

**Bedeutung endogener Faktoren  
für  
Steady-State-Level und Reparatur  
oxidativer DNA-Modifikationen  
in Säugerzellen**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

"DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN"

am Fachbereich Chemie und Pharmazie

der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von

**Stephan Hollenbach**

geb. in Wertheim

**Mainz 1999**

Dekan:

Prof. Dr. W. Tremel

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dezember 1999

*Die ungelösten Probleme  
erhalten einen Geist lebendig  
und nicht die gelösten.*

E.G. Kolbenheyer

*für meine Eltern*

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von September 1996 bis August 1999 am Institut für Pharmazie des Fachbereichs Chemie und Pharmazie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Leitung von Prof. Dr. B. Epe.

Mein Dank gilt besonders Herrn Prof. Dr. B. Epe für die Überlassung des interessanten und sehr aktuellen Themas, die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, die Begutachtung dieser Arbeit und nicht zuletzt für seine jederzeit gewährte Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. R. Becker und seiner Arbeitsgruppe (Institut für Toxikologie, Mainz) als auch Dr. J. Hengstler und seinen Mitarbeitern (Institut für Toxikologie, Mainz) möchte ich dafür danken, daß ich bei Ihnen im Labor zu „Gast“ sein durfte und sie mich bei meiner Arbeit mit großem Einsatz unterstützten.

Vielen Dank möchte ich hiermit auch den Mitarbeitern der Werkstatt, der Materialverwaltung und des Photolabors des Instituts für Pharmazie für die fachmännische und zuverlässige Hilfe bei technischen Problemen aussprechen.

Ich danke herzlich allen meinen Kolleginnen und Kollegen des AK Epe, insbesondere Dr. Daniel Ballmaier, Marie Isabel Homburg, Hanns-Christian Mahler, Lydia Neu, Marcel Osterod, Karin Pauly, Nicole Phoa, Dorothea Scherer, Ina Schulz und Dr. Olaf Will, die immer ein offenes Ohr für mich hatten und bei meiner Arbeit unermüdlich unterstützt haben. Herrn Dr. Michael Pflaum und seiner Frau Dr. Inge Eckert möchte ich ganz besonders herzlich für die unermüdliche wissenschaftliche Unterstützung bei meiner Arbeit danken.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>4</b>
<b>2. Kenntnisstand</b>	<b>6</b>
<b>2.1 Reaktive Sauerstoffspezies</b>	<b>6</b>
2.1.1 Endogene Quellen reaktiver Sauerstoffspezies	7
2.1.2 Reaktive Sauerstoffspezies und die Bedeutung bei der Apoptose	9
2.1.3 Experimentelle Generierung reaktiver Sauerstoffspezies	11
2.1.3.1 ROS generiert durch den Photosensibilisator Ro 19-8022 und sichtbares Licht	11
2.1.3.2 ROS generiert durch Kaliumbromat	13
2.1.3.3 ROS generiert durch SIN-1	14
2.1.3.4 Induktion des <i>Respiratory Burst</i> mit PMA	16
<b>2.2 Oxidative DNA-Modifikationen</b>	<b>16</b>
<b>2.3 Biologische Konsequenzen oxidativer DNA-Schäden</b>	<b>18</b>
<b>2.4 DNA-Reparaturmechanismen</b>	<b>20</b>
2.4.1 Direkte Reparatur (Schadenreversion)	20
2.4.2 Basen-Exzisions-Reparatur (BER)	21
2.4.2.1 Reparaturenzyme für 8-Hydroxyguanin in Pro- und Eukaryonten	23
2.4.2.1.1 Reparaturenzyme für 8-Hydroxyguanin in <i>Escherichia coli</i> : FPG, Mut Y und Mut T	24
2.4.2.1.2 Reparaturenzyme für 8-Hydroxyguanin in der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : yOgg1, Ntg1	26
2.4.2.1.3 Reparaturenzyme für 8-Hydroxyguanin in Säugern: Ogg1, Myh und Mth1	28
2.4.2.2 Rolle des Xrcc1-Proteins in der Basen-Exzisions-Reparatur	30
2.4.3 Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)	31
2.4.4 Transkriptionsgekoppelte DNA-Reparatur (TCR, <i>preferential repair</i> )	32
2.4.5 Postreplikative Reparatur ( <i>Mismatch-Reparatur</i> )	33
2.4.6 Die Bedeutung der DNA-Reparatur für die Kanzerogenese	34
<b>3. Zielsetzung</b>	<b>36</b>
<b>4. Material und Methoden</b>	<b>37</b>
<b>4.1 Material</b>	<b>37</b>
4.1.1 Geräte	37
4.1.2 Verbrauchsmaterial	38
4.1.3 Chemikalien	39
4.1.4 Antikörper, DNA, Enzyme und Primer	41
4.1.5 Zelllinien, Bakterienstämme und Versuchstiere	42
4.1.6 Puffer, Lösungen, Medien	44
4.1.6.1 Alkalische Elution	44
4.1.6.2 Puffer und Medien zur Zellkultur	46
4.1.6.3 Puffer zur Glutathion-Bestimmung	48
4.1.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	49
4.1.6.5 Proteintransfer ( <i>Western Blot</i> ), Detektion mit Antikörpern	50
4.1.6.6 NBT-Reduktionstest	50
4.1.6.7 Plasmidisolierung	51
4.1.6.8 pSV2- <i>gpt</i> -Plasmid-Modifizierung	52
4.1.6.9 Enzyminkubation des pSV2- <i>gpt</i> -Plasmids	52
4.1.6.10 Agarosegelelektrophorese von PM2-DNA, Plasmid-DNA und RNA-Präparationen	53
4.1.6.11 pSV2- <i>gpt</i> -Plasmidtransformation	53
4.1.6.12 RNA-Isolierung	54
4.1.6.13 RT-PCR	54
4.1.6.14 Medien und Lösungen für den AS52/ <i>gpt</i> -Mutationstest	55

4.1.6.15 DNA-Isolierung	56
4.1.6.16 PCR und Aufreinigung der PCR-Produkte	56
4.1.6.17 Puffer zur Bestimmung von Mikrokernen	57
<b>4.2 Methoden</b>	<b>58</b>
4.2.1 Alkalische Elution	58
4.2.1.1 Prinzip	58
4.2.1.2 Versuchsaufbau	59
4.2.1.3 Vorbereitung und Schädigung der Zellen	60
4.2.1.4 Zellyse, Enzyminkubation und alkalische Elution der DNA	62
4.2.1.5 Auswertung der Alkalischen Elution, Quantifizierung der DNA-Menge	63
4.2.1.6 Alkalische Schnellelution zur Detektion von höheren DNA-Schäden	64
4.2.2 Zellkultur	64
4.2.2.1 Allgemeine Arbeitstechniken	64
4.2.2.2 Kryokonservierung von Säugerzellen	65
4.2.2.3 Zelllinien	65
4.2.3 Enzymatische GSH-Bestimmung	68
4.2.3.1 Prinzip	68
4.2.3.2 Durchführung	68
4.2.4 Nachweis des Bcl-2-Proteins	69
4.2.4.1 Präparation der Zellysate	69
4.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	70
4.2.4.2.1 Prinzip	70
4.2.4.2.2 Durchführung	70
4.2.4.3 Proteintransfer ( <i>Western Blot</i> ), Detektion mit Antikörpern	72
4.2.4.3.1 Prinzip	72
4.2.4.3.2 Durchführung	73
4.2.5 Differenzierung und Stimulation der HL60-Zellen	73
4.2.6 Plasmidisolierung (pSV2- <i>gpt</i> , pPR 63, pPR 65)	74
4.2.6.1 Bakterienkultivierung	74
4.2.6.2 Plasmidisolierung und Reinigung	75
4.2.6.3 Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA	76
4.2.7 Enzymatische Schadensanalyse am pSV2- <i>gpt</i> Plasmid (Relaxations-Assay)	76
4.2.7.1 Prinzip des DNA-Relaxations-Assay	76
4.2.7.2 Schädigung der DNA	77
4.2.7.3 Enzyminkubation	78
4.2.7.4 Schadensdetektion und Auswertung	78
4.2.8 pSV2- <i>gpt</i> -Plasmid-Transformation	81
4.2.8.1 Prinzip	80
4.2.8.2 Präparation von kompetenten Bakterien ( <i>E. coli</i> DT-2)	81
4.2.8.3 Herstellung von Nährmedien-Platten (Hart-Agar)	81
4.2.8.4 pSV2- <i>gpt</i> -Modifizierung	82
4.2.8.5 Transformation und Plattieren der Bakterien	82
4.2.8.6 Auswertung	83
4.2.9 Transfektion der CHO-Zelllinien AA8 und AS52 mit <i>hOGG1</i>	83
4.2.9.1 Prinzip	83
4.2.9.2 Durchführung	84
4.2.10 Analyse der Transfektanten auf <i>hOGG1</i> -Expression und Enzymaktivität des Genproduktes	85
4.2.10.1 RT-PCR	85
4.2.10.1.1 Prinzip	85
4.2.10.1.2 RNA-Präparation	86
4.2.10.1.3 Charakterisierung der RNA-Präparation	87
4.2.10.1.4 DNA-Hydrolyse	89
4.2.10.1.5 Erststrangsynthese mit Hilfe der Reversen Transkriptase	88
4.2.10.1.6 Durchführung der PCR	88
4.2.10.1.7 Charakterisierung der PCR-Produkte	89
4.2.10.2 <i>Western Blot</i>	91
4.2.10.3 Enzym-Aktivitäts-Tests im Gesamtzellextrakt	90
4.2.10.3.1 8-oxoG-Glykosylaseaktivität	90

4.2.10.3.2 FAPY-Guanin-Glykosylaseaktivität	91
4.2.11 AS52/ <i>gpt</i> -Mutationstest	91
4.2.11.1 Prinzip	93
4.2.11.2 Bestimmung induzierter Mutationshäufigkeiten	92
4.2.11.3 Bestimmung spontaner Mutationsraten	95
4.2.12 Bestimmung der Zelltoxizität ( <i>Cloning Efficiency</i> )	96
4.2.13 Charakterisierung von Mutationen des <i>gpt</i> -Gens in 6TG-resistenten AS52-Zellen	95
4.2.13.1 Isolierung 6TG-resistenter AS52-Zellen	95
4.2.13.2 DNA-Isolierung	97
4.2.13.3 PCR und Aufreinigung der PCR-Produkte	97
4.2.13.4 Sequenzierung der <i>gpt</i> -Sequenz	98
4.2.14 Mikrokerntest	97
4.2.14.1 Prinzip der Methode	97
4.2.14.2 Mikrokerninduktion mit Ro 19-8022 und sichtbarem Licht in AS52 und Transfektanten	99
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>99</b>
<b>5.1 Untersuchung des Einflusses des Bcl-2-Proteins auf oxidative DNA-Schäden und intrazelluläre GSH-Spiegel</b>	<b>99</b>
5.1.1 Überprüfung der konstitutiven Überexpression von <i>BCL-2</i>	99
5.1.2 Bestimmung des Steady-State-Levels FPG-sensitiver DNA-Modifikationen	100
5.1.3 Suszeptibilitätsvergleich zwischen Kontroll- und <i>BCL-2</i> -überexprimierenden Zellen	101
5.1.4 Bestimmung des Gesamt-GSH-Gehaltes	102
<b>5.2 Untersuchung des Einflusses der Zelldifferenzierung auf oxidative DNA-Schäden</b>	<b>103</b>
5.2.1 Differenzierung von HL60-Zellen	103
5.2.2 Bestimmung der Steady-State-Level FPG-sensitiver DNA-Modifikationen in HL60 und ausdifferenzierten DMSO-HL60	104
<b>5.3 Untersuchung des Einflusses einer <i>XRCC1</i>-Defizienz in CHO-Zellen auf oxidative DNA-Schäden</b>	<b>105</b>
5.3.1 Auswirkungen der <i>XRCC1</i> -Defizienz auf den Steady-State-Level FPG-sensitiver DNA-Modifikationen	106
5.3.2 Auswirkungen der <i>XRCC1</i> -Defizienz auf die Suszeptibilität gegenüber der Induktion oxidativer DNA-Schäden	106
5.3.3 Auswirkungen der <i>XRCC1</i> -Defizienz auf die Reparaturgeschwindigkeit oxidativer DNA-Schäden	108
<b>5.4 Untersuchung des Einflusses der 8-oxoG-Glykosylase (<i>Ogg1</i>) auf oxidative DNA-Schäden</b>	<b>111</b>
5.4.1 Auswirkungen einer <i>hOGGI</i> -Überexpression in CHO-Zellen	112
5.4.1.1 Ausmaß der <i>hOGGI</i> -Überexpression in den transfizierten CHO-Zellen	112
5.4.1.2 Auswirkungen der <i>hOGGI</i> -Überexpression auf den Steady-State-Level FPG-sensitiver DNA-Modifikationen	113
5.4.1.3 Auswirkungen der <i>hOGGI</i> -Überexpression auf die Suszeptibilität gegenüber der Induktion oxidativer DNA-Schäden	115
5.4.1.4 Auswirkungen der <i>hOGGI</i> -Überexpression auf die Reparaturgeschwindigkeit oxidativer DNA-Schäden	118
<b>5.4.2 Auswirkungen eines <i>mOGGI</i>-Ausfalls (<i>knock-out</i>) in Mäusezellen</b>	<b>122</b>
5.4.2.1 Auswirkungen des <i>mOGGI</i> -Ausfalls auf den Steady-State-Level FPG-sensitiver DNA-Modifikationen in Mäusefibroblasten	122
5.4.2.2 Auswirkungen des <i>mOGGI</i> -Ausfalls auf den Steady-State-Level FPG-sensitiver DNA-Modifikationen in primären Mäuse-Hepatocyten	123
5.4.2.3 Auswirkungen des <i>mOGGI</i> -Ausfalls auf die Suszeptibilität gegenüber der Induktion oxidativer DNA-Schäden	125
5.4.2.4 Auswirkungen des <i>mOGGI</i> -Ausfalls auf die Reparaturgeschwindigkeit oxidativer DNA-Schäden	126
<b>5.5 Untersuchung des Einflusses der 8-oxoG-Glykosylase (<i>Ogg1</i>) auf Mutagenese und Zelltoxizität</b>	<b>128</b>
<b>5.5.1 Mutagenität und Zelltoxizität induziert durch Ro 19-8022 und sichtbares Licht</b>	<b>129</b>

---

<b>5.5.2 Mutagenität und Zelltoxizität induziert durch Kaliumbromat</b>	<b>130</b>
<b>5.5.3 Spontane Mutationsraten</b>	<b>132</b>
<b>5.6 Untersuchung des Einflusses der 8-oxoG-Glykosylase (Ogg1) auf die Bildung von Mikrokernen</b>	<b>135</b>
<b>5.6.1 Auswirkungen der <i>hOGG1</i>-Überexpression auf die Induktion von Mikrokernen</b>	<b>136</b>
<b>5.7 Untersuchung verschiedener Bronchialkarzinom-Zelllinien</b>	<b>137</b>
5.7.1 Untersuchung der Steady-State-Level FPG-sensitiver DNA-Modifikationen in Bronchialkarzinom-Zelllinien	137
5.7.2 Bestimmung der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität in Bronchialkarzinom-Zelllinien	138
<b>5.8 Mutagenität von oxidativen DNA-Schäden</b>	<b>140</b>
5.8.1 Mutagenität von oxidativen DNA-Schäden in Bakterien	140
5.8.1.1 Modifizierung des pSV2- <i>gpt</i> -Plasmids durch SIN-1	141
5.8.1.2 Untersuchung der Mutagenität und Toxizität von SIN-1 in Bakterien	141
5.8.2 Mutagenität von oxidativen DNA-Schäden in Säugerzellen	143
5.8.2.1 Charakterisierung der durch Kaliumbromat induzierten Mutationen in AS52-Zellen	144
5.8.2.2 Charakterisierung von spontan entstandenen Mutationen in AS52-Zellen	146
<b>6. Diskussion</b>	<b>148</b>
<b>6.1 Hat das Anti-Apoptose-Protein Bcl-2 Einfluß auf die Regulation reaktiver Sauerstoffspezies?</b>	<b>148</b>
<b>6.2 Zelldifferenzierung, <i>Respiratory Burst</i> und oxidative DNA-Schäden</b>	<b>149</b>
<b>6.3 Ist das Xrcc1-Protein an der Reparatur von 8-oxoG beteiligt?</b>	<b>150</b>
<b>6.4 Inwieweit schützt Ogg1 das Säuger-Genom vor oxidativen DNA-Schäden?</b>	<b>152</b>
<b>6.5 <i>OGG1</i> ein Antimutator-Gen?</b>	<b>156</b>
<b>6.6 Besitzen maligne Zellen Anzeichen erhöhten oxidativen Stresses?</b>	<b>158</b>
<b>6.7 Spontane und induzierte Mutagenität als Folge von oxidativen DNA-Schäden?</b>	<b>159</b>
<b>7. Literaturverzeichnis</b>	<b>162</b>



**Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:**

a	adhärent (wachsend)
Abb.	Abbildung
AP-Läsionen	basenfreie Stelle in der DNA (apurinische/apyrimidinische)
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
bzw.	beziehungsweise
CHO-Zellen	Chinesische Hamster Ovarienzellen
CS	Cockayne´s Syndrom
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds	doppelsträngig
ECD	elektrochemischer Detektor
EDTA	Ethylendinitrotetraessigsäure-Dinatriumsalz
EGTA	Ethylenglycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)-N,N,N',N'- tetraessigsäure
Endo	Endonuklease
Exo	Exonuklease
f	femto
FA	Fanconi-Anämie
FAPY-Guanin	2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin
FCS	Fötale Kälberserum
FPG	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
geb.	geboren
GSH	reduziertes Glutathion
GSP	Genspezifische Primer
GSSG	oxidiertes Glutathion (Disulfid-Dimer)
h	Stunde
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
kDa	Kilo-Dalton (Molekularmasse von Proteinen)
kbp	Kilobasenpaare
k.o.	<i>knock-out</i>
LOH	Verlust der Heterozygotie ( <i>loss of heterozygosity</i> )
M	molar

mA	Milliampere
MG	Molekulargewicht
min	Minute
μ	mikro
MPA	<i>mycophenolic acid</i>
MPG	N-Methylpurin-DNA-Glykosylase
n	nano
n	Anzahl der durchgeführten, voneinander unabhängigen Experimente
NAC	N-Acetylcystein
n.b.	nicht bestimmt
NBT	Nitroblautetrazolium
NDPO <sub>2</sub>	1,4-Etheno-2,3-benzodioxin-1,4-dipropionsäure dinatriumsalz
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NLS	nukleare Lokalisationssequenz
8-oxoA	8-Hydroxyadenin
8-oxoG	8-Hydroxyguanin
p	pico
p	Irrtumswahrscheinlichkeit (Signifikanztest)
PBSCMF	phosphatgepufferte Salzlösung (Calcium-/Magnesium-frei)
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	Polymerase-Ketten Reaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat (syn. für TPA)
(m)RNA	( <i>messenger-</i> ) Ribonukleinsäure
Ro 19-8022	[R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]chinoxalin-1-yl)-carbonyl]-2-pyrrolidinmethanol
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkription bzw. Transkriptase
s	(in) Suspension (wachsend)
s.	siehe
sec	Sekunde
ssb	Einzelstrangbrüche ( <i>single strand-breaks</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIN-1	3-Morpholinosydnomin
SLCL	<i>small cell lung cancer</i>
SOD	Superoxid-Dismutase

---

T4 Endo V	T4 Endonuklease V
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TCR	transkriptionsgekoppelte Reparatur
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid
6TG	6-Thioguanin
TPA	Tetradecanoicphorbolacetat (syn. für PMA)
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Units pro Milliliter
vgl.	vergleiche
v.o.	<i>vector-only</i>
w.t.	Wildtyp
XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i>
XRCC1	<i>X-ray repair cross complementing group 1</i>

## Zusammenfassung

Die endogene Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) – wie beispielsweise Hydroxyl-Radikale, Superoxid-Radikalanionen, Wasserstoffperoxid und Singulett-Sauerstoff – bei essentiellen Stoffwechselreaktionen in allen aeroben Lebewesen stellt eine potentielle Gefahr für die Integrität der DNA in jeder Zelle dar. ROS generieren in der DNA unter anderem oxidative DNA-Modifikationen (zum größten Teil wahrscheinlich 8-Hydroxyguanin (8-oxoG)), welche wiederum zu einem Teil zu Mutationen führen und somit wahrscheinlich einen Beitrag zu der Entstehung von Krebs und anderen Krankheiten leisten.

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen vorgenommen, in welchem Ausmaß zum einen die Steady-State-Level oxidativer DNA-Schäden in Säugerzellen zum anderen die Reparaturgeschwindigkeiten solcher DNA-Modifikationen durch verschiedene endogene Faktoren beeinflusst werden. Dabei resultieren die Steady-State-Level, die in jeder Zelle nachgewiesen werden können, aus dem Fließgleichgewicht zwischen endogener Generierung und Reparatur oxidativer DNA-Schäden. Die Bestimmung dieser Steady-State-Level erfolgte mit Hilfe einer modifizierten Alkalischen Elutionstechnik unter Ausnutzung der bakteriellen Reparaturoendonuklease FPG (Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase), die sehr spezifisch oxidative Schädigungen der DNA, wie 8-oxoG erkennt. Zusätzlich wurde in einem bakteriellen Mutationstest die Mutagenität von oxidativen DNA-Schäden quantifiziert, um in Verbindung mit den ermittelten Effekten auf die Steady-State-Level und Reparaturkinetiken eine Abschätzung des veränderten Mutationsrisikos zu ermöglichen.

Im Mittelpunkt der Arbeit stand dabei die Charakterisierung der 8-Hydroxyguaninglykosylase der Säugerzellen. Sie ist das Produkt des *OGGI*-Gens, das erst 1997 kloniert wurde. Für die Untersuchungen wurden zunächst CHO-Zelllinien (Chinesische Hamster Ovarienzellen) mit der cDNA der menschlichen 8-Hydroxyguaninglykosylase (hOgg1) stabil transfiziert. Die resultierenden Transfektanten zeigten eine deutliche konstitutive Überexpression des *hOGGI*-Gens. In den so erzeugten Zelllinien konnte demonstriert werden, daß die Reparatur von induzierten FPG-sensitiven Basenmodifikationen durch die Überexpression bis zu dreifach beschleunigt wird und daß eine Korrelation zwischen dem Grad der Überexpression und der Reparaturrate besteht. Dagegen waren die Steady-State-Level der oxidativen DNA-Schäden durch die Überexpression unbeeinflusst, was dafür spricht, daß die Aktivität von Ogg1-Protein keinen geschwindigkeitslimitierenden Faktor in der Reparatur von 8-oxoG in routinemäßig kultivierten Säugerzellen darstellt. Sowohl bei den spontanen Mutationsraten als auch bei den durch oxidative Schädigungen induzierten Mutationsfrequenzen konnte keine Erniedrigung bedingt durch die *hOGGI*-Überexpression beobachtet werden. Untersuchungen zur Genotoxizität mit Hilfe des Mikrokerntests ergaben keine Korrelation zwischen Ausmaß der induzierten genotoxischen Ereignisse und dem Grad der Genexpression.

Weitere Untersuchungen zur Bedeutung von Ogg1-Protein konnten in Mäusezellen durchgeführt werden, in denen das *OGG1*-homologe Mäusegen, *mOGG1*, homozygot inaktiviert (*mOGG1*(-/-)) worden war. Hierbei konnte gezeigt werden, daß in den *mOGG1*-defizienten Zellen im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Zellen (*mOGG1*(+/+)) eine Reparatur induzierter FPG-sensitiver Basenmodifikationen erst nach 8 h einsetzt, während in den Kontrollzellen schon nach 3-4 h 50 % der Modifikationen repariert waren. Die Steady-State-Level FPG-sensitiver Modifikationen in *mOGG1*(-/-)-Zellen waren in immortalisierten, schnell proliferierenden Mäusefibroblasten nur um den Faktor 1.4, in primären Mäusehepatocyten jedoch um den Faktor 2.5 gegenüber den Wildtyp-Zellen erhöht. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese einer *OGG1*-unabhängigen Reparatur von 8-oxoG, die an die Replikation gekoppelt ist.

Inwieweit das menschliche Reparaturprotein Xrcc1 (*X-ray repair cross complementing group 1*) auch an der Prozessierung oxidativer DNA-Modifikationen beteiligt ist und ob dabei möglicherweise eine Interaktion mit Ogg1 vorliegt, wurde in der *XRCCI*-defizienten CHO-Zelllinie EM9 und der entsprechenden Wildtyp-Zelllinie untersucht. Dabei wurde ermittelt, daß weder die Steady-State-Level noch die Reparaturkinetiken der FPG-sensitiven Basenmodifikationen durch die *XRCCI*-Defizienz beeinflusst werden. In den defizienten EM9-Zellen wurden nach Induktion von oxidativen DNA-Schäden mit dem angeregten Photosensibilisator Ro 19-8022 jedoch eine deutlich höhere Anzahl an Einzelstrangbrüchen als auch eine verlangsamte Reparatur dieser Strangbrüche gegenüber der Kontrolle beobachtet. Die beschriebenen Daten machen deutlich, daß Xrcc1-Protein für die Erkennung von oxidativen DNA-Schäden und den Einschnitt des DNA-Stranges nicht notwendig ist. Es kann aber nicht ausgeschlossen werden, daß die Erhöhung der Anzahl der induzierten Strangbrüche in den EM9 auf unligierte Stranginzisionen – bedingt durch die unvollendete Reparatur oxidativer Basenmodifikationen – zurückzuführen ist. Eine *XRCCI*-Defizienz könnte somit den Ligationsschritt bei der Reparatur oxidativer DNA-Schäden erschweren.

In einem weiteren Schwerpunkt der Arbeit wurde untersucht, ob Unterschiede im Steady-State-Level in Abhängigkeit von Organ-, Gewebe- und Zelltyp auftreten. Dazu wurden Untersuchungen in Bronchialkarzinom-Zelllinien verschiedener Subtypen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, daß nur in wenigen Zelllinien – jedoch nicht in Abhängigkeit des Karzinom-Subtyps – eine leichte Erhöhung der Steady-State-Level oxidativer DNA-Modifikationen gegenüber einer als Kontrolle dienenden Bronchialepithel-Zelllinie vorliegen. In allen Bronchialkarzinom-Zelllinien konnte *in vitro* eine 8-Hydroxyguaninglykosylase-Aktivität gezeigt werden. Ebenfalls zur Frage der Zelltyp-Abhängigkeit wurde in der menschlichen Zelllinie HL60 der Einfluß des Zelldifferenzierungsstadiums auf die Steady-State-Level untersucht. Dabei zeigte sich, daß unabhängig vom Differenzierungsstadium und selbst bei Induktion eines *Respiratory Burst* in den HL60-Zellen keine Veränderung der eigenen Steady-State-Level beobachtet werden kann. Schließlich wurde in diesem

Zusammenhang der Einfluß des apoptoseregulierenden Bcl-2-Proteins, das sowohl anti- als auch prooxidative Eigenschaften aufweisen soll, in seiner Wirkung auf Steady-State-Level und Glutathionspiegel untersucht. Als Untersuchungsmodell dienten hierzu Mausemakrophagen, in denen das humane *BCL-2*-Gen konstitutiv überexprimiert wird. Die Untersuchungen ergaben, daß die Überexpression jedoch weder zu Veränderungen auf der Ebene der oxidativen DNA-Modifikationen noch der Glutathionspiegel in den Zellen führte. Dies zeigt, daß Bcl-2 keine direkten pro- oder antioxidativen Eigenschaften besitzt.

## 1. Einleitung

Die Vermeidung oder die erfolgreiche Behandlung von Krebs setzt eine genaue Kenntnis der molekularen Abläufe während der Entstehung und der Weiterentwicklung dieser Krankheit (Kanzergenese) voraus. Mutationen, die zur Aktivierung von Onkogenen bzw. zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen, werden als ursächliche Ereignisse der Krebsentstehung angesehen. Man kennt bislang jedoch noch nicht alle Gene, deren Funktionsstörung zu einer Prädisposition für Krebs führen können. Es gibt viele Hinweise dafür, daß oxidative DNA-Schäden wichtige Vorläufer für Mutationen in der Kanzerogenese darstellen, also einen großen Beitrag zur Krebsentstehung leisten (**Feig et al., 1994; Wiseman et al., 1995; Beckman & Ames, 1997**). Es ist deshalb auch vorstellbar, daß Gene, die an der Verhinderung oder Reparatur von oxidativen DNA-Schäden beteiligt sind, eine indirekte tumorsuppressive Eigenschaft aufweisen, also zu den sogenannten „Caretaker-Genen“ gehören (**Loeb, 1991**). Ein Ausfall solcher Gene würde die spontane Mutationsrate erhöhen und das Risiko der malignen Transformation entsprechend erhöhen („Mutator-Phänotyp“).

Oxidative DNA-Schäden entstehen in jeder Zelle durch reaktive Sauerstoffspezies, die aus endogenen Quellen (z.B. mitochondriale Atmungskette) und exogenen Quellen (z.B. Umweltbelastungen) stammen. Dabei stellt eine konkrete, oxidative DNA-Modifikation, das 8-Hydroxyguanin (8-oxoG), die wahrscheinlich häufigste und wegen ihrer erwiesenermaßen prämutagenen Eigenschaft bedeutendste, oxidative Modifikation der DNA dar. Die Menge an 8-oxoG in der DNA einer Zelle wird deshalb auch als Biomarker für den zellulären oxidativen Streß herangezogen (**Kasai & Nishimura, 1993**).

Natürlich gewährleisten in gesunden Zellen verschiedene Abwehrmechanismen, wie enzymatische „Entgiftung“ von ROS und zelleigene Antioxidantien, einen Schutz der zellulären Bestandteile vor zu starken Schädigungen durch reaktive Sauerstoffspezies. Eine große Rolle für die Integrität der DNA spielen darüber hinaus verschiedene Mechanismen speziell zur Reparatur der DNA. Die große Bedeutung der DNA-Reparatur spiegelt sich unter anderem in der evolutionären Konservierung einzelner für die DNA-Reparatur zuständiger Enzyme vom Einzeller bis hin zum Menschen wieder. Aus der fortwährenden Generierung oxidativer DNA-Schäden durch ROS und Reparatur dieser Schädigungen resultiert ein Gleichgewichtsspiegel der oxidativen DNA-Modifikationen – üblicherweise als Steady-State-Level bezeichnet. Jede Erhöhung dieser Gleichgewichtsspiegel aufgrund einer vermehrten Generation oder verschlechterten Reparatur oxidativer DNA-Schäden führt zu einem erhöhten Risiko für Mutationen.

In dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, inwiefern verschiedene endogene Faktoren einen Einfluß auf den Steady-State-Level und die Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen besitzen. Insbesondere wurde hierbei die Bedeutung des apoptoseregulierenden Proteins Bcl-2, der Status der Zelldifferenzierung, die endogene Generierung von ROS in

---

granulocytenartigen Zellen und der Status der Malignität untersucht. Von großem Interesse war auch die Charakterisierung bestimmter Reparaturenzyme hinsichtlich ihrer Bedeutung für die Beseitigung oxidativer DNA-Schäden. Hierbei wurde das Enzym Xrcc1 und die erst 1997 entdeckte menschliche Reparaturenuklease für 8-oxoG, hOGG1, in Säugerzellen näher untersucht. Ferner war es von Interesse, quantitative und qualitative Aussagen über die prämutagene Wirkung von oxidativen DNA-Modifikationen zu gewinnen.



## 2. Kenntnisstand

### 2.1 Reaktive Sauerstoffspezies

In allen aeroben Organismen wird Sauerstoff als essentielles Element in großen Mengen zur Energiegewinnung benötigt. Quasi als Nebeneffekt muß der Organismus die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in seinem Stoffwechsel hinnehmen (pathologische Auswirkungen der ROS). Andererseits erfüllen ROS auch physiologische Funktionen. Beispielsweise werden sie als Botenstoffe in der Signaltransduktion der Zelle genutzt.

Unter ROS versteht man eine ganze Reihe von Verbindungen, die sich vom molekularen Sauerstoff ( $O_2$ ) ableiten, aber sehr viel reaktionsfreudiger als dieser sind. Aufgrund dieser Reaktionsfreudigkeit können ROS oxidative Schäden auf zellulärer Ebene beispielsweise in DNA, Proteinen, Kohlenhydraten und Lipiden verursachen. Eine vermehrte Bildung von ROS wird als oxidativer Streß bezeichnet (Sies, 1986). In Tab. 2.1 sind eine Reihe vorkommender ROS zusammengestellt.

Bezeichnung	Formel
Hydroxyl-Radikal	$OH^\bullet$
Singulett-Sauerstoff	$^1O_2$
Hydroperoxyl-Radikal	$HO_2^\bullet$
Peroxynitrit	$ONOO^-$
Superoxid-Radikal	$O_2^{\bullet-}$
Alkoxy-Radikal	$RO^\bullet$
Peroxy-Radikal	$ROO^\bullet$
Wasserstoffperoxid	$H_2O_2$
Hypochlorige Säure	$HOCl$
Stickstoffmonoxid	$NO^\bullet$

Tab. 2.1 Reaktive Sauerstoffspezies in der Reihenfolge abnehmender Reaktivität.

### 2.1.1 Endogene Quellen reaktiver Sauerstoffspezies

ROS aus endogenen Quellen sind in den meisten Fällen Superoxid-Radikale ( $O_2^{\bullet-}$ ) oder gehen durch Folgereaktionen aus diesen hervor. Dies beruht auf der Tatsache, daß bei vielen Oxidationsreaktionen in aeroben Zellen ein monovalenter Elektronentransfer auf molekularen Sauerstoff (Abb. 2.1) stattfinden kann, was zur Bildung von Superoxid-Radikalen ( $O_2^{\bullet-}$ ) führt.

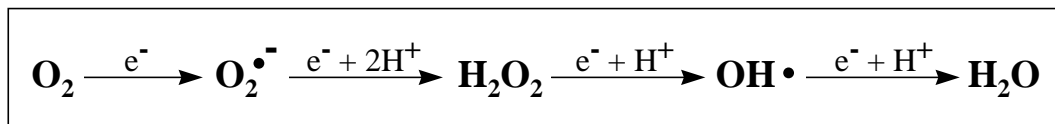


Abb. 2.1 Sequentielle Reduktion von molekularem Sauerstoff.

Als bedeutsame Quellen für die endogene Bildung von  $O_2^{\bullet-}$  gelten (Markant et al., 1995; Martinez-Cayuela, 1995; Siems et al., 1998):

- Mitochondriale Atmungskette
- Arachidonsäuremetabolismus
- Katecholaminoxidationen
- *Respiratory Burst* phagozytischer Zellen (Abb. 2.3)
- Purinabbau (Umwandlung von Hypoxanthin zu Xanthin und Harnsäure)
- Xenobiotika-Entgiftung (Reaktionen des Cytochrom-P-450-Systems)
- Autoxidation von Oxy-Hämoglobin, Thiolen und anderen reduzierten Verbindungen.

Aus den vorhandenen Superoxid-Radikalen ( $O_2^{\bullet-}$ ) kann auf spontane Weise und durch das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) katalysiert infolge von Dismutations-Reaktionen in wäßrigem Milieu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und molekularer Sauerstoff ( $O_2$ ) entstehen (Abb. 2.2, Gleichung 1). Weitere Bildungsmöglichkeiten für Wasserstoffperoxid sind die bivalente Reduktion (Abb. 2.1) von molekularem Sauerstoff durch spezifische, peroxisomal lokalisierte Oxidasen wie die D-Amino-, Harnsäure- und Glycolat-Oxidasen (Southborn & Powis, 1988).  $H_2O_2$  ist aufgrund seiner apolaren Eigenschaften dazu in der Lage Zellmembranen zu durchdringen. Zwar ist  $H_2O_2$  eine verhältnismäßig reaktionsträge Verbindung, wird aber gemeinsam mit anwesenden Superoxid-Radikalen ( $O_2^{\bullet-}$ ) durch die metallkatalysierte Haber-Weiss-Reaktion zu hochreaktiven Hydroxyl-Radikalen ( $OH^{\bullet}$ ) umgesetzt (Abb. 2.2, Gleichung 2-4).

Das Hydroxyl-Radikal ( $OH^{\bullet}$ ) kann aufgrund seiner Reaktionsfreudigkeit mit nahezu allen zellulären Molekülen (Lipide, Proteine, Nukleinsäuren, Kohlenhydraten) reagieren (Halliwell & Gutteridge, 1985; Southborn & Powis, 1988). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit und

den radikalischen Eigenschaften liegen Bildungsort und Reaktionsort (Aktionsradius: 30 Å) nahe beieinander (**Halliwell & Gutteridge, 1984; Pryor, 1986**). Hauptquelle für Hydroxylradikale ( $\text{OH}^\bullet$ ) ist die bereits erwähnte Haber-Weiss-Reaktion, welche über eine Fenton-Reaktion (Abb. 2.2, Gleichung 2 und 3) verläuft.

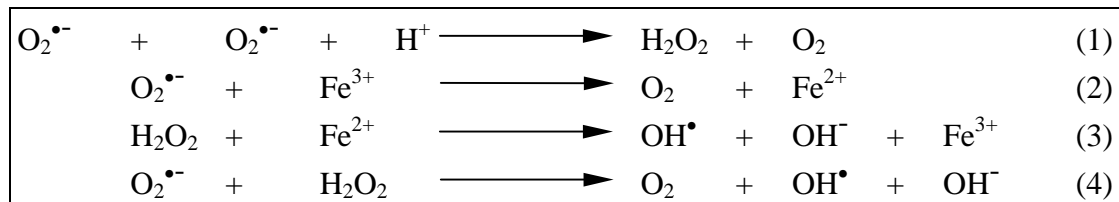


Abb. 2.2 Metallkatalysierte Bildung von Hydroxylradikalen aus Superoxid (*Haber-Weiss-Reaktion*).

Zweifelsfrei gehört auch Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) zu den ROS, die in Zellen endogen generiert werden können (**Epe, 1991**). Dafür gibt es zwei grundsätzlich unterschiedliche Mechanismen. Zum einen kann Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) bei der Belichtung endogen vorhandener Photosensibilisatoren wie Flavinen (**Joshi, 1985**), Porphyrinen (**Lambert et al., 1986; Keene et al., 1986; Carraro & Pathak, 1988**) und 4-Thiouridin (**Heihoff et al., 1990**) entstehen. Zum anderen entsteht ( $^1\text{O}_2$ ) in sehr geringen Mengen auch ohne Belichtung bei Reaktionen verschiedener Oxidasen (Peroxidasen, Cytochrom, Lipoxygenase) (**Kanofsky, 1989; Naqui et al., 1986**). Singulett-Sauerstoff besitzt eine geringere Reaktivität als Hydroxylradikale, ist aber aufgrund seiner längeren Lebensdauer beispielsweise dazu in der Lage nach Bildung im Cytosol in den Zellkern zu diffundieren (Halbwertszeit: 0.4 - 1  $\mu\text{s}$ ; Diffusionsweglänge: 1 - 2  $\mu\text{m}$ ). Dort kann er mit der DNA reagieren und verursacht dabei hauptsächlich die Bildung von 8-oxoG (**Epe, 1991**).

Stickstoffmonoxid (NO) und Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ) werden als spezielle Vertreter der ROS wegen ihres Stickstoffanteils auch unter der Bezeichnung NOS zusammengefaßt.

Die reaktiven Sauerstoffspezies erfüllen im Organismus auch physiologische Funktionen bei der Regulation biochemischer Prozesse.

So ist Stickstoffmonoxid (NO), das auch als Endothelial-Derived-Relaxing-Faktor (EDRF) bezeichnet wird, – eventuell gemeinsam mit  $\text{O}_2^{\bullet-}$  und deren Folgeprodukten – an der Regulation des vaskulären Tonus beteiligt (**Saran et al., 1990**). ROS werden auch Kontrollfunktionen bei einigen der obengenannten Enzymreaktionen zugeschrieben (**Rice-Evans & Burton, 1993**) und sind bei Vorgängen der Thrombocytenaggregation und -adhäsion beteiligt (**Salvemini & Botting, 1990**). Des Weiteren wird ein physiologisch-regulatorischer Effekt auf die Proliferationsraten von kultivierten Fibroblasten durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2^{\bullet-}$  beschrieben (**Meier et al., 1990; Murrel et al., 1990**).

Große physiologische Bedeutung besitzen auch  $\text{O}_2^{\bullet-}$  bei bakteriellen Abwehrmechanismen durch phagozytäre Zellen (Monocyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten, großer Teil

der Makrophagen) (Rice-Evans & Burton, 1993). Bei diesem als *Respiratory Burst* bezeichnetem Abwehrmechanismus wird von einem membrangebundenen Enzym, der NADPH-Oxidase, mittels der Ein-Elektron-Reduktion von molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) die Bildung von Superoxidradikalen ( $O_2^{\bullet-}$ ) katalysiert. Aus den Superoxidradikalen kann aufgrund spontaner oder enzymatischer Dismutation Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) entstehen, welches wiederum über eine eisenkatalysierte Reaktion zu Hydroxylradikalen ( $OH^{\bullet}$ ) oder mittels dem Enzym Myeloperoxidase zu Hypochloriger Säure ( $HOCl$ ) umgesetzt werden kann. Diese Folgeprodukte können dann als potente antimikrobielle Agentien von den Zellen eingesetzt werden (Weiss, 1989; Maly & Schürer-Maly, 1995) (Abb. 2.3).

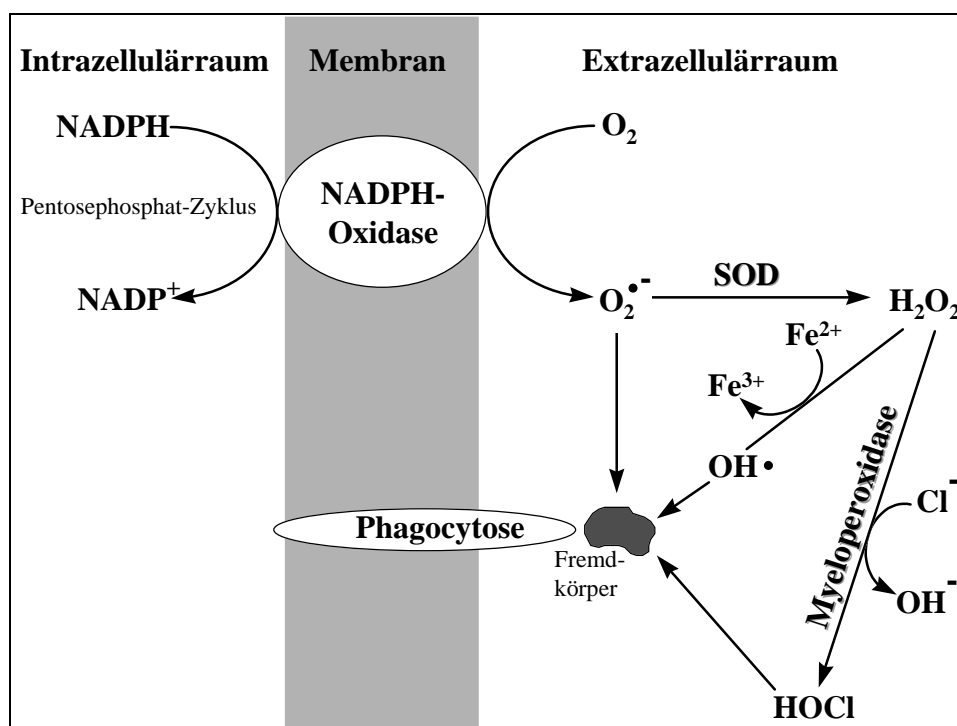


Abb. 2.3 Schematische Darstellung des *Respiratory Burst* zur bakteriellen Abwehr (Markant et al., 1995).

### 2.1.2 Reaktive Sauerstoffspezies und die Bedeutung bei der Apoptose

Die Apoptose oder der programmierte Zelltod (PCD: *programmed cell death*) erfüllt eine wichtige physiologische Funktion in Organismen. Die Apoptose ermöglicht das schnelle, gezielte Absterben von einzelnen Zellen, die durch Noxen stark geschädigt wurden, infiziert oder entartet sind oder vom Organismus nicht mehr benötigt werden, ohne umliegendes Gewebe zu schädigen. Dies stellt eine Schutzfunktion des Organismus dar (Apoptose als „Notbremse“) und spielt eine Schlüsselrolle bei der Ontogenese komplexer Organismen.

Störungen im Vermögen eines Organismus, Zellen in die Apoptose zu schicken, haben fatale Folgen. Störungen der Apoptose spielen bei vielen Erkrankungen, wie beispielsweise Krebs, AIDS und Autoimmunerkrankungen, eine Rolle (**Duke et al., 1997; Anderson, 1997**).

Die Apoptose scheint in allen Zellen nach dem gleichen Schema zu verlaufen und kann grob in die drei Abschnitte Detektionsphase, Induktionsphase und Ausführungsphase (Degradationsphase) eingeteilt werden. Dabei wird eine Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies in verschiedenen Phasen der Apoptose diskutiert (Abb. 2.4). So können ROS einer von vielen möglichen Stimuli während der Detektionsphase der Apoptose sein (**Vaux & Strasser, 1996**). Beispielsweise kann in den Mausmakrophagen RAW264.7 nach Einleitung der Apoptose mit Interferon- $\gamma$  in Gegenwart von Lipopolysacchariden (**Meßmer et al., 1996**) eine Induktion von NO-Synthasen gezeigt werden (**Meßmer et al., 1995**). In diesen Zellen läßt sich auch durch Behandlung mit NO-Donoren die Apoptose einleiten (**Meßmer & Brüne, 1996**). Neben einer verstärkten Produktion von NO wird auch eine gesteigerte Superoxidbildung in apoptoseeingeleiteten Makrophagen beschrieben (**Whyte et al., 1993; Biffl et al., 1996**). Der Zusatz von Antioxidantien dagegen kann die Einleitung der Apoptose verhindern. Dies sind Hinweise dafür, daß ROS auch in der Signalkaskade (Detektionsphase) der Apoptose eine Rolle spielen.

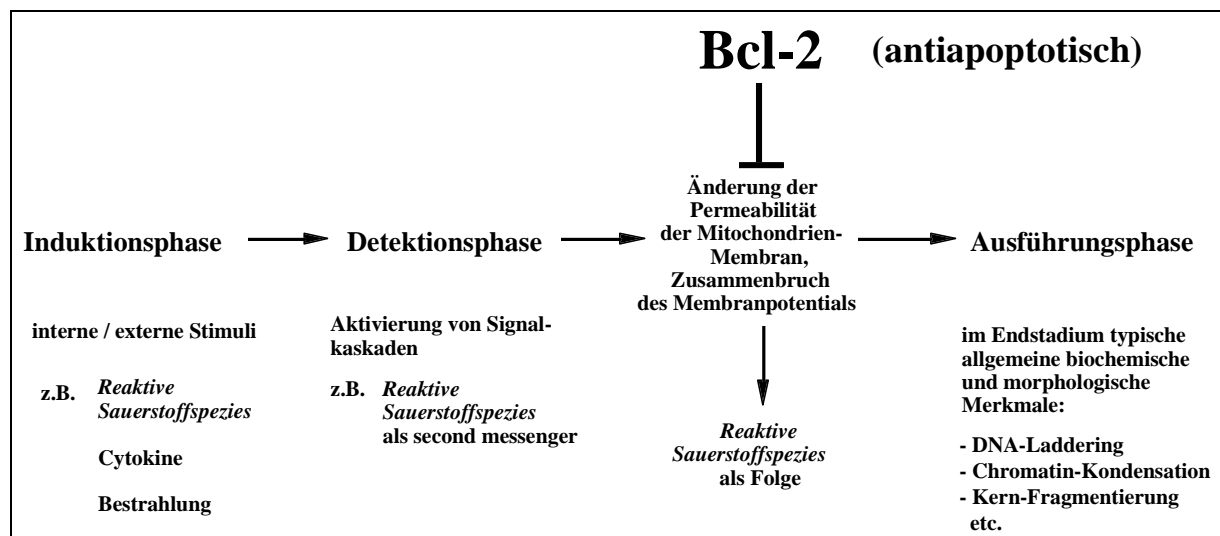


Abb. 2.4 Schematisierter Verlauf der Apoptose unter besonderer Berücksichtigung der möglichen Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies.

Die Bcl-2-Proteinfamilie nimmt eine zentrale Rolle in der Regulation der Apoptose ein. Das Bcl-2-Protein ist nachweislich einer der bedeutendsten apoptosehemmenden Faktoren (**Wertz & Hanley, 1996**). Dem Bcl-2-Protein werden in der Literatur sowohl pro- als auch antioxidative Eigenschaften nachgesagt, worauf auch zunächst die apoptosehemmende Wirkung zurückgeführt wurde (**Kane et al., 1993; Hockenbery et al., 1993; Steinman, 1994**). Es gibt Hinweise dafür, daß die Apoptose auch ohne Anwesenheit – zumindest größerer Mengen – von ROS, nämlich bei Stimulierung der Apoptose durch Hypoxie,

trotzdem durch Bcl-2 unterdrückt werden kann. Dies weist möglicherweise daraufhin, daß ROS nicht essentiell für den Verlauf der Apoptose sind und Bcl-2 nicht zwangsläufig über die Regulierung von ROS in den Ablauf der Apoptose eingreift. Die ROS scheinen demnach nur manchmal als Stimulus der Apoptose eine Rolle zu spielen. Das verstärkte Auftreten von ROS im Verlaufe der Apoptose kann andererseits auch Folge des Zelltods sein (**Shimizu et al., 1995; Jacobson & Raff, 1995**). Es konnte demonstriert werden, daß ein anderes Protein aus der Bcl-2-Familie (Bcl-x<sub>L</sub>) dazu in der Lage ist Kanäle in synthetischen Membranen zu bilden (**Minn et al., 1997**). Es konnte auch gezeigt werden, daß die Überexpression von *BCL-2* die Bildung von Ionenkanälen in der Mitochondrienmembran verhindern kann (**Susin et al., 1999**).

### **2.1.3 Experimentelle Generierung reaktiver Sauerstoffspezies**

In diesem Abschnitt sollen die in dieser Arbeit experimentell eingesetzten Agentien und die durch sie generierten ROS näher erläutert werden. Des weiteren sollen die durch diese ROS verursachten Schädigungen an der DNA charakterisiert werden.

#### **2.1.3.1 ROS generiert durch den Photosensibilisator Ro 19-8022 und sichtbares Licht**

Ro 19-8022 bezeichnet eine stark gelb fluoreszierende Verbindung mit der systematischen Bezeichnung [R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl)carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol (Abb. 2.5), die von der Firma Hoffmann-La Roche im Zuge der Entwicklung neuer Tranquillantien synthetisiert wurde.

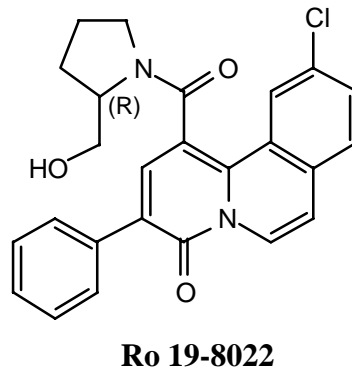


Abb. 2.5 Strukturformel von Ro 19-8022 {[R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo-[a]chinolizin-1-yl)carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol}.

Im Ames-Test erwies sich die polare Substanz ausschließlich bei gleichzeitiger Belichtung als mutagen. Zellfreie Untersuchungen an Bakteriophagen-DNA (PM2-DNA) demonstrierten, daß die Verbindung bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht ein für Singulett-Sauerstoff ( $^1\text{O}_2$ ) typisches Schadensprofil an der eingesetzten DNA generiert (Abb. 2.6) (Epe & Hegler, 1994; Will, 1995). Da Ro 19-8022 DNA-Schäden auch nur bei Anwesenheit von sichtbarem Licht generiert, handelt es sich bei Ro 19-8022 um eine photosensibilisierende Verbindung (Absorptionsmaxima: 425 nm, 315 nm und 250 nm) (Will, 1995). Die bei zellfreier Schädigung mit Ro 19-8022 und sichtbarem Licht erzeugten FPG-sensitiven Basenmodifikationen in Plasmid-DNA stellen nach Untersuchungen mit HPLC und elektrochemischer Detektion zu ca. 75 % 8-oxoG dar (Will, 1999) und verursachen bei Replikation in *E. coli* Mutationen, die zu etwa 50 % auf 8-oxoG zurückgeführt werden konnten (Will, 1999). Auch das Schadensspektrum, daß bei Schädigung von Säugerzellkulturen erhalten wird, wird von FPG-sensitiven Modifikationen dominiert und ähnelt stark dem bei zellfreier Schädigung erzeugtem Spektrum (Will, 1995). Des weiteren konnte bereits demonstriert werden, daß Ro 19-8022 unter Belichtung in Säugerzellen sowohl mutagen und zusätzlich phototoxisch wirkt als auch Mikrokerne induziert (Will et al., 1999).

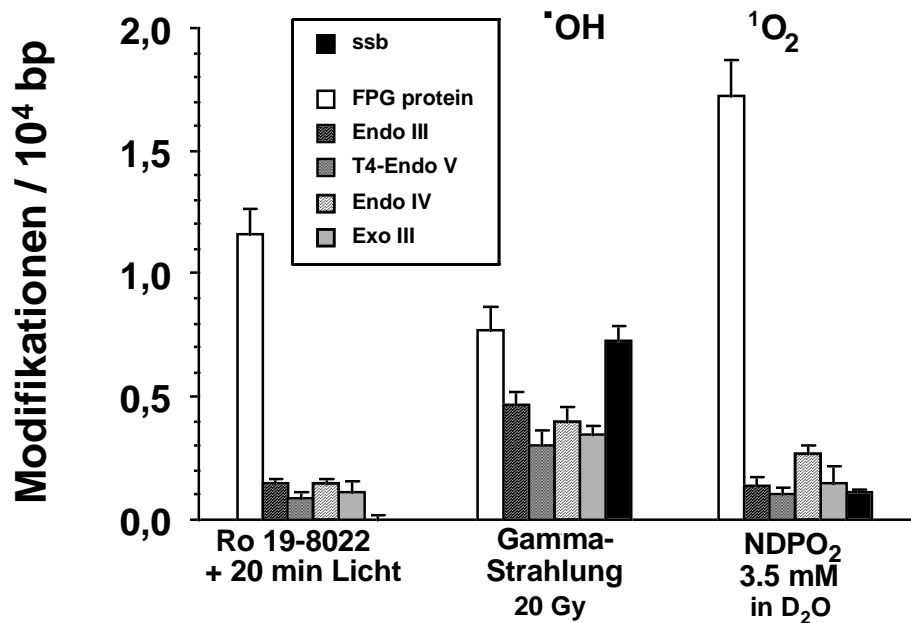


Abb. 2.6 Schadensprofil in PM2-DNA (zellfrei) von Ro 19-8022 [50  $\mu$ M] im Vergleich zu den Schadensprofilen von NDPO<sub>2</sub> (Singulett-Sauerstoff-Quelle) und  $\gamma$ -Strahlung (Hydroxyl-Radikal-Quelle). Die Bestimmung erfolgte mit dem Relaxations-Assay (nach Will, 1995).

### 2.1.3.2 ROS generiert durch Kaliumbromat

Aus Untersuchungen an zellfrei durch Kaliumbromat geschädigter Bakteriophagen-DNA (PM2-DNA) konnte mit Hilfe von DNA-Schadensprofilen (s. Kapitel 2.4.2) und verschiedenen Scavengern gezeigt werden, daß Kaliumbromat nur in Anwesenheit von Glutathion DNA-Schäden erzeugt und daß diese Schäden wahrscheinlich auf ein Bromradikal, das als Intermediat aus Bromat und Glutathion entsteht, zurückzuführen sind. Sowohl im zellfreien System als auch in Säugerzellkulturen wird das Schadensprofil eindeutig von FPG-sensitiven Basenmodifikationen dominiert (Abb. 2.7). In HPLC-Bestimmungen mit elektrochemischer Detektion wurde gezeigt, daß der Hauptanteil (etwa 60 %) der durch Kaliumbromat induzierten FPG-sensitiven Basenmodifikationen 8-oxoG darstellt (Ballmaier & Epe, 1995).

Untersuchungen belegen, daß Kaliumbromat bei der oralen Verabreichung im Tierversuch zu Tumoren in der Niere und Bauchhöhle führt (Kurokawa et al., 1983, 1986, 1990). Des Weiteren wurden in der Niere von solchen Versuchstieren hohe Spiegel an 8-oxoG nachgewiesen (Kasai et al., 1987; Umemura et al., 1995). Ferner induziert Kaliumbromat sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Mikrokerne, HPRT-Mutationen und



Chromosomenaberrationen (Nakajima et al., 1989; Hayashi et al., 1988; Ishidate & Yoshikawa, 1980; Speit et al., 1999).

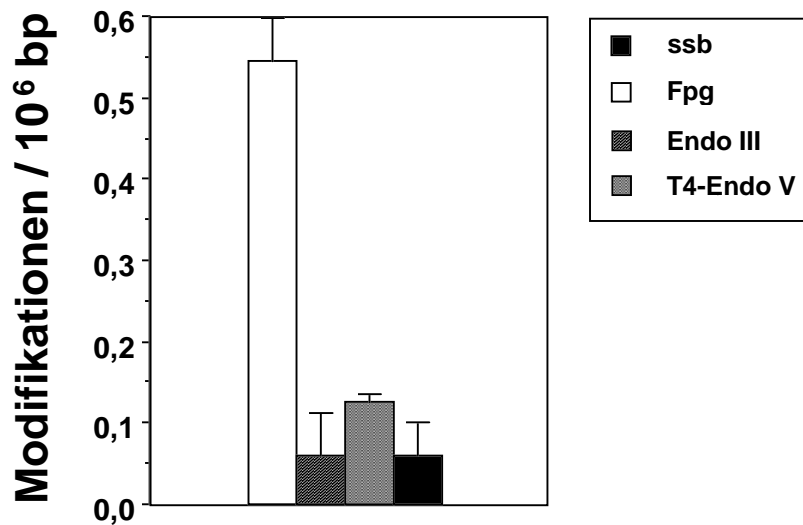


Abb. 2.7 Schadensprofil von Kaliumbromat generiert in AS52-Zellen durch Inkubation mit 7.5 mM Kaliumbromat für 15 min bei 37°C. Die Bestimmung erfolgte mit der Alkalischer Elution (nach Ballmaier, 1997).

### 2.1.3.3 ROS generiert durch SIN-1

Die Verbindung SIN-1 (3-Morpholino-sydnonimin; Abb. 2.8) ist ein Metabolit des Koronartherapeutikums Molsidomin, welcher als Feststoff käuflich erworben werden kann. SIN-1 generiert in wäßrigen Lösungen in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff spontan äquimolare Mengen an Stickstoffmonoxid (NO) und Superoxid-Radikalen ( $O_2^{\bullet-}$ ). Die durch SIN-1 generierte Menge NO soll jedoch bei höheren Konzentrationen von SIN-1 nicht mehr linear ansteigen. So wird berichtet, daß durch 10  $\mu$ M SIN-1 bei 37°C und 30 min 6.5  $\mu$ M NO erzeugt werden, dagegen unter den gleichen Bedingungen von 100  $\mu$ M SIN-1 nur 26  $\mu$ M NO (de Groot, 1993). Es konnte gezeigt werden, daß das erzeugte NO und Superoxid sehr schnell zu Peroxynitrit ( $3.8 \times 10^9 M^{-1}s^{-1}$ ) (Duchstein & Riederer, 1995) weiterreagiert, weshalb SIN-1 nicht als NO-Donor sondern vielmehr als eine Peroxynitrit-Quelle angesehen werden sollte.

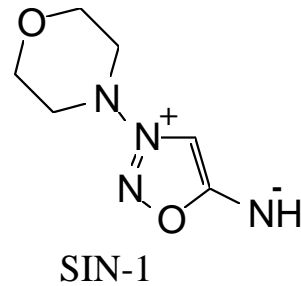


Abb. 2.8 Strukturformel von SIN-1 (3-Morpholino-sydnonimin).

In der Arbeit von **Epe et al. (1996)** konnte mittels Schädigung von zellfreier DNA demonstriert werden, daß Peroxynitrit und SIN-1 das gleiche Spektrum an FPG-sensitiven DNA-Modifikationen erzeugen (Abb. 2.9). Aus den Untersuchungen geht hervor, daß Peroxynitrit jedoch nicht selbst das eigentlich DNA-schädigende Agens, sondern ein Intermediat – mit einer vergleichbaren Reaktivität von Hydroxylradikalen – den DNA-Schaden verursacht. Des weiteren wurde mit Hilfe von HPLC-Bestimmungen mit elektrochemischer Detektion demonstriert, daß etwa 75 % der durch SIN-1 generierten FPG-sensitiven Basenmodifikationen 8-oxoG darstellen (**Epe et al., 1996**).

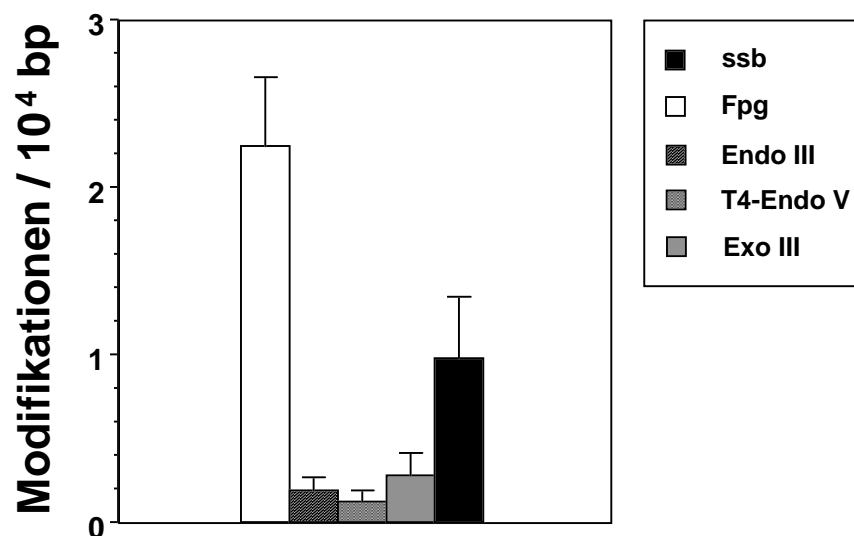


Abb. 2.9 Schadensprofil in PM2-DNA (zellfrei) erzeugt durch 10 µM SIN-1 (60 min, 37°C). Die Bestimmung erfolgte mit dem Relaxations-Assay (**nach Ballmaier, 1997**).

#### 2.1.3.4 Induktion des *Respiratory Burst* mit PMA

Mit Hilfe des Tumorpromoters Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA; Synonyme: TPA, 12-*O*-Tetradecanoylphorbol-13-acetat) lassen sich beispielsweise in polymorphkernigen Leukocyten, peritonealen Makrophagen und neutrophilen Granulocyten (**Przybyszewski et al., 1998**) experimentell die verstärkte Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (*Respiratory Burst* oder *Oxidative Burst*; Abb. 2.3) induzieren. PMA ist ein nicht physiologischer aber sehr potenter Stimulus für die Proteinkinase C und wird häufig zur experimentelle Induktion des *Respiratory Burst* eingesetzt (**Maly & Schürer-Maly, 1995**). Mit den eingesetzten experimentellen Systemen soll unter anderem die Bedeutung des *Respiratory Burst* und reaktiver Sauerstoffspezies bei der Tumorprogression untersucht werden. Studien zur Folge soll PMA neben der erhöhten Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies unter anderem zu einer Erhöhung der Spiegel an 8-oxoG in HeLa-Zellen (**Bhimani et al., 1993**) und HL60-Zellen (**Takeuchi et al., 1994**) führen.

