

Aus der Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und
Thoraxchirurgie, der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss des Monomers TEGDMA als Bestandteil
dentaler Composite auf das COP9 Signalosom und die
Differenzierung von LiSa-2 Zellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Andreas Heine

aus Finsterwalde

Datum der Promotion: 10. März 2017

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
1.1 Dentale Composite	6
1.1.1 Organische Matrix	7
1.1.2 Polymerisation	8
1.1.3 Anorganische Matrix.....	10
1.1.4 Verbundphase	12
1.2 Adhäsive	13
1.3 TEGDMA	14
1.4 Der Einfluss von Monomeren dentaler Composite wie TEGDMA und HEMA auf die osteogene Differenzierung	16
1.5 Das COP9 Signalosom (CSN)	16
1.5.1 Der Aufbau des CSN und die Regulation der Expression der CSN- Untereinheiten	17
1.5.2 Das CSN und seine Rolle im UPS	19
1.5.3 Die Rolle des CSN bei der Differenzierung von Adipozyten	21
2. Fragestellung und Zielsetzung	23
3. Material und Methoden	24
3.1 Material	24
3.1.1 Geräte	24
3.1.2 Chemikalien.....	25
3.1.3 Antikörper	25
3.1.4 Kits	26
3.1.5. Puffer.....	26
3.1.6 Zellkulturmedium	27
3.1.7 Eukaryotische Zelllinie:.....	27
3.2 Methoden	28
3.2.1 Zellkultur	28
3.2.2 Proteinbiochemische Methoden	29
4. Ergebnisse	38
4.1 Der Einfluss von TEGDMA auf das CSN und auf CSN-assoziierte Proteine in LiSa-2 Zellen	38
4.2 Der Einfluss von TEGDMA auf die Differenzierung von LiSa-2 Präadipozyten	40
4.3 Der Einfluss der TEGDMA Behandlung auf die VEGF Produktion und den Apoptosegrad der LiSa-2 Zellen	43
4.4 NAC schützt vor TEGDMA Behandlung	46
5. Diskussion	47
5.1 Der Einfluss von TEGDMA auf das COP9 Signalosom	48
5.2 LiSa-2 Zellen, ein Zellmodell zum Studium der Wirkung von TEGDMA auf die Zelldifferenzierung	49
5.3 TEGDMA beeinträchtigt die LiSa-2 Zellvitalität und induziert Apoptose in LiSa-2 Zellen während der Differenzierung	51
5.4 Möglicher Mechanismus der TEGDMA Wirkung	52
5.5 Mögliche Auswirkungen für die Klinik und Ausblicke	52
6. Literaturverzeichnis	54
7. Anhang	61

Zusammenfassung

Dentale Composite sind für die moderne Zahnheilkunde essentiell. Sie dienen nicht nur der direkten und substanzschonenden Füllungstherapie, sondern werden auch als Befestigungsmaterial für indirekte, laborgefertigte Konstruktionen eingesetzt. In der organischen Phase der Composite kommen verschiedenste Monomere zum Einsatz. Das wichtigste Comonomer moderner Composite ist das Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA), ein Ester aus α,β -Methacrylatsäure und Ethylenglycol. Viele Studien bescheinigen dem Monomer TEGDMA cytotoxische und genotoxische Wirkungen verbunden mit negativen Effekten auf die Vitalität von Zellen und auf die Differenzierung von Fibroblasten der Pulpa. Bisher sind jedoch die genauen Mechanismen der TEGDMA Wirkung unbekannt.

Um den Einfluss von TEGDMA auf die Differenzierung von humanen Zellen zu untersuchen, wurden LiSa-2 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von TEGDMA inkubiert. LiSa-2 Präadipozyten sind ein anerkanntes und gut charakterisiertes Modellsystem für Untersuchungen der Differenzierung von Adipozyten, die Adipogenese. Dieser Prozess ist durch eine Vielzahl von regulatorischen Proteinen kontrolliert, deren Stabilität durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) bestimmt wird. Eine Komponente des UPS, das COP9 Signalosom (CSN), ist für die Adipogenese entscheidend. Das CSN bindet an Cullin-RING-Ubiquitin-Ligasen (CRL) und reguliert deren Aktivität. Die CRL ubiquitinieren wichtige Regulatoren der Adipogenese, wie p27 und CHOP, was zum Abbau durch das 26S Proteasom führt.

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragen beantwortet werden: Wie wirkt sich die TEGDMA Behandlung von LiSa-2 Zellen auf das CSN, auf Komponenten der CRL wie Cul1 und Cul3 und auf die Substrate p27 und p53 aus? Wie wird die Differenzierung von LiSa-2 Präadipozyten durch TEGDMA beeinflusst? Gibt es einen Effekt von TEGDMA auf die Apoptose von LiSa-2 Zellen? Was ist der Mechanismus der TEGDMA Wirkung in LiSa-2 Zellen?

Die Ergebnisse zeigen eine reduzierende Wirkung von TEGDMA auf die Untereinheiten des CSN und auf einige CSN-assoziierte Proteine. In Abhängigkeit von der TEGDMA Konzentration wurde eine Verlangsamung der Adipogenese in LiSa-2 Zellen beobachtet. Bei hohen TEGDMA Konzentrationen wurde eine verstärkte Apoptose in LiSa-2 Zellen gemessen und die Vitalität der Zellen nahm drastisch ab. Interessanterweise konnte die durch TEGDMA hervorgerufene

gesunkene Vitalität der Zellen durch den Einsatz von N-Acetylcystein (NAC), einem Antioxidants, signifikant verbessert werden. Ob die Senkung der CSN Untereinheiten in Anwesenheit von TEGDMA auf den Anstieg von Reactive Oxygen Species (ROS) zurückzuführen ist, muss in der Zukunft weiter untersucht werden.

Als Schlussfolgerung für die Zahnheilkunde ergibt sich, dass die Konzentration des TEGDMA Monomers durch optimale Polymerisationsraten möglichst gering gehalten werden muss. Ob NAC als Schutz gegen verbleibende TEGDMA Monomere eingesetzt werden kann, bedarf weiterer Forschungen.

Abstract

Dental Composites are essential for current dentistry. They serve not only as direct and substance-protecting filling material, but are also used as fixation material for indirect, labor-made construction. The organic phase of composites contains different monomers. The most important monomer of current composites is the triethylenglycolmethacrylat (TEGDMA), an ester composed of α,β -methacrylat acid and ethylenglycol. Many studies evidenced cytotoxic and genotoxic properties of the TEGDMA monomer connected with negative effect on cell vitality and on the differentiation of fibroblast pulp cells. At the moment the exact mechanisms of TEGDMA action are unknown.

To study the influence of TEGDMA on differentiation of human cells LiSa-2 cells were treated with different concentrations of TEGDMA. LiSa-2 preadipocytes are a recognized and well-characterized model system for the investigation of adipocyte differentiation called adipogenesis. This process is controlled by a large number of regulatory proteins, the stability of which is determined by the ubiquitin proteasome system (UPS). One component of the UPS, the COP9 signalosome (CSN), is essential for adipogenesis. The CSN binds to cullin-RING-ubiquitin ligases (CRLs) and regulates their activity. CRLs ubiquitinate important regulators of adipogenesis, such as p27 and CHOP, and target them for proteolysis by the 26S proteasome.

In the present study the following questions were answered: How does TEGDMA treatment of LiSa-2 cells influence the CSN, components of CRLs such as Cul1 and Cul3 and the substrates p27 and p53? How does TEGDMA influence the differentiation of LiSa-2 preadipocytes? Is there an effect of TEGDMA on the apoptosis in LiSa-2 cells? What is the mechanism of TEGDMA action in LiSa-2 cells?

The data shows that TEGDMA treatment leads to a reduction of CSN subunits and of CSN-associated proteins. In dependence on the TEGDMA concentration a retardation of adipogenesis in LiSa-2 cells was observed. At high TEGDMA concentrations an increase apoptosis rate in LiSa-2 cells was measured and cell vitality drastically decreased. Interestingly, the decreased cell vitality induced by TEGDMA treatment was significantly rescued by using the antioxidant N-acetylcystein (NAC). Whether the reduction of CSN subunits in the presence of TEGDMA is due to the elevation of reactive oxygen species (ROS) has to be studied in the future.

As a consequence for dentistry we conclude that the TEGDMA monomer has to be kept low by optimized polymerization rate. Whether NAC can be used as protection against remaining TEGDMA monomers, needs additional research.

1. Einleitung

1.1 Dentale Composite

Dentale Composite (lat. compositum: Gemisch) sind als zahnfarbene, plastisch zusammengesetzte Werkstoffe definiert. Durch die Anwendung dentaler Composite und deren adhäsive Befestigung an der Zahnhartsubstanz wurden neue Möglichkeiten der Zahnrestauration ermöglicht. Sie dienen nicht nur der direkten und substanzschonenden Füllungstherapie, sondern werden auch als Befestigungsmaterial für indirekte, laborgefertigte Konstruktionen (Inlay, Kronen, usw.) eingesetzt. Sie sind Bestandteil einiger Unterfüllungs-materialien, werden in der Kariesprävention als Fissurenversiegelung bei Kindern und Jugendlichen eingesetzt und als Befestigungsmaterial von kieferorthopädischen festsitzenden Apparaturen verwendet.

Auch für die Herstellung von herausnehmbarem Zahnersatz (Prothesen oder Teilprothesen) und herausnehmbarem kieferorthopädischen Apparaturen werden Compositmaterialien eingesetzt, welche den dentalen Compositen in Ihren Bestandteilen und Eigenschaften sehr ähnlich sind. Composite sind aus der Zahnheilkunde nicht mehr weg zu denken.

Dentale Composite bestehen aus drei Hauptbestandteilen: der organischen Matrix (Monomere), der dispersen Phase (Füllkörper) und der Verbundphase (Tab. 1). Nach einbringen in eine Kavität härten die Composite chemisch oder durch Energiezufuhr (Licht, Wärme) aus (Hellwig E, 1999). Durch den Einsatz leistungsfähiger Dentin-Bonding-Systeme werden moderne Composite als universelle Füllungsmaterialien für fast alle Kavitätenarten benutzt.

Bestandteile	Kurzbeschreibung	Chemische Bezeichnung
Organische Matrix		
Monomere	Bis-GMA	Bisphenol-A-Glycidyl-Methacrylat
	UDMA	Urethandimethacrylat
Comonomere	TEGDMA	Triethylen-Glycol-Dimethacrylat
	EDMA	Ethylen-Glycol-Dimethacrylat
Initiatoren		
(Photopolymerisat)	Peroxide	Kampferchinon
Inhibitor (Stabilisator)		z.B. Eugenol (sterische Phenole)
Anorganische Matrix		
Makrofüller	Quarz, Glas, Keramik	Lithium-Aluminium-Silikat
	feinstteiliges	
Mikrofüller	Siliziumdioxid	z.B. pyrogenes SiO ₂
Verbundphase		
Haftvermittler	Silan	z.B. Methacryloxypropyl-trimethoxysilan

Tab. 1: Hauptbestandteile lichthärtender dentaler Composite (Hellwig E, 2007).

1.1.1 Organische Matrix

Die organische Matrix beinhaltet Monomere, Initiatoren, Stabilisatoren und andere Additive (z.B. optische Aufheller, Photostabilisatoren, Weichmacher). Die Kompositmatrix ist niedrig viskös und zeigt eine entsprechend gute Fließfähigkeit (Polydorou et al, 2007).

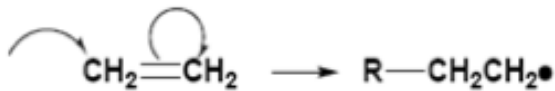
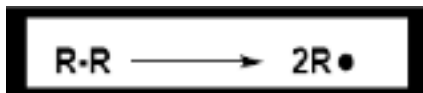
Die Monomere sind multifunktionelle Methacrylate mit der Grundformel M-R-M. Das mit R bezeichnete organische Molekülskelett kann aus aliphatischen Ketten, Urethanpräpolymeren, aromatischen Ringen und Polyäthern bestehen. R ist für die physikalischen und mechanischen Eigenschaften, wie z.B. Viskosität, Polymerisationsschrumpfung, Druck- und Zugfestigkeit verantwortlich. Die reaktive Methacrylgruppe $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)-\text{CO}-\text{O}-$ wird durch M gekennzeichnet.

1.1.2 Polymerisation

Die Initiatoren zerfallen bei einer Aktivierung durch chemische oder physikalische Aktivatoren in energiereiche Moleküle (Radikale). Diese Radikale addieren sich unter Öffnung der Doppelbindungen an das Monomer (Abb. 1) (Eichner, 1996).

Aufgrund der geöffneten Doppelbindung wird das Monomer ebenfalls zum Radikal und öffnet eine Doppelbindung von dem benachbarten Monomer. Dieser Polymerisationsprozess führt zur Ausbildung von Polymerketten (Schulz, 2003).

Polymerisationsreaktion:



Radikalbildung, Startreaktion und Kettenwachstum:

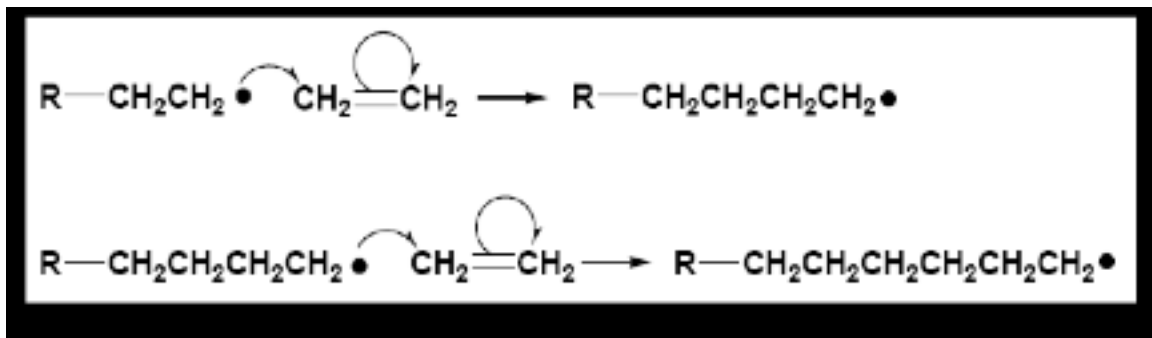


Abbildung 1: Polymerisationsreaktion mit Startreaktion und Kettenwachstum

Wird der Radikalzustand beendet kommt es zum Abbruch der Kettenreaktion (Abb. 2). Solch ein Abbruch kann durch Kombination oder Disproportionierung bei Begegnung zweier Radikalenden oder durch das Zusammentreffen des Kettenendes mit einem Initiatorradikal hervorgerufen werden. Auch fehlende Monomere können das Kettenwachstum stoppen. Eine zu geringe Konzentration von Monomeren, so dass nicht mehr genügend Energie für die Reaktion vorhanden ist, hat den gleichen Effekt. Als Restmonomere bezeichnet man die nicht umgesetzten Monomermoleküle, welche im Composite zurück bleiben (Schulz, 2003; Spahl et al, 1991).

Kombination:**Disproportionierung:**

Abbildung 2: Abbruchreaktion durch Kombination und Disproportionierung

Ein möglichst hoher Umsetzungsgrad ist Ziel einer jeden Polymerisation. Je höher der Umsetzungsgrad der Monomermoleküle ist, umso besser sind die mechanischen, physikalischen und physiologischen Eigenschaften der Compositmatrix zu bewerten. Für eine vollständige Polymerisation der Composite ist die Reaktionsfreudigkeit (syn. Reaktionsvermögen, Reaktionsfähigkeit) der Initiatoren entscheidend (Lutz F, 1993; Lutz F, 1976).

Da die Viskosität des Composites durch anorganische Füllkörper ansteigt, muss das Composit mit fließfähigeren Monomeren verdünnt werden. So lässt es sich besser applizieren und modellieren. Als Verdünnungsmittel dienen Comonomere, wie z.B. Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA) und Ethylenglycoldimethacrylat (EGDMA) (Anseth et al, 1996; Schulz, 2003).

Eine typisches Verhältnis zwischen Monomer und Verdünnungsmittel setzt sich aus 75 Masse-% Bis-GMA und 25 Masse-% TEGDMA zusammen (Cahn R W, 1992). Buonocore führte die *Lichthärtung* ein, welche die Verarbeitung von Compositen deutlich gegenüber 2-phasigen chemisch härtenden Compositen verbesserte (Buonocore & Davila, 1973). Nach Weiterentwicklungen mit neuen Initiatoren im sichtbaren Wellenbereich konnten photopolymerisierende Einkomponentenmaterialien durch Halogenlampen bis zu 4 mm Durchhärtungstiefe ausgehärtet werden (Reinhardt & Vahl, 1979). Der für dentale Zwecke am häufigsten eingesetzte Photoinitiator ist Campherchinon (CC), ein α -Diketon. Sein Absorptionsspektrum liegt in einem Wellenlängenbereich von 360-520 nm, wobei es bei einer Wellenlänge von 470 nm aktiviert wird. Ein tertiäres Amin oder Phosphin dient dabei als reduzierendes Agens. Der entstandene Komplex zerfällt in Radikale und die Polymerisationsreaktion startet (Hellwig E, 1999).

Nicht reagierte Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen sind anfälliger gegenüber Abbaureaktionen. Dies führt zu Verfärbungen, reduzierter Verschleißfestigkeit und

Freisetzung von Methacrylaten (Ferracane, 1994; Oysaed et al, 1988).

Während der Aushärtung entsteht an der Oberfläche eine Sauerstoffinhibitionsschicht (Hellwig E, 1999). Diese stört die Polymerisation bis zu einer Tiefe von 50 – 100 µm (Finger & Dreyer Jorgensen, 1976). Durch die Reaktion des Sauerstoffs mit den wachsenden Ketten bilden sich neue Radikale mit verminderter Reaktionsfreudigkeit. So kommt es zum langsamen Polymerisationsstopp. Die Sauerstoffinhibitionsschicht kann theoretisch durch Schutzgas, Gel, Überschussabtragung etc. verhindert werden (Reinhardt & Vahl, 1979; Vankerckhoven et al, 1982). Dies ist in der alltäglichen Zahnheilkunde jedoch kaum praktikabel und während der Schichtung der Füllung auch nicht erwünscht. Durch die Sauerstoffinhibitionsschicht und der daraus resultierenden unvollständigen Polymerisation kommt es bei einem erneuten auftragen eines Composites zu einem stabilen Verbund, da noch freie geöffnete Doppelbindungen vorhanden sind. Durch mögliche Verunreinigungen, Luftsauerstoff, Licht oder Wärme neigen ungesättigte Monomere bei der Lagerung zur langsamen Polymerisation. Inhibitoren sind Stabilisatoren, welche diese vorzeitige Polymerisation, durch Reaktion mit vorzeitig entstehenden Radikalen, verhindern sollen (Eichner, 1996).

Photostabilisatoren sind Lichtschutzmittel, welche Licht unterhalb von 350 nm möglichst vollständig absorbieren können. Somit sollen Verfärbungen durch UV- und Tages-Licht verhindert werden (Viohl, 1986).

Anorganische und organische *Pigmente* dienen der Farbgebung in dentalen Compositen. Fluoreszierende Agentien verleihen dem Material die nötige Fluoreszenz. Metalloxide, meist Eisen- und Titanoxide bilden dabei die anorganischen Pigmente. Diese müssen über gute Farbstabilität bei chemischen Einflüssen und Wärme verfügen (Eichner, 1996).

1.1.3 Anorganische Matrix

Durch die Zugabe von Füllstoffen werden die physikalischen und mechanischen Eigenschaften der Compositmatrix, wie z.B. die Druck- und Zugfestigkeit verbessert (Eichner, 1996; Menges, 1990).

Als anorganische Füllstoffe werden Quarz, Keramik und Siliziumdioxid eingesetzt, sowie Metalloxide. Compositmaterialien werden nach Größe ihrer Füllkörper unterschieden, welche zwischen 1-100 µm bis hin zu 2-4 nm betragen kann (Powell, 1992).

Eine Einteilung der klassischen Compositmaterialien nach der Größe der Füllkörper und nach dem Materialtyp (Ernst C.-P., 2003) kann z.B. folgendermaßen aussehen:

- Makrofüllercomposite
- Mikrofüllercomposite
- Hybridcomposite
- Nanocomposite
- Matrix-modifizierte Compositmaterialien:
 - o Kompomere
 - o Ormocere
- Schrumpfreduzierte Composite – Silorane

Makrofüller besitzen splitterförmige Füllstoffe aus zermahlenem Quarz, Glas oder Glaskeramiken mit einer mittleren Korngröße von 1,5 bis 5 μm und einem Füllstoffgehalt von ca. 75 Gew.-% (Hellwig E, 1999; Schulz, 2003). Da die Größe dieser Makrofüller über der Wellenlänge des Lichtes liegt sind sie für das menschliche Auge erkennbar. Zusätzlich kann es zu einem Herausbrechen der Makrofüller aufgrund der Härteunterschiede zwischen organischer Matrix und disperser Phase kommen.

Füllstoffe mit einer Größe $< 0,1 \mu\text{m}$ sind Mikrofüller und erreichen einen Füllstoffgehalt von ca. 50 Gew.-%. Mikrofüller bestehen größtenteils aus kleinstteiligen, hochdispersen SiO_2 - Partikeln (Eichner, 1996). Die Entwicklung inhomogener Mikrofüller führte zu einem Füllstoffgehalt von 70-80 Gew.-% und verbesserten Materialeigenschaften. Durch die Kombination von Makro- und Mikrofüllerkompositen wurden Hybridcomposite entwickelt, welche einen Füllstoffgehalt von 85 Gew.-% erreichten. Die enthaltenen Füllkörper setzen sich zu 85-90% aus Makrofüllern und 10-15% aus Mikrofüllern zusammen. Siliziumdioxidpartikel bilden die disperse Phase.

Durch Nanotechnologie konnten Materialien mit neuen Eigenschaften entwickelt werden, sogenannte Nanocomposite. Diese Technologie ermöglichte Füllkörper in einer Dimension von 0,1 bis 100 nm. Diese Composite verfügen über eine gute Polierbarkeit bei einer Festigkeit eines Hybridcomposits. Die Füllstoffe besitzen im Vergleich zu den Hybridcompositen eine sehr große Oberfläche und damit eine hohe Oberflächenenergie. Die Partikeloberfläche verhindert eine Verklumpung zu gewöhnlichen Mikropartikeln.

1.1.4 Verbundphase

Die Verbundphase dient einer chemischen Verbindung, mittels Silanen, zwischen der organischen Matrix und den anorganischen Füllstoffen (Eichner, 1996). Um die Haftung zu verbessern werden mechanische Retentionsmechanismen angewandt. Zur Oberflächenvergrößerung kommen Unterschnitte, Anätzung oder Oberflächenaufräuhung der Partikel zum Einsatz. Ein Kopplungsagens, welches gleichzeitig hydrophobe und hydrophile Bestandteile besitzt, wird zur chemischen Anbindung der anorganischen Füllkörper an die organische Polymermatrix benötigt. Monomere sind hydrophob und benetzen daher die SiOH-Oberfläche nicht ausreichend. Die Füllerpartikel werden mit einem trifunktionellen Organsilan behandelt und somit wird die hydrophile SiOH-Oberfläche hydrophobiert und chemisch durch eine Esterreaktion (Si-O-Bindungen) an den Füllstoff adaptiert (Schulz, 2003).

Im ersten Schritt wird Silan in der Silanisierungsreaktion zum Silanol hydrolysiert und auf die anorganischen Füller aufgebracht (Eichner, 1996). Eine durch die Reaktion erhöhte Temperatur führt zur Wasserabspaltung und zum Aufbau kovalenter Sauerstoffbrückenbindungen zwischen der Füllstoffoberfläche und dem Silanol (Bowen, 1963; Schulz, 2003) (Abb. 3).

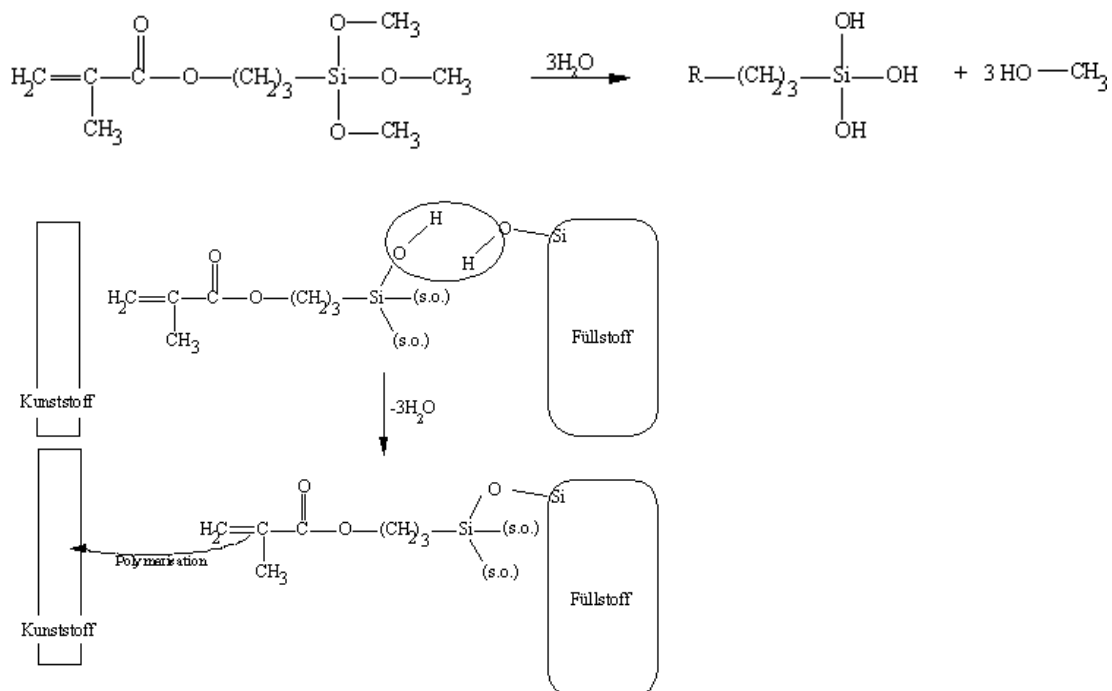


Abbildung 3: Mögliche Reaktionen der Silanisierung.

Es kommt zu kovalenten C-C-Bindungen zwischen den freien endständigen Methacrylatgruppen und dem Matrixkunststoff. Das Silan wird in das Polymergeflecht eingebunden (Schulz, 2003). Durch den chemischen Verbund zwischen disperser Phase und organischer Matrix werden die Eigenschaften der Composite, wie Druckfestigkeit, Biegefestigkeit, Abrasionsfestigkeit und Beständigkeit gegen hydrolytische Abbauvorgänge, verbessert.

Grundsätzlich stellt die Silanschicht der Verbundphase eine Schwachstelle in allen Compositen dar, da es durch saure Hydrolyse zur Lösung des Verbundes kommen kann. In der Folge kommt es zum Verlust von Füllkörpern (Craig R, 2006).

1.2 Adhäsive

Um einen dauerhaften und randdichten Verbund zwischen Zahnhartsubstanz und Composit zu erreichen benötigt man dentale Adhäsive mit niedriger Viskosität. Da die Zahnhartsubstanz hydrophil ist und die Composite hydrophob, ist ohne Haftvermittler keine mikromechanische Verankerung möglich.

Im Rahmen der Total-Etch-Technik werden Schmelz und Dentin gemeinsam mit Säure vorbehandelt, meist mit 30-40%ige Phosphorsäure. Als erstes wird ein hydrophiler Primer und danach ein hydrophobes Adhäsiv aufgetragen (Van Meerbeek et al, 1998). Bei dieser Konditionierung durch Phosphorsäure wird die, durch die Präparation der Kavität entstandene, organische Schmierschicht entfernt. Auch anorganische Bestandteile des intra- und peritubulären Dentins werden herausgelöst. Ein Austrocknen der freigelegten Kollagenfibrillen sollte vermieden werden um eine möglichst vollständige Penetration des Primers in das Kollagengeflecht zu gewährleisten, daher wird ein „rewet“ des Kollagengeflechtes empfohlen. Am Zahnschmelz werden angeschliffen Hydroxylapatit-Kristalle herausgelöst und es bildet sich ein Ätzmuster, welches einer mikromechanischen Verankerung dient. Die Dentintubuli werden durch Tagbildung und Hybridschicht verschlossen (Kugel & Ferrari, 2000).

Durch konsequente Weiterentwicklung wurden Primer und Adhäsiv zu einem Ein-Komponenten-Material vereinigt, was die Applikation erleichtert (Ferrari et al, 1997). Die neuen Adhäsivsysteme der Non-Rinse-Technik sind selbstkonditionierende und selbstprimierende Adhäsive in 2 Komponentensystemen oder All-In-One-Systemen (Van Meerbeek et al, 2003). Eine klassische Säureätzung ist nicht nötig und damit

wird ein Kollagenkollaps durch absprühen der Säure und Trocknung der Kavität vorgebeugt. Die verwendeten Primer müssen genügend Säure mit niedrigem pH-Wert besitzen um Schmierschicht zu entfernen, Dentin zu demineralisieren und ein retentives Prismenmuster am Schmelz freizulegen (Moszner et al, 2005).

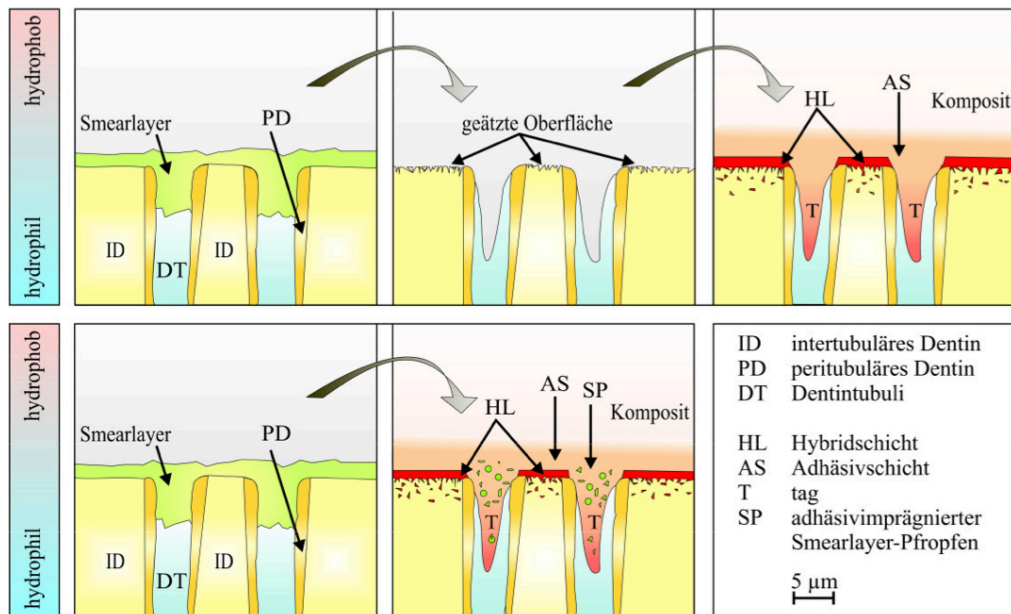


Abbildung 4: Die obere Reihe zeigt den Verlauf einer klassischen Total-Etch-Technik, hierbei wird der Smearlayer durch 30%ige Phosphorsäure entfernt und zurück bleibt eine geätzte Oberfläche mit freigelegten Kollagenfibrillen, danach wird das Adhäsive aufgetragen, das notwendige „reweten“ des Kollagengeflechts wurde nicht dargestellt. In der Unteren Reihe wird die Non-Rinse-Technik gezeigt, bei der man auf ein Anätzen der Oberfläche verzichten kann, da die zur Verfügung stehenden Adhäsivsysteme dies selbst übernehmen.

1.3 TEGDMA

TEGDMA ist ein wichtiger Bestandteil in dentalen Compositen (15-25%) und dentalen Bonding-systemen (30-50%). TEGDMA dient der verbesserten Haftung des Bonders, es verringert den durch die Polymerisationsschrumpfung entstehenden Randspalt, es erhöht die Verschleißfestigkeit und beeinflusst die Viskosität. Es wurde mehrfach gezeigt, dass nach der Polymerisation freie, unreaktierte Monomere vorhanden sind. Nicht umgesetzte Monomere können in die wässrige Phase übergehen und in umliegende Bereiche diffundieren (Gerzina & Hume, 1996). Da die Mundhöhle ein wässriges Milieu besitzt, sind gerade die Monomere, welche in eine wässrige Phase übergehen von großer Bedeutung in Bezug auf dentale

Composite. TEGDMA wurde als der Hauptbestandteil der Monomere in wässriger Phase identifiziert (Geurtsen, 1998; Geurtsen et al, 1999).

Bei Kontakt des Füllmaterials mit der Pulpa oder Gingiva gelangt TEGDMA direkt ans und ins Gewebe. Befindet sich, wie in fast allen Kavitäten, noch Dentin zwischen dem Composit und der Pulpa, so kann TEGDMA durch das Dentin zur Pulpa diffundieren (Gerzina & Hume, 1996). Dieses Phänomen ist auf den Aufbau des Dentins geschuldet. Neuere Studien zeigten, dass TEGDMA zu entzündlichen und nekrotischen Prozessen am Pulpengewebe führen kann, vermehrt bei direktem Kontakt zur Pulpa als Bestandteil eines Bonding-Systems oder eines Überkappungsmaterials (Costa et al, 2000; Pereira et al, 2000). Trotz vieler Studien konnte bis zum heutigen Stand der zytotoxische Mechanismus und der zelluläre Angriffspunkt von TEGDMA oder anderen Monomeren aus dentalen Compositen nicht gefunden werden.

Schweikl et al. demonstrierten mutagene Wirkungen des TEGDMA an Chinese Hamster Zelllinie V79 (Schweikl et al, 2001). Es wurde gezeigt, dass TEGDMA die Glutathion (GSH)- Konzentration absenkt und gleichzeitig es zur Anhebung der Konzentration von Reactive Oxygen Species (ROS) kommt (Schweikl et al, 2006). Der zugrundeliegende Mechanismus ist noch unklar. In dieser Studie wurden Gingivafibroblasten mit 0,9 mM TEGDMA inkubiert. Diese Konzentration wurde vorher als 50% Vitalität experimentell ermittelt. Diese Studie zeigt einen Abfall des GSH bereits nach 30 min. GSH konnte nach 4h nicht mehr nachgewiesen werden. Ebenfalls zeigt diese Studie einen protektiven Effekt von Antioxidantien wie NAC (N-acetylcystein), Trolox (Vitamin E) und Ascorbate (Schweikl et al, 2007; Schweikl et al, 2006).

Eine weitere Studie hat gezeigt, dass das Co-Monomere TEGDMA zu Genmutationen führt, anhand der Bildung von Mikrokernen als Indikation für chromosomalen Schaden und von DNA-Strang-Brüchen. Als Konsequenz der DNA-Schäden kommt es zur Verzögerung des Zellzyklus in der G1 und G2/M Phase, in Abhängigkeit zur Konzentration von TEGDMA. Auch in dieser Studie wurde gezeigt, dass TEGDMA die intrazelluläre Glutathionkonzentration senkt. Daraus resultiert eine Erhöhung der ROS-Konzentration, welche zytotoxische Effekte fördert und Wege für die Apoptose aktiviert. Die zytotoxischen und genotoxischen Effekte von TEGDMA konnten durch Antioxidantien, wie NAC, Trolox und Ascorbate, abgeschwächt werden (Schweikl et al, 2006).

ROS können ebenfalls ein komplexes Netzwerk von Redox-Reaktions-Makromolekülen aktivieren, inklusive Redox-Sensitive Transkriptionsfaktoren. Die Apoptose in Pulpazellen durch TEGDMA wurde mit der Inhibition des Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3- κ B) Zellschutzsignalwegs assoziiert. Auch in dieser Studie konnten die Mechanismen nicht vollständig geklärt werden.

Vermeehrt werden beruflich bedingte Hauterkrankungen wie Kontaktdermatitis bei zahnärztlichem Personal festgestellt, welche auf dentale Composite zurück zu führen sind. Auch hier soll TEGDMA eine wichtige Rolle spielen. (Alanko et al, 2004; Kanerva et al, 2001).

1.4 Der Einfluss von Monomeren dentaler Composite wie TEGDMA und HEMA auf die osteogene Differenzierung

Einige Studien haben gezeigt, dass Monomere von dentalen Composite wie TEGDMA und 2-hydroxyethyl Methacrylat (HEMA) zytotoxische Effekte auf orale Gewebe während oder nach einer restaurativen dentalen Behandlung haben (Chang et al, 2005; Stanislawski et al, 2003). TEGDMA und HEMA hemmen die Zelldifferenzierung was für humane Pulpazellen, für Präosteoblasten und für die humane Osteosarcoma-Zelllinie MG63 gezeigt wurde (About et al, 2005; About et al, 2002; Imazato et al, 2009; Kim et al, 2011b).

Für die reparative Dentinogenese ist die Differenzierung von Pulpa-Stammzellen zu reifen Odontoblasten essentiell. Dieser Prozess kann durch Substanzen wie TEGDMA und HEMA signifikant beeinträchtigt werden. Die genaue Kenntnis der molekularen Mechanismen ist von größter Bedeutung, um die TEGDMA- und HEMA-Effekte zu verhindern.

1.5 Das COP9 Signalosom (CSN)

Das COP9 Signalosom (CSN) ist ein essentieller Regulator des Ubiquitin (Ub)-Proteasom-Systems (UPS), das wichtigste proteolytische System in eukaryotischen Zellen. In Kooperation mit dem UPS ist das CSN an so wichtigen zellulären Prozessen beteiligt wie Zellzyklus (Dohmann et al, 2008; Liu et al, 2003), DNA-Reparatur (Groisman et al, 2003; Matsuoka et al, 2007; Shiloh, 2006), Angiogenese (Braumann et al, 2008) und Zelldifferenzierung (Huang et al, 2012).

Das CSN wurde 1996 als Repressor des Licht-abhängigen Wachstums in *Arabidopsis thaliana* entdeckt (Chamovitz et al, 1996) und konnte 1998 erstmalig in

humanen Zellen identifiziert werden (Seeger et al, 1998).

1.5.1 Der Aufbau des CSN und die Regulation der Expression der CSN-Untereinheiten

Die Kristallstruktur des rekombinanten humanen CSN (Lingaraju et al, 2014) und die 3D Struktur des humanen gereinigten CSN basierend auf der Cryo-Elektronenmikroskopie (Rockel et al, 2014) wurden kürzlich veröffentlicht. Es war bekannt, dass der strukturelle Aufbau des CSN Ähnlichkeiten mit dem 26S Proteasom Lid Komplex und dem eukaryotischen Translation Initiation Komplex 3 (eIF3) hat (Lingaraju et al, 2014; Rockel et al, 2014). In Mammalia besteht das CSN aus 8 Untereinheiten, CSN1-CSN8 (Abb. 5) (Deng et al, 2000).

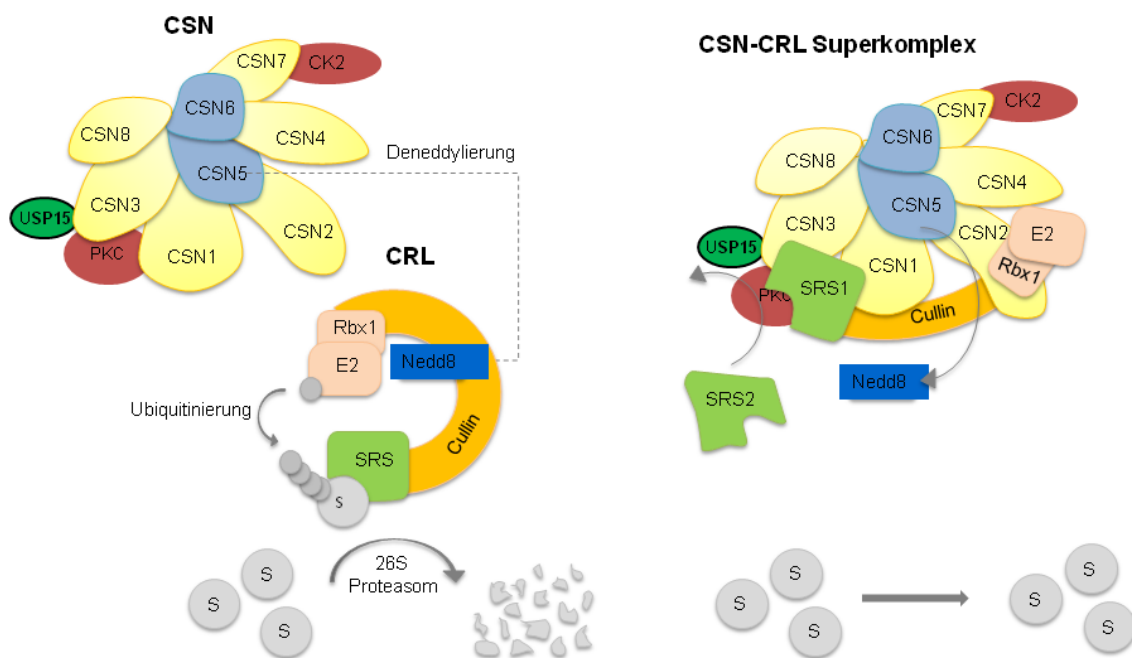


Abbildung 5: Das CSN besteht aus 8 Untereinheiten, deren Interaktion schematisch dargestellt ist. Es gibt 6 Untereinheiten mit PCI Domänen (gelb) und 2 Untereinheiten mit MPN Domänen (hellblau). Die Kinasen CK2 und PKC sind mit dem CSN assoziiert. Die Ubiquitin-spezifische Protease 15 (USP15) bindet ebenfalls an das CSN. Das CSN bildet Superkomplexe mit Cullin-RING-Ubiquitin-Ligasen, die durch das CSN deneddylt und inaktiviert werden (Abb. modifiziert nach (Gummlich et al, 2013)).