## 2.2 Oxidative DNA-Modifikationen

Oxidative DNA-Modifikationen sind die Produkte von Reaktionen der unterschiedlichen reaktiven Sauerstoffspezies mit einem Bestandteil der DNA. Es kann also ebenso zu einer oxidativen Schädigung des Zucker-Phosphat-Rückgrats als auch einzelner DNA-Basen kommen. Die Tatsache, daß man unter zellfreien Bedingungen bislang über 100 verschiedene DNA-Modifikationen nachweisen konnte (**von Sonntag, 1987; Dizdaroglu, 1992**), läßt auf eine große Anzahl unterschiedlicher Schädigungsmechanismen schließen.

So findet man zum einen DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche (**Sies, 1986; Ciulla et al., 1989; Epe et al., 1988**). Sie gehen aus der Hydrolyse von Desoxyribose-Phosphat-Bindungen hervor. Des weiteren treten AP-Stellen (apurinische bzw. apyrimidinische Stellen) auf, die bei der Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung zwischen Base und Desoxyribose entstehen. Oft wird die Desoxyribose bei diesen hydrolytischen Spaltungen zusätzlich oxidativ modifiziert (**OhUigin et al., 1987; Piette et al., 1981**) (Abb. 2.10).

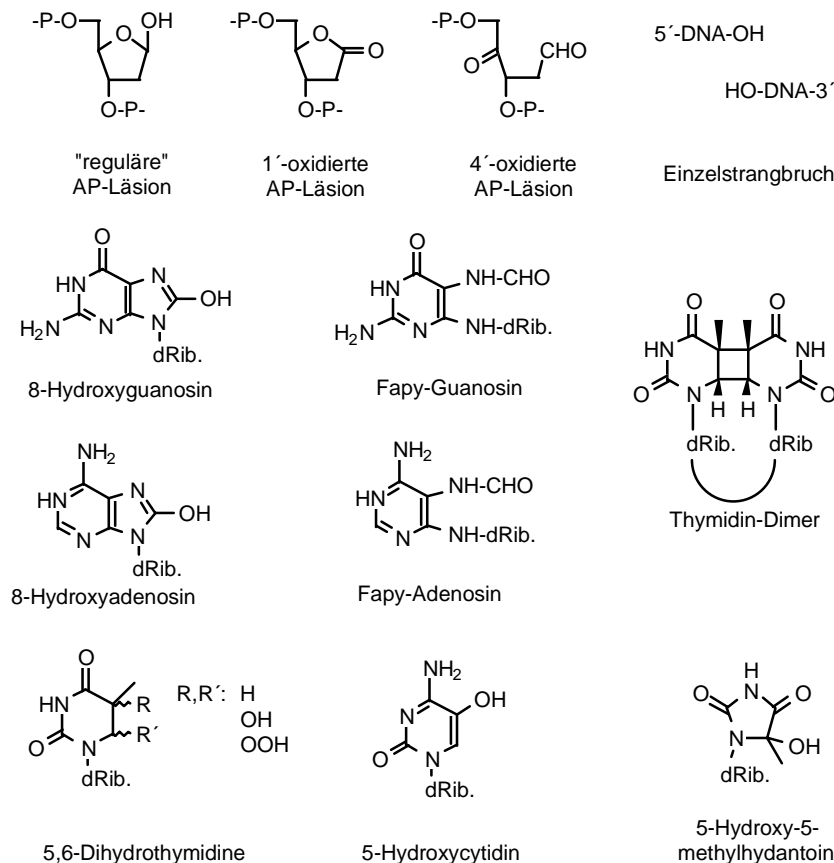


Abb. 2.10 Strukturformeln einer Auswahl von DNA-Modifikationen, die durch ROS induziert werden.

Zum anderen kommt es zu verschiedentlichen Oxidationen der DNA-Basen (**Cadet et al., 1997; Epe, 1995**) (Abb. 2.10), die sowohl in zellfreier DNA als auch in DNA von Zellkulturen nachgewiesen wurden.

Dabei wird ein Oxidationsprodukt der Purinbase Guanin, das 8-Hydroxyguanin (7,8-Dihydro-8-oxoguanin, 8-oxoG), als die bedeutendste aller DNA-Modifikationen betrachtet, was zum einen in seiner relativen Häufigkeit und zum anderen in der bekannten prämutagenen Wirkung dieser Modifikation (s. Kapitel 2.3) begründet liegt. Die Anzahl von 8-oxoG in der DNA eines Organismus wird als ein zuverlässiger Biomarker für zellulären oxidativen Streß betrachtet (**Kasai & Nishimura, 1993**). Die große Häufigkeit dieser Modifikation erklärt sich dadurch, daß die Purinbase Guanin das niedrigste Oxidationspotential aller DNA-Basen besitzt, also am leichtesten einer Oxidation unterliegt (**Hüttermann, 1982**). Aus gebildetem 8-oxoG oder 8-Hydroxyadenin (8-oxoA), das in sehr viel geringerer Häufigkeit in der DNA vorgefunden wird, kann durch Öffnung des Imidazolrings ein Formamidopyrimidin (FAPY) entstehen (**Fuciarelli et al., 1990; Dizdaroglu, 1992; Dizdaroglu, 1993**). 8-oxoG und auch 8-oxoA – in weit geringerem Ausmaß – können experimentell durch die Behandlung von DNA bzw. Zellen mit beispielsweise Kaliumbromat, Hydroxylradikalen oder Singulett-Sauerstoff induziert werden (**Kasai et al., 1986; Kasai et al., 1987; Ballmaier, 1993; etc.**). So

modifizieren auch viele Photosensibilisatoren, die im sichtbaren Bereich des Lichtes absorbieren (Riboflavin, Proflavin, Hämatoporphyrin, Methylenblau, Acridinorange, Rose Bengal), fast ausschließlich Guanin und dieses vorrangig zu 8-oxoG (**Piette et al., 1981; Cadet & Téoule, 1978; Lee & Rodgers, 1987; Kawanishi et al., 1986**).

Auch die Pyrimidinbasen Thymin und Cytosin unterliegen Oxidationsreaktionen, wenn auch wie bereits erwähnt in geringerem Ausmaß. Dabei kommt es meist zur Modifizierung der Doppelbindung zwischen der Position 5 und 6 im Pyrimidin-Ring. So kann die Bildung von verschiedenen 5,6-Dihydropyrimidinen wie Glycolen und Hydraten von Thymidin und Cytidin und deren Fragmentierungsprodukte (z.B. 5-Hydroxy-5-methylhydantoin) beobachtet werden (**Breimer & Lindahl, 1985; von Sonntag, 1987**). 5-Hydroxycytidin, das in ähnlich hohen Konzentrationen wie 8-oxoG in Niere und Leber von Ratten gemessen wurde (**Wagner et al., 1992**), geht wahrscheinlich unter Abspaltung von Wasser aus Cytosinglycolen hervor.

Eine weitere Modifikation der Pyrimidine sind die Pyrimidindimere, die zwar nicht aufgrund oxidativer DNA-Schädigung entstehen, aber auch als Begleiterscheinung bei Schädigung mit Photosensibilisatoren und sichtbarem Licht (s.o.) auftreten. Sie gehen aus [2+2] Cycloadditionsreaktionen zweier benachbarter Pyrimidine hervor und stellen eine typischerweise durch UV-Licht (260 nm) verursachte Basenmodifikation dar.

Letztlich kann es auch zu Quervernetzungen zwischen DNA und Proteinen kommen. Beispielsweise konnte die Entstehung von Bindungen zwischen der DNA-Base Thymin und der Aminosäure Tyrosin in Gegenwart von Sauerstoff gezeigt werden (**Nackerdien et al., 1991**).

### 2.3 Biologische Konsequenzen oxidativer DNA-Schäden

Hat sich in der DNA einer Zelle ein Schaden ereignet, so kann dies grundsätzlich zu drei unterschiedlichen Ereignissen führen. So kann der DNA-Schaden durch die vorhandenen Reparaturmechanismen vollständig und fehlerfrei behoben werden (s. Kapitel 2.4), wodurch die Integrität der DNA bewahrt bliebe. Eine weitere Möglichkeit ist, daß die Schädigung so massiv ist, daß sie durch die vorhandenen Reparaturmechanismen nicht mehr oder nicht schnell genug behoben werden kann. Dies könnte zur Blockade der Transkription und bzw. oder der Replikation führen und schließlich das Absterben (Einleitung der Apoptose) der Zelle bedeuten. Letztlich kann auch der Fall eintreten, daß der DNA-Schaden nicht oder nicht fehlerfrei repariert wird und dies bei der nächsten Replikation der DNA zu einer Mutation führt. Eine Mutation wiederum kann bei Zugrundelegung des Mehrstufenkonzepts der

Krebsentstehung (**Neumann, 1992**) einen Schritt auf dem Weg zur malignen Entartung einer Zelle bedeuten (s. auch Kapitel 2.4.6).

Im folgenden sollen nun die typischerweise aus oxidativen Schädigungen hervorgegangenen DNA-Modifikationen (s. Kapitel 2.2) hinsichtlich ihrer Konsequenzen referiert werden.

Die Basenmodifikation 8-oxoG besitzt unbestritten ein prämutagenes Potential. So konnten sowohl in Prokaryonten, Hefen als auch in Säugerzellen G:C→T:A Transversionen beobachtet werden, die auf Paarungen von 8-oxoG mit Adenin während der Replikation beruhen (s. Kapitel 2.4.2.1.1; Abb. 2.11) (**Wood et al., 1990; Shibutani et al., 1991; Klein et al., 1992; Michaels et al., 1992; Thomas et al., 1997**). Untersuchungen zur quantitativen Beurteilung des prämutagenen Potentials von 8-oxoG ergaben, daß beim Einbringen von 8-oxoG-beinhaltenden, einzelsträngigen Vektoren in Säugerzellen eine Mutagenität von 2.5 % bis 4.8 % resultiert (**Moriya, 1993**). Diese relativ niedrige Mutagenität kann mit dem Vorhandensein effizienter Reparaturmechanismen für 8-oxoG (s. Kapitel 2.4.2.1) erklärt werden.

Das oxidierte Adenin 8-oxoA, das bei der Replikation keine Fehlpaarungen eingeht, war bei einem direkten Vergleich mit 8-oxoG in einem Vektorsystem um etwa eine Zehnerpotenz weniger mutagen (**Wood et al., 1992; Shibutani, 1993**).

Foramidopyrimidine (FAPY) besitzen im Gegensatz dazu kein mutagenes Potential, sondern führen zur Blockade der Replikation (**Tudek et al., 1992**).

Über die Konsequenzen oxidiertes Pyrimidine ist bekannt, daß cis-Thyminglycole zu einer Blockade der Replikation führen (**Evans et al., 1993**) und in doppelsträngiger DNA keine Mutationen zu verursachen scheinen (**Basu et al., 1989; Hayes et al., 1988**). Die Modifikationen vom Typ der 5,6-Dihydrocytosine scheinen gegenüber unmodifizierten Cytosinen eine erhöhte Rate an spontanen Desaminierungen aufzuweisen (**O'Donnell et al., 1994**). Dies kann zu einer Erhöhung der G:C→A:T Transitionen beitragen, die auch als Folge der spontanen Methylierungen und Desaminierung von Cytosin zu Thymin resultieren. Auch das 5-Hydroxycytosin gilt als prämutagene Basenmodifikation, die für eine erhöhte Rate von G:C→A:T Transitionen verantwortlich gemacht wird. Unter zellfreien Bedingungen konnte gezeigt werden, daß in Abhängigkeit des Sequenzkontextes neben Guanin sowohl Adenin als auch Cytosin mit 5-Hydroxycytosin im DNA-Doppelstrang paart (**Purmal et al., 1994**).

DNA-Doppelstrangbrüche, welche große Deletionen als auch Chromosomenaberrationen verursachen können, wirken sich sowohl stark toxisch als auch mutagen im Genom einer Zelle aus. Dagegen werden entstandene Einzelstrangbrüche effizient repariert (**Churchill et al., 1991**), doch können sie nicht als prämutagene Modifikationen ausgeschlossen werden.

Schließlich tragen noch AP-Stellen zur Mutagenese bei. Diese Modifikation stellt eine informationsleere Stelle in der DNA dar, die zur Blockade der Replikation führt. In Versuchen mit einem Shuttle-Vektor, der eine AP-Stelle beinhaltet, wurde bei der Replikation in

Säugerzellen bevorzugt Guanin gegenüber der AP-Stelle inkorporiert. So können AP-Stellen zu Basenaustauschmutationen führen (Neto et al., 1992; Klinedinst & Drinkwater, 1992). Des Weiteren kann durch die spontane oder enzymatische Umwandlung einer AP-Stelle in einen Strangbruch die Entstehung von Deletionen begünstigt sein.

## 2.4 DNA-Reparaturmechanismen

Im Verlaufe der Evolution haben sich in pro- und eukaryontischen Zellen ausgefeilte Verteidigungsmechanismen zur Bewahrung der Originalität ihrer Erbsubstanz ausgebildet. Diese Reparaturmechanismen sind infolge der Entwicklung von immer leistungsfähigeren molekularbiologischen Methoden teilweise schon gut charakterisiert, weisen aber immer noch viele unverstandene und unbekanntere Bereiche auf. Zum Verständnis der komplexen Vorgänge wird oft von einfachen Organismen wie dem Prokaryonten *Escherichia coli* ausgegangen, um dann eine Homologiesuche in eukaryontischen Organismen anzuschließen (s. Kapitel 2.4.2.1). Nach dem heutigen Kenntnisstand (Dempfle & Harrison, 1994; Wood, 1996; Sancar, 1996; Friedberg, 1996; Modrich & Lahue, 1996; Kaina, 1997) kann man die DNA-Reparaturmechanismen grob in die folgenden Gruppen einteilen:

- Direkte Reparatur (Schadenreversion)
- Basen-Exzisions-Reparatur (BER)
- Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)
- Postreplikative Reparatur (*Mismatch*-Reparatur).

### 2.4.1 Direkte Reparatur (Schadenreversion)

Die direkte Reparatur von DNA-Schäden spielt dem heutigen Wissen nach nur bei der Photoreparatur von Pyrimidindimeren und Alkylierungen eine Rolle.

So kann nach Induktion von Pyrimidindimeren durch UV-Strahlung, diese Modifikation der DNA direkt durch das Enzym Photolyase behoben werden. Dabei wandelt die Photolyase unter Ausnutzung der Energie von nahem UV- und sichtbarem Licht diese Modifikation wieder in zwei Pyrimidinnukleotide um. Dieses Enzyme liegt in einigen Säugetieren vor, die Existenz im Menschen ist umstritten.

Die direkte Reparatur von bestimmten Alkylierungsschäden wird durch die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) bewerkstelligt. Es handelt sich hierbei um ein Suizidenzym, das bisher in allen Spezies gefunden wurde. Die Substratspezifität erstreckt sich auf O<sup>6</sup>-Methylguanin, O<sup>6</sup>-Ethylguanin, O<sup>6</sup>-Butylguanin und methylierte Phosphotriester. Bei der Enzymreaktion überträgt die MGMT die Alkylgruppe vom Substrat auf sich selbst, was zur eigenen Inaktivierung führt.

### 2.4.2 Basen-Exzisions-Reparatur (BER)

Das Basen-Exzisions-Reparatur-System prozessiert in der Hauptsache solche Basenmodifikationen, die in der DNA keine oder nur geringfügige Distorsionen verursachen. Substrate der BER sind somit neben methylierten Basen durch reaktive Sauerstoffspezies oder durch ionisierende Strahlung bedingte oxidierte, reduzierte oder fragmentierte Basen.

Den ersten Schritt der BER stellt die Erkennung und anschließende Entfernung der modifizierten Base durch eine spezifische Glykosylase aus der DNA dar. Dazu spaltet das Enzym hydrolytisch die N-glykosidische Bindung zwischen modifizierter DNA-Base und der Desoxyribose, woraus eine AP-Stelle in der DNA resultiert. Diese wird dann durch eine AP Endonuklease 5' zur AP-Stelle eingeschnitten und eine Phosphodiesterase schafft durch Entfernung des verbliebenen 5'-Desoxyribosephosphates eine 1-Nukleotid-Spalte in der DNA. Anstelle der Phosphodiesterase kann auch mit Hilfe einer Exonuklease eine Spalte von 1 bis 5 Nukleotiden geschaffen werden. Die jeweilige Spalte wird von der Reparaturpolymerase (DNA-Polymerase  $\beta$ ) aufgefüllt und von einer Ligase schließlich versiegelt (**Dianov & Lindahl, 1994; Seeberg et al., 1995**) (vgl. Abb. 4.4, linke Seite).

Neben diesem *Short-patch*-Reparaturweg wird seit kurzem in Säugerzellen auch ein Reparaturweg der BER beschrieben, bei dem größerer DNA-Stücke (*long patch*) im Bereich der modifizierten Base ersetzt werden. Bei diesem sogenannten PCNA-abhängigen Reparaturweg (*proliferating cell nuclear antigen*) werden nach Schaffung von größeren Lücken – in 3'-Richtung ausgehend von der AP-Stelle – Stücke von 7 bis 14 Nukleotiden von der DNA-Polymerase  $\delta$  oder  $\epsilon$  in die DNA eingefügt (**Frosina et al., 1996; Klungland & Lindahl, 1997; Matsumoto et al., 1994**). Am Anfang dieses PCNA-abhängigen Reparaturweges steht ebenfalls die Enzymreaktion der modifizierten Base mit einer Glykosylase und einer AP-Endonuklease.

Neueste Befunde weisen darauf hin, daß die *Long-patch*-Variante der BER replikationsgekoppelt (an der Replikationsgabel) erfolgt (**Otterlei et al., 1999**).



Viele der DNA-Glykosylasen sind mit einer AP-Endonukleaseaktivität assoziiert, weshalb man diese auch als Reparaturoendonukleasen bezeichnet. Dies ermöglicht es ihnen sowohl die glykosidische Bindung zwischen Base und Zucker als auch die Phosphodiesterbindung 3' zur geschädigten Base in einer konzertierten Aktion zu spalten, wobei als Zwischenstufe eine Schiff'sche Base zwischen Enzym und DNA auftritt (**Dodson et al., 1994**). Die verschiedenen menschlichen DNA-Glykosylasen und ihre unterschiedliche Substratspezifitäten werden im folgenden kurz beschrieben (**Cunningham, 1997; Krokan et al., 1997**):

- Die verschiedenen Uracil-DNA-Glykosylasen (UNG) entfernen Uracil aus der DNA, welches entweder aufgrund von Fehleinbau durch die DNA-Polymerase oder wegen spontaner Desaminierung von Cytosin in der DNA vorliegt. Die Proteine besitzen keine zusätzliche AP-Lyaseaktivität.
- Die Hydroxymethyluracil-DNA-Glykosylase beseitigt Hydroxymethyluracil aus der DNA, welches entweder durch Oxidation der Methylgruppe von Thymin oder durch Desaminierung von 5-Hydroxymethylcytosin entsteht. Auch diese Glykosylase besitzt keine AP-Lyaseaktivität.
- Die Thyminglykol-DNA-Glykosylase ist das Homolog zur Endonuklease III aus *E. coli*. Das Enzym erkennt gesättigte, oxidierte und fragmentierte Pyrimidine, welche unter anderem bei  $\gamma$ - und UV-Strahlung generiert werden. Diese Glykosylase besitzt eine assoziierte AP-Lyaseaktivität, spaltet also *via*  $\beta$ -Elimination Zucker-Phosphatbindungen an AP-Stellen. Die Strukturen und Motive in der Endonuklease III findet man in vielen Glykosylasen wieder, was zur einer Klassifizierung in Enzym-Superfamilie – beispielsweise der Endonuklease III-ähnlichen Glykosylasen – herangezogen werden kann.
- Die N-Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG) ist ein 33 kDa Enzym ohne assoziierte AP-Lyaseaktivität, welches über eine vergleichsweise breite Substratspezifität verfügt. Zu den Substraten zählen 7-Alkylguanin, 3-Methyladenin, 3-Methylguanin, Hypoxanthin und 1,N<sup>6</sup>-Ethenoadenin. Eine Reparatur von 8-oxoG wird diskutiert (s. Kapitel 2.4.2.1.3).
- Die 8-Hydroxyguanin-DNA-Glykosylasen in Pro- und Eukaryonten (*Escherichia coli*: FPG, Eukaryonten: Ogg1) werden ausführlich in Kapitel 2.4.2.1 besprochen. Die Substratspezifitäten sind in Tab. 2.2 (FPG) und Tab. 2.3 (Ogg1) wiedergegeben.

	FPG	Endo- nuklease III	Endo- nuklease IV	T4-Endo- nuklease V	Exo- nuklease III
<b>AP-Läsionen</b>					
normal	+	+	+	+	+
1'-oxidiert	-	-	+	-	+
4'-oxidiert	+	+	+	+	(+) <sup>a</sup>
<b>Basenmodifikationen</b>					
8-Hydroxyguanin	+	-	-	-	-
FAPY-Guanin <sup>b</sup>	+	-	-	-	-
FAPY-Adenin <sup>c</sup>	+	-	-	-	-
5,6-Dihydropyrimidine	-	+	-	-	-
Pyrimidin-Photodimere	-	-	-	+	-

<sup>a</sup> Erkennung benötigt sehr hohe Enzymkonzentrationen (200 U/ml).

<sup>b</sup> 2,4-Diamino-6-hydroxy-5-formylamino-pyrimidin.

<sup>c</sup> 2,6-Diamino-5-formylamino-pyrimidin.

Tab. 2.2 Bakterielle Reparaturenzyme und durch sie erkannte DNA-Modifikationen.

Die Substratspezifität der verschiedenen Reparaturenendonukleasen kann man sich auch experimentell bei der Charakterisierung von geschädigter DNA zu Nutze machen. So lassen sich die durch die Reparaturenendonukleasen generierten Strangbrüche beispielsweise mit dem Relaxations-Assay (Kapitel 4.2.7) oder der Alkalischen Elution (Kapitel 4.2.1) quantifizieren (**Epe, 1993; Epe & Hegler, 1994**). Hochreine, bakterielle Enzyme werden so als „Sonden“ zur Charakterisierung von DNA-Schäden und deren Schadensprofilen (**Epe, 1995**) eingesetzt. Eine Auswahl von bakteriellen Reparaturenendonukleasen mit ihren Substratspezifitäten ist in Tab. 2.2 dargestellt.

#### 2.4.2.1 Reparaturenzyme für 8-Hydroxyguanin in Pro- und Eukaryonten

Eine besondere Bedeutung hat die BER für die Entfernung der durch reaktive Sauerstoffverbindung häufig verursachten Oxidationsprodukte der Guaninbasen aus der DNA (**Boiteux & Radicella, 1999**). Die Bedeutung dieses Reparaturweges spiegelt sich einerseits in seiner Konservierung während der Evolution vom Prokaryonten über einfache Eukaryonten bis hin zu den Säugern und dem Menschen wieder. Andererseits konnte demonstriert werden, welches mutagene Potential von in der DNA verbliebenem 8-Hydroxyguanin ausgeht (s. auch Kapitel 2.3).

#### 2.4.2.1.1 Reparaturenzyme für 8-Hydroxyguanin in *Escherichia coli*: FPG, Mut Y und Mut T

Gegen die Gefährdung des Genoms durch 8-oxoG gibt es in dem Prokaryonten *Escherichia coli* ein mittlerweile gut untersuchtes Verteidigungssystem dreier Proteine (Abb. 2.11). Mut T, eine Nucleosidtriphosphatase, verringert dabei durch Umsetzung von 8-oxodGTP zu 8-oxodGMP, das Angebot von 8-oxodGTP im Nucleotid-Pool und damit die Wahrscheinlichkeit, daß 8-oxodG bei der Reparatur oder Replikation in die DNA des Bakteriums inkorporiert wird. Das zweite Protein, FPG-Protein, ist eine 8-oxoG-Glykosylase mit gleichzeitiger AP-Lyaseaktivität, das eingebaute oder in der DNA generierte 8-oxoG-Basen aus dem Doppelstrang entfernt. Dabei katalysiert das FPG-Protein neben der glykosidischen Abspaltung der 8-oxoGuaninbase eine sukzessive Entfernung der basenfreien Desoxyribose *via*  $\beta$ -Eliminierung und  $\delta$ -Eliminierung aus der Zucker-Phosphat-Kette der DNA. Das für FPG codierende Gen wurde 1987 kloniert. Das Protein ist ein 30.2 kDa Monomer (269 Aminosäuren) mit einer Zink-Finger-Struktur an der DNA-Bindungsdomäne (**Boiteux et al., 1987**). Durch FPG nicht entfernte 8-oxoG-Basen paaren bei der nächsten Replikation der DNA aufgrund der veränderten chemischen Struktur der Guaninbase bevorzugt mit Adenin. Eine nicht behobene 8-oxoG:A-Fehlpaarung manifestiert sich bei der darauffolgenden Replikation als Punktmutation (G:C→T:A Transversion).

Das dritte Protein schließlich, Mut Y-Protein, ist eine Adenin-DNA-Glykosylase mit assoziierter AP-Lyaseaktivität, die Paarungen von Adenin mit 8-oxoG erkennt und die Adeninbase nur aus solchen Fehlpaarungen entfernt. Bei der anschließenden Reparatursynthese unter der Beteiligung der DNA-Polymerase I wird gegenüber von 8-oxoG bevorzugt ein Cytosin eingebaut, was wieder die Erkennung und Reparatur durch das FPG-Protein ermöglicht. Falls sich nochmals die Paarung mit Adenin ergeben hat, kann ein weiteres Male das Mut Y-Protein aktiv werden (**Michaels et al., 1992; Grollman & Moriya, 1993**).

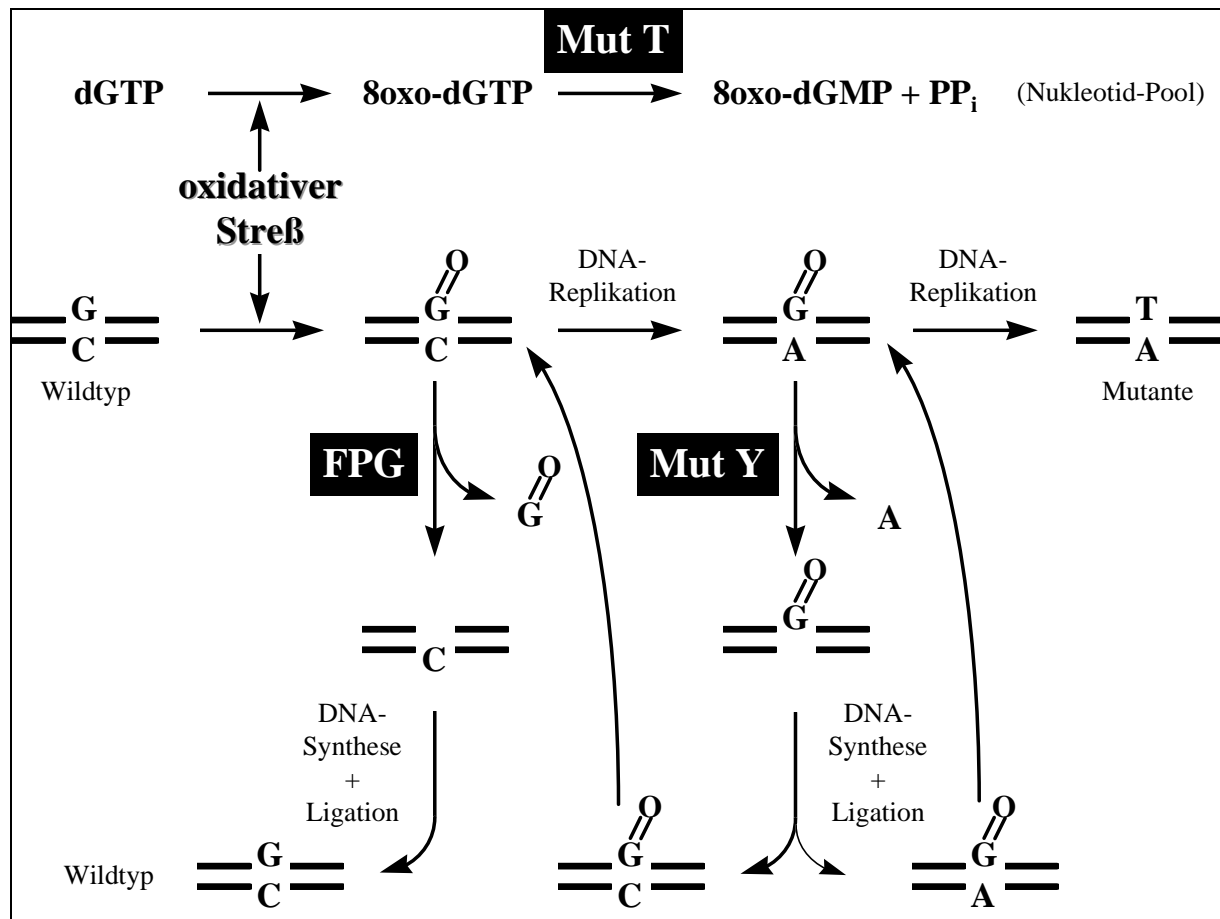


Abb. 2.11 Zusammenspiel von FPG, Mut T und Mut Y zur Entfernung von 8-oxoG aus dem Genom von *Escherichia coli* nach Grollman & Moriya (1993).

Die große Bedeutung der Proteine FPG, Mut Y und Mut T für die Integrität der DNA wird bei der Betrachtung der entstandenen Phänotypen nach Inaktivierung der Gene deutlich. Bei der gezielten Inaktivierung des *mut T*-Gens in *E. coli* zeigt der entstandene Bakterienstamm einen spontanen A:T→C:G Phänotyp (Tajiri et al., 1995), wobei die Spontanrate an A:T→C:G Transversionen nachgewiesenermaßen durch die Mut Y-Funktion in diesem *mut T*<sup>-</sup>-Stamm verursacht wird (Vidmar & Cupples, 1993), was im Einklang mit dem in Abb. 2.11 zusammengefaßten Abwehrsystem steht.

Während die Inaktivierung eines der beiden Gene *mut Y* und *fpg* zu einer 10- bis 100-fachen Erhöhung der spontanen Mutationsrate führt, wird beim Ausfall beider Gene eine über 1000-fach erhöhte Spontanrate beobachtet, wobei von 8-oxoG herrührende G:C→T:A Transversionen das Mutationsspektrum jeweils klar dominieren (Michaels et al., 1992). Letzteres demonstriert das synergistische Prinzip der 8-oxoG-Reparatur durch die beiden Proteine FPG und Mut T.

#### 2.4.2.1.2 Reparaturenzyme für 8-Hydroxyguanin in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*: yOgg1, Ntg1

Als Funktionshomolog zum FPG-Protein wurde in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* das yOgg1-Protein entdeckt und kloniert (**Auffret van der Kemp et al., 1996**). Dabei zeigte sich beim Vergleich der Aminosäuresequenzen, daß das FPG und das yOgg1-Protein keinerlei strukturelle Verwandtschaft aufweisen, sondern sogar vollkommen verschiedenen Enzymfamilien entstammen. Das 376 Aminosäure große yOgg1-Protein (s. auch Tab. 2.3) besitzt keine Zink-Finger-Struktur und wird im Gegensatz zum FPG-Protein der Enzym-Superfamilie der Endo III-ähnlichen Enzyme zugerechnet (**Auffret van der Kemp et al., 1996; Nash et al., 1996**). Das yOgg1-Protein stellt eine Glykosylase dar, die 8-oxoG, FAPY-G und Methyl-FAPY-G in geschädigter DNA erkennt (**Auffret van der Kemp et al., 1996; Nash et al., 1996; Karahalil et al., 1997**). Sie besitzt ebenfalls wie FPG eine AP-Lyase-Aktivität, die *via*  $\beta$ -Eliminierung verläuft (**Auffret van der Kemp et al., 1996; Nash et al., 1996; Girard et al., 1997**). Im Gegensatz zum FPG-Protein erfordert die AP-Lyaseaktivität von Ogg1 jedoch eine Cytosin-Base gegenüber der AP-Stelle (**Girard et al., 1997**). Untersuchungen zeigten, daß die Enzymreaktion des yOgg1-Proteins über eine kovalente Zwischenstufe von Enzym und DNA verläuft. Dabei bildet sich bei Entfernung einer oxidierten Base eine Schiff'sche Base zwischen dem Lysin 241 – unter Beteiligung der Asparaginsäure 260 als Protonengeber – von yOgg1 und dem 1'-Kohlenstoff des betreffenden Ribose-Moleküls aus (**Nash et al., 1996; Girard et al., 1997**). Der gleiche Mechanismus konnte bei Endonuklease III am entsprechenden Lysin 120 gezeigt werden (**Nash et al., 1996; Girard & Boiteux, 1997**).

Der Verlust des intakten *yOGGI*-Gens führt zu keiner Veränderung der Überlebensfähigkeit, aber zu einem spontanen Mutator-Phänotyp des betreffenden Hefestamms, wobei wieder die G:C→T:A Transversionen deutlich dominieren (**Thomas et al., 1996**). So komplementiert das yOgg1-Protein auch teilweise den Mutator-Phänotyp von *fpg/mut Y*-defekten *E. coli* und kann aufgrund all dieser Befunde als funktionelles Homolog von FPG angesehen werden (**Auffret van der Kemp et al., 1996**).

	<b>yOgg1</b>	<b><math>\alpha</math>-hOgg1</b>	<b><math>\beta</math>-hOgg1</b>
Genort	Chromosom VIII	3p25	3p25
Aminosäuren im Protein	376	345	424
Molekularmasse [kDa]	42.8	38.8	47.2
Isoelektrischer Punkt	8.83	8.89	6.52
<b>Zelluläre Lokalisierung</b>			
Zellkern	n.b.	Ja	Nein
Mitochondrium	n.b.	Nein	Ja
<b>Enzymaktivitäten</b>			
DNA Glykosylase	Ja	Ja	Ja
Methyl-FAPY-G:C	Ja	Ja	Ja
FAPY-G:C	Ja	n.b.	n.b.
8-oxoG:C	Ja	Ja	Ja
8-oxoG:A	Nein	Nein	Nein
8-oxoA:C	Ja	Ja	n.b.
AP-Lyase	Ja, $\beta$ -Elimination	Ja, $\beta$ -Elimination	Ja, $\beta$ -Elimination
AP:C	Ja	Ja	Ja
AP:A	Nein	Nein	n.b.
Mutator-Phänotyp	G:C $\rightarrow$ T:A	n.b.	n.b.
<b>Komplementierung</b>			
<i>E. coli</i> <i>fpg</i> <sup>-</sup> / <i>mut Y</i>	Ja	Ja	Ja
<i>S. cerevisiae</i> <i>ogg1</i> <sup>-</sup>	Ja	Ja	n.b.
DNA-Schaden induzierbar	Nein	n.b.	n.b.

Tab. 2.3 Vergleichende Zusammenstellung der Enzymeigenschaften der Ogg1-Proteine aus Hefe und Mensch (aus **Boiteux & Radicella, 1999**).

Ein weiteres Enzym in *Saccharomyces cerevisiae*, das eine hohe Sequenzhomologie zur Endonuklease III aufweist ist Ntg1 (**Eide et al., 1996**). Es ist 45 kDa groß, besteht aus 399 Aminosäuren, weist aber im Gegensatz zur Endonuklease III kein [4Fe-4S] Eisen-Schwefel-Cluster-Motiv auf (**Tayer et al., 1995**). Ntg1 ist ebenfalls eine Glykosylase mit assoziierter AP-Lyaseaktivität (**Senturker et al., 1998; Bruner et al., 1998**). Während **Senturker et al. (1998)** berichten, daß Ntg1 zwar verschiedene, oxidierte Pyrimidine und Formamidopyrimidine aber kein 8-oxoG aus  $\gamma$ -bestrahlter DNA ausschneidet, wird von **Bruner et al. (1998)** die Erfassung von 8-oxoG durch Ntg1 in Opposition zu allen vier Basen geschildert. Des weiteren gibt es einen Befund, wonach in *S. cerevisiae* eine spezifische Glykosylaseaktivität – wahrscheinlich aufgrund von Ntg1 – für Methyl-FAPY-G und 8-oxoG:G vorliegt (**De Oliveira et al., 1994**). Bei der Inaktivierung der *NTG1*-Gensequenz, entsteht nach Berichten von **Eide et al. (1996)** ein lebensfähiger Stamm, der keinen Mutator-Phänotyp zeigt, aber eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativen Agentien wie H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Menadion zeigt.

In *S. cerevisiae* konnte bislang weder aufgrund von Homologie-Untersuchungen noch bei funktionellen Screening-Tests – auf Komplementierung des Mutator-Phänotyps von *fpg/mut Y*-defekten Bakterien – ein Protein gefunden werden, das eine Homologie zu Mut Y aufweist. Der Befund, daß in Zellextrakten von *S. cerevisiae* keine für Mut Y typische Adenin-Glykosylaseaktivität nachgewiesen werden konnte (**unveröffentlicht, s. Boiteux & Radicella, 1998**) führt zu der Annahme, das ein solches Homolog in *S. cerevisiae* nicht existiert.

In *S. cerevisiae* ist bisher auch kein dem *E. coli* Mut T-homologes Enzym beschrieben worden.

#### 2.4.2.1.3 Reparaturenzyme für 8-Hydroxyguanin in Säugern: Ogg1, Myh und Mth1

Mit Bekanntwerden der *yOGGI*-Sequenz wurde die Datenbanksuche nach *OGGI*-homologen Sequenzen in Säugetieren ermöglicht. Verschiedenen Arbeitsgruppen gelang es schließlich 1997 die cDNA für das menschliche *OGGI* (*hOGGI*) zu klonieren (**Radicella et al., 1997; Aburatani et al., 1997; Arai et al., 1997; Bjoras et al., 1997; Lu et al., 1997; Roldan-Arjona et al., 1997; Rosenquist et al., 1997**). Obwohl bezogen auf die Gesamtsequenz nur eine 38-prozentige Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen von *yOgg1* und *hOgg1* vorliegt, gibt es verschiedene Regionen in beiden Proteinen, in denen mehr als 60 % der Aminosäuren identisch sind. Durch alternatives Spleißen der mRNA ergeben sich die zwei unterschiedlichen Proteine  $\alpha$ -*hOgg1* mit 345 Aminosäuren und  $\beta$ -*hOgg1* mit 424 Aminosäuren, wobei beginnend am aminoterminalen Ende die ersten 316 Aminosäuren identisch sind. Das Gen wurde in allen angegebenen Arbeiten mittels *In-situ*-Hybridisierungen auf dem Genabschnitt 3p25 lokalisiert. Beide Proteinformen besitzen aufgrund der Sequenz der 30 ersten aminoterminalen Aminosäuren eine mögliche Lokalisierung in den Mitochondrien. Dagegen unterscheiden sich die carboxyterminalen Enden vollkommen voneinander. In diesem Teil weisen das  $\alpha$ -*hOgg1* und das *yOgg1* neben einem hohen Konservierungsgrad eine Struktur auf, die vermutlich die Lokalisierung in den Kern (NLS) bedingt. Bei immunologischen Untersuchungen der subzellulären Lokalisierung beider *hOgg1*-Proteine konnten die gemachten Vorhersagen bestätigt werden. Es zeigte sich, daß das  $\alpha$ -*hOgg1* im Zellkern und das  $\beta$ -*hOgg1* in den Mitochondrien vorliegt (**Takao et al., 1998**). Ob die Berichte von 8-oxoG-Reparatur in Mitochondrienextrakten von Menschen und Ratten (**Croteau et al., 1997**) auf das  $\beta$ -*hOgg1* zurückzuführen sind, ist bislang unbekannt. Neben der NLS liegen weitere hoch konservierte Motive in dem aus der Hefe stammendem und den beiden menschlichen Proteinen vor. Eines davon ist das Helix-Haarnadel-Helix-Motiv (HhH-

Motiv), das charakteristisch für das aktive Zentrum in der Superfamilie der Endonuklease III-artigen Enzyme ist (Nash et al., 1996). Des weiteren gibt es einige andere hochkonservierte Strukturen, deren Funktion bislang nicht bekannt sind, was aber vermuten läßt, daß ihnen wichtige Funktionen bezüglich der Enzymaktivität zukommen.

In jüngerer Zeit konnte ebenso die cDNA für das homologe Ogg1-Enzym in Mäusen (mOgg1) kloniert werden (Tani et al., 1998). Die cDNA kodiert für ein 345 Aminosäuren umfassendes Peptid und zeigt eine Sequenzübereinstimmung von 84 % mit dem  $\alpha$ -hOgg1 Protein (Arai et al., 1997; Lu et al., 1997; Rosenquist et al., 1997; Tani et al., 1998; Boiteux et al., 1998). Auch die Strukturierung des Gens in bezug auf Anzahl und Beschaffenheit der Exons zeigt große Übereinstimmung gegenüber dem menschlichen  $\alpha$ -hOGG1. Über eine entsprechende  $\beta$ -Form des Mäusehomologs liegen bislang keine Berichte vor. Basierend auf RT-PCR-Untersuchungen wurde bislang in allen untersuchten Geweben von Mensch und Maus eine OGG1-Transkription nachgewiesen, was für ein ubiquitäres Vorkommen des Enzyms in Säugetieren spricht.

Die Substratspezifität der beiden menschlichen Typen als auch des mOgg1 stimmen weitgehend mit der des homologen Hefe-Enzyms überein (s. Tab. 2.3). Auch bei den Säuger-Enzymen kommt es bei der katalytischen Enzymreaktion zu einem Schiff'sche-Base-Intermediat, wobei in den Säugerproteinen das Lysin 249 die Aminogruppe zur Knüpfung der vorübergehenden kovalenten Bindung – analog der bei der Hefe beschriebenen Reaktion – stellt (Lu et al., 1997; Nash et al., 1997).

Die Komplementierung der Mutator-Phänotypen von *fpg/mut Y*-defekten *E. coli* als auch *yogg1*-defekten Hefen durch die jeweiligen Ogg1-Säugerproteine lassen vermuten, daß das Ogg1-Protein auch bei Säugern eine Schlüsselrolle bei der Reparatur und damit der Verhinderung von Mutationen durch 8-oxoG hat. In der **Arbeitsgruppe von T. Lindahl** wurden kürzlich *mOGG1(-/-)-knock-out*-Mäuse hergestellt, deren Phänotyp (bezüglich Reparatur und Gleichgewichtsspiegel von oxidativen DNA-Schäden) u.a. in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden (s. Kapitel 5.4.2). In diesen Tieren konnte bis dato jedoch weder eine erhöhte Rate maligner Transformationen noch andere pathologische Veränderungen beobachtet werden (Klungland et al., 1999).

Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* hat man in Säugetieren die zu *mut Y* und *mut T* aus *E. coli* homologen Gene *MYH* und *MTH1* nachweisen können.

Das menschliche Homologe *hMYH* Gen kodiert für ein Enzym mit 535 Aminosäuren und weist auf struktureller Ebene eine Sequenzübereinstimmung von 41 % mit dem bakteriellen Mut Y Protein auf. Studien zeigen, daß dieses menschliche Protein in den Mitochondrien lokalisiert ist (Takao et al., 1998). Den Schluß, daß das zum bakteriellen Abwehrsystem – bestehend aus FPG und Mut Y – homologe System von  $\beta$ -hOgg1 und hMyh nur in den Mitochondrien von Säugern konserviert ist, könnte man mit der Endosymbionten-Hypothese erklären. Dagegen spricht jedoch, daß zum einen keine strukturelle Homologie von FPG und



Ogg1 gegeben ist und zum anderen auch in Kernextrakten von Säugern eine Adeninglykosylaseaktivität bei 8-oxoG:A-Paarungen beobachtet wird (**Mc Goldrick et al., 1995**). Letzteres spricht also für ein weiteres Mut Y-homologes Reparaturprotein mit Zellkernlokalisierung. Dies könnte entweder eine Isoform des bekannten Myh-Proteins oder ein weiteres bisher unbekanntes Säugerprotein sein.

Säugerhomologe von Mut T (Mth1) wurden kloniert und charakterisiert (**Sakumi et al., 1993; Cai et al., 1995**). Das homologe Mut T-Protein in Ratten und Menschen besteht jeweils aus 156 Aminosäuren. Dabei ist sowohl bei Vergleich der Säugerproteine miteinander als auch bei Vergleich mit dem bakteriellen Mut T-Protein eine Aminosäuresequenz-Homologie vorhanden. Bei Expression der cDNA der Säugerenzyme in *mut T*<sup>-</sup>-Stämmen von *E. coli* konnte eine deutliche Reduzierung (Komplementierung) der spontanen Mutationsraten dieser Stämme gezeigt werden (vgl. Kapitel 2.4.2.1.1).

Über andere Reparaturwege von 8-oxoG – außerhalb des beschriebenen und konservierten bakteriellen Reparatursystems – liegen vereinzelte Befunde vor. So wurde bei den Alkylpurin-DNA-Glykosylasen (AAG) von Mensch und Maus die Fähigkeit zur Entfernung von 8-oxoG aus DNA beschrieben (**Bessoh et al., 1993**). Untersuchungen an AAG(-/-)-*knock-out*-Mäusen zeigten aber die gleiche 8-oxoG-Glykosylaseaktivität in Zellextrakten von *Knock-out*- und Wildtyp-Tieren (**Engelward et al., 1997; Hang et al. 1997**). Dergleichen bedingte die Überexpression der cDNA für die N-Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG) in CHO-Zellen keine verbesserte Reparatur FPG-sensitiver DNA-Modifikationen (**Will, 1999**). Dies schließt aus, daß die Gruppe der AAG einen bedeutsamen Anteil zu der Reparatur von 8-oxoG im Säuger genom beisteuert.

Ferner wird auch ein Beteiligung des NER-Systems an der Reparatur von 8-oxoG nicht ausgeschlossen. Hiezu wird auf das Kapitel 2.4.3 verwiesen.

#### 2.4.2.2 Rolle des Xrcc1-Proteins in der Basen-Exzisions-Reparatur

Das *XRCC* (*X-ray repair cross-complementing*) 1-Gen kodiert für ein 70 kDa Protein, das an der Reparatur von Einzelstrangbrüchen während der BER beteiligt ist, was wahrscheinlich auf die gezeigten Interaktionen mit einer Form der DNA-Ligase III (Lig III) (**Nash et al., 1997; Mackey et al., 1997; Cappelli et al., 1997**) und der DNA-Polymerase  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) (**Kubota et al., 1996; Caldecott et al., 1996**) zurückgeführt werden kann. Des weiteren wird auch von spezifischen Interaktionen zwischen Xrcc1 und der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), einem Zinkfingerprotein, das an der Signalkaskade von DNA-Schäden beteiligt ist und an DNA-Strangbrüche bindet (**de Murcia & Menissier-de Murcia, 1994**), berichtet (**Caldecott**

**et al., 1996; Masson et al., 1998**). Alle diese Befunde lassen die Annahme zu, daß es sich beim Xrcc1-Protein um eine Art Plattformprotein für weitere Enzyme zur Formation eines Reparaturkomplexes innerhalb der BER handelt.

Zellen mit einer Defizienz an *XRCC1* zeichnen sich durch eine Hypersensitivität gegenüber Alkylantien, durch eine Sensitivität gegenüber ionisierender Strahlung, durch eine Anhäufung von Einzelstrangbrüchen nach DNA-Schädigung und durch eine ungewöhnlich hohe Frequenz von Schwester-Chromatid-Austauschen (SCE) aus (**Churchill et al., 1991; Zdzienicka et al., 1992; Thompson et al., 1982**). Bei den defizienten Zelllinien EM9 und EM-C11 wurde neben der *XRCC1*-Defizienz (**Caldecott et al., 1995**) auch eine Defizienz an Lig III (**Caldecott et al., 1995; Ljungquist et al., 1994**) nachgewiesen, was zu der Annahme veranlaßte, daß Mutationen in *XRCC1* zu einer Destabilisierung der Assoziate bestehend aus den beiden Proteinen führt (**Caldecott et al., 1995**). *In-vitro*-Reparaturexperimente zeigten, daß in den Zellextrakten der EM-C11 nur der 1-Nukleotid-Reparaturweg der BER durch die Defizienzen betroffen ist, wohingegen der PCNA-abhängige Teil der BER durch die Defizienz nicht beeinflußt zu sein scheint (**Kubota et al., 1996**). Dies bedeutet, daß die Anwesenheit von Xrcc1 nicht essentiell für die Reparatur ist. Dagegen scheint *XRCC1* in der frühen Entwicklung von Organismen eine große Rolle zu spielen, da Maus-Embryonen, die kein intaktes *XRCC1*-Gen besitzen, nicht länger als 8 Tage lebensfähig sind (**Tebbs et al., 1999**).

### 2.4.3 Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)

Die NER prozessiert überwiegend solche Modifikationen der DNA, die zu größeren Distorsionen in ihrer räumlichen Anordnung führen und dadurch eine Blockade von Transkriptions- und Replikationsvorgängen verursachen. Typische Beispiele solcher Modifikationen stellen Cisplatin-Guanin, Psoralen-Thyminaddukte und (6-4)-Photoprodukte dar. Andersartige Modifikationen werden in erster Linie von der BER oder der direkten Reparatur prozessiert, wobei alle bekannten kovalenten Basenmodifikationen auch Substrate für das NER-System darstellen (**Huang et al., 1994**).

In Pro- und Eukaryonten verläuft die NER nach dem gleichen Prinzip. Ein ATP-abhängiger Multienzymkomplex schneidet im Abstand von mehreren Nukleotiden 3' und 5' zur DNA-Modifikation das Zucker-Phosphat-Gerüst des betroffenen DNA-Stranges ein. Die Exinukleaseaktivität beruht in *Escherichia coli* auf den 3 Enzymen des *uvrABC*-System, im Menschen ist sie auf einen Komplex bestehend aus bis zu 16 Polypeptiden („Repaurosom“) zurückzuführen, der in einem hochkomplexen Zusammenspiel dieser 16 „Akteure“ die modifizierte Base zusammen mit einem Oligomer von durchschnittlich 24-29 Nukleotiden

entfernt (Unter den beteiligten Enzymen von *E. coli* und Menschen treten keinerlei Sequenz-Homologien auf.). Sieben dieser 16 menschlichen Polypeptide lassen sich als Komplementationsgruppen der Erbkrankheit *Xeroderma pigmentosum* (XP) definieren und werden deshalb mit XPA bis XPG bezeichnet. Als weitere Bestandteile des Polypeptidkomplexes seien hier noch der aus sieben Untereinheiten bestehende Transkriptionsfaktor TFIIH und die ERCC (*excision repair cross complementing*)-Proteine 1 bis 3 genannt. Nach dem Einschnitt wird der Komplex durch einen anderen Proteinkomplex (Postinzisionskomplex) ersetzt, der die Reparatursynthese durchführt – also die entstandene Lücke unter Zuhilfenahme des gegenüberliegenden DNA-Einzelstranges wieder auffüllt. Die Reparatursynthese ist wie der *Long-patch*-Reparaturweg des BER PCNA-abhängig und erfordert folglich die Anwesenheit der DNA-Polymerase  $\delta$  oder  $\epsilon$ . Schließlich wird das eingefügte DNA-Stück durch eine Ligase – höchstwahrscheinlich die Ligase I – versiegelt.

#### 2.4.4 Transkriptionsgekoppelte DNA-Reparatur (TCR, *preferential repair*)

Die bisher beschriebenen Reparatursysteme beseitigen DNA-Schäden unabhängig davon, ob der geschädigte DNA-Bereich ein aktiver Bereich ist, der transkribiert wird, oder nur einen ruhenden, inaktiven Bereich des Genoms darstellt. Dies bezeichnet man als *global repair* der DNA. Die Tatsache, daß sowohl in *E. coli* als auch beim Menschen transkribierte DNA (ca. 1 % des Genoms) wesentlich schneller als das übrige Genom repariert werden, bezeichnet man als *preferential repair*. Dies beruht auf einer Kopplung von an der Transkription beteiligten Faktoren und einem Reparaturkomplex. Die Einzelheiten des Mechanismus sind im Menschen bisher nicht vollständig aufgeklärt. Aus den bisherigen Beobachtungen läßt sich jedoch der prinzipielle Ablauf rekonstruieren. So nimmt man an, daß die an einer DNA-Modifikation „hängengebliebene“ RNA-Polymerase II durch TFIIIS und die beiden Proteine CSA/CSB erkannt wird. Nachdem die RNA-Polymerase II durch TFIIIS zur Seite gedrückt wurde, erfolgt durch das CSA/CSB-Proteinheterodimer und TFIIIE die Rekrutierung von XPA und TFIIH zum Ort der nun wieder freiliegenden DNA-Modifikation. Es kommt dann zu dem bei der NER beschriebenen, dualen Einschnitt beiderseits der Modifikation und einer Reparatursynthese mit anschließender Ligation. Der neu synthetisierte, nun unmodifizierte DNA-Abschnitt kann im Anschluß gleich wieder von der RNA-Polymerase II als Matrice genutzt werden und die begonnene Transkription kann somit unmittelbar fortgesetzt werden.

Ein Ausfall der für die Proteine CSA und CSB codierenden Gene führt beim Menschen zu einer als Cockayne's Syndrom (CS) bezeichneten Erkrankung, die für die Bezeichnung der

Gene herangezogen wurde. Diese seltene Erbkrankheit äußert sich in den betroffenen Menschen unter anderem in schweren neurologischen Störungen. Daneben bedeutet die Erkrankung den Ausfall des beschriebenen *Preferential-repair*-Mechanismus. Im Zusammenhang mit dem Cockayne's Syndrom wurde kürzlich auch von einer eingeschränkten Kapazität der *In-vitro*-Inzision von 8-oxoG in Zellextrakten von CS-Patienten (Komplementationsgruppe B) berichtet (**Dianov et al., 1999**). Der Arbeit zufolge soll in diesen CS-Zellen ein verminderte Expression von *hOGG1* vorliegen, welche durch Transfektion durch das *CSB*-Gen komplementiert werden konnte. Dies wird so gedeutet, daß die Mutation im *CSB*-Gen zu einer defizienten Transkription von *hOGG1* führt.

#### 2.4.5 Postreplikative Reparatur (*Mismatch-Reparatur*)

Sind Modifikationen der DNA nicht durch die präreplikativen Reparaturmechanismen erfaßt worden und ist es bei der Replikation zu einer Basenfehlpaarung (*mismatch*) gekommen, so besteht noch die Möglichkeit diesen Fehler mit Hilfe der postreplikativen Reparatur innerhalb des Genoms zu korrigieren. Sowohl pro- als auch eukaryontische Organismen verfügen über verschiedene postreplikative Reparaturmechanismen. Anhand eines genau charakterisierten Mechanismus in *E. coli* soll das Prinzip kurz erläutert werden. Die Voraussetzung der postreplikativen Reparatur ist die Unterscheidbarkeit des parentalen Stranges und des neusynthetisierten Tochterstranges der DNA. In *E. coli* wird dies durch eine Methylierung bestimmter Adenine erzielt, die zeitlich verzögert nach der Replikation erfolgt. Bis dahin kann der parentale Strang an seiner Methylierung erkannt werden („hemi-methylierter“ DNA-Doppelstrang). In *E. coli* bewerkstelligen die Proteine Mut S, Mut L und Mut H die Erkennung einer *Mismatch*-Stelle in der DNA, nehmen einen Einschnitt vor und ermöglichen dann weiteren Enzymen den Austausch und die Korrektur des *mismatch*-beihaltenden DNA-Stückes. Mutationen in den *E.-coli*-Genen *mut S*, *mut L* und *mut H* führen in den entsprechenden Bakterienstämmen zu Mutator-Phänotypen, was die große Bedeutung der postreplikativen DNA-Reparatur unterstreicht. Im Menschen wurden zu den Bakteriengen *mut S* und *mut L* die homologen Gene *MSH2* und *MLH1* gefunden. In beiden Fällen konnte nachgewiesen werden, daß Mutationen in diesen Genen einen Ausfall der *Mismatch*-Reparatur nach sich ziehen und so im menschlichen Organismus zu genomischen Instabilitäten führen (**Fishel et al., 1993; Modrich, 1994**). Es konnte in diesen Arbeiten demonstriert werden, daß der Ausfall der *Mismatch*-Reparatur im Menschen eine hohe Prädisposition für die Entwicklung von Tumoren nach sich zieht.

#### 2.4.6 Die Bedeutung der DNA-Reparatur für die Kanzerogenese

Es ist bekannt, daß der Ausfall von bestimmten Genen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, ein erhöhtes Krebsrisiko nach sich zieht. Gut belegt ist dies an dem bereits erwähnten Beispiel des menschlichen Gens, *MSH2*, das an der *Mismatch*-Reparatur beteiligt ist und ein Homolog des bakteriellen *mut S*-Gens darstellt (**Modrich, 1994**) (s. auch Kapitel 2.4.5). Der Ausfall dieses Gens führt zu einer erblichen Form des Dickdarmkrebses (HNPCC: *hereditary non-polyposis colon cancer*). Man weiß, daß bereits Individuen mit einer heterozygoten Mutation in diesem Gen ein erhöhtes Risiko für eine Folgemutation in dem intakten Allel des Gens in einer Körperzelle besitzen, also somit ebenfalls eine erhöhte Prädisposition für diese Form des Dickdarmkrebses aufweisen (**Kaina, 1997**).

Da der Ausfall der Reparaturgene *fpg/mut Y* in *E. coli* bzw. *yOGGI* in *S. cerevisiae* zu sogenannten Mutator-Phänotypen führt (s. Kapitel 2.4.2.1.1 bzw. 2.4.2.1.2), liegt die Annahme nahe, daß ein homologer Verlust des Reparaturgens *hOGGI* im Menschen ähnliche Konsequenzen wie im Falle des Ausfalls von beispielsweise *MSH2* haben könnte. Tatsächlich hat man in jüngerer Zeit einige Indizien für die Richtigkeit dieser Hypothese gefunden. So ist das *OGGI*-Gen auf dem Chromosomenabschnitt 3p25 lokalisiert (**Radicella et al., 1997; Aburatani et al., 1997; Arai et al., 1997; Bjoras et al., 1997; Lu et al., 1997; Roldan-Arjona et al., 1997; Rosenquist et al., 1997**), welcher häufig in bestimmten Karzinomtypen – speziell klarzelligem Nierenkarzinom und Lungentumoren – auf einem Allel verlorengegangen ist (Verlust der Heterozygotie, LOH) (**Decker et al., 1996; Naylor et al., 1987; Yokota et al., 1987; Hibi et al., 1992**). Interessant ist, daß auch das von Hippel-Lindau (*VHL*)-Tumorsuppressorgen auf dem Chromosomenabschnitt 3p lokalisiert ist. In Lungentumoren fand man je nach Typ in 73 % bis 100 % der Fälle ein LOH im Bereich 3p20-25 (**Arai et al., 1997**). Des weiteren gibt es vereinzelte Berichte von *OGGI*-inaktivierenden Mutationen in menschlichen Lungen-, Nieren- (**Chevillard et al., 1998**) und Magentumoren (**Shinmura et al., 1998**). Im Falle der Lungen- und Nierentumore wurde die inaktivierenden Mutationen eindeutig auf Basensubstitutions-Mutationen zurückgeführt.

Ein weiteres Indiz für die Wichtigkeit der Reparatur von 8-oxoG ergibt sich aus der Analyse der Mutationsmuster im Tumorsuppressorgen *p53* verschiedener Tumortypen. Das *p53*-Gen, das sehr häufig in vielen Krebsarten mutiert ist, weist bei Betrachtung der Mutationsarten in Lungentumoren – im Gegensatz zu den meisten anderen Tumortypen – eine auffällige Dominanz von G:C→T:A Transversionen auf (**Hollstein et al., 1996**). Diese Basensubstitutions-Mutation wird typischerweise von nicht repariertem 8-oxoG verursacht (s. Kapitel 2.4.2.1.1).

All diese Berichte stützen die Hypothese, daß ähnlich wie der Defekt in der *Mismatch-Reparatur* auch ein Ausfall der Reparatur von Modifikationen, die aus oxidativen Belastungen resultieren, einen Beitrag zur Kanzerogenese bzw. Tumorprogression leistet. So ist vorstellbar (Abb. 2.12), daß eine Mutation in einem Gen, das für die Reparatur oxidativer DNA-Schäden verantwortlich ist, zu einem Mutator-Phänotyp führt. Als Folge resultiert daraus ein erhöhtes Risiko für weitere Mutationen in Zellzyklus-regulierenden Genen und Tumorsuppressorgenen, was die Entartung einer Zelle nach sich ziehen könnte (**Boiteux & Radicella, 1998; Boiteux & Radicella, 1999**). Gene, die für ein Reparaturprotein codieren, hätten demnach eine tumorsuppressorartige Bedeutung im Modell der Kanzerogenese.

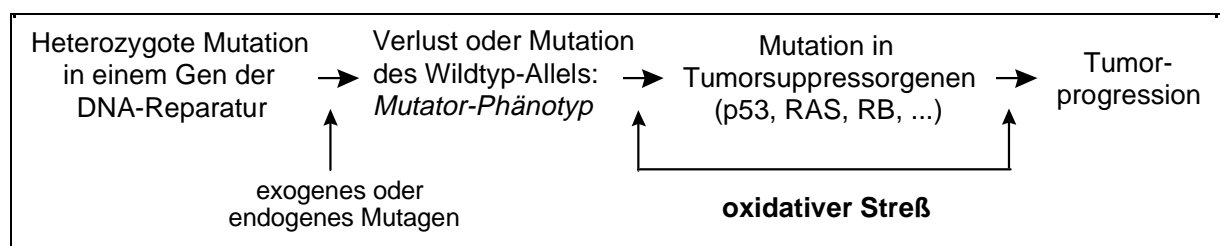


Abb. 2.12 Mögliche Rolle von Mutationen in Genen der DNA-Reparatur in der Kanzerogenese (**Boiteux & Radicella, 1998**).

### **3. Zielsetzung**

In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene endogene Faktoren hinsichtlich ihrer Bedeutung für den Steady-State-Level und die Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen in Säugerzellen untersucht werden. Hierzu sollten Untersuchungen in verschiedenen Säugerzellen mit Hilfe einer modifizierten Alkalischen Elutionstechnik unternommen werden.

Zunächst sollte geklärt werden, ob Unterschiede im Steady-State-Level in Abhängigkeit von Organ-, Gewebe- und Zelltyp auftreten. Dazu sollten u.a. die Steady-State-Level in Bronchialkarzinom-Zelllinien verschiedener Subtypen untersucht werden. Weitere Hinweise zur Zelltyp-Abhängigkeit der Steady-State-Level sollten durch deren Bestimmung in Abhängigkeit des Zelldifferenzierungsstadiums in der menschlichen Zelllinie HL60 gewonnen werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit sollte die Untersuchung des Einflusses von Säugerenzymen sein, die an der Reparatur von oxidativen DNA-Schäden beteiligt sind. Im Mittelpunkt dieser Untersuchungen standen die erst kürzlich in Säugern klonierten 8-Hydroxyguanin-glykosylasen (Ogg1). Es sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, in welchem Maße eine Überexpression oder ein Defekt der für diese Enzyme kodierenden Gene zu einer Veränderung der Steady-State-Level und Reparaturgeschwindigkeiten oxidativer DNA-Modifikationen zum anderen zu einer Veränderung der Mutationshäufigkeiten und genotoxischen Ereignisse führt. Ähnliche Untersuchungen sollten auch zur Bedeutung des XRCC1-Enzyms vorgenommen werden.