Die Untereinheiten CSN1-4, 7 und 8 enthalten eine PCI (Proteasom, COP9 Signalosome, Initiation factor 3) Domäne. Die PCI Domänen sind wichtig für Interaktionen zwischen den CSN-Untereinheiten und mit anderen Proteinen. Außerdem bilden sie das Gerüst des Komplexes (Tsuge et al, 2001; Wei & Deng, 2003). Die Untereinheiten CSN5, auch als JAB1 (Jun-activation domain-binding protein 1) bezeichnet und CSN6 enthalten eine MPN (Mpr-Pad1-N-terminal) Domäne. Die MPN-Domäne des CSN5 hat zusätzlich ein JAMM-Motiv (JAB1, MPN-Domäne, Metalloenzym), welches als katalytisches Zentrum für die enzymatische Aktivität des CSN, die Deneddylierungsaktivität dient (Cope et al, 2002). Außerdem sind die Proteinkinasen Casein Kinase 2 (CK2) und Proteinkinase D (PKD) mit dem CSN-Komplex assoziiert. Diese Kinasen phosphorylieren verschiedene Substrate des UPS (Bech-Otschir et al, 2001; Uhle et al, 2003).

Darüber hinaus steht das deubiquitinierende Enzym USP15 mit dem CSN in Wechselwirkung (Hetfeld et al, 2005; Zhou et al, 2003) (siehe Abb. 5). USP15 ist eine Cysteinprotease und gehört zur Familie der Deubiquitinierungsenzyme (DUBs). DUBs sind in wichtige Schritte des Ub-Signalwegs involviert und kontrollieren die Stabilität von Proteinen. Sie sind beteiligt an der Bereitstellung von freiem Ub, an der Modifizierung von Ub-Ketten und an der Stabilisierung von bereits Ub-markierten Proteinen durch Abspaltung der Ub-Ketten (Komander, 2011). USP15 bewahrt Komponenten von Cullin-RING-Ub Ligasen (CRL) vor Autoubiquitinierung und dem Abbau durch das UPS. Es enthält ein Zink-Finger-Motiv, was für die Spaltung von Poly-Ub-Ketten notwendig ist (Hetfeld et al, 2005).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass miRNAs der let-7 Familie die mRNA der CSN-Untereinheiten blockieren und somit die Translation bzw. die folgende Expression der CSN-Untereinheiten hemmen können (Leppert et al, 2011). miRNAs sind endogene, nicht kodierende kleine RNA Moleküle, bestehend aus 18-25 Nukleotiden. Sie regulieren die Proteinexpression über den Abbau von mRNAs oder durch Hemmung der Translation. Durch die Blockade der miRNA let-7a-1 steigt die Expression des CSN, dies erfolgt über den c-Myc/Lin28B/let-7 Signalweg (Abb. 6) (Leppert et al, 2011).

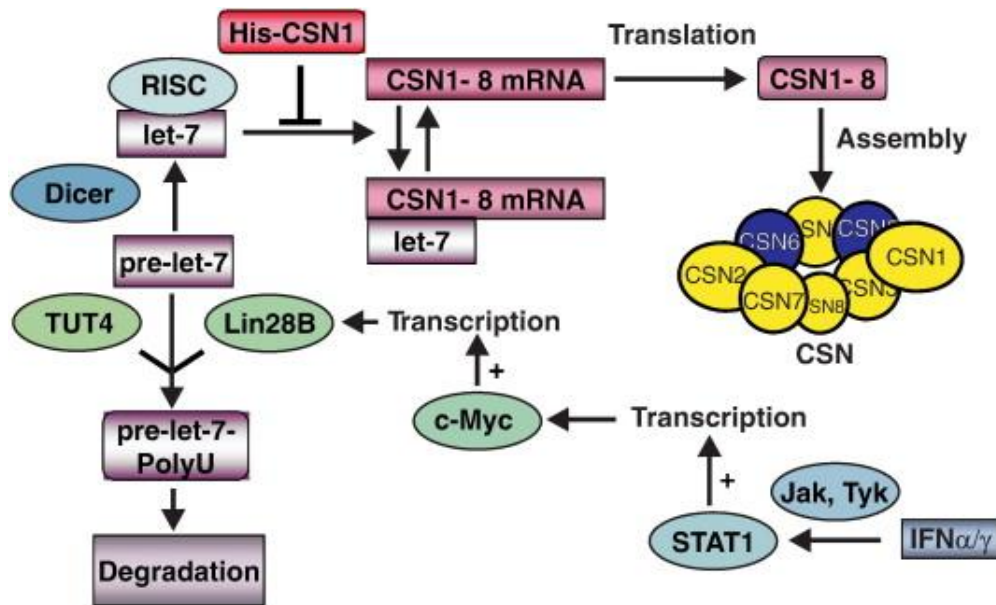


Abbildung 6: c-Myc/Lin28B/let-7 Signalweg. Let-7 miRNA blockieren die mRNA der CSN-Untereinheiten und damit deren Expression. Durch die STAT1-vermittelte Aktivierung von c-Myc wird der Abbau der pre-let-7a-miRNA durch das RNA-binding-Protein Lin28B und die TUT4ase induziert, was die Expression der CSN-Untereinheiten zur Folge hat (Abb. von (Leppert et al, 2011)).

Der Transkriptionsfaktor STAT1 aktiviert c-Myc, wodurch das RNA-binding-Protein Lin28B mit Hilfe der TUTase4 (TUT4) den Abbau der pre-let-7a miRNA induziert (Heo et al, 2009). Der c-Myc/Lin28B/let-7 Signalweg kann durch IFN α induziert werden, was für Differenzierungs- und Entwicklungsprozesse von Bedeutung sein könnte (Leppert et al, 2011).

1.5.2 Das CSN und seine Rolle im UPS

Im UPS werden Proteine für den Abbau mit Ub Ketten markiert. Dazu muss das Ub zunächst aktiviert werden. Über eine Enzymkaskade bestehend aus E1-Aktivierungs-Enzym, E2-Konjugations-Enzym und E3-Ligationsenzym wird das Ub aktiviert, übertragen und schließlich an Zielproteine gebunden (Hershko & Ciechanover, 1998) (siehe Abb. 7). Proteine, die mit bestimmten PolyUb Ketten markiert sind werden spezifisch vom 26S Proteasom erkannt und zu kleinen Peptiden abgebaut (Finley, 2009).

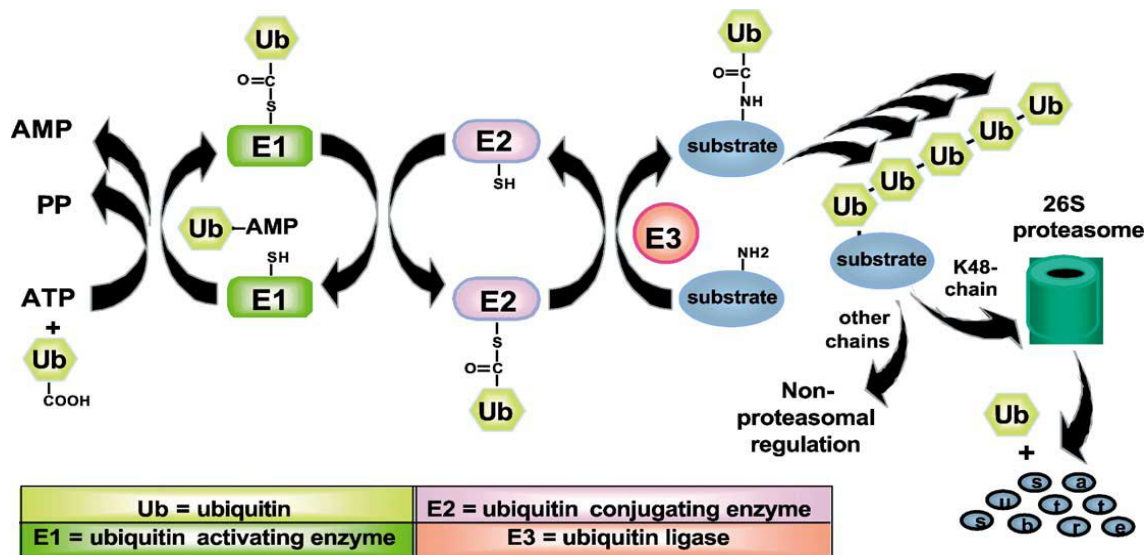


Abbildung 7: Das Ubiquitin-Proteasom-System. Damit ein Protein vom 26S Proteasom für den Abbau erkannt wird, ist die Ubiquitinierung erforderlich. Die Übertragung von Ubiquitin auf das Substrat wird durch eine Enzymkaskade vermittelt. E1 aktiviert Ub, es erfolgt die Übertragung auf E2, E3 sorgt für die Substraterkennung. Nach der Polyubiquitinierung des Substrats erfolgt der Abbau durch das Proteasom (Abb. modifiziert nach (Pray et al, 2002)).

Die Substratspezifität des UPS wird durch die Ub-E3-Ligasen vermittelt. Es gibt 2 große Familien von Ub-E3-Ligasen: HECT-Domän (homologous to E6-AP- carboxyl terminus) und RING-Ligasen (really interesting new gene). HECT-Domän E3 Ligasen bilden Thioesterkomplexe mit Ub in Anwesenheit von E2s und vermitteln so die Übertragung des Ub auf Targetproteine (Scheffner & Kumar, 2014). RING-Ligasen enthalten als katalytisches Zentrum 2 Zinkionen und interagieren darüber mit E2s. Sie vermitteln die Übertragung des Ub von E2s, indem sie Substrat und E2s in räumliche Nähe bringen (Spratt et al, 2014). RING-Ligasen sind die größte E3 Familie und kommen häufig in Komplexen vor (Petroski & Deshaies, 2005).

Eine Superfamilie der Ub Ligasen bilden CRLs (Deshaies & Joazeiro, 2009; Petroski & Deshaies, 2005) (siehe Abb. 5). Culline sind das Gerüst der CRLs. In Mammalia gibt es 7 verschiedene Culline, Cul1, 2, 3, 4a, 4b, 5 und 7. Am C-Terminus binden Culline RING-Domain-Proteine (Rbx1 oder Rbx2), die eine Interaktion mit dem E2 und den Transfer des Ub auf das Substrat vermitteln. Am N-Terminus binden verschiedene Adaptorproteine und Substrate-Recognition-Subunits (SRS), die die Substratspezifität bestimmen. Cul1 CRLs enthalten das Adaptorprotein SKP1 und ein F-Box Protein als SRS. Cul2 und Cul5 CRLs binden Substrate über ein Elongin-BC Adaptor und ein Suppressor des Zytokin Signalling/Elongin BC (SOCS/BC)-box Protein als SRS. Cul3 CRLs binden Substrate über BTB-Domän-Proteine, wie z. B. Keap1. Cul4 CRLs enthalten als Adaptorprotein das DNA-damage-binding protein-1

(DDB1) (Deshaies & Joazeiro, 2009). CRLs werden durch die Neddylierung und Deneddylierung von Cullinen reguliert (siehe Abb. 5). Die Neddylierung am C-Terminus vom Cullin sorgt für eine allosterische Aktivierung des Ub Transfers vom E2 auf das Substrat. Inaktiviert werden CRLs durch die hydrolytische Abspaltung des Nedd8 vom Cullin mittels Deneddylierungsaktivität des CSN (Lyapina et al, 2001; Schwechheimer et al, 2001). Die CSN-vermittelte Deneddylierung von CRLs ist spezifisch und mit einer Konformationsänderung/Aktivierung des CSN verbunden (Lingaraju et al, 2014).

1.5.3 Die Rolle des CSN bei der Differenzierung von Adipozyten

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass das CSN essentiell für die Adipogenese, die Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten, ist (Huang et al, 2012). Dysfunktionen der Adipogenese sind häufig kennzeichnend für Adipositas und die Aufdeckung der zuständigen Mechanismen hat hohe Priorität für die Identifizierung neuer Adipositas-Therapien. Die Adipogenese wird durch eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren und regulatorischen Proteinen gesteuert (zur Übersicht siehe Abb. 8) (Koppen & Kalkhoven, 2010; White & Stephens, 2010).

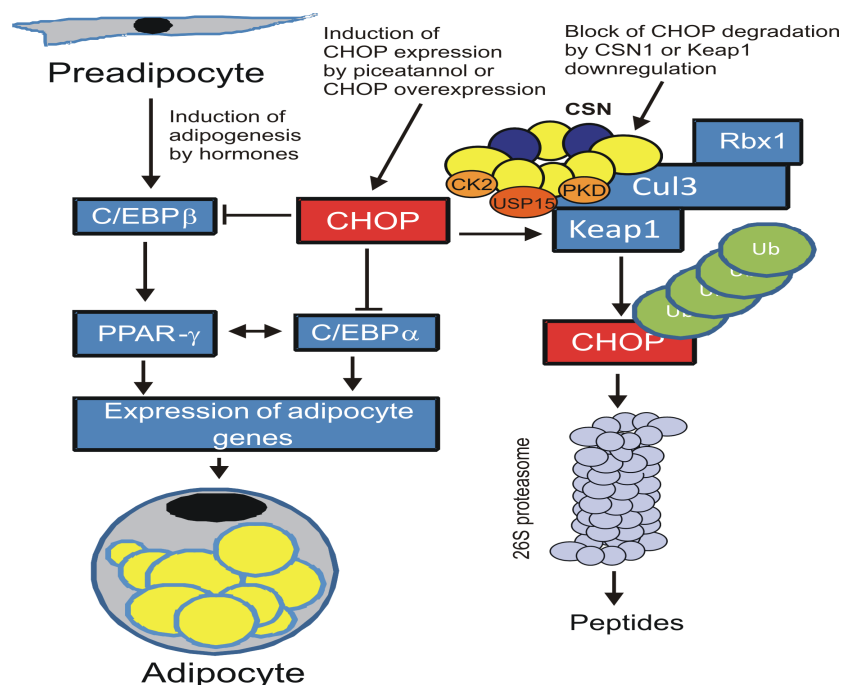


Abbildung 8: Modell der Differenzierung von Adipozyten und der Rolle vom CSN. Die Adipozytendifferenzierung wurde durch die Hormone Insulin, Cortisol und Trijodthyronin induziert. Das führt zur Expression der Masterregulatoren PPAR-γ und C/EBPα/β. Das ist verbunden mit einer koordinierten Expression von Proteinen, die für den reifen Fett-Zell-Phenotyp zuständig sind. CHOP (C/EBP homologous protein or GADD153 - Growth-Arrest-DNA-damage induced protein) ist ein negativer Regulator der Adipogenese. Unter normalen Bedingungen wird das CHOP Protein durch die Cullin 3-RING-Ub Ligase mit dem BTB-Protein Keap1 (CRL3^{Keap1}) ubiquitiniert und anschließend durch das 26S Proteasom abgebaut (Abb. aus (Huang et al, 2012)).

Als Modellsystem für die Untersuchungen dienten humane Liposarkomazellen (LiSa-2 Zellen), die sich durch eine hohe Adipogenese-Effektivität auszeichnen. Die LiSa-2 Präadipozyten können durch ein Hormongemisch (Insulin, Cortisol und Trijodthyronin) zur Adipogenese angeregt werden. Der Grad der Differenzierung wird durch die Quantifizierung der Lipidtröpfchen mittels Oil Red O (ORO) in den Adipozyten gemessen (Wabitsch et al, 2000). Außerdem produzieren Präadipozyten und Adipozyten eine Vielzahl an Adipokinen, wie z. B. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), die für die Expansion des Fettgewebes erforderlich sind.

Die Downregulation des CSN mittels spezifischer siRNA gegen CSN1 führt zu einer Blockade der Adipogenese und zu einem signifikanten Abfall der VEGF Produktion (Huang et al, 2012). Unter diesen Bedingungen kommt es zu einem Anstieg von CHOP und zu einem Abfall von Keap1 und von Cul3. Durch spezifische siRNA gegen Keap1 konnte gezeigt werden, dass eine Downregulation von Keap1 zum Anstieg von CHOP führt. Darüber hinaus wurden CHOP, Keap1 und Cul3 co-präzipitiert. Diese Daten sprechen dafür, dass CHOP während der Adipogenese durch CRL3^{Keap1} ubiquitiniert wird. Die Rolle des CSN besteht vermutlich in der Stabilisierung und Bildung von CRL3^{Keap1} Komplexen (Huang et al, 2012).

2. Fragestellung und Zielsetzung

Es gibt Hinweise darauf, dass TEGDMA die odontogene und osteogene Differenzierung blockieren und somit die reparative Dentinogenese behindern (Kim et al, 2011b). Daher besteht das Hauptziel der Arbeit in der Erforschung des Mechanismus der TEGDMA Wirkung auf die Zelldifferenzierung. Da das COP9 Signalosom ein essentieller Faktor der Zelldifferenzierung ist und LiSa-2 Zellen ein ideales Modell für das Studium der Zelldifferenzierung sind, soll der Einfluss von TEGDMA auf das CSN und auf CSN-vermittelte Aktivitäten während der Differenzierung von LiSa-2 Zellen untersucht werden. Um die Mechanismen der TEGDMA Wirkung auf die Zelldifferenzierung besser zu verstehen, sollen folgende Fragestellungen im Vordergrund stehen:

Wie wirkt sich die TEGDMA Behandlung von LiSa-2 Zellen auf das CSN, auf Komponenten der CRL wie Cul1 und Cul3 und auf die Substrate p27 und p53 aus?

Es soll das CSN, CRL Komponenten und Substrate der CSN-vermittelten Proteolyse wie p53, p27 und deren Veränderungen mittels während der Zelldifferenzierung mittels Western Blot bestimmt werden.

Wie beeinflusst TEGDMA die Differenzierung von LiSa-2 Präadipozyten?

Es soll der Einfluss verschiedener Konzentrationen von TEGDMA auf die Adipogenese in LiSa-2 Zellen mittels Western Blot und ORO Färbung evaluiert werden. Darüber hinaus soll die VEGF Produktion der Zellen gemessen werden.

Gibt es einen Einfluss von TEGDMA auf die Apoptose von LiSa-2 Zellen?

Nach TEGDMA Behandlung soll die Apoptoserate in LiSa-2 Zellen gemessen werden.

Was ist der Mechanismus der TEGDMA Wirkung in LiSa-2 Zellen?