Zusätzlich sollten in einem bakteriellen Mutationstest quantitative Erkenntnisse über die Mutagenität oxidativer DNA-Modifikationen gewonnen werden. In Verbindung mit diesen Erkenntnissen sollten Abschätzungen ermöglicht werden, in welchem Maße ein veränderter Steady-State-Level oder eine veränderte Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen zu einer Erhöhung des Mutationsrisikos bzw. Krebsrisikos in Säugerzellen beiträgt.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte

Autoklav	Tecnoclav 50 (Tecnomara, Italien)
Brutschrank (Bakterienkultur)	Heraeus B 6200 (Heraeus, Hanau)
Brutschrank (Zellkultur)	Heraeus B 5060 EK/CO <sub>2</sub> (Heraeus, Hanau)
Coulter Counter	Modell N Industry (Coulter Electronics LTD, Beds., England)
DNA-Gel-Vermessung	BioRad Gel Doc 1000 (BioRad, Hercules, CA, USA)
DNA-Gel-Auswertung	Molecular Analyst <sup>®</sup> (v 2.1, 1995, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA)
Einkanalschreiber	LKB 6520-4 (LKB, Bromma, Schweden)
Fluoreszenz-Mikroskop	(Zeiss, Oberkochen) Filter 46 63 01-9901
Fluoreszenzphotometer	Kontron SFM 25 (Kontron AG, Zürich, Schweiz)
Fraktionssammler	Ultrorac 2070 II (Pharmacia / LKB, Uppsala, Schweden)
Gefrierbehälter (Zellen)	Flüssigstickstoffcontainer TW 750 RS (Taylor Wharton, Theodore, AL, USA)
Gefrierschrank (-70°C)	Colora UF 85-300S (Colora, Lorch)
Gelapparatur (Elektrophorese von Plasmid-DNA)	Mechanikwerkstatt, Institut für Toxikologie, Universität Würzburg
Gelapparatur (Elektrophorese von RNA und DNA)	EasyCast <sup>™</sup> , 40-B1 (peqlab, Erlangen)
Halogenlampe (1000 W)	Osram SLG 1000-Studio (Osram, München) mit Flecta Halogen Mini-Brenner (Reflekta)
Halogentageslichtstrahler	SLG-1000-Studio (Osram, München)
Klonierungsringe	Werkstatt, Institut für Pharmazie, Universität Mainz
Kühlzentrifuge	Sorvall Superspeed RC2-B (Sorvall, Conn., USA)
pH-Meter	PHM 62 (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark)
PCR-Gerät	Progene (Techne, Cambridge, Großbritannien)
Pipetten	Pipetman P 20, P 200, P 1000, P 5000 (Gilson, Frankreich)
Pumpe (Alkal. Elution)	Mehrkanalpumpe, Ismatec IPN (Ismatec Laboratoriumstechnik, Zürich, Schweiz)
Rotoren für Kühlzentrifuge	SS-34, GS-3 (Sorvall, Newton, Conn., USA)



Schüttelinkubator (Bakterien)	TH25/SM25 Digi (Edmund Bühler, Bodelshausen)
Spannungsquelle (Elektrophorese)	Consort E425 (Consort pvba, Turnhout, Belgien)
Spannungsquelle ( <i>Western Blot</i> )	Trans-Blot <sup>®</sup> SD, Semi-Dry Transfer Cell (BioRad, Hercules, CA, USA)
Speedvac	Konzentrationszentrifuge Univapo 100 H mit Unijet II Refrigerated Aspirator (Laborgerätebau A.N. Kraupa, Martinsried)
Tropfentrichter (Cytospin)	Shandon Cytoclip (Shandon, Pittsburg, USA)
Ultraschallbad	RK 100 (Bandelin electronic, Berlin)
Ultraschall-Homogenisator	SONOPULS; HD 70 mit Sonotrode MS 73 und (Sonifier) HF-Generator GM 70 (70 W, 20 kHz) (Bachofer, Reutlingen)
UV / VIS-Photometer	LKB Biochrom Ultrospec 2 (Pharmacia / LKB, Uppsala, Schweden); Spektralphotometer Hitachi U-2000 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)
Zentrifugen	Heraeus Biofuge 28 RS (Heraeus, Hanau); Hettich Micro Rapid/K und Hettich Universal/K2S (Hettich, Tuttlingen); Ultrazentrifuge Optima LK-80K (Beckmann Instruments, Palo Alto, CA, USA)
Zytozentrifuge	Cytospin 3 (Shandon, Astmoor, England)

#### 4.1.2 Verbrauchsmaterial

Anionenaustauschersäulen	QIAGENSäulen TIP 500 bzw. 2500 (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA,USA)
Blotting-Papier (Proteine)	(Schleicher & Schüll, Würzburg)
Cellulosenitrat-Membran	(Schleicher & Schüll, Würzburg)
Dialyseschläuche	Spectra Por (Spectrum Medical Ind., Los Angeles, CA, USA)
DNA-Isolierungs-Kit	QIAamp <sup>®</sup> Blood Kit (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA,USA)
Filter (Alkal. Elution)	Polycarbonat-Membran, 2 µm, Ø: 25 mm, (Nucleopore, Cambridge, USA)
Filterhalter (Alkal. Elution)	Swinnex SX 2500 (Millipore, Holstein, Frankreich)
Filterpapier und Faltenfilter	(Schleicher & Schüll, Würzburg)

Fluoreszenzküvetten	Hellma 105251-QS (Hellma GmbH, Mühlheim);Elkay Ultra-Vu (Elkay Produkts, Inc., Shrewsbury, MA, USA)
Lochfilter	Shandon Filter Cards (Schleicher & Schüll, Würzburg)
Objektträger	Labcraft, DFF 76×26 mm (Richardson Supply Comp. Ltd., London, England)
PCR-Aufreinigungskit	QIAquick™ PCR Purification Kit (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA,USA)
PCR-Kit	Taq PCR Master Mix Kit (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA,USA)
Plastikmaterialien	(Eppendorf, Hamburg)
Protein-Längenstandard	Sigma SDS-7 Dalton Mark VII-L (Sigma Chemie, Deisenhofen)
RNA-Isolierungskit	Rneasy® Mini Kit (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA,USA)
RT-PCR-Kit	SUPERSCRIPT™, Voramplifizierungssystem zur Erststrang-cDNA-Synthese (Gibco, Eggenstein)
Spritzen (Alkal. Elution)	20cc-Syringe, Luerlock (Becton Dickinson & Co., Rutherford, USA)
Sterilfilter	Porengröße 0.22 µm (Schleicher & Schüll, Dassel)
Zellkulturflaschen	(Greiner GmbH, Nürtingen)
Zelllysat-Homogenisatoren	QIAshredder™ (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA,USA)
Zentrifugenröhrchen	(Greiner GmbH, Nürtingen)

### 4.1.3 Chemikalien

Adenin	Sigma Chemie, Deisenhofen
Agarose (Typ I, low EEO)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Alkalische Phosphatase	Sigma Chemie, Deisenhofen
Aminopterin	Sigma Chemie, Deisenhofen
Bacto-Agar	Gibco, Eggenstein
Bacto-Hefeextrakt	Gibco, Eggenstein
Bacto-Trypton (Pepton)	Gibco, Eggenstein
Bisbenzimid	Sigma Chemie, Deisenhofen
BSA (Bovine Serum Albumin)	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blue G, C.I. Nr. 42655	Serva, Heidelberg
Dithioerithritol (DTE)	Serva, Heidelberg

DMEM-Medium	Gibco, Eggenstein
DMSO	Sigma Chemie, Deisenhofen
DTNB, <i>Ellman's</i> Reagens (5,5'-Dithio-(2-nitrobenzoesäure))	Serva, Heidelberg
Eindeckmittel EDL-2 (Fluoreszenz-Mikroskopie)	Linaris, Wertheim-Bettingen
EDTA	Fluka, Buchs, Schweiz
EMS (Ethylmethansulfonat)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth KG, Karlsruhe
Fluorochrom (Hoechst No. 33258)	Sigma Chemie, Deisenhofen
FuGENE™6 Transfektion Reagent	Boehringer Mannheim
Giemsa	Sigma Chemie (Nr. GS-500), Deisenhofen
Geneticin® (G418)	Gibco, Eggenstein
Ham's F12-Medium	Gibco, Eggenstein
HEPES ([N-2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'- [2-ethansulfonsäure])	Sigma Chemie, Deisenhofen
8-Hydroxyguanin (2-Amino-6,8-dihydroxy-purin)	Aldrich, Steinheim
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Kälberserum, fötales (FCS)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Markerproteine SDS-7 Dalton Mark VII-L	Sigma Chemie, Deisenhofen
McCoy's 5A-Medium	Sigma Chemie, Deisenhofen
MEM-Medium	Sigma Chemie, Deisenhofen
MOPS (3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Mycphenolsäure	Sigma Chemie, Deisenhofen
NADPH	Boehringer Mannheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
Nitroblautetrazolium	Fluka, Buchs, Schweiz
PEG 3000 (Polyethylenglykol)	Serva, Heidelberg
Penicillin / Streptomycin-Lösung	Gibco, Eggenstein
PMA	Fluka, Buchs, Schweiz
Ro 19-8022	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Rotiporese Gel 30® (Art.Nr. 3029)	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	Sigma Chemie, Deisenhofen
SIGMA FAST™ BCIP/NBT-Tabletten (Art.Nr. B-5655)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Tetraethylammoniumhydroxid (TEAH)	Fluka, Buchs, Schweiz
Thymidin	Sigma Chemie, Deisenhofen
Tetradecanoicphorbolacetat (TPA)	Sigma Chemie, Deisenhofen

6-Thioguanin (2-Amino-6-mercapto-purin)	Fluka, Buchs, Schweiz
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg
Trypsin / EDTA-Lösung	Gibco, Eggenstein
Xanthin	Sigma Chemie, Deisenhofen

Ro 19-8022 [ (R)-1-[10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]quinolizin-1-yl]carbonyl]-2-pyrrolidinmethanol ] wurde dankenswerterweise von Herrn Dr. E. Gocke der Firma F. Hoffmann-La Roche AG (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

Alle anderen Reagenzien stammten aus Hochschullieferungen oder von verschiedenen Herstellern und entsprachen größtmöglicher lieferbarer Reinheit (p.a.-Qualität).

#### 4.1.4 Antikörper, DNA, Enzyme und Primer

Antikörper gegen humanes Bcl-2	bcl-2 $\alpha$ Oncoprotein Ab-1 (Clone 100/D5), Monoklonaler Maus-Antikörper (Cat.No. MS-123-S, NEOMARKERS, Dunn Labortechnik GmbH, Asbach)
Anti-Maus-Antikörper	Phosphatase-gelabelter Antimaus(IgG)-Ziegenantikörper (Cat.No. 475-1802, Kirkegaard & Perry, Gaithersburg, Maryland, USA)
Desoxyribonuklease I	Amplifizierungs-Qualität (Cat.No. 18068-015, Gibco, Eggenstein)
Glutathionreduktase	Boehringer Mannheim
Kalbsthymus DNA	Serva, Heidelberg
PM2-DNA	DNA des Bakteriophagen PM2, Präparation nach <b>Salditt et al. (1972)</b> durch I. Schulz, Mainz
pcDNA3.1(-)	Expressionsvektor (Invitrogen <sup>®</sup> , Carlsbad, CA), Präparation s. Kapitel 4.2.6
pPR65	Expressionsvektor (Vektorkonstrukt aus pcDNA3.1(-) und der cDNA des hOGG1-Gens), Präparation s. Kapitel 4.2.6
pSV2- <i>gpt</i> -Plasmid	Plasmid-DNA, Präparation s. Kapitel 4.2.6
FPG-Protein	( <u>F</u> ormamidopyrimidin-DNA- <u>G</u> lykosylase) aus <i>Escherichia coli</i> ; zur Verfügung gestellt von S. Boiteux (Institute Gustave Roussy, Villejuif, Frankreich)
Primer	MWG-Biotech, Ebersberg

Proteinase K	lyophilisiert, aus <i>Tritirachium album</i> (Roth, Karlsruhe)
Reverse Transkriptase	SUPERSCRIPT™-RT-PCR-Kit (Gibco, Eggenstein)
RNase I	(Serva, Heidelberg)
Taq-Polymerase	Taq DNA-Polymerase (QIAGEN Inc., Chatsworth, CA, USA)

#### 4.1.5 Zelllinien, Bakterienstämme und Versuchstiere

AA8 (CHO-Zellen)	Ovarienzellen des Chinesischen Hamsters, erhalten von J.H.J. Hoeijmakers (Department of Cell Biology and Genetics, Medical Genetics Centre, Erasmus University, Rotterdam, Niederlande).
AA8-ogg1-1/9/16/19/22	Die Tranfektantenklone Nummer 1, 9, 16, 19 und 22, die aus der Transfektion der AA8-Zellen mit dem Plasmid pPR65 resultierten.
AS52 (CHO-Zellen)	Ovarienzellen des Chinesischen Hamsters, erhalten von W.J. Caspary (Laboratory of Environmental Carcinogenesis and Mutagenesis, Research Triangle Park, North Carolina, USA).
AS52-ogg1-1/2/3	Die Tranfektantenklone Nummer 1, 2 und 3, die aus der Transfektion der AS52-Zellen mit dem Plasmid pPR65 resultierten.
AS52-v.o.-1 ( <i>vector-only</i> )	Der Tranfektant, der aus der Transfektion der AS52-Zellen mit dem Plasmid pcDNA3.1(-) resultierte.
BEAS-2B	Immortalisierte humane Bronchialepithelzellen, erhalten von S. Horn (Projekt Z2, SFB 519), HTG-Chirurgie, Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung, Mainz.
EM9 und AA8-1	<i>XRCC1</i> -defiziente und Wildtyp-Ovarienzellen des Chinesischen Hamsters, erhalten von E. Sage, Institut Curie Recherche, Paris, Frankreich.
F11.1 bzw. 1.2	Immortalisierte Fibroblasten von <i>mOGGI(+/-)</i> -Wildtyp-Mäusen bzw. <i>mOGGI(-/-)</i> -knock-out-Mäusen, erhalten von D. Barnes (Imperial Cancer Research Fund, Clare Hall Laboratories, South Mimms, Großbritannien).
HL60	Menschliche promyeloische Leukämie-Zelllinie, erhalten von M. Clark, Medizinische Poliklinik der Universität Würzburg.

---

LC-MZ-1	Bronchialkarzinom-Zellen (Großzeller), erhalten von S. Horn (Projekt Z2, SFB 519), HTG-Chirurgie, Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung, Mainz.
LC-MZ-2	Bronchialkarzinom-Zellen (Großzeller), erhalten von S. Horn (Projekt Z2, SFB 519), HTG-Chirurgie, Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung, Mainz.
LC-MZ-4	Bronchialkarzinom-Zellen (Großzeller), erhalten von S. Horn (Projekt Z2, SFB 519), HTG-Chirurgie, Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung, Mainz.
LC-MZ-5	Bronchialkarzinom-Zellen (SLCL), erhalten von S. Horn (Projekt Z2, SFB 519), HTG-Chirurgie, Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung, Mainz.
LC-MZ-6a/s	Bronchialkarzinom-Zellen (Plattenepithelkarzinom), erhalten von S. Horn (Projekt Z2, SFB 519), HTG-Chirurgie, Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung, Mainz.
LC-MZ-7	Bronchialkarzinom-Zellen (Plattenepithelkarzinom), erhalten von S. Horn (Projekt Z2, SFB 519), HTG-Chirurgie, Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung, Mainz.
LC-MZ-8	Bronchialkarzinom-Zellen (Adenokarzinom), erhalten von S. Horn (Projekt Z2, SFB 519), HTG-Chirurgie, Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung, Mainz.
LC-MZ-9a/s	Bronchialkarzinom-Zellen (Adenokarzinom), erhalten von S. Horn (Projekt Z2, SFB 519), HTG-Chirurgie, Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung, Mainz.
LC-MZ-10	Bronchialkarzinom-Zellen (Großzeller), erhalten von S. Horn (Projekt Z2, SFB 519), HTG-Chirurgie, Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung, Mainz.
LC-MZ-11	Bronchialkarzinom-Zellen (Plattenepithelkarzinom), erhalten von S. Horn (Projekt Z2, SFB 519), HTG-Chirurgie, Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung, Mainz.
LC-MZ-13a/s	Bronchialkarzinom-Zellen (Adenokarzinom), erhalten von S. Horn (Projekt Z2, SFB 519), HTG-Chirurgie, Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung, Mainz.
NCI-H82	Bronchialkarzinom-Zellen (SCLC), erhalten von S. Horn (Projekt Z2, SFB 519), HTG-Chirurgie, Verfügungsgebäude für Forschung und Entwicklung, Mainz.

RAW264.7 bzw. Rbcl2-14	Mausmakrophagen-Zellen vom Wildtyp bzw. <i>BCL-2</i> -überexprimierend, erhalten von B. Brüne, Medizinische Abteilung IV, Universität Erlangen.
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	erhalten von P. Radicella, Département de Radiobiologie et Radiopathologie, Commissariat à l'Énergie Atomique, Fontenay-aux-Roses, Frankreich; Träger der Plasmide pcDNA3.1(-) bzw. pPR65.
<i>Escherichia coli</i> DT2 ( <i>gpt</i> <sup>-</sup> )	wurde zur Verfügung gestellt von E. Dogliotto (Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien).
<i>Escherichia coli</i> „sure strain“	Träger des Plasmids pSV2- <i>gpt</i> .
Versuchsmäuse	<i>mOGGI</i> (+/+)-Wildtyp-Mäuse (2 weibliche und 2 männliche Tiere, geb. 16.08.98) bzw. <i>mOGGI</i> (-/-)- <i>knock-out</i> -Mäuse (2 weibliche und 2 männliche Tiere, geb. 08.08.98 bzw. 30.08.98), erhalten von D. Barnes (Imperial Cancer Research Fund, Clare Hall Laboratories, South Mimms, Großbritannien).

#### 4.1.6 Puffer, Lösungen, Medien

##### 4.1.6.1 Alkalische Elution

PBSCMF (autoklav.)	pH 7.4	137 mM NaCl 2.70 mM KCl 8.30 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
BE <sub>1</sub> (15) (autoklav.)	pH 7.5	100 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 1.0 (15.0) mM Na <sub>2</sub> EDTA
BE <sub>1</sub> /BSA (autoklav.)	pH 7.5	100 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 1.00 (15.0) mM Na <sub>2</sub> EDTA 0.10 g/l BSA

---

TC-Puffer (mit BSA)	pH 8.0	50 mM Tris/HCl 25 mM CaCl <sub>2</sub> 0.5 g/l BSA
Lysepuffer	pH 10.0	100 mM Glycin 20 mM Na <sub>2</sub> EDTA 2 % SDS pH-Wert mit 2 N NaOH eingestellt
Lysepuffer (mit Proteinase K)	pH 10.0	100 mM Glycin 20 mM Na <sub>2</sub> EDTA 2 % SDS pH-Wert mit 2 N NaOH eingestellt 500 mg/l Proteinase K
Waschpuffer (autoklav.)	pH 10.0	20 mM Na <sub>2</sub> EDTA pH-Wert mit 2 N NaOH eingestellt
Elutionspuffer	pH 12.1	20 mM H <sub>4</sub> EDTA pH-Wert mit TEAH eingestellt
DNA-Standard		50.0 mg/l Kalbsthymus-DNA in BE <sub>1</sub> -Puffer
Bisbenzimid-Stammlösung (Hoechst No. 33258)		0.15 mM in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> die Lösung wird aliquotiert bei -20°C gelagert
Phosphatpuffer PP I	pH 6.0	100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Phosphatpuffer PP II (autoklav.) mit Bisbenzimid	pH 7.2	100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.0 % (v/v) Bisbenzimid-Stammlösung

(Die Bisbenzimid-Stammlösung wird dem autoklavierten Phosphatpuffer erst unmittelbar vor Gebrauch in einer lichtgeschützten Flasche zugesetzt.)



**4.1.6.2 Puffer und Medien zur Zellkultur**

HBSS	pH 7.4	0.185 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0.4 g KCl 0.06 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.1 $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0.1 $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 8 g NaCl 0.35 g $\text{NaHCO}_3$ 0.048 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 1 g D-Glucose 30 mM HEPES mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ ad 1000 ml
PBS		8 g NaCl 0.2 g KCl 1.15 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0.2 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 0.134 $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0.1 $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ ad 1000 ml
PBSCMF (10-fach)		80 g NaCl 2 g KCl 11.5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 2 g $\text{KH}_2\text{PO}_4$ mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ ad 1000 ml
PBSCMF (1 ×) (autoklav.)	pH 7.4	10 % PBSCMF (10-fach) in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$
Trypsin/EDTA		0.5 g/l Trypsin 0.2 g/l EDTA in modifizierter Puck's Salzlösung A

---

Kulturmedium für AS52 (Routinemedium)	Ham's F12 5 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg/ml) 200 µg/ml Geneticin <sup>®</sup> (Transfektanten)
Kulturmedium für AA8	Mc Coy's 5A 5 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg/ml) 200 µg/ml Geneticin <sup>®</sup> (Transfektanten)
Kulturmedium für BEAS-2B, alle LC-MZ-Zellen sowie NCI-H82	RPMI 1640 7 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg/ml)
Kulturmedium für EM9 und AA8-1	α-MEM 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg/ml)
Kulturmedium für F11.1 bzw. 1.2	3 Teile DMEM (4.5 g/l Glucose) 1 Teil Ham's F12 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg/ml)
Kulturmedium für HL60	RPMI 1640 7 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg/ml)
Kulturmedium für RAW264.7 bzw. Rbcl2-14	RPMI 1640 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg/ml) 200 µg/ml Geneticin <sup>®</sup> (Transfektanten)

#### 4.1.6.3 Puffer zur Glutathion-Bestimmung

Phosphat/EDTA-Puffer	pH 7.5	125 mM Natriumphosphat (15.96 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.72 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 6.3 mM EDTA-Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub>
NADPH-Puffer	pH 7.5	125 mM Natriumphosphat (15.96 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.72 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 6.3 mM EDTA-Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> 0.3 mM NADPH (2 Wochen bei 4°C haltbar)
DTNB-Farbstofflösung		125 mM Natriumphosphat (15.96 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.72 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 6.3 mM EDTA-Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> 6.0 mM DTNB (2 Wochen bei 4°C haltbar)
GSH-Reduktase-Puffer		125 mM Natriumphosphat (15.96 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.72 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 6.3 mM EDTA-Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> 200 U/ml GSH-Reduktase (2 Wochen bei 4°C haltbar)
GSH-Standard-Lösung		125 mM Natriumphosphat (15.96 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1.72 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) 6.3 mM EDTA-Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> 100 µM GSH (reduziert) (immer frisch herstellen)

TCA-Puffer	5 ml 20%ige Trichloressigsäure 40 µl 0.5 M EDTA 2 ml 1N HCl ad. 60 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
------------	--

#### 4.1.6.4 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Lysepuffer	150 mM NaCl 50 mM Tris-HCl 5 mM EDTA 1% Igepal 10 µg/ml Leupeptin 10 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Antipain	pH 8.0
Tris-Puffer I	1.5 M Tris/HCl pH-Wert mit 5 N HCl einstellen	pH 8.8
Tris-Puffer II	1.0 M Tris/HCl pH-Wert mit 2 N HCl einstellen	pH 6.8
SDS-Lösung	10 % SDS in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	
Ammoniumpersulfat-Lsg.	10 % in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> (w/v) die Lösung ist bei 4°C 8 Tage haltbar	
Kammerpuffer	25 mM Tris/HCl 250 mM Glycin 0.1 % SDS	pH 8.3
2×SDS-Auftragepuffer (2-fach)	100 mM Tris/HCl 4 % SDS 0.2 % Bromphenolblau 20 % Glycerin unmittelbar vor Gebrauch Dithioerithritol (DTE) zusetzen	pH 6.8

Acrylamidmix	Rotiphorese 30 <sup>®</sup> (wäßrige 30%ige Acrylamidstammlösung mit 0.8 % Bisacrylamid)
Gel-Färbelösung	500 mg Coomassie Brilliant Blue G 180 ml MeOH/H <sub>2</sub> O (1:1) 20 ml Eisessig die Lösung wird vor Gebrauch filtriert
Gel-Entfärbelösung	180 ml MeOH/H <sub>2</sub> O (1:1) 20 ml Eisessig

#### 4.1.6.5 Proteintransfer (*Western Blot*), Detektion mit Antikörpern

Transferpuffer (Tourbin)	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % Methanol (p.a.) Aqua bidest. ad 1000 ml	pH 8.3
Ponceau S-Färbelösung	1 g Ponceau S 3% TCA Aqua bidest. ad 500 ml	
TBS-T	10 mM Tris 137 mM NaCl 0.1 % Tween 20 pH-Wert mit konz. HCl einstellen	pH 7.6

#### 4.1.6.6 NBT-Reduktionstest

NBT-Lösung I	5 % Nitroblautetrazolium in Methanol p.a.
NBT-Lösung II	4 % NBT-Lösung I in PBS

PMA-Lösung  
50  $\mu$ M PMA  
in DMSO

#### 4.1.6.7 Plasmidisolierung

Bakterienkulturmedium  
(autoklaviert) LB-Medium (Luria-Bertani):  
10 g Bacto-Trypton (Pepton), pH 7.0  
5 g Bacto-Hefeextrakt  
10 g NaCl  
ad 1 l H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>, wird am gleichen Tag  
autoklaviert; dem abgekühlten Medium zusetzen:  
100  $\mu$ g/ml Ampicillin

Ampicillin-Stammlösung 100 mg/ml Na-Ampicillin in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>  
sterilfiltrieren, Lagerung: -20°C, lichtgeschützt

#### DNA-Isolierung - Alkalilyse

Resuspensionspuffer (P1) 25 mM Tris/HCl pH 8.0  
(autoklaviert)  
10 mM EDTA  
100  $\mu$ g/ml RNase A- erst kurz vor Anwendung  
zusetzen

Lysepuffer (P2) 0.2 N NaOH  
1 % SDS (w/v)  
immer frisch mit 10 N NaOH herstellen

Neutralisationspuffer (P3) 3 M Kaliumacetat  
mit Eisessig wird pH 5.5 eingestellt

#### DNA-Isolierung - Reinigung über QIAGEN Tip-Säulen

QBT-Äquilibrierungspuffer 750 mM NaCl pH 7.0  
(sterilfiltriert) 50 mM MOPS  
15 % Isopropylalkohol

QC-Waschpuffer (sterilfiltriert)	0.15 % Triton <sup>®</sup> X-100 1 M NaCl 50 mM MOPS 15 % Isopropylalkohol	pH 7.0
QF-Elutionspuffer (sterilfiltriert)	1.25 M NaCl 50 mM Tris/HCl 15 % Isopropylalkohol	pH 8.5
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl 1 mM EDTA	pH 8.0

#### 4.1.6.8 pSV2-*gpt*-Plasmid-Modifizierung

I <sub>1/2</sub> -Puffer	5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM NaCl	pH 7.4
PP10-Puffer	10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM NaCl	pH 7.4
BE <sub>1</sub> (15) (autoklav.)	100 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 1 (15) mM Na <sub>2</sub> EDTA	pH 7.5
Fällungslösung	125 mM Natriumacetat in EtOH <sub>abs.</sub>	

#### 4.1.6.9 Enzyminkubation des pSV2-*gpt*-Plasmids

BE <sub>1</sub> /BSA (autoklaviert)	100 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 1 (15) mM Na <sub>2</sub> EDTA 0.1 g/l BSA	pH 7.5
--	--	--------

TC-Puffer (mit BSA)	50 mM Tris/HCl 25 mM CaCl <sub>2</sub> 0.5 g/l BSA	pH 8.0
------------------------	--	--------

Auftragepuffer (Stoppuffer)	40 mM Tris/HCl 5 mM Natriumacetat 20 mM EDTA 0.05 % Bromphenolblau 70 % Glycerin 4 % SDS	pH 7.8
--------------------------------	---	--------

#### 4.1.6.10 Agarosegelelektrophorese von PM2-DNA, Plasmid-DNA und RNA-Präparationen

PM2-Puffer	40 mM Tris/HCl 5 mM Natriumacetat 1 mM EDTA der pH-Wert wird mit 2 N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> eingestellt	pH 7.8
------------	--	--------

Ethidiumbromid-Stammlösung	1.0 mg/ml H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	
----------------------------	---	--

#### 4.1.6.11 pSV2-gpt-Plasmidtransformation

LB-Platten	LB-Medium 15 g/l Bacto-Agar am selben Tag autoklavieren Platten bei 50°C gießen; ca. 20 ml/Platte	
------------	--	--

M9 <sub>Amp.</sub> -Platten	Minimum Salz-Medium (zur Bestimmung der Transformationsrate) 15 g/l Bacto-Agar 0.1 mM CaCl <sub>2</sub> autoklavieren, dann bei 50°C zugeben: 50 ml M9-Salze (20-fach)	
-----------------------------	--	--



	2 ml MgSO <sub>4</sub> (1.00 M, autoklaviert)
	15 ml Bacto-Trypton (100 g/l, autoklaviert)
	4 ml Thiamin (10.0 mg/ml, sterilfiltriert)
	10 ml Glucose (20 % (w/v), autoklaviert)
	1 ml Ampicillin (100 mg/ml, sterilfiltriert)
M9-Salze (20-fach)	170 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 60 g/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 10 g/l NaCl 20 g/l NH <sub>4</sub> Cl
M9 <sub>Amp./6TG</sub> -Mutantenplatten	M9-Plattenmedium 20 µg/ml 6-Thioguanin 100 µg/ml Ampicillin
Topagar (autoklaviert)	14 g/l Bacto-Agar 5 g/l NaCl

#### 4.1.6.12 RNA-Isolierung

Puffer RLT, Puffer RW1, Puffer RPE und RNase-freies Wasser aus RNeasy Mini Kit.

#### 4.1.6.13 RT-PCR

10-fach DNase-I-Reaktionspuffer (DNA-Verdau)	200 mM Tris/HCl 20 mM MgCl <sub>2</sub> 500 mM KCl	pH 8.4
EDTA-Lösung	25 mM EDTA	pH 8.0
10-fach PCR-Puffer	200 mM Tris/HCl 500 mM KCl	pH 8.4
MgCl <sub>2</sub> -Lösung	25 mM MgCl <sub>2</sub>	

DTT-Lösung	0.1 M D/L-Dithiothreitol
Nucleotid-Mix	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP

#### 4.1.6.14 Medien und Lösungen für den AS52/*gpt*-Mutationstest

<b>Routinemedium</b>	Ham's F12 5 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg/ml)
----------------------	---

<b>MPA (<i>Cleansing Medium</i>)</b>	500 ml Ham's F12 5 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. 6.58 ml Adenin-Stammlösung 2.50 ml Thymidin-Stammlösung 1.50 ml Aminopterin-Stammlösung 0.50 ml MPA-Stammlösung 25.00 ml Xanthin-Stammlösung
--------------------------------------	---

Alle Zusätze (außer FCS) zugeben, Xanthin zuletzt zugeben  
pH-Wert auf 7.2 einstellen  
sterilfiltrieren, anschließend FCS zugeben

<b>Recovery-Medium</b>	500 ml Ham's F12 5 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. 1.65 ml Adenin-Stammlösung 0.63 ml Thymidin-Stammlösung 6.25 ml Xanthin-Stammlösung
------------------------	--

Alle Zusätze (außer FCS) zugeben, Xanthin zuletzt zugeben, pH-Wert auf 7.2 einstellen,  
sterilfiltrieren und abschließend FCS zugeben.

---

6-Thioguaninlösung	5.00 mg 6-Thioguanin 1 mg Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 10 ml Aqua bidest.	
Adenin-Stammlösung	187 mg Adenin 100 ml 1N HCl	pH 7.5
Aminopterin-Stammlösung	25.0 mg Aminopterin 56.8 ml Aqua bidest.	pH 7.2
MPA-Stammlösung	25.0 mg MPA 2.5 ml 1N NaOH	
Thymidin-Stammlösung	121.2 mg Thymidin 50 ml Aqua bidest.	
Xanthin-Stammlösung	2.50 g Xanthin 50 ml 1N NaOH 450 ml Aqua bidest.	
Giensa-Lösung	10 % (V/V) Giensa in Aqua bidest. durch Faltenfilter filtrieren Lagerung: lichtgeschützt	

#### **4.1.6.15 DNA-Isolierung**

Puffer AL, Puffer AW und Puffer AE aus QIAamp Blood Kit.

#### **4.1.6.16 PCR und Aufreinigung der PCR-Produkte**

Taq PCR Master Mix Kit

Puffer PB, Puffer PE und Puffer EB aus QIAquick PCR Purification Kit.

**4.1.6.17 Puffer zur Bestimmung von Mikrokernen**

PBSCMF (autoklav.)	pH 7.4	137 mM NaCl 2.70 mM KCl 8.30 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1.50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Bisbenzimid-Stammlösung (Hoechst No. 33258)		0.15 mM in H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> die Lösung wird aliquotiert bei -20°C gelagert
Färbelösung		99.5 ml PBSCMF 5.0 ml Bisbenzimid-Stammlösung

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Alkalische Elution

#### 4.2.1.1 Prinzip

Die Alkalische Elution ist eine hochempfindliche *In-vitro*-Methode zur Quantifizierung intrazellulärer DNA-Schäden. Das von **Kohn et al. (1976)** eingeführte Verfahren ermöglicht es Einzelstrangbrüche, DNA-DNA- und DNA-Protein-Quervernetzungen nachzuweisen. Bei einer modifizierten Methode der Alkalischen Elution kann man durch eine ergänzende Inkubation mit Reparaturenzymen neben DNA-Einzelstrangbrüchen auch DNA-Basenmodifikationen nachweisen und quantifizieren. Dazu inkubiert man die isolierte DNA vor der Elution mit spezifischen Reparaturenukleasen, die entsprechende Basenmodifikationen erkennen und die DNA dort einschneiden. Dieser Einschnitt wird als Einzelstrangbruch detektiert, so daß ursprüngliche Basenmodifikationen nun sichtbar werden.

Mit der Alkalischen Elution ist man in der Lage, DNA-Schäden bis zu einer Nachweisgrenze von etwa 0.5 Läsionen pro  $10^7$  Basenpaaren zu erkennen. Damit ist die Alkalische Elutionstechnik etwa 200 mal empfindlicher der Relaxations-Assay mit PM2-DNA oder pSV2-*gpt* Plasmid (vgl. Kapitel 4.2.7). Auch die Detektion durch HPLC/ECD ist weitaus unempfindlicher (**Pflaum et al., 1997**). Mit Hilfe des Relaxations-Assays und durch HPLC/ECD-Analyse lassen sich Schäden bis zu einer Nachweisgrenze von einem Einzelstrangbruch pro  $10^5$  Basenpaaren bestimmen.

Bei der Durchführung der Alkalischen Elution werden die zu untersuchenden Zellen zunächst in Suspension auf einen Polycarbonatfilter aufgetragen und durch Spülen mit einem Detergenz (Lysepuffer) lysiert. Hierbei werden alle Zellbestandteile, der Hauptteil des zellulären Proteins und die RNA vom Filter gewaschen. Die DNA bleibt in Doppelstrangform auf dem Filter zurück. Nach dem Waschen der DNA - zur Beseitigung vom eingesetzten Lysepuffer - kann eine Inkubation mit Reparaturenukleasen erfolgen. Danach wird die DNA mit Proteinase K behandelt, um die DNA von gebundenem Protein zu befreien. Anschließend überführt man die in doppelsträngiger Form vorliegende DNA in ihre Einzelstränge. Dies geschieht durch Zugabe eines alkalischen Puffers (Elutionspuffer pH 12.1), wobei die DNA durch Verlust ihrer Wasserstoffbrückenbindungen in ihre komplementären Einzelstränge dissoziiert.

Dabei liegt stärker geschädigte DNA in kürzeren DNA-Bruchstücken und weniger stark geschädigte DNA in längeren Einzelsträngen vor. In Abhängigkeit von ihrer Länge passieren diese einzelsträngigen Bruchstücke die Poren des Filters. Kurze Bruchstücke werden dabei schneller durch den Filter gespült als lange DNA-Stränge. Ungeschädigte DNA bleibt auf dem

Filter zurück. Durch langsames Pumpen des Elutionspuffers durch die Filter und fraktioniertes Sammeln des Eluates erhält man die DNA in Fraktionen unterschiedlicher Länge (Abb. 4.1).

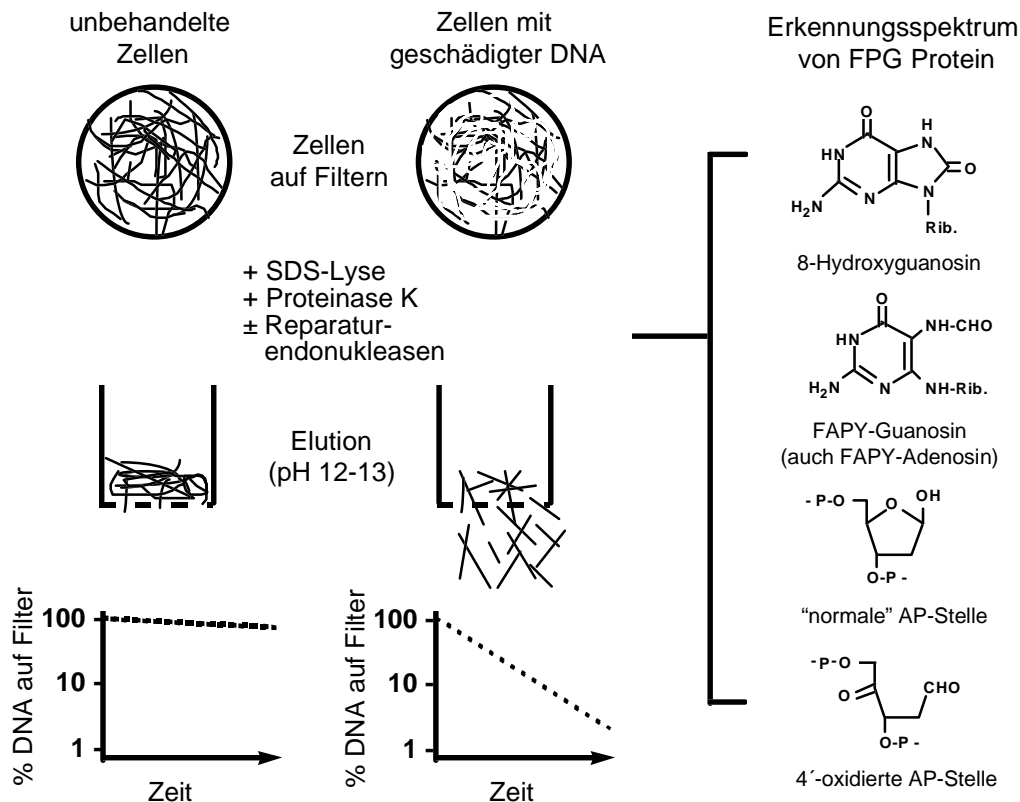


Abb. 4.1 Prinzip der Alkalischen Elution.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration der einzelnen Fraktionen bzw. auf dem Filter erfolgt nach Neutralisation mit Phosphatpuffer (PP I pH 6.0) durch Fluoreszenzmessung der mit Bisbenzimid in Phosphatpuffer (PP II pH 7.2) angefärbten DNA. Daraus errechnet sich die Elutionsrate der DNA, die direkt proportional zum Gehalt an Einzelstrangbrüchen und alkalilabilen Läsionen ist. Zur Kalibrierung der Methode wird eine Schädigung mit  $\gamma$ -Strahlung als Standard gewählt: 6 Gy  $\gamma$ -Strahlung erzeugen eine Läsion pro  $10^6$  Basenpaaren (Kohn et al., 1976).

#### 4.2.1.2 Versuchsaufbau

Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von  $2 \mu\text{m}$  und einem Durchmesser von 25 mm liegen luftblasenfrei auf einem Frittenboden in einer Filterhalterung. Auf diesem Filtersystem ist ein 25 ml fassendes Vorratsgefäß angebracht. Die Ausgänge der Filterhalterungen sind durch Dialyseschläuche mit dem Fraktionssammler verbunden. Um die jeweilige Durchflußrate der

verschiedenen Puffer während des Versuchs zu gewährleisten, ist zwischen Fraktionssammler und Filterhalterung eine peristaltische Mehrkanalpumpe zwischengeschaltet (Abb. 4.2). Über den Vorratsbehälter werden die Zellsuspension, die Puffer und Enzymlösungen auf das Filter aufgebracht, wobei darauf zu achten ist, daß zu keiner Luft durch das Filtersystem eingesaugt wird. Ein temperierbares Wasserbad, in das das Filtersystem eintaucht, dient zur Gewährleistung der zum jeweiligen Abschnitt des Versuchs benötigten Temperatur.

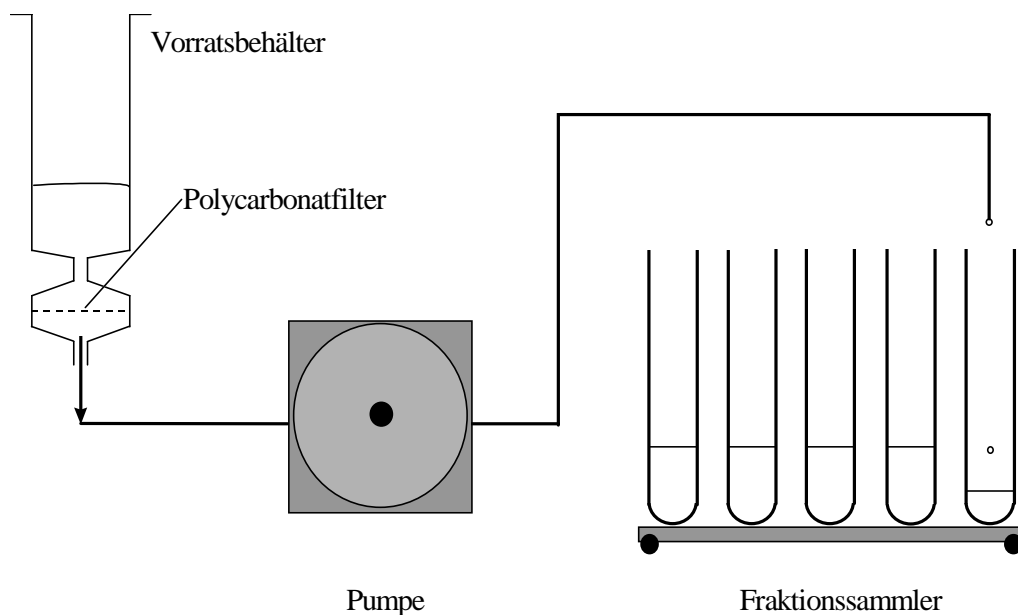


Abb. 4.2 Schematischer Aufbau der Alkalischen Elution.

### 4.2.1.3 Vorbereitung und Schädigung der Zellen

#### 4.2.1.3.1 Vorbereitung

Zur Bestimmung der DNA-Schäden verwendet man in der Regel Zellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden. Zellen, die adhärent wachsen werden erst kurz vor dem Auftragen auf das Filter bzw. nach der Schädigung in Suspension gebracht. Vor der Schädigung wird das Nährmedium von der Zellkultur abgenommen und die Zellen zweimal mit je 10 ml PBSCMF gewaschen. Suspensionszellen zentrifugiert man aus dem Kulturmedium ab (10 min, 1000 U/min, 4°C) und resuspendiert in PBSCMF. Diesen Schritt wiederholt man zweimal. Um eine Reparatur der durch eine Schädigung induzierten DNA-Einzelstrangbrüche und Endonuklease-sensitiven Läsionen zu verhindern, wird die Schädigung des Zellmaterials bei 0°C durchgeführt bzw. wird das Zellmaterial sofort nach der Schädigung bis zum Auftragen auf das Filter bei 0°C aufbewahrt.

#### 4.2.1.3.2 Schädigung mit Ro 19-8022 und sichtbarem Licht

Zur Schädigung versetzt man die am Boden der Zellkulturflasche festwachsenden Zellen mit 10 ml PBSCMF. Suspensionszellen werden in PBSCMF mit einer Zellkonzentration von  $10^6$  Zellen/ml vorgelegt. Nun inkubiert man mit Ro 19-8022 unter Belichtung für 10 min bei  $0^\circ\text{C}$  mit einer 1000 W Halogenlampe aus einer Distanz von 38 cm (entsprechend  $166\text{ kJ/m}^2$  im Bereich 400-800 nm). Anschließend wird die schädigende Lösung unverzüglich komplett abgezogen und man wäscht zweimal mit je 10 ml kaltem PBSCMF ( $4^\circ\text{C}$ ). Danach werden festwachsende Zellen durch Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Die abgelösten Zellen werden in einem geeigneten Volumen kaltem Vollmedium ( $4^\circ\text{C}$ ) aufgenommen und resuspendiert. Suspensionszellen werden direkt nach der Schädigung von der Reaktionslösung abzentrifugiert und zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen. Nach Bestimmung der Zelldichte am Coulter-Counter wird das  $1 \times 10^6$  Zellen entsprechende Volumen Zellsuspension auf die vorbereiteten Filter aufgetragen.

#### 4.2.1.3.3 Schädigung mit Kaliumbromat

Zur Schädigung versetzt man die am Boden der Zellkulturflasche festwachsenden Zellen mit 10 ml  $37^\circ\text{C}$  warmem PBSCMF, in dem kurz vorher eine entsprechende Menge Kaliumbromat (5 - 40 mM) gelöst wurde. Daran schließt sich unmittelbar eine Inkubation für 5 bzw. 15 min bei  $37^\circ\text{C}$  an. Im Anschluß verfährt man ebenso wie bei der Schädigung mit Ro 19-8022 und sichtbarem Licht beschrieben.

#### 4.2.1.3.4 Gewinnung von primären Mäusehepatocyten

Zur Gewinnung frischer Hepatocyten wurden Zellpräparationen aus den einzelnen Tieren vor dem Auftragen auf die Alkalische Elution von der **Arbeitsgruppe J. Hengstler (Institut für Toxikologie, Mainz)** vorgenommen. Die Präparation erfolgte an narkotisierten Tieren mittels Leberperfusion mit EGTA-haltigem Puffer (10 min) und Kollagenase-Lösung (ca. 30 min). Bei allen Präparationen betrug der Anteil an lebenden Zellen mindestens 60 % nach Trypanblau-Ausschluß.



#### 4.2.1.3.5 Bestimmung der Steady-State-Level

Die Bestimmung von DNA-Modifikationen in ungeschädigten Säugerzellen erfolgt direkt nach zweimaligem Waschen der adhärenen Zellkultur mit PBSCMF, anschließendem Trypsinieren und Resuspendieren in Kulturmedium. Suspensionszellen werden durch zweimaliges Zentrifugieren und Resuspendieren in PBSCMF gewaschen. Danach werden die Zellen in Kulturmedium auf die Filter der Alkalischen Elution aufgetragen.

#### 4.2.1.3.6 Bestimmung der Reparaturgeschwindigkeit in Säugerzellen

Die Zellen werden nach Schädigung und Waschsritten (wie oben beschrieben) nicht trypsiniert, sondern noch im adhärenen Zustand wieder in Vollmedium inkubiert. Die Inkubation erfolgt für die entsprechende Reparaturzeit ( $\frac{1}{4}$  - 16 h), im Brutschrank (5 % CO<sub>2</sub>, 37°C). Die Kontrollzellen („0 h-Wert“), die den induzierten Schaden nicht durch ihre Reparaturmechanismen verringern sollen, werden währenddessen im Eisbad bei 0°C aufbewahrt. Nach dem Erreichen der jeweiligen Reparaturzeit werden alle Zellkulturen sukzessive aus dem Brutschrank in ein Eisbad überführt und dort bis zur Aufarbeitung (wie oben beschrieben) aufbewahrt.

#### 4.2.1.4 Zellyse, Enzyminkubation und alkalische Elution der DNA

Die Filterhalter mit den Polycarbonatfilterblättchen werden mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> blasenfrei gefüllt und zweimal mit je 2.5 ml PBSCMF gewaschen. Vor dem Auftragen der Zellsuspension kühlt man die Filtersysteme mit einem temperierbaren Wasserbad auf 4°C. Nun trägt man die Zellproben ( $1 \times 10^6$  Zellen) über den Vorratsbehälter auf die Filter auf und spült sie anschließend vorsichtig mit maximaler Pumpleistung (80 ml/h) zweimal mit je 2.5 ml eiskaltem PBSCMF auf die Filtermembran. Zur Zellyse werden über den Vorratsbehälter 2 ml Lysepuffer aufgebracht und bei 15 - 16°C mit 80 ml/h durch den Filter gespült. Weitere 5 ml Lysepuffer werden daraufhin bei 20°C mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 5 ml/h hindurchgepumpt. Hierauf werden die verbliebenen Reste des Lysepuffers bei maximaler Pumpleistung entfernt, indem man fünfmal mit je 5 ml

BE<sub>1</sub>-Puffer wäscht. Für die nun folgende Enzyminkubation erwärmt man das Wasserbad auf 37°C und trägt entweder 2 ml reinen BE<sub>1</sub>-Puffer, für die direkten Strangbrüche, oder 2 ml Enzymlösung auf. Die FPG-Enzymlösung enthält 1.0 µg FPG-Protein und 0.5 mg BSA pro ml BE<sub>1</sub>-Puffer.

1 ml der Enzymlösung (in BE<sub>1</sub>-Puffer) wird mit 80 ml/h durch das Filter gespült, die andere Hälfte wird 1 h lang mit 1 ml/h durch das Filtersystem gepumpt. Im Anschluß an die Enzyminkubation wird das Wasserbad auf 25°C abgekühlt und die auf dem Filter liegende DNA zweimal mit je 5 ml BE<sub>1</sub>-Puffer gewaschen (80 ml/h). Für die folgende Proteinhydrolyse wird in einem weiteren Lyseschritt 3.5 ml Lysepuffer/Proteinase K aufgetragen und 2 ml bei 80 ml/h und 1.5 ml bei 3 ml/h durch das Filtersystem gepumpt. Anschließend wird nochmals fünfmal mit je 5 ml BE<sub>1</sub>-Puffer und einmal mit 4.5 ml Waschpuffer gespült und schließlich 25 ml Elutionspuffer aufgebracht. Zur Elution der DNA wird über eine Zeitspanne von 10 h mit einer Durchlaufgeschwindigkeit von 2.15 ml/h der Elutionspuffer bei 25°C durch die Filter gepumpt. Alle zwei Stunden wechselt dabei der Fraktionssammler die Auffanggläser. Nach 10 h wird die Elution abgebrochen, das verbleibende Volumen Elutionspuffer abgepumpt und die entnommenen Polycarbonatfilter aus den Filterhaltern in diesem Volumen Elutionspuffer für 2 h bei 60°C im Wasserbad geschüttelt, um so die auf dem Filter zurückgebliebene DNA-Menge in Lösung zu bringen und später bestimmen zu können (Filterwert).

#### **4.2.1.5 Auswertung der Alkalischen Elution, Quantifizierung der DNA-Menge**

Zu den einzelnen Fraktionen (Volumen: 4.3 ml) bzw. dem Filterwert gibt man ein gleiches Volumen an Phosphatpuffer I und neutralisiert so den Elutionspuffer beim Durchmischen der beiden Puffer. Daher bilden sich wieder DNA-Doppelstränge aus. Nach 15 min werden jeweils 4.3 ml Phosphatpuffer II mit Bisbenzimid zugegeben und nach Durchmischen dunkel für weitere 15 min aufbewahrt. Daraufhin wird die Emissionsintensität des Bisbenzimid-DNA-Komplexes in den einzelnen Proben bei 450 nm nach Anregung bei 360 nm im Fluoreszenzphotometer bestimmt.

Die Summe der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Fraktionen und des Filterwerts einer Probe ist linear zur Gesamtmenge der DNA dieser Probe. Daraufhin errechnet man den prozentualen Anteil der jeweiligen DNA-Menge, der zu den entsprechenden Zeiten noch auf dem Filter vorlag. Wenn man nun den DNA-Gehalt auf dem Filter einer Probe logarithmisch gegen die Zeit aufträgt, resultiert eine Gerade, deren Steigung direkt proportional zur Anzahl der Einzelstrangbrüche ist, wobei eine vollkommen zufällige Verteilung der Modifikationen in der DNA vorausgesetzt wird. Die absolute Zahl an Einzelstrangbrüchen in Modifikationen

pro  $10^6$  Basenpaaren kann mit dem Faktor  $F = -2.24$  direkt aus der Geradensteigung errechnet werden. Dieser Faktor wurde von M. Pflaum mittels einer Kalibrierung durch  $\gamma$ -Strahlung bestimmt (Epe et al., 1993c; Pflaum, 1996).

#### 4.2.1.6 Alkalische Schnellelution zur Detektion von höheren DNA-Schäden

Mit der oben beschriebenen Elutionstechnik lassen sich Schäden bis zu etwa einem Strangbruch pro  $10^7$  bp nachweisen. Zur Bestimmung höherer Schäden läßt sich die oben beschriebene Technik einfach abwandeln, indem man den letzten Arbeitsschritt, die eigentliche Elution, bei einer Pumpgeschwindigkeit von 30.7 ml/h durchführt. Damit wird die Empfindlichkeit der Methode herabgesetzt und die Gesamtelutionszeit verringert sich somit von 10 h auf 45 min. Das Fraktionsvolumen und die Anzahl der Fraktionen bleiben gleich, d.h., alle 9 min werden die Fraktionen gewechselt.

Zur Auswertung der Schnellelution wird die Methode wiederum durch die Induktion eines Referenzschadens mit Hilfe von  $\gamma$ -Strahlung kalibriert (Kohn et al., 1976; Epe et al. 1993c).

Nach den von D. Ballmaier (Ballmaier, 1997) durchgeführten  $\gamma$ -Bestrahlungsexperimenten ergibt sich für die Umrechnung der Geradensteigungen aus der Alkalischen Schnellelution in die Anzahl von Einzelstrangbrüchen pro  $10^6$  Basenpaaren ein Faktor  $F = -8.7$ .

## 4.2.2 Zellkultur

### 4.2.2.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Alle Zellkulturarbeiten werden unter sterilen Bedingungen innerhalb einer Laminar-Flow-Sterilwerkbank durchgeführt. Alle hier beschriebenen Zelllinien werden bei  $37^\circ\text{C}$ , 5 % Kohlendioxid-Atmosphäre und 99 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Abhängig von der Verdopplungszeit - spätestens jedoch nach 4 Tagen - werden die Zellen passagiert bzw. erfolgt ein Mediumwechsel. Das Passagieren bei festwachsenden Zellen (adhärente Zellen) erfolgt, indem man zunächst das verbrauchte Medium absaugt, anschließend mit PBSCMF wäscht und schließlich mit Trypsin/EDTA-Lösung bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Einwirkzeit der Trypsinlösung hängt von der jeweiligen Zelllinie ab. Sie liegt zwischen einer und fünf Minuten. Nach dem Ablösen werden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert. Suspensionszellen werden durch Zentrifugation bei maximal 1000 U/min (150 g) und  $4^\circ\text{C}$  vom verbrauchten Medium abgetrennt und anschließend in frischem Kulturmedium resuspendiert. Wenn notwendig wird eine Zellzahlbestimmung durchgeführt, indem man

beispielsweise 200 µl der Zellsuspension 1:50 mit Isoton II (physiologische Kochsalzlösung) verdünnt und mit Hilfe eines Coulter Counter™ Zellzählgerätes die Zellkonzentration bestimmt. Zur Passagierung wird die Zellsuspension meist 1:10 bis 1:20 mit frischem vorgewärmtem (37°C) Kulturmedium verdünnt. In allen Versuchen mit Säugerzellen werden, wenn nicht anders angegeben, Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase bzw. aus vorkonfluenten Stadien ihres Wachstums verwendet.

#### **4.2.2.2 Kryokonservierung von Säugerzellen**

Zur Konservierung der Zelllinien über einen langen Zeitraum werden die Zellen nach dem Ablösen in frischem Medium aufgenommen und bei maximal 1000 U/min (150 g) und 4°C zentrifugiert. Die so entstandenen Zellpellets werden nach Abziehen des Überstandes in eisgekühltem (0-4°C) Einfriermedium (Kulturmedium mit 10 % DMSO) resuspendiert ( $10^6$ - $10^7$  Zellen/ml). Anschließend werden Aliquots von ca. 1.5 ml in Kryoröhrchen zunächst 2 h bei -20°C gelagert, dann über Nacht bei -70°C aufbewahrt und am nächsten Morgen in flüssigem Stickstoff deponiert. Die Lagerzeit bei -70°C beträgt 3 bis maximal 6 Monate. In flüssigem Stickstoff können die Zellen bis zu mehreren Jahren gelagert werden.

Die Reaktivierung der Zellen geschieht durch schnelles Auftauen der Zellproben und direktes Überführen in 10 ml vorgewärmtes (37°C) Kulturmedium. Zur Entfernung der cytotoxischen Menge DMSO wird zentrifugiert und wieder in Kulturmedium aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 24 h im CO<sub>2</sub>-Inkubator wird das Medium nochmals gewechselt. Untersuchungen an reaktivierten Zellen werden erst nach mindestens 2 Passagen vorgenommen, um schädigende Einflüsse der Kryokonservierung möglichst ausschließen zu können.

#### **4.2.2.3 Zelllinien**

##### **AA8**

Adhärent wachsende Wildtyp-Ovarienzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen). Die Trypsininkubation bei 37°C für maximal für eine Minute. Die Zellverdopplungszeit beträgt etwa 15 h.

**AA8-ogg1-1, AA8-ogg1-9, AA8-ogg1-16, AA8-ogg1-19, AA8-ogg1-22**

Die Klone 1, 9, 16, 19 und 22 die aus der Transfektion von AA8-Zellen mit dem Plasmid pPR65 hervorgingen (s. Kapitel 4.2.9). Diese Zelllinien exprimieren in unterschiedlichem Ausmaße konstitutiv das *hOGGI*-Gen über und weisen eine Neomycin-Resistenz auf.

### **AS52**

Adhärenz wachsende Ovarienzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) (**Hsie et al., 1975; Tindall et al., 1984, 1989**). Die Zelllinie stammt von der CHO-K1-BH4-Zelllinie ab, in der die einzige Kopie des hemizygoten Säugergens *HPRT* (auf dem X-Chromosom) mutiert wurde. Durch Transformation mit dem pSV2-*gpt* Vektor wurde eine Kopie des analogen bakteriellen *gpt*-Gens (*Ecogpt*), welches für die Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (XPRT bzw. XGPRT) kodiert, eingeführt (**Mulligan & Berg, 1980**).

Trypsininkubation bei 37°C für maximal eine Minute. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 18 h.

### **AS52-ogg1-1, AS52-ogg1-2, AS52-ogg1-3**

Die Klone 2 und 3, die aus der Transfektion von AS52-Zellen mit dem Plasmid pPR65 hervorgingen (s. Kapitel 4.2.9). Die Klone AS52-ogg1-2 und AS52-ogg1-3 exprimieren in unterschiedlichem Ausmaße konstitutiv das *hOGGI*-Gen über und weisen eine Neomycin-Resistenz auf. Der Klon AS52-ogg1-1 besitzt zwar eine Neomycin-Resistenz, hat aber kein intaktes *hOGGI*-Gen. Mit der RT-PCR (s. Kapitel 4.2.10.1) konnte bei diesem Klon die *hOGGI*-Sequenz nicht nachgewiesen werden.

### **AS52-vector-only**

Der Klon 1, der aus der Transfektion von AS52-Zellen mit dem Plasmid pcDNA3.1(-) hervorging (s. Kapitel 4.2.9). Neomycinresistente Kontroll-Zelllinie.

### **BEAS-2B**

Adhärenz wachsende humane Bronchialepithelzellen. Trypsininkubation bei 37°C für etwa zwei Minuten. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 18 h.

### **EM9 bzw. AA8-1**

Adhärenz wachsende *XRCCI*-defiziente (EM9) Ovarienzellen des Chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) (**Thompson et al., 1980**). Die AA8-1-Zellen stellen den entsprechenden Wildtyp dar. Die Trypsinbehandlung und die Verdopplungszeit entspricht derjenigen der AA8-Zellen.

**F11.1 bzw. 1.2**

Adhärenz wachsende, immortalisierte Fibroblasten-Zelllinien von *mOGGI(+/-)*-Wildtyp-Mäusen (F11.1) bzw. *mOGGI(-/-)*-*knock-out*-Mäusen (1.2). Trypsininkubation bei 37°C für drei bis vier Minuten. Die F11.1-Zellen lassen sich nach dem Ablösen erst durch mehrmaliges Auf- und Absaugen mit einer Pipette wieder vereinzeln. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 18 h.

**HL60**

In Suspension wachsende menschliche promyeloische Leukämie- Zelllinie.

**Bronchialtumor-Zelllinien**

Die untersuchten Bronchialtumor-Zelllinien wurden vom HTG-Chirurgie-Labor (Prof. Oelert / Dr. Moersig) des Universitätsklinikums Mainz folgendermaßen charakterisiert:

Alle Linien wurden von Primärtumoren ausgehend etabliert. LC-MZ-5, LC-MZ-6s, LC-MZ-9s, LC-MZ-13s und NCI-H82 wachsen in Zellaggregaten in Suspensionskultur. Die übrigen Zelllinien bilden einen adhärenz Zellrasen.

	Zelllinie	Zellteilungs- geschwindigkeit	Bildung von foci im Softagar
<b>1. NSCLC (non small cell lung cancer)</b>			
1.1 Adenokarzinom:	LC-MZ-8	mittel	positiv
	LC-MZ-9a	sehr schnell	positiv
	LC-MZ-9s	sehr schnell	Suspensionszellen
	LC-MZ-13a	schnell	positiv
	LC-MZ-13s	schnell	Suspensionszellen
1.2 Plattenepithelkarzinom	LC-MZ-6a	schnell	positiv
	LC-MZ-6s	schnell	Suspensionszellen
	LC-MZ-7	sehr langsam	positiv
	LC-MZ-11	sehr schnell	positiv
1.3 Großzeller	LC-MZ-1	mittel	positiv
	LC-MZ-2	schnell	negativ
	LC-MZ-4	mittel	positiv
1.4 solides Bronchialkarzinom	LC-MZ-10	schnell	positiv
<b>2. SCLC (small cell lung cancer)</b>			
	LC-MZ-5	sehr schnell	Suspensionszellen
	NCI-H82 (aus USA)	sehr schnell	Suspensionszellen

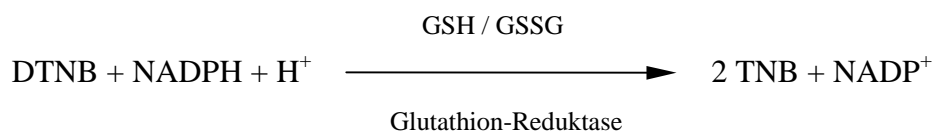
**RAW264.7 bzw. Rbcl2-14**

RAW264.7 und Rbcl2-14 sind adhären wachsende Mausmakrophagen-Zellen. Die RAW264.7-Zellen stellen den Wildtyp dar und die Rbcl2-14-Zellen exprimieren konstitutiv das menschliche *BCL-2*-Gen über. Die Transfektanten besitzen eine Resistenz gegenüber Neomycin. Trypsininkubation bei 37°C für etwa zwei Minuten. Die Verdopplungszeit beträgt bei beiden Zelllinien etwa 12 h.

### 4.2.3 Enzymatische GSH-Bestimmung

#### 4.2.3.1 Prinzip

Zur Bestimmung des zellulären Gesamtglutathion-Spiegel ( $[GSH] + 2 \times [GSSG]$ ) wird die Methode von **Griffith (1985)** herangezogen. Diese enzymatische Bestimmungsmethode beruht auf folgendem Prinzip. Zunächst reagiert reduziertes Glutathion (GSH) mit DTNB (5,5'-Dithio-(2-nitrobenzoesäure); *Ellman's* Reagens) nicht enzymatisch zu oxidiertem Glutathion und TNB (5-Thio-(2-nitrobenzoesäure)). Des weiteren wird GSSG durch die Glutathion-Reduktase unter Verbrauch von NADPH enzymatisch wieder zu GSH reduziert, welches wieder mit DTNB reagieren kann. Daraus ergibt sich folgende Reaktionsgleichung:



Hierbei sind die Konzentrationen von DTNB, NADPH und der Glutathion-Reduktase so gewählt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit dieser Gesamtreaktion linear proportional zur Konzentration des Gesamtglutathions ist. Man verfolgt dabei die Bildung von TNB spektrophotometrisch. Die Methode wird mittels GSH-Standards kalibriert.