Da die Wirkung von TEGDMA auf die Zelldifferenzierung über die Bildung von Reactive Oxygen Species (ROS) vermutet wird (Kim et al, 2011b), soll das Antioxidant N-Acetylcystein (NAC) eingesetzt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte

Geräte:

Blottingpapier, 703
Blottingschwämme
Eismaschine AF-10
Feinwaage MC1
Flacon Tubes 15ml, 50ml
Glasplatten Mini Protean System 0,75mm
Glasplattenhalterungssystem
Heizblock
Kämme, 0,75mm, 15 well
Pipette Boy – Pipetus®
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl
Magnetrührer, MR3000
Mikroskop, Wiloverts 30
Minizentrifuge GMC-060
Nitrocellulosetransfermembran Protran®
Röntgenfilm
Röntgenkassette
SafeSeal tubes 1,5ml, 2ml
Saran Folie
Schüttler, Unimax2010
SDS-PAGE System Mini Protean® 3 cell
Serologische Pipetten 2ml, 5ml, 10ml, 25ml
Sterilbank
„Microflow Biological Safety Cabinet“
Thermomixer compact
Tischzentrifuge Fresco 17
Ultraspec 1000
Vortex, REAX control
Western Blot System
Zählkammer Neubauer
Zellkultur-Inkubator BB4220CV
Zellkulturplatte 6-well, Cellstar®
Zellkulturschale 94 x 16 mm

Hersteller:

VWR, Darmstadt
BIO-RAID, München
Scotsman
Satorius
Greiner bio-one, Frickenhausen
BIO-RAID, München
BIO-RAID, München
Eppendorf
BIO-RAID, München
Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Sarstedt, Nümbrecht
Heidolph, Kelheim
Helmut Hund GmbH, Wetzlar
neoLab®, Heidelberg
Whatman®, Dassel
Kodak, Stuttgart
Kisker Biotech, Steinfurt
Sarstedt, Nümbrecht
DOW, Schwalbach
Heidolph, Kelheim
BIO-RAID, München
Sarstedt, Nümbrecht
Pharma- und Elektrotechnik
M. Trenkner, Koblenz
Eppendorf, Hamburg
Heraeus, Hanau
Amersham Pharmacia Biotech
Heidolph, Kelheim
BIO-RAID, München
LaborOptik, Friedrichsdorf
Heraeus, Hanau
Greiner bio-one, Frickenhausen
Greiner bio-one, Frickenhausen

3.1.2 Chemikalien

Chemikalien:

Ammonium peroxiddisulfate (APS)
 Aprotininpulver
 Di-Natriumhydrogenphosphat (Na₂HPO₄)
 Essigsäure
 Glycin
 Kaliumdihydrogenphosphat
 Natriumazid (NaN₃)
 Natriumdeoxycholat
 Natriumchlorid (NaCl)
 Nonidet® 40
 Magermilchpulver
 Markerprotein

 Methanol
 PBS Dulbecco w/o Ca²⁺ w/o Mg²⁺
 Peroxyacetic acid (PAA)
 Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)
 Ponceau S
 Roti® Load 4x Konzentration
 SDS
 Tetramethylethylendiamin (TEMED)
 Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA)
 Tris
 Trypan blue solution (0,4%)
 Trypsin-EDTA
 Tryptophanblau
 Tween

Hersteller:

Carl Roth, Karlsruhe
 AppliChem, Darmstadt
 AppliChem, Darmstadt
 AppliChem, Darmstadt
 AppliChem, Darmstadt
 AppliChem, Darmstadt
 AppliChem, Darmstadt
 AppliChem, Darmstadt
 AppliChem, Darmstadt
 AppliChem, Darmstadt
 Thermo Fisher Scientific,
 Waltham, MA, USA
 AppliChem, Darmstadt
 Biochrom, Berlin
 Carl Roth, Karlsruhe
 AppliChem, Darmstadt
 AppliChem, Darmstadt
 Carl Roth, Karlsruhe
 Serva, Heidelberg
 AppliChem, Darmstadt
 Sigma Aldrich, St. Louis
 AppliChem, Darmstadt
 Sigma Aldrich, St. Louis
 Invitrogen, Darmstadt
 Sigma Aldrich, St. Louis
 AppliChem, Darmstadt

3.1.3 Antikörper

<u>Antikörper:</u>	<u>Verdünnung:</u>	<u>Herkunft:</u>	<u>Hersteller:</u>
CUL I	1:400	Kaninchen	Santa Cruz
CUL III	1:500	Maus	BD Transduction Laboratories TM
CSN 5	1:500	Maus	GeneTex, Inc.
CSN 8	1:5000	Kaninchen	BIOMOL
CHOP	1:200	Kaninchen	Santa Cruz
p27	1:500	Kaninchen	Santa Cruz
p53	1:5000	Maus	Chromogen
PPAR-γ	1:200	Kaninchen	Santa Cruz
γ-Tubulin	1:1000	Maus	Santa Cruz
c-Jun	1:500	Kaninchen	Santa Cruz
α-Maus	1:2000	Maus	Seramun
α-Kaninchen	1:2000	Kaninchen	Seramun

3.1.4 Kits

<u>Kit</u>	<u>Hersteller</u>
Pierce® ECL – Kit	Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA
ELISA-Caspase-3 – Kit	Invitrogen
ELISA-VEGF – Kit	RayBio®
O-Red-Oil – Kit	Sigma Aldrich, St. Louis

3.1.5. Puffer

Puffer:

Triplelysatpuffer (TLP)

Blockierlösung

1x Ponceau-Färbung

5x SDS-PAGE Puffer

1x Western Blot Puffer

Tris – HCL

10x PBS

PBS-T

Entwicklungslösung

Fixierungslösung

Roti®-Load 1, 4x Konz.

Lysatpuffer (OD Messung)

Zusammensetzung:

50mM Tris HCL (pH 7,4), 150mM NaCl,
0.02% NaN₃, 0,1% SDS, 1% Nonident® P40,
0,5% Natriumdeoxycholat

5% Magermilchpulver in 1 x PBS-T

0,1% Ponceau, 5% Essigsäure

75,5g Tris, 360g Glycin, 25g SDS

mit destilliertem Wasser zu 1l

14,4g Glycin, 3g Tris, 10% Methanol,

mit destilliertem Wasser zu 1l

Tris 1,5 M, HCL, destilliertes Wasser. pH=8,8

Tris 0,5 M, HCL, destilliertes Wasser. pH=6,7

80g NaCl, 2g HCL, 2,4g Na₂PO₄, 14,4g

KH₂PO₄, mit destilliertem Wasser zu 1l

1x PBS, 0,1% Tween 20

50% X-OMA Ex II Lösung A, 5% X-OMA

Ex II Lösung B, 0,025% X-OMA II Lösung C

mit destilliertem Wasser zu 2l

40% RPX-OMAL LO Lösung A, 10% RPX-

OMAL LO Lösung B

mit destilliertem Wasser zu 1l

1:4 Lösung

96% Isopropanol, 4% NP40

Zur Herstellung aller Puffer wurde destilliertes Wasser benutzt und der pH-Wert wurde bei Raumtemperatur eingestellt.

3.1.6 Zellkulturmedium

Medium für LiSa-2-Zellen: Iscove/RPMI 4:1

FCS 10%	Biochrom AG, Berlin
Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Iscove	Biochrom AG, Berlin
Penicillin – Streptomycin	Biochrom AG, Berlin
RPMI	Biochrom AG, Berlin

Serumfreies Medium für LiSa-2-Zellen: DMEM/Ham's F12 (1:1)

Transferrin (10 µg/ml)	Sigma Aldrich, St. Louis
NaHCO ₃ (15 mM)	Sigma Aldrich, St. Louis
HEPES (15 mM)	Sigma Aldrich, St. Louis
Biotin (33 µM)	Sigma Aldrich, St. Louis
Cortisol (1mM)	Sigma Aldrich, St. Louis
Insulin (1nM)	Sigma Aldrich, St. Louis
Pantothenat (17 µM)	Sigma Aldrich, St. Louis
Penicillin (100 U/ml)	Biochrom AG, Berlin
Streptomycin (100 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin
Triiodothyronin (20 pM)	Sigma Aldrich, St. Louis

Die Zellkulturmedien wurden unter sterilen Bedingungen hergestellt und in einer Sterilbank verwendet.

3.1.7 Eukaryotische Zelllinie:

Die humane Liposarkom Zelllinie LiSa-2 stammt aus einer retroperitonealen Metastase eines schlecht differenzierten Liposarkom des pleomorphen Subtyps eines 53 Jahre alten Mannes.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Kultivierung der LiSa-2 Zellen

LiSa-2-Zellen wurden in Dulbecco's Iscove/RPMI 4:1 Medium unter Standardbedingungen von 37°C und 5% CO₂ in 10 cm Schalen im Inkubator kultiviert.

3.2.1.2 Inkubation der LiSa-2 Zellen mit TEGDMA und NAC

Die Zellen wurden mit PBS (1x) gewaschen, mit Trypsin von dem Schalenboden gelöst und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach Überführung des Zellpellets ins Medium, wurde die Zellzahl mit der Neubauerzählkammer bestimmt. Dann wurden die Zellen mit einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ auf 6-Well-Platten, mit 2 ml Medium pro Well, ausgesät.

Nach 24 h wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von TEGDMA oder/und NAC für verschiedene Zeitspannen inkubiert und im Brutschrank gelagert.

Zelllinie	Inkubationsdauer	TEGDMA-Konz.	NAC-Konz.
LiSa-2 Zellen	24 h	2 - 5 mM	10 mM
Induzierte LiSa-2 Zellen	1 - 8 – 15 d	0,2 - 0,5 mM	

3.2.1.3 Zellyse

Unter einer Sterilbank wurde das Medium aus den Wells abgesaugt und mit 2 ml PBS (1x) pro Well gewaschen. Nach absaugen des PBS und Lagerung auf Eis wurde jede Well mit 120 µl Triplelysatpuffer (TLP), welchem frisch Proteaseinhibitor PMSF (1 mg/ml) und Aprotinin (10 µg/ml) hinzugegeben wurde, beladen und damit die Zellen lysiert. Das entstandene Lysat wurde in 1,5 ml Tubes je Well überführt und bei 13.000 rpm, 4°C für 10 min zentrifugiert. Unter erneuter Lagerung auf Eis wurden die entstandenen Überstände in neue 1,5 ml Tubes transferiert.

Die Proben wurden entweder direkt im Anschluss an die Zellyse weiterverarbeitet für ELISA und SDS-Page oder zur Lagerung bei -80°C eingefroren.

3.2.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.2.1 SDS – PAGE

SDS-Page (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) dient der Auftrennung der verschiedenen Proteine aus dem Lysat in Bezug auf Ihre Molekülmasse. Das Gel, auf Polyacrylamidbasis, besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel, deren Zusammensetzungen wie folgend darstellen:

Sammelgel 5% (6ml)

2,5 ml Tris 0,5 M (pH 6,8)
1 ml PAA
0,1 ml 10% SDS
0,06 ml 10% APS
0,01 ml TEMED
2,34 ml H₂O

Trenngel 10% (10ml)

2,5 ml Tris 1,5 M (pH 8,8)
3,33 ml PAA
0,1 ml 10% SDS
0,05 ml 10% APS
0,01 ml TEMED
4,01 ml H₂O

Zu den Lysaten wurde 1x Ladepuffer (Roti ®-Load) im Verhältnis 1:4 hinzugegeben und bei 95°C für 5min erhitzt. Die Geltaschen im Sammelgel wurden mit 12 µl der Proben beladen und eine Geltasche mit 2 µl Markerprotein der Firma Thermo Fisher Scientific. Die Proteinauftrennung erfolgt in den ersten 10 min mit 90 V und danach mit 140 V für insgesamt ca. 75 min in 1 x SDS – PAGE Puffer.

Das anionische Tensid (Detergens) SDS überdeckt die Eigenladung der einzelnen Proteine, indem ca. 1,4 g SDS an 1 g Protein bindet und die Proteine nun eine negative Ladungsverhältnisse aufweist. Aufgrund der gegenseitigen Abstoßung des negativ geladenen SDS kommt es zur Denaturierung der Proteine. Dadurch kommt es zur Trennung der Moleküle anhand Ihrer Kettenlänge, welche proportional zur Molekülmasse steht, wobei die längeren Moleküle stärker zurückgehalten werden. Dank der SDS Beladung ist die Eigenladung der Proteine vernachlässigbar.

3.2.2.2 Western - Blot

Durch Anlegen eines elektrischen Feldes von 250 mA senkrecht zum Polyacrylamidgel wandern die negativ geladenen Proteine in Richtung Anode auf eine Nitrozellulosemembran. Dies erfolgt mit 1 x Transferpuffer auf Eis für 2-3 h. Nun können die Proteine durch auswaschen des SDS renaturieren und ihre Sekundär- und Tertiärstruktur teilweise wieder einnehmen.

3.2.2.3 Ponceau - Färbung

Die Ponceau - Färbung dient dem Nachweis des erfolgreichen Transfers der Proteine auf die Nitrozellulosemembran. Die Membran wurde mit 1 x Ponceaulösung für 5 min inkubiert und damit wurden die Proteine visualisiert. Nun konnte die Position der zu untersuchenden Proteine anhand Ihrer Molekülmasse auf der Membran markiert werden. Vor dem Auswaschen der Färbung mit 1 x PBS-T für 5 min erfolgte eine Fotokopie zur Dokumentation.

3.2.2.4 Blockierung

Zur Blockierung freier unspezifischer Bindungsplätze auf der Nitrozellulosemembran wurde diese in 100 ml Blockierungslösung gelegt und für 1 h mittels eines Unimax2010 geschüttelt.

3.2.2.5 Immundetektion

Die Nitrozellulosemembran wurde für 2 h mit verschiedenen Primärantikörper inkubiert, welche je an ein bestimmtes Protein (Antigen) mit einer spezifischen Molekülmasse binden. Danach kommt es zu einer einstündigen Inkubation mit Sekundärantikörpern, diese binden an spezifische Bereiche der Primärantikörper. An den Sekundärantikörper ist ein Enzym gekoppelt, welches eine Chemolumineszenzreaktion katalysieren kann. Das gekoppelte Enzym ist eine Peroxidase aus dem Meerrettich, die Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase). Nach jeder Inkubation wurde die Nitrozellulosemembran 3mal mit 1 x PBS-T für je 5 min gewaschen. Die Antikörper wurden in 5%iger Blockierungslösung verdünnt.

3.2.2.6 Visualisierung der Immundetektion

Die Membran wurde für 1 min mit ECL - Lösung (Pierce® ECL - Kit) nach dem Herstellprotokoll inkubiert. Die ECL-Lösung enthält ein Substrat, welches durch HRP in seine oxidierte Form überführt wird. Dabei entsteht eine Chemolumineszenz, welche auf einem Röntgenfilm (Kodak UV Film) detektiert werden kann. Vorher wurde die Membran in Saran Folie verpackt und anschließend in einer Dunkelkammer benutzt um einen Röntgenfilm in einer Röntgenkassette zu belichten.

Mit Hilfe von unterschiedlichen Belichtungszeiten wurden die zu untersuchenden Proteine anhand ihrer Banden nachgewiesen. Die Entwicklung und Fixierung der Röntgenfilme erfolgte mit entsprechenden Entwickler- und Fixierlösungen.

3.2.2.7 ELISA Caspase-3

Mit dem Kit wurde eine 96-well-Mikrotiterplatte bereitgestellt, die in ihren Wells mit einem monoklonalen Antikörper, spezifisch für den menschlichen Caspase-3, beschichtet wurden. Entsprechend dem Herstellerprotokoll wurde eine siebenstufige Verdünnungsreihe erstellt, die eine Eichkurve ergab. Die Zelllysate wurden mit Diluent Puffer 1:10 verdünnt und je 100 µl in die verbliebenen Wells pipettiert und 2 h inkubiert. Während der Inkubation bindet die menschliche Caspase-3 an die immobilisierten Antikörper in den Wells. Nach der Inkubation werden die Wells 4mal gewaschen. Es wurden 100 µl/Well Antikörper, spezifisch für menschliches aktive Caspase-3 hinzugefügt und 1 h inkubiert, außer der Blank-Well. Nun bindet das spezifische aktive Caspase-3-Antikörper an das immobilisierte aktive Caspase-3-Protein und dient damit als Nachweisantikörper. Nach dem Waschen, um überschüssige Protein und Nachweisantikörper zu entfernen, wurden 100 µl Meerrettichperoxidase markiertes Anti-Kaninchen-Antikörper IgG (Anti-Rabbit-IgG-HRP) für 30 min pro Well hinzugegeben, außer der Blank-Well. Dieses IgG bindet an die ebenfalls gebundenen Nachweisantikörper und komplettiert damit den ELISA Sandwich. Nach einem erneuten Waschen, um alle überschüssigen Anti-Kaninchen-IgG-HRP zu entfernen, wurden 100 µl/Well einer Substrat-Lösung zugegeben, welche mit dem gebundene Enzym (HRP) reagiert und einen Farbstoff produziert. Die Inkubation erfolgt für 30min im Dunkeln unter Raumtemperatur. Die Intensität dieser Färbung, ist direkt proportional zur Konzentration des menschlichen aktiven Caspase-3 in der Probe. Im Anschluss wurden 100 µl Stop Lösung in jede Well pipettiert. Die Färbung und damit auch die Konzentration der Caspase-3 wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und mit dem Programm Soft Max Pro der Firma Molecular Devices GmbH ausgewertet.

Kit-Materialien:

- 96-Well Mikrotiterplatte beschichtet mit monoklonalen Antikörpern, spezifisch für die menschliche Caspase-3
- Humaner Caspase-3 Standard, beinhaltet 0,1% Natriumhydrogenpyrophosphat
- Standard-Verdünnungspuffer, 25ml pro Flasche und jede enthält 0,1% Natriumhydrogenpyrophosphat
- Caspase-3 Detektion-Antikörper, beinhaltet 0,1% Natriumhydrogenpyrophosphat
- Anti-Kaninchen IgG HRP (100X), beinhaltet 3,3 mM Thymol
- HRP Verdünner, beinhaltet 3,3 mM Thymol
- Waschpufferkonzentrat (25x)
- Tetramethylbenzidin (TMB)
- Stop Lösung

IgG HRP präparieren

Anti-Kaninchen IgG HRP (100X) liegt in 50% Glycerin vor und ist daher zähflüssig. Um eine genaue Verdünnung zu gewährleisten, muss Anti-Kaninchen IgG HRP (100X) auf Raumtemperatur gebracht werden. Vorsichtig mischen und langsames pipettieren ist wichtig.

- 15 Minuten vor Gebrauch zubereiten
- 10 µl des Anti-Kaninchen IgG HRP (100X) mit 1 ml HRP Verdünnungspuffer verdünnen, dies reicht für einen 8-Well Streifen der Mikrotiterplatte
- Nicht verwendetes Anti-Kaninchen IgG HRP (100X) kann im Kühlschrank gelagert werden

Waschpuffer herstellen

- Waschpufferkonzentrat (25x) unter Raumtemperatur verwenden und gut mischen um ausgefallene Salze zu lösen
- 1 Volumenanteil des Waschpufferkonzentrats (25x) mit 24 Volumenanteilen dest. H₂O mischen
- Waschpufferkonzentrat (25x) und Arbeitswaschpuffer (1x) können im Kühlschrank gelagert werden
- Arbeitswaschpuffer ist innerhalb von 14 d zu benutzen

Erstellen der Verdünnungskurve:

1. Humanen Caspase-3 Standard mit Standard-Verdünnungspuffer verdünnen, wie auf dem Etikett beschrieben.
2. Flasche mit 2,5 ng/ml beschriften und Standard innerhalb einer Stunde gebrauchen
3. 0.25 ml des Standard-Verdünnungspuffer in 6 vorbereitete und beschriftete Tubs pipettieren
4. Standardreihe wie in der folgenden Grafik zu sehen ist zu erstellen und zwischen jedem Schritt gut mischen
5. 100 μ l Standard-Verdünnungspuffer dient als Blank

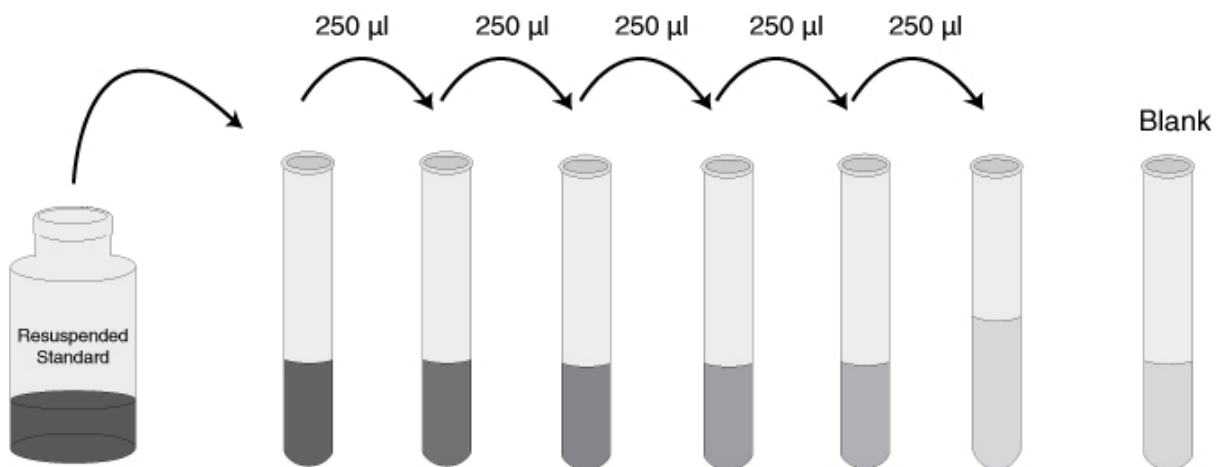


Abbildung 9: Methode zur Herstellung einer Verdünnungsreihe.

Verbleibender rekonstituierter Standard sollte verworfen werden oder bei -80°C eingefroren werden. Standard sollte ohne Verlust seiner Aktivität nur einmal aufgetaut werden.

3.2.2.8 VEGF ELISA

Mit dem Kit der Firma RayBio® wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte bereitgestellt, welche am Wellboden mit einem Antikörper beschichtet wurde das spezifisch an menschliches VEGF bindet. Um eine Eichkurve, laut Herstellerprotokoll, in der anschließenden Auswertung zu erhalten wurde in 7 Wells (100 μ l/Well) eine VEGF-Verdünnungskurve aufgetragen und ein Well als Null-Standard. Nach verdünnen der Zelllysate werden auch von diesen 100 μ l in je eine Well pipettiert, anschließend die

Mikrotiterplatte abgedeckt und für 2,5 h inkubiert. Während der Inkubation bindet menschliches VEGF an die immobilen Antikörper in den Wells. Anschließendes 4maliges Waschen mit 300 µl 1x Waschpuffer entfernt ungebundene Bestandteile. Im nächsten Schritt wurden 100 µl biotinylierter Antikörper in jede Well pipettiert und bei Raumtemperatur unter permanenten schütteln inkubiert. In der einstündigen Inkubation binden freie biotinylierte Antikörper an immobilen VEGF-Antikörper und komplettieren den „Sandwich-ELISA“. Erneutes Waschen entfernt ungebundene biotinylierte Antikörper. Dann wurden 100 µl/Well HRP konjugierter Streptavidin-Komplex pipettiert und 45 min unter schütteln inkubiert. Während der Inkubation kommt es zu einer der stärksten nichtkovalenten Bindungen zwischen Biotin und Streptavidin. Ein letztes Mal werden die Wells der Mikrotiterplatte gewaschen. Im anschließenden Schritt wurden 100 µl TMP Substrat Lösung aufgetragen und 30 min in Dunkelheit inkubiert. Es kommt zu einer Färbung im bläulichen Bereich, dessen Intensität proportional zur Konzentration von VEGF steht. Im letzten Schritt werden 50 µl Stop-Lösung pipettiert und es kommt zum Farbumschlag in den gelben Bereich. Im Anschluss kann die Mikrotiterplatte bei einer Wellenlänge von 450nm ausgewertet werden.

Kit-Materialien:

- Mikrotiterplatte mit 96 Wells beschichtet mit Antikörper gegen humanem VEGF
- 25 ml Waschpufferkonzentrat (20x)
- Standard (Ampulle C) mit rekombinierten humanem VEGF
- Probenverdünner A (für Serum/Plasma), 30ml 0,09% Natriumhydrogenpyrophosphat
- Probenverdünner B (für Zellkulturmedium/Urin), 15 ml 5x Konzentrat
- Detektion-Antikörper: Biotinylierter Antikörper
- HRP-Streptavidin Konzentrat, 8 µl 15,000x Konzentrat
- TMB Ein-Schritt Substrat Lösung, 12 ml von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) in Pufferlösung
- Stop-Lösung, 8 ml von 2 M Schwefelsäure

Reagenzien präparieren:

- alle Chemikalien und Proben auf Raumtemperatur bringen
- Probenverdünner-Konzentrat 1:5 verdünnen mit dest. H₂O
- Waschkonzentrat verdünnen: 20 ml Konzentrat auf insgesamt 400 ml mit dest. H₂O auffüllen

- 100 µl Probenverdünner B (1x) zu dem Detektion-Antikörper-Konzentrat pipettieren und mehrmals pipettieren, eine 100fache Verdünnung entsteht
- das HRP-Streptavidin Konzentrat sollte 300fach verdünnt werden mit Probenverdünner B (1x)

Erstellen der Verdünnungskurve:

1. 640 µl 1x Probenverdünner B (für Zellkulturmedium und Urin) in Ampulle C (rekombiniertes menschliches VEGF) zur Herstellung eines 50 ng/ml Standards geben und das Pulver durch sanftes mischen lösen.
2. 60 µl des 50 ng/ml VEGF-Standard aus der Ampulle C in ein Tub pipettieren und mit 440 µl 1x Probenverdünner B eine 6.000 pg/ml Standard-Lösung herstellen
3. 400 µl 1x Probenverdünner B in jeden der 8 vorbereiteten Tubes pipettieren
4. Verdünnungsreihe wie in folgender Grafik gezeigt erstellen und vor jedem nächsten Transfer den Tub gründlich mixen
5. Probenverdünner B dient als Null-Standard

3.2.2.9 Oil Red O (ORO) Färbung

Um die Lipidtröpfchen in den LiSa-2 Zellen visuell und spektrophotometrisch auswerten zu können wurden die Zellen mittels des Oil-Red-O-Kits der Firma Sigma Aldrich spezifisch angefärbt.

Hierzu wurde eine ORO-Arbeitslösung laut Herstellerangaben vorbereitet. Nach Fixierung der LiSa-2 Zellen wurden diese mittels der ORO-Arbeitslösung gefärbt.

Die visuelle Auswertung erfolgte unter einem Kontrastmikroskop (Wiloverts 30) der Firma Helmut Hund GmbH, hierfür wurden zur Differenzierung angeregte LiSa-2 Zellen bereitgestellt, welche mit 0, 0,2 oder 0,5 mM TEGDMA über den Zeitraum der Zelldifferenzierung inkubiert wurden. Untersucht wurden dann Zellen nach 1, 8 und 15 Tagen.

Mit dem Spektrophotometer (Ultraspec 1000) der Firma Amersham Pharmacia Biotech wurden weiter ORO gefärbte Zellen spektrophotometrisch aufgearbeitet, dies erfolgte sowohl mit als auch ohne Hematoxylin (blaue Farbe der Zellkernfärbung). Hematoxylin wurde nur bei vorangehender mikroskopischer Untersuchung gebraucht. So konnten die Zellkulturen erst visuell unter dem Kontrastmikroskop untersucht

werden und danach wurde noch eine OD Messung durchgeführt, da Hematoxylin im Wellenbereich der OD Messung vernachlässigbar ist. Untersucht wurden zur Differenzierung angeregte LiSa-2 Zellen nach 1, 8, 15 und 22 Tagen. Diese Zellen wurden über den Zeitraum der Differenzierung mit 0, 0,2 oder 0,5 mM TEGDMA inkubiert.

Kit Material:

- DPBS
- 10% Formalin, neutral gepuffert
- Oil Red O
- 99% Isopropanol
- 60% Isopropanol
- Hematoxylin
- Konisches Filterpapier

Vorbereitung der ORO Lösung (Stamm- und Arbeitslösung):

- Alle Arbeiten sollten in Sterilbank erfolgen
- Stammlösung vorbereiten, durch Mischen von 300 mg ORO Pulver mit 100 ml 99% Isopropanol (Stammlösung ist 1 Jahr stabil)
- Arbeitslösung herstellen, in dem man 3 Teile Stammlösung mit 2 Teilen dest. H₂O mischt und 10 min ruhen lässt (Arbeitslösung ist 2 h stabil)
- Vor dem Gebrauch der Arbeitslösung, diese mit Filterpapier in einem Trichter langsam filtern

Fixierung der adipogenen Zellen

- 6-Well-Zellkulturplatten aus dem Inkubator nehmen und unter Sterilbank weiter arbeiten
- Medium absaugen, beginnend mit den Wells der Kontrollgruppe
- Sanftes spülen der Wells mit je 2 ml PBS
- PBS absaugen und 2 ml 10% Formalin hinzugeben
- Inkubationsdauer 30-60 min bei Raumtemperatur

Färbung der adipogenen Zellen

- Alle Arbeiten erfolgen in einer Sterilbank
- Formalin aus allen Wells absaugen, mit Kontrollgruppe beginnen
- Sanftes spülen jeder Well mit 2 ml sterilem H₂O

- H₂O absaugen und in jede Well 2 ml 60% Isopropanol geben, 2-5 min ruhen lassen
- Isopropanol absaugen und 2 ml ORO Arbeitslösung pipettieren, 5 min warten
- Waschen der Wells mit H₂O bis es klar ist
- 2 ml Hematoxylin-Gegenfärbung hinzugeben und abgedeckt 1 min warten
- Hematoxylin absaugen und die Wells mit warmen H₂O (60-70°C) spülen
- Die Wells sollten feucht bleiben, damit die Fettvakuolen nicht zerstört werden
- Die Zellkultur kann unter einem Kontrastmikroskop betrachtet werden, hier sind die Lipidtröpfchen rot und die Zellkerne blau gefärbt

Mikroskopische Begutachtung und Dokumentation der Zellen nach ORO-Färbung

Die Betrachtung der Zellen erfolgt unter einem Kontrastmikroskop (Wiloverts 30) bei einer Vergrößerung von 1:200. Durch die vorhergehende ORO-Färbung erscheinen Lipidtröpfchen rot und Zellkerne blau. Mittels einer an das Kontrastmikroskop angeschlossenen Kamera wurden Ausschnitte der Zellkultur dokumentiert und archiviert.

Spektrophotometrische Analyse der Zellen nach ORO-Färbung mittels OD-Messung

Nach dem absaugen der Überstände aus den Wells der LiSa-2 Zellen wurde 1 ml Lysatpuffer (96% Isopropanol, 4% NP40) pro Well pipettiert. Da die Zellen nicht vollständig vom Wellboden in den Puffer suspendierten musste mit einem kleinen Schaber bis zur totalen Suspension der LiSa-2 Zellen nachgeholfen werden. Die Suspension wurde je Well in einen Tube überführt und zentrifugiert (13.000 rpm für 5 min bei 4°C). Der Überstand wurde im Spektrophotometer bei 520 nm ausgewertet in Bezug auf eine Kontrollgruppe, welche aus Lysatpuffer bestand.

3.2.2.10 Statistische Auswertung

Der ungepaarte *t*-Test wurde für die statistische Auswertung verwendet. Jedes Experiment wurde mindestens 3-mal unabhängig voneinander durchgeführt. Die P-Werte wurden mit der GraphPad InStat3 Software berechnet.

4. Ergebnisse

4.1 Der Einfluss von TEGDMA auf das CSN und auf CSN-assoziierte Proteine in LiSa-2 Zellen

Um den Einfluss von TEGDMA auf die Zelldifferenzierung zu studieren, wurden LiSa-2 Präadipozyten verwendet. Diese Zelllinie besitzt ein hohes Potential für die adipogene Differenzierung *in vitro* (Wabitsch et al, 2000). Daher sind LiSa-2 Zellen ein hervorragendes Modell für das Studium der Zelldifferenzierung. Durch einen Hormoncocktail bestehend aus Insulin, Trijodthyronin und Cortisol wurde die Adipogenese induziert. Die Differenzierung von LiSa-2 Zellen zu reifen Adipozyten dauert etwa 3 Wochen. Der Prozess kann durch die Färbung von Lipidtröpfchen, die sich während der Adipogenese bilden, mittels ORO im Lichtmikroskop visualisiert werden (siehe Abb. 10). In meinen Experimenten habe ich die Tage 1, 8 und 15 nach der Differenzierung analysiert.

Differenzierung von LiSa-2 Zellen

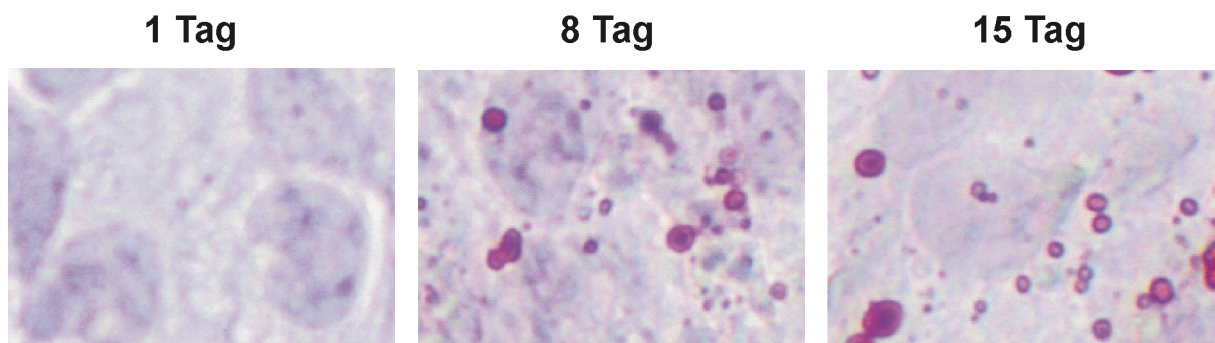


Abbildung 10: Differenzierung von LiSa-2 Zellen. Um die Differenzierung zu induzieren wurden LiSa-2 Präadipozyten in serumfreiem Medium inkubiert, welches mit 1 nM Insulin, 20 pM Trijodthyronin, 1 µM Cortisol und 10 µg/ml Transferin (siehe Material) kultiviert wurde. Nach 1, 8 und 15 Tagen wurden die Zellen nach Verwendung einer ORO Färbung (siehe Methoden) unter einem Kontrastmikroskop bei einer Vergrößerung von 1:200 begutachtet und zur Dokumentation fotografiert. Dank der ORO-Färbung sind Lipidtröpfchen rot und Zellkerne blau (Hämatoxylin) eingefärbt.

Das CSN und CRL Komplexe spielen bei der Differenzierung von LiSa-2 Zellen eine entscheidende Rolle (Dubiel et al, 2013; Huang et al, 2012). Daher wurde zunächst der Einfluss von verschiedenen Konzentrationen von TEGDMA auf die Expression von endogenen CSN-Untereinheiten und CSN-assoziierten Proteinen wie Cullin 1 (CUL1) und Cullin 3 (CUL3) sowie der Substrate p27 und p53 in LiSa-2 Zellen

untersucht. Die Zellen wurden mit 0 (Kontrolle), 0,2 und 2 mM TEGDMA behandelt und nach 24 h oder 48 h lysiert. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE (siehe Methoden) aufgetrennt und anschließend auf Nitrozellulose übertragen. Die Nitrozellulosestreifen wurden mit den in Abb. 11 gezeigten Antikörpern inkubiert.

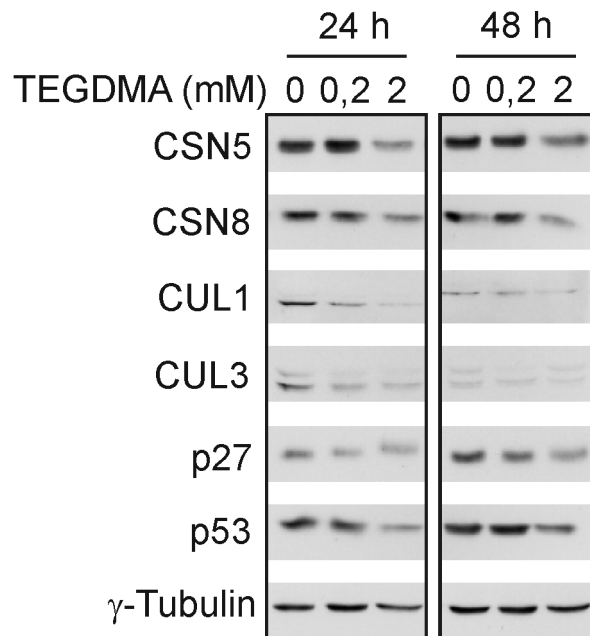


Abbildung 11: Einfluss von TEGDMA auf die Expression von CSN-Untereinheiten und CSN-assoziierten Proteinen. SDS-PAGE und anschließende Western-Blots wurden nach 24 h und 48 h Behandlung mit jeweils 0, 0,2 und 2 mM TEGDMA durchgeführt. Die LiSa-2 Zellen wurden mit Triplelysatpuffer (TLP) lysiert und anschließend mit Antikörpern gegen CSN5, CSN8, CUL1, CUL3, p27, p53 und γ -Tubulin analysiert (siehe Material und Methoden). Der Western-Blot ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente.

Die gebundenen Antikörper wurden mit ECL-Lösung behandelt und mittels Röntgenfilm sichtbar gemacht. In den in Abb. 10 gezeigten Western-Blots sind die erhaltenen Resultate zusammengefasst. Nach 24 h zeigten 0,2 mM TEGDMA wenig Wirkung auf die Konzentrationen der untersuchten Proteine, während 2 mM TEGDMA bereits nach 24 h zur Absenkung der CSN Untereinheiten CSN5 und CSN8, von CUL1 und CUL3 sowie der Substrate p27 und p53 führte (siehe Abb. 11). Nach 48 h hat die Behandlung mit 0,2 mM TEGDMA einen deutlichen Abfall von p27 zur Folge. Die Inkubation der LiSa-2 Zellen mit 2 mM TEGDMA führte zur Reduktion aller untersuchten Proteine (siehe Abb. 11).

4.2 Der Einfluss von TEGDMA auf die Differenzierung von LiSa-2 Präadipozyten

Die Differenzierung von LiSa-2 Präadipozyten zu reifen Adipozyten wurde durch den beschriebenen Hormoncocktail bestehend aus Insulin, Trijodthyronin und Cortisol induziert (siehe Material und Methoden). Nach der Induktion der Adipogenese wurden die LiSa-2 Zellen für 1, 8 und 15 Tage in Anwesenheit von 0, 0,2 oder 0,5 mM TEGDMA inkubiert.

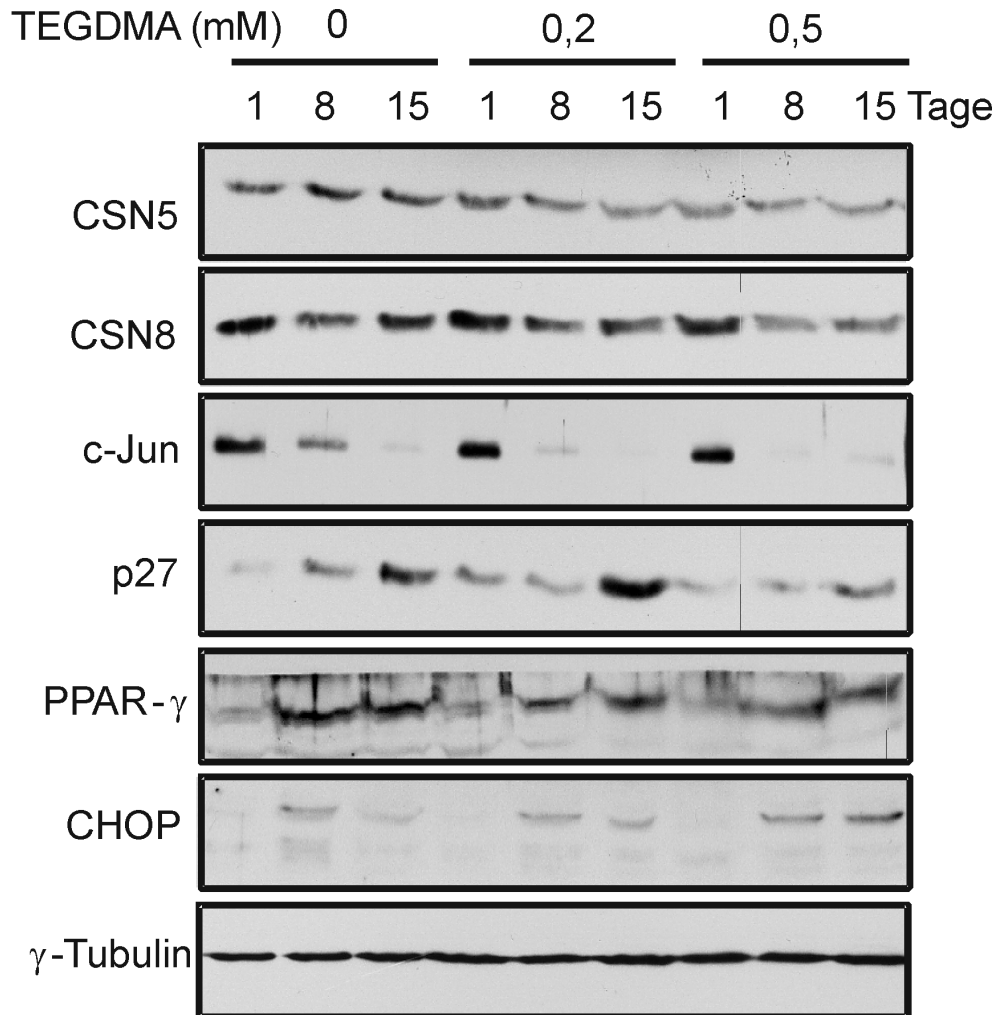


Abbildung 12: Einfluss von TEGDMA auf das CSN und Transkriptionsregulatoren während der Adipogenese. LiSa-2 Zellen wurden mit dem Hormoncocktail stimuliert und mit 0, 0,2 oder 0,5 mM TEGDMA behandelt. Nach 1, 8 und 15 Tagen wurden die Zellen lysiert und im Western-Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für 4 unabhängige Experimente.