#### 4.2.3.2 Durchführung

Zur Probenvorbereitung werden Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Adhären wachsende Zellen werden hierzu nach Waschen und Ablösen in kaltem PBSCMF (4°C) aufgenommen und zentrifugiert (150 g, 8 min, 4°C). In Suspension wachsende Zellen werden direkt aus ihrem Kulturmedium abzentrifugiert (150 g, 8 min, 4°C) und zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen. Anschließend werden die so gewonnen Zellpellets in TCA-Puffer mit einer Zelldichte von  $10^7$  Zellen/ml aufgenommen und mittels eines Ultraschall-

Homogenisators lysiert (35 W, 3×20 Impulse, 20 kHz). Anschließend werden die festen Zellbestandteile abzentrifugiert (2°C, 10 min, 12000 U/min). Aliquots von 10 - 40 µl des Überstands werden sofort vermessen. Zu diesem Probenvolumen werden auf Raumtemperatur temperierte 700 µl NADPH-Puffer, 100 µl DTNB-Farbstofflösung und H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> in dieser Reihenfolge bis zu einem Gesamtvolumen von 1.0 ml zugegeben. Nach Zugabe von 5 µl Glutathion-Reduktaselösung wird mit Hilfe einer 1000 µl Eppendorf-Pipette kräftig gemischt und unmittelbar danach die Änderung der Absorption bei 412 nm ( $A_{412}$ ) gegen Luft in Abhängigkeit von der Zeit ( $\Delta A/\Delta t$ , t in min) gemessen. Der Gehalt an Gesamtglutathion ([GSH] + 2×[GSSG]) wird mit Hilfe einer Kalibriergeraden bestimmt. Zur Erstellung der Kalibriergeraden vermischt man 5 -30 µl einer 100 µM frisch angesetzten GSH-Standardlösung (entsprechend 0.5 -3 nmol GSH).

#### 4.2.4 Nachweis des Bcl-2-Proteins

Um die konstitutive Überexpression des menschlichen *BCL-2* in der Transfektanten-Zelllinie Rbcl2-14 gegenüber den Kontroll-Mausmakrophagen RAW264.7 zu demonstrieren, werden Zell-Präparate beider Linien zunächst einer Proteinauftrennung und schließlich einem hochspezifischen *Western Blot* auf humanes Bcl-2-Protein unterzogen. Das Bcl-2-Protein besitzt ein Molekulargewicht von 25 kDa.

##### 4.2.4.1 Präparation der Zellysate

Hierzu werden 48 h vor der geplanten Zellaufarbeitung jeweils  $1.5 \times 10^6$  Zellen der RAW264.7- und Rbcl2-14-Zellen in Gewebekultur-Schalen (Durchmesser 10 cm) ausgesät. Die Zellyse erfolgt dann nach Abziehen des Kulturmediums und Waschen mit PBSCMF direkt mit je 500 µl Lysepuffer in den Gewebekultur-Schalen. Der Lysepuffer enthält verschiedene Protease-Inhibitoren, um einen vorzeitigen Proteinabbau in den Lysaten zu verhindern. Anschließend werden die Lysate durch Zentrifugieren (2°C, 10 min, 12000 U/min) von den festen Zellbestandteile befreit. Je ein Aliquot des unverdünnten Überstandes der beiden Zellysate sowie eine 50-, 20- und 10-prozentige Verdünnung mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> des Rbcl2-14-Präparates werden durch Zugabe des gleichen Volumens 2×SDS-Auftragepuffer gemischt und durch Erhitzen für 5 min auf 95°C denaturiert. Eine Lösung mit Markerproteinen (Sigma SDS-7 Dalton Mark VII-L<sup>®</sup>) wird ebenso mit 2×SDS-Auftragepuffer



gemischt und auf die gleiche Weise behandelt. Die Proben sind nun bereit zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

#### **4.2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

##### **4.2.4.2.1 Prinzip**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient zur Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit ihrer Größe. Im allgemeinen wird zur Dissoziation der Proteine vor dem Auftragen auf das Gel das starke anionische Detergenz SDS in Verbindung mit einem Reduktionsmittel und hoher Temperatur verwendet. Die denaturierten Proteine binden das SDS und erhalten dadurch eine negative Ladung. Da die Menge an gebundenem SDS proportional zum Molekulargewicht des Proteins und unabhängig von seiner Aminosäuresequenz ist, wandern die SDS-Protein-Komplexe abhängig von der Größe des Proteins durch das Gel. Durch Verwendung von Marker-Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht ist deshalb eine Abschätzung der Molekülgröße der zu untersuchenden Proben möglich.

##### **4.2.4.2.2 Durchführung**

Zur Herstellung des Trenngels werden die folgenden Lösungen in der angegebenen Reihenfolge zueinander gegeben und sorgfältig gemischt. 1.75 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>, 3.75 ml Acrylamidmix 30 % (Rotiporese<sup>®</sup> Gel 30), 1.875 ml Tris (1.5 M, pH 8.8), 75.0 µl SDS (10 %), 3.0 µl TEMED und 75.0 µl Ammoniumpersulfat (10 %). Für die Trennung von Proteinen mit 12 bis 43 kDa ist der Trennbereich eines 15-prozentigen Polyacrylamidgels linear. Die Lösung wird zwischen zwei Glasplatten bis ca. 1 cm unter die Zähne des Gelkammes in die Gelapparatur gegossen. Die Lösung wird vorsichtig mit Isobutanol überschichtet. Nach der Polymerisation des Gels (30-45 min) wird der flüssige Überstand vorsichtig entfernt und das Auftragegel darübergeschichtet. Dazu werden der Reihe nach 1.7 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>, 425 µl Acrylamidmix 30 % (Rotiporese<sup>®</sup> Gel 30), 315 µl Tris (1.00 M, pH 6.8), 25.0 µl SDS (10 %), 2.5 µl TEMED und 25.0 µl Ammoniumpersulfat (10 %) zusammenpipettiert und nach jeder Zugabe gründlich gemischt. Die Lösung wird direkt auf

die Oberfläche des Trenngels gegossen und der Gelkamm daraufhin sofort in die Flüssigkeit eingeführt. Nach der Polymerisation des Auftragegels wird der Kamm vorsichtig herausgezogen. Die Gelkammern werden nun mit Kammerpuffer gefüllt und die Geltaschen mittels einer Pipette mit dem darüberstehenden Kammerpuffer gespült, um unpolymerisiertes Acrylamid zu entfernen. Jetzt werden die einzelnen Geltaschen mit einem maximalen Gesamtvolumen von 28  $\mu\text{l}$  der zu analysierenden Proben, hier die Präparationen aus 4.2.4.1 und dem gleich behandelten Längenstandard vorsichtig beschickt. Nicht benötigte Geltaschen werden mit dem gleichen Volumen SDS-Auftragepuffer gefüllt. Die Apparatur wird mit dem Netzteil verbunden und eine Spannung von 200 V angelegt (entsprechen ca. 50 mA). Nach etwa 60 min, wenn die Farbstofffront das Ende des Separationsgels erreicht hat, ist die Trennung beendet. Das Gel kann jetzt für 4 h mit Coomassie-Blue-Färbelösung auf einem Schüttelpult gefärbt werden, wenn kein *Western Blot* (s. Kapitel 4.2.4.3.2) durchgeführt werden soll. Zur Entfärbung des Gels wird die Färbelösung abgegossen und durch frische Entfärbelösung ersetzt. Für die Entfärbung des Gels auf einem Schüttelinkubator bedarf es 24 bis 48 h, dabei muß die Entfärbelösung mehrmals ausgetauscht werden. Wenn das Gel diskrete Proteinbanden und einen klaren Hintergrund zeigt, wird das Gel zur Auswertung auf einem Leuchttisch mit einer Kombination aus einer digitalen CCD-Kamera, einem Computer (Macintosh) und eines Bildanalyseprogramms (MolecularAnalyst<sup>®</sup>) aufgenommen und gespeichert (Abb. 4.3).

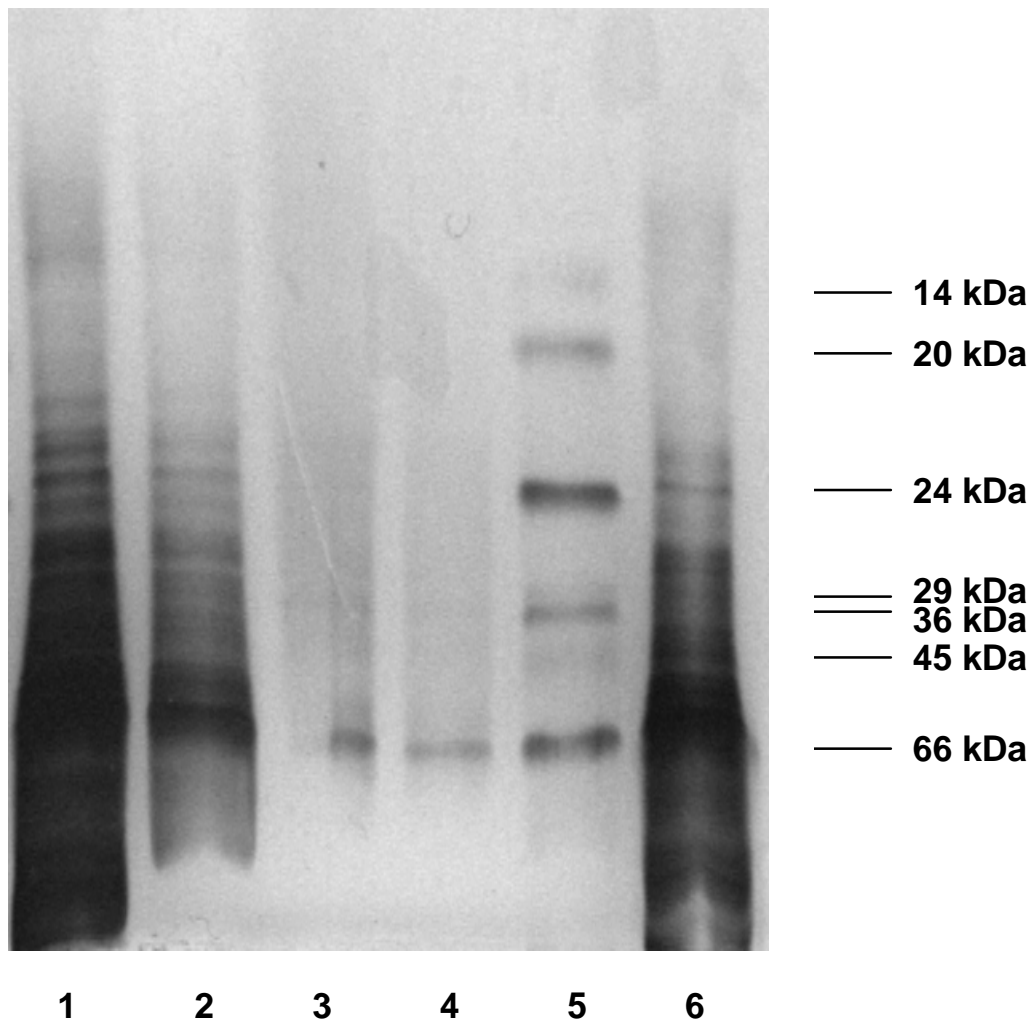


Abb. 4.3 SDS-Polyacrylamid-Gel der Zellysate aus RAW264.7- und Rbcl2-14-Zellen. Visualisierung durch Coomassie-Blue-Anfärbung (**Spur 1:** Zellysat Rbcl2-14 (1:1 Verdünnung), **Spur 2:** Zellysat Rbcl2-14 (1:2 Verdünnung), **Spur 3:** Zellysat Rbcl2-14 (1:5 Verdünnung), **Spur 4:** Zellysat Rbcl2-14 (1:10 Verdünnung), **Spur 5:** Protein-Längenstandard Sigma SDS-7 Dalton Mark VII-L Zellysat, **Spur 6:** RAW264.7 (1:1 Verdünnung).

#### 4.2.4.3 Proteintransfer (*Western Blot*), Detektion mit Antikörpern

##### 4.2.4.3.1 Prinzip

Bei dieser Methode werden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf einen geeigneten Trägerfilter übertragen. Das ursprüngliche Trennmuster der verschiedenen Proteinmoleküle bleibt dabei erhalten. Unter geeigneten Bedingungen bleiben sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine erhalten. Somit ist beispielsweise ein immunologischer Nachweis spezifischer Proteine mittels Antikörpern nach dem Transfer möglich.

#### 4.2.4.3.2 Durchführung

Zunächst wird ein auf die genaue Größe des Trenngels zugeschnittene Cellulosenitrat-Membran durch Einweichen in Transferpuffer (Tourbin-Puffer) für mindestens 15 min äquilibriert. Dabei sind verbleibende Luftblasen auf der Membran durch zu abruptes Einbringen in den Transferpuffer unbedingt zu vermeiden. Selbstverständlicherweise werden auch bei allen folgenden Arbeitsschritten Handschuhe getragen, um Verunreinigungen des Gels und der Membranen zu vermeiden. Das Sammelgel (s. Kapitel 4.2.4.2.2) wird nun ebenfalls nach Entnahme aus der Elektrophoresekammer für etwa 3 min in Transferpuffer inkubiert. Des weiteren werden vier auf die Gelgröße zugeschnittene Lagen Blottingpapier ausreichend lange in Transferpuffer getränkt. Nun stapelt man vorsichtig unter Vermeidung von Luftblasen der Reihe nach zwei Lagen des getränkten Blottingpapiers, die äquilibrierte Membran, das befeuchtete Sammelgel und schließlich nochmals zwei Lagen getränktes Blottingpapier auf die Anode des Transfergerätes. Jetzt wird das Gerät durch vorsichtiges Auflegen der Kathode und Gerätedeckel verschlossen. Es ergibt sich daher folgende Anordnung:

----- **Kathode (-)**  
----- **2x Blottingpapier** -----  
----- **Gel** -----  
----- **Membran** -----  
----- **2x Blottingpapier** -----  
----- **Anode (+)**

Der Transfer erfolgt nun unter Anlegen einer Spannung von 15 V für 15 min. Danach wird die Blotmembran wieder entnommen. Das Sammelgel kann nun zur unspezifischen Anfärbung aller Proteine mit Coomassie-Blue-Färbelösung behandelt werden (s. Kapitel 4.2.4.2.2).

Der Transfer der Proteine auf die Cellulosenitrat-Membran wird überprüft, indem die Membran für maximal 60 sec mit Ponceau S-Färbelösung reversibel angefärbt, dokumentiert und anschließend mit TBS-T wieder komplett vom Farbstoff befreit wird.

Nach gelungenem Transfer wird die Membran 1 h lang auf dem Schüttler in 5 % Trockenmilchpulver-haltigem TBS-T inkubiert, um später unspezifische Bindungen des Antikörpers an die Proteinmoleküle auszuschließen (abzublöcken). Danach wird die Membran einmal für 15 min und zwei weitere Male für 5 min in TBS-T gewaschen. Nun wird die Membran mit dem spezifischem Maus-Antikörper für das menschliche Bcl-2-Protein in einer Konzentration von 2 µg/ml in 5 % Trockenmilchpulver-haltigem TBS-T für 1 h auf dem

Schüttler inkubiert. Im Anschluß werden die drei Waschschriffe wiederholt, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, und die Membran wird ein zweites Mal - jetzt mit Phosphatase-gelabelten Anti-Maus-Antikörpern in 1:5000-facher Verdünnung - in 5 % Trockenmilchpulver-haltigem TBS-T für 1 h auf dem Schüttler inkubiert.

Nach Durchführung der drei Waschschriffe können jetzt diejenigen Proteinbanden detektiert werden, an die zunächst der spezifische Bcl-2-Antikörper gebunden hat. Diese gebundenen Antikörper wiederum werden schließlich durch den mit Phosphatase-konjugierten Sekundäntikörper in einer Enzymreaktion sichtbar gemacht.

Dazu wird die Membran für 5 bis 10 min in einer Lösung von 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> und einer SIGMA FAST™ BCIP/NBT-Tablette inkubiert. Nach ausreichend starker Farbentwicklung (blau-violett) wird die Membran mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> abgespült und schließlich dokumentiert (Abb. 5.1).

#### 4.2.5 Differenzierung und Stimulation der HL60-Zellen

Die Differenzierung der HL60-Zellen in Richtung Granulocyten erfolgt durch eine Inkubation mit DMSO (Collins et al., 1979). Dazu werden Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase in einer Konzentration von  $1.5 \times 10^6$  Zellen pro ml Kulturmedium mit 1.3 % DMSO-haltigem Kulturmedium für 5 bis 7 Tage inkubiert. Nach drei Tagen erfolgt dabei ein Austausch des DMSO-haltigen Kulturmediums. Der Verlauf der Differenzierung zu DMSO-HL60-Zellen (granulocytenartigen Zellen) wird mit Hilfe des NBT-Reduktionstests verfolgt (Harttig, 1991). Zur Kontrolle wird auch mit unbehandelten HL60-Zellen der NBT-Reduktionstest durchgeführt.

Dazu mischt man 200 µl Zellsuspension mit 200 µl NBT-Lösung II. Danach gibt man 4 µl PMA-Lösung zu, mischt und inkubiert für 20 min bei 37°C. Die Inkubation wird durch Einbringen in ein Eisbad abgestoppt und die Zellsuspension wird bei 1000 U/min (150 g) und 4°C zentrifugiert. Das so gewonnene Zellpellet wird in 5 µl PBS resuspendiert und unverzüglich am Mikroskop bei 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Es werden 500 Zellen gezählt, wobei Zellen mit blau-schwarzem Formazan-Niederschlag als NBT-positiv gewertet werden.

Zur Stimulation des *Respiratory Burst* werden DMSO-HL60-Zellen (nach 7 Tagen in 1.3 % DMSO-haltigem Kulturmedium) mit dem Tumorpromoter PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) behandelt (Floyd et al., 1986). Dazu werden die DMSO-HL60-Zellen bei 1000 U/min (150 g) und 4°C abzentrifugiert und zweimal mit 10 ml HBSS gewaschen und in HBSS in

einer Konzentration von  $2.5 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Nun erfolgt die Zugabe der PMA-Lösung, so daß eine PMA-Endkonzentration von 100 bzw. 500 nM resultiert. Es schließt sich nun unmittelbar eine Inkubation für 1 h bei 37°C an. Danach werden die Zellen bis zum Aufgeben auf die Alkalische-Elutions-Apparatur auf Eis aufbewahrt.

#### **4.2.6 Plasmidisolierung (pSV2-*gpt*, pPR 63, pPR 65)**

##### **4.2.6.1 Bakterienkultivierung**

Da das pSV2-*gpt*-Plasmid als Abkömmling des pBR322-Plasmids nur in einer geringen Kopienzahl pro Bakterium vorliegt wird die Isolierung nach dem Protokoll für „low copy“-Plasmide durchgeführt. Zur Anzucht der Bakterien werden 2.5 l LB-Medium (Mega-Präparation) mit 100 µg/ml Ampicillin in einem Schikanekolben mit *E. coli* "sure strain" beimpft und über Nacht (ca. 14 h) bei 37°C und 200 U/min im Schüttelinkubator kultiviert. Wenn die Zelldichte in der Bakteriensuspension eine optische Dicht von 1 bei 600 nm (entsprechend  $10^9$  Bakterien/ml) erreicht hat (Messung im Photometer als Absorption gegen LB-Medium) werden die Zellen 15 min bei 6000 g und 4°C zentrifugiert. Das Medium wird vom Zellpellet abdekantiert und verworfen. Mit 50 ml eiskaltem Resuspensionspuffer werden die Zellen wieder komplett resuspendiert.

Die Plasmide pcDNA3.1(-) und pPR65 werden in einer Maxi-Präparation gewonnen. Dazu werden jeweils 400 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin in einem Schikanekolben mit dem entsprechenden *E. coli* DH5α beimpft und wie oben beschrieben über Nacht zur richtigen Zelldichte kultiviert. Die durch Zentrifugieren gewonnenen Zellpellets werden nach Dekantieren des Mediums in jeweils 10 ml eiskaltem Resuspensionspuffer aufgenommen.

##### **4.2.6.2 Plasmidisolierung und Reinigung**

Zu den in Resuspensionspuffer suspendierten Bakterien wird für die Zellyse ein gleiches Volumen Lysepuffer zugegeben und durch fünfmaliges Drehen der Zentrifugenröhrchen auf den Kopf innerhalb von 5 min bei Raumtemperatur gut gemischt. Hierbei muß beachtet

werden, daß man das Lysat nur vorsichtig schwenkt und nicht vortext. Zu dieser schlierigen Mischung gibt man wiederum ein dem Resuspensionspuffer entsprechendes Volumen Neutralisationspuffer, dreht und kippt die Lösung 5-6 Mal zur Mischung und inkubiert für 30 min auf Eis. Zur Trennung der Plasmide von chromosomaler DNA und den festen Zellbestandteilen wird jetzt für 30 min bei 13000 U/min (SS-34 Rotor: 20000 g) zentrifugiert. Der Überstand wird dann zur vollständigen Abtrennung von resuspendierten Partikeln ein zweites Mal für 15 min unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Danach wird der gesamte Überstand über eine mit QBT-Puffer äquilibrierte QIAGEN-tip-2500 (Mega-Präparation) bzw. QIAGEN-tip-500 (Maxi-Präparation) Säule gegeben. Bei diesem Reinigungsschritt wird die Plasmid-DNA bei einer niedrigen NaCl-Konzentration am Säulenmaterial adsorbiert. Anschließend wäscht man mit 2×100 ml bzw. 2×30 ml QC-Puffer. Die gewaschene Plasmid-DNA auf dem Säulenmaterial wird nun mit 35 ml bzw. 15 ml QF-Puffer eluiert. Aus dem Eluat fällt man die DNA mit Isopropanol (0.7 Volumenanteile) und zentrifugiert 30 min bei 4°C mit 15000 g. Der Überstand wird dekantiert und verworfen. Anschließend wird das DNA-Pellet mit 7 ml bzw. 5 ml 70-prozentigen Ethanol gewaschen, 10 min bei 4°C mit 15000 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig dekantiert, ohne das Pellet abzulösen. Das DNA-Pellet wird für etwa 10 min an der Luft getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen (400 µl bzw. 150 µl).

#### 4.2.6.3 Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA

Die DNA-Konzentration aus den Plasmidpräparationen aus 4.2.6.2 werden durch Messung der Absorption im Spektralphotometer bei 260 nm (Absorptionsmaximum von DNA und auch RNA) bestimmt. Hierzu gibt man beispielsweise 5 µl der zu vermessenden DNA-Lösung in 995 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> in eine Halbmikro-Quarzküvette und mißt die Absorption gegen H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>. Es gilt bei einer Schichtdicke von 1 cm:  $A_{260} = 1.0 \cong 50 \mu\text{g/ml}$ . Die Reinheit der DNA läßt sich durch den Quotienten der  $A_{260}/A_{280}$  abschätzen. Das Verhältnis gibt Aufschluß über den Anteil an verbliebenem Protein in der Präparation. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm. Ein Absorptionsverhältnis von 1.7-1.9 gilt als rein. Liegt es außerhalb, muß die Präparation nochmals gereinigt werden. Die DNA-Konzentration läßt sich auch über einen Fluoreszenz-Vergleich mit einer Probe bekannter DNA-Konzentration nach einer Agarosegelelektrophorese abschätzen.

## 4.2.7 Enzymatische Schadensanalyse am pSV2-*gpt* Plasmid (Relaxations-Assay)

### 4.2.7.1 Prinzip des DNA-Relaxations-Assay

Die Methode nutzt aus, daß ein superhelikales DNA-Molekül (hier: das pSV2-*gpt*-Plasmid, 5.2 kbp) durch Auftreten eines Einzelstrangbruchs im Molekül in eine weniger kompaktere, relaxierte Form überführt wird. In der Agarose-Gelelektrophorese können diese beiden Formen aufgrund ihres unterschiedlichen Laufverhaltens leicht aufgetrennt werden. Die Menge an relaxierter Form korreliert dabei mit dem Ausmaß einer DNA-Schädigung bzw. ist in ungeschädigter Plasmid-DNA relativ gering. Mit Hilfe von Reparaturoendonukleasen, wie dem FPG-Protein, lassen sich zusätzlich zu den bereits vorhandenen („direkten“) Einzelstrangbrüchen enzyspezifische DNA-Modifikationen (bei FPG-Protein z.B. 8-Hydroxyguanin und AP-Läsionen) in Einzelstrangbrüche überführen und so ebenfalls in diesem Assay sichtbar machen (**Epe et al., 1988; Epe et al., 1993a-c**). Dies geschieht durch Inkubation der geschädigten Plasmid-DNA vor der Gelelektrophorese mit der entsprechenden Reparaturoendonuklease (Abb. 4.4, Tab. 2.2).



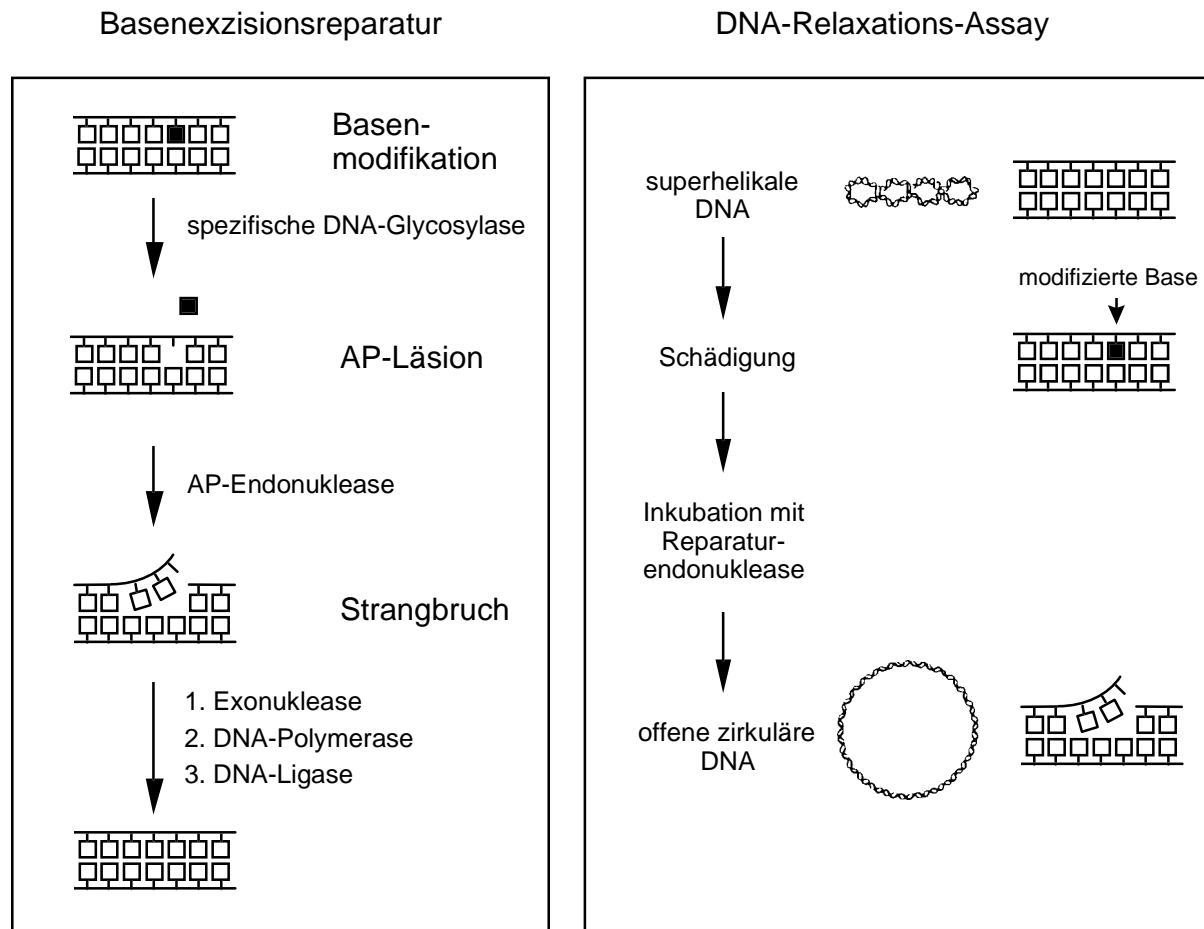


Abb. 4.4 Prinzip des DNA-Relaxations-Assays.

#### 4.2.7.2 Schädigung der DNA

Die Schädigung des pSV2-*gpt* Plasmids erfolgt in  $I_{1/2}$ -Puffer mit einer DNA-Endkonzentration von  $50.0 \mu\text{g/ml}$ . Dazu inkubiert man die DNA 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  in Gegenwart von SIN-1 (Endkonzentration:  $5\text{-}500 \mu\text{M}$ ). Nach Beendigung der Inkubation gibt man zur Fällung der DNA das 2.5-fache Volumen Fällungslösung zur Reaktionsmischung und lagert die Proben für 30 min bei  $-20^\circ\text{C}$ . Danach wird 10 min bei  $12000 \text{ U/min}$  zentrifugiert und die überstehende Lösung vorsichtig abpipettiert. Nach Waschen mit 70-prozentigem Ethanol wird nochmals abzentrifugiert und der überstehende EtOH entfernt. Nach einer Trockenzeit von 10 min wird die DNA zur Schadensbestimmung in  $\text{BE}_1$ -Puffer entsprechend dem Reaktionsvolumen ( $0.2 \mu\text{g}/20 \mu\text{l}$ ) aufgenommen.

### 4.2.7.3 Enzyminkubation

Das in BE<sub>1</sub>-Puffer aufgenommene pSV2-*gpt* Plasmid (0.2 µg/20µl) wird mit 10.0 µl Enzymlösung versetzt, durchmischt und 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Hierzu wird FPG-Protein in BE<sub>1</sub>/BSA-Puffer in einer Endkonzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Zur Bestimmung der Einzelstrangbrüche wird BE<sub>1</sub>/BSA-Puffer ohne Enzym zugesetzt. Danach beendet man die Enzyminkubation durch Zugabe von 10 µl SDS-haltigem Auftragepuffer.

### 4.2.7.4 Schadensdetektion und Auswertung

Zur Auftrennung von superhelikaler, linearer und relaxierter Form der Plasmid-DNA wird eine Horizontalgelelektrophorese in 1-prozentiger Agarose (**Sambrook et al., 1989**) durchgeführt. Die Elektrophorese erfolgt bei 80 V und 200 mA für etwa 90 min.

Im Anschluß wird das Gel für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttelpult oder alternativ über Nacht bei 4°C in einer Ethidiumbromid-Lösung (500 µg/l) gefärbt. Nach der Färbung können die DNA-Banden auf dem Gel bei UV-Licht (312 nm) detektiert werden. Dazu wird das Gel zunächst mit Hilfe einer digitalen CCD-Kamera aufgenommen und anschließend mit Hilfe eines Computers (Macintosh) und eines Bildanalyseprogrammes (MolecularAnalyst<sup>®</sup>) gespeichert (Abb. 4.5) und ausgewertet. Die einzelnen Fluoreszenzkurven werden mit Hilfe des Bildanalysenprogrammes integriert und die Banden jeder einzelnen Spur werden zueinander in Verhältnis gesetzt.

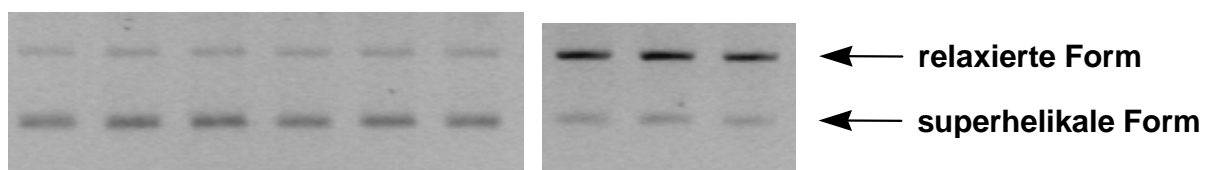


Abb. 4.5 Beispiel eines Agarosegels zur DNA-Schadensanalyse. Linker Teil: pSV2-*gpt*-Plasmid ungeschädigt (Bahn 1 - 3 ohne und Bahn 4 - 6 mit anschließender FPG-Enzyminkubation). Rechter Teil: pSV2-*gpt*-Plasmid geschädigt mit 40 µM SIN-1 und anschließender FPG-Enzyminkubation.

Die Anzahl der Strangbrüche („direkte“ oder durch Reparatarendonukleasen überführte) pro Plasmid-Molekül kann nun folgendermaßen errechnet werden. Wenn man erstens bei der Verteilung der Strangbrüche eine Poissonverteilung zugrundelegt, zweitens berücksichtigen will, daß ein zweiter Strangbruch in einem Molekül zu keiner weiteren Konformationsänderung führt, und drittens die abgeschwächte Fluoreszenz des

Ethidiumbromid-Komplexes mit der superhelikalen Form (aufgrund der geringeren Interkalation) korrigieren will, ergibt sich folgende Beziehung (Lloyd et al., 1978):

$$ssb_g = - \ln \frac{1.42 \times S}{1.42 \times S + R}$$

ssb <sub>g</sub>	Gesamtzahl der DNA-Einzelstrangbrüche pro DNA-Molekül
S	Fluoreszenzintensität der superhelikalen Form der DNA
R	Fluoreszenzintensität der relaxierten Form der DNA
1.42	Korrekturfaktor, der die geringere Interkalation des Ethidiumbromids in die superhelikale Form der DNA und daraus folgend eine schwächere Fluoreszenz der Bande berücksichtigt.

Die Anzahl der direkt erzeugten Einzelstrangbrüchen kann aus denjenigen Gelspuren errechnet werden, auf denen Proben aufgetragen wurden, die nicht mit Enzymen behandelt wurden. Um nun den Anteil der Strangbrüche, der erst durch die Inkubation mit der Reparaturenendonuklease erzeugt wurde, zu bestimmen, müssen die direkten Einzelstrangbrüche wie folgt erst von der Gesamtzahl der Einzelstrangbrüche subtrahiert werden.

$$ess = ssb_g - ssb_d$$

ess	Zahl der Endonuklease-sensitiven Modifikationen pro DNA-Molekül
ssb <sub>g</sub>	Gesamtzahl der Einzelstrangbrüche
ssb <sub>d</sub>	Zahl der direkten Einzelstrangbrüche

Des weiteren muß von jeder geschädigten Probe der „Blindwert“ (ungeschädigtes Plasmid) abgezogen werden, um den eigentlichen Nettowert der Einzelstrangbrüche zu erhalten, der nur durch das schädigende Agens hervorgerufen wurde. Der Schaden des „Blindwerts“ folgt aus der Tatsache, daß die Plasmid-DNA zum einen von Anfang an nur zu etwa 95 % in superhelikaler Form vorliegt und zum anderen durch die Enzyminkubation teilweise auch eine unspezifische Endonuklease-Aktivität auftritt.

## 4.2.8 pSV2-*gpt*-Plasmid-Transformation

### 4.2.8.1 Prinzip

Transformation bezeichnet allgemein die Aufnahme gereinigter DNA in Bakterien und höhere Zellen. Unter normalen Bedingungen ist dies ein äußerst seltenes Ereignis. Eine starke Erhöhung der Transformations-Effizienz wird durch eine physikalische Behandlung (z.B. Elektroporation) und/oder eine chemische Behandlung (z.B. CaCl<sub>2</sub>-Methode) erreicht. Bakterienzellen können mit einer CaCl<sub>2</sub>-Behandlung in ein Stadium der Kompetenz gebracht werden, d.h. sie sind bereit beispielsweise Plasmid-DNA aufzunehmen. Wenn man solche kompetenten Bakterien in einer geeigneten Prozedur mit isolierter Plasmid-DNA mischt, kann es also zur Aufnahme von Plasmiden in Bakterienzellen kommen. Entsprechend aufgebaute DNA wird dann in Bakterienzelle repliziert, transkribiert und schließlich in das Protein durch die Translation umgesetzt. Das Bakterium kann also die Fremd-DNA nutzen und erhält eventuell neue Fähigkeiten, auf die durch geeignete Zusätze im Kulturmedium selektiert werden kann.

Mit Hilfe des hier im Folgenden beschriebenen Systems bestehend aus dem *E. coli*-Stamm DT-2 und dem Plasmid pSV2-*gpt* lassen sich Ausmaß und Art an DNA-Schäden und daraus in Bakterien entstandene Mutationsraten korrelieren (**Ashman & Davidson, 1984; Richardson et al., 1987; Palombo & Dogliotti, 1989**). Das 5.2 kbp große Plasmid enthält zum einen eine Sequenz, die für eine  $\beta$ -Lactamase kodiert (*amp<sup>r</sup>*) und so ein Wachstum in ampicillinhaltigem Kulturmedium ermöglicht. Dies macht man sich bei der Bestimmung der Transformationsrate zu Nutze. Jede Kolonie auf einem ampicillinhaltigen Nährmedium steht für ein Bakterium, das ein Plasmid aufgenommen hat. Zum anderen beinhaltet das Plasmid die Erbinformation für das bakterielle *gpt*-Gen, welches für die bakterielle Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (XGPRT), einem Enzym des Reservestoffwechsels der Purinsynthese, kodiert. Das *gpt*-Genprodukt hat physiologischerweise die Funktion Hypoxanthin und Guanin mit 5-Phosphoribosyl-1-diphosphat unter Abspaltung von Diphosphat in Inosin- bzw. Guanosin-monophosphat umzusetzen. Ebenso kann es aber das Purinanalogon, 6-Thioguanin (6TG), zu 6-Thioguanosin-monophosphat verstoffwechseln, was letztendlich zu einer starken Behinderung der RNA-Synthese und damit der Protein-Biosynthese führt. Der hier verwendete *E. coli*-Stamm DT-2 besitzt kein intaktes *gpt*-Gen. Obwohl er *gpt*-defizient ist, ist dieser Stamm lebensfähig, weil er den Bedarf an Nukleotiden mit Hilfe eines alternativen Synthesestoffwechselweges, der *De-novo*-Synthese, deckt. Dieser Stamm kann demnach ohne Einschränkung auf 6-Thioguanin-haltigen Nährboden wachsen. Hat nun eine Bakterienzelle dieses Bakterienstamms ein pSV2-*gpt*-Plasmid aufgenommen und wird auf 6-Thioguanin-haltigen Nährboden kultiviert, führt dies durch die „Vergiftung“

mit 6-Thioguanin zu einem stark eingeschränkten Wachstum. Zur Bestimmung der Mutationsrate einer potentiell genotoxischen Verbindung wird nun das pSV2-*gpt*-Plasmid geschädigt und anschließend in Bakterien transformiert. Ist eine ausreichend große Zahl an DNA-Modifikationen in der DNA des Plasmids und damit auch in der *gpt*-codierenden Sequenz vorhanden, kann es dann im Bakterium bei der Replikation des Plasmids im Bakterium zu einer Fixierung des DNA-Schadens, einer Mutation, kommen. Wenn eine solche Mutation in der Sequenz des *gpt*-Gens zu einem Ausfall oder einem nicht funktionierenden Genprodukt führt, können Bakterien an ihrem Wachstum auf Ampicillin- und 6-Thioguanin-haltigem Nährboden erkannt werden. Mutanten in der *gpt*-Sequenz weisen wieder den Phänotyp *gpt*-defizienter Stämme auf. Aus der Kolonienzahl auf Ampicillin- und 6-Thioguanin-haltigem Nährboden läßt sich somit eine Mutationsrate bestimmen.

#### **4.2.8.2 Präparation von kompetenten Bakterien (*E. coli* DT-2)**

Zur Herstellung kompetenter Bakterien werden in einem 2l-Schikanekolben 600 ml LB-Medium (ohne Ampicillin) mit *E. coli* DT2 beimpft. Die Kultur wird bis zu einer optischen Dichte von  $OD_{600} = 0.5$  bis  $0.8$  bei  $37^{\circ}\text{C}$  und  $200$  U/min im Schüttelinkubator inkubiert. Im Anschluß werden die Bakterien, die sich jetzt in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, für  $30$  min auf Eis aufbewahrt und danach für  $10$  min bei  $4000$  U/min (GS-3 Rotor) und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wird das Bakterienpellet in  $240$  ml eiskalter, steriler  $0.1$  M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung resuspendiert und wieder für  $30$  min auf Eis aufbewahrt, wobei die Suspension während dieser Zeit dreimal gevortext wird. Die Bakterien werden danach wie vorher abzentrifugiert und in  $24$  ml eiskalter, steriler  $0.1$  M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung mit  $15\%$  Glycerol aufgenommen. Die Bakteriensuspension wird in Aliquots mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Vor der weiteren Verwendung wird der Titer (Überlebensrate) der Bakteriensuspension bestimmt, indem man Verdünnungen im Bereich von  $1 : 10^5$  bis  $1 : 10^7$  mit LB-Medium (ohne Ampicillin) ansetzt und davon jeweils  $100 \mu\text{l}$  auf LB-Medium-Platten ausstreicht.

#### **4.2.8.3 Herstellung von Nährmedien-Platten (Hart-Agar)**

Um dem Medium eine feste Konsistenz zu verleihen wird zusätzlich zu den Flüssigmedienkomponenten vor dem Autoklavieren 15 g/l Bacto-Agar (Bottom-Agar) zugesetzt. Nachdem das Medium auf 50°C abgekühlt ist, gibt man alle notwendigen übrigen Supplemente (s. Kapitel 4.1.6.11) hinzu und gießt die Platten (20 ml/Platte) sofort aus. Dies erfolgt entweder per Hand oder mit Hilfe einer Plattengießmaschine. Es werden Petrischalen mit 10 cm Durchmesser verwendet. Nachdem das Medium unterhalb von 30°C ausgehärtet ist, werden die Platten zur Vermeidung von Kondenswasserbildung umgedreht und können am nächsten Tag verwendet oder bei 4°C für einige Tage gelagert werden.

Für das beschriebene Testsystem werden drei verschiedene Plattenarten benötigt: LB-Medium für die Bakterientiterbestimmung, M9-minimal-salt-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (M9<sub>Amp.</sub>) zur Bestimmung der Transformationsrate und M9-minimal-salt-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 20.0 µg/ml (120 µM) 6-Thioguanin (M9<sub>Amp./6TG</sub>) zur Mutantenselektion.

#### **4.2.8.4 pSV2-gpt-Modifizierung**

Um in diesem System eine Mutation zu generieren, benötigt man erfahrungsgemäß eine 10- bis 50-fach höhere Schädigung als es zur Detektion von Modifikationen im Relaxations-Assay (s. Kapitel 4.2.7) notwendig ist. Dies leuchtet ein, da nur aus wenigen der induzierten DNA-Modifikationen eine Mutation resultiert. Die induzierten FPG-sensitiven Modifikationen sind bei höheren Schädigungen daher nicht mehr mit dem Relaxations-Assay meßbar.

#### **4.2.8.5 Transformation und Plattieren der Bakterien**

Zunächst taut man schonend innerhalb 1-2 h ein ausreichend großes Aliquot kompetenter Bakterienzellen bei 0°C auf. Danach werden am Boden eines 2 ml-Reaktionsgefäßes 50 µl Bakteriensuspension und 50 ng der jeweiligen Plasmidprobe (entsprechend 2 µl einer 25 ng/µl Plasmid-DNA enthaltenden Probe) zusammenpipettiert. Anschließend vortext man kurz und inkubiert alle Ansätze für 30 min auf Eis. Darauf werden die Ansätze für 90 sec bei exakt 42°C inkubiert und schließlich wieder für 5 min auf Eis aufbewahrt. Zu jedem Ansatz wird nun auf 37°C vortemperiertes LB-Medium zugegeben und für 30 min bei 200 U/min und 37°C zur Expression der Antibiotikaresistenz inkubiert. Aus jedem Ansatz werden nun 50 µl

für die Bestimmung der Transformationsrate in ein separates Reaktionsgefäß überführt. Die Gefäße mit den verbleibenden 500 µl dienen der Bestimmung der Mutationsrate. Zu den Ansätzen für die Bestimmung der Transformationsrate gibt man 1.5 ml einer 45°C warmen Mischung aus 2 Teilen LB-Medium und 1 Teil klargeschmolzenem Topagar, die 100 µg/ml Ampicillin enthält, durchmischt gut und verteilt die Mischung unmittelbar danach gleichmäßig unter raschem Schwenken auf M9<sub>Amp.</sub>-Platten. Analogerweise gibt man zu den Ansätzen für die Bestimmung der Mutationsrate 1.5 ml der gleichen Mischung, die aber neben 100 µg/ml Ampicillin zusätzlich noch 20 µg/ml 6-Thioguanin enthält, durchmischt gut und verteilt die Mischung ebenso auf M9<sub>Amp./6TG</sub>-Mutantenplatten. Nach dem Aushärten werden alle Platten mit dem Deckel nach unten für etwa 24 h bei 37 C im Brutschrank inkubiert.

#### 4.2.8.6 Auswertung

Zur Ermittlung der Transformationsrate und Mutationsrate wird in jedem Versuch jeweils eine Doppel- bzw. Vierfachbestimmung durchgeführt. Die Zahl der gebildeten Kolonien auf Transformanten- und Mutantenplatten wird durch Auszählen bestimmt und der jeweilige Mittelwert berechnet. Die Mutationsfrequenz der jeweiligen Ansätze ergibt sich aus dem Quotienten der entsprechenden Mutationsrate und der dazugehörigen Transformationsrate.

$$\text{Mutationsfrequenz} = \frac{\text{Mutanten} / \mu\text{g Plasmid}}{\text{Transformanten} / \mu\text{g Plasmid}}$$

#### 4.2.9 Transfektion der CHO-Zelllinien AA8 und AS52 mit *hOGG1*

##### 4.2.9.1 Prinzip

Ebenso wie in Bakterienzellen (s. Kapitel 4.2.8.1) ist es möglich, fremde DNA in eukaryontischen Zellen zur Expression zu bringen. Hierzu stehen mittlerweile eine Vielzahl physikalischer und chemischer Methoden zur Verfügung. Stellvertretend sei hier nur die apparativ sehr aufwendige Mikroinjektion in den Zellkern, die Calciumphosphatpräzipitations-Methode und die Transfektion mit Hilfe von Liposomen

erwähnt. Prinzipiell wird noch zwischen transienter (vorübergehender) und stabiler (dauerhafter) Transfektion unterschieden. Ob eine Zelle transient oder stabil transfiziert wird, hängt vom Untersuchungsziel des Experimentators ab. Bei der stabilen Transfektion wird die eingeschleuste DNA in das Genom integriert und folglich mit diesem dauerhaft transkribiert und repliziert. Die so entstandene neue Zelllinie unterscheidet sich nur durch die Anwesenheit des neuen DNA-Stücks von seinen Vorgängern. Zur Erzielung einer stabil transfizierten Zelllinie ist allerdings eine Selektion über etwa 14 Tage auf eine mit der Fremd-DNA erworbene Eigenschaft (z.B. Antibiotikaresistenz) notwendig. Bei der transienten Transfektion liegt die Fremd-DNA zwar im Zellkern der Wirtszelle vor, ist aber nicht in ihr Genom integriert. Vorübergehend kann das DNA-Stück jedoch für etwa 12-72 h in der Wirtszelle exprimiert werden. Beispielsweise bei Untersuchungen von regulatorischen Genelementen kann die transiente Transfektion die Methode der Wahl sein (**Koch-Brandt, 1993**).

In dieser Arbeit wurden die CHO-Zelllinien AA8 und AS52 stabil mit dem *hOGG1*-Gen transfiziert. Als Vektoren dienten die Plasmide pcDNA3.1(-) und pPR65 aus der Plasmidpräparation aus 4.2.6. Das Plasmid pPR65 besteht aus dem pcDNA3.1(-)-Invitrogen-Vektor und dem offenen Leseraster für das *hOGG1*-Gen unter der Kontrolle des Cytomegalovirus-Promoters. Das Plasmid pcDNA3.1(-) stellt den Leervektor (ohne das *hOGG1*-Gen) dar. Beide Plasmide tragen eine Neomycin-Resistenz, was eine Selektion der Transfektanten mit Geneticin ermöglicht. Zur Transfektion wird das FuGENE™6-Transfektionsreagens der Firma Boehringer Mannheim verwendet. Es besteht aus einer Mischung von Lipiden und anderen Verbindungen in 80-prozentigem Ethanol und stellt eine nicht-liposomale Formulierung dar. Zielsetzung der Transfektion ist die konstitutive Überexpression des *hOGG1*-Gens in den CHO-Zelllinien.

#### 4.2.9.2 Durchführung

Um die beiden CHO-Zelllinien AA8 und AS52 zu transfizieren, wird zunächst in Vorversuchen diejenige Geneticinsulfat (G418)-Konzentration durch Zugabe zum Kulturmedium bestimmt, die für beide Wildtyp-Zelllinien absolut toxisch ist.

Dann sät man zunächst  $3 \times 10^5$  regelmäßig passagierte und sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindende Zellen in eine 60 mm-Zellkulturgewebe-Schale mit 5 ml des entsprechenden Kulturmediums aus. 16-20 h später werden die Zellen transfiziert. Dazu mischt man jeweils 97  $\mu$ l Kulturmedium mit 3  $\mu$ l FuGENE™6 Transfektionsreagens und inkubiert für 5 min bei Raumtemperatur. Diese Mischung gibt man tropfenweise zu 1  $\mu$ l der



entsprechenden DNA-Lösungen (1 µg Plasmid-DNA pro 1 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>), durchmischt durch Antippen des Röhrchen und inkubiert für 15 min bei Raumtemperatur. Diese Gesamtmischung wird tropfenweise zu den jeweiligen mit Kulturmedium gefüllten Gewebekultur-Schalen gegeben, durch Schwenken der Schalen gemischt und dann für 24 h im Brutschrank inkubiert. Die Zellen werden dann abgelöst und in einer Verdünnung von 1:100 auf 100 mm-Schalen mit 10 ml Kulturmedium ausgesät. Nach weiteren 24 h beginnt die Selektion, indem das Kulturmedium durch frisches 800 µg/ml Geneticin enthaltendes Medium ersetzt wird. Während der folgenden 10 Tage wird das Kulturmedium (800 µg/ml Geneticin) alle 2-3 Tage ausgetauscht. Schließlich isoliert man einzelne Zellklone, indem man sie mit Hilfe von Klonierungsringen separat trypsiniert und zunächst in 24-Loch-Kulturgewebeschaln, danach in Zellkulturgewebeflaschen vermehrt.

#### **4.2.10 Analyse der Transfektanten auf *hOGGI*-Expression und Enzymaktivität des Genproduktes**

Die Verifizierung der Transfektion und Charakterisierung des Ausmaßes der Überexpression erfolgt mit unterschiedlichen Techniken auf RNA- und Proteinebene.

##### **4.2.10.1 RT-PCR**

Die Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine Methode, um die Expression des in die Zellen transfizierten Gens auf mRNA-Ebene zu überprüfen.

##### **4.2.10.1.1 Prinzip**

Voraussetzung der RT-PCR ist die Gewinnung der Gesamt-RNA des zu untersuchenden Systems. Eine erfolgreiche RT-PCR setzt eine RNA-Isolierung von hoher Qualität voraus. Eine Verunreinigung mit RNasen und bei der Isolierung eingesetzten Chemikalien muß ausgeschlossen werden können. In einer RNA-Gesamt-Präparation sind alle drei RNA-Arten, transfer-RNA (tRNA), ribosomale RNA (rRNA) und messenger-RNA (mRNA), enthalten, wobei die mRNA oder Boten-RNA nur einen Anteil von 1-2 % der gesamten RNA-Präparation ausmacht. Die mRNA gibt jedoch Aufschluß über diejenigen Gene, die im Genom des untersuchten Organismus zur Expression gelangen. Ein Besonderheit fast aller

mRNAs in tierischen und pflanzlichen Zellen ist, daß sie neben der für das jeweilige Gen codierenden Nukleinsäure-Sequenz noch eine Kette bestehend aus 150-250 Adenin-Nukleotiden am 3'-Ende („PolyA-Schwanz“) tragen. Dies ermöglicht eine Hybridisierung der unterschiedlichsten mRNA-Stücke mit Oligomeren, die aus 12-18 Desoxythymidinen (Oligo(dT)) bestehen. Unter Anwesenheit einer Mischung der vier verschiedenen Desoxyribonukleotiden und dem Enzym Reverse Transkriptase (RT) kommt es dann zur sogenannten Erst-Strangsynthese. Im Idealfall wird hier jede mRNA des untersuchten Organismus in die der mRNA komplementären DNA-Kopie (cDNA) übersetzt.

Mit der so erhaltenen cDNA kann nun in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) mit genspezifischen Oligonukleotidprimern (GSP) nach dem Zielgen gesucht werden. Mit der PCR lassen sich kleinste Mengen der Zielsequenz durch enzymatische Vermehrung eines Sequenzabschnitts zwischen zwei Oligonukleotidprimern nachweisen. Dazu gibt man die GSP im Überschuß unter Hybridisierungsbedingungen (etwa 70°C) zur DNA-Probe, damit sich die GSP an die komplementären Zielsequenzen anlagern können. Nun verknüpft eine DNA-Polymerase die im Ansatz vorhandenen Nukleotide mit den 3'-Enden der Primer und synthetisiert so komplementäre DNA-Stränge. Diese werden bei 94°C denaturiert, um einen erneuten Syntheszyklus durch Hybridisierung der GSP und den Oligonukleotiden einzuleiten. Solche Zyklen - Denaturierung, Hybridisierung, DNA-Synthese - werden 20-50 mal wiederholt, was in einer Kettenreaktion ausgehend von einer kleinen Anzahl der gesuchten DNA-Sequenz zu einer millionenfachen Amplifizierung des Zielgens führt. Dieses Produkt der PCR läßt sich dann leicht anhand eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels sichtbar machen. Die Länge des PCR-Produktes wird mit Hilfe von DNA-Längenstandards bestimmt.

#### **4.2.10.1.2 RNA-Präparation**

Zur Präparation der Gesamt-RNA werden jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen der Zelllinien AA8, AS52 und der entsprechenden Transfektanten nach dem Ablösen und Aufnehmen in Kulturmedium pelletiert. Im folgenden verfährt man nach dem leicht modifizierten Protokoll des Rneasy-Mini-Handbuch (2. Auflage, März 1997, Firma QIAGEN). Alle Arbeiten werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Während aller Arbeitsschritte werden zur Minimierung der Kontaminationsgefahr durch RNA-degradierende Enzyme Handschuhe getragen.

Das jeweilige Zellpellet wird in 600 µl RLT-Lysepuffer aufgenommen und mit einer Pipette so durchmischt, daß kein Klumpen mehr sichtbar sind. Das Lysat wird dann mittels einer QIAshredder-Säule homogenisiert und mit 600 µl 70% Ethanol mittels einer Pipette gemischt.

Das Probenvolumen wird in 2 gleichen Portionen auf eine Rneasy-mini-Spin-Säule gegeben und diese Säule dann jeweils für 15 sec bei 8000 g zentrifugiert. Dabei wird der Durchfluß jeweils ein zweites Mal auf die Säule gegeben bevor er verworfen wird. Nun wird 700 µl RW1-Waschpuffer auf die Säule gegeben, 5 min inkubiert und schließlich auch bei 8000 g für 15 sec zentrifugiert. Nachdem die Säule auf ein neues 2 ml-Auffanggefäß gesetzt wurde, wird jede Säule mit 500 µl RPE-Puffer durch Zentrifugieren unter den gleichen Bedingungen wie oben gewaschen. Der Durchfluß wird verworfen und der Waschschrift wird wiederholt, wobei man für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zur vollständigen Trocknung der Säule zentrifugiert. Zum Schluß wird die Säule in ein sauberes 1.5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt, und durch zweimaliges Eluieren mit 50 µl Rnase-freiem Wasser (jeweils 1 min bei 8000 g zentrifugieren) wird die RNA von der Säule gewaschen.

#### 4.2.10.1.3 Charakterisierung der RNA-Präparation

Die RNA-Präparation wird dann mit Hilfe eines analytischen Gels auf die Unversehrtheit und Reinheit der RNA untersucht. Dazu werden 2 µl jedes Ansatzes in einem 1-prozentigen Agarosegel, das 500 µg/l Ethidiumbromid enthält, aufgetrennt (EasyCast-Gelelektrophoresekammer) und unmittelbar im Anschluß die Banden auf dem Gel bei UV-Licht (312 nm) detektiert. Bei einer unversehrten und hochreinen RNA-Präparation sollten dabei zwei scharfe Banden ribosomaler RNA detektiert werden können, wobei das Verhältnis der 28S-Bande (4.7 kb) zur 18S-Bande (1.9 kb) etwa 2:1 beträgt (Abb. 4.6).

Des weiteren führt man eine UV-photometrische Bestimmung des Quotienten der Absorptionen bei 260 nm ( $A_{260}$ ) und 280 nm ( $A_{280}$ ) durch und berechnet mit Hilfe der  $A_{260}$  den ungefähren RNA-Gehalt (bei einer Schichtdicke von 1 cm gilt  $A_{260} = 1.0 \cong 40 \mu\text{g/ml}$ ) der Proben (analog 4.2.6.3).

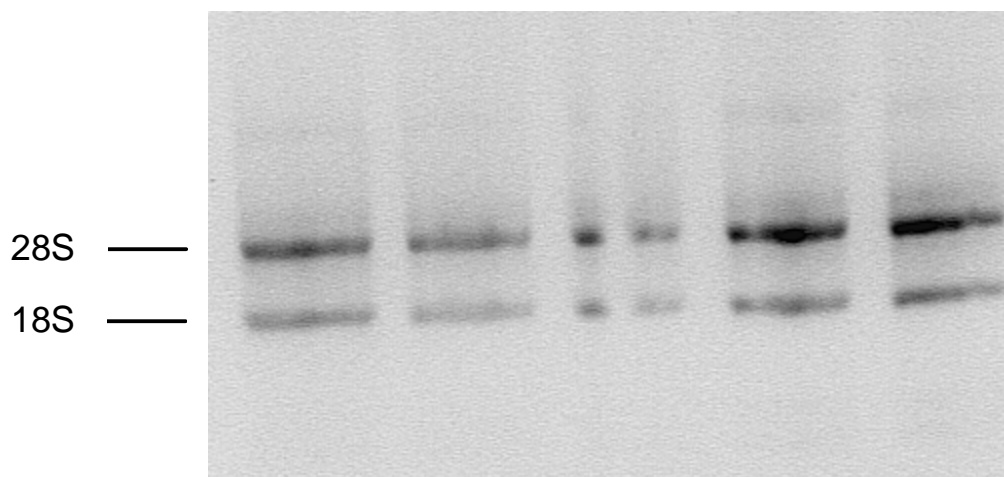


Abb. 4.6 Beispiel eines aufgenommenen Agarosegels von RNA-Präparationen aus den Zellen AS52, AS52-ogg1-1 AS52-ogg1-2 AS52-ogg1-3. und AS52-ogg1-4.

#### 4.2.10.1.4 DNA-Hydrolyse

Als nächstes werden die RNA-Proben bevor sie in der RT-PCR eingesetzt werden zur Entfernung von Spuren genomischer DNA einer enzymatischen Hydrolyse der DNA unterzogen.

Man gibt hierzu das Volumen der jeweiligen RNA-Präparationen, das 2 µg Gesamt-RNA entspricht, in ein dünnwandiges 0.5 ml Reaktionsgefäß. Dazu pipettiert man je 1 µl DNase I (1U/µl) und 10-fach DNase-I-Reaktionspuffer und ergänzt mit RNase-freiem Wasser auf 10 µl. Dieser Ansatz wird zunächst für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach gibt man 1 µl EDTA-Lösung zu und inkubiert im PCR-Gerät bei 65°C für 10 min, um die DNase wieder zu inaktivieren.

#### 4.2.10.1.5 Erststrangsynthese mit Hilfe der Reversen Transkriptase

Zur Erststrangsynthese werden die Ansätze zunächst mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 11.8 µl ergänzt und mit 1 µl Oligo(dT)<sub>12-18</sub> (0.5 µg/µl) versetzt. Danach werden sie für 10 min bei 70°C inkubiert. Jetzt gibt man zu jedem Ansatz 6.2 µl des vorbereiteten Master-Mix (je Ansatz: 2 µl 10-fach PCR-Puffer, 2 µl DTT-Lösung, 1.2 µl MgCl<sub>2</sub>-Lösung, 1 µl Nucleotid-Mix) und inkubiert die Proben für 5 min bei 42°C. Nun versieht man die Ansätze mit je 1 µl Reverse Transkriptase (SUPERSCRIPT), inkubiert für weitere 50 min bei 42°C und dann für 15 min bei 72°C. Diese Ansätze dienen als Matrize (*template*) für die sich anschließende PCR.

#### 4.2.10.1.6 Durchführung der PCR

Die PCR zum spezifischen Nachweis der Sequenz des *hOGG1*-Gens wird jeweils mit Hilfe der beiden Primer-Paare OGG1/OGG2 und OGG3/OGG4 durchgeführt. Das Primer-Paar

OGG1/OGG2 liefert ein Amplifikations-Produkt von 417 bp und das Primer-Paar OGG3/OGG4 von 573 bp. Die Primer weisen folgende Sequenzen auf:

Primer OGG1: 5' GCTGGGCCTGGGCTATCGTG 3'

Primer OGG2: 5' CTGCGCTTTGCTGGTGGCTCCTG 3'

Primer OGG3: 5' TCCATCCCGTGCCCTCGCTCTG 3'

Primer OGG4: 5' GATGGCTCGGGCACTGGCACTCA 3'

Die gelieferten Primer werden alle in autoklaviertem H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> zu einer Endkonzentration von 25 pmol/μl gelöst.

Zunächst wird der Master-Mix für die PCR angesetzt. Pro Ansatz mischt man 30.75 μl autoklaviertes H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>, 5.75 μl Glycerol 85 %, 5 μl 10-fach PCR-Puffer, 3 μl MgCl<sub>2</sub>-Lösung, 1 μl Nucleotid-Mix, je 1 μl Primer-Lösung von OGG1 und OGG2 oder OGG3 und OGG4 (Volumen pro Ansatz 47.5 μl). 2 μl Probe (*template* aus 4.2.10.1.5) werden mit 47.5 μl dieses bereiteten Master-Mix versetzt und für 5 min bei 94°C inkubiert. Jedem Ansatz wird nun 0.5 μl Taq-Polymerase zugefügt und die Ansätze 35 Wiederholungen folgenden PCR-Programms unterzogen: 1 min 94°C, 1.5 min 63.5°C, 2 min 72°C. Nach abschließender Inkubation für 5 min bei 72°C können die Ansätze untersucht oder bei -20°C bis zur Untersuchung gelagert werden.

#### 4.2.10.1.7 Charakterisierung der PCR-Produkte

Zur Charakterisierung der PCR-Produkte werden jeweils 5 μl jedes PCR-Ansatzes gelelektrophoretisch in einem 1-prozentigem Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt. Zur Abschätzung der Molekülgrößen der resultierenden Banden wird ein DNA-Längenstandard mit bekannten Bandenlängen (pBR322-alu1) aufgetragen.

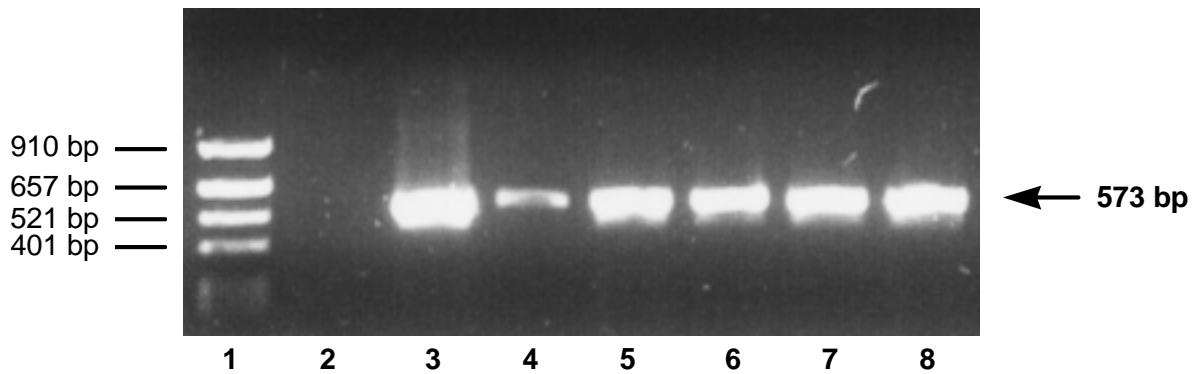


Abb. 4.7 Beispiel eines Agarosegels von Proben nach einer RT-PCR. Eingesetzt wurden die PCR-Produkte der Zelllinien AA8 (Spur 2), AA8-ogg1-22 (Spur 4), AA8-ogg1-19 (Spur 5), AA8-ogg1-16 (Spur 6), AA8-ogg1-9 (Spur 7), AA8-ogg1-1 (Spur 8) und pPR65-Plasmid-DNA (Spur 3) unter Verwendung des Primer-Paares OGG3/OGG4. Auf Spur 1 ist der Längenstandard (pBR322-alu1) aufgetragen. Das PCR-Produkt weist eine vorhergesagte Länge von 573 bp auf.

#### 4.2.10.2 *Western Blot*

Um sicher zu sein, daß die vorhanden mRNA auch in die entsprechende Aminosäuresequenz translatiert wird, werden die Zellen mit Hilfe der *Western-Blot*-Technik auch auf Proteinebene untersucht (s. auch Kapitel 4.2.4.3). Diese Untersuchung wurde nach Versendung der Zellpellets bestehend aus je  $5 \times 10^6$  Zellen von der **Arbeitsgruppe von P. Radicella (Fontenay-aux-Roses)** durchgeführt.

Dazu werden die Zellpellets in 0.35 ml Lysepuffer (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA, 250 mM NaCl, 2.5 µg /ml AAL) resuspendiert. Die Zellsuspension wird mit einem Ultraschall-Homogenisator aufgeschlossen und anschließend für 45 min bei 4°C und 85000 g zentrifugiert. Im Überstand wird der Proteingehalt nach Bradford bestimmt. Mit diesem Überstand werden der *Western Blot* und auch die Enzymaktivitätstest (s. Kapitel 4.2.10.3) durchgeführt.

Für den *Western Blot* wird ein 50 µg Protein entsprechendes Aliquot des Zellysat-Überstandes mit einer SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Detektion des hOgg1-Proteins erfolgt mit einem polyklonalen Hasen-Antikörper gegen das komplette Protein (**Dhérin, Radicella and Boiteux, unveröffentlicht**). Abb. 5.13 (oben) zeigt stellvertretend den *Western Blot* auf hOgg1 in parentalen AS52 und dem Klon AS52-ogg1-2.

#### 4.2.10.3 *Enzym-Aktivitäts-Tests im Gesamtzellextrakt*

In diesen Tests – **durchgeführt von der Arbeitsgruppe von P. Radicella (Fontenay-aux-Roses)** – wird mittels spezifischer Substrate von Ogg1-Protein die *In-vitro*-Enzymaktivität in Zellextrakten (aus 4.2.10.2) untersucht.

#### 4.2.10.3.1 8-oxoG-Glykosylaseaktivität

Hierzu verwendet man ein 34-mer Oligonukleotid, das in Position 16 ein einzelnes 8-oxoG aufweist. Die Synthese erfolgte wie in **Girard et al. (1998)** vor kurzem beschrieben wurde. Folgende Sequenz wurde eingesetzt:

5'-GGCTTCATCGTTATT(8-OxoG)ATGACCTGGTGGATACCG-3'

Dieses Oligonukleotid wird am 5'-Ende mit Hilfe von [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP und T4 Polynukleotid-Kinase radioaktiv markiert. Der <sup>32</sup>P-markierte Strang wird mit einem komplementären Oligonukleotid hybridisiert, das an Position 16 ein Cytosin trägt.

Die jeweiligen Versuchsansätze (Endvolumen 16 ml) enthalten 50 fmol des <sup>32</sup>P-markierten DNA-Doppelstranges und ein 3 µg Gesamt-Protein entsprechendes Volumen Zellextrakt in NTE-Puffer (70 mM NaCl, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 7.6). Zur Bestimmung der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität werden diese Ansätze für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf einer denaturierenden SDS-PAGE (20 %, 7 M Harnstoff) analysiert.

Abb. 5.13 (Mitte) zeigt die 8-oxoG-Glykosylaseaktivität im Zellextrakt stellvertretend für die parentalen AS52 und den Klon AS52-ogg1-2.

#### 4.2.10.3.2 FAPY-Guanin-Glykosylaseaktivität

Die FAPY-Guanin-Glykosylaseaktivität wird bestimmt, indem man die Freisetzung von <sup>3</sup>H-markiertem FAPY-Guanin aus einem mit <sup>3</sup>H-Methylmethansulfonat behandelten poly(dG-dC)-Stück mißt (**Boiteux et al., 1990**).

Abb. 5.13 (unten) zeigt die FAPY-Guanin-Glykosylaseaktivität im Zellextrakt stellvertretend für die parentalen AS52 und den Klon AS52-ogg1-2.

#### 4.2.11 AS52/*gpt*-Mutationstest

Diese Methode ermöglicht die Identifizierung und Untersuchung mutagener Substanzen in Zellkulturen der CHO-Zelllinien AS52. Die Methode erlaubt daher durch den Vergleich von Mutationsraten in AS52 und *hOGG1*-transfizierten Klonen eine Aussage über den Einfluß einer *OGG1*-Überexpression auf induzierte und spontane Mutationsraten.

#### 4.2.11.1 Prinzip

Die AS52-Zellen wurden aus der CHO-K1-BH4-Zelllinie durch Austausch des Säugergens *HPRT* gegen das funktionell analoge *gpt*-Gen aus *E. coli* geschaffen. Dabei wurde das hemizygote *HPRT*-Gen auf dem X-Chromosom deletiert und statt dessen eine Kopie der *gpt*-Sequenz in ein Autosom inseriert. Die AS52 besitzen daher nur autosomal eine einfache Kopie des bakteriellen *gpt*-Gens, das ebenso wie das HGPRT-Gen der Säugerzellen für eine Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase, ein Enzym des Reservestoffwechsels der Purinsynthese, kodiert. Da das *E. coli*-Enzym im Gegensatz zur Säuger-HGPRT nicht nur Hypoxanthin, sondern auch Xanthin als Substrat im Wiederverwertungsweg benutzen kann, wird es auch Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (XGPRT) genannt. Neben der physiologischen Funktion der HGPRT kann es das Purinanalogen 6-Thioguanin (6TG) toxifizieren (s. Kapitel 4.2.8.1). Durch Zugabe von 6TG zum Kulturmedium werden also alle Zellen abgetötet die ein unversehrtes *gpt*-Gen besitzen. Mit 6TG wird somit eine Selektion auf solche Zellen möglich, die entweder spontan oder durch eine Behandlung mit einem Agens eine Mutation im *gpt*-Gen (*gpt*<sup>-</sup>) erlitten haben, welche zu einem Funktionsverlust des kodierten Enzyms geführt hat. Um vor Versuchsbeginn die Zellpopulation von spontan entstandenen *gpt*-Mutanten zu befreien, kann mit der Zugabe des Folsäure-Antagonisten Aminopterin die *De-novo*-Synthese von Nukleinsäuren blockiert werden. Somit sterben alle *gpt*-Mutanten ab, da sie den Ausfall des *De-novo*-Syntheseweges nicht mehr mit dem alternativen Wiederverwertungsweg kompensieren können. (Tindall, 1984, 1986, 1989).



#### 4.2.11.2 Bestimmung induzierter Mutationshäufigkeiten

Zur Eliminierung spontaner *gpt*-Mutanten werden die AS52 und Transfektanten für 5 Tage in MPA (*Cleansing Medium*) kultiviert. Danach werden pro Schädigungsansatz  $0.5 \times 10^6$  der jeweiligen Zellen in 15 ml Recovery-Medium ausgesät und zur Regeneration für 48 h im Brutschrank kultiviert. Vor der Schädigung wird das Medium von den sich in der logarithmischen Wachstumsphase befindenden Zellen abgenommen und die Zellen zweimal mit je 10 ml PBSCMF gewaschen.

##### Schädigung mit Ro 19-8022 und sichtbarem Licht

Zur Schädigung versetzt man die am Boden der Zellkulturflasche festwachsenden Zellen mit 10 ml PBSCMF. Nun inkubiert man mit Ro 19-8022 unter Belichtung für 10 min bei 0°C mit einer 1000 W Halogenlampe aus einer Distanz von 38 cm (entsprechend  $166 \text{ kJ/m}^2$  im Bereich 400-800 nm). Anschließend wird die schädigende Lösung unverzüglich komplett abgezogen, und man wäscht zweimal mit je 10 ml PBSCMF.

##### Schädigung mit Kaliumbromat

Zur Schädigung versetzt man die am Boden der Zellkulturflasche festwachsenden Zellen mit 10 ml 37°C warmem PBSCMF, in dem kurz vorher eine entsprechende Menge Kaliumbromat (0 - 80 mM) gelöst wurde. Daran schließt sich unmittelbar eine Inkubation für 15 min bei 37°C im Brutschrank an. Im Anschluß verfährt man ebenso wie bei der Schädigung mit Ro 19-8022 und sichtbarem Licht beschrieben.

Danach werden die Zellen durch Zugabe von Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, gezählt und  $0.5 \times 10^6$  Zellen wieder in 15 ml Routinemedium ausgesät. Nach 4 Tagen wird jeder Ansatz nochmals abgelöst und wieder  $0.5 \times 10^6$  Zellen für weitere 3 Tage in Routinemedium kultiviert. Diese Woche in Routinemedium dient zum Abbau noch vorhandener *gpt*-Genprodukte vor Selektionsbeginn.

Jetzt werden pro Ansatz jeweils  $2 \times 10^5$  Zellen auf 5 100 mm-Gewebekultur-Schalen (Mutantenplatten) in einem Gesamtvolumen von 10 ml Routinemedium ausgesät. Zusätzlich plattiert man pro Ansatz je 200 Zellen auf 3 60 mm-Gewebekultur-Schalen (Titerplatten) mit 5 ml Routinemedium aus. Nach 2 h erschütterungsfreier Inkubation im Brutschrank werden die Mutantenplatten um 50 µl 6-Thioguaninlösung (resultierende Konzentration: 2.5 µg/ml) ergänzt. Alle Platten werden dann für etwa 8 Tage im Brutschrank kultiviert.

Zur Anfärbung der Kolonien wird das Medium abgegossen, die Platten mit 0.9 % Natriumchlorid-Lösung gespült und die Kolonien mit Methanol fixiert. Jetzt werden die Platten für 15 min mit Giemsa-Lösung gefärbt. Danach wird nicht gebundener Farbstoff durch Spülen mit Wasser vorsichtig entfernt und die Kolonien der einzelnen Mutanten- und Titerplatten nach dem Trocknen ausgezählt. Die Anzahl der Mutanten pro  $10^6$  überlebende Zellen ergibt sich aus nachfolgender Beziehung:

$$\text{Mutanten pro } 10^6 \text{ überlebende Zellen} = \frac{\text{Ø Mutantenzahl} \times 1000}{\text{Ø Titerzahl}}$$

#### 4.2.11.3 Bestimmung spontaner Mutationsraten

Zur Bestimmung der Spontan-Mutationsraten werden die verschiedenen Zelllinien durch Kultivierung für 5 Tage in MPA-Medium von schon vor Versuchsbeginn vorhandenen Spontanmutanten befreit und dann über längere Zeit unter exponentiellen Wachstumsbedingungen in kontinuierlichen Zellkulturen weitergezüchtet, wobei zu verschiedenen Zeitpunkten die Anzahl der sich angehäuften *gpt*-Mutanten bestimmt wird (**Glaab und Tindall, 1997**).

Nach Kultivierung in MPA-Medium („Zeitpunkt 0“) werden die Zellen abgelöst. Ein Teil der Zellen wird sofort zur Bestimmung der Spontanmutanten ausplattiert und ein anderer Teil wird zur weiteren Kultivierung direkt in Routinemedium (nicht erst in Recovery-Medium) überführt. Dabei wird der Ablauf des Mutationstest nach 4.2.11.2 (Bestimmung induzierte Mutationsraten) nur in sofern abgewandelt, daß erstens pro Mutantenplatte zur Erhöhung der Empfindlichkeit  $1 \times 10^6$  Zellen ausplattiert werden, zweitens sowohl eine Schädigung als auch eine zusätzliche Woche Kultivierung in Routinemedium vor dem Plattieren entfällt und drittens bis zu Versuchsende immerfort ein Teil der Zellen in Routinemedium weiterkultiviert wird. Zur Gewährleistung der kontinuierlichen exponentiellen Wachstumsbedingungen werden alle 2 oder 3 Tage die verschiedenen Zelllinien passagiert, indem man nach dem Ablösen jeweils 2 oder  $3 \times 10^6$  Zellen in einer  $175 \text{ cm}^2$ -Zellkulturgefäß mit 30 ml Routinemedium neu aussät. Zu diesen Zeiten wird entweder auch zur Bestimmung der Spontanrate ein Teil der Zellen ausplattiert oder die gesamten überschüssigen Zellen verworfen.

Zur Auswertung der im Laufe der Zeit gewonnenen spontanen Mutationsraten der einzelnen Zelllinien wird die Anzahl der jeweiligen Spontan-Mutanten mit dem Zeitpunkt der

Bestimmung korreliert. Wenn man die Mutantenrate einer Zelllinie auf der Ordinate gegen den Zeitpunkt der Bestimmung auf der Abszisse aufträgt, erhält man für jede Zelllinie eine Gerade, deren Steilheit die Empfänglichkeit der einzelnen Zelllinien gegenüber spontanen Mutationen widerspiegelt. Die Zeitangaben der Bestimmungen der Spontanraten wird in Generationen angegeben. Die Anzahl der Generationen wird durch die Zellzahlbestimmung beim Passagieren bestimmt, wobei die ausgesäte Zellzahl jeweils um den Faktor  $0.89 \pm 0.07$  (durchschnittliche *Plating Efficiency*) korrigiert wird.

#### **4.2.12 Bestimmung der Zelltoxizität (*Cloning Efficiency*)**

In Routinemedium kultivierte Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase werden genauso wie unter 4.2.11.2 beschrieben geschädigt. Nach den Waschsritten werden die Zellen ebenfalls abgelöst, gezählt und dann 200-4000 Zellen in je 3 60 mm-Gewebekulturschalen pro Ansatz mit 5 ml Routinemedium ausgesät. Die Platten werden für 8 Tage im Brutschrank kultiviert und dann wie unter 4.2.11.2 beschrieben gefärbt und ausgezählt. Zur Auswertung wird die durchschnittlich Anzahl der Kolonien des Kontrollansatzes (unbehandelte Zellen) als 100 %-Wert (maximale Überlebensrate) angesehen. Die durchschnittlichen Kolonienzahlen der geschädigten Ansätze werden dazu in Relation gesetzt.

#### **4.2.13 Charakterisierung von Mutationen des *gpt*-Gens in 6TG-resistenten AS52-Zellen**

##### **4.2.13.1 Isolierung 6TG-resistenter AS52-Zellen**

Zur Gewinnung 6TG-resistenter AS52-Mutanten-Klone verwendet man Zellkolonien der Mutantenplatten aus dem AS52/*gpt*- Mutationstest (s. Kapitel 4.2.11). Von jeder

Mutantenplatte, die aus einer unabhängig geschädigten Zellpopulation stammen muß, darf nur eine Kolonie zur Auswertung herangezogen werden, um zu vermeiden, daß genetisch identische Tochterzellen, die nur aus der Teilung einer Zelle stammen, untersucht werden. Es werden sowohl Mutantenkolonien, die spontanen Ursprungs sind (s. Kapitel 4.2.11.3), als auch durch Bromat-induzierte Mutanten (s. Kapitel 4.2.11.2), bei denen die Mutationsfrequenz mindestens 4-fach über der der Kontrollen liegt, durch separates Trypsinieren mit Klonierungsringen isoliert. Die Zellklone werden dann in 6TG-haltigem Routinemedium (2.5 µg/ml) bis zu einer für die DNA-Isolierung ausreichenden Zellzahl vermehrt.

#### **4.2.13.2 DNA-Isolierung**

Jeweils  $5 \times 10^6$  der einzelnen 6TG-resistenten Zellklone werden nach den Anweisungen des „Handbuch für QIAamp<sup>®</sup> Blood Kits und QIAamp Tissue Kits“ (QIAGEN, August 1998, Seite 15f.) aufgearbeitet.

#### **4.2.13.3 PCR und Aufreinigung der PCR-Produkte**

Die isolierten DNA-Proben werden dann in Anwesenheit von *gpt*-genspezifischen Primern (GSP) zur Vermehrung der in den Mutanten vorhandenen *gpt*-Sequenz einer PCR unterzogen. Dazu pipettiert man jeweils ein 1 µg DNA entsprechendes Volumen der Präparationen aus 4.2.13.2, 50 µl QIAGEN Master Mix, je 25 pmol eines GSP-Paares und autoklaviertes H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> zu einem Endvolumen von 100 µl in einem dünnwandigen PCR-Reaktionsgefäß zusammen. Die PCR wird jeweils mit Hilfe der beiden Primer-Paare For4/Rev4 und For6/Rev6 durchgeführt. Das Primer-Paar For4/Rev4 liefert ein Amplifikations-Produkt von 810 bp und das Primer-Paar For6/Rev6 von 888 bp. Die Primer weisen folgende Sequenzen auf:

Primer For4:        5' TCCCCTCGAACACTTTTT 3'  
Primer Rev4:        5' CTGGACGTCGAGGATTTC 3'

Primer For6:        5' AGACAGGCTTGCGAGATA 3'  
Primer Rev6:        5' CATGCGATACCAGTGAGG 3'

Die Ansätze werden im PCR-Gerät zunächst 5 min bei 94°C inkubiert. Jedem Ansatz wird 0.5 µl Taq-Polymerase zugefügt und die Ansätze 30 Zyklen folgenden PCR-Programms unterzogen: 1 min 94°C, 1 min 58°C, 2 min 72°C. Nach abschließender Inkubation für 5 min bei 72°C und einer Abkühlphase können die Ansätze untersucht oder bei -20°C bis zur Untersuchung gelagert werden.

Die Charakterisierung der Ansätze erfolgt wie in Kapitel 4.2.10.1.7 beschrieben.

Da in einigen Proben kein passendes PCR-Produkt detektiert werden konnte wird neben einer Versuchswiederholung zusätzlich ein Experiment mit einem „Über-Kreuz-Primer-Paar“ (Rev4/For6: Amplifikations-Produkt von 947 bp) zur Überprüfung der Methode durchgeführt. Die Wiederholungen bestätigten die jeweiligen Experimente. Bei Proben die kein passendes PCR-Produkt liefern, ist daher mit großer Wahrscheinlichkeit von größeren oder kompletten Deletionen der *gpt*-Sequenz auszugehen (Tindall, 1989).

Um die PCR-Produkte in hochreiner Qualität für die Sequenzierung zur Verfügung zu haben, werden sie in einer Aufreinigungsprozedur von Primern, Nukleotiden, Salzen und Polymerase befreit. Hierzu behandelt man den PCR-Ansatz nach dem „Protokoll für den QIAquick PCR Purification Kit bei Verwendung einer Mikrozentrifuge“ (S. 19 f., QIAquick Spin Handbuch, März 1998, QIAGEN). Im Anschluß wird die Qualität und Ausbeute der Proben nochmals mit einem Agarosegel überprüft.

#### 4.2.13.4 Sequenzierung der *gpt*-Sequenz

Zur Bestimmung der Veränderung in der *gpt*-Sequenz werden die aufgereinigten PCR-Produkte sequenziert. Die Sequenzierung erfolgt durch die Firma GENTERprise™ (Gesellschaft für Genanalyse und Biotechnologie mbH, Mainz) - unter der Leitung von Dr. Hankeln - durch eine nicht-radioaktive DNA-Sequenzierung mittels vier mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Didesoxynukleotiden (Dye-Terminator™) in Kombination mit dNTPs. Als Primer dient Rev3 (5'-CCAGAATACTTACTGGAAAC-3'). Die so erhaltenen DNA-Sequenzen werden mit der bekannten Wildtyp-Sequenz verglichen. Abweichungen in der Nukleotidfolge von der nativen, nichtmutierten Sequenz können so als Mutation erkannt werden.

## **4.2.14 Mikrokerntest**

### **4.2.14.1 Prinzip der Methode**

Im Mikrokerntest wird der Einschluß von chromosomalen Fragmenten oder vollständigen Chromosomen in eine eigene, vom Hauptkern getrennte Kernmembran fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht. Untersuchungen zur Mikrokernelfrequenz lassen sich in jeder Zellart durchführen, in der die Morphologie des Kerns eine Unterscheidung zwischen einer Kerndeformation und einem Mikrokernel zuläßt und in der nicht übermäßig häufig fragmentierte oder apoptotische Kerne vorhanden sind. Mikrokernel kommen in den Zellen verschiedenster Gewebe und Organismen spontan vor. Ihre Häufigkeit ist unter bestimmten Umständen jedoch erhöht (z.B. Präkanzerosen, Tumoren, nach Kontakt mit bestimmten Xenobiotika). Zur Bestimmung der Mikrokernelfrequenz werden suspendierte Zellen mit einer Zytocentrifuge auf Objektträger aufgebracht. Anschließend werden die Präparate mindestens eine Stunde in Methanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fixiert. Die Färbung der Präparate erfolgt mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Bisbenzimid Nr. 33258). Bei der mikroskopischen Auswertung werden Strukturen erfaßt, die erstens eine Größe von weniger als  $1/4$  des Zellkerns aufweisen, zweitens deutlich getrennt vom Zellkern vorliegen und drittens eine dem Kern vergleichbare Färbung aufweisen.

### **4.2.14.2 Mikrokernelinduktion mit Ro 19-8022 und sichtbarem Licht in AS52 und Transfektanten**

Pro zu schädigenden Ansatz werden  $0.5 \times 10^6$  Zellen der jeweiligen Zelllinien in  $25 \text{ cm}^2$ -Zellkulturgefäß mit 5 ml Kulturmedium am Vortag der Schädigung ausgesät. Zur Schädigung wird das Kulturmedium abgenommen, die Zellen zweimal mit je 5 ml PBSCMF gewaschen und die Zellen am Boden der Zellkulturflasche mit 5 ml kaltem ( $4^{\circ}\text{C}$ ) PBSCMF, das eine entsprechende Konzentration Ro 19-8022 enthält, bedeckt. Die Ansätze werden nun für 10 min bei  $0^{\circ}\text{C}$  mit einer 1000 W Halogenlampe aus einer Distanz von 38 cm (entsprechend  $166 \text{ kJ/m}^2$  im Bereich 400-800 nm) bestrahlt. Um den Einfluß auf die Mikrokernelinduktion von Ro 19-8022 ohne Anregung durch Licht beurteilen zu können,

werden AS52-Zellen in zusätzlichen Ansätzen einer analogen Schädigung mit Ro 19-8022 ohne Bestrahlung unterzogen („Dunkelkontrolle“). Anschließend wird die schädigende Lösung unverzüglich komplett abgezogen und die Zellen werden zweimal mit je 5 ml PBSCMF gewaschen. Jetzt werden die Ansätze wieder mit je 5 ml Kulturmedium bedeckt und zur Manifestation der Schädigung für 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Erholungsphase werden die Zellen abgelöst und mit der Zytocentrifuge für 5 min bei 1000 U/min auf fettfreie Objektträger aufgeschleudert. Für jeden Ansatz werden 6 Objektträger präpariert. Die auf der Glasoberfläche anhaftenden Zellen werden dann zur Fixierung für mindestens 1 h in Methanol bei -20°C inkubiert. Die Färbung der Gesamt-DNA erfolgt mit Bisbenzimid-Färbelösung für 3 min. Anschließend werden die Präparate dreimal für 2 min mit PBSCMF gewaschen und mit Eindeckmittel (EDL-2) für die Fluoreszenzmikroskopie eingedeckt. Zur Quantifizierung der Mikrokerne werden im Fluoreszenzmikroskop mit Anregungsfilter 356 nm pro Ansatz jeweils dreimal 2000 Zellen ausgewertet.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Untersuchung des Einflusses des Bcl-2-Proteins auf oxidative DNA-Schäden und intrazelluläre GSH-Spiegel

Die Rolle des Bcl-2-Proteins in der Regulation von ROS wird kontrovers diskutiert. Es gibt sowohl Berichte über prooxidative (Steinmann, 1995) als auch antioxidative Eigenschaften (Hockenbery et al., 1993; Kane et al., 1993) des antiapoptotischen Bcl-2-Proteins

Um einen möglichen pro- oder antioxidativen Effekt des Bcl-2-Proteins bei der endogenen und exogenen oxidativen DNA-Schädigung zu prüfen, wurden Bcl-2-überexprimierende Mausmakrophagen (Rbcl2-14) und deren Parental-Zelllinie (RAW264.7) hinsichtlich ihres Steady-State-Levels an FPG-sensitiven DNA-Modifikationen, ihrer Suszeptibilität gegenüber oxidativen Agentien und des GSH-Gehaltes charakterisiert.

#### 5.1.1 Überprüfung der konstitutiven Überexpression von *BCL-2*

Zum Nachweis der konstitutiven Überexpression des humanen *BCL-2* in dem von **B. Brüne (Erlangen)** zur Verfügung gestellten, stabil transfizierten Klon Rbcl2-14 gegenüber der als Kontrolle dienenden parental Zelllinie wurde ein *Western Blot* mit hochspezifischen Antikörpern gegenüber humanem Bcl-2-Protein durchgeführt. Wie Abb. 5.1 zeigt, ist im unverdünnten Zellextrakt der Parentalzellen kein menschliches Bcl-2-Protein nachweisbar, wohingegen selbst im 1:10 verdünnten Extrakt der transfizierten Zellen noch eine deutlich detektierte Proteinbande zu erkennen ist.



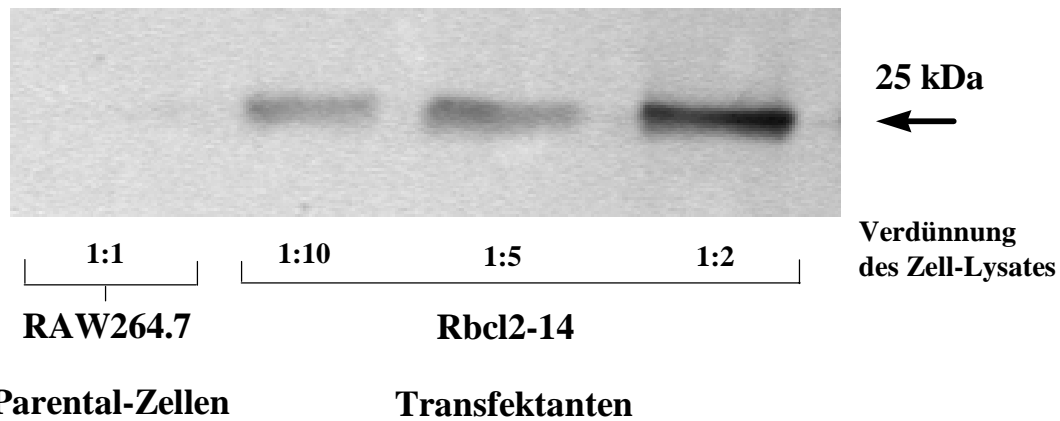


Abb. 5.1 *Western Blot*: Immunologischer Nachweis des humanen Bcl-2-Proteins in den Mausemakrophagen-Zelllinien RAW264.7 und Rbcl2-14.

### 5.1.2 Bestimmung des Steady-State-Levels FPG-sensitiver DNA-Modifikationen

Die Auswirkungen einer *BCL-2*-Überexpression in Mausemakrophagen auf den Steady-State-Level FPG-sensitiver DNA-Modifikationen wurde in unbehandelten Zellen der Parental-Zelllinie RAW264.7 und der Transfektanten-Zelllinie Rbcl2-14 untersucht. Dadurch sollte ein möglicher Einfluß durch das Bcl-2-Protein auf das Fließgleichgewicht zwischen endogener Generierung und Reparatur FPG-sensitiver DNA-Modifikationen erkannt werden. In Abb. 5.2 ist die jeweilige Anzahl der bestimmten DNA-Einzelstrangbrüche und FPG-sensitiver Basenmodifikationen dargestellt.

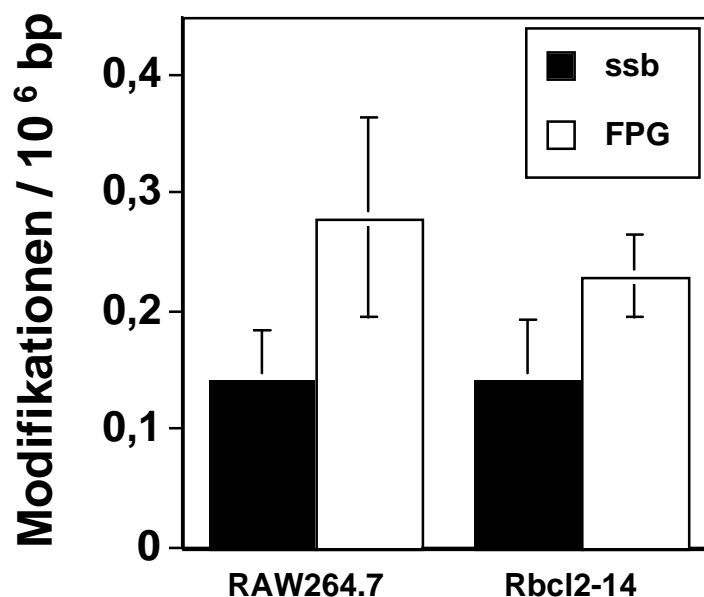


Abb. 5.2 Steady-State-Level von DNA-Einzelstrangbrüchen und FPG-sensitiven DNA-Modifikationen in unbehandelten RAW264.7 und Rbcl2-14 (n = 5-6).

Aus Abb. 5.2 ist zu ersehen, daß die Überexpression von *BCL-2* in den Rbcl2-14-Zellen zu keiner signifikanten Veränderung der Steady-State-Level oxidativer DNA-Modifikationen gegenüber den Kontrollzellen führt. In beiden Zelllinien ist sowohl die Anzahl der DNA-Einzelstrangbrüche als auch die durchschnittliche Anzahl der FPG-sensitiven Modifikationen annähernd gleich.

### 5.1.3 Suszeptibilitätsvergleich zwischen Kontroll- und *BCL-2*-überexprimierenden Zellen

Nachdem in unbehandelten Zellen beider Zelllinien kein Unterschied im Steady-State-Level oxidativer DNA-Modifikationen entdeckt werden konnte, wurden die Zellen auf ihre Empfänglichkeit von DNA-Schäden durch eine gezielte Behandlung mit oxidativ schädigenden Agentien untersucht. Hierzu wurde unter definierten Bedingungen in den Zellen ein zusätzlicher oxidativer DNA-Schaden zum einen mit Kaliumbromat, zum anderen mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022 und sichtbarem Licht induziert. Das Schadensausmaß wurde bestimmt und ist vergleichend in Abb. 5.3 dargestellt.

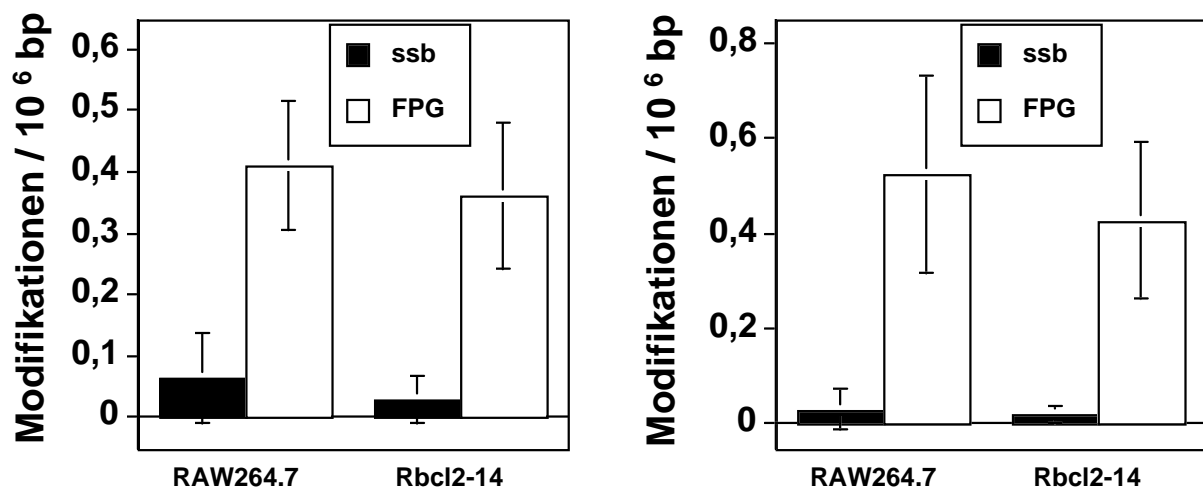


Abb. 5.3 Anzahl an DNA-Einzelstrangbrüchen und FPG-sensitiven DNA-Modifikationen in RAW264.7 und Rbcl2-14, die durch eine Schädigung mit Kaliumbromat (5 mM, 15 min, 37°C; linker Teil der Abbildung) bzw. mit Ro 19-8022 (0.05 µM; rechter Teil der Abbildung) in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m<sup>2</sup>; 400-800 nm) induziert wurden (n = 3-4).

In Abb. 5.3 ist zu erkennen, daß weder bei Induktion mit Kaliumbromat noch mit dem Photosensibilisator ein signifikant unterschiedliches Ausmaß an oxidativen DNA-Schäden in den Mausemakrophagen-Zelllinien resultiert. Bei beiden Agentien wurden jeweils wenige DNA-Einzelstrangbrüche, aber jeweils etwa 200 % zusätzliche FPG-sensitive DNA-Modifikationen gegenüber denen im Steady-State-Level vorliegenden induziert.

#### 5.1.4 Bestimmung des Gesamt-GSH-Gehaltes

Da in den vorangegangenen Versuchen kein Einfluß des Bcl-2-Proteins auf oxidative DNA-Schäden festgestellt werden konnte, sollte untersucht werden, ob das Bcl-2-Protein den Redox-Status der Zellen reguliert. Stellvertretend hierfür wurde in beiden Zelllinien der Gesamt-GSH-Spiegel bestimmt. Das Ergebnis der Untersuchung ist in Abb. 5.4 dargestellt.

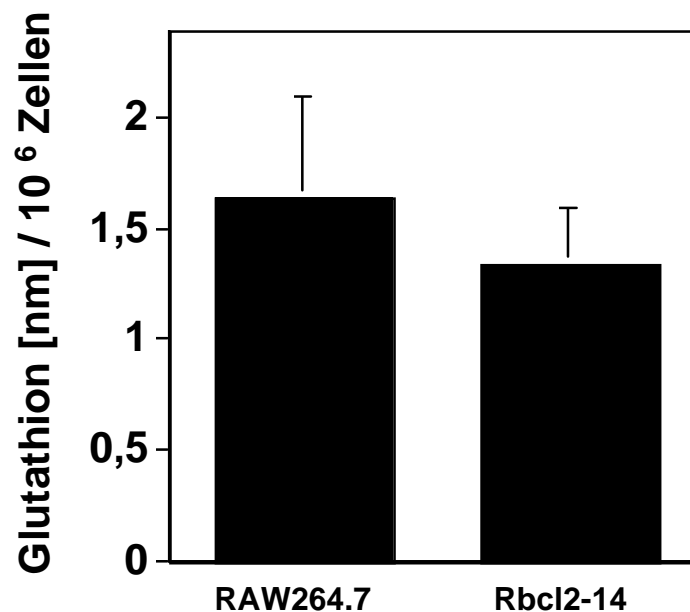


Abb. 5.4 Gesamt-GSH-Gehalt in RAW264.7 und Rbcl2-14 (n = 3).

Aus Abb. 5.4 geht hervor, daß der Gesamt-GSH-Gehalt in den Rbcl2-14-Zellen gegenüber den Parental-Zellen zwar durchschnittliche um knapp 20 % erniedrigt ist, aber der Unterschied ist auch hierbei nicht signifikant.

## **5.2 Untersuchung des Einflusses der Zelldifferenzierung auf oxidative DNA-Schäden**

Zum Verständnis der Entstehung oxidativer DNA-Schäden in menschlichen Zellen ist die Fragestellung, ob die Zelldifferenzierung einen Effekt auf das Gleichgewicht der Entstehung und Beseitigung von DNA-Schäden hat, von großem Interesse. Als Versuchsmodell diente in dieser Arbeit die humane promyeloische Zelllinie HL60, die durch eine Inkubation mit DMSO zu granulocytenartigen Zellen differenziert werden kann (Takeuchi et al., 1994; Takeuchi et al., 1996).

### **5.2.1 Differenzierung von HL60-Zellen**

Um sicher zu gehen, daß für die nachfolgenden Untersuchungen die Zellen in ausreichender Anzahl in differenziertem Zustand vorliegen, wurde das Testsystem zunächst im Hinblick auf die optimale Inkubationszeit untersucht. Dazu wurden Zellkulturen der HL60-Zellen nach der Inkubation in 1.3 % DMSO-haltigem Kulturmedium zu verschiedenen Zeitpunkten einem NBT-Reduktionstest unterzogen. Dadurch kann der Anteil der zu granulocytenartigen Zellen (DMSO-HL60) differenzierten Zellen bestimmt werden (s. Kapitel 4.2.5). In Abb. 5.5 ist der zeitliche Verlauf der Zunahme des Anteils differenzierter Zellen dargestellt. Aus der Abbildung ist ersichtlich, daß etwa ab dem 2. Tag der Inkubation mit DMSO die ersten differenzierten Zellen auftreten und dann bis zum 6. Tag eine lineare Zunahme an differenzierten Zellen verzeichnet wird. Nach dem 6. Tag kann nur noch ein schwächerer Anstieg beobachtet werden.

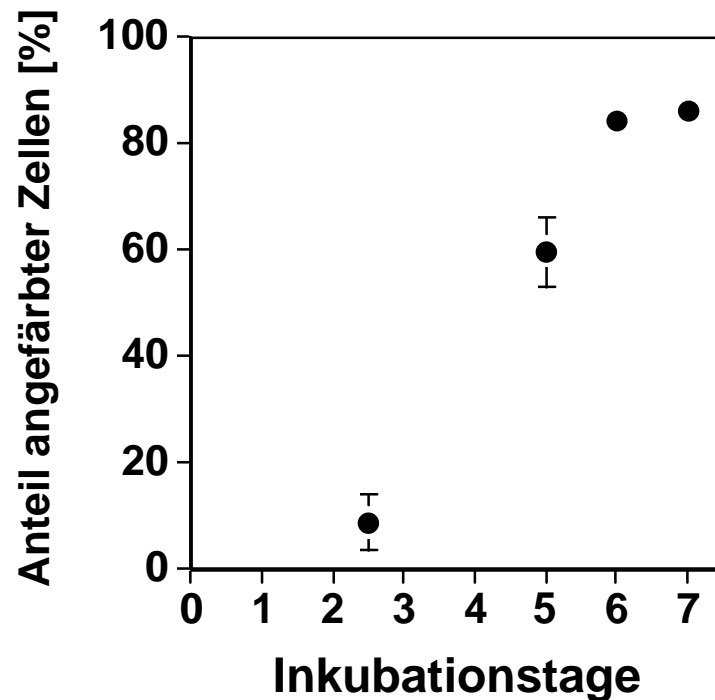


Abb. 5.5 Anteil der im NBT-Reduktionstest angefarbten DMSO-HL60-Zellen nach verschiedenen Inkubationszeiten in 1.3 % DMSO-haltigem Kulturmedium (n = 2).

### 5.2.2 Bestimmung der Steady-State-Level FPG-sensitiver DNA-Modifikationen in HL60 und ausdifferenzierten DMSO-HL60

Zum Vergleich der Steady-State-Level oxidativer DNA-Schäden in undifferenzierten HL60 und ausdifferenzierten DMSO-HL60, wurde wiederum jeweils die Anzahl von DNA-Einzelstrangbrüchen und FPG-sensitiven DNA-Modifikationen in beiden Zell-Typen bestimmt. Des weiteren wurde untersucht, ob sich die Steady-State-Level in den granulocystenartigen DMSO-HL60 nach Stimulation mit dem Tumorpromoter PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) zur Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (*Respiratory Burst*) verändern (s. Kapitel 2.1.3.4). Dazu wurden jeweils Zellkulturen der HL60-Zellen nach siebentägiger Inkubation in 1.3 % DMSO-haltigem Kulturmedium mit 100 nM oder 500 nM PMA für 1 h bei 37°C inkubiert, um anschließend wiederum die Anzahl von DNA-Einzelstrangbrüchen und FPG-sensitiven DNA-Modifikationen zu ermitteln.

Wie aus Abb. 5.6 hervorgeht, zeigt sich weder bei den unstimulierten DMSO-HL60-Zellen noch bei den mit PMA angeregten DMSO-HL60-Zellen eine signifikante Veränderung in den Steady-State-Leveln gegenüber den undifferenzierten HL60-Zellen. In allen vier untersuchten

Fällen wird ein Steady-State-Level von durchschnittlich etwa 0.25 FPG-sensitiven Modifikationen pro  $10^6$  bp nachgewiesen.

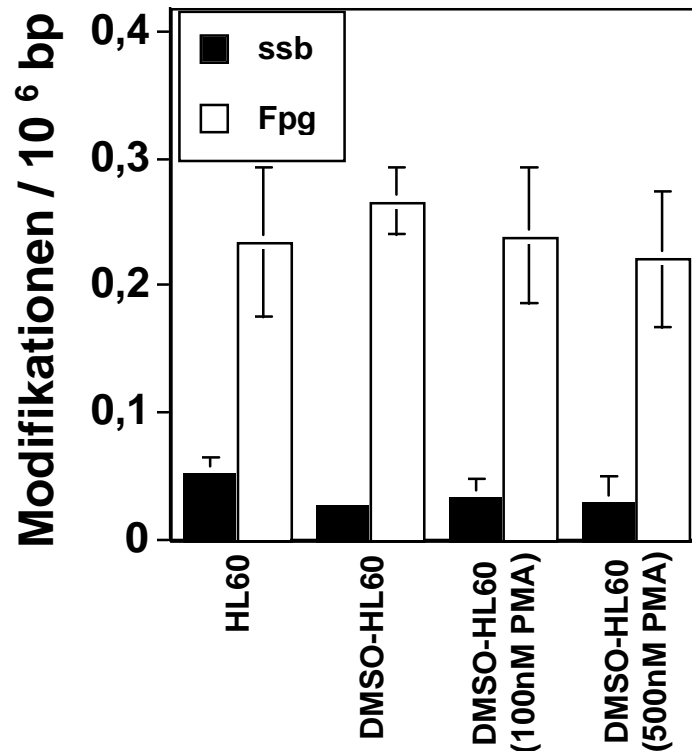


Abb. 5.6 Steady-State-Level von DNA-Einzelstrangbrüchen und FPG-sensitiven DNA-Modifikationen in undifferenzierten HL60-Zellen, in ausdifferenzierten DMSO-HL60-Zellen und in durch PMA stimulierten DMSO-HL60-Zellen (n = 3).

### 5.3 Untersuchung des Einflusses einer *XRCC1*-Defizienz in CHO-Zellen auf oxidative DNA-Schäden

Das *XRCC1*-Gen (*X-ray repair cross complementing group 1*) kodiert für ein Protein, das an der Reparatur von Einzelstrangbrüchen beteiligt ist. Des Weiteren wird von Interaktionen von Xrcc1 mit einer Vielzahl anderer an der Reparatur beteiligter Proteine berichtet (s. Kapitel 2.4.2.2), weshalb das Xrcc1-Protein als sogenanntes Plattform-Protein bezeichnet wird. Um eine Beteiligung des Xrcc1-Proteins an der Reparatur von oxidativen DNA-Schäden zu überprüfen, wurden Versuche mit der *XRCC1*-defizienten CHO-Zelllinie EM9 und deren Wildtyp-Zellen AA8-1 durchgeführt.

### 5.3.1 Auswirkungen der *XRCC1*-Defizienz auf den Steady-State-Level FPG-sensitiver DNA-Modifikationen

Zunächst wurde die jeweilige Anzahl der DNA-Einzelstrangbrüche und FPG-sensitiven Basenmodifikationen in unbehandelten Zellen beider Linien bestimmt. Dies sollte zeigen, ob eine *XRCC1*-Defizienz zu einer Veränderung des Fließgleichgewichtes zwischen endogener Generierung und Reparatur FPG-sensitiver DNA-Modifikationen führt. Wie aus Abb. 5.7 hervorgeht, ist der Steady-State-Level oxidativer DNA-Modifikationen der *XRCC1*-defizienten EM9-Zellen gegenüber dem der AA8-1-Wildtyp-Zellen unverändert.

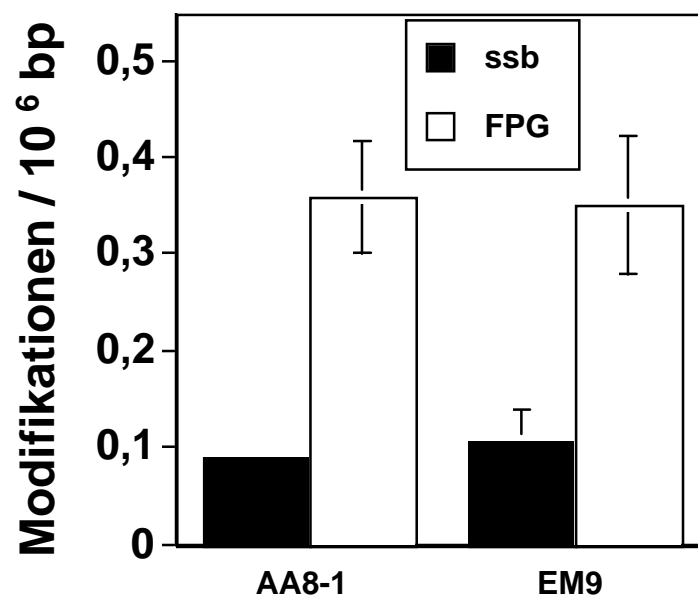


Abb. 5.7 Steady-State-Level von DNA-Einzelstrangbrüchen und FPG-sensitiven DNA-Modifikationen in unbehandelten AA8-1 und EM9 (n = 2-5).

### 5.3.2 Auswirkungen der *XRCC1*-Defizienz auf die Suszeptibilität gegenüber der Induktion oxidativer DNA-Schäden

Daran anschließend wurde der Einfluß der *XRCC1*-Defizienz auf die Induktion oxidativer DNA-Schäden untersucht. Hiezu wurden beide Zelllinien einer Schädigung mit Ro 19-8022 und sichtbarem Licht unterzogen. Die Anzahl der induzierten DNA-Basenmodifikationen ist für beide Zelllinien in Abb. 5.8 dargestellt.

Während die induzierten FPG-sensitiven Basenmodifikationen in beiden Zelllinien etwa 0.3 pro 10<sup>6</sup> bp betragen, kann bei der Anzahl der induzierten Einzelstrangbrüche in den *XRCC1*-

defizienten EM9-Zellen eine 6-fache Erhöhung (Signifikanz  $p \leq 0.005$ ) gegenüber den Wildtyp-Zellen beobachtet werden.

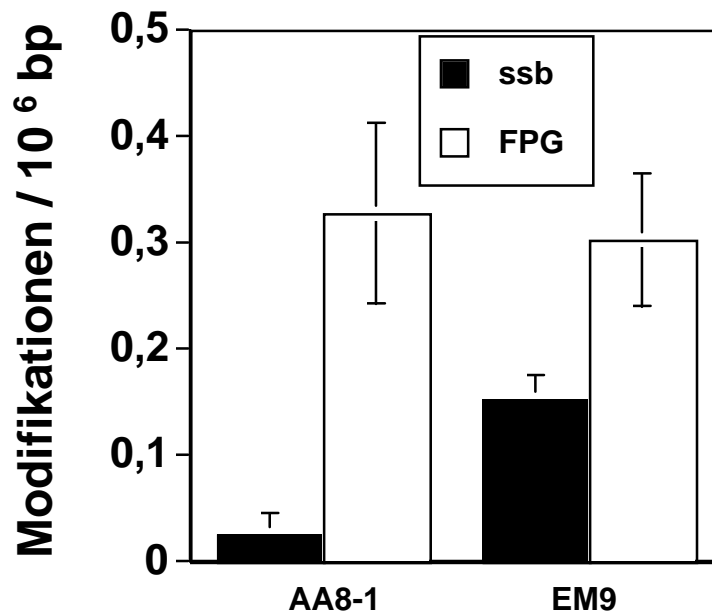


Abb. 5.8 Anzahl der DNA-Einzelstrangbrüche und FPG-sensitiven DNA-Modifikationen induziert durch  $0.03 \mu\text{M}$  Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht ( $166 \text{ kJ/m}^2$ ; 400-800 nm) bei  $0^\circ\text{C}$  in AA8-1 und EM9 ( $n = 4-5$ ).

Um zu überprüfen, ob die Erhöhung der induzierten Einzelstrangbrüche möglicherweise auf unerwünschte, schnelle Reparaturvorgänge nach der Schädigung (reparaturbedingte Einzelstrangbrüche) – wenn die Zellen zum Trypsinieren für kurze Zeit auf  $37^\circ\text{C}$  erwärmt werden – zurückgeführt werden können, wurden die Zellen für die nachfolgenden Versuche vor der Schädigung abgelöst. Die geschädigten Zellsuspensionen wurden dabei für den gesamten Zeitraum von der Schädigung bis zur Lyse der Zellen komplett bei  $0^\circ\text{C}$  oder  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt. In Abb. 5.9 ist die Anzahl der induzierten DNA-Einzelstrangbrüche in beiden Zelllinien bei zwei unterschiedlich hohen Schädigungen mit Ro 19-8022 und sichtbarem Licht in Suspension dargestellt. Auch hier zeigt sich wieder ein deutlicher Unterschied im Schadensausmaß zwischen defizienten und Wildtyp-Zellen. Bei der niedrigen Ro 19-8022-Schädigung ist die Anzahl induzierter Einzelstrangbrüche in den *XRCC1*-defizienten EM9-Zellen etwa 10-fach und bei der höheren Schädigung etwa 2-fach gegenüber den Wildtypzellen erhöht. Diese Ergebnisse, bei denen die komplette Zellaufarbeitung bei  $0^\circ\text{C}$  bzw.  $4^\circ\text{C}$  erfolgte, lassen die Möglichkeit reparaturbedingter Strangbrüche als Ursache einer erhöhten Anzahl von Einzelstrangbrüchen als unwahrscheinlich erscheinen.



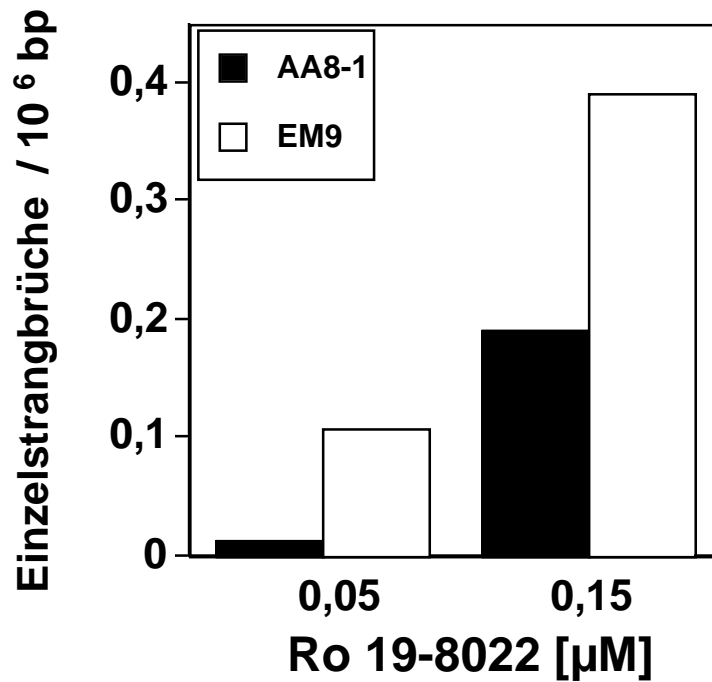


Abb. 5.9 Anzahl der DNA-Einzelstrangbrüche induziert in Suspension durch 0.05  $\mu\text{M}$  bzw. 0.15  $\mu\text{M}$  Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166  $\text{kJ}/\text{m}^2$ ; 400-800 nm) bei 0°C in AA8-1 und EM9 ( $n = 1$ ).

### 5.3.3 Auswirkungen der *XRCCI*-Defizienz auf die Reparaturgeschwindigkeit oxidativer DNA-Schäden

In den EM9- und AA8-1-Zellen wurde nach Induktion eines DNA-Schadens mit Ro 19-8022 und sichtbarem Licht der Verlauf der Reparatur des Schadens verfolgt, um eine Aussage über die Bedeutung des Xrcc1-Proteins bei der Reparatur oxidativer DNA-Schäden machen zu können.

In Abb. 5.10 sind die Reparaturkinetiken der FPG-sensitiven Basenmodifikationen für die EM9- und AA8-1-Zellen dargestellt. Hierbei zeigt sich ein nahezu identischer Verlauf der Reparaturkinetiken beider Zelllinien. Die *XRCCI*-Defizienz scheint keine Verschlechterung der Reparatur FPG-sensitiver Basenmodifikationen zu bedingen.

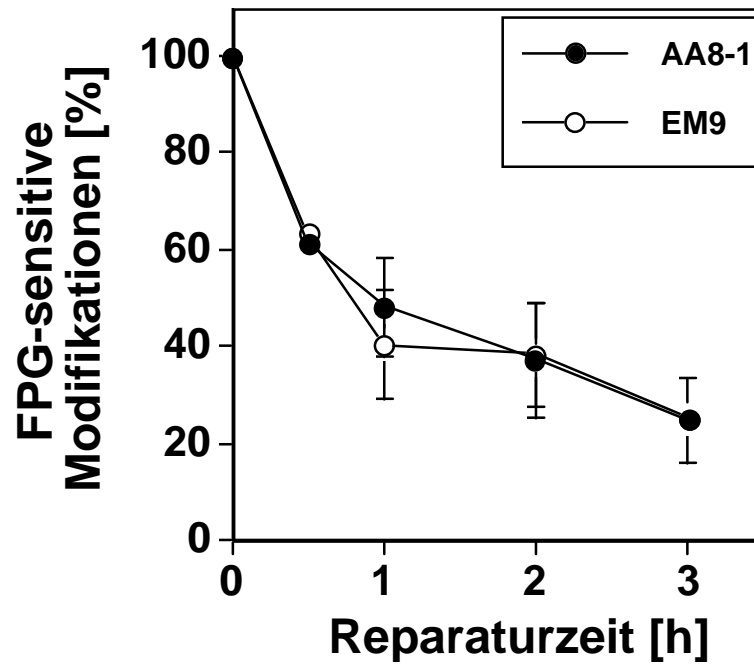


Abb. 5.10 Reparatur von FPG-sensitiven Basenmodifikationen in Kulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Schadensinduktion erfolgte durch 0.03 µM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m<sup>2</sup>; 400-800 nm) bei 0°C in AA8-1 und EM9 (n = 2-3).

Bei der Betrachtung der parallel bestimmten Reparaturkinetiken der induzierten DNA-Einzelstrangbrüche, in Abb. 5.11 dargestellt, zeigt sich erstens wieder ein deutlich erhöhtes Schadensausmaß bei den EM9-Zellen und zweitens eine gegenüber den Wildtyp-Zellen langsamere Reparatur der induzierten Strangbrüche.

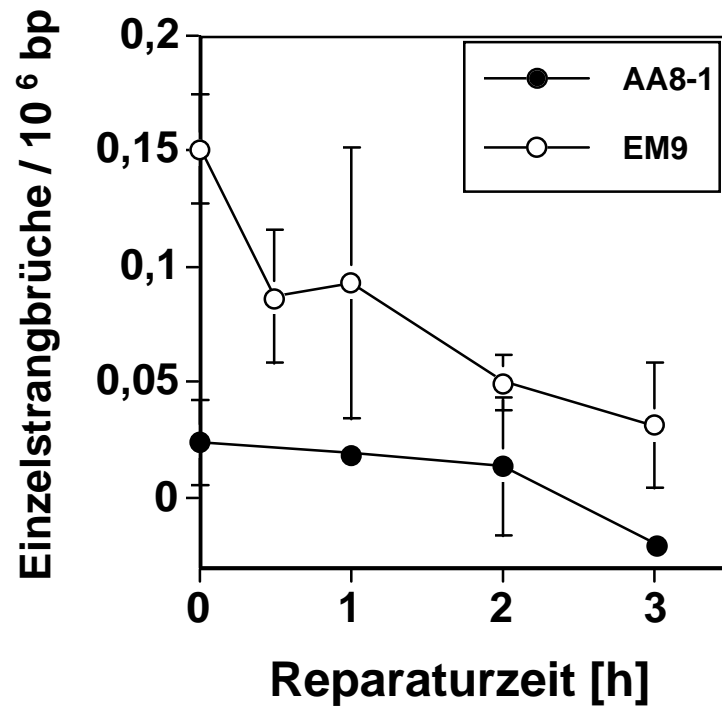


Abb. 5.11 Reparatur von induzierten DNA-Einzelstrangbrüchen in Kulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Schadensinduktion erfolgte durch 0.03 µM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m<sup>2</sup>; 400-800 nm) bei 0°C in AA8-1 und EM9 (n = 2-3).

Um genauere Aussagen über den Verlauf der Einzelstrangbruch-Reparatur innerhalb der ersten Stunde nach der Schädigung machen zu können, wurden in beiden Zelllinien Reparaturversuche mit kürzeren Reparaturzeiten durchgeführt. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Abb. 5.12 gezeigt. Hier zeigt sich ebenfalls – neben dem höheren Ausgangsniveau – die langsamere Reparatur der induzierten Strangbrüche in den EM9-Zellen. Während in den Wildtyp AA8-1 die wenigen induzierten Einzelstrangbrüche bereits nach 15 min behoben sind, so ist in den EM9-Zellen nach 30 min noch etwa ein Drittel und nach 60 min noch etwa ein Fünftel der induzierten Strangbrüche vorhanden.

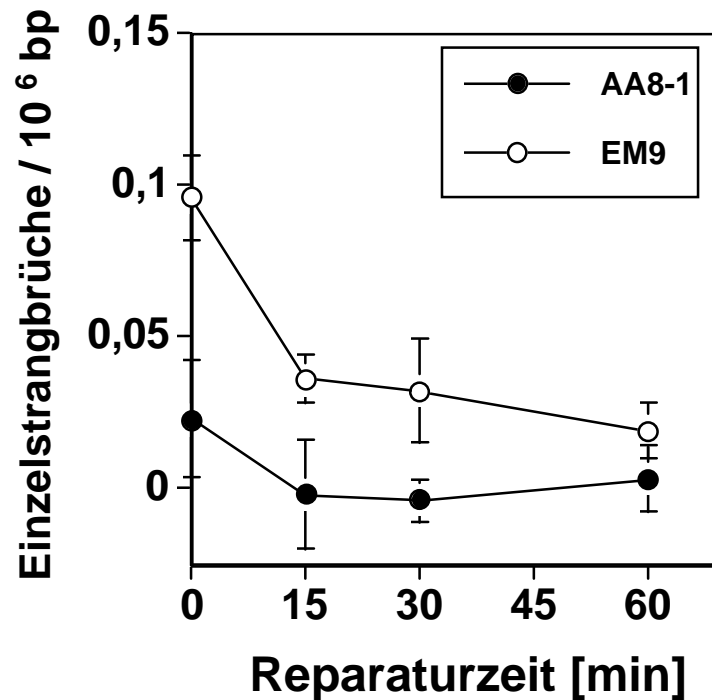


Abb. 5.12 Reparatur von induzierten DNA-Einzelstrangbrüchen in Kulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Schadensinduktion erfolgte durch 0.075 µM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m<sup>2</sup>; 400-800 nm) bei 0°C in AA8-1 und EM9 (n = 2-3).

#### 5.4 Untersuchung des Einflusses der 8-oxoG-Glykosylase (Ogg1) auf oxidative DNA-Schäden

Nachdem im Menschen und nachfolgend auch in anderen Säugetieren das Gen, das für die Reparaturglykosylase von 8-oxoG (*OGG1*) kodiert, entdeckt und kloniert werden konnte (Arai et al., 1997; Aburatani et al., 1997; Bjoras et al., 1997; Lu et al., 1997; Radicella et al., 1997; Roldan-Arjona et al. 1997; Rosenquist et al., 1997; Tani et al., 1998), wurde damit eine eingehendere Untersuchung dieses Teils der Basen-Exzisions-Reparatur in Säugerzellen (s. Kapitel 2.4.2.1.3) ermöglicht. Die Untersuchungen in diesem Kapitel wurden zum einen in CHO-Zelllinien, die stabil mit der humanen 8-oxoG-Glykosylase (*hOGG1*) transfiziert wurden, zum anderen mit Mäusefibroblasten-Zelllinien bzw. primären Mäuszellen, bei denen das analoge Mäusegene (*mOGG1*) inaktiviert worden war (*knock-out*), durchgeführt.

## 5.4.1 Auswirkungen einer *hOGG1*-Überexpression in CHO-Zellen

### 5.4.1.1 Ausmaß der *hOGG1*-Überexpression in den transfizierten CHO-Zellen

Stabil transfizierte Klone der CHO-Zelllinien AA8 und AS52 wurden, wie in Kapitel 4.2.9 beschrieben, hergestellt und mit verschiedenen Methoden auf Qualität und Quantität der Überexpression untersucht. Dazu wurde zunächst eine Vorauswahl der Transfektanten durch eine RT-PCR-Charakterisierung durchgeführt. Daran anschließend wurden Gesamtzell-extrakte der parentalen und ausgewählten, transfizierten Zellen durch *Western Blot*, 8-oxoG-Glykosylaseaktivitäts- und FAPY-Guanin-Glykosylaseaktivitätstests durch die **Arbeitsgruppe von P. Radicella (Fontenay-aux-Roses)** analysiert. Bezogen auf die jeweiligen parentalen Zellen zeigten hierbei die Klone AA8-ogg1-19 und AS52-ogg1-2 (Abb. 5.13) *in vitro* eine etwa 10-fach höhere Enzymglykosylaseaktivität gegenüber 8-oxoG. Verschiedene andere Klone der beiden Zelllinien wiesen in Abstufungen eine mittelstarke Enzymaktivität auf (Daten nicht gezeigt).

In Abb. 5.13 ist zu erkennen, daß im Gegensatz zu den parentalen AS52 im Klon AS52-ogg1-2 humanes Ogg1-Protein deutlich nachweisbar ist. Bei den Versuchen, bei denen mit Hilfe Ogg1-spezifischer Substrate die Enzymaktivität in den Zellextrakten bestimmt wurde, ist im transfizierten Klon eine deutlich erhöhte enzymatische Aktivität erkennbar. Die schwächere, aber deutlich detektierbare Enzymaktivität im Extrakt der Parental-Zellen ist wahrscheinlich auf das in den CHO-Zellen vorhandene Hamsterhomolog des Ogg1-Proteins zurückzuführen.