Nach 1, 8 und 15 Tagen der Differenzierung von LiSa-2 Präadipozyten wurden die Zellen lysiert und die Proteine der Lysate im Western Blot analysiert (siehe Abb. 12).

Es hatte sich bereits gezeigt, dass 2 mM TEGDMA zu einer massiven Apoptose nach wenigen Tagen führte (Daten nicht gezeigt). Daher wurden 0,5 mM als maximale TEGDMA Konzentration verwendet. Die Daten in Abb. 11 zeigen, dass 0,2 mM TEGDMA wenig Einfluss auf die Dynamik der untersuchten Proteine während der Adipogenese hatten. Im Gegensatz dazu führte die Behandlung der LiSa-2 Zellen mit 0,5 mM TEGDMA zu einer Reduktion von CSN5 und CSN8. Außerdem wurde der Anstieg von p27, der für die Differenzierung von LiSa-2 Zellen essentiell ist (Dubiel et al, 2013), verhindert. Darüber hinaus kam es zu einer Verminderung von PPAR- γ und zu einem Anstieg des negativen Regulators der Adipogenese, CHOP.

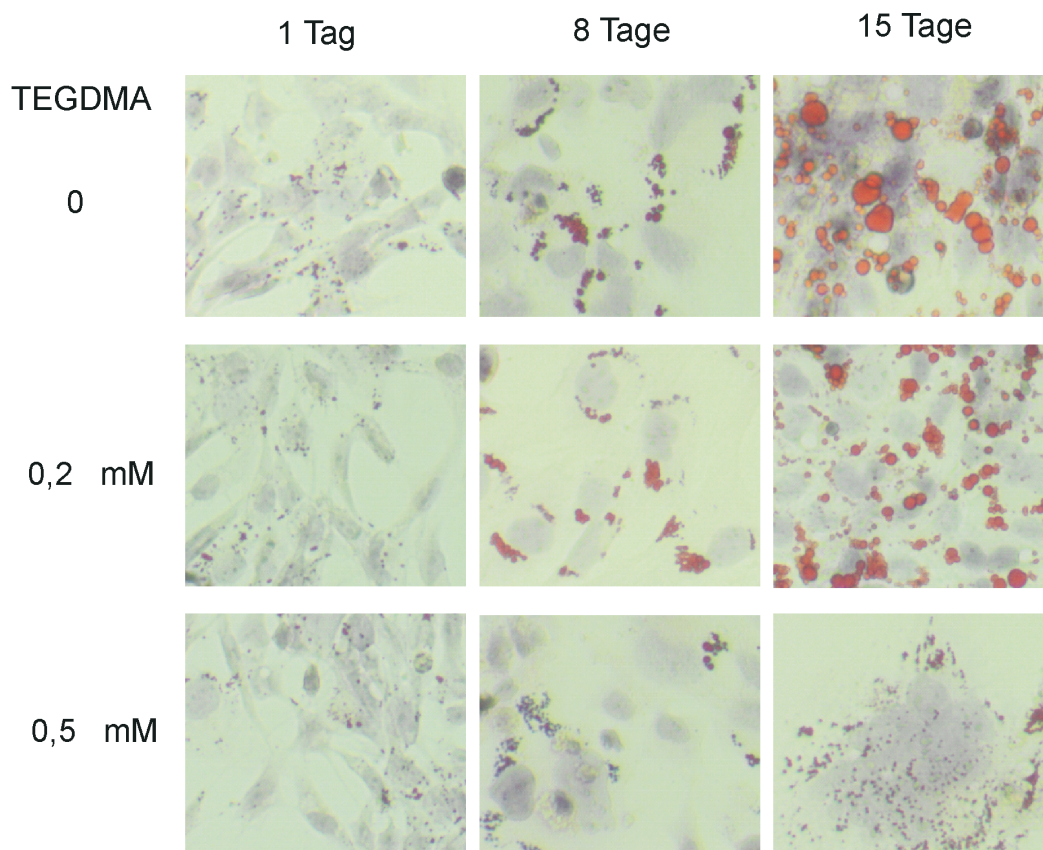


Abbildung 13: LiSa-2 Präadipozyten wurden mittels Hormoncocktail zur Differenzierung angeregt und mit 0, 0,2 und 0,5 mM TEGDMA inkubiert. Nach 1, 8 und 15 Tagen wurden die Zellen mittels ORO Färbung behandelt und anschließend mikroskopisch ausgewertet. Ähnliche Ergebnisse wurden in 3 unabhängigen Experimenten erzielt.

Zur Visualisierung der LiSa-2 Zelldifferenzierung wurden die gebildeten Lipidtröpfchen mit ORO gefärbt und anschließend im Lichtmikroskop fotografiert. Dabei zeigte sich, dass bereits mit 0,2 mM TEGDMA eine leichte Verminderung der

Lipidtröpfchenbildung zu sehen war (Abb. 13). In Anwesenheit von 0,5 mM TEGDMA fand praktisch keine Lipidtröpfchenbildung mehr statt und die LiSa-2 Zellen gingen verstärkt in die Apoptose. Insbesondere nach 15 Tagen war ein Anstieg der apoptotischen Zellen zu sehen.

Um die ORO Färbung zu quantifizieren, wurde die relative Menge des Farbstoffs ORO im Photometer bei einer Wellenlänge von 520 nm gemessen.

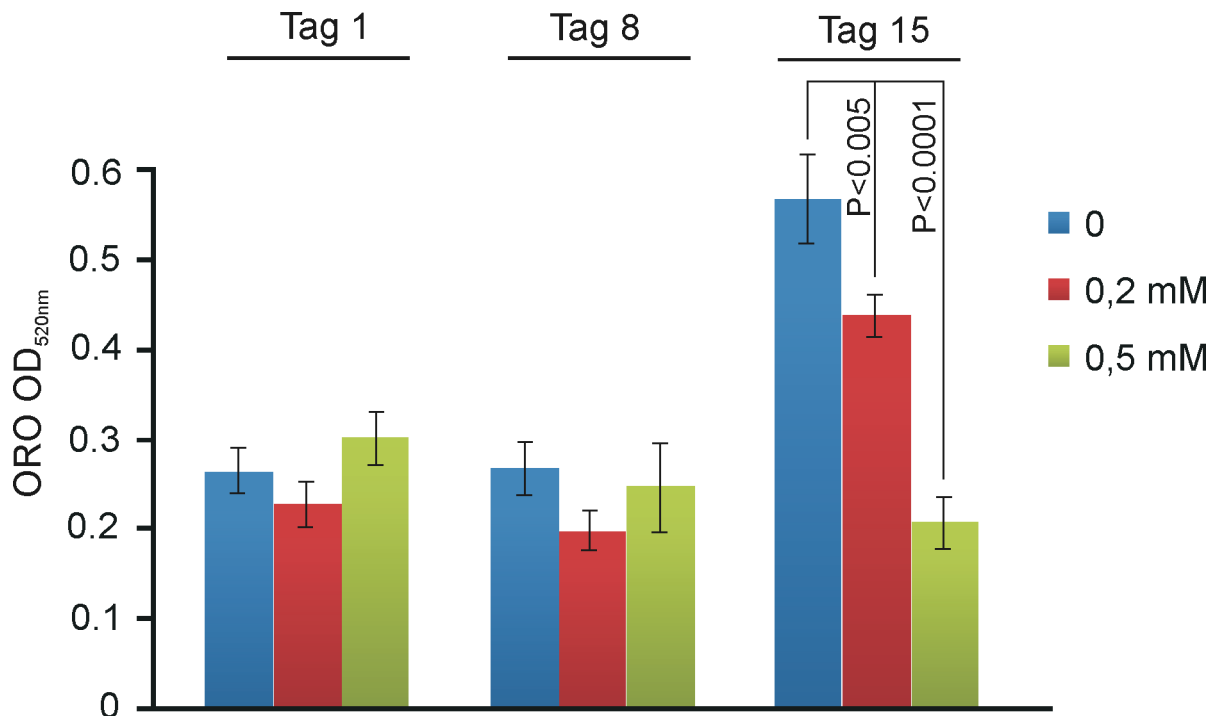


Abbildung 14: Quantifizierung der ORO-Färbung nach TEGDMA Behandlung von LiSa-2 Zellen während ihrer Differenzierung. In dieser Abbildung werden photometrisch gewonnene Werte gegenüber gestellt. Die Werte stammen von LiSa-2 Zellen aus dem Verlauf der Differenzierung von Präadipozyten zu Adipozyten, hierbei wurden Zellen nach 1, 8 und 15 Tagen mit ORO-Färbung behandelt und mittels OD Messung quantifiziert. Die unterschiedlichen Konzentrationen von TEGDMA, mit welchen die Zellen während der Differenzierung inkubiert wurden, sind farblich gekennzeichnet. Die gezeigten Daten wurden in 4 unabhängigen Experimenten erzielt. Die Statistik wurde mit der GraphPad InStat3 Software berechnet. (Mittelwerte+/-SD, n=4).

Während der Differenzierung von LiSa-2 Zellen wurde nach 1, 8 und 15 Tagen eine ORO-Färbung mit anschließender OD Messung durchgeführt. Hierbei wurden Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von TEGDMA (0, 0,2 und 0,5 mM TEGDMA) gegenüber gestellt (Abb. 13) und in der Abb. 14 statistisch aufbereitet.

Nach 1 Tag und nach 8 Tagen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Konzentrationen eines Differenzierungszeitpunktes ermittelt werden. Vergleicht man die einzelnen Konzentrationen in Bezug auf 1 Tag und 8 Tage, so ist eine abfallende Tendenz bei den Proben mit TEGDMA Inkubation (0,2 mM und 0,5 mM) und ein minimaler Anstieg bei den Proben ohne TEGDMA zu erkennen. Schaut man sich die Werte der Proben nach 15 Tagen Differenzierung an, dann erkennt man deutlich abfallende Werte von 0 TEGDMA über 0,2 mM zu 0,5 mM TEGDMA. Vergleicht man die Werte von 15 Tagen mit 1 und 8 Tagen so kommt es bei 0 TEGDMA wie erwartet zu einem starken Anstieg bei 15 Tagen. Auch in Anwesenheit von 0,2 mM TEGDMA konnte ein Anstieg im Vergleich zu 1 und 8 Tagen verzeichnet werden. Dieser Anstieg war jedoch signifikant geringer im Vergleich zu 0 mM TEGDMA. Bei 0,5 mM TEGDMA kommt es nochmals zu einem weiteren Abfall (Abb. 14). Im Vergleich zu 1 und 8 Tagen wurde in Anwesenheit von 0,5 mM TEGDMA kein Anstieg der ORO-Färbung beobachtet.

4.3 Der Einfluss der TEGDMA Behandlung auf die VEGF Produktion und den Apoptosegrad der LiSa-2 Zellen

Da das VEGF ein wichtiges Adipokin und Ausdruck für die Vitalität der LiSa-2 Präadipozyten ist (Huang et al, 2012), haben wir den Einfluss von TEGDMA auf die VEGF Produktion während der Adipogenese untersucht.

Nach dem 1. Tag der Differenzierung ist die VEGF Produktion am höchsten. Zu diesem Zeitpunkt konnte jedoch noch kein Unterschied in der VEGF Produktion zwischen 0, 0,2 und 0,5 mM TEGDMA Behandlung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Einen signifikanten Unterschied gab es nur nach 8 Tagen der LiSa-2 Zelldifferenzierung. Nach 8 Tagen Differenzierung konnte eine signifikante Abnahme der VEGF Produktion sowohl mit 0,2 mM als auch mit 0,5 mM TEGDMA gemessen werden (Abb. 15).

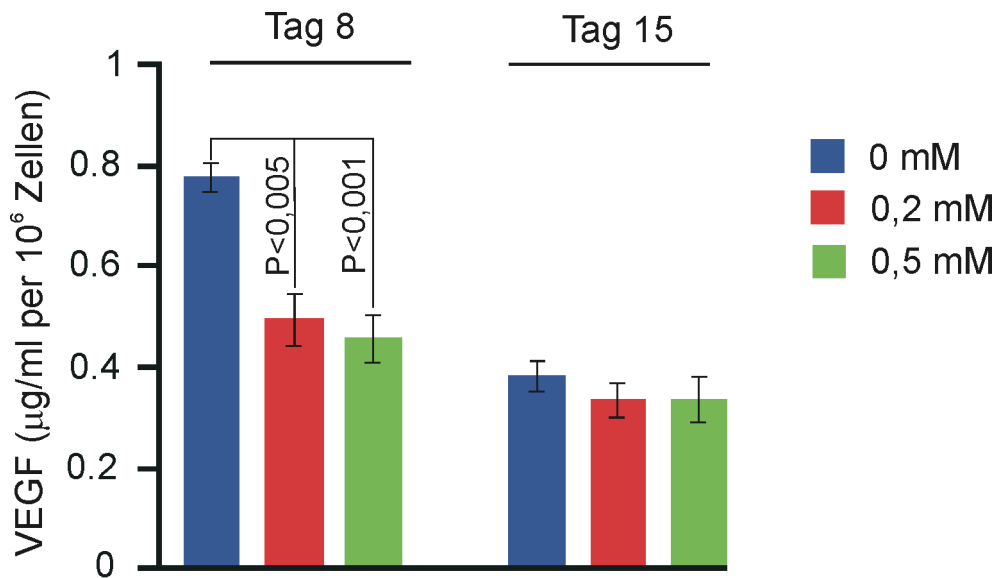


Abbildung 15: VEGF Messung zur Quantifizierung der Vitalität von LiSa-2 Zellen nach TEGDMA Inkubation während der Differenzierung von LiSa-2 Zellen. In dieser Abbildung finden sich Werte von LiSa-2 Zellen nach 8 und 15 Tagen Differenzierung und gleichzeitiger Inkubation mit 0, 0,2 und 0,5 mM TEGDMA. Diese Werte beziehen sich auf die VEGF Konzentration der untersuchten Zellen. Die unterschiedlichen TEGDMA Konzentrationen wurden farblich unterschieden. Die VEGF Konzentration wurde mittels VEGF-ELISA in den Zellüberständen nach den entsprechenden Zeiten gemessen. Die Ergebnisse wurden in 4 unabhängigen Experimenten erhalten. (Mittelwert+/-SD, n=4).

In reifen Adipozyten geht die Produktion von VEGF drastisch zurück (Huang et al, 2012). Dies zeigt sich auch in unserem Experiment, hier wurde nach 15 Tagen eine geringe VEGF Produktion nachgewiesen und es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen 0, 0,2 und 0,5 mM TEGDMA-Behandlung beobachtet werden.

Zur Quantifizierung der Apoptoserate nach TEGDMA-Behandlung wurde ein ELISA verwendet, der aktive Caspase-3 detektiert (siehe Material und Methoden). Caspase-3 steht am Ende des extrinsischen und intrinsischen Apoptosesignalwegs und ist deshalb ein geeigneter Marker zur Messung von Apoptose (Cohen, 1997; Reed, 2000).

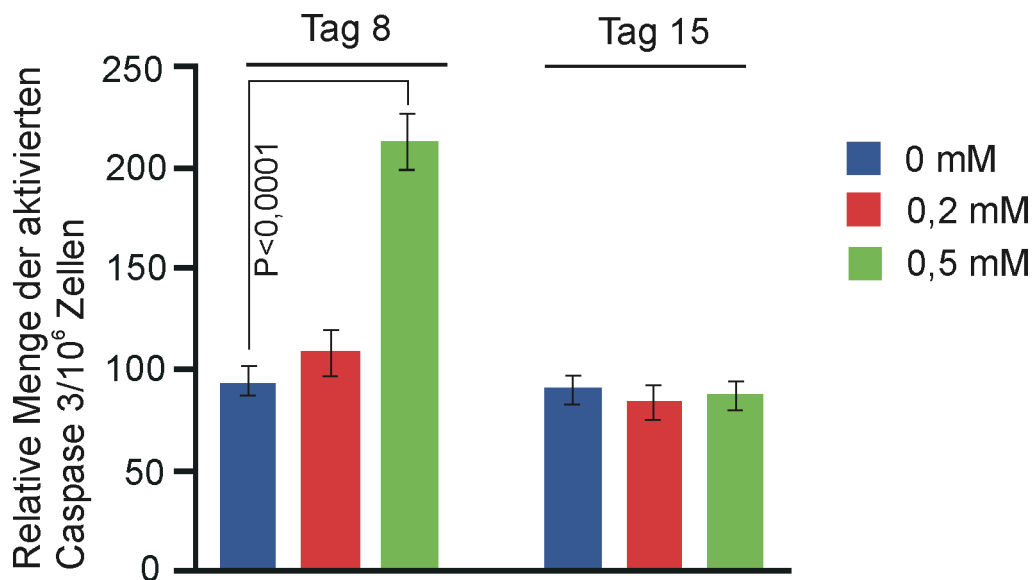


Abbildung 16: Caspase-3 Messung von in der Differenzierung befindlichen LiSa-2 Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen TEGDMA (0, 0,2 und 0,5 mM). Mittels ELISA-Caspase-3 Kit wurde die aktivierte Caspase-3 selektiv photometrisch bei 420 nm gemessen (siehe Material und Methode). (Mittelwert \pm SD, n=4).

Am 1. Tag der Differenzierung gab es keinen Unterschied in der Apoptoserate von LiSa-2 Zellen zwischen 0, 0,2 und 0,5 mM TEGDMA-Behandlung (Daten nicht gezeigt).

Nach 8 Tagen der Differenzierung von LiSa-2 Zellen zeigte sich bei einer TEGDMA Konzentration von 0,2 mM ein leicht erhöhter Wert gegenüber der Kontrollgruppe. Bei 0,5 mM TEGDMA kam es zu einem starken Anstieg der Caspase-3 Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe und auch zu der Gruppe mit 0,2 mM TEGDMA. Die Werte der Zelldifferenzierung nach 15 Tagen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen TEGDMA Konzentrationen und der Kontrollgruppe auf. Stellt man die Werte von 8 Tagen und 15 Tagen gegenüber, so zeigte die Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied, die Gruppe mit einer 0,2 mM TEGDMA Inkubation einen leichten Caspase-3 Abfall und die 0,5 mM TEGDMA Gruppe einen sehr deutlichen Abfall der Caspase-3 Konzentration. Nach 15 Tagen glichen sich die Werte der aktiven Caspase 3 der Kontrolle mit denen der mit TEGDMA behandelten LiSa-2 Zellen wieder aus (siehe Abb. 16).

4.4 NAC schützt vor TEGDMA Behandlung

Es wurde bereits beschrieben, dass NAC die Hemmung der osteogenen Differenzierung in humanen Osteosarkomazellen MG63 verhindern kann (Kim et al, 2011b). Daher haben wir den Einfluss von NAC auf die TEGDMA Wirkung in LiSa-2 Zellen untersucht.