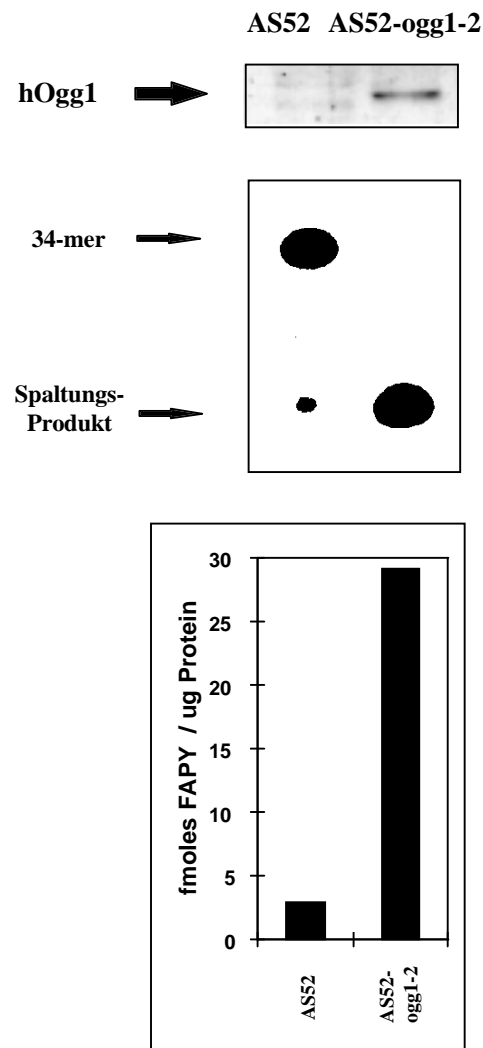


Abb. 5.13 Expression von *hOGG1* in parentalen AS52 und dem Klon AS52-ogg1-2. Die Proteinextrakte beider Zelllinien wurden analysiert auf hOgg1-Protein durch *Western Blot* (oberer Teil), auf 8-oxoG-Glykosylaseaktivität (mittlerer Teil) und FAPY-Guanin-Glykosylaseaktivität (unterer Teil).

#### 5.4.1.2 Auswirkungen der *hOGG1*-Überexpression auf den Steady-State-Level FPG-sensitiver DNA-Modifikationen

Zunächst wurde in Parental-Zellen und Transfektanten durch die Bestimmung der Steady-State-Level FPG-sensitiver DNA-Modifikationen untersucht, ob in Abhängigkeit des Grades der *hOGG1*-Überexpression eine Veränderung des Fließgleichgewichtes zwischen endogener Generierung und Reparatur FPG-sensitiver DNA-Modifikationen beobachtet werden kann. In Abb. 5.14 und Abb. 5.15 ist jeweils die Anzahl der DNA-Einzelstrangbrüchen und FPG-sensitiven Basenmodifikationen in unbehandelten Zellen dargestellt.

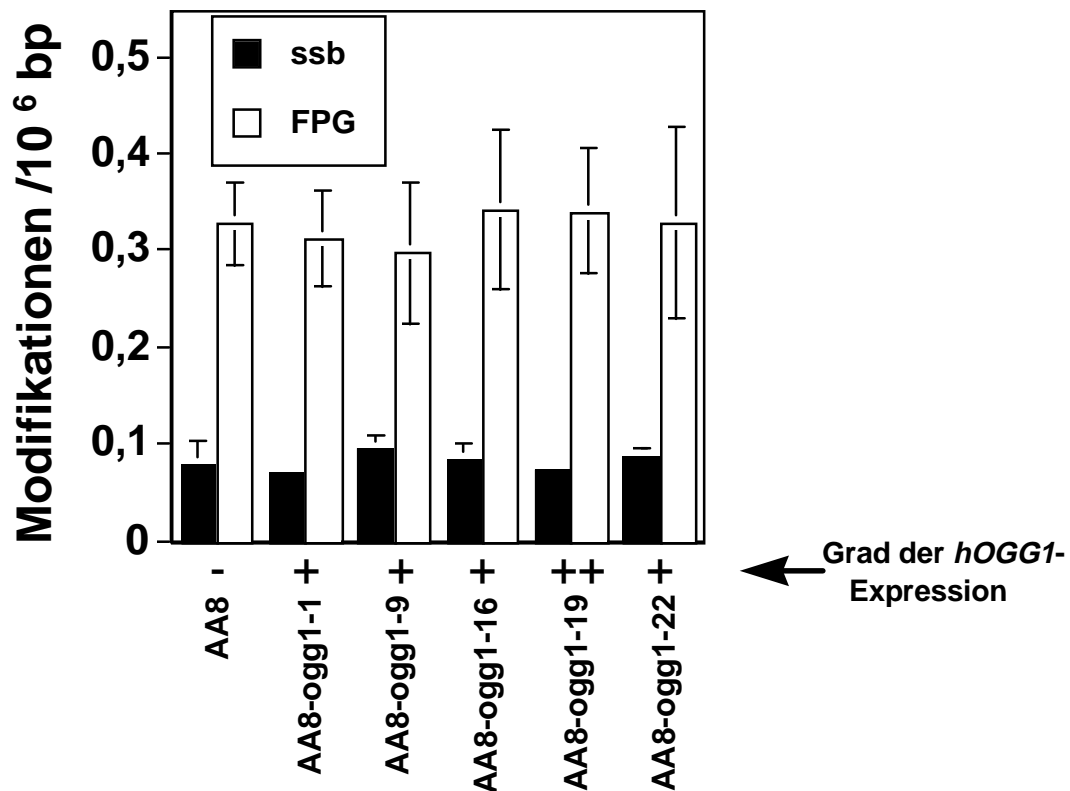


Abb. 5.14 Steady-State-Level von DNA-Einzelstrangbrüchen und FPG-sensitiven DNA-Modifikationen in unbehandelten AA8-Parental-Zellen und den Transfektanten-Klonen AA8-ogg1-1, AA8-ogg1-9, AA8-ogg1-16, AA8-ogg1-19 und AA8-ogg1-22 (n = 4-8).

Abb. 5.14 zeigt, daß sich zwischen den parentalen AA8-Zellen und ihren Transfektanten keine Veränderung im Steady-State-Level oxidativer DNA-Modifikationen ergeben hat.

Wie in Abb. 5.15 zu sehen ist, bewirkt die *hOGG1*-Überexpression auch in den AS52-Zellen keinerlei signifikante Veränderung im Steady-State-Level oxidativer DNA-Modifikationen gegenüber den Wildtyp- bzw. den *vector-only*-transfizierten Zellen.

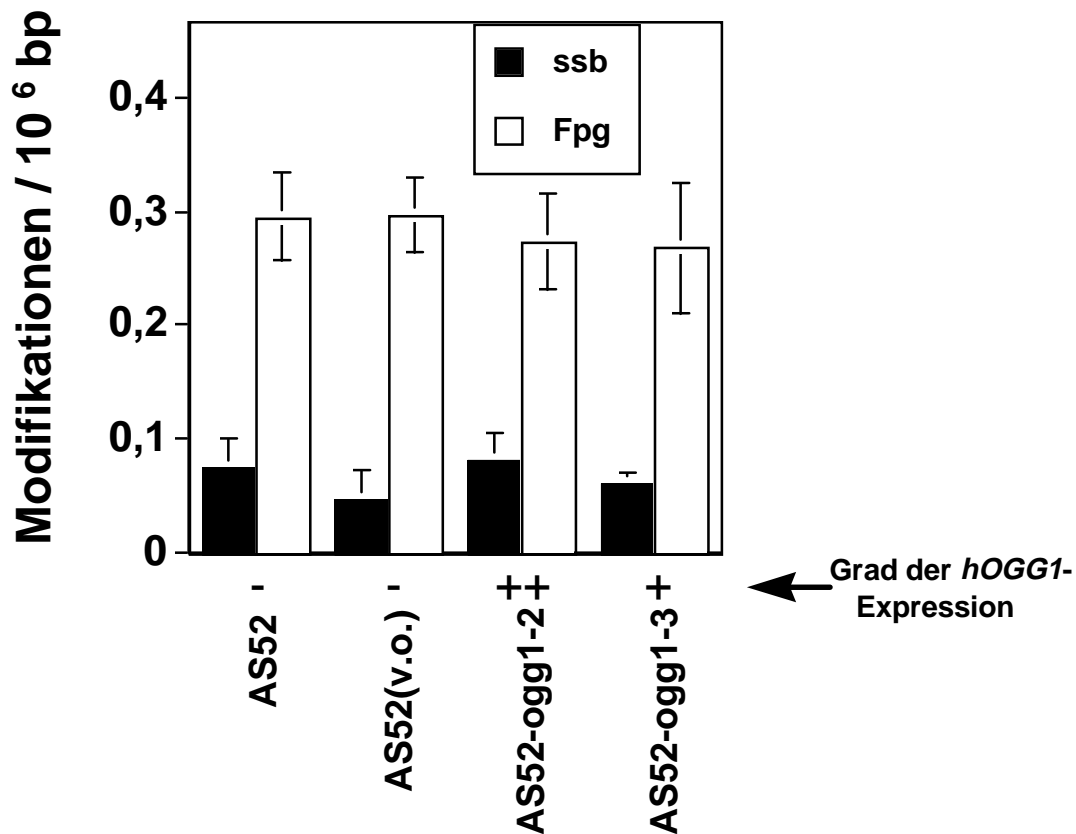


Abb. 5.15 Steady-State-Level von DNA-Einzelstrangbrüchen und FPG-sensitiven DNA-Modifikationen in unbehandelten AS52-Parental-Zellen, AS52 *vector-only*-transfizierten Zellen und Zellen der Transfektanten-Klone AS52-ogg1-2 und AS52-ogg1-3 (n = 4-8).

#### 5.4.1.3 Auswirkungen der *hOGG1*-Überexpression auf die Suszeptibilität gegenüber der Induktion oxidativer DNA-Schäden

Durch gleichartige Schädigungen der parentalen und transfizierten Zelllinien mit Ro 19-8022 und sichtbarem Licht oder Kaliumbromat sollte untersucht werden, ob die *hOGG1*-Überexpression einen Einfluß auf das Ausmaß des induzierten DNA-Schadens hat. In den folgenden Abbildung ist jeweils die Anzahl der DNA-Einzelstrangbrüche und der FPG-sensitiven Basenmodifikationen dargestellt, die ausschließlich durch das schädigende Agens erzeugt wurden. Dazu wurden also jeweils die in den unbehandelten Zellen vorliegenden Modifikationen subtrahiert.



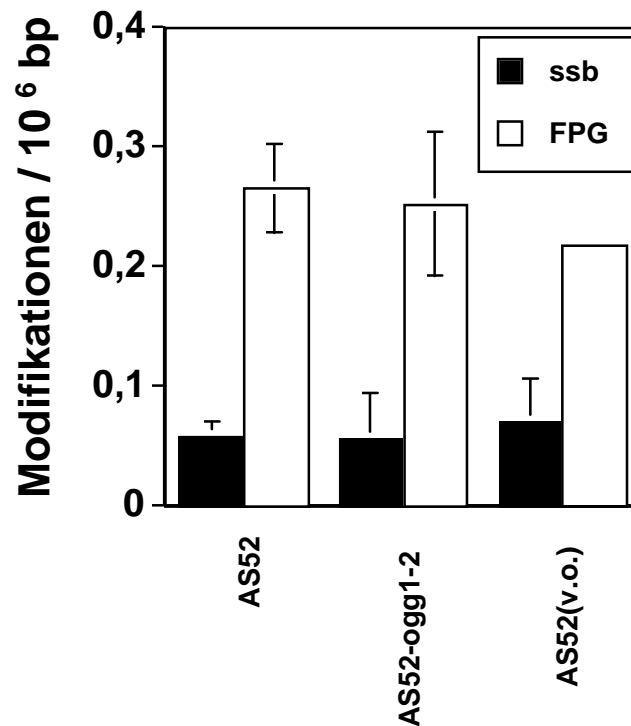


Abb. 5.16 Anzahl der DNA-Einzelstrangbrüche und FPG-sensitiven DNA-Modifikationen induziert durch 0,02  $\mu$ M Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m<sup>2</sup>; 400-800 nm) bei 0°C in AS52-Wildtyp-Zellen, AS52 *vector-only*-transfizierten Zellen und den AS52-ogg1-2 (n = 2-4).

Die durch Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht induzierten DNA-Schäden (Abb. 5.16 und Abb. 5.17) in den transfizierten Zellen unterscheiden sich nicht signifikant vom Schadensausmaß in den Kontrollen. Bei der Schädigung werden jeweils hauptsächlich FPG-sensitive Basenmodifikationen und wenige DNA-Einzelstrangbrüche generiert.

Die durch die Kaliumbromat-Schädigung induzierten Modifikationen in AS52-Zellen und ihren Transfektanten unterscheiden sich ebenfalls nicht signifikant voneinander (Abb. 5.18). Auch unter diesen Schädigungsbedingungen werden verhältnismäßig wenige DNA-Einzelstrangbrüche erzeugt.

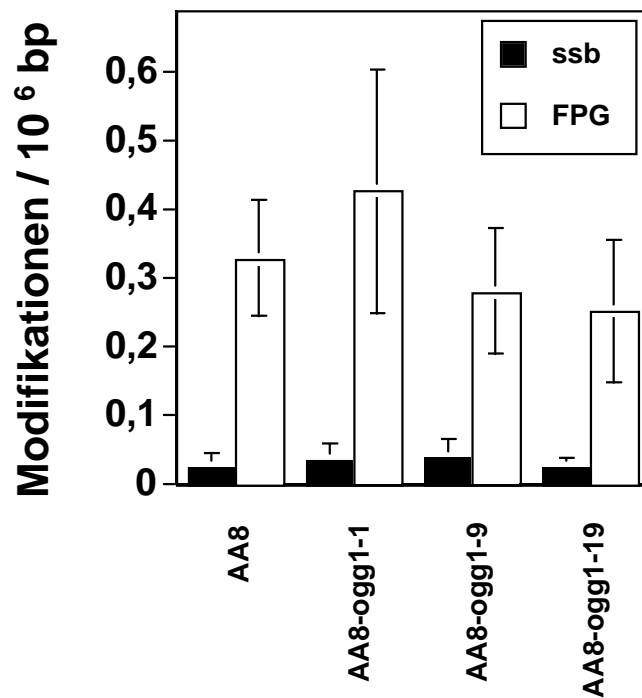


Abb. 5.17 Anzahl der DNA-Einzelstrangbrüche und FPG-sensitiven DNA-Modifikationen induziert durch 0.03  $\mu$ M Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m<sup>2</sup>; 400-800 nm) bei 0°C in AA8-Zellen und den Transfektanten-Klonen AA8-ogg1-1, AA8-ogg1-9, AA8-ogg1-16, AA8-ogg1-19 und AA8-ogg1-22 (n = 3-5).

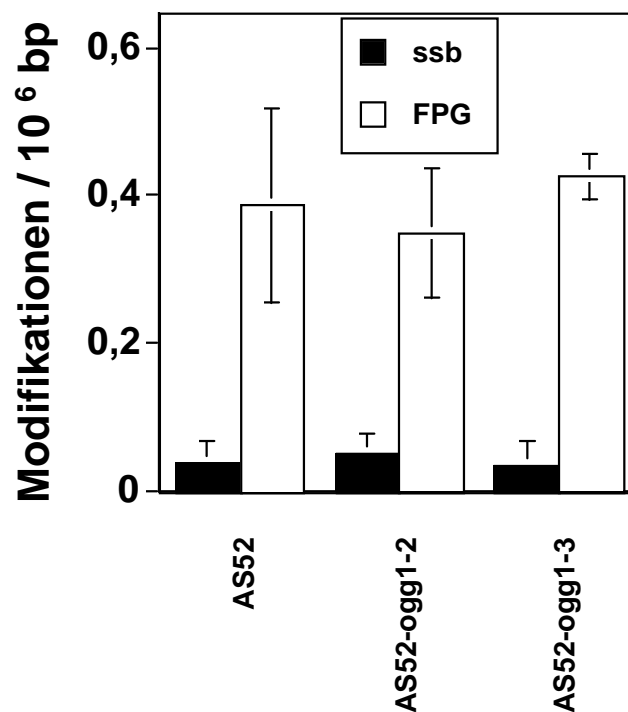


Abb. 5.18 Anzahl der DNA-Einzelstrangbrüche und FPG-sensitiven DNA-Modifikationen induziert durch Inkubation mit 20 mM Kaliumbromat für 5 min bei 37°C in AS52-Zellen und den Transfektantenzelllinien AS52-ogg1-2 und AS52-ogg1-3 (n = 4-6).

#### 5.4.1.4 Auswirkungen der *hOGG1*-Überexpression auf die Reparaturgeschwindigkeit oxidativer DNA-Schäden

Um den Einfluß der *hOGG1*-Überexpression auf die Reparaturvorgänge in CHO-Zellen zu untersuchen, wurden in verschiedenen Zelllinien die Reparaturgeschwindigkeit nach Induktion eines DNA-Schadens durch Ro 19-8022 und sichtbarem Licht oder Kaliumbromat bestimmt. Zur Bestimmung der Reparaturkinetiken wird die vorhandene Anzahl FPG-sensitiver Basenmodifikationen zu den verschiedenen Reparaturzeiten als prozentualer Anteil an dem Schadensausmaß zum Zeitpunkt 0 h (keine Reparatur) gegen die Reparaturzeit aufgetragen. Bei allen Werten wird die Anzahl FPG-sensitiver Basenmodifikationen, die in unbehandelten Zellen vorliegen (Steady-State-Level), subtrahiert. Auf die Reparatur der wenigen induzierten Einzelstrangbrüche wird im folgenden nicht näher eingegangen. Alle induzierten Einzelstrangbrüche waren nach spätestens 30 min komplett behoben.

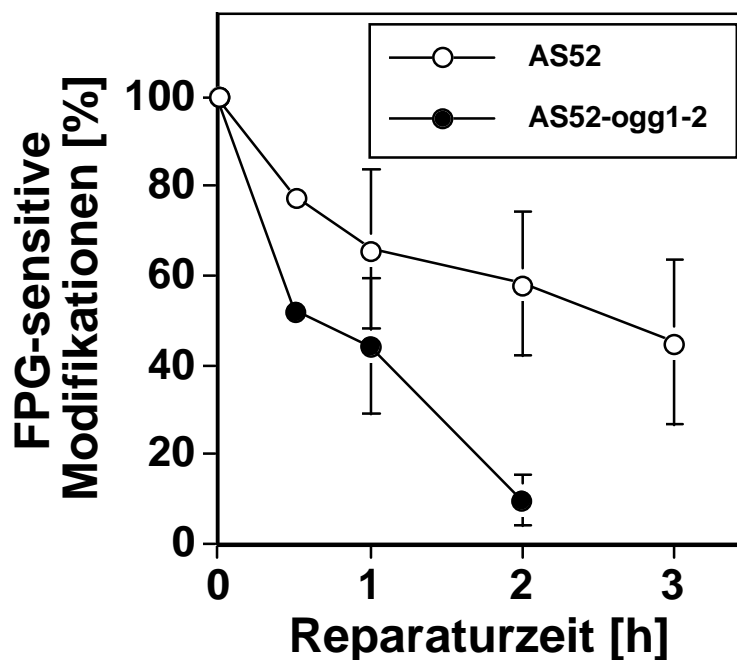


Abb. 5.19 Reparatur von FPG-sensitiven Basenmodifikationen in Kulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Schadensinduktion erfolgte durch 0.02 µM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m<sup>2</sup>; 400-800 nm) bei 0°C in AS52-Zellen und der Transfektantenzelllinie AS52-ogg1-2 (n = 2-3).

Die Reparaturkinetik für die AS52-Zellen und den Klon AS52-ogg1-2 ist in Abb. 5.19 dargestellt. Hier zeigt sich, daß die induzierten FPG-sensitiven Modifikationen in der *hOGG1*-transfizierten Zelllinie etwa 3-fach schneller als in den Wildtyp-Zellen repariert werden. Die

Reparaturhalbwertszeit beträgt in den parentalen AS52-Zellen etwa 2h, wohingegen sie im Transfektantenklon AS52-ogg1-2 etwa 30-45 min beträgt.

In Abb. 5.20 ist eine entsprechende Reparaturkinetik für die parentalen AA8-Zellen und den dazugehörigen Transfektantenklon AA8-ogg1-19 dargestellt. Auch hier werden in der *hOGG1*-überexprimierenden Zelllinie die FPG-sensitiven Modifikationen deutlich schneller entfernt als in den parentalen Zellen. Die Diskrepanz in den Reparaturkinetiken ist jedoch nicht ganz so deutlich wie in dem entsprechenden AS52-Zellpaar. Während die parentalen AA8 eine Reparaturhalbwertszeit von etwa 90 min aufweisen, liegt die Reparaturhalbwertszeit in den AA8-ogg1-19 bei etwa 30 min.

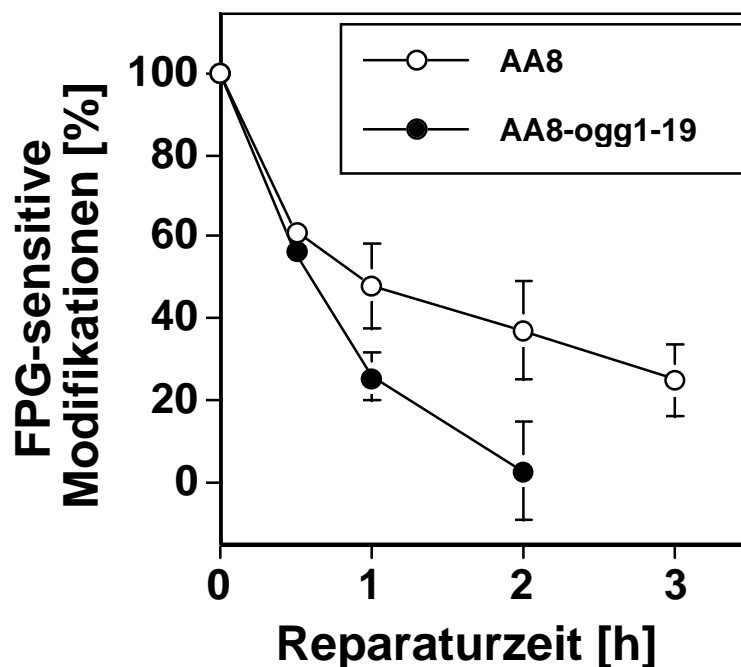


Abb. 5.20 Reparatur von FPG-sensitiven Basenmodifikationen in Kulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Schadensinduktion erfolgte durch 0.03 µM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m<sup>2</sup>; 400-800 nm) bei 0°C in AA8-Zellen und der Transfektantenzelllinie AA8-ogg1-19 (n = 2-3).

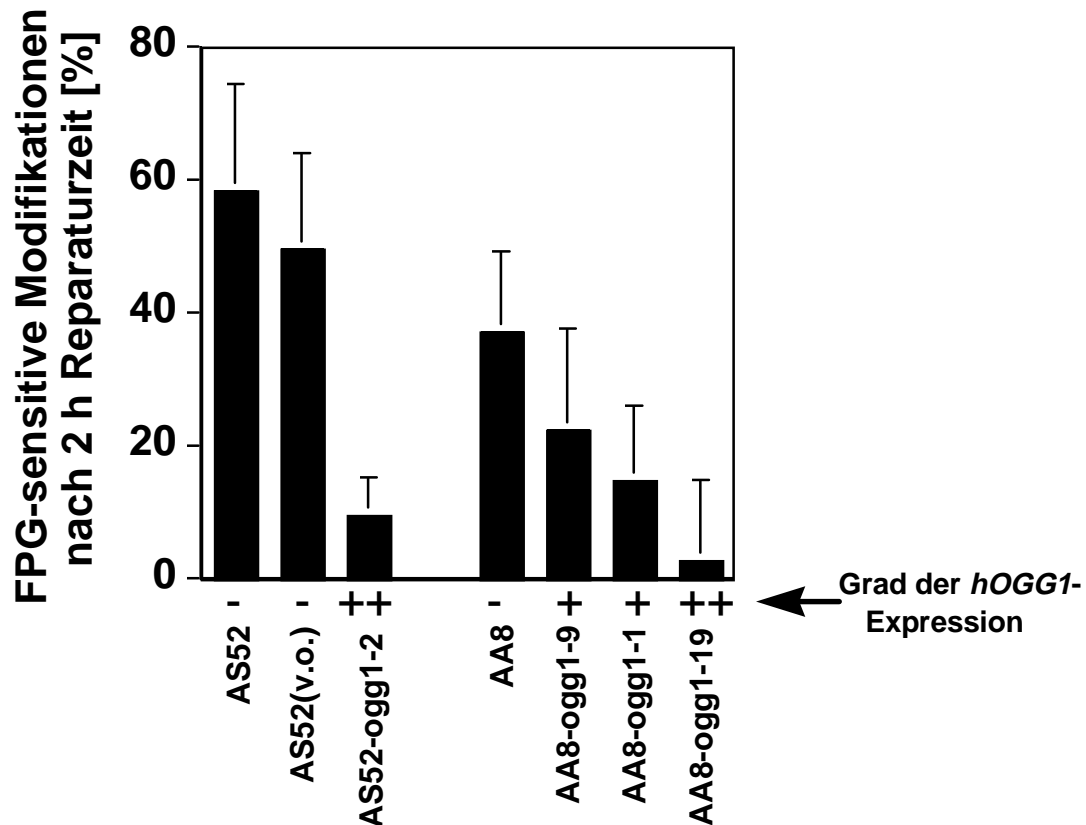


Abb. 5.21 Relative Anzahl von FPG-sensitiven Basenmodifikationen nach 2 h Reparatur in Kulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Schadensinduktion erfolgte durch 0.02 µM bzw. 0.03 µM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m<sup>2</sup>; 400-800 nm) bei 0°C in parentalen AS52- und AA8-Zellen und verschiedenen Transfektantenzelllinien (n = 2-3).

Eine Zusammenfassung der 2 h-Reparaturwerte verschiedener Zelllinien unter Berücksichtigung des Grades der *hOGG1*-Überexpression ist in Abb. 5.21 wiedergegeben. Die Einstufung des Expressionsgrades wurde schätzungsweise anhand der *Western Blots* und der Enzymaktivitätsmessungen im Zellextrakt durchgeführt (s. Kapitel 5.4.1.1). Wie die Abbildung zeigt, kann man eine Korrelation zwischen den Reparaturraten und dem Grad der Genexpression in den transfizierten Zellen feststellen.

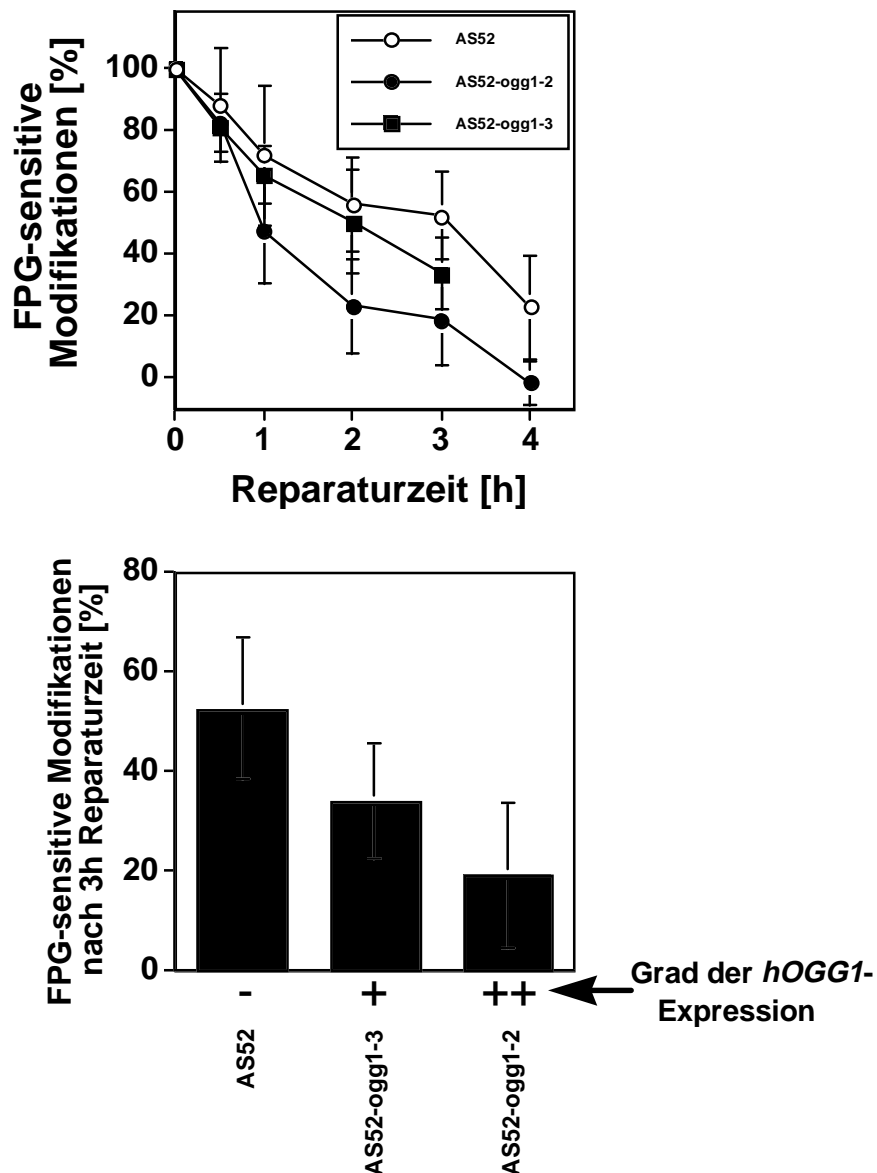


Abb. 5.22 Reparatur von FPG-sensitiven Basenmodifikationen in Kulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Schadensinduktion erfolgte durch Inkubation mit 20 mM Kaliumbromat für 5 min bei 37°C in AS52-Zellen und den Transfektantenzelllinien AS52-ogg1-2 und AS52-ogg1-3 (n = 2-3).

Nachdem in den vorangegangenen Reparaturexperimenten (Abb. 5.19 bis 5.21) die Schadensinduktion jeweils mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022 und sichtbarem Licht erfolgte, wurden in den in Abb. 5.22 dargestellten Experimenten die Induktion des DNA-Schadens mit Kaliumbromat vorgenommen. In Abb. 5.22 sind also die Reparaturgeschwindigkeiten in AS52-Zellen und den dazugehörigen Transfektanten nach Schädigung mit Kaliumbromat zusammengefasst. Die Reparaturkinetiken im oberen Teil der Abbildung zeigen ähnliche Verläufe wie die der entsprechenden Zelllinien nach Schädigung mit Ro 19-8022 in Anwesenheit von Licht. Auch hier ist die Reparatur in dem stark *hOGG1*-überexprimierenden Klon AS52-ogg1-2 deutlich schneller als in den parentalen AS52-Zellen.

Die Reparaturgeschwindigkeit des Klons AS52-ogg1-3 liegt zwischen der parentalen und der AS52-ogg1-2-Zellen. Auch anhand der 3 h-Reparaturwerte (unterer Teil Abb. 5.22) kann wiederum die Korrelation der Reparaturgeschwindigkeit mit dem Grad der *hOGGI*-Expression gezeigt werden.

## 5.4.2 Auswirkungen eines *mOGGI*-Ausfalls (*knock-out*) in Mäusezellen

Während der praktischen Arbeiten zur vorliegenden Dissertationsschrift gelang **T. Lindahl und Mitarbeitern** die Herstellung von *mOGGI*(-/-)-*knock-out*-Mäusen. Durch die Bereitstellung von solchen *knock-out*-Tieren und daraus etablierten Zelllinien wurde die Bearbeitung der Fragestellung, was ein kompletter Ausfall des *OGGI*-Gens für die DNA in Säugetieren bedeutet, ermöglicht.

### 5.4.2.1 Auswirkungen des *mOGGI*-Ausfalls auf den Steady-State-Level FPG-sensitiver DNA-Modifikationen in Mäusefibroblasten

Zu einer ersten Überprüfung, inwieweit der Steady-State-Level bei einem kompletten Wegfall des *OGGI*-Genproduktes beeinflusst wird, wurde in den permanenten Zelllinien F11.1 (*mOGGI*(+/+)-Wildtyp-Kontrollzellen) und 1.2 (*mOGGI*(-/-)-*knock-out*-Zellen) die Anzahl der DNA-Einzelstrangbrüche und FPG-sensitiven Basenmodifikationen bestimmt.

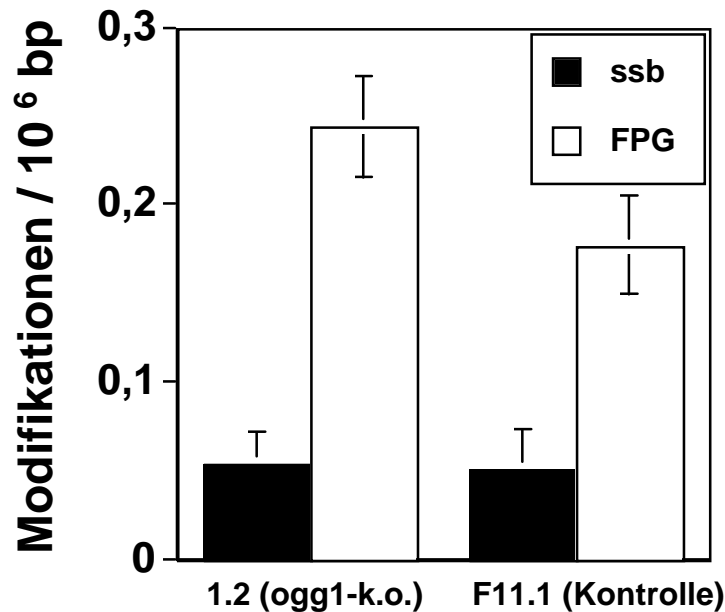


Abb. 5.23 Steady-State-Level von DNA-Einzelstrangbrüchen und FPG-sensitiven DNA-Modifikationen in unbehandelten 1.2 (*mOGGI(-/-)*-knock-out-Zellen) und F11.1 (*mOGGI(+/-)*-Kontrollzellen) (n = 5).

Wie aus Abb. 5.23 ersichtlich, ist in den *mOGGI(-/-)*-knock-out-Zellen gegenüber den Kontrollzellen die Anzahl FPG-sensitiver Modifikationen um etwa den Faktor 1.4 erhöht (Signifikanz  $p \leq 0.005$ ). Die Anzahl der DNA-Einzelstrangbrüche bleibt währenddessen völlig unbeeinflusst.

#### 5.4.2.2 Auswirkungen des *mOGGI*-Ausfalls auf den Steady-State-Level FPG-sensitiver DNA-Modifikationen in primären Mäuse-Hepatocyten

Um beurteilen zu können, inwieweit sich die Steady-State-Level der untersuchten Mäusezelllinien mit denen primärer Mäuse-Zellen decken, wurden durch Leberperfusion frisch isolierte Hepatocyten (s. Kapitel 4.2.1.3.4) von *mOGGI(+/-)*-Wildtyp-Mäusen und *mOGGI(-/-)*-knock-out-Mäusen untersucht. In einem Vorversuch wurden außerdem Hepatocyten einer gentechnisch unveränderten, jungen, männlichen Labormaus nach Isolierung der Hepatocyten auf die gleiche Weise charakterisiert. In allen Proben wurden die Anzahl der DNA-Einzelstrangbrüche (Daten nicht gezeigt) und FPG-sensitiven Basenmodifikationen mit Hilfe der Alkalischen Elution bestimmt.



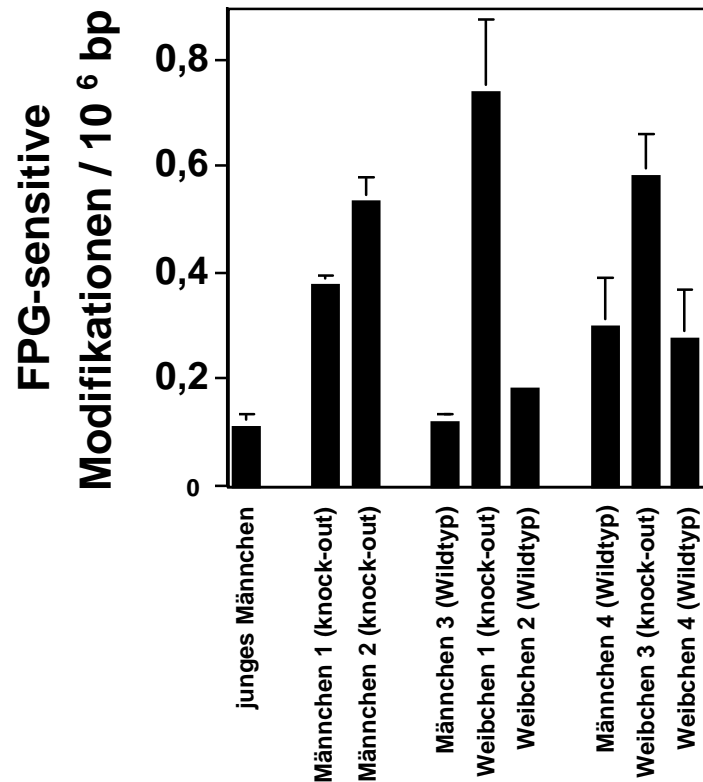


Abb. 5.24 Steady-State-Level von FPG-sensitiven DNA-Modifikationen in frisch isolierten und unbehandelten Hepatocyten von *mOGGI(+/+)*-Wildtyp-Mäusen, *mOGGI(-/-)*-knock-out-Mäusen und einer jungen, männlichen Maus. Jede der 4 Säulengruppen stellt einen Versuch dar (Isolierung der Hepatocyten und jeweils parallele Bestimmung der DNA-Modifikationen in einem Alkalischen-Elutions-Experiment) ( $n = 1$ ).

In Abb. 5.24 kann deutlich erkannt werden, daß die in den Mäuse-Hepatocyten bestimmte Anzahl an FPG-sensitiven Modifikationen stark variiert und in einem Bereich zwischen 0.1 und 0.7 Modifikationen pro  $10^6$  bp liegt. Dabei weisen die Hepatocyten der *mOGGI(-/-)*-knock-out Tiere deutlich höhere Werte als die der Wildtyp-Tiere auf. In Abb. 5.25 sind alle Durchschnittswerte (ohne das junge männliche Tier) graphisch dargestellt. Hieran zeigt sich, daß die Steady-State-Level der *mOGGI(-/-)*-knock-out-Tiere gegenüber dem der *mOGGI(+/+)*-Wildtyp Tiere in diesem Zelltyp durchschnittlich um den Faktor 2.5 erhöht ist (Signifikanz  $p \leq 0.005$ ). Ein signifikanter geschlechtspezifischer Unterschied kann aus der kleinen Datenzahl nicht abgelesen werden.

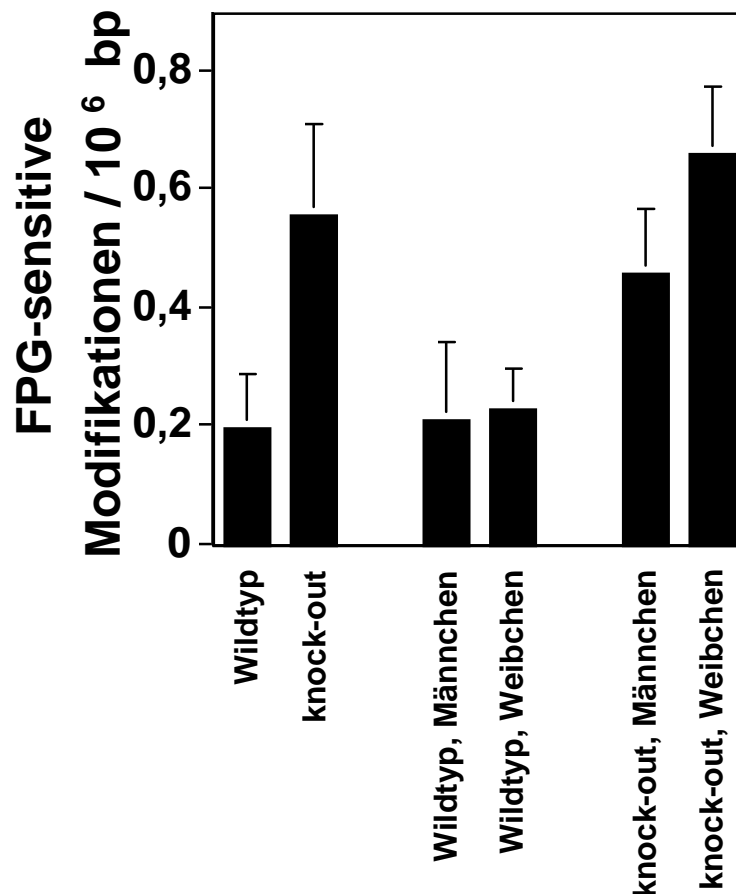


Abb. 5.25 Durchschnittswerte (Abb. 5.24) der Steady-State-Level von FPG-sensitiven DNA-Modifikationen (Netto) in frisch isolierten und unbehandelten Hepatocyten von *mOGGI(+/+)*-Wildtyp-Mäusen und *mOGGI(-/-)*-knock-out-Mäusen (n = 2-4).

#### 5.4.2.3 Auswirkungen des *mOGGI*-Ausfalls auf die Suszeptibilität gegenüber der Induktion oxidativer DNA-Schäden

Eine Schädigung der *mOGGI(-/-)*-Zelllinie (1.2) und der *mOGGI(+/+)*-Kontrollzelllinie (F11.1) mit Ro 19-8022 und sichtbarem Licht sollte zeigen, ob der Ausfall des *OGGI*-Gens die Induktion oxidativer DNA-Schäden beeinflusst. Abb. 5.26 zeigt die Anzahl der induzierten DNA-Modifikationen, wobei jeweils die Steady-State-Level der einzelnen Modifikationen subtrahiert sind. Aus der Abbildung ist zu entnehmen, daß in beiden Zelllinien etwa 0,3 FPG-sensitive Basenmodifikationen pro 10<sup>6</sup> bp unter den gegebenen Bedingungen induziert werden

und daß die Suszeptibilität gegenüber der oxidativen DNA-Schäden durch den Ausfall des *OGGI*-Genproduktes unbeeinflusst bleibt.

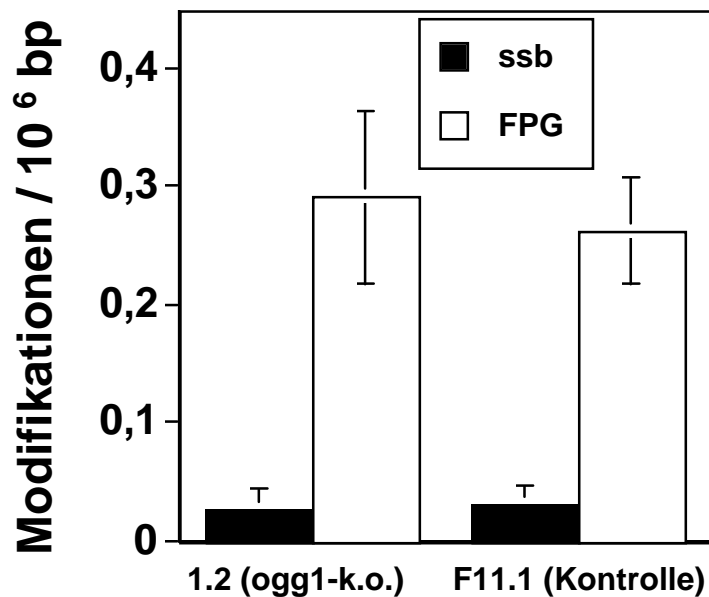


Abb. 5.26 Anzahl der DNA-Einzelstrangbrüche und FPG-sensitiven DNA-Modifikationen induziert durch 0,03  $\mu$ M Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m<sup>2</sup>; 400-800 nm) bei 0°C in 1.2 (*mOGGI(-/-)*-knock-out-Zellen) und F11.1 (*mOGGI(+/+)*-Kontrollzellen) (n = 6).

#### 5.4.2.4 Auswirkungen des *mOGGI*-Ausfalls auf die Reparaturgeschwindigkeit oxidativer DNA-Schäden

Da sich bei der Überexpression des *hOGGI*-Gens in CHO-Zelllinien eine deutliche Beeinflussung oxidativer DNA-Schäden erst beim Vergleich der jeweiligen Reparaturgeschwindigkeiten zeigte, wurden die Mäuse-Zelllinien ebenfalls hinsichtlich ihrer Reparaturgeschwindigkeiten untersucht. Das Vorgehen war analog (s. Kapitel 5.4.1.4). Der Schaden wurde durch eine Behandlung mit Ro 19-8022 und sichtbarem Licht in den *mOGGI(-/-)*-knock-out-Zellen (1.2) und *mOGGI(+/+)*-Kontrollzellen (F11.1) induziert (Abb. 5.26). Daraufhin wurde der verbliebene Schaden zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt und wie in Abb. 5.27 dargestellt gegen die Reparaturzeit aufgetragen. Die induzierten Einzelstrangbrüche waren in beiden Zelllinien nach spätestens 30 min komplett repariert (Daten nicht gezeigt.).

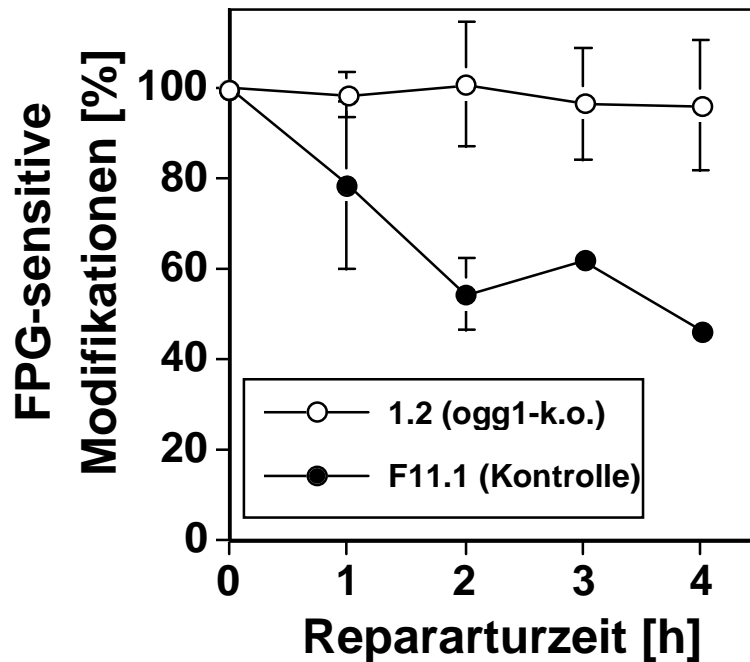


Abb. 5.27 Reparatur von FPG-sensitiven Basenmodifikationen in Kulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Schadensinduktion erfolgte durch 0.03 µM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m<sup>2</sup>; 400-800 nm) bei 0°C in 1.2 (*mOGGI(-/-)*-knock-out-Zellen) und F11.1 (*mOGGI(+/+)*-Kontrollzellen) (n = 2-3).

Die Abb. 5.27 zeigt stark unterschiedliche Reparaturkinetiken. Während in der Wildtyp-Zelllinie F11.1 die Anzahl der induzierten FPG-sensitiven Modifikationen nach etwa 2 h halbiert ist, ist in der *Knock-out*-Zelllinie 1.2 selbst nach 4 h Reparaturzeit noch keine signifikante Reparatur der induzierten FPG-sensitiven Basenmodifikationen nachweisbar. Aufgrund dieses Befundes wurden zusätzlich zu späteren Reparaturzeitpunkten (8 h und 16 h) die verbliebenen FPG-sensitiven Basenmodifikationen bestimmt. In Abb. 5.28 sind die Reparaturkinetiken der Abb. 5.27 um die jeweiligen 8 h und 16 h-Reparaturwerte beider Zelllinien ergänzt. Da bei diesen langen Reparaturzeiten die „Verdünnung“ der induzierten FPG-sensitiven Basenmodifikationen durch die fortlaufende Zellteilung nicht mehr unberücksichtigt bleiben konnte, wurden die verbliebenen Modifikationen nach 8 h und 16 h um die jeweilige Proliferationsrate korrigiert. Diese wurde in Parallelansätzen durch Zellzählung bestimmt.

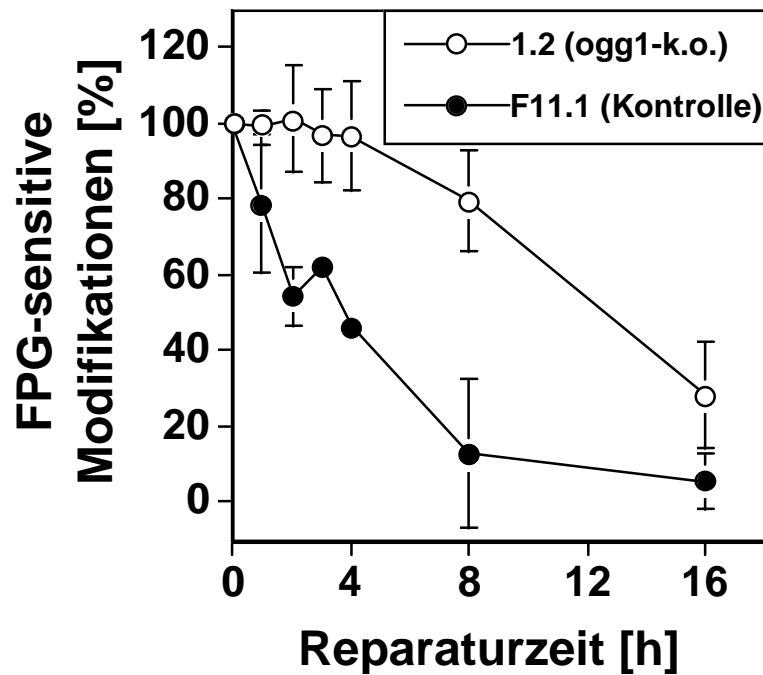


Abb. 5.28 Reparatur von FPG-sensitiven Basenmodifikationen in Kulturmedium bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Schadensinduktion erfolgte durch 0.03 µM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m<sup>2</sup>; 400-800 nm) bei 0°C in 1.2 (*mOGGI(-/-)*-knock-out-Zellen) und F11.1 (*mOGGI(+/+)*-Kontrollzellen) (n = 2-4).

Wie aus Abb. 5.28 ersichtlich, nimmt der induzierte Schaden nach 4 h in den Kontrollzellen F11.1 weiter ab und ist nach etwa 8 h Reparaturzeit nahezu vollständig repariert. Die Kinetik der *Knock-out*-Zelllinie 1.2 zeigt dagegen nach 8 h die ersten Anzeichen einer Reparatur FPG-sensitiver Basenmodifikationen. Nach 16 h Reparaturzeit ist auch in den *mOGGI*-knock-out-Zellen eine deutliche Reparatur zu verzeichnen. Der Schaden ist in den *Knock-out*-Zellen zu diesem Zeitpunkt auf durchschnittlich 30 % des Ausgangsschadens zurückgegangen.

## 5.5 Untersuchung des Einflusses der 8-oxoG-Glykosylase (Ogg1) auf Mutagenese und Zelltoxizität

Um herauszufinden, ob die wesentlich schnellere Reparatur von FPG-sensitiven Basenmodifikationen in den *hOGGI*-transfizierten CHO-Zellen auch mit einer Verminderung induzierter und vielleicht auch spontaner Mutationen einhergeht, wurden AS52-Zellen und verschiedene Transfektanten hinsichtlich ihrer Mutationsraten im *gpt*-Locus untersucht.

Ebenso sollte auch der Einfluß der *hOGG1*-Überexpression auf die Zelltoxizität in CHO-Zellen bestimmt werden.

### 5.5.1 Mutagenität und Zelltoxizität induziert durch Ro 19-8022 und sichtbares Licht

Da die Reparatur von durch Ro 19-8022 und sichtbarem Licht induzierten Modifikationen in dem Klon AS52-ogg1-2 gegenüber den AS52 Wildtyp-Zellen sich als deutlich schneller erwies, wurden mit diesem Zellpaar Mutationstests durchgeführt. Dabei wurden wesentlich höhere Konzentrationen des Photosensibilisators Ro 19-8022 als bei der Ermittlung der Reparaturgeschwindigkeiten eingesetzt. In Abb. 5.29 ist die Anzahl der induzierten Mutationen im *gpt-Locus* für beide Zelllinien angegeben.

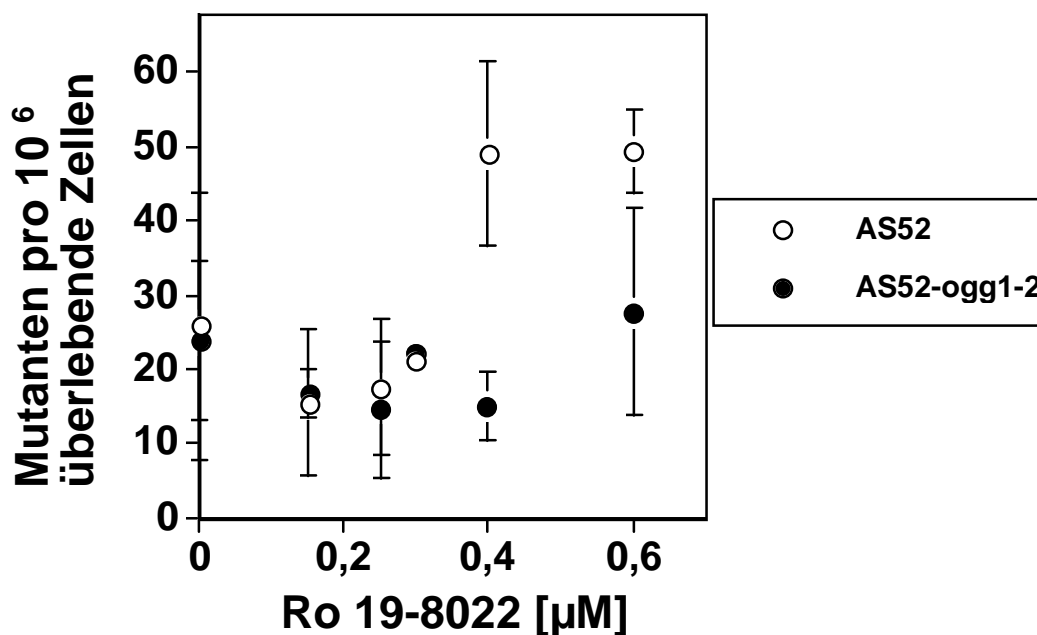


Abb. 5.29 Induzierte *gpt*-Mutanten infolge einer Schädigung mit verschiedenen Konzentrationen Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m<sup>2</sup>; 400-800 nm) bei 0°C in AS52-Zellen und der Transfektantenzelllinie AS52-ogg1-2 (n = 2-8).

Wie aus Abb. 5.29 hervorgeht, läßt sich in den Wildtyp-Zellen nur eine maximal 2-fache Erhöhung gegenüber der spontanen Mutationszahl mit den angegebenen Ro 19-8022-Konzentrationen erzielen. Eine höhere Schädigung ist wegen der schnell ansteigenden Zelltoxizität (Abb. 5.30) nicht möglich. Zwar liegt die Mutationszahl der *hOGG1*-

überexprimierenden Zelllinie unter der der Wildtyp-Zellen, es kann aber wegen der insgesamt sehr niedrigen Erhöhung der Mutationsraten keine klare Aussage über den Einfluß der *OGG1*-Expression gemacht werden.

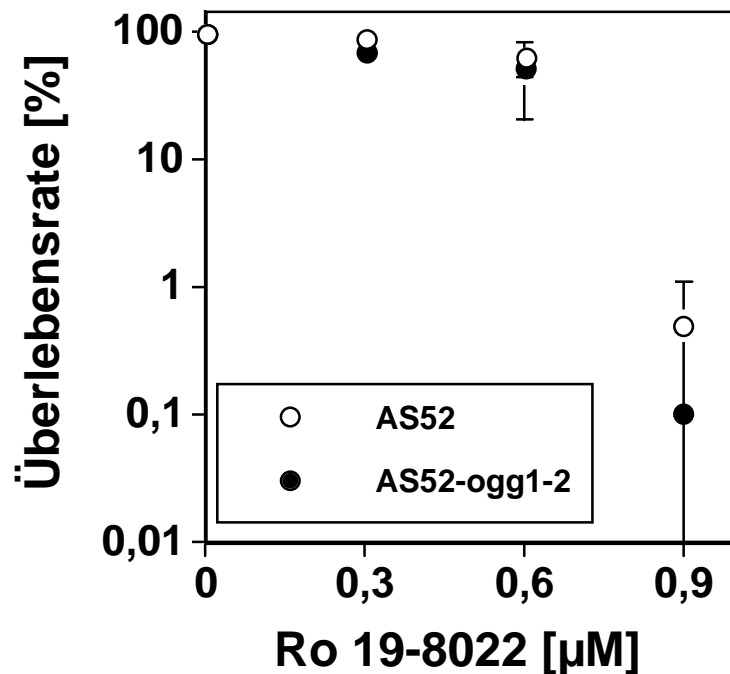


Abb. 5.30 Induzierte Zelltoxizität (*Cloning Efficiency*) infolge einer Schädigung mit verschiedenen Konzentrationen Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht ( $166 \text{ kJ/m}^2$ ; 400-800 nm) bei  $0^\circ\text{C}$  in AS52-Zellen und der Transfektantenzelllinie AS52-ogg1-2 ( $n = 2-3$ ).

Aus Abb. 5.30 kann abgeleitet werden, daß die *hOGG1*-Überexpression zu keiner signifikanten Veränderung der Zelltoxizität des Photosensibilisators Ro 19-8022 führt. In beiden Zelllinien wird bei höheren Ro 19-8022-Konzentrationen als  $0,6 \mu\text{M}$  ein starker Abfall der Überlebensraten verzeichnet.

### 5.5.2 Mutagenität und Zelltoxizität induziert durch Kaliumbromat

Da die Zahl der durch Ro 19-8022 induzierten Mutationen (s. Kapitel 5.5.1) nur sehr niedrig war, wurden analoge Mutationstest mit AS52-Wildtyp-Zellen und dem Transfektantenklon AS52-ogg1-2 auch nach Schädigung mit hohen Kaliumbromat-Konzentrationen bei 15-minütiger Inkubation durchgeführt. In Abb. 5.31 ist die Zahl der so induzierten Mutationen im

*gpt-Locus* für beide Zelllinien angegeben. Durch die Kaliumbromat-Schädigung konnten bei geringerer Zelltoxizität ein Vielfaches der bei der Ro 19-8022-Schädigung induzierten Anzahl an *gpt*-Mutanten erzielt werden. Dabei wird für beide Zelllinien ein biphasischer Verlauf der Mutationshäufigkeiten mit steigende Kaliumbromat-Konzentrationen vorgefunden. Im ersten Kurvenviertel wird nur eine schwache Zunahme, im weiteren Verlauf eine stärkere lineare Zunahme der Mutantenzahl beobachtet. Die durchschnittliche Anzahl der induzierten Mutanten in der *hOGG1*-transfizierten Zelllinie liegt bei allen Konzentrationen unter der Anzahl induzierter Mutanten in den Wildtyp-Zellen. Die Erniedrigung ist aber bei keiner Kaliumbromat-Konzentration statistisch signifikant.

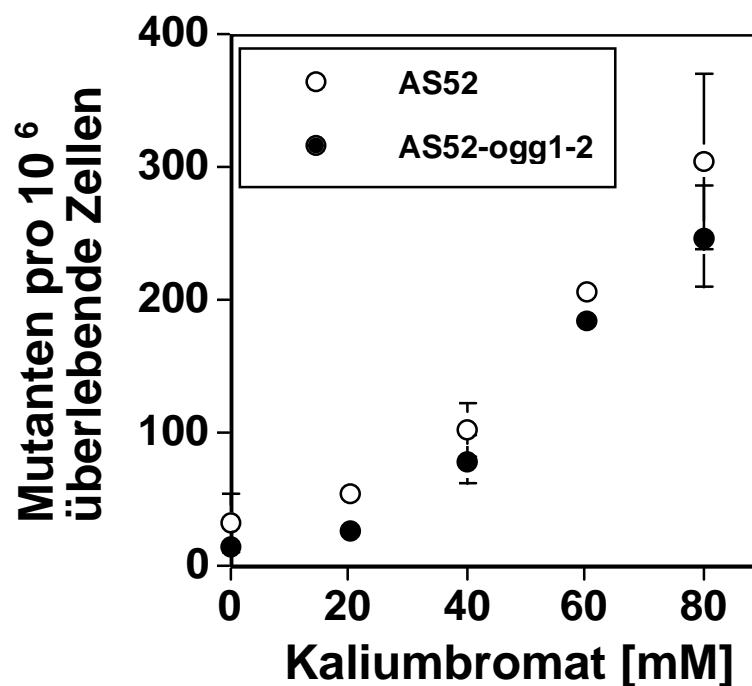


Abb. 5.31 Induzierte *gpt*-Mutanten infolge einer Schädigung mit verschiedenen Konzentrationen Kaliumbromat für 15 min bei 37°C in AS52-Zellen und der Transfektantenzelllinie AS52-ogg1-2 (n = 2-7).

In Abb. 5.32 ist der Verlauf der durch die Kaliumbromatschädigung bedingten Zelltoxizität in den beiden Zelllinien wiedergegeben. Im Gegensatz zur Schädigung mit Ro 19-8022 ist mit steigenden Kaliumbromat-Konzentrationen eine streng lineare Abnahme der Überlebensrate gegeben. Auch hier ist der Zelltoxizitäts-Verlauf in den Wildtypzellen AS52 und *hOGG1*-transfizierten Zellen nicht durch die verstärkte Genexpression beeinflusst.



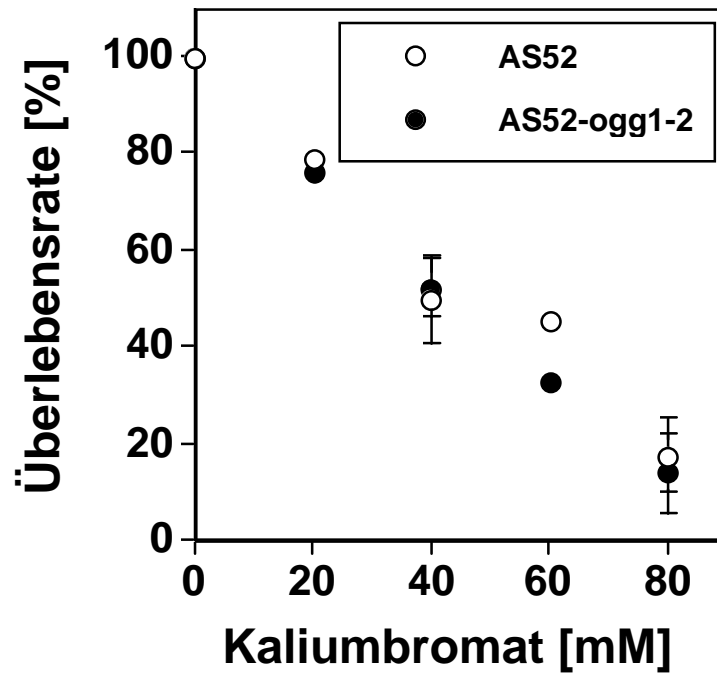


Abb. 5.32 Induzierte Zelltoxizität (*Cloning Efficiency*) infolge einer Schädigung mit verschiedenen Konzentrationen Kaliumbromat für 15 min bei 37°C in AS52-Zellen und der Transfektantenzelllinie AS52-ogg1-2 (n = 1-4).

### 5.5.3 Spontane Mutationsraten

In verschiedenen Zelllinien wurde die zeitliche Zunahme spontaner *gpt*-Mutationen bestimmt, um zu untersuchen, ob die erhöhte Ogg1-Enzymaktivität eine verminderte spontane Mutationsrate bedingt. Zu diesem Zweck wurden Zellkulturen der verschiedenen Zelllinien zunächst durch die Kultivierung in einem *Cleansing Medium* (MPA-Medium) von bereits vorhandenen *gpt*-Mutanten befreit (Zeitpunkt: 0 Generationen) und dann für etwa 70 Generationen in Routinemedium kontinuierlich kultiviert (s. Kapitel 4.2.11.3). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde dann in einem Teil der jeweiligen Zellkulturen durch Selektion mit 6-Thioguanin (6TG) die Anzahl der spontan aufgetretenen Mutanten bestimmt. In den beiden dargestellten Experimenten wurden pro Zelllinie und Versuch jeweils zwei unabhängige Zellkulturen untersucht (unabhängige Doppelbestimmung). Wie in den Abbildungen 5.33 und 5.34 zu sehen ist, kann in allen Zellkulturen der verschiedenen Zelllinien eine lineare Zunahme der *gpt*-Mutanten beobachtet werden (s. auch Tab. 5.1). Die Mutationsraten sind also konstant. Bei einem Vergleich der jeweiligen Werte der Doppelbestimmungen zeigt sich auch eine hohe Reproduzierbarkeit der einzelnen Mutationsraten.