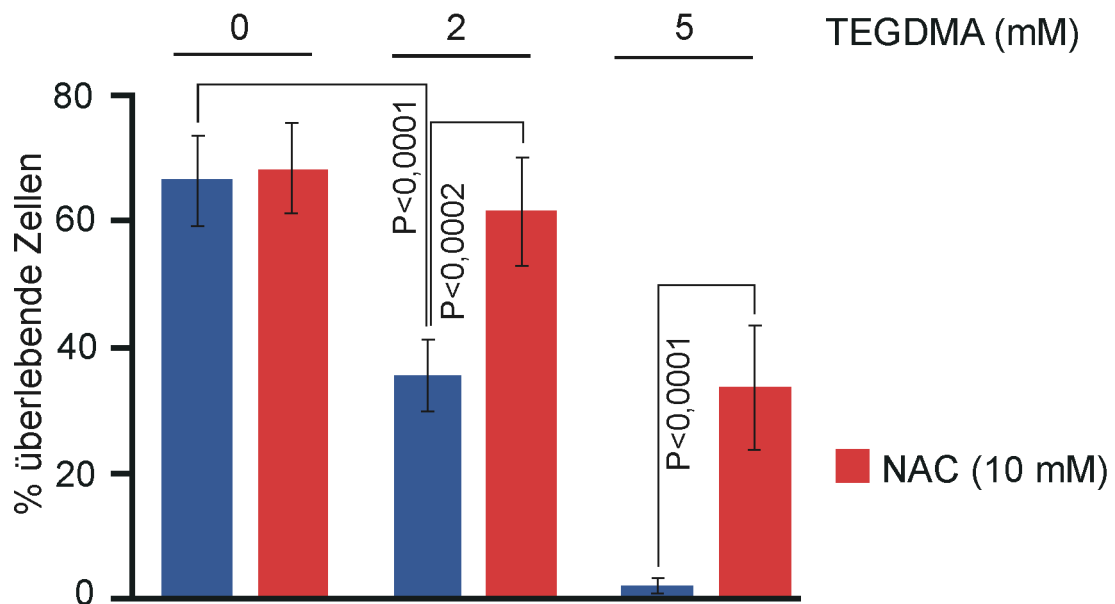


Abbildung 17: Auszählung vitaler LiSa-2 Zellen nach Inkubation mit 0, 2 und 5 mM TEGDMA mit oder ohne gleichzeitiger NAC (10 mM) Behandlung. Bevor die überlebenden Zellen in der Neubauerzählkammer ausgezählt werden konnten, wurden die Wells in denen sie kultiviert und für 24 h mit TEGDMA inkubiert wurden mit PBS (1x) gewaschen, mit Trypsin suspendiert, in Zentrifugenröhrchen zentrifugiert (1.000 rpm für 5 min) und mit Trypan-Blau markiert. (Mittelwert+/-SD, n=4).

LiSa-2 Zellen wurden für 24 h mit 0, 2 und 5 mM TEGDMA in Abwesenheit oder in Anwesenheit von NAC behandelt. Danach wurden die überlebenden Zellen in der Neubauerzählkammer ausgezählt, statistisch ausgewertet und grafisch in Abbildung 17 dargestellt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne NAC kommt es zum starken Abfall der vitalen Zellen bei 2 mM TEGDMA und zum fast vollständigen Verlust der vitalen Zellen bei 5 mM TEGDMA. Diese Daten bestätigen den drastischen Abfall der Expression von CSN Untereinheiten, von Cul1, Cul3 und von p27 und p53 nach Behandlung mit 2 mM TEGDMA für 24 h (siehe Abb. 11). Bei den Proben mit NAC erkennt man deutlich eine Erhöhung der Anzahl überlebender Zellen im Vergleich zu den Proben mit TEGDMA alleine. Bei einer Behandlung mit 2 mM TEGDMA konnten 10 mM NAC die LiSa-2 Zellen fast vollständig schützen, während ohne NAC etwa

50% der Zellen zerstört waren. Bei 5 mM TEGDMA konnten 10 mM NAC noch etwa 50% der LiSa-2 Zellen erhalten, die ohne NAC nicht überlebt hätten.

5. Diskussion

In der modernen Zahnheilkunde sind Materialien auf Compositbasis nicht mehr weg zu denken. Ihre Eigenschaften erlauben den Einsatz in sehr vielen Bereichen der Zahnmedizin, z.B. als Füllungsmaterial, Bonding-System, Befestigungsmaterial für festsitzenden Zahnersatz und festsitzende kieferorthopädische Apparaturen.

Es gibt eine Vielzahl von Bestandteilen in einem modernen Composit, wobei uns speziell die organische Phase der Composite interessiert, in der verschiedenste Monomere zum Einsatz kommen. Das wichtigste Comonomer moderner Composite ist das TEGDMA, ein Ester aus α,β -Methacrylatsäure und Ethylenglycol (Bakopoulou et al, 2009). TEGDMA senkt die Viskosität von Compositen. Aufgrund dieser Eigenschaft kann man nicht auf dieses Monomer verzichten, da nur so Composite produziert werden können, die auch vom Zahnmediziner zu handhaben sind. Von der Gesamtmasse der verwendeten organischen Phase in Compositen macht TEGDMA einen Anteil von über 50% aus (Stanislawski et al, 2003).

Da viele Studien nachgewiesen haben, dass TEGDMA einen zytotoxischen und genotoxischen Effekt auf Zellen hat, habe ich mich in meiner Arbeit auf diesen wichtigen Bestandteil der Composite fokussiert. Der Mechanismus mit dem TEGDMA auf die Zellen wirkt ist noch nicht geklärt. Viele Studien zeigen einen starken und schnellen Abfall der intrazellulären GSH Konzentration bei gleichzeitigen leichten Anstieg der ROS in Anwesenheit von TEGDMA in einer nichttoxischen Konzentration. Es wird daher vermutet dass hier der Wirkungsmechanismus von TEGDMA auf die Zelle liegt. Einige Studien haben sich mit diesem Thema näher beschäftigt und keinen direkten Zusammenhang zwischen der Senkung von GSH und dem Anstieg von ROS und der zytotoxischen und genotoxischen Wirkung festgestellt (Martins et al, 2012; Volk et al, 2012). Um den Wirkungsmechanismus von TEGDMA besser zu verstehen, habe ich den Effekt des Monomers auf das CSN während der Differenzierung von LiSa-2 Präadipozyten untersucht.

5.1 Der Einfluss von TEGDMA auf das COP9 Signalosom

Das CSN ist ein wichtiger zellulärer Baustein, der in jeder eukaryotischen Zelle vorkommt. Im Zusammenspiel mit dem UPS ist das CSN an zellulären Prozessen beteiligt wie Zellzyklus (Dohmann et al, 2008; Liu et al, 2003), DNA-Reparatur (Groisman et al, 2003; Matsuoka et al, 2007; Shiloh, 2006), Angiogenese (Braumann et al, 2008) und Zelldifferenzierung (Huang et al, 2012) (siehe Einleitung).

Am Anfang stand die Frage ob TEGDMA überhaupt einen Einfluss auf das CSN hat und welche Konzentration für unser Modell geeignet ist. Die meisten anderen Studien gaben einen maximalen nichttoxischen Konzentrationswert von 0,5 mM TEGDMA an (Batarseh et al, 2014; Chang et al, 2012; Kim et al, 2011a).

Wir starteten mit Konzentrationen von 0,2 und 2 mM TEGDMA. Es zeigte sich jedoch schnell, dass in LiSa-2 Zellen 2 mM TEGDMA eine zu hohe Konzentration darstellte, welche bereits nach 48 h zu einer massiven Apoptose führte und daher wenig verwendbare Daten lieferte. Daraufhin definierten wir einen neuen Konzentrationsbereich von 0,2 und 0,5 mM TEGDMA, welchen wir für fast alle späteren Experimente nutzten.

Ein Effekt auf das CSN konnte beobachtet werden, anhand der Absenkung von CSN-Untereinheiten (CSN5, CSN8) und CSN assoziierten Proteinen. Nach Behandlung von LiSa-2 Zellen mit hohen TEGDMA Konzentrationen (0,5 und 2 mM) wurden deutliche Reduktionen der Untereinheiten CSN5 und CSN8 im Western-Blot festgestellt (Abb. 10 und 11) was sehr wahrscheinlich mit einem Abfall des gesamten CSN Komplexes verbunden ist. Der zugrunde liegende Mechanismus ist unklar. Möglicherweise hat TEGDMA einen Einfluss auf die Bildung der Let-7 miRNAs, welche die Expression von CSN Untereinheiten regulieren (Leppert et al., 2011). Während der Differenzierung von LiSa-2 Zellen steigt das CSN an (Dubiel et al., 2014) und ist essentiell für den Differenzierungsprozess (Huang et al. 2012). Daher führt eine Reduktion des CSN zur Hemmung der Differenzierung von LiSa-2 Zellen.

Es ist interessant, dass das Chemotherapeutikum Mitomycin C im Gegensatz dazu zu einer Erhöhung des CSN führt, was eine verbesserte DNA Reparatur zur Folge hat (Feist et al. 2014). TEGDMA scheint daher keinen stimulierenden Effekt auf die DNA-Damage Response Mechanismen zu haben.

5.2 LiSa-2 Zellen, ein Zellmodell zum Studium der Wirkung von TEGDMA auf die Zelldifferenzierung

Bei einem kariösen Zahn mit einer tiefen Läsion und Beteiligung der Pulpa, ist die Zelldifferenzierung von Pulpastammzellen hin zu Odontoblasten essentiell für den Vitalerhalt der Pulpa, ebenso im Bereich der Gingiva und des Parodonts. Ungebundene Monomere von Compositfüllungsmaterialien und Bonding-Systemen haben zytotoxische und entzündliche Wirkung auf angrenzendes Gewebe, wie z.B. der Pulpa wo die reparative Dentinbildung der Odontoblasten gestört wird (Lee et al, 2009; Sandberg et al, 2005). Auch in diesen Studien ging es vorrangig um das TEGDMA, welches am häufigsten aus Compositen freigesetzt wird und durch seine hydrophile und lipophile Eigenschaft in die unterschiedlichsten biologischen Umgebungen vordringen kann (Geurtsen & Leyhausen, 2001). Das Composit muss keinen direkten Kontakt zur Pulpa haben, da TEGDMA durch das Dentin diffundieren kann und im Pulpagewebe sich in hohen Konzentrationen (im mM-Bereich) anlagert (Schweikl et al, 2006). Dies ist dem speziellen Aufbau des Dentins geschuldet.

Es gibt nur wenige Studien, die sich mit dem Einfluss von TEGDMA auf die Zelldifferenzierung beschäftigt haben. Bei allen Studien kam es zu einem negativen Effekt auf die Differenzierung. In einer Studie von About und Mitarbeitern (About et al, 2002) wurde die Zelldifferenzierung von Pulpafibroblasten zu Odontoblasten untersucht, in Anwesenheit und Abwesenheit von einigen Monomeren (TEGDMA, HEMA, UDMA, Bis-GMA) in nichttoxischer Konzentration. Man verwendete für diese in vitro Studie Pulpagewebe von extrahierten 3. Molaren. Nach einer vierwöchigen Inkubation mit täglichem Mediumwechsel wurde die Differenzierung anhand der Expression von Typ-I-Collagen, Osteonectin und Sialoprotein (DSP) ausgewertet. Die Kontrollgruppe zeigte in der mikroskopischen Betrachtung die Bildung von mineralischen Knollen (Dentin). Die Monomere hatten alle einen negativen Einfluss auf die Expression der untersuchten Proteine. TEGDMA senkte sehr stark die Sialoproteinausschüttung. Bei allen Zellen mit Monomerinkubation kam es zu keinerlei Dentinbildung. In einer andere Studie (Kim et al, 2011a) wurden Osteosarkom-Zellen MG63 verwendet. Auch hier wurden Zellen während ihrer Differenzierung untersucht, in einem Zeitraum von 1 – 6 Tagen mit einer nichttoxischen Konzentration von maximal 0,5 mM TEGDMA. Auch in dieser Studie kommt es zu einer starken Störung der Zelldifferenzierung in Abhängigkeit von der Zeit und der Konzentration des Monomers.

In meinen Experimenten habe ich mich für die LiSa-2 Zelllinie entschieden, da diese Zelllinie im Labor von Prof. Dubiel seit vielen Jahren etabliert und als Zelldifferenzierungsmodell charakterisiert ist. Die Differenzierung der humanen Liposarkom-LiSa-2 Zellen erfolgt über drei Wochen und ist sehr gut dokumentiert. Die Bildung von Lipiden und deren Einlagerung in Lipidtröpfchen während der Zelldifferenzierung kann durch Färbung mit ORO ausgezeichnet sichtbar gemacht werden, was auch quantitativ mittels Photometrie ausgewertet werden kann.

Da die Zelldifferenzierung der LiSa-2 Zellen 3 Wochen dauert, haben wir folgende Zeitpunkte für unsere Untersuchung festgelegt: nach 1 Tag, 8 Tage und 15 Tage.

Während der Differenzierung von LiSa-2 Zellen in Anwesenheit von TEGDMA erfolgte ein signifikanter Abfall von CSN5 und CSN8. Auch die Expression des für die Differenzierung von LiSa-2 Zellen wichtigen Proteins p27 sank, ebenso wie der Masterregulator für die Adipogenese, PPAR- γ . Durch den Abfall des CSN, ist die Zelldifferenzierung gestört. Bestätigt wird dies durch einen gleichzeitigen Anstieg des negativen Regulators der Adipogenese, CHOP (siehe Abb. 12).

Unter normalen Bedingungen ubiquitiniert eine Cul3-abhängige Ub-Ligase, CRL3^{Keap1}, das CHOP-Protein (siehe Einleitung). Das CRL3^{Keap1} wird aber nur mit Hilfe des CSN gebildet. Da TEGDMA das CSN reduziert, kommt es nicht zur CRL3^{Keap1}-Bildung und somit zur Hemmung der Adipogenese (Huang et al, 2012).

Um den Einfluss von TEGDMA auf die Differenzierung von LiSa-2 Zellen zu visualisieren wurden LiSa-2 Zellen mit der ORO Färbung behandelt und unter einem Lichtmikroskop untersucht und fotografiert. In der Abb.12 kann man die Adipogenese in den Kontrollzellen gut beobachten. Im Verlauf der 15 Tage akkumulieren immer mehr Lipide in den Lipidtröpfchen, welche dank ORO Färbung rot erscheinen. Bei einer Konzentration von 0,2 mM TEGDMA zeigt sich nach 15 Tagen eine deutlich verminderte Lipidtröpfchenbildung, während bei 0,5 mM TEGDMA schon nach 8 Tagen. Nach 15 Tagen ist so gut wie kein Lipidtröpfchen zu finden. Da sich dabei auch die Zellzahl vermindert, muss man von einer verstärkten Apoptose ausgehen. Auch diese Untersuchung zeigt einen deutlichen negativen Einfluss von TEGDMA auf die Differenzierung von LiSa-2 Zellen in direkter Abhängigkeit von der verwendeten Monomerkonzentration. Um dieses visuell ermittelte Ergebnisse zu quantifizieren wurde ein Photometer bei einer Wellenlänge von 520 nm verwendet. Der ORO Farbstoff wurde aus den Zellen extrahiert und photometrisch gemessen.

Die statistisch ausgewerteten Daten decken sich mit den mikroskopischen Aufnahmen. Je höher die TEGDMA Konzentration, desto niedriger der gemessene ORO Wert, desto weniger Lipidtröpfchen, desto stärker die Hemmung der Differenzierung. Bei den Werten in Abb.14 für 0,5 mM TEGDMA nach 15 Tagen sollte man auch davon ausgehen, dass die Apoptose bei dieser Monomerkonzentration sehr hoch ist. Daher wird man zusätzlich zur Hemmung der Differenzierung auch weniger vitale LiSa-2 Zellen vorfinden.

5.3 TEGDMA beeinträchtigt die LiSa-2 Zellvitalität und induziert Apoptose in LiSa-2 Zellen während der Differenzierung

Wir haben festgestellt, wie auch andere Studien, dass TEGDMA mit steigender Konzentration die Lebensfähigkeit von eukaryotischen Zellen beeinträchtigt und die Apoptoseraten erhöht. Ich habe zunächst die Vitalität von LiSa-2 Präadipozyten während der Differenzierung und in Anwesenheit von TEGDMA untersucht. Ein wichtiges Kennzeichen für die Vitalität von LiSa-2 Präadipozyten ist die Produktion von Adipokinen. Ein wichtiges Adipokin ist das VEGF, welches bereits in früheren Studien bestimmt wurde (Huang et al., 2012). Meine Ergebnisse zeigen eine Absenkung der VEGF Produktion bei steigender Konzentration von TEGDMA nach 8 Tagen Differenzierung (Abb. 15).

Die Zellvitalität ist negativ proportional zur TEGDMA Konzentration. Dieses Ergebnis wird durch die Auszählung der überlebenden Zellen bestätigt. Nach 24 h bei einer TEGDMA Konzentration von 5 mM gibt es praktisch keine überlebende Zellen (siehe Abb. 17).

Eine erniedrigte Zellvitalität lässt eine erhöhte Apoptoserate vermuten. In einer jüngsten Studie (Batarseh et al, 2014) wurden verschiedene Pro- und Anti-apoptotische Proteine gemessen. Die Autoren stellten einen deutlichen Anstieg von Pro-apoptotischen Proteinen bei steigender TEGDMA-Konzentration fest.

Zur Bestimmung der Apoptoserate haben wir die Bildung der aktiven Caspase 3 in LiSa-2 Zellen gemessen. Mittels eines Caspase-3-ELISAs konnten wir eine quantifizierbare Aussage zum Verhältnis TEGDMA zum Apoptosegrad ermitteln. Nach 8 Tagen der Differenzierung zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Caspase-3-Konzentration bei 0,5 mM TEGDMA, während bei 0,2 mM nur eine leichte Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe zu beobachten war (Fig. 16). Das

bestätigt die Vermutung, dass je höher die Konzentration von TEGDMA ist, desto höher ist die Apoptoserate. Nach 15 Tagen haben sich die Werte der mit TEGDMA inkubierten Proben an die Kontrollgruppe angeglichen, da vermutlich bereits in allen Zellen Apoptose induziert war. Da wir bereits gezeigt haben, dass TEGDMA auf das CSN wirkt und dieses negativ beeinflusst, vermuten wir hier einen Punkt gefunden zu haben an dem TEGDMA angreift und durch die Downregulation des CSN die Vitalität der LiSa-2 Zellen senkt und die Apoptose begünstigt. Zusätzliche Wirkungen von TEGDMA auf andere zelluläre Signalwege können wir nicht ausschließen.

5.4 Möglicher Mechanismus der TEGDMA Wirkung

Wir haben uns die Frage gestellt, ob es auch eine Möglichkeit gibt den negativen Einfluss von TEGDMA auf die LiSa-2 Zellen abzuschwächen oder gar zu neutralisieren. Viele Studien, die eine Wirkung des TEGDMA auf die GSH-Konzentration untersuchten, fanden einen protektiven Mechanismus in der zusätzlichen Inkubation mit N-Acetylcystein (NAC). NAC ist ein Antioxidant, welches die vermeintlichen durch TEGDMA gebildeten ROS wegfangen könnte (Kim et al, 2011a; Schweikl et al, 2006). Durch meine Experimente kann ich eine hemmende Wirkung von NAC auf die TEGDMA Wirkung bestätigen. In den in Abb. 17 dargestellten Versuchen kam es zu einem protektiven Einfluss von NAC auf die LiSa-2 Zellen. Viele Studien haben einen Zusammenhang von TEGDMA und dem Anstieg von ROS verbunden mit dem Abfall von GSH. Dies konnte aber bisher nicht bewiesen werden und wurde oft ausgeschlossen (Martins et al, 2012; Volk et al, 2012). Eine jüngere Studie fand im intra- und extrazellulären Raum Addukte bestehend aus TEGDMA und NAC (Spagnuolo et al, 2013). Die protektive Wirkung von NAC gegenüber TEGDMA kommt vermutlich durch die Bindung an das Monomer und nicht durch eine antioxidative Wirkung innerhalb der Zelle mit Senkung der ROS zustande.

5.5 Mögliche Auswirkungen für die Klinik und Ausblicke

Wie schon andere Studien vor uns zeigten, kommen in den heutigen dentalen Compositen Monomere zum Einsatz, die sich in Abhängigkeit zur Konzentration negativ auf die Vitalität humaner Zellen auswirken können. Sollte man daher die Verwendung dieser Materialien vermeiden? Da den Nebenwirkungen ein sehr hoher Nutzen gegenübersteht, kann man zurzeit nicht auf Composite wie TEGDMA

verzichten. Der Zahnarzt sollte aber gründlich aufgeklärt sein. Da bei der Polymerisation nur ca. 80% der Monomere ins Polymer gebunden werden, muss der Zahnarzt gerade bei der Polymerisation Sorgfalt walten lassen, also kleine Compositeschichten und gründliches aushärten mittels UV-Lichtquelle. Aus meiner Sicht ist der kritischste Bereich die Pulpa, da das Monomer dorthin unverdünnt vordringen und sich dort anreichern kann. Gelangt das Monomer in den Mundraum, so wird es durch Speichel oder Sulkusflüssigkeit verdünnt und weg gespült. Da „die Dosis das Gift macht“, besteht im Mundraum kaum Gefahr für orale Zellen. Also sollten wir uns wieder der Pulpa zuwenden, da wir im Moment die Monomere brauchen, muss diese besser geschützt werden, also eine Monomer-freie-Unterfüllung.