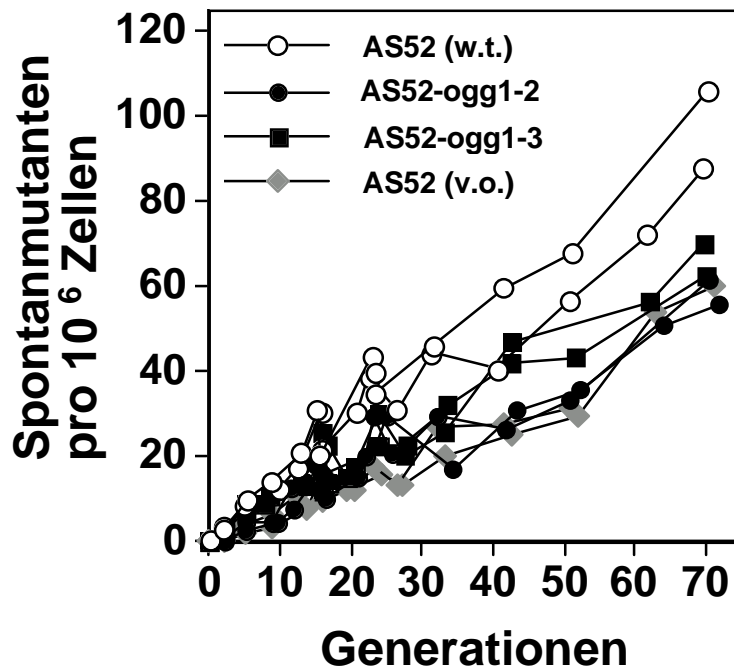


Abb. 5.33 Spontane *gpt*-Mutanten in AS52-Wildtyp-Zellen, AS52-ogg1-2, AS52-ogg1-3 und AS52 *vector-only*-transfizierten Zellen nach verschiedenen Zeiten (Generationen) (jeweils Doppelbestimmung).

In Abb. 5.33 ist ein Versuch mit AS52-Wildtyp-Zellen, AS52-ogg1-2, AS52-ogg1-3 und AS52 *vector-only*-transfizierten Zellen dargestellt. Wenn aus den Daten dieser Abbildung die Geradensteigungen der einzelnen Zelllinien mittels linearer Regression ermittelt werden, so ergeben sich die in Tab. 5.1 angegebenen Werte. Dabei stellen die Geradensteigungen die Mutationsfrequenzen im *gpt*-Locus einer Millionen Zellen pro Generation der jeweiligen Zelllinie dar. Hierbei zeigt sich, daß die Mutationsraten der beiden *OGG1*-überexprimierenden Klone AS52-ogg1-2 und AS52-ogg1-3 signifikant unter der Mutationsrate der AS52-Wildtyp-Zellen liegen. Ebenso liegt aber auch die Mutationsrate der AS52 *vector-only*-transfizierten Zellen unter derjenigen der Wildtyp-Zellen. Eine Beeinflussung der Spontanmutationsraten durch die *OGG1*-Überexpression kann somit nicht abgeleitet werden.

Zelllinie	Mutationsrate pro $10^6$ Zellen
AS52 (w.t.)	$1.39 \pm 0.07$
AS52-ogg1-2	$0.79 \pm 0.05$
AS52-ogg1-3	$0.96 \pm 0.04$
AS52 (v.o.)	$0.68 \pm 0.05$

Tab. 5.1 Mutationsfrequenz im *gpt-Locus* je Generation (entsprechend den Steigungen der Geraden aus Abb. 5.33) in AS52-Wildtyp-Zellen, AS52-ogg1-2, AS52-ogg1-3 und AS52 *vector-only*-transfizierten Zellen.

Um ausschließen zu können, daß die reduzierten Mutationsraten dieser drei Transfektanten auf die Supplementierung des Kulturmediums mit G418 (Geneticinsulfat), das zur Selektion auf die mit der Transfektion erworbenen Neomycin-Resistenz eingesetzt wird, zurückzuführen ist, wurde das in Abb. 5.34 dargestellte Experiment durchgeführt. In diesem Versuch wurde neben den AS52-Wildtyp-Zellen und dem Klon AS52-ogg1-3, auch der Klon AS52-ogg1-1 eingesetzt, der zwar mit dem Plasmid pPR65 transfiziert wurde, aber – wie die *vector-only*-Kontrollzellen – nur die Neomycin-Resistenz und nicht das *hOGG1*-Gen exprimiert. Dazu wurden jeweils zwei Zellkulturen des Klons AS52-ogg1-1 während des gesamten Versuchs mit und ohne G418 im Routinemedium kultiviert.

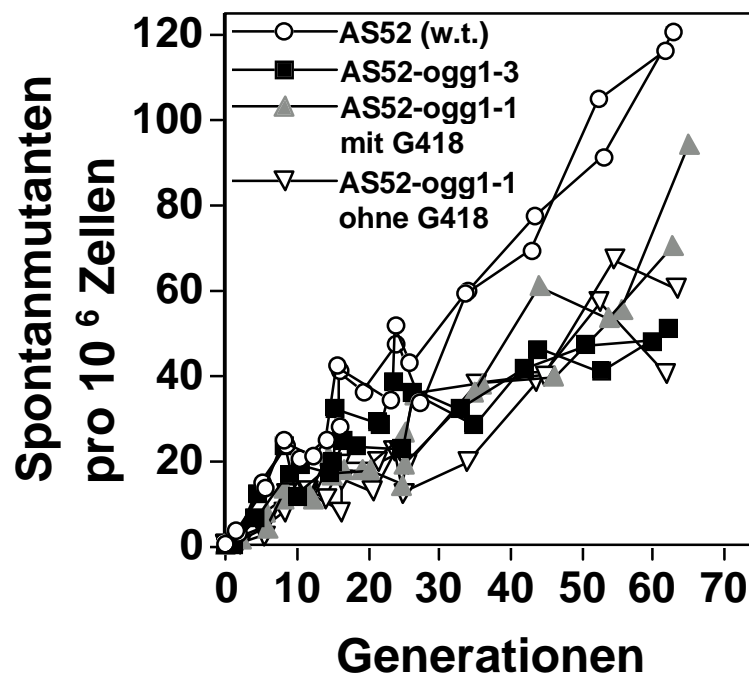


Abb. 5.34 Spontane *gpt*-Mutanten in AS52-Wildtyp-Zellen, AS52-ogg1-3 und AS52-ogg1-1 mit und ohne Geneticinzusatz (G418) im Routinemedium (jeweils Doppelbestimmung).

Das in Abb. 5.34 dargestellte Experiment, zeigt wieder eine in den AS52-Wildtyp-Zellen deutlich höhere Mutationsrate als in den transfizierten Klonen AS52-ogg1-3 und AS52-ogg1-1. In Tab. 5.2 sind die dazugehörigen Geradensteigungen angegeben, die sich mittels linearer Regression aus den Daten zu Abb. 5.34 ergeben. Hieraus geht hervor, daß die Geneticin-Zugabe in der Zeit des Versuchs keinen Einfluß auf die spontane Mutationsrate hat, da die Steigungen der Mutationsraten in den Zellkulturen mit und ohne Geneticinzusatz einen annähernd gleichen Wert aufweisen. Des weiteren wird nochmals demonstriert, daß die Spontanraten nicht mit dem Status der *OGG1*-Expression korrelieren, da sowohl in allen Zellkulturen des *hOGG1*-überexprimierenden Klons AS52-ogg1-3 als auch des *hOGG1*-inaktiven Transfektanten AS52-ogg1-1 die Mutationsraten deutlich unter der Wildtyp-Mutationsrate liegen.

Zelllinie	Mutationsrate pro $10^6$ Zellen
AS52 (w.t)	$1.77 \pm 0.04$
AS52-ogg1-3	$0.76 \pm 0.00$
AS52-ogg1-1 (m. G418)	$1.14 \pm 0.05$
AS52-ogg1-1 (o. G418)	$0.92 \pm 0.16$

Tab. 5.2 Mutationsfrequenz im *gpt-Locus* je Generation (entsprechend den Steigungen der Geraden aus Abb. 5.34) in AS52-Wildtyp-Zellen, AS52-ogg1-3, AS52-ogg1-1 (mit G418) und AS52-ogg1-1 (ohne G418).

## 5.6 Untersuchung des Einflusses der 8-oxoG-Glykosylase (Ogg1) auf die Bildung von Mikrokernen

Als weiterer Endpunkt oxidativer Schädigungen der DNA war die Beeinflussung der Bildung von Mikrokernen durch das *OGG1*-Genprodukt von Interesse. Es sollte in *hOGG1*-überexprimierende CHO-Zellen untersucht werden, ob in geschädigten Zellen eine Veränderung der induzierten Mikrokernraten in Abhängigkeit des *hOGG1*-Status beobachtet werden kann.

### 5.6.1 Auswirkungen der *hOGG1*-Überexpression auf die Induktion von Mikrokernen

Um den Einfluß der *hOGG1*-Überexpression auf die Bildung von Mikrokernen zu untersuchen, wurden in den Zelllinien AS52 (Wildtyp), AS52-ogg1-2, AS52-ogg1-3 und AS52-*vector-only* durch Schädigung mit Ro 19-8022 und sichtbarem Licht ein oxidativer DNA-Schaden induziert. Eine Schädigung mit Ro 19-8022 ohne Licht („Dunkelkontrolle“) zeigte keine signifikante Erhöhung gegenüber den Mikrokernraten in ungeschädigten Zellen (Daten nicht gezeigt).

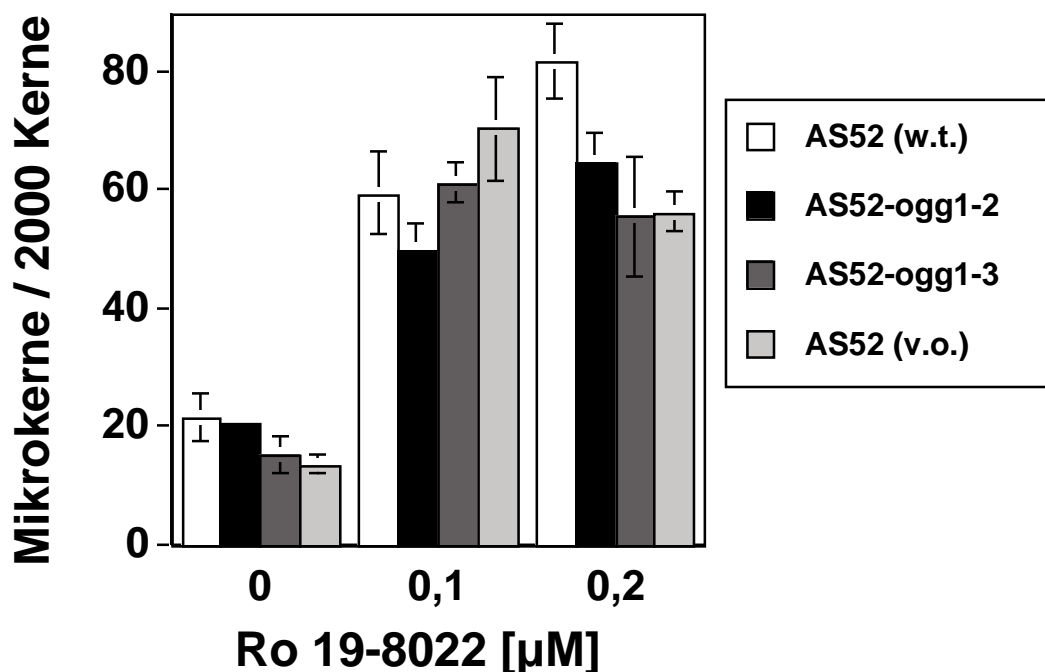


Abb. 5.35 Anzahl von Mikrokernen pro 2000 Zellkernen 24 h nach Behandlung mit 0.0 µM, 0.1 µM bzw. 0.2 µM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m<sup>2</sup>; 400-800 nm) bei 0°C in AS52-Wildtyp-Zellen, AS52-ogg1-2, AS52-ogg1-3 und AS52 *vector-only*-transfizierten Zellen (n = 2-3).

Wie aus Abb. 5.35 ersichtlich, wird durch die Ro 19-8022-Schädigung in allen Zelllinien eine deutliche Erhöhung der Mikrokernraten erzielt. Während sich die Mikrokernraten der vier Zelllinien in den Kontrollwerten nur wenig unterscheiden, kann man bei der Schädigung mit 0.1 µM Ro 19-8022 einen deutlichen Unterschied zwischen AS52-ogg1-2 und AS52-*vector-only* beobachten. Hier werden im Klon AS52-ogg1-2 durchschnittlich etwa 50, im *Vector-only*-Klon 70 und in den beiden anderen Zelllinien 60 Mikrokern pro 2000 Zellkerne verzeichnet. Bei der Schädigung mit 0.2 µM Ro 19-8022 wird nur noch in den Wildtyp-Zellen mit durchschnittlich etwa 80 Mikrokernen pro 2000 Kerne und in dem Klon AS52-ogg1-2 mit

65 Mikrokernen pro 2000 Kerne ein weiterer Anstieg der Mikrokernrate verzeichnet. Bei den Transfektantenklonen AS52-ogg1-3 und AS52-vector-only hingegen wird bei dieser Konzentration ein leichtes Absinken der Mikrokernraten beobachtet. Alle drei Transfektanten liegen damit statistisch signifikant unter der Mikrokernrate der Wildtyp-Zellen. Da aber zwischen den Vector-only-Zellen und den *hOGG1*-überexprimierenden Zellen kein signifikanter Unterschied vorliegt, kann kein Zusammenhang zwischen dem Status der *OGG1*-Genexpression und der Bildung von Mikrokernen abgeleitet werden.

## 5.7 Untersuchung verschiedener Bronchialkarzinom-Zelllinien

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung von oxidativen DNA-Schäden in Karzinom-Zelllinien, die alle der Gruppe der Bronchialkarzinome angehören. Zum einen war es von Interesse die Bedeutung der oxidativen DNA-Schäden im Hinblick auf die Malignität und den jeweiligen Tumor-Typ zu untersuchen, zum anderen wird von *hOGG1*-Mutationen in Lungentumoren berichtet (Chevallard et al., 1998). Deshalb ist auch die Untersuchung der Aktivitäten des *hOGG1*-Genproduktes in diesen Bronchialkarzinom-Typen von großem Interesse.

### 5.7.1 Untersuchung der Steady-State-Level FPG-sensitiver DNA-Modifikationen in Bronchialkarzinom-Zelllinien

Zur Bestimmung der Steady-State-Level wurden in 13 verschiedenen Bronchialkarzinom-Zelllinien und einer immortalisierten Bronchialepithel-Zelllinie als Kontrolle unter normalen Kulturbedingungen die Anzahl an DNA-Einzelstrangbrüchen und FPG-sensitiven DNA-Modifikationen bestimmt. Die Bronchialkarzinome werden dabei nach histologischen Kriterien in die beiden Haupttypen kleinzellige Bronchialkarzinome und nicht-kleinzellige Bronchialkarzinome (Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome, solide Bronchialkarzinome, Großzeller) eingestuft. Als Kontrolle diente die immortalisierte Bronchialepithel-Zelllinie BEAS-2B.

In Abb. 5.36 sind die Steady-State-Level dieser Zelllinien, geordnet nach Gruppen, wiedergegeben. Aus der Abbildung kann entnommen werden, daß die Steady-State-Level der FPG-sensitiven Basenmodifikationen der untersuchten Zelllinien untereinander um etwa den

Faktor 2 variieren. Der Großteil der Zelllinien weist etwa 0.2 FPG-sensitive Modifikationen pro  $10^6$  bp, wie die Kontroll-Zelllinie BEAS-2B, auf. Die Zelllinien LC-MZ-9s (Adenokarzinom), LC-MZ-1, LC-MZ-4 (beide Großzeller) und LC-MZ-10 (solides Bronchialkarzinom) liegen mit durchschnittlich 0.3 FPG-sensitiven Modifikationen pro  $10^6$  bp deutlich über dem Wert der Kontrolle. Ein für die Bronchialkarzinom-Typen einheitlicher Befund läßt sich jedoch nicht ableiten.

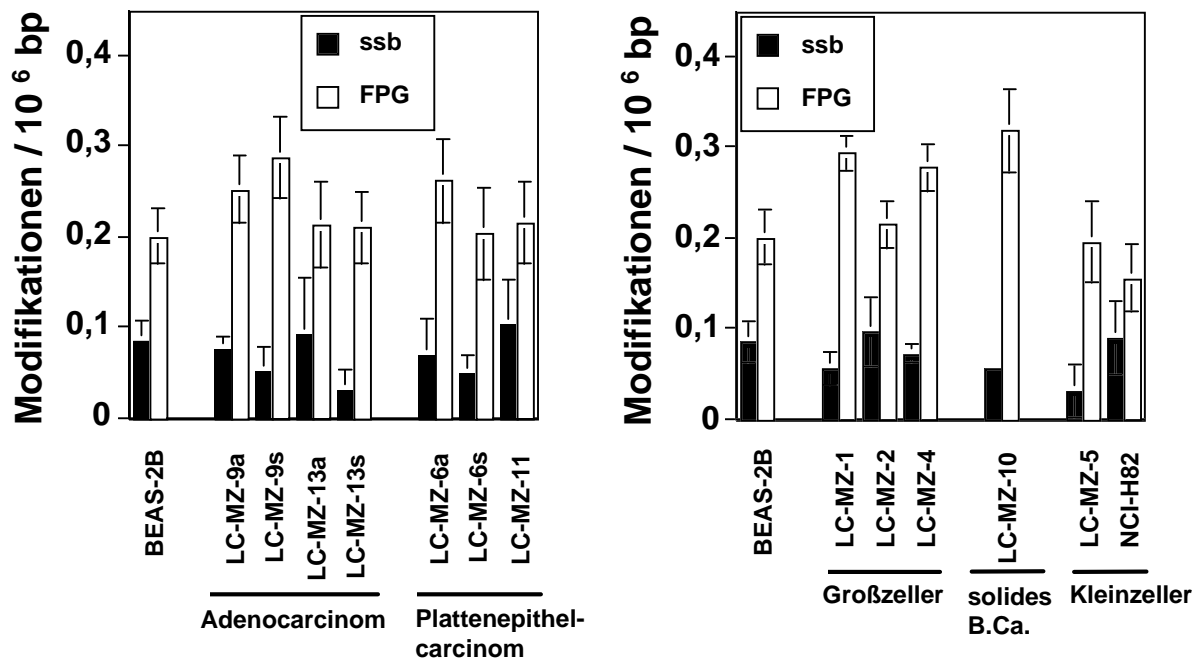


Abb. 5.36 Steady-State-Level von DNA-Einzelstrangbrüchen und FPG-sensitiven DNA-Modifikationen in unbehandelten Bronchialkarzinom-Zelllinien und immortalisierten Bronchialepithel-Zellen (BEAS-2B; Kontrolle) (n = 2-3).

### 5.7.2 Bestimmung der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität in Bronchialkarzinom-Zelllinien

Zur weiteren Charakterisierung des Status der verschiedenen Bronchialkarzinome konnte in einem Teil der Zelllinien das Potential für die 8-oxoG-Erkennung bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurden Zellextrakte der verschiedenen Zelllinien mit einem 8-oxoG-enthaltenden Oligomer inkubiert. Diese Untersuchungen wurden von der **Arbeitsgruppe von P. Radicella (Fontenay-aux-Roses)** durchgeführt (s. Kapitel 4.2.10.3.1).

Wie aus Abb. 5.37 hervorgeht ist in allen untersuchten Bronchialkarzinomen eine Ogg1-Aktivität nachweisbar. In den Zelllinien LC-MZ-7 und LC-MZ-4 ist die schwächste Enzymaktivität und in den Zelllinien LC-MZ-6a und LC-MZ-5 die stärkste Enzymaktivität detektierbar. Eine Korrelation zwischen den Ogg1-Enzymaktivitäten und den Steady-State-Level FPG-sensitiver Modifikationen ist jedoch nicht ersichtlich.

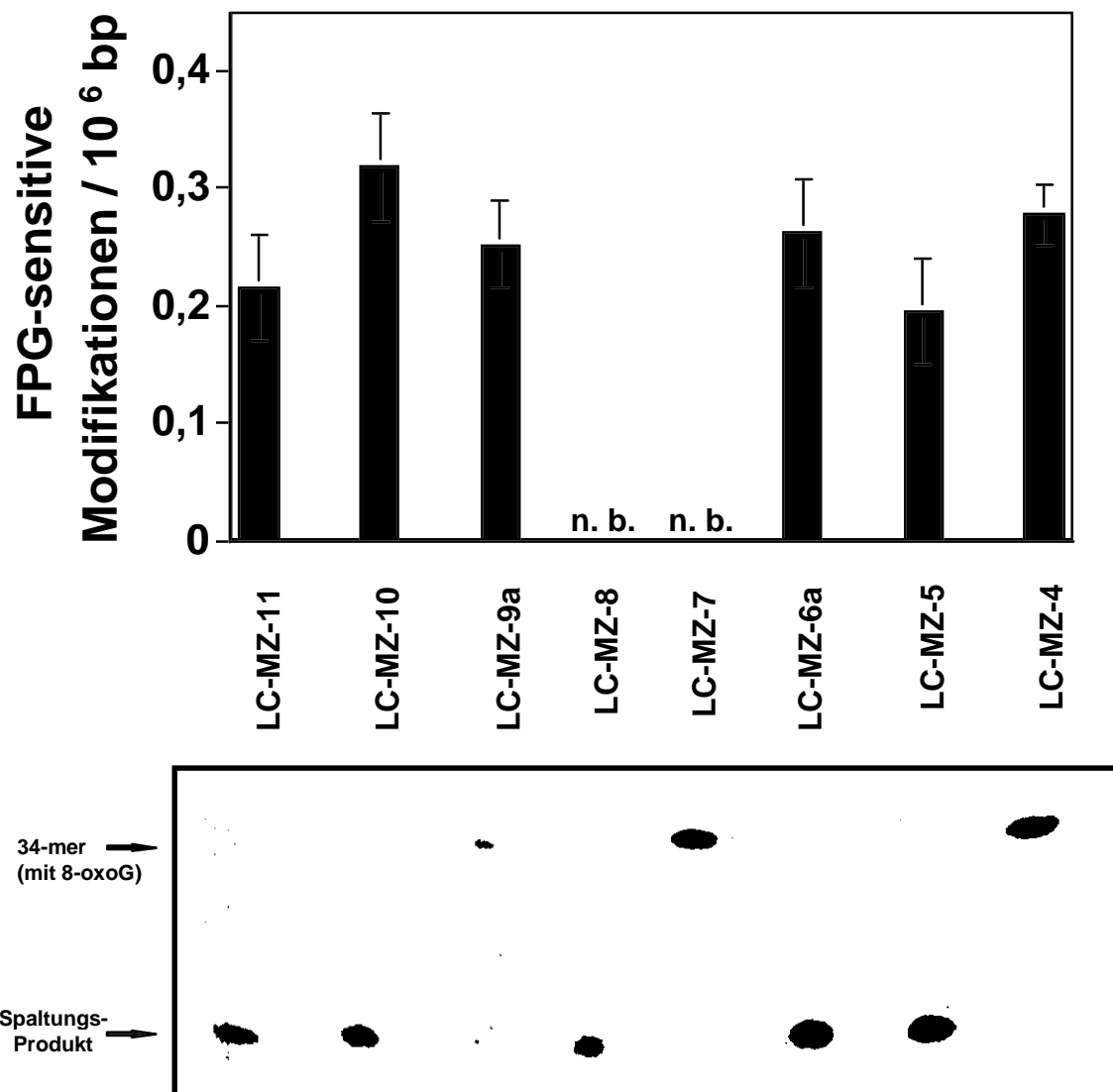


Abb. 5.37 Gegenüberstellung der Steady-State-Level FPG-sensitiver DNA-Modifikationen und der Ogg1-Enzymaktivität im Zellextrakt von unbehandelten Bronchialkarzinom-Zelllinien.



## 5.8 Mutagenität von oxidativen DNA-Schäden

Die sowohl in ungeschädigter als auch geschädigter DNA wahrscheinlich häufigste vorkommende DNA-Modifikation ist das 8-oxoG (s. Kapitel 2.2), welches ein Substrat des bakteriellen FPG-Proteins darstellt und mit Hilfe dieses Enzym auch experimentell nachgewiesen werden kann (s. Kapitel 2.4.2). 8-oxoG ist bei der DNA-Replikation zweifelsfrei mutagen (**Shibutani et al., 1991**). Es führt sowohl in Bakterien (**Cheng et al., 1992**) als auch in Säugerzellen (**Klein et al., 1992; Moriya, 1993**) aufgrund von Fehlpaarungen zu G:C→T:A Transversionen.

In dieser Arbeit wurde die Mutagenität oxidativer DNA-Schäden sowohl in Bakterien als auch in Säugerzellen näher charakterisiert. Im bakteriellen System (s. Kapitel 4.2.8) wurde zellfrei geschädigte pSV2-*gpt* Plasmid-DNA in Bakterien transformiert, dort zur Replikation gebracht, um anschließend die Mutationsrate zu bestimmen und mit der Anzahl der bestimmten DNA-Modifikationen zu korrelieren. Die so gewonnenen Erkenntnisse sollen eine Abschätzung des Mutationsrisikos durch veränderte Steady-State-Level und Reparatur oxidativer DNA-Schäden ermöglichen.

Im Säugerzell-System (s. Kapitel 4.2.11) wurden im *gpt-Locus* der AS52-Zellen und deren *OGG1*-transfizierten Klone (s. Kapitel 4.2.9) sowohl quantitative Untersuchungen der spontanen als auch durch Kaliumbromat induzierten Mutationsraten unternommen (s. Kapitel 5.5.2 und 5.5.3). Darüberhinausgehend wurden 6TG-resistente Mutanten-Klone der AS52-Zellen isoliert und durch Sequenzierung des mutationsbehafteten *gpt-Locus* auch qualitativ charakterisiert.

### 5.8.1 Mutagenität von oxidativen DNA-Schäden in Bakterien

Die Mutagenität von oxidativen DNA-Schäden im bakteriellen System wurde anhand der Peroxynitrit-freisetzenden Verbindung SIN-1 (**Duchstein und Riederer, 1995**) gezeigt. Diese Verbindung generiert neben DNA-Einzelstrangbrüchen sehr selektiv hauptsächlich FPG-sensitive Modifikationen (s. Kapitel 2.1.3.3), was auf ein mutagenes Potential der Verbindung schließen läßt und der Anlaß der hier durchgeführten Untersuchungen war.

### 5.8.1.1 Modifizierung des pSV2-*gpt*-Plasmids durch SIN-1

Zunächst wurde das Plasmid pSV2-*gpt* dem schädigenden Agens SIN-1 in verschiedenen Konzentrationen ausgesetzt und anschließend die induzierten DNA-Modifikationen mit Hilfe des Plasmid-Relaxations-Assays (s. Kapitel 4.2.7) und FPG-Enzym bestimmt. Das Ergebnis dieser Schädigung ist in Abb. 5.38 dargestellt. Dabei zeigt sich deutlich, daß sowohl die induzierten Einzelstrangbrüche als auch die FPG-sensitiven DNA-Modifikationen linear mit steigender Konzentration des schädigenden Agens ansteigen. Es werden jedoch bei gleichen Konzentrationen SIN-1 mehr als doppelt so viele FPG-sensitive Modifikationen wie DNA-Einzelstrangbrüche induziert. Da der Anstieg der FPG-sensitiven Modifikationen also deutlich steiler ist, lassen sich die FPG-sensitiven Modifikationen im geschädigten Plasmid schon bei 100  $\mu\text{M}$  SIN-1 mit dem Relaxations-Assay nicht mehr bestimmen.

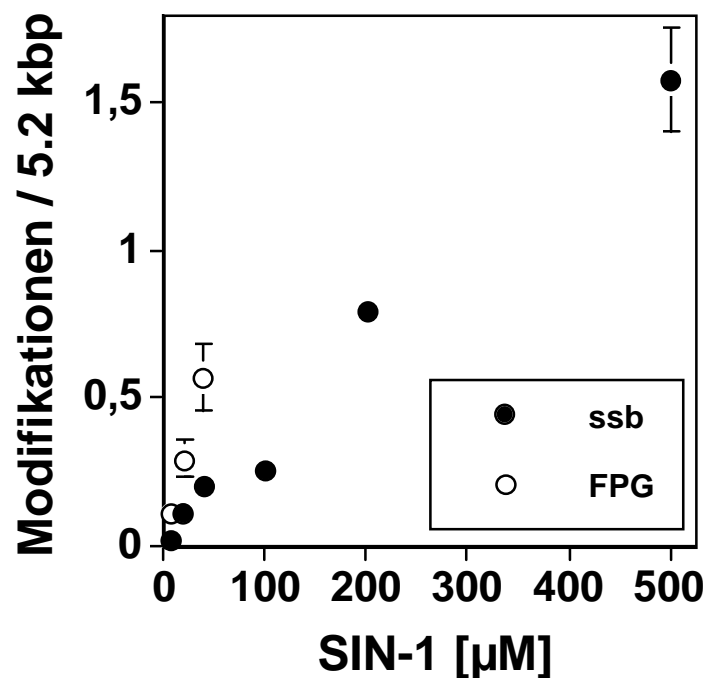


Abb. 5.38 Anzahl der DNA-Einzelstrangbrüche und FPG-sensitiven DNA-Modifikationen in pSV2-*gpt* Plasmid-DNA induziert durch verschiedene Konzentrationen SIN-1 (37°C, 1h) (n = 3).

### 5.8.1.2 Untersuchung der Mutagenität und Toxizität von SIN-1 in Bakterien

Um nun die Mutagenität und Toxizität von SIN-1 zu bestimmen, wurde die durch verschiedene Konzentrationen SIN-1 geschädigte Plasmid-DNA in *gpt*-defiziente *E. coli* DT-2

Bakterien transformiert und dort zur Replikation gebracht. Dieses System erlaubt es sowohl die Transformationsfrequenz – aufgrund der Ampicillinresistenz der transformierten Bakterien – als auch die Mutationsfrequenz – aufgrund der Resistenz gegenüber 6TG und Ampicillin – zu ermitteln (s. Kapitel 4.2.8.1). Da – wie bereits erläutert – mit dem Relaxations-Assay bei den hohen SIN-1-Schädigungen die Anzahl FPG-sensitiver Modifikationen nicht mehr direkt gemessen werden kann, wurde die angegebene Anzahl FPG-sensitiver Modifikationen pro Plasmid durch Extrapolation der Geraden der FPG-Werte aus Abb. 5.38 rechnerisch ermittelt. Bei der Darstellung der Toxizität und Mutagenität wurde auf der Abszisse die den jeweiligen Schädigungen entsprechenden FPG-sensitiven Modifikationen aufgetragen. Die Abnahme der Transformantenrate mit steigendem Schädigungsausmaß der jeweils eingeschleusten Plasmid-DNA wurde als Toxizität der Schädigung definiert.

In Abb. 5.39 ist die Toxizität der SIN-1-Schädigung in Form der jeweiligen Transformationsraten dargestellt. Die Transformationsrate gibt den Anteil der Transformanten erzielt mit geschädigtem Plasmid gegenüber der Transformantenzahl, die mit ungeschädigtem Plasmid erzielt wird, an. Wie deutlich zu sehen ist, nimmt die Transformationsrate mit zunehmender Anzahl induzierter FPG-sensitiver Modifikationen (extrapolierte Werte, s.o.) schnell ab, wobei auffällig ist, daß bereits bei Schädigungen unter 1 FPG-sensitiven Modifikation pro Plasmid ein schnelles Absinken der Transformationsrate auf unter 60 % erfolgt.

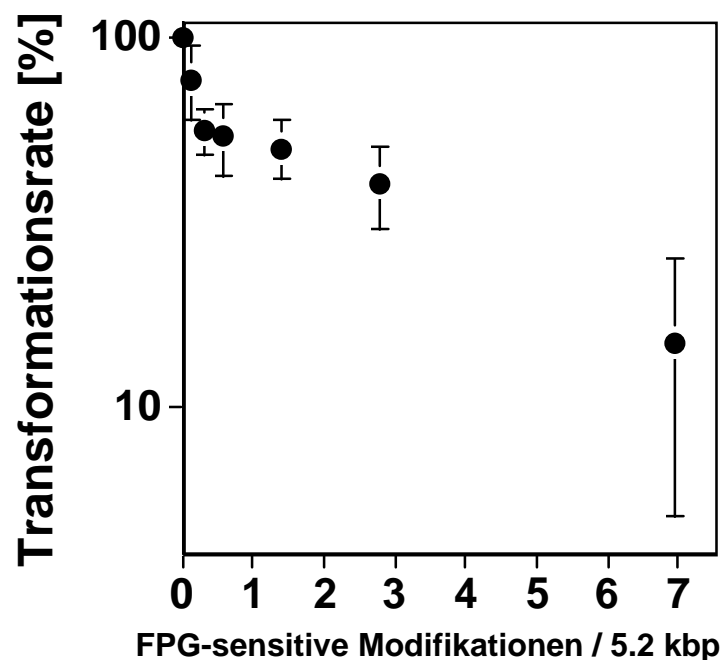


Abb. 5.39 Transformationsrate der mit SIN-1-geschädigten pSV2-*gpt* Plasmid-DNA transformierten *E. coli* DT-2 Bakterien ( $n = 5$ ).

In Abb. 5.40 ist auf entsprechende Weise die Mutagenität der SIN-1-Schädigung dargestellt. Auf der Ordinate ist die Anzahl der Mutanten pro  $10^4$  Transformanten aufgetragen. Es ist zu erkennen, daß Mutationsfrequenz mit steigender Anzahl FPG-sensitiver Modifikationen linear zunimmt. Wegen der starken Toxizität der Schädigung konnten Mutationsraten nur bis etwa 2.8 FPG-sensitive Modifikationen pro Plasmid ermittelt werden.

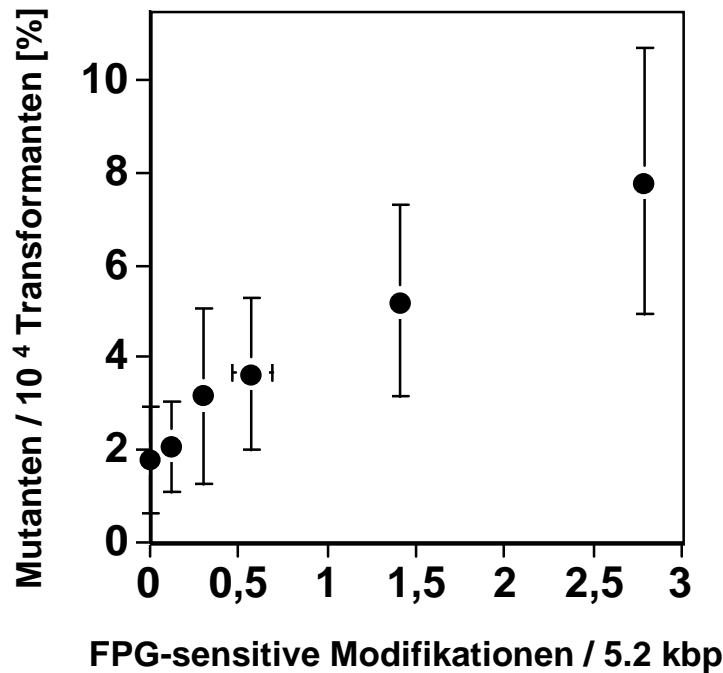


Abb. 5.40 Mutationsrate der mit SIN-1-geschädigten pSV2-*gpt* Plasmid-DNA transformierten *E. coli* DT-2 Bakterien ( $n = 3$ ).

### 5.8.2 Mutagenität von oxidativen DNA-Schäden in Säugerzellen

Quantitative Untersuchungen zur Mutagenität in Säugerzellen, die durch Kaliumbromat induziert wurde oder spontan auftritt, wurden bereits in Kapitel 5.5.2 und 5.5.3 dargestellt. Dort konnten in AS52-Zellen Mutanten aufgrund ihrer Resistenz gegenüber 6TG erkannt werden. Da diese Resistenz auf eine Mutation im *gpt-Locus* der Zellen zurückzuführen ist, sollte nun durch Sequenzierung des *gpt-Locus* 6TG-resistenter AS52-Zellen auch eine qualitative Aussage über die aufgetretenen Mutationen gemacht werden.

### 5.8.2.1 Charakterisierung der durch Kaliumbromat induzierten Mutationen in AS52-Zellen

Hierzu wurden 6TG-resistente Kolonien der AS52-Zellen, die durch Kaliumbromat induziert worden waren (die induzierte Mutationsrate liegt mindestens 4-fach über der Untergrund-Mutationsrate), gezielt isoliert, vermehrt und die aus den einzelnen Mutantenklonen präparierte DNA hinsichtlich des *gpt-Locus* sequenziert. Die so gewonnenen *gpt*-Gensequenzen wurden mit der Wildtyp-Sequenz verglichen. Die Art der Veränderung gegenüber der Wildtyp-Sequenz ist in Tab. 5.3 wiedergegeben. Die Lokalisierung dieser Mutationen sind hinsichtlich ihrer Lage im *gpt*-Gen in Abb. 5.41 dargestellt.

Hierbei zeigt sich, daß sich die detektierten Mutationen auf einen *Hot Spot* konzentrieren, der im *gpt*-Gen zwischen den bp 366-369 lokalisiert ist, und daß das Mutationsspektrum deutlich von Deletionen dominiert wird. Die bei der Kaliumbromat-Schädigung erwarteten GC→TA Transversionen spielen in diesen Experimenten mit einer relativen Häufigkeit von etwa 4 % eine untergeordnete Rolle.

Mutationsart	Anzahl
3b-Deletion	4
9b-Deletion	1
2b-Deletion	1
1b-Insert	1
<u>G</u> C→ <u>A</u> T	1
<u>G</u> C→ <u>T</u> A	1
<u>T</u> A→ <u>A</u> T	1
<u>T</u> A→ <u>G</u> C	1
kein PCR-Produkt	13
keine Mutation	2

Tab. 5.3 Durch Kaliumbromat induzierte Mutationen in der *gpt*-Sequenz von AS52-Zellen. Die Basen des codierenden (nicht transkribierten) Stranges sind unterstrichen.

CCT	ATT	TTC	CCC	TCG	AAC	ACT	TTT	TAA	GCC	GTA	GAT	AAA	CAG	GCT	GGG
					-40							-20			
ACA	CTT	CAC	ATG	AGC	GAA	AAA	TAC	ATC	GTC	ACC	TGG	GAC	ATG	TTG	CAG
		1							20						
		(START)													
ATC	CAT	GCA	CGT	AAA	CTC	GCA	AGC	CGA	CTG	ATG	CCT	TCT	GAA	CAA	TGG
40						60							80		
AAA	GGC	ATT	ATT	GCC	GTA	AGC	CGT	GGC	GGT	CTG	GTA	CCG	GGT	GCG	TTA
				100						120					
CTG	GCG	CGT	GAA	CTG	GGT	ATT	CGT	CAT	GTC	GAT	ACC	GTT	TGT	ATT	TCC
	140							160						180	
	+1														
AGC	TAC	GAT	CAC	GAC	AAC	CAG	CGC	GAG	CTT	AAA	GTG	CTG	AAA	CGC	GCA
					200							220			
GAA	GGC	GAT	GGC	GAA	GGC	TTC	ATC	GTT	ATT	GAT	GAC	CTG	GTG	GAT	ACC
		240		T					260						
GGT	GGT	ACT	GCG	GTT	GCG	ATT	CGT	GAA	ATG	TAT	CCA	AAA	GCG	CAC	TTT
280						300							320		
GTC	ACC	ATC	TTC	GCA	AAA	CCG	GCT	GGT	CGT	CCG	CTG	GTT	GAT	GAC	TAT
				340						360					
GTT	GTT	GAT	ATC	CCG	CAA	GAT	ACC	TGG	ATT	GAA	CAG	CCG	TGG	GAT	ATG
		380		A				400						420	
GGC	GTC	GTA	TTC	GTC	CCG	CCA	ATC	TCC	GGT	CGC	TAA	TCT	TTT	CAA	CGC
					440							459			
															(STOP)

Abb. 5.41 Verteilung der durch Kaliumbromat induzierten Mutationen in der *gpt*-Sequenz von AS52-Zellen.

### 5.8.2.2 Charakterisierung von spontan entstandenen Mutationen in AS52-Zellen

Zu diesem Zweck wurden 6TG-resistente AS52-Zellen, die ohne jegliche schädigende Behandlung nach Standardprotokoll für den AS52/*gpt*- Mutationstest kultiviert wurden (s.



ATC	CAT	GCA	CGT	AAA	CTC	GCA	AGC	CGA	CTG	ATG	CCT	TCT	GAA	CAA	TGG
40						60							80		
AAA	GGC	ATT	ATT	GCC	GTA	AGC	CGT	GGC	GGT	CTG	GTA	CCG	GGT	GCG	TTA
				100						120					
CTG	GCG	CGT	GAA	CTG	GGT	ATT	CGT	CAT	GTC	GAT	ACC	GTT	TGT	ATT	TCC
	140							160						180	
AGC	TAC	GAT	CAC	GAC	AAC	CAG	CGC	GAG	CTT	AAA	GTG	CTG	AAA	CGC	GCA
					200							220			
GAA	GGC	GAT	GGC	GAA	GGC	TTC	ATC	GTT	ATT	GAT	GAC	CTG	GTG	GAT	ACC
		240							260						
GGT	GGT	ACT	GCG	GTT	GCG	ATT	CGT	GAA	ATG	TAT	CCA	AAA	GCG	CAC	TTT
280						300							320		
													- -3		
													- -3		
									- - - - -6						
-1															
GTC	ACC	ATC	TTC	GCA	AAA	CCG	GCT	GGT	CGT	CCG	CTG	GTT	GAT	GAC	TAT
				340						360					
--3															
GTT	GTT	GAT	ATC	CCG	CAA	GAT	ACC	TGG	ATT	GAA	CAG	CCG	TGG	GAT	ATG
	380							400						420	
GGC	GTC	GTA	TTC	GTC	CCG	CCA	ATC	TCC	GGT	CGC	TAA	TCT	TTT	CAA	CGC
					440							459			
															(STOP)

Abb. 5.42 Verteilung der spontan aufgetretenen Mutationen in der *gpt*-Sequenz von AS52-Zellen.



## 6. Diskussion

### 6.1 Hat das Anti-Apoptose-Protein Bcl-2 Einfluß auf die Regulation reaktiver Sauerstoffspezies?

Anhand der *BCL-2*-überexprimierenden Mausmakrophagen-Zelllinie (Rbcl2-14) und der dazugehörigen Wildtyp-Zelllinie (RAW264.7) wurde die Bedeutung des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 (**Hockenbery et al., 1993; Kane et. al., 1993**) für die Regulation des Redox-Status der Zellen untersucht. Berichten zufolge soll Bcl-2 den programmierten Zelltod (Apoptose) durch herabgesetzte Generierung von ROS verhindern können (**Kane et. al., 1993**). Im Gegensatz dazu wird auch von pro-oxidativen Effekten des Bcl-2-Proteins berichtet (**Steinman, 1994**).

Nach Überprüfung der Überexpression (Abb. 5.1) wurde im genannten Zellpaar mit Hilfe der Alkalischen Elution der Steady-State-Level an FPG-sensitiven Basenmodifikationen bestimmt, der als ein Indikator für den oxidativen Streß in Säugerzellen angesehen werden kann (**Will et al., 1999**). Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den beiden Zelllinien (Abb. 5.2). Ebenfalls mit der Alkalischen Elution wurde ein Suszeptibilitätsvergleich gegenüber durch Kaliumbromat und durch den angeregten Photosensibilisator Ro 19-8022 induzierten FPG-sensitiven Modifikationen vorgenommen (Abb. 5.3). Auch hier ergab sich bei beiden Schädigungen kein Anzeichen für einen pro- oder antioxidativen Effekt der *BCL-2*-Überexpression. Als einen weiteren Indikator für den Status zellulären, oxidativen Stresses wurde der Gesamt-Glutathion-Gehalt in Zellextrakten beider Zelllinien bestimmt (Abb. 5.4). Hier zeigte sich ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied. Dieser Befund steht im Widerspruch zu Untersuchungen von **Kane et al. (1993)** und **Steinman (1994)**, bei denen durch stabile Expression von *BCL-2* in Nervenzellen ein 2- bis 3-fache Erhöhung des Glutathiongehaltes gegenüber den Kontrollen erzielt wurde.

Die ermittelten Ergebnisse zeigen, daß es in den Mausmakrophagen durch die Überexpression der cDNA für das Bcl-2-Protein zu keinem pro- oder antioxidativem Effekt bezüglich der Schädigung der DNA kommt. Auch die Glutathionspiegel sind unbeeinflusst. Dies steht im Einklang mit Arbeiten, die zeigten, daß das Bcl-2-Protein den Zelltod auch bei Abwesenheit von ROS (hypoxischen Bedingungen) verhindern kann (**Shimizu et al., 1995; Jacobson et Raff, 1995**). Dies bedeutet, daß die reaktiven Sauerstoffspezies keine zentrale Rolle in der Regulation der Apoptose spielen, sondern nur eine von vielen anderen Stimuli zur Einleitung der Apoptose darstellen. Die in der Literatur beschriebenen protektiven, antioxidativen Eigenschaften von Bcl-2 sind somit nicht primär auf Eigenschaften des Proteins selbst zurückzuführen, sondern liegen vielmehr in der Verhinderung der Folgen der Apoptose durch das Bcl-2-Protein begründet. Die nachgewiesene Stabilisierung der Mitochondrien-Membran durch Bcl-2 (**Susin et al., 1998**) führt daher wahrscheinlich indirekt zu einer antioxidativen

Wirkung des Proteins, da es die unkontrollierte Freisetzung von ROS verhindert. Auf den Steady-State-Level der oxidativen DNA-Modifikationen wirkt sich dies jedoch offensichtlich nicht aus.

## 6.2 Zelldifferenzierung, *Respiratory Burst* und oxidative DNA-Schäden

Die Bestimmung der Steady-State-Level der oxidativen DNA-Schäden in den undifferenzierten, promyeloischen HL60-Zellen und in den ausdifferenzierten, granulocytenartigen DMSO-HL60-Zellen (Collins et al., 1979) erbrachte keinerlei Anzeichen für eine durch die Differenzierung bedingte Veränderung der basalen Spiegel oxidativer DNA-Schäden (Abb. 5.6). Des weiteren wurden die ausdifferenzierten, granulocytenartigen DMSO-HL60-Zellen durch Stimulation mit dem Tumorpromoter PMA zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffverbindungen angeregt (Floyd et al., 1986). Bei beiden eingesetzten Konzentrationen von PMA (100 nM und 500 nM) konnte keine signifikante Erhöhung der Steady-State-Level FPG-sensitiver Basenmodifikationen beobachtet werden (Abb. 5.6). Daß der Hauptanteil der HL60-Zellen durch die DMSO-Behandlung zur Differenzierung zu granulocytenartigen Zellen induziert worden war, konnte mit Hilfe des NBT-Reduktionstest demonstriert werden (Abb. 5.5). Dieser Test beruht darauf, daß die HL60-Zellen ebenfalls nach Stimulierung mit PMA (500 nM) zur Freisetzung von ROS induziert werden und damit an ihrer Zelloberfläche NBT sichtbar zu Formazan oxidieren. Dies führt zur Anfärbung der zu granulocytenartigen Zellen ausdifferenzierten DMSO-HL60-Zellen und zeigt, daß die Bedingungen zur Induktion des *Respiratory Burst* in dem hier geschaffenen Säugerzell-System gegeben sind.

Die eigenen Befunde stehen jedoch im klaren Widerspruch zu Ergebnissen von Takeuchi et al. (1994) und Takeuchi et al. (1996). In diesen Arbeiten wurde in durch PMA stimulierten DMSO-HL60-Zellen ein konzentrationsabhängiger Anstieg von 8-oxodG in der DNA der behandelten Zellen beschrieben. Die Analytik dieser Arbeiten beruht auf einer HPLC-Methode mit elektrochemischer Detektion. Des weiteren zeigten die Autoren eine Korrelation zwischen PMA-Stimulation und dem Auftreten von Wasserstoffperoxid und Superoxid-Anionen, basierend auf Bestimmungen mit Dichlorofluorescindiacetat (DCFH-DA) und Hydroethidin (HE). Aus diesen Untersuchungen in Verbindung mit confocaler Laser-Scan-Mikroskopie schlossen die Autoren auf die intrazelluläre Lokalisierung von Wasserstoffperoxid und Superoxid-Anionen, welche schließlich nach Generierung von Hydroxyl-Radikalen *via* Fenton-Reaktion für die oxidierten Guaninbasen verantwortlich sein

sollen. Da die Anwesenheit von größeren Mengen der 8-oxoG-induzierenden, reaktiven Verbindungen in diesen Arbeiten im Zellkern der stimulierten DMSO-HL60-Zellen nicht zweifelsfrei gezeigt werden konnte, besteht die Möglichkeit, daß die nachgewiesenen ROS bei der Probenvorbereitung für die HPLC-Bestimmung zur artfiziellen Entstehung von Basenmodifikationen (**Pflaum et al., 1997**) geführt haben. Dies scheint bei der Durchführung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Alkalischen-Elutions-Technik nicht der Fall zu sein. Gestützt wird diese Annahme durch einen Vergleich der in beiden Methoden bestimmten absoluten Werte an 8-oxoG bzw. FPG-sensitiven Modifikationen. Hierbei liegen die mit der HPLC-Technik ermittelten Werte mehr als 20-fach über den mittels Alkalischer Elution gemessenen Steady-State-Level.

Dies spricht dafür, daß in den HL60-Zellen sowohl die Ausdifferenzierung als auch eine Stimulation zum *Respiratory Burst* zu keiner Erhöhung der eigenen Steady-State-Level führt. Ein mögliches Absinken der Steady-State-Level in den hier erzeugten, granulocystenartigen Zellen als Folge eines verstärkten Schutzmechanismus zur Abwehr gegenüber der zelleigenen Generierung von reaktiven Sauerstoffverbindungen konnte jedoch auch nicht beobachtet werden.

### 6.3 Ist das Xrcc1-Protein an der Reparatur von 8-oxoG beteiligt?

Xrcc1 wird als Plattform-Protein im Basen-Exzisions-Reparatursystem diskutiert (**Kubota et al., 1996**). Neben der Bindung von Xrcc1 an DNA-Ligase III, konnte auch eine direkte Interaktion mit der DNA-Ligase  $\beta$  gezeigt werden (**Kubota et al., 1996**). In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit Xrcc1 an der Reparatur von 8-oxoG beteiligt ist, und ob gegebenenfalls eine Interaktion zwischen Xrcc1 und Ogg1 wahrscheinlich ist.

Dazu wurden zunächst in den *XRCC1*-defizienten EM9-Zellen und den entsprechenden Wildtyp-Zellen AA8-1 die Steady-State-Level oxidativer DNA-Schäden bestimmt (Abb. 5.7). Dabei zeigte sich eine nahezu identische Anzahl an Einzelstrangbrüchen und FPG-sensitiven Basenmodifikationen. Auch die Reparatur von FPG-sensitiven Modifikationen, die durch den angeregten Photosensibilisator Ro 19-8022 induziert wurden, erfolgte mit beinahe gleich hoher Effizienz in beiden Zelllinien (Abb. 5.10). Beim Suszeptibilitätsvergleich der durch den Photosensibilisator induzierten DNA-Modifikationen wurde eine signifikant erhöhte Anzahl von Einzelstrangbrüchen detektiert, wohingegen die Anzahl der FPG-sensitiven Basenmodifikationen ein vergleichbares Niveau aufwies (Abb. 5.8). Betrachtet man die Reparatur der durch Ro 19-8022 und Licht induzierten Strangbrüche in beiden Zelllinien (Abb.

5.11 und 5.12) so zeigt sich, daß die Reparatur in den *XRCC1*-defizienten Zellen wesentlich langsamer als in den Wildtypzellen verläuft, bei denen schon nach ca. 15 min keine Strangbrüche mehr nachweisbar sind.

Die Ergebnisse lassen keinen eindeutigen Schluß zu, ob *Xrcc1* an der Reparatur von 8-oxoG beteiligt ist und ob eine Interaktion von *Xrcc1* mit *Ogg1* vorliegt. Für eine Interaktion spricht zum einen der Befund, daß nur bei der Induktion von FPG-sensitiven Modifikationen durch den angeregten Photosensibilisator ein Unterschied in der vorhandenen Strangbruchzahl auftritt, wohingegen im Steady-State-Level kein Unterschied vorliegt. Wäre nur die Strangbruch-Reparatur als solche die Ursache für die unterschiedlich schnelle Entfernung dieses DNA-Schadens, dann würde man erwarten, daß sich dies auch im Steady-State-Level der Strangbrüche niederschläge. Zum anderen ist die Anzahl der bei der Schädigung mit angeregtem Ro 19-8022 induzierten Einzelstrangbrüche in den defizienten Zellen außergewöhnlich hoch, verglichen mit der erzielten Anzahl von Einzelstrangbrüchen bei gleichartigen Schädigungen in der CHO-Zelllinie AS52 (Will, 1995). Diese Brüche könnten als „Reparaturbrüche“ erklärt werden, was bedeutet, daß die Strangbrüche aus FPG-sensitiven Basenmodifikationen stammen würden. Dagegen spricht jedoch, daß in den *XRCC1*-defizienten und -profizienten Zellen eine etwa gleiche Anzahl von durch Ro 19-8022 induzierten FPG-sensitiven Modifikationen beobachtet wird. Es ist daher wahrscheinlicher, daß die beobachtete unterschiedliche Zahl von induzierten Strangbrüchen auf eine sehr schnelle Strangbruch-Reparatur zurückzuführen ist, die in Wildtyp-Zellen auch bei Temperaturen unter 4°C stattfindet, in den EM9-Zellen jedoch defekt ist.

Gegen eine Beteiligung von *Xrcc1* an der Prozessierung oxidativer DNA-Schäden spricht die Tatsache, daß die Reparatur der FPG-sensitiven Basenmodifikationen in beiden Zelllinien mit gleicher sehr hoher Effizienz verläuft. Schließlich können die eigenen und berichteten Befunde über eine verlangsamte Strangbruch-Reparatur in den *XRCC1*-defizienten Zellen (Zdzienicka et al., 1992; Churchill et al., 1991; Thompson et al., 1982) auch ohne die Interaktion mit *Ogg1* erklärt werden. Der Ausfall von *Xrcc1* und die dadurch bedingte Defizienz an DNA-Ligase III (Caldecott et al., 1995; Ljungquist et al., 1994) reichen aus, um eine deutlich verschlechterte Strangbruch-Reparatur zu erklären.

Eine Möglichkeit, die Hypothese einer Interaktion von *Xrcc1* mit *Ogg1* zu überprüfen, wäre die Überexpression von *OGGI* in *XRCC1*-defizienten Zellen. In einem solchen Zellsystem müßte die Schädigung mit 8-oxoG induzierenden Agentien zur Entstehung größerer Mengen an Strangbrüchen nach kurzen Reparaturzeiten führen, was sich in einer noch langsameren Strangbruch-Reparatur in den *OGGI*-überexprimierenden und *XRCC1*-defizienten Zellen äußern müßte.

#### 6.4 Inwieweit schützt Ogg1 das Säuger-Genom vor oxidativen DNA-Schäden?

Bei der Charakterisierung der durch Transfektion mit cDNA von *hOGG1* entstandenen Klone der CHO-Zelllinien AS52 und AA8 konnte zweifelsfrei die stabile und konstitutive Überexpression von humanem *OGG1* in diesen Säugerzellsystemen demonstriert werden. Dabei wurde *in vitro* eine maximal etwa 10-fach höhere Enzymaktivität in den Gesamtzellextrakten gegenüber den Kontrollen festgestellt (Abb. 5.13).

Diese deutlich höhere Enzymaktivität führte jedoch in keinem der erzeugten Transfektanten der beiden Zelllinien zu einer Reduzierung der basalen Anzahl FPG-sensitiver Modifikationen in jeweils unbehandelten Zellen (Steady-State-Level: Abb. 5.14 und 5.15). Das fehlende Absinken der Steady-State-Level FPG-sensitiver Modifikationen läßt sich zum einem dadurch erklären, daß sich im Laufe der Evolution in allen Säugetierzellen eine ausreichend hohes Expressionsniveau an Ogg1-Enzym zur Abwehr von DNA-Schäden durch oxidativen Streß ausgebildet hat. Ein ausreichendes Angebot an Ogg1 würde bedeuten, daß das Ausmaß der *OGG1*-Expression nicht geschwindigkeitslimitierend für die Reparatur endogen gebildeter oxidativer DNA-Modifikationen ist. Eine andere Erklärungsmöglichkeit ist, daß die in unbehandelten Zellen (d.h. ohne Schadensinduktion) nachgewiesenen oxidativen Basenmodifikationen gar nicht dem Enzym zugänglich sind und sich das höhere Enzymangebot daher erst bei exogener Schädigung von Zellen bemerkbar macht. Des weiteren würde das Fehlen von notwendigen Mitspielern des Ogg1-Enzyms bei dessen alleiniger Überexpression die ausbleibende Reduzierung des Steady-State-Levels erklären. Als Ursache des Befundes müßten grundsätzlich auch Meßfehler wie die Bildung von artifiziellen Basenmodifikationen während der Zellyse oder eine unspezifische Erkennung des FPG-Enzyms bei der Durchführung der Alkalischen Elution diskutiert werden. Gegen einen (hohen) artifiziellen Anteil an den Steady-State-Levels, die durch die Alkalischen-Elutions-Technik bestimmt werden, sprechen unter anderem (Pflaum et al., 1997; Pflaum et al., 1999) die Befunde, daß zum einen verschiedene Zelllinien deutlich unterschiedliche Steady-State-Level aufweisen (Will et al., 1999; Will, 1999), zum anderen, daß die gemessenen Werte durch Zugabe antioxidativer Verbindungen (DMSO und Desferoxamin) während der Zellyse nicht reduziert werden (Daten nicht gezeigt).

Während die Überexpression von *hOGG1* in CHO-Zellen also keine erkennbare Reduzierung der Steady-State-Level FPG-sensitiver Basenmodifikationen bedingte, konnte in den Experimenten mit immortalisierten Fibroblasten von *mOGG1(+/+)*-Wildtyp-Mäusen und *mOGG1(-/-)*-knock-out-Mäusen als auch in frisch isolierten Hepatocyten dieser Tiere eine Auswirkung auf den Steady-State-Level FPG-sensitiver Modifikationen gezeigt werden. In den Fibroblasten wurde eine 1.4-fache und in den Hepatocyten eine 2.5-fache relative

Erhöhung der Anzahl FPG-sensitiver Basenmodifikationen des *Knock-out*-Typs gegenüber dem Wildtyp beobachtet (Abb. 6.1).

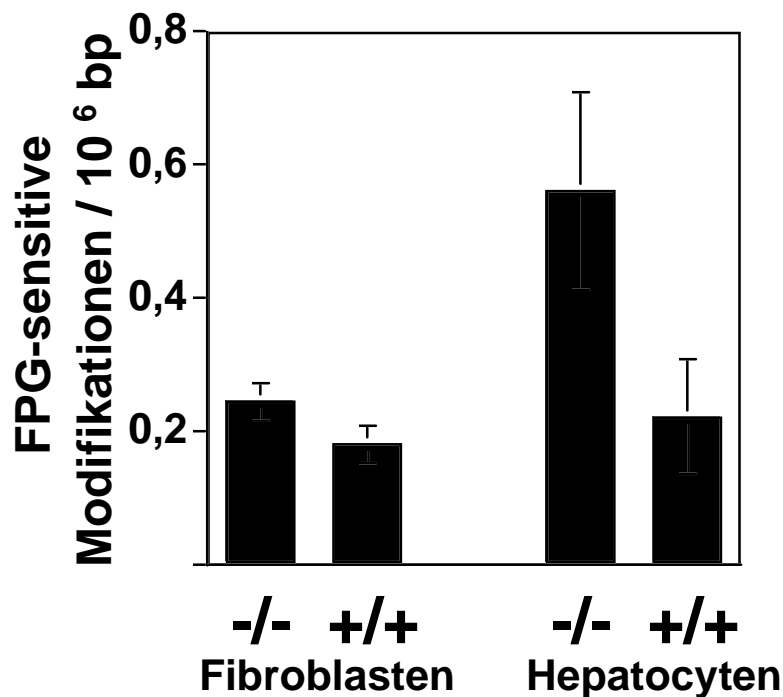


Abb. 6.1 Durchschnittswerte der Steady-State-Level von FPG-sensitiven DNA-Modifikationen (Netto) in immortalisierten Fibroblasten bzw. Hepatocyten von *mOGG1(-/-)*-*knock-out*-Mäusen und *mOGG1(+/+)*-Wildtyp-Mäusen (n = 5 bzw. n = 4).

Es stellt sich hierbei die Frage, wie die unterschiedlichen Erhöhungen in Fibroblasten und Hepatocyten zu erklären sind. Eine wahrscheinliche Erklärung ist, daß die völlig unterschiedlichen Proliferationsraten beider Zellpaare die entscheidende Bedeutung haben. Während die Fibroblasten-Zelllinien schnell teilende Zellen darstellen (Verdopplungszeit jeweils etwa 18 h), handelt es sich bei den isolierten Hepatocyten um Zellen, die bis zum Zeitpunkt der Präparation für ca. 12 Monate (Alter der Tiere bei der Leberperfusion) im ausdifferenzierten Zustand ohne jegliche Zellteilung vorlagen. Wenn man nun davon ausgeht, daß bei jeder Replikation in die Tochterstränge unversehrtes dGTP aus dem Nukleotid-Pool der Zellen eingebaut wird, so wird die Anzahl der im gesamten Genom vorliegenden 8-oxoG-Basen um 50 % „verdünnt“. Es kommt somit durch die Verdünnung der geschädigten Guanin-Basen zu einer scheinbaren Reparatur der 8-oxoG-Basen mit einer Halbwertszeit von 18 h. Dieser Verdünnungseffekt ist in den Hepatocyten nicht gegeben. Dort kann es wegen des Defektes im *OGG1*-Gen zu einer Akkumulierung oxidativer DNA-Schäden im Genom der Hepatocyten kommen. Dies könnte zumindest teilweise die unterschiedlich starke Auswirkung des *OGG1*-Ausfalls in beiden Zellsystemen erklären. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre die Postulation einer „replikationsgekoppelten Reparatur“, in

Anlehnung an die bekannte Kopplung der DNA-Reparatur an die Transkription (*transcription coupled repair*; s. Kapitel 2.4.4). Eine solcher Reparaturmechanismus könnte aufgrund der deutlich unterschiedlichen Teilungsraten der beiden Zellsysteme die differierenden Steady-State-Level plausibel erklären. Ein weiteres Indiz dafür, daß eine replikationsgekoppelte DNA-Reparatur eine Rolle spielen könnte, ist, daß in Zellextrakten von *mOGG1-knock-out*-Tieren *in vitro* keinerlei 8-oxoG-Glykosylaseaktivität nachgewiesen werden konnte (**Klungland et al., 1999**), während in proliferierenden Zellen auch vom *mOGG1-knock-out*-Typ eine deutliche Reparatur von FPG-sensitiven Basenmodifikationen demonstriert werden kann (s. unten). Bislang gibt es jedoch nur vereinzelte Vermutungen über eine derartig gekoppelte DNA-Reparatur (**Foiani et al., 1998**). Gestützt wird die Hypothese der „replikationsgekoppelten Reparatur“ durch jüngste Berichte über eine postreplikative BER unter der Beteiligung der Uracil-DNA-Glykosylase 2 (UNG2) (**Otterlei et al., 1999**). Aus beiden Überlegungen heraus folgt nun zwangsläufig die weitere Frage, ob sich dann in den stationär vorliegenden Hepatocyten von *Knock-out*-Mäusen die Steady-State-Level an 8-oxoG im Laufe des Lebens fortwährend akkumulieren. Dies müßte der Fall sein, wenn neben OGG1 keine weiteren Reparaturenzyme existieren, die 8-oxoG aus dem Säuger genom entfernen können (s.u.).

Bei den Untersuchungen der Reparaturkinetiken konnte sowohl bei der Überexpression von *hOGG1* in CHO-Zellen als auch in der *mOGG1-knock-out*-Zelllinie die Bedeutung dieses Gens für die Reparatur FPG-sensitiver Modifikationen verdeutlicht werden.

So konnte demonstriert werden, daß durch die Überexpression eine bis zu 3-fach schnellere Reparatur FPG-sensitiver Modifikationen erzielt wird (Abb. 5.19, 5.20 und 5.22) und zum anderen der Grad der Überexpression mit den erhöhten Reparaturraten korreliert (Abb. 5.21 und 5.22). Die so für die parentalen AS52 und AA8 bestimmten Reparaturraten ähneln dabei kürzlich berichteten Reparaturkinetiken von FPG-sensitiven Modifikationen in verschiedenen Nagerzellen und menschlichen Zellen (**Pflaum et al., 1997; Kasai et al., 1986; Jaruga & Dizdaroglu, 1996; Dally & Hartwig, 1997; Will et al., 1998**). Die Tatsache, daß in den Transfektanten trotz einer etwa 10-fach höheren Enzymaktivität eine nur etwa 3-fach schnellere Reparatur resultiert, könnte dafür sprechen, daß bei den Reparaturvorgängen in den Zellen ein oder mehrere zusätzliche Komponenten bei hohem Ogg1-Angebot geschwindigkeitslimitierend werden. Die Tatsache, daß die Reparaturkinetiken in überexprimierenden Zellen nicht biphasisch verlaufen, ist ein weiteres Indiz dafür, daß die meisten der induzierten FPG-sensitiven Basenmodifikationen auch Substrate des hOgg1-Enzyms sind.

Die Bestimmung der Reparaturgeschwindigkeiten in den immortalisierten Fibroblasten vom *mOGG1(+/-)*-Wildtyp und *mOGG1(-/-)*-*knock-out*-Typ erfolgte in analoger Weise nach Induktion eines DNA-Schadens durch Ro 19-8022. Auch hier zeigte sich die Suszeptibilität gegenüber dem Agens durch den Ogg1-Status unbeeinflusst (Abb. 5.26). Die

Reparaturgeschwindigkeiten hingegen zeigten wiederum einen deutlichen Unterschied im Reparaturvermögen von 8-oxoG im Wildtyp gegenüber dem *Knock-out*-Typ. Während der Wildtyp eine Reparaturhalbwertszeit von etwa 4 h aufwies, konnte in der *Knock-out*-Zelllinie nach 4 h noch gar keine signifikante Reparatur beobachtet werden. Erst nach 8 h und 16 h machte sich auch in den *Knock-out*-Zellen eine Reparatur (Halbwertszeit ca. 16 h) bemerkbar (Abb. 5.28). Auch dieser Befund legt wieder die Vermutung nahe, daß die Entfernung von 8-oxoG aus der DNA mit Vorgängen bei der Replikation gekoppelt sein könnten, denn erst bei Reparaturzeiten von 8 h und 16 h, bei denen ein relativ großer Anteil der Zellen bereits wieder eine Teilung vollzogen hat, macht sich in den *Knock-out*-Zellen eine Abnahme FPG-sensitiver Basenmodifikationen bemerkbar (Die durch Zellteilung erfolgte Verdünnung der induzierten Schäden wurde durch die parallele Bestimmung der Verdopplungszeiten in beiden Zelllinien korrigiert). Welche Reparaturmechanismen dieser Abnahme in den Zellen vom *Knock-out*-Typ zugrunde liegen ist unklar. Der Reparaturreffekt kann jedenfalls nicht mit einer transkriptionsgekoppelten Reparatur (TCR, *preferential repair*) erklärt werden, da nur etwa 5 % des gesamten Genoms transkribiert werden, in den durchgeführten Versuchen aber die Reparatur von etwa 50 % der induzierten oxidativen Schäden beobachtet wurde. Eine andere Erklärungsmöglichkeit für diese in den *Knock-out*-Zellen beobachtete Reparatur wäre, daß die oxidativen DNA-Modifikationen von der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) erkannt werden. Dafür sprechen neuere Berichte über die Beteiligung des NER an der Reparatur von 8-oxoG (**Reardon et al., 1997; Dianov et al., 1998**). Andererseits gibt es Berichte, daß die NER bei der Reparatur von 8-oxoG nur eine vernachlässigbare Rolle spielt. So führte die Erzeugung einer Mutation im NER-System (*uvrA*) eines *fpg/mut Y*-defekten *E. coli*-Stamms zu keiner signifikanten weiteren Erhöhung der spontanen Mutationsfrequenz (**Wagner et al., 1997**). Ebenso zeigte die Doppelmutante *rad14/ogg1* in *S. cerevisiae* keine signifikante Erhöhung der spontanen Mutationsfrequenz bei Vergleich mit dem *ogg1*-defekten Stamm (**unveröffentlichte Daten, Boiteux & Radicella**).

Um zu ergründen, inwieweit die Replikation für die Reparatur von FPG-sensitiven Modifikationen in den *Knock-out*-Zellen notwendig ist, müßten analoge Versuche in sich nicht teilenden Zellen oder sich synchron teilenden *Knock-out*-Zellen durchgeführt werden.

Diese Ergebnisse unterstreichen insgesamt die Bedeutung von Ogg1 für die Integrität der DNA hinsichtlich der Beseitigung von 8-oxoG, verdeutlichen aber auch, daß in Säugerzellen auch andere Reparaturmechanismen existieren müssen, die an der Reparatur von 8-oxoG beteiligt sind und als *Back-up*-System wirken.



## 6.5 *OGGI* ein Antimutator-Gen?

Da in jüngster Zeit nach der Klonierung des humanen *OGGI*-Gens von Befunden über Tumore der Lungen, Nieren (**Chevillard et al., 1998**) und des Magens (**Shinmura et al., 1998**) berichtet wurde, in denen inaktivierende Mutationen im *hOGGI*-Gen vorlagen, wird die Diskussion geführt, ob das *OGGI*-Gen als Reparaturgen der DNA als eine Art Tumorsuppressorgen bzw. „Caretaker-Genen“ fungieren könnte (**Loeb, 1991; Radicella & Boiteux, 1998; Chevillard et al., 1998**). Beispielsweise wird beim Ausfall der Gene *hMSH2* und *hMLH1*, die ebenfalls an der DNA-Reparatur beteiligt sind (s. Kapitel 2.4.5), von einer erhöhten Rate maligner Transformationen berichtet (**Fishel et al., 1993; Modrich, 1994**).

Als weitere biochemische und biologische Endpunkte wurde deshalb die Einflußnahme des *OGGI*-Genproduktes auf Zelltoxizität, induzierte und spontane Mutagenese und die Induktion von Mikrokernen bestimmt. Die Untersuchungen wurden in der CHO-Zelllinie AS52 und ihren transfizierten Klonen durchgeführt.

Bei der Induktion von Mutanten im *gpt-Locus* der AS52-Zellen und der *OGGI*-überexprimierenden Transfektanten mit Hilfe des angeregten Photosensibilisators Ro 19-8022 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den AS52-Zellen und dem Klon AS52-ogg1-2. Die Untersuchungen erwiesen sich insofern als problematisch, daß durch die Induktion in den Zellen keine mehr als 2-fach über dem Untergrund liegenden Mutationsraten erzielt werden konnten (Abb. 5.29). Dies liegt in der hohen Zelltoxizität der Schädigung begründet, welche höchstwahrscheinlich auf andere zelluläre Schäden als die Schädigung der DNA zurückzuführen ist. Aus diesem Grunde war es nicht möglich mehr als etwa 8 FPG-sensitive Basenmodifikationen pro  $10^6$  bp in den Zelllinien zu generieren. Jedoch deckt sich dieser Befund mit den relativ niedrig ausfallenden Mutationsraten für 8-oxoG (< 2 %), die von Experimenten in Säugerzellen berichtet werden (**Klein et al., 1992; Le Page et al., 1998**). Die ermittelten Zelltoxizitätskurven in beiden Zelllinien erwiesen sich als sehr ähnlich (Abb. 5.30), was wiederum ein Indiz für einen DNA-unabhängigen Mechanismus der Toxizität ist.

Die Induktion durch Kaliumbromat führt zu wesentlich höheren Mutationsraten, die bis zu 25-fach über den spontanen Mutationsraten lagen (Abb. 5.31). Aber auch hier ist kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen AS52 und dem *OGGI*-transfizierten Klon nachweisbar, obgleich der transfizierte Klon durchschnittlich bei allen Konzentrationen niedrigere Mutationsraten als die parentalen Zellen aufweist. Wahrscheinlich ist die Mutagenität von Kaliumbromat bei höheren Konzentrationen (> 20 mM) nicht auf FPG-sensitive Basenmodifikationen sondern andere Modifikationen oder Einzelstrangbrüche (s. Kapitel 6.7) zurückzuführen. Hinweise dafür sind die nicht lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung sowie Befunde, daß der Schädigungsmechanismus von Kaliumbromat bei höheren Konzentrationen sich vermutlich von dem bei niedrigeren unterscheidet, was ein anderes

Spektrum an Basenmodifikationen bedingt (**Ballmaier & Epe, 1995**). Dieses Resultat läßt auch vermuten, daß die kanzerogene Wirkung von Kaliumbromat in Nagetieren demnach nicht durch 8-oxoG verursacht wird. Die durch die Kaliumbromat-Schädigung bedingte Zelltoxizität stellt sich in den beiden Zelllinien wiederum als nahezu identisch dar (Abb. 5.32).

Auch bei der Bestimmung der spontanen Mutationsraten konnte kein signifikanter Effekt der *hOGGI*-Überexpression gezeigt werden (Abb. 5.33 und 5.34). Dies kann darin begründet sein, daß Ogg1 in den Zellen keinen geschwindigkeitsbestimmenden Faktor bei der Reparatur von 8-oxoG darstellt, was auch die Bestimmung der Steady-State-Level FPG-sensitiver Modifikationen vermuten ließ (s. Kapitel 6.4). Wahrscheinlich ist jedoch, daß oxidative Modifikationen nur einen kleinen Beitrag zur spontanen Mutationsrate im *gpt-Locus* leisten, da das Mutationsspektrum kaum GC→TA Transversionen aufweist (s. Kapitel 5.8.2.2 und Diskussion unter Kapitel 6.7). Die Tatsache, daß die Mutationsraten in allen Transfektanten – auch dem *vector-only*-transfizierten Klon – signifikant gegenüber den parental AS52 erniedrigt sind, läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß während der Selektion auf stabil transfizierte Klone parallel gegen genomisch instabile und damit hypermutable Zellklone selektiert wurde.

Für diese Vermutung sprechen auch die Ergebnisse der durchgeführten Mikrokern-Bestimmungen. Ähnlich wie bei der Bestimmung der Spontan-Mutationsraten ergab sich in allen Transfektanten zumindest bei der Induktion mit 0.2 µM Ro 19-8022 und sichtbarem Licht eine signifikant niedrigere Rate von Mikrokernen als in den parental AS52 (Abb. 5.35). Dies spricht ebenfalls für die höhere genomische Stabilität der transfizierten Klone. Es konnte jedoch keine signifikante Erniedrigung der induzierten Mikrokernraten in Abhängigkeit der *OGGI*-Überexpression beobachtet werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß durch die Überexpression von *hOGGI* in den CHO-Zellen keine signifikante Erniedrigung von spontanen oder induzierten Mutationsraten beobachtet wurde. Ebenso führte die Überexpression in diesem System zu keiner signifikanten Veränderung der durch oxidativ schädigende Agentien herbeigeführten Zelltoxizität. Auch bei der Induktion von Mikrokernen konnte keine Korrelation zwischen induzierten Mikrokernraten und dem Grad der *hOGGI*-Überexpression erkannt werden. Die alleinige Überexpression von *hOGGI* scheint also in dem hier beschriebenen System keinen Schutz vor genotoxischen Ereignissen und Mutationen zu bieten. Zur weiteren Bestimmung der Bedeutung von *OGGI* im Hinblick auf die Entstehung von Mutationen, müssen Mutationstests in *OGGI(-/-)*-*knock-out*-Zellen oder Tiere durchgeführt werden.

Erste Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe von T. Lindahl zeigen, daß die spontane Mutationsrate in den Hepatocyten von *OGGI(-/-)*-*knock-out*-Mäusen tatsächlich mehr als 2-fach höher ist als in den Wildtyp-Mäusen, während in den schnell proliferierenden Spermatozyten keine signifikanten Unterschiede gefunden wurden (**Klungland et al., 1999**).

## 6.6 Besitzen maligne Zellen Anzeichen erhöhten oxidativen Stresses?

In dieser Arbeit wurde eine Reihe von etablierten Bronchialkarzinom-Zelllinien hinsichtlich ihrer Steady-State-Level FPG-sensitiver Modifikationen und ihrer 8-oxoG-Glykosylaseaktivität untersucht. Gerade die Gruppe der Bronchialcarcinome ist gekennzeichnet durch einen häufigen Verlust der Heterozygotie im Chromosomen-Bereich 3p (Naylor et al., 1987; Yokota et al., 1987; Hibi et al., 1992), auf dem das *hOGG1*-Gen (3p25) lokalisiert ist. Eine inaktivierende Mutation des einen verbliebenen *OGG1*-Allels würde somit zu einem Funktionsverlust von *OGG1* führen, was mit einer Erhöhung von oxidativen DNA-Schäden und Mutationen einhergehen müßte. In 2 von 25 kleinzelligen Lungentumoren wurden in den Untersuchungen von Chevillard et al. (1998) homozygote Punktmutation von *hOGG1* – bedingt durch den Verlust eines Allels – und einen dadurch bedingter Ausfall der Enzymaktivität gezeigt.

Bei den hier untersuchten Bronchialkarzinom-Zelllinien verschiedener Gruppen zeigen sich gegenüber der als Kontrolle dienenden Bronchialepithel-Zelllinie BEAS-2B keine statistisch signifikante erhöhten Steady-State-Level FPG-sensitiver Basenmodifikationen (Abb. 5.36). Die beiden untersuchten Kleinzeller-Linien besitzen den Kontrollen völlig ähnelnde Steady-State-Level von durchschnittlich 0.2 Basenmodifikationen pro  $10^6$  bp. Bei der Bestimmung der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität im Zellextrakt konnten in allen untersuchten Zelllinien eine deutliche Erkennung von 8-oxoG detektiert werden (Abb. 5.37, unten). Eine Korrelation der Steady-State-Level mit den verschiedenen hohen Enzymaktivitäten konnte nicht erkannt werden. In den hier durchgeführten Untersuchungen konnten keine zelltypabhängigen Veränderungen im Steady-State-Level oxidativer Basenmodifikationen detektiert werden. Die relativ leichten Erhöhungen der verschiedenen Steady-State-Level könnten, unabhängig von der Malignität der Zelllinien, auf interindividuelle Unterschiede in den Spendern der Karzinome zurückzuführen sein. Nach den oben beschriebenen Ergebnissen ist es aber selbst bei vollständigem Verlust der *Ogg1*-Aktivität nicht sicher, daß ein signifikanter Unterschied im Steady-State-Level FPG-sensitiver Modifikationen detektiert werden könnte, da es sich bei allen Bronchialkarzinomen um relativ schnell teilende Zellen handelt (mögliche Bedeutung der Zellteilung: s. Kapitel 6.4). Auch die Etablierung und die Passagenzahl der Zelllinien stellen kritische Punkte im Hinblick auf die Originalität der untersuchten Proben dar. Schließlich ist auch die Wahrscheinlichkeit nach den bisher vorliegenden Befunden Mutationen im *hOGG1*-Gen in Tumoren zu finden nicht so hoch, daß bei der hier untersuchten Anzahl von Bronchialkarzinom-Zelllinien davon ausgegangen werden kann, Karzinomzelllinien mit defekter Reparatur oxidativer DNA-Schäden vorliegen zu haben. Gestützt wird diese Annahme wiederum durch eine Arbeit von Arai et al. (1997), in der bei

Untersuchungen von 28 Lungentumoren in keinem der Tumore ein totaler Ausfall der *OGG1*-Genexpression vorgefunden wurde.

### **6.7 Spontane und induzierte Mutagenität als Folge von oxidativen DNA-Schäden?**

Zur Untersuchung der mutagenen Potenz oxidativer DNA-Modifikationen wurden in dieser Arbeit sowohl Versuche in einem prokaryontischen System als auch in Säugerzellen durchgeführt. Dabei wurden spontane und durch oxidativ schädigende Agentien induzierte Mutationsraten ermittelt.

Bei den Versuchen im prokaryontischen System wurde Plasmid-DNA mit der Peroxynitrit-freisetzenden Verbindung SIN-1 geschädigt und dann in Bakterien transformiert. In Vorarbeiten (**Ballmaier, 1997**) konnte bei der Bestimmung eines Schadensprofils in PM2-Bakteriophagen-DNA gezeigt werden, daß durch SIN-1 in zellfreier DNA etwa zehnmal mehr FPG-sensitive als andere Endonuklease-sensitive Basenmodifikationen induziert werden. Die ermittelte Anzahl FPG-sensitiver Modifikationen lag gut zweimal höher als die induzierte Anzahl an Einzelstrangbrüchen. Die Schädigung der pSV2-*gpt*-Plasmid-DNA führt zu einem linearen Anstieg an FPG-sensitiven Modifikationen und Einzelstrangbrüchen, wobei wiederum gut doppelt soviel FPG-sensitive Modifikationen wie Einzelstrangbrüche bei den selben Schädigungen generiert wurden (Abb. 5.38). Mit steigender Plasmidschädigung kann nach Transformation der Plasmide in den Bakterienstamm *E. coli* DT2 sowohl ein rasches Absinken der Transformationsrate (Abb. 5.39) als auch ein lineares Ansteigen der Mutationsrate (Abb. 5.40) beobachtet werden. Wenn man – wie in Abb. 5.40 – die Zahl der generierten FPG-sensitiven Modifikationen mit der bestimmten Mutationsfrequenz korreliert, kann abgelesen werden, daß die Induktion von 1 FPG-sensitiven Modifikation pro 5.2 kbp (pro Plasmid) zusätzlich zum Untergrund etwa  $2 \times 10^{-4}$  Mutanten generiert. Dies liegt um ca. 40 % unter dem entsprechend ermittelten Wert, der für die Schädigung von Plasmid-DNA durch Ro 19-8022 und sichtbarem Licht im gleichen System erzielt wurde (**Will, 1999**). Dies zeigt, daß die durch SIN-1 generierten FPG-sensitive Modifikationen Mutationen induzieren, aber nicht in dem Ausmaß wie es bei der Schädigung mit Ro 19-8022 und sichtbarem Licht der Fall ist. Dies ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß die durch die SIN-1-Schädigung generierten FPG-sensitiven Modifikationen zu einem geringeren Anteil wie bei der Schädigung mit dem angeregten Photosensibilisator Ro 19-8022 8-oxoG darstellen. Ein weitere Möglichkeit wäre, daß der bei der Extrapolation angenommene lineare Anstieg FPG-sensitiver Modifikationen nicht gegeben ist. Im übrigen verhindert die schnell ansteigende Toxizität der SIN-1 Schädigung die Induktion höherer Mutationsraten.

Die durch Kaliumbromat und Ro 19-8022 induzierten als auch spontanen Mutationsraten in den CHO-Zellen AS52 wurden bereits im Kapitel 6.5 (*OGG1* ein Antimutator-Gen?) diskutiert. Im Folgenden soll nun auf die Qualität der entstandenen Mutationen eingegangen

werden, was auf der Basis gewonnener Sequenzierungsdaten der *gpt*-Gene verschiedener Mutanten geschehen soll. Bei den induzierten Mutanten wurden zur Untersuchung nur durch Kaliumbromat induzierte Mutationen sequenziert, da hier im Gegensatz zur Induktion durch Ro 19-8022 und sichtbarem Licht eine mehrfach über dem Untergrund liegende Mutationsrate gegeben war (vgl. hierzu Abb. 5.29 und 5.31). Die untersuchten, induzierten Mutantenklone stammen aus Versuchen, bei denen die induzierten Mutationsraten mindestens 4-fach über der Mutationsrate ungeschädigter Zellen (Kontrolle) lagen.

Bei den 26 untersuchten, durch Kaliumbromat induzierten Mutanten (6TG-resistente AS52) ergaben die Sequenzierungen wider Erwarten keine Dominanz von Punktmutationen, sondern das Vorherrschen von Deletionen (Tab. 5.3). Dabei werden Proben die mit verschiedenen *gpt*-genspezifischen Primer-Kombinationen wiederholt kein zu erwartendes PCR-Produkt lieferten als größere oder komplette Deletionen des *gpt*-Gens angesehen (**Meng & Hsie, 1996**). Somit stellen 19 der 26 Proben (73 %) Deletionsmutationen dar, die höchstwahrscheinlich nicht auf 8-oxoG zurückzuführen sind. Daneben wurden eine 1-Basen-Insertions-Mutation und vier Punktmutationen detektiert, worunter nur eine ( $\approx 4\%$  aller Proben) die von 8-oxoG typischerweise verursachte G:C $\rightarrow$ T:A Transversion war. Da die untersuchten Mutanten aus Schädigungen mit mindestens 40 mM Kaliumbromat hervorgingen, wird somit aufgrund des detektierten Mutationsmusters die Vermutung gestützt, daß Kaliumbromat bei höheren Konzentrationen ein anderes Spektrum an DNA-Schäden generiert (**Ballmaier & Epe, 1995**). Die hohen durch Kaliumbromat induzierten Mutationsraten könnten möglicherweise auf die Induktion von Strangbrüchen zurückgeführt werden, was auch den hohen Anteil an Deletionen erklären könnte. Beim Einsatz hoher Konzentrationen von Natriumarsenit im AS52/*gpt*-Mutationstest wird ebenfalls von einem bis zu 67-prozentigen Anteil größere Deletionen im *gpt*-Gen berichtet (**Meng & Hsie, 1996**). Dabei werden als mögliche Ursache Strangbrüche und Fehler während der DNA-Reparatur diskutiert. Betrachtet man die Verteilung der durch Bromat induzierten Mutationen innerhalb des *gpt*-Gens (Abb. 5.41), so wird augenfällig, daß sich alle kurzen Deletionen (2b- und 3b-Deletionen) auf einen ganz schmalen Bereich (bp 366-369) im *gpt*-Gen konzentrieren. **Tindall & Stankowski (1989)** berichten ebenfalls von einem ähnlichen *Hot Spot* kleiner Deletionen (bp 366-387) bei der Analyse von spontanen Mutationen im *gpt*-Gen von AS52-Zellen. Auch in Mäusezellen (A9I2-Zellen), in denen das bakterielle *gpt*-Gen genomisch integriert wurde, wird von dem gleichen Deletions-*Hot-Spot* bei der Analyse spontan aufgetretener Mutanten berichtet (**Ashman & Davidson, 1987**). Dies legt die Vermutung nahe, daß der detektierte *Hot Spot* unabhängig von einer Spezies und/oder unabhängig von der Lokalisierung innerhalb des Wirtsgenoms ist.

Auf analoge Weise wurden in dieser Arbeit auch 12 spontan aufgetretene 6TG-resistente AS52-Mutanten mittels PCR und Sequenzierung näher charakterisiert. Die Untersuchung der relativ geringen Anzahl von 12 Proben läßt sicherlich keine statistisch exakten Aussagen zu,

bestätigt aber in ihrer Tendenz die bereits erwähnten Befunde über die spontanen Mutationen im *gpt*-Gen von AS52-Zellen und A9I2-Zellen (**Tindall & Stankowski, 1989; Ashman & Davidson, 1987**). Die in Tab. 5.4 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen, daß 6 der 12 (50 %) Proben Deletionen und 2 der 12 (17 %) Proben Punktmutationen darstellen. Eine der Punktmutationen ist eine G:C→T:A Transversion, was einer relativen Häufigkeit von 8 % entspricht. An der Verteilung der Mutationen im Genom (Abb. 5.42) zeigt sich wieder die Konzentrierung aller drei 3b-Deletionen (30 %) im *Hot-Spot*-Bereich beginnend bei Basenpaar 366. **Tindall & Stankowski (1989)** berichten in ihren Untersuchungen spontaner *gpt*-Mutationen in AS52-Zellen von insgesamt 55 % (Experiment I) bzw. 61 % (Experiment II) relativem Anteil an Deletionen und von 31 % 3b-Deletionen mit Lokalisierung im *Hot Spot*. Dies deckt sich mit den hier bestimmten Daten.

Beim Vergleich der hier bestimmten Mutationsspektren, die entweder durch Kaliumbromat induziert wurden oder spontan aufgetreten waren, findet man eine hohe Ähnlichkeit der Mutationsspektren. Beide Mutationsspektren zeichnen sich durch einen hohen Anteil an Deletionsmutationen und einen geringen Anteil an Punktmutationen aus. Der geringe Anteil an G:C→T:A Transversionen im Spektrum der induzierten Mutanten spricht entweder dafür, daß die bei hohen Konzentrationen induzierten FPG-sensitiven Basenmodifikationen nur zu einem geringen Teil 8-oxoG sind oder daß die Besonderheit der zu Deletionsmutationen neigenden *Hot-Spot*-Region im *gpt*-Gen eine Induktion anderer Mutationen erschwert bzw. überdeckt.

## 7. Literaturverzeichnis

- Aburatani, H., Hippo, Y., Ishida, T., Takashima, R., Matsuba, C., Kodama, T., Takao, M., Yasui, A., Yamamoto, K., Asano, M., Fukasawa, K., Yoshinari, T., Inoue, H., Ohtsuka E., and Nishimura, S. (1997) Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue. *Cancer Res.*, 57, 2151-2156.
- Anderson, G.P. (1997) Bcl-2 related proteins, apoptosis and disease. *TIPS (Comment)*, 18, 51.
- Arai, K., Morishita, K., Shinmura, K., Kohno, T., Kim, S.R., Nohmi, T., Taniwaki, M., Ohwada, S., and Yokota, J. (1997) Cloning of a human homolog of the yeast OGG1 gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage. *Oncogene*, 14, 2857-61.
- Ashman, C.R. and Davidson, R.L. (1984) High spontaneous mutation frequency in shuttle vector sequences recovered from mammalian cellular DNA. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 2266-2272.
- Ashman, C.R. and Davidson, R.L. (1987) Sequence analysis of spontaneous mutation in a shuttle vector gene integrated into mammalian chromosomal DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 3354-3358.
- Auffret van der Kemp, P., Thomas, D., Barbey, R., DeOliveira, R. and Boiteux, S. (1996) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 5197-5202.
- Ballmaier, D. (1993) Charakterisierung von DNA-Schäden durch Kaliumbromat mit Hilfe von Reparaturenukleasen. Diplomarbeit, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg.
- Ballmaier, D. (1997) Oxidative DNA-Modifikationen durch extrazellulär und intrazellulär gebildete reaktive Sauerstoffspezies. Dissertation, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg.
- Ballmaier, D. and Epe, B. (1995) Oxidative DNA damage induced by potassium bromate under cell-free conditions and in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 16, 335-342.
- Basu, A.K., Loechler, E.L., Leadon, S.A. and Essigmann, J.M. (1989) Genetic effects of thymine glycol site specific mutagenesis and molecular modeling studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 7677-7681.
- Beckman, K.B. and Ames, B.N. (1997) Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.*, 272, 19633-19636.
- Bessho, T., Roy, R., Yamamoto, K., Kasai, H. and Nishimura, S. (1993) Repair of 8-hydroxyguanine in DNA by mammalian N-methylpurine DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 8901-8904.
- Bhimani, R.S., Troll, W., Grunberger, D. and Frenkel, K. (1993) Inhibition of oxidative stress in HeLa cells by chemopreventive agents. *Cancer Res.*, 53, 4528-4533.
- Biffi, W.L., Moore, E.E., Moore, F.A., Barnett, C.C., Carl, V.S. and Peterson, V.N. (1996) Interleukin-6 delays neutrophil apoptosis. *Arch. Surg.*, 131, 24-29.

- Bjoras, M., Luna, L., Johnsen, B., Hoff, E., Haug, T., Rognes, T., and Seeberg, E. (1997) Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites. *Embo J.*, 16, 6314-6322.
- Boiteux, S. and Radicella, J.P. (1998) Réparation de l'ADN et cancer: Les gènes de réparation des bases oxydées dans l'ADN sont-ils des gènes suppresseurs de tumeurs? *Médecines/sciences*, 14, 310-313.
- Boiteux, S. and Radicella, J.P. (1999) Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects from endogenous oxidative stress. *Biochimie*, 81, 59-67.
- Boiteux, S., O'Connor, T.R. and Laval, J. (1987) Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli*: cloning and sequencing of the *fpg* structural gene and overproduction of the protein. *EMBO J.*, 6, 3177-3183.
- Boiteux, S., O'Connor, T.R., Lederer, F., Gouyette, A. and Laval, J. (1990) Homogeneous *Escherichia coli* Fpg protein. *J. Biol. Chem.*, 265, 3916-3922.
- Boiteux, S., Dhérin, C., Reille, F., Apiou, F., Dutrillaux, B. and Radicella, J.P. (1998) Excision repair of 8-hydroxyguanine in mammalian cells: The mouse Ogg1 protein as a model. *Free Rad. Res.*, 29, 487-497.
- Breimer, L.H. and Lindahl, T. (1985) Thimine lesions produced by ionizing radiation in double-stranded DNA. *Biochemistry*, 24, 4018-4022.
- Bruner, S.D., Nash, H.M., Lane, W.S. and Verdine, G.L. (1998) Repair of oxidatively damaged guanine in *Saccharomyces cerevisiae* by an alternative pathway. *Curr. Biol.*, 8, 393-403.
- Cadet, J. and Téoule, R. (1978) Comparative study of oxidation of nucleic acid components by hydroxyl radicals, singlet oxygen and superoxide anion radicals. *Photochem. Photobiol.*, 28, 661-667.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T. and Ravanat, J.L. (1997) Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 131, 1-87.
- Cai, J.P., Kakuma, T., Tsuzuki, T. and Sekiguchi, M. (1995) cDNA and genomic sequences for rat 8-oxo-dGTPase that prevents occurrence of spontaneous mutations due to oxidation of guanine nucleotides. *Carcinogenesis*, 16, 2343-2350.
- Caldecott, K.W., Tucker, J.D., Stanker, L.H. and Thompson, L.H. (1995) Characterization of the XRCC1-DNA ligase III complex in vitro and its absence from mutant hamster cells. *Nucleic Acids Res.*, 23, 4336-4843.
- Caldecott, K.W., Aoufouchi, S., Johnson, P. and Shall, S. (1996) XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly(ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res.*, 24, 4387-4394.
- Cappelli, E., Taylor, R., Cevasco, M., Abbondandolo, Caldecott, K. and Frosina, G. (1997) Involvement of XRCC1 and DNA Ligase III gene products in DNA Base Excisions Repair. *J. Biol. Chem.*, 272, 23970-23975.
- Carraro, C. and Pathak, M.A. (1988) Studies on the nature of *in vitro* and *in vivo* photosensitization reactions by psoralens and porphyrins. *J. Invest. Dermatol.*, 90, 267-275.



- Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S. and Loeb, L.A. (1992) 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G→T and A→C substitutions. *J. Biol. Chem.*, 267, 166-172.
- Chevillard, S., Radicella, J.P., Levalois, C., Lebeau, J., Poupon, M.-F., Oudard, S., Dutrillaux, B. and Boiteux, S. (1998) Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours. *Oncogene*, 16, 3083-3086.
- Churchill, M.E., Peak, J.G. and Peak, M.J. (1991) Repair of near-visible- and blue-light-induced DNA single-strand breaks by the CHO cell lines AA8 and EM9. *Photochem. Photobiol.*, 54, 639-644.
- Ciulla, T.A., van Kamp, J.R., Rosenfeld, E. and Kochevar, I.E. (1989) Photosensitization of single-strand breaks in pBR322 DNA by rose bengal. *Photochem. Photobiol.*, 49, 293-298.
- Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E. and Gallo, R.C. (1979) Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. *J. Exp. Med.*, 149, 969-974.
- Croteau, D.L., Rhys, C.M.J., Hudson, E.K., Dianov, G.L., Hansford, R.G. and Bohr, V.A. (1997) An oxidative damage specific endonuclease from rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 272, 27338-27344.
- Cunningham, R.P. (1997) DNA glycosylases. *Mutat. Res. DNA Repair*, 383, 189-196.
- Dally, H. and Hartwig, A. (1997) Induction and repair of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 18, 1021-1026.
- de Groot, H., Hegi, U. and Sies, H. (1993) Loss of  $\alpha$ -tocopherol upon exposure to nitric oxide or the sydnomine SIN-1. *FEBS*, 315, 139-142.
- de Murcia, G. and Menissier-de Murcia, J. (1994) Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem. Sci.*, 19, 172-176.
- De Oliveira, R., Auffret van der Kemp, P., Thomas, D., Barbey, R. and Boiteux, S. (1994) Formamidopyrimidine DNA glycosylase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, 22, 3760-3764.
- Decker, H.J., Neuhaus, C., Jauch, A., Speicher, M., Ried, T., Bujard, M., Brauch, H., Storkel, S., Stockle, M., Seliger, B. and Huber, C. (1996) Detection of a germline mutation and somatic homozygous loss of the von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene in a family with a de novo mutation. A combined genetic study, including cytogenetics, PCR/SSCP, FISH and CGH. *Human Genet.*, 97, 770-776.
- Demple, B., and Harrison, L. (1994) Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu. Rev. Biochem.*, 63, 915-948.
- Dianov, G. and Lindahl, T. (1994) Reconstitution of the DNA base excision-repair pathway. *Curr. Biol.*, 4, 1069-1076.
- Dianov, G., Bischoff, C., Piotrowski, J. and Bohr, V.A. (1998) Repair pathways for processing of 8-oxoguanine in DNA by mammalian cell extracts. *J. Biol. Chem.*, 273, 33811-33816.
- Dianov, G., Bischoff, C., Sunesen, M. and Bohr, V.A. (1999) Repair of 8-oxoguanine in DNA is deficient in Cockayne syndrome group B cells. *Nucleic Acids Res.*, 27, 1365-1368.

- Dizdaroglu, M. (1992) Oxidative DNA damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutation Res.*, 275, 331-342.
- Dizdaroglu, M. (1993) Quantitative determination of oxidative base damage in DNA by stable isotope-dilution mass spectrometry. *FEBS*, 315, 1-6.
- Dodson, M.L., Michaels, M.L. and Lloyd, R.S. (1994) Unified catalytic mechanism for DNA glycosylases. *J. Biol. Chem.*, 269, 32709-32712.
- Duchstein, H.J. and Riederer, S. (1995) Cytochrom P-450: Enzymsystem zur NO-Freisetzung. *PZ*, 140(31), 25-29.
- Eide, L., Bjoras, M., Pivorano, M., Alseth, I., Berdal, K.G. and Seeberg, E. (1996) Base excision of oxidative purine and pyrimidine DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae* by a DNA glycosylase with sequence similarity to endonuclease III of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 10735-10740.
- Engelward, B.P., Weeda G., Wyatt M.D., Broekhof, J.L.M., deWit, J., Donker, I., Allan, J.M., Gold, B., Hoeijmakers, J.H.J. and Samson, L.D. (1997) Base excision repair deficient mice lacking the Aag alkyladenine DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 13087-13092.
- Epe, B. (1991) Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem.-Biol. Interactions*, 80, 239-260.
- Epe, B. (1993) DNA damage induced by photosensitization. In: Halliwell, B., Aruoma, O.I., Hoorwood, E. (eds.) *DNA and Free Radicals*, S. 41-65.
- Epe, B. (1995) DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 127, 223-249.
- Epe, B., Mützel, P. and Adam, W. (1988) DNA damage by oxygen radicals and excited state species: a comparative study using enzymatic probes *in vivo*. *Chem.-Biol. Interactions*, 67, 149-165.
- Epe, B., Häring, M., Ramaiah, D. and Stopper, H. (1993a) DNA damage induced by furocumarin hydroperoxides plus UV (360 nm). *Carcinogenesis*, 14, 2271-2276.
- Epe, B., Henzel, H., Adam, W. and Saha-Möller, C. (1993b) Endonuclease-sensitive DNA modifications induced by acetone and acetophenone as photosensitizers. *Nucleic Acids Res.*, 21, 863-869.
- Epe, B., Pflaum, M. and Boiteux, S. (1993c) DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems. *Mutation Res.*, 299, 135-145.
- Epe, B. and Hegler, J. (1994) Oxidative DNA damage: endonuclease fingerprinting. *Methods Enzymol.*, 234, 122-131.
- Epe, B., Ballmaier, D., Roussyn, I., Briviba, K. and Sies, H. (1996) DNA damage by peroxynitrite characterized with DNA repair enzymes. *Nucleic Acids Res.*, 24, 4105-4110.
- Evans, J., Maccabee, M., Hatahet, Z., Courcelle, J., Bockrath, R., Ide, H. and Wallace, S. (1993) Thymine ring saturation and fragmentation products: lesion bypass, misinsertion and implications for mutagenesis. *Mutat. Res.*, 299, 147-156.
- Feig, D.I., Reid, T.M. and Loeb, L.A. (1994) Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res. Suppl.*, 54, 1890-1894.

- Fishel, R., Lescoe, M.K., Rao, M.R.S., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Garber, J., Kane, M. and Kolodner, R. (1993) The human mutator homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*, 75, 1027-1038.
- Floyd, R.A., Watson, J.J., Harris, J., West, M. and Wong, P.K. (1986) Formation of 8-hydroxydesoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promoter, tetradecanoylphorbolacetate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 137, 841-846.
- Foiani, M., Ferrari, M., Liberi, G., Lopes, M. Lucca, C., Marini, F., Pelliccioli, A., Falconi, M.M. and Plevani, P. (1998) S-Phase DNA damage checkpoint in budding yeast. *Biol. Chem.*, 379, 1019-1023.
- Friedberg, E.C. (1996) Relationships between DNA repair and transcription. *Ann. Rev. Biochemistry*, 65, 15-42.
- Frosina, G., Fortini, P., Rossi, O., Carozzino, F., Raspaglio, G., Cox, I.S., Lane, D.P., Abbondandolo, E. and Dogliotti, E. (1996) Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 271, 9573-9578.
- Fuciarelli, A.F., Wegher, B.J., Blakely, W.F. and Dizdaroglu, M. (1990) Yields of radiation-induced base products in DNA: effects of DNA conformation and gassing conditions. *Int. J. Radiat. Biol.*, 58, 397-415.
- Girard, P.M. and Boiteux, S. (1997) Repair of oxidized DNA bases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimie*, 79, 559-566.
- Girard, P.M., Guibourt, N. and Boiteux, S. (1997) The Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: a 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase / AP lyase whose lysine 241 is a critical residue for catalytic activity. *Nucleic Acids Res.*, 25, 3404-3411.
- Girard, P.M., D'Ham, C., Cadet, J. and Boiteux, S. (1998) Opposite base-dependent excision of 7,8-dihydro-8-oxoadenine by the Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Carcinogenesis*, 19, 1299-1305.
- Glaab, W.E. and Tindall, K.R. (1997) Mutation rate at the hprt locus in human cancer cell lines with specific mismatch repair-gene defects. *Carcinogenesis*, 18, 1-8.
- Griffith, O.W. (1985) Glutathione and glutathione disulphide. In: Bergmeyer, H.U. (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*, 3rd Ed., VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, Vol. VIII, pp. 521-529.
- Grollman, A.P. and Moriya, M. (1993) Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends Genet.*, 9, 246-249.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, 219, 1-14.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1985) *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press, Oxford.
- Hang, B., Singer, B., Margison, G.P. and Elder, R.H. (1997) Targeted deletion of alkylpurine-DNA-N-glycosylase in mice eliminates repair of 1,N<sup>6</sup>-ethenoadenine but not of 3,N<sup>4</sup>-ethenocytosine or 8-oxoguanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 12869-12874.

- Harttig, U. (1991) Interaktion chinoider Metaboliten mit Proteinen: Ein möglicher Mechanismus für die Aneuploidie-Induktion durch das kanzerogene Östrogen Diethylstilbestrol. Doktorarbeit an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
- Hayashi, M., Kishi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M.Jr. (1988) Micronucleus tests with mice on 39 food additives and 8 miscellaneous chemical substances. *Food Chem. Toxicol.*, 26, 487-500.
- Hayes, R.C., Petruccio, L.A., Huang, H., Wallace, S.S. and LeClerc, J.E. (1988) Oxidative DNA damage in DNA. Lack of mutagenicity by thymine glycol lesions. *J. Mol. Biol.*, 201, 239-246.
- Heihoff, K., Redmond, R.W., Braslavsky, S.E., Rougée, M., Salet, C., Favre, A. and Bensasson, R.V. (1990) Quantum yields of triplet and  $O_2(^1\Delta_g)$  formation of 4-thiouridine in water and acetonitrile. *Photochem. Photobiol.*, 51, 635-641.
- Hibi K., Takahashi, T., Yamakawa, K., Ueda, R., Sekido, Y., Ariyoshi, Y., Suyama, M., Takagi, H., Nakamura, Y. and Takahashi, T. (1992) Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer. *Oncogene*, 7, 445-449.
- Hockenbery, M.D., Oltvai, Z.N., Yin, X.-M., Millman, C.L. and Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*, 75, 241-251.
- Hollstein, M., Shomer, B., Greenblatt, M., Soussi, T., Hovig, E., Montesano, R. and Harris, C.C. (1996) Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res.*, 24, 141-146.
- Hsie, A.W., Brimer, P.A., Mitchell, T.J. and Gosslee, D.G. (1975) The dose-response relationships for ethyl-methanesulfonate-induced mutations at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus in Chinese hamster ovary cells. *Somat. Cell. Genet.*, 1, 247-261.
- Huang, J.C., Hsu, D.S., Kazantsev, A. and Sancar, A. (1994) Substrate spectrum of human exonuclease: repair of abasic sites, methylated bases, mismatches and bulky adducts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 12213-12217.
- Hüttermann, J. (1982) Solid-state radiation chemistry of DNA and its constituents. *J. Ultramicroscopy*, 10, 25-40.
- Ishidate, M.Jr. and Yoshikawa, K. (1980) Chromosome aberration tests with chinese hamster cells in vitro with and without metabolic activation – a comparative study on mutagens and carcinogens. *Arch. Toxicol.*, 4, 41-44.
- Jacobson, D.M. and Raff, C.M. (1995) Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature*, 374, 814-816.
- Jaruga, P. and Dizdaroglu, M. (1996) Repair of products of oxidative DNA damage in human cells. *Nucleic Acids Res.*, 24, 1389-1394.
- Joshi, P.C. (1985) Comparison of the DNA-damaging property of photosensitized riboflavin via singlet oxygen ( $^1O_2$ ) and superoxid radical ( $O_2^{\bullet-}$ ) mechanisms. *Toxicol. Lett.*, 26, 211-217.
- Kaina, B. (1997) DNA-Reparatur, induzierbare zelluläre Schutzmechanismen und Salutogenese. In: Bartsch, H.H., Bengel, J. (Hrsg.) Salutogenese in der Onkologie. Basel, Karger, pp. 47-73.
- Kane, D.J., Sarafian, T.A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E.B., Valentine, J.S., Örd, T. and Bredesen, D.E. (1993) Bcl-2 Inhibition of neural cell death: Decreased generation of reactive oxygen species. *Science*, 262, 1274-1277.

- Kanofsky, J.R. (1989) Singlet oxygen production by biological systems. *Chem.-Biol. Interact.*, 70, 1-28.
- Karahalil, B., Girard, P.M., Boiteux, S. and Dizdaroglu, M. (1996) Substrate specificity of the Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: Excision of guanine lesions produced in DNA by ionizing radiation- or hydrogen peroxide/metal ion-generated free radicals. *Nucleic Acids Res.*, 26, 1228-1232.
- Kasai, H., Crain, P.F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Ootsuyama, A. and Tanooka, H. (1986) Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis*, 7, 1849-1851.
- Kasai, H., Nishimura, S., Kurokawa, Y. and Hyashi, Y. (1987) Oral administration of the renal carcinogen, potassium bromate, specifically produces 8-hydroxydeoxyguanosine in rat target organ. *Carcinogenesis*, 8, 1959-1961.
- Kasai, H. and Nishimura, S. (1993) Formation of 8-hydroxyguanine by oxidative DNA damage, its repair and its mutagenic effects. *Adv. Mutagen. Res.*, 4, 31-45.
- Kawanishi, S., Inoue, S., Sano, S. and Aiba, H. (1986) Photodynamic guanine modification by hematoporphyrin is specific for single-stranded DNA with singlet oxygen as mediator. *J. Biol. Chem.*, 261, 6090-6095.
- Keene, J.P., Kessel, D., Land, E.J., Redmond, R.W. and Truscott, T.G. (1986) Direct detection of singlet oxygen sensitized by haematoporphyrin and related compounds. *Photochem. Photobiol.*, 43, 117-120.
- Klein, J.C., Bleeker, M.J., Saris, C.P., Roelen, H.C.P.F., Brugghe, H.F. and Berns, A.J.M. (1992) Repair and replication of plasmids with side-specific 8-oxodG and 8-AAFdG residues in normal and repair deficient human cells. *Nucleic Acids Res.*, 20, 4437-4443.
- Klinedinst, D.K. and Drinkwater, N.R. (1992) Mutagenesis of apurinic sites in normal and ataxia teleangiectasia human lymphoblastoid cells. *Mol. Carcinogenesis*, 6, 32-42.
- Klungland, A. and Lindahl, T. (1997) Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J.*, 16, 3341-3348.
- Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T. and Barnes, D.E. (1999) Accumulation of pre-mutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.
- Koch-Brandt, C. (1993) Gentransfer: Pinzipien – Experimente – Anwendung bei Säugern. Thieme, Stuttgart, New York, 35ff..
- Kohn, K.W., Erickson, L.C., Ewig, R.A.G., Friedman, C.A. (1976) Fractionation of DNA from Mammalian Cells by Alkaline Elution. *Biochemistry*, 15, 4629-4637.
- Krokan, H.E., Standal, R. and Slupphaug, G. (1997) DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem. J.*, 325, 1-16.
- Kubota, Y., Nash, R.A., Klungland, A., Schär, P., Barnes, D.E. and Lindahl, T. (1996) Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase  $\beta$  and the XRCC1 protein. *EMBO J.*, 15, 6662-6670.

- Kurokawa, Y., Hayashi, Y., Maekawa, A., Takahashi, M., Kobuko, T. and Odashima, S. (1983) Carcinogenicity of potassium bromate administered orally to F344 rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, 71, 965-972.
- Kurokawa, Y., Takayama, S., Konishi, Y., Hiasa, Y., Asahina, S., Takahashi, M., Maekawa, A. and Hayashi, Y. (1986) Long-term in vivo carcinogenicity test of potassium bromate, sodium hypochlorite and sodium chlorite conducted in Japan. *Environ. Health Perspect.*, 69, 221-235.
- Kurokawa, Y., Maekawa, A., Takahashi, M. and Hayashi, Y. (1990) Toxicity and carcinogenicity of potassium bromate – a new renal carcinogen. *Environ. Health Perspect.*, 87, 309-335.
- Lambert, C.R., Reddi, E., Spikes, J.D., Rodgers, M.A.J. and Jori, G. (1986) The effects of porphyrin structure and aggregation state in aqueous and micellar media. *Photochem. Photobiol.*, 44, 595-601.
- Le Page, F., Guy, A., Cadet, J., Sarasin, A. and Gentil, A. (1998) Repair and mutagenic potency of 8-oxoG:A and 8-oxoG:C base pairs in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, 26, 1276-1281.
- Lee, P.C.C. and Rogers, M.A.J. (1987) Laser flash photokinetic studies of rose bengal sensitized photodynamic interactions of nucleotides and DNA. *Photochem. Photobiol.*, 45, 79-86.
- Ljungquist, S., Kenne, K., Olsson, L. and Sandstrom, M. (1994) Altered DNA ligase III activity in the CHO EM9 mutant. *Mutat. Res.*, 314, 177-186.
- Lloyd, R.S., Haidle, C.W., Robberson D.L. (1978) Bleomycin-specific fragmentation of double-stranded DNA. *Biochemistry*, 17, 1890-1896.
- Loeb, L.A. (1991) Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res.*, 51, 3075-3079.
- Lu, R., Nash, H.M., and Verdine, G.L. (1997) A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer. *Curr. Biol.*, 7, 397-407.
- Mackey, Z.B., Ramos, W., Levin, D.S., Walter, C.A., McCarrey, J.R. and Tomkinson, A.E. (1997) An alternative splicing event which occurs in mouse pachytene spermatocytes generates a form of DNA ligase III with distinct biochemical properties that may function in meiotic recombination. *Mol. Cell. Biol.*, 17, 989-998.
- Maly, F.E. and Schürer-Maly, C.C. (1995) How and why cells make superoxide: The „phagocytic“ NADPH oxidase. *NIPS*, 10, 233-238.
- Markant, A., Rimbach, G., Krämer, K., Mayer, H. and Pallauf, J. (1995) Reaktive Sauerstoffradikale: Entstehung, Wirkung, Eliminierung. *PZ*, 26, 2313-2327.
- Martinez-Cayuela, M. (1995) Oxygen free radicals and human disease. *Biochimie*, 77, 147-161.
- Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., de Murcia, J.M. and de Murcia, G. (1998) XRCC1 is specifically associated with Poly(ADP-ribose)polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol. Cell. Biol.*, 18, 3563-3571.
- Matsumoto, Y., Kim, K. and Bogenhage, D.F. (1994) Proliferating cell antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair. *Cell. Biol.*, 14, 6187-6189.

- Mc Goldrick, J.P., Yeng-Chen, Y., Solomon, M., Essigman, J. and Lu, A.L. (1995) Characterization of a human homolog of the E. coli Mut Y repair protein. *Mol. Cell. Biol.*, 15, 989-996.
- Meier, B., Radeke, H.H., Selle, S., Raspe, H.H., Sies, H., Resch, K., and Habermehl, G.G., (1990) Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to treatment with synovial fluids from patients suffering from arthritis. *Free Radic. Res. Commun.*, 8, 149-160.
- Meng, Z. and Hsie, A.W. (1996) Polymerase chain reaction-based deletion analysis of spontaneous and arsenite-enhanced gpt mutants in CHO-AS52 cells. *Mutat. Res.*, 356, 255-259.
- Meßmer, U.K., Lapetina, E.G. and Brüne, B. (1995) Nitric oxide-induced apoptosis in RAW264.7 macrophages is antagonized by protein kinase C- and protein kinase A-activating compounds. *Mol. Pharmacol.*, 47, 757-765.
- Meßmer, U.K. and Brüne, B. (1996) Nitric oxide (NO) in apoptotic versus necrotic RAW264.7 macrophage cell death: the role of NO-donor exposure, NAD<sup>+</sup> content and p53 accumulation. *Arch. of Biochem. Biophys.*, 327, 1-10.
- Meßmer, U.K., Reed, J.C. and Brüne, B. (1996) Bcl-2 protects macrophages from nitric oxide-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 271, 20192-20197.
- Michaels, M.L., Cruz, C., Grollman, A.P. and Miller, J.H. (1992) Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 7022-7025.
- Minn, A.J., Vélez, P., Schendel, S.L., Liang, H., Muchmore, S.W., Fesik, S.W., Fill, M. and Thompson, C.B. (1997) Bcl-x<sub>L</sub> forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature*, 385, 353-357.
- Modrich, P. (1994) Mismatch repair, genetic stability and cancer, *Science*, 266, 1959-1960.
- Modrich, P. and Lahue, R. (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 101-133.
- Moriya, M. (1993) Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted GC→TA transversions in simian kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1122-1126.
- Mulligan, R.C., Berg, P. (1980) Expression of a bacterial gene in mammalian cells. *Science*, 209, 1422-1424.
- Murell, G.A.G., Francis, M.J.O. and Bromley, L. (1990) Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem. J.*, 265, 659-665.
- Nackerdien, Z., Rao, G., Cacciuttolo, M.A., Gajewski, E. and Dizdaroglu, M. (1991) Chemical nature of DNA-protein-cross-links produced in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of iron or copper ions. *Biochemistry*, 30, 4873-4879.
- Nakajima, M., Kitazawa, M., Oba, K., Kitagawa, Y. and Toyoda, Y. (1989) Effect of route of administration in the micronucleus test with potassium bromate. *Mutat. Res.*, 223, 399-402.
- Naqui, A., Chance, B. and Cadenas, E. (1986) Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.*, 55, 137-166.

- Nash, H.M., Bruner, S.D., Scharer, O.D., Kawate, T., Addona, T.A., Spooner, E., Lane, W.S. and Verdine, G.L. (1996) Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base excision repair protein superfamily. *Curr. Biol.*, 6, 968-980.
- Nash, H.M., Rongzhen, L., Lane, W.S. and Verdine, G.L. (1997) The critical active-site amine of the human 8-Oxoguanine DNA glycosylase, hOgg1: direct identification, ablation and chemical reconstitution. *Chem. Biol.*, 4, 693-702.
- Nash, R.A., Caldecott, K.W., Barnes, D.E. and Lindahl, T. (1997) XRCC1 protein interacts with one or two distinct forms of DNA ligase III. *Biochemistry*, 36, 5207-5211.
- Naylor, S.L., Johnson, B.E., Minna, J.D. and Sakaguchi, A.Y. (1987) Loss of heterozygosity of chromosome 3p markers in small-cell lung cancer. *Nature*, 329, 451-454.
- Neto, J.B., Gentil, A., Cabral, R.E. and Sarasin, A. (1992) Mutation spectrum of heat-induced abasic-sides on a single-stranded shuttle-vector replicated in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 267, 19718-19723.
- Neumann, H.G. (1992) Entstehung und Behandlung von Tumoren. In: Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K., (eds.) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 6. Aufl., BI-Wiss.-Verlag, Mannheim, Leipzig, Wien, 722-723.
- O'Donnell, R.E., Boorstein, R.J., Cunningham, R.P. and Teebor, G.W. (1994) Effect of pH and temperature on the stability of UV-induced repairable pyrimidine hydrates in DNA. *Biochemistry*, 33, 9875-9880.
- OhUigin, C., McDonnell, D.J., Kelly, J.M. and von der Putten, J.M. (1987) Methylene blue photosensitized strand cleavage of DNA: effects of dye binding and oxygen. *Nucl. Acids Res.*, 15, 7411-7427.
- Otterlei, M., Warbrick, E., Nagelhus, T.A., Haug, T., Slupphaug, G., Akbari, M., Aas, P.A., Steinsbekk, K., Bakke, O. and Krokan, H.E. (1999) Post-replicative base excision repair in replication foci. *EMBO J.*, 18, 3834-3844.
- Palombo, F. and Dogliotti, E. (1989) Construction of an EBV-derived shuttle vector for studying the influence of transcription on mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1009, 251-256.
- Pflaum, M. (1996) Oxidative DNA-Modifikationen durch langwelliges UV-Licht und sichtbares Licht. Dissertation, Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg.
- Pflaum, M., Will, O. and Epe, B. (1997) Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis*, 18, 2225-2231.
- Pflaum, M., Will, O., Mahler, H.C. and Epe, B. (1999) DNA oxidation products determined with repair endonucleases in mammalian cells: types, basal levels and influence of cell proliferation. *Free Rad. Res.*, 29, 585-594.
- Piette, J., Calberg-Bacq, C.M. and van de Vorst, A. (1981) Alteration of guanine residues during proflvine mediated photosensitization of DNA. *Photochem. Photobiol.*, 33, 325-333.
- Pryor, W.A. (1986) Oxy-radicals and related species: Their formation, life-times and reactions. *Annu. Rev. Physiol.*, 48, 657-667.



- Przybyszewski, J., Box, H.C. and Kulesz-Martin, M. (1998) Induction of reactive oxygen species without 8-hydroxydeoxyguanosine formation in DNA of initiated mouse keratinocytes treated with 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Carcinogenesis*, 19, 1467-1474.
- Purmal, A.A., Kow, Y.W. and Wallace, S.S. (1994) Major oxidative products of cytosine, 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil, exhibit sequence context-dependent mispairing *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, 22, 72-78.
- Radicella, J.P., Dherin, C., Desmaze, C., Fox, M.S., and Boiteux, S. (1997) Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8010-8015.
- Reardon, J.T., Bessho, T., Kung, H.C., Bolton, P.H. and Sancar, A. (1997) *In vitro* repair of oxidative DNA damage by human nucleotide excision repair system: Possible explanation for neurodegeneration in xeroderma pigmentosum patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 9463-9468.
- Rice-Evans, C. and Burton, R. (1993) Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lipid Res.*, 32, 71-110.
- Richardson, K.K., Richardson, F.C., Crosby, R.M., Swenberg, J.A. and Skopek, T.R. (1987) DNA base changes and alkylation following *in vivo* exposure of *Escherichia coli* to N-methyl-N-nitrosourea or N-ethyl-N-nitrosourea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 344-348.
- Roldan-Arjona, T., Wei, Y.F., Carter, K.C., Klungland, A., Anselmino, C., Wang, R.P., Augustus, M., and Lindahl, T. (1997) Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8016-8020.
- Rosenquist, T.A., Zharkov, D.O., and Grollman, A.P. (1997) Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 7429-7434.
- Sakumi, K., Furuichi, M., Tsuzuki, T., Kakuma, T., Kawabata, S., Maki, H. and Sekiguchi, M. (1993) Cloning and expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis. *J. Biol. Chem.*, 268, 23524-23530.
- Salvemini, D. and Botting, R. (1990) The effect of free radical scavengers on platelet adhesion and aggregation. *Drug News and perspectives*, 3, 202-212.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 6.1-6.19.
- Sancar, A. (1996) DNA Excision Repair. *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 43-81.
- Saran, M., Michel, C. and Bors, W. (1990) Reaction of NO with superoxide. *Free rad. Res. Comm.*, 10, 221-226.
- Seeberg, E., Eide, L. and Bjoras, M. (1995) The base excision repair pathway. *Trends Biochem. Sci.*, 20, 391-397.
- Senturker, S., Auffret van der Kemp, P., HoJin, Y., Doetsch, P.W., Dizdaroglu, M. and Boiteux, S. (1998) Substrate specificity of the Ntg1 and Ntg2 proteins of *Saccharomyces cerevisiae* for modified bases in oxidatively damaged DNA. *Nucleic Acids Res.*, 26, 5270-5276.
- Shibutani, S. (1993) Quantification of base substitutions and deletions induced by chemical mutagens during DNA synthesis *in vitro*. *Chem. Res. Toxicol.*, 6, 625-629.

- Shibutani, S., Takeshita, M. and Grollman, A.P. (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature (London)*, 349, 431-434.
- Shimizu, S., Eguchi, Y., Kosaka, H., Kamiike, W., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y. (1995) Prevention of hypoxia-induced cell death by Bcl-2 and Bcl-xL. *Nature*, 374, 811-813.
- Shimura, K., Kohno, T., Kasai, H., Koda, K., Sugimura, H. and Yokota, J. (1998) Infrequent mutations of the hOGG1 gene, that is involved in the excision of 8-hydroxyguanine in damaged DNA, in human gastric cancer. *Jpn. J. Cancer Res.*, 89, 825-828.
- Siems, W.G., Sommerburg, O., Mayer, H. and Grune, T. (1998) Die wichtigsten Radikalquellen im menschlichen Organismus. *PZ*, 19, 1515-1527.
- Sies, H. (1986) Biochemie des oxidativen Stress. *Angew. Chem.*, 98, 1061-1075.
- Southorn, P.A. and Powis, G. (1988) Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biological reactions. *Mayo. Clin. Proc.*, 63, 381-389.
- Speit, G., Haupter, S., Schütz, P. and Kreis, P. (1999) Comparative evaluation of the genotoxic properties of potassium bromate and potassium superoxide in V79 Chinese hamster cells. *Mutation Res.*, 439, 213-221.
- Steinmann, H.M. (1995) The Bcl-2 oncoprotein functions as a pro-oxidant. *J. Biol. Chem.*, 270, 3487-3490.
- Susin, S.A., Zamzami, N. and Kroemer, G. (1998) Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more. *Biochim. Biophys. Acta*, 1366, 151-165.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., Larochette, N., Goodlett, D.R., Aebersold, R., Siderovski, D.P., Penninger, J.M. and Kroemer, G. (1999) Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, 397, 441-446.
- Tajiri, T., Maki, H. and Sekiguchi, M. (1995) Functional cooperation of Mut T, Mut M and Mut Y proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. *Mutat. Res. DNA Repair*, 336, 257-267.
- Takao, M., Aburatani, H., Kobayashi, K. and Yasui, A. (1998) Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.*, 26, 2917-2922.
- Takeuchi, T., Nakajima, M. and Morimoto, K. (1994) Establishment of a human system that generates  $O_2^-$  and induces 8-Hydrodesoxyguanosine, typical of oxidative DNA damage, by a tumor promoter. *Cancer Research*, 54, 5837-5840.
- Takeuchi, T., Nakajima, M. and Morimoto, K. (1996) Relationship between the intracellular reactive oxygen species and the induction of oxidative DNA damage in human neutrophil-like cells. *Carcinogenesis*, 17, 1543-1548.
- Tani, M., Shimura, K., Kohno, T., Shiroishi, T., Wakana, S., Kim, S.R., Nohmi, T., Kasai, H., Takenoshita, S., Nagamachi, Y. and Yokota, J. (1998) Genomic structure and chromosomal localization of the mouse ogg1 gene that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in DNA damage. *Mamm. Genome*, 9, 32-37.
- Tayer, M.M., Ahern, H., Xing, D., Cunningham, R.P. and Tainer, J.A. (1995) Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure. *EMBO J.*, 14, 4108-4120.

- Tebbs, R.S., Flannery, M.L., Meneses, J.J., Hartmann, A., Tucker, J.D., Thompson, L.H., Cleaver, J.E. and Pedersen, R.A. (1999) Requirement for the XRCC1 DNA base excision repair gene during early mouse development. *Dev. Biol.*, 208, 513-529.
- Thomas, D., Scott, A.D., Barbey, R., Padula, M. and Boiteux, S. (1997) Inactivation of OGG1 increases the incidence of G:C→T:A transversions in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for endogenous oxidative damage to DNA in eukaryotic cells. *Mol. Gen. Genet.*, 254, 171-178.
- Thompson, L.H., Rubin, J.S., Cleaver, J.E., Whitmore, G.F. and Brookman, K. (1980) A screening method for isolating DNA repair-deficient mutants of CHO cells. *Somat. Cell Genet.*, 6, 391-405.
- Thompson, L.H., Brookman, K.W., Dillehay, L.E., Carrano, A.V., Mazrimas, J.A., Mooney, C.L. and Minkler, J.L. (1982) A CHO-cell strain having hypersensitivity to mutagens, a defect in DNA strand-break repair, and an extraordinary baseline frequency of sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.*, 95, 427-440.
- Tindall, K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff, R. and Hsie, A.W. (1984) Detection of deletion mutations in pSV2gpt-transformed cell. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1411-1415.
- Tindall, K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff, R. and Hsie, A.W. (1986) Analyses of mutation in pSV2gpt-transformed CHO-cells. *Mutation Res.*, 160, 121-131.
- Tindall, K.R. and Stankowski Jr., L.F. (1989) Molekular analysis of spontaneous mutations