Aber auch die Dentalindustrie sollte sich dem Thema annehmen und weiter auf dem Gebiet forschen. Die Kontaktallergien beim zahnmedizinischen Personal steigen, was durch die Monomere der Composite verursacht wird. Also stellt sich die Frage an die Industrie ob es Alternativen für das ein oder andere Monomer gibt und ob es möglich ist die Polymerisation zu verbessern, hin zu 100%. NAC wurde als wirksamer „Fänger“ von TEGDMA Monomeren identifiziert und sollte zum Beispiel in Unterfüllungsmaterialien zum Einsatz kommen oder in Mundspüllösungen und Zahncreme enthalten sein. Da NAC TEGDMA bindet, ist natürlich zu hinterfragen, ob es einen negativen Einfluss beim Legen einer Füllung auf den Polymerisationsprozess hat. Sollte dies der Fall sein, ist es schwer NAC als Unterfüllungsmaterial einzusetzen. Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um zu einer Anwendung von NAC in der Zahnarztpraxis zu kommen.

6. Literaturverzeichnis

- About I, Camps J, Burger AS, Mitsiadis TA, Butler WT, Franquin JC (2005) Polymerized bonding agents and the differentiation in vitro of human pulp cells into odontoblast-like cells. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* **21**: 156-163
- About I, Camps J, Mitsiadis TA, Bottero MJ, Butler W, Franquin JC (2002) Influence of resinous monomers on the differentiation in vitro of human pulp cells into odontoblasts. *Journal of biomedical materials research* **63**: 418-423
- Alanko K, Susitaival P, Jolanki R, Kanerva L (2004) Occupational skin diseases among dental nurses. *Contact Dermatitis* **50**: 77-82
- Anseth KS, Goodner MD, Reil MA, Kannurpatti AR, Newman SM, Bowman CN (1996) The influence of comonomer composition on dimethacrylate resin properties for dental composites. *J Dent Res* **75**: 1607-1612
- Bakopoulou A, Papadopoulos T, Garefis P (2009) Molecular toxicology of substances released from resin-based dental restorative materials. *International journal of molecular sciences* **10**: 3861-3899
- Batarseh G, Windsor LJ, Labban NY, Liu Y, Gregson K (2014) Triethylene glycol dimethacrylate induction of apoptotic proteins in pulp fibroblasts. *Operative dentistry* **39**: E1-8
- Bech-Otschir D, Kraft R, Huang X, Henklein P, Kapelari B, Pollmann C, Dubiel W (2001) COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *Embo J* **20**: 1630-1639
- Bowen RL (1963) Properties of a silica-reinforced polymer for dental restorations. *J Am Dent Assoc* **66**: 57-64
- Braumann C, Tangermann J, Jacobi CA, Muller JM, Dubiel W (2008) Novel anti-angiogenic compounds for application in tumor therapy - COP9 signalosome-associated kinases as possible targets. *Mini reviews in medicinal chemistry* **8**: 421-428
- Buonocore MG, Davila J (1973) Restoration of fractured anterior teeth with ultraviolet-light-polymerized bonding materials: a new technique. *J Am Dent Assoc* **86**: 1349-1354
- Cahn R W HP, Kramer E J (1992) *Materials Science and Technology: "Medical and Dental Materials"*, Vol. 14.
- Chamovitz DA, Wei N, Osterlund MT, von Arnim AG, Staub JM, Matsui M, Deng XW (1996) The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell* **86**: 115-121

Chang HH, Chang MC, Huang GF, Wang YL, Chan CP, Wang TM, Lin PS, Jeng JH (2012) Effect of triethylene glycol dimethacrylate on the cytotoxicity, cyclooxygenase-2 expression and prostanooids production in human dental pulp cells. *International endodontic journal* **45**: 848-858

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

Cohen GM (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* **326 (Pt 1)**: 1-16

Cope GA, Suh GS, Aravind L, Schwarz SE, Zipursky SL, Koonin EV, Deshaies RJ (2002) Role of predicted metalloprotease motif of Jab1/Csn5 in cleavage of Nedd8 from Cul1. *Science* **298**: 608-611

Costa CA, Hebling J, Hanks CT (2000) Current status of pulp capping with dentin adhesive systems: a review. *Dent Mater* **16**: 188-197

Craig R PJ, Wataha J (2006) Dental Materials. *Elsevier*: p. 63-84

Deng XW, Dubiel W, Wei N, Hofmann K, Mundt K, Colicelli J, Kato J, Naumann M, Segal D, Seeger M, Carr A, Glickman M, Chamovitz DA (2000) Unified nomenclature for the COP9 signalosome and its subunits: an essential regulator of development. *Trends Genet* **16**: 202-203

Deshaies RJ, Joazeiro CA (2009) RING domain E3 ubiquitin ligases. *Annu Rev Biochem* **78**: 399-434

Dohmann EM, Levesque MP, De Veylder L, Reichardt I, Jurgens G, Schmid M, Schwechheimer C (2008) The Arabidopsis COP9 signalosome is essential for G2 phase progression and genomic stability. *Development* **135**: 2013-2022

Dubiel D, Gierisch ME, Huang X, Dubiel W, Naumann M (2013) CAND1-dependent control of cullin 1-RING Ub ligases is essential for adipogenesis. *Biochimica et biophysica acta* **1833**: 1078-1084

Eichner K (1996) Zahnärztliche Werkstoffkunde und ihre Verarbeitung. Grundlagen und Verarbeitung. Hüthig Verlag, Heidelberg

Ernst C.-P. WB (2003) Quo vadis Komposit? - Eine aktuelle Standortbestimmung zahnärztlicher Füllungskomposite. *ZM* **7/2003**: 30 - 41

Ferracane JL (1994) Elution of leachable components from composites. *J Oral Rehabil* **21**: 441-452

Ferrari M, Goracci G, Garcia-Godoy F (1997) Bonding mechanism of three "one-bottle" systems to conditioned and unconditioned enamel and dentin. *American journal of dentistry* **10**: 224-230

Finger W, Dreyer Jorgensen K (1976) [Inhibition of polymerization by oxygen in composite filling materials and enamel sealers]. *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd* **86**: 812-824

Finley D (2009) Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem* **78**: 477-513

Gerzina TM, Hume WR (1996) Diffusion of monomers from bonding resin-resin composite combinations through dentine in vitro. *J Dent* **24**: 125-128

Geurtsen W (1998) Substances released from dental resin composites and glass ionomer cements. *European journal of oral sciences* **106**: 687-695

Geurtsen W, Leyhausen G (2001) Chemical-Biological Interactions of the resin monomer triethyleneglycol-dimethacrylate (TEGDMA). *Journal of dental research* **80**: 2046-2050

Geurtsen W, Spahl W, Muller K, Leyhausen G (1999) Aqueous extracts from dentin adhesives contain cytotoxic chemicals. *Journal of biomedical materials research* **48**: 772-777

Groisman R, Polanowska J, Kuraoka I, Sawada J, Saijo M, Drapkin R, Kisselev AF, Tanaka K, Nakatani Y (2003) The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage. *Cell* **113**: 357-367

Gummlich L, Rabien A, Jung K, Dubiel W (2013) Deregulation of the COP9 signalosome-cullin-RING ubiquitin-ligase pathway: mechanisms and roles in urological cancers. *Int J Biochem Cell Biol* **45**: 1327-1337

Hellwig E KJ, Attin T (1999) *Einführung in die Zahnerhaltung*, 2. Auflage edn.: Urban & Fischer.

Hellwig E KJ, Attin T (eds) (2007) *Einführung in die Zahnerhaltung*, München: Urban & Fischer.

Heo I, Joo C, Kim YK, Ha M, Yoon MJ, Cho J, Yeom KH, Han J, Kim VN (2009) TUT4 in concert with Lin28 suppresses microRNA biogenesis through pre-microRNA uridylation. *Cell* **138**: 696-708

Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* **67**: 425-479

Hetfeld BK, Helfrich A, Kapelari B, Scheel H, Hofmann K, Guterman A, Glickman M, Schade R, Kloetzel PM, Dubiel W (2005) The zinc finger of the CSN-associated deubiquitinating enzyme USP15 is essential to rescue the E3 ligase Rbx1. *Curr Biol* **15**: 1217-1221

Huang X, Ordemann J, Muller JM, Dubiel W (2012) The COP9 signalosome, cullin 3 and Keap1 supercomplex regulates CHOP stability and adipogenesis. *Biol Open* **1**: 705-710

Imazato S, Horikawa D, Nishida M, Ebisu S (2009) Effects of monomers eluted from dental resin restoratives on osteoblast-like cells. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* **88**: 378-386

Kanerva L, Rantanen T, Aalto-Korte K, Estlander T, Hannuksela M, Harvima RJ, Hasan T, Horsmanheimo M, Jolanki R, Kalimo K, Lahti A, Lammintausta K, Lauerma A, Niinimäki A, Turjanmaa K, Vuorela AM (2001) A multicenter study of patch test reactions with dental screening series. *Am J Contact Dermat* **12**: 83-87

Kim NR, Lim BS, Park HC, Son KM, Yang HC (2011a) Effects of N-acetylcysteine on TEGDMA- and HEMA-induced suppression of osteogenic differentiation of human osteosarcoma MG63 cells. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* **98**: 300-307

Kim NR, Lim BS, Park HC, Son KM, Yang HC (2011b) Effects of N-acetylcysteine on TEGDMA- and HEMA-induced suppression of osteogenic differentiation of human osteosarcoma MG63 cells. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* **98B**: 300-307

Komander D (2011) Mechanism, specificity and structure of the deubiquitinases. *Subcell Biochem* **54**: 69-87

Koppen A, Kalkhoven E (2010) Brown vs white adipocytes: the PPARgamma coregulator story. *FEBS letters* **584**: 3250-3259

Kugel G, Ferrari M (2000) The science of bonding: from first to sixth generation. *J Am Dent Assoc* **131 Suppl**: 20S-25S

Lee DH, Kim NR, Lim BS, Lee YK, Yang HC (2009) Effects of TEGDMA and HEMA on the expression of COX-2 and iNOS in cultured murine macrophage cells. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* **25**: 240-246

Leppert U, Henke W, Huang X, Müller JM, Dubiel W (2011) Post-transcriptional fine-tuning of COP9 signalosome subunit biosynthesis is regulated by the c-Myc/Lin28B/let-7 pathway. *J Mol Biol* **409**: 710-721

Lingaraju GM, Bunker RD, Cavadini S, Hess D, Hassiepen U, Renatus M, Fischer ES, Thoma NH (2014) Crystal structure of the human COP9 signalosome. *Nature*

Liu C, Powell KA, Mundt K, Wu L, Carr AM, Caspari T (2003) Cop9/signalosome subunits and Pcu4 regulate ribonucleotide reductase by both checkpoint-dependent and -independent mechanisms. *Genes Dev* **17**: 1130-1140

Lutz F KI, Schüpbach P (1993) Adhäsivsysteme für zahnfarbene Restaurationen. *Schweiz Monatsschreiben Zahnmedizin* **103**: 537 - 547

Lutz F LB, Ochsenbein H, Mühlemann H (1976) *Adhäsive Zahnheilkunde*: Juris Verlag, Zürich.

Lyapina S, Cope G, Shevchenko A, Serino G, Tsuge T, Zhou C, Wolf DA, Wei N, Deshaies RJ (2001) Promotion of NEDD-CUL1 conjugate cleavage by COP9 signalosome. *Science* **292**: 1382-1385

Martins CA, Leyhausen G, Geurtsen W, Volk J (2012) Intracellular glutathione: a main factor in TEGDMA-induced cytotoxicity? *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* **28**: 442-448

Matsuoka S, Ballif BA, Smogorzewska A, McDonald ER, 3rd, Hurov KE, Luo J, Bakalarski CE, Zhao Z, Solimini N, Lerenthal Y, Shiloh Y, Gygi SP, Elledge SJ (2007) ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* **316**: 1160-1166

Menges G (1990) *Werkstoffkunde der Kunststoffe*, 3. Auflage edn.: Carl Hanser Verlag, München.

Moszner N, Salz U, Zimmermann J (2005) Chemical aspects of self-etching enamel-dentin adhesives: a systematic review. *Dent Mater* **21**: 895-910

Oysaed H, Ruyter IE, Sjøvik Kleven IJ (1988) Release of formaldehyde from dental composites. *J Dent Res* **67**: 1289-1294

Pereira JC, Segala AD, Costa CA (2000) Human pulpal response to direct pulp capping with an adhesive system. *American journal of dentistry* **13**: 139-147

Petroski MD, Deshaies RJ (2005) Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 9-20

Polydorou O, Trittler R, Hellwig E, Kummerer K (2007) Elution of monomers from two conventional dental composite materials. *Dent Mater* **23**: 1535-1541

Powell LV (1992) Composite-resin materials and techniques in dentistry. *Curr Opin Dent* **2**: 128-136

Pray TR, Parlanti F, Huang J, Wong BR, Payan DG, Bennett MK, Issakani SD, Molineaux S, Demo SD (2002) Cell cycle regulatory E3 ubiquitin ligases as anticancer targets. *Drug Resist Updat* **5**: 249-258

Reed JC (2000) Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* **157**: 1415-1430

Reinhardt KJ, Vahl J (1979) [A comparison of light-hardened and UV-polymerizable sealants and composites]. *Dtsch Zahnärztl Z* **34**: 245-250

Rockel B, Schmalzer T, Huang X, Dubiel W (2014) Electron microscopy and in vitro deneddylation reveal similar architectures and biochemistry of isolated human and Flag-mouse COP9 signalosome complexes. *Biochem Biophys Res Commun* **450**: 991-997

Sandberg E, Kahu H, Dahlgren UI (2005) Inflammation and adjuvant properties of HEMA in mice. *European journal of oral sciences* **113**: 410-416

Scheffner M, Kumar S (2014) Mammalian HECT ubiquitin-protein ligases: biological and pathophysiological aspects. *Biochim Biophys Acta* **1843**: 61-74

Schulz S (2003) *In-Vitro-Verschleißfestigkeit und mechanisch-physikalische Werkstoffgrößen zahnärztlicher Füllungsmaterialien*: Universität Regensburg.

Schwechheimer C, Serino G, Callis J, Crosby WL, Lyapina S, Deshaies RJ, Gray WM, Estelle M, Deng XW (2001) Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response. *Science* **292**: 1379-1382

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

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

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

Seeger M, Kraft R, Ferrell K, Bech-Otschir D, Dumdey R, Schade R, Gordon C, Naumann M, Dubiel W (1998) A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *Faseb J* **12**: 469-478

Shiloh Y (2006) The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem Sci* **31**: 402-410

Spagnuolo G, Desiderio C, Riviaccio V, Amato M, Rossetti DV, D'Anto V, Schweikl H, Lupi A, Rengo S, Nocca G (2013) In vitro cellular detoxification of triethylene glycol dimethacrylate by adduct formation with N-acetylcysteine. *Dental materials : official publication of the Academy of Dental Materials* **29**: e153-160

Spahl W, Budzikiewicz H, Geurtsen W (1991) [Study on the residual monomer contents of different light curing hybrid composite resins]. *Dtsch Zahnarzt Z* **46**: 471-475

Spratt DE, Walden H, Shaw GS (2014) RBR E3 ubiquitin ligases: new structures, new insights, new questions. *Biochem J* **458**: 421-437

Stanislowski L, Lefeuvre M, Bourd K, Soheili-Majd E, Goldberg M, Perianin A (2003) TEGDMA-induced toxicity in human fibroblasts is associated with early and drastic glutathione depletion with subsequent production of oxygen reactive species. *Journal of biomedical materials research Part A* **66**: 476-482

Tsuge T, Matsui M, Wei N (2001) The subunit 1 of the COP9 signalosome suppresses gene expression through its N-terminal domain and incorporates into the complex through the PCI domain. *J Mol Biol* **305**: 1-9

Uhle S, Medalia O, Waldron R, Dumdey R, Henklein P, Bech-Otschir D, Huang X, Berse M, Sperling J, Schade R, Dubiel W (2003) Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with the COP9 signalosome. *Embo J* **22**: 1302-1312

Van Meerbeek B, De Munck J, Mattar D, Van Landuyt K, Lambrechts P (2003) Microtensile bond strengths of an etch&rinse and self-etch adhesive to enamel and dentin as a function of surface treatment. *Operative dentistry* **28**: 647-660

Van Meerbeek B, Perdigao J, Lambrechts P, Vanherle G (1998) The clinical performance of adhesives. *J Dent* **26**: 1-20

Vankerckhoven H, Lambrechts P, van Beylen M, Davidson CL, Vanherle G (1982) Unreacted methacrylate groups on the surfaces of composite resins. *J Dent Res* **61**: 791-795

Viohl J (1986) *Die Chemie zahnärztlicher Füllungswerkstoffe*: Carl Hanser Verlag, München.

Volk J, Leyhausen G, Geurtsen W (2012) Glutathione level and genotoxicity in human oral keratinocytes exposed to TEGDMA. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials* **100**: 391-399

Wabitsch M, Bruderlein S, Melzner I, Braun M, Mechttersheimer G, Moller P (2000) LiSa-2, a novel human liposarcoma cell line with a high capacity for terminal adipose differentiation. *Int J Cancer* **88**: 889-894

Wei N, Deng XW (2003) The COP9 signalosome. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**: 261-286

White UA, Stephens JM (2010) Transcriptional factors that promote formation of white adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* **318**: 10-14

Zhou C, Wee S, Rhee E, Naumann M, Dubiel W, Wolf DA (2003) Fission yeast COP9/signalosome suppresses cullin activity through recruitment of the deubiquitylating enzyme Ubp12p. *Mol Cell* **11**: 927-938

7. Anhang

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Bis-GMA	Bisphenol-A-Glycidyl-Methacrylat
CK2	Casein Kinase II
COP	constitutive photomorphogenic
CRL	Cullin-RING Ubiquitin Ligasen
CSN	COP9 Signalosom
Cul	Cullin
d	Tag
DDB1	DNA-damage-binding protein 1
DNA	deoxyribonucleic acid
DSP	Sialoprotein
DUB	Deubiquitinierungsenzyme
EDMA	Ethylen-Glycol-Dimethacrylat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eIF3	eukariotischer Translations Initiations Komplex 3
ERK	extracellular regulated kinase 1,2
GSH	Gluthation
h	Stunde
HECT	homologous to E6-AP-carboxyl terminus
HEMA	2-hydroxyethyl Methacrylat
HRP	horseradish peroxidase
JAB1	Jun-activation domain binding protein 1
JAMM	JAB1 MPN Domäne Metalloenzym
µl	microLiter
min	Minute

miRNA	microRNA
μM	microMolar
ml	milliLiter
mM	milliMolar
MPN	Mpr-Pad1-N-terminal
NAC	N-Acetylcystein
ORO	Oil Red O
PBS	phosphat bultered saline
PCI	Proteasom COP9 signalosome Initiation factor 3
PI3-κB	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKD	Proteinkinase D
RING	really interesting new gene
RNA	ribonucleid acid
ROS	reactive oxygen species
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SRS	substrate-recognition-subunits
TEGDMA	Triethylenglycoldimethacrylat
TLP	Triplelysatspuffer
TMB	Tetramethylbenzidin
TUT4	TUTase 4
Ub	Ubiquitin
USP	Ubiquitin-spezifische Protease
VEGF	vascular endothelial growth factor

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Andreas Heine, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss des Monomers TEGDMA als Bestandteil dentaler Composite auf das COP9 Signalosom und die Differenzierung von LiSa-2 Zellen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Andreas Heine hatte keinen Anteil an Publikationen.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Ohne die Unterstützung und den Rat anderer wäre diese Promotion nicht möglich gewesen, daher möchte ich mich an dieser Stelle bei den wichtigsten Personen bedanken.

Als erstes möchte ich meinen herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. Wolfgang Dubiel richten, der mir eine Dissertation in seiner Abteilung ermöglichte und mich dabei mit großem Engagement unterstützte. Ich konnte mich bei jedem Problem seiner vollen Unterstützung sicher sein.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Xiaohua Huang, der mich mit viel Geduld in die Experimentelle Forschung eingearbeitet hat und mir jederzeit zur Seite stand wenn ein Problem auftrat.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dubiel für die gute Zusammenarbeit.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei meiner Frau und meinen Töchtern bedanken, die mir Zeit und Freiraum gaben und mich immer motivierten.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die es mir durch ihre Unterstützung ermöglicht haben, Zahnmedizin zu studieren und damit auch die vorliegende Dissertation zu erstellen. Vielen Dank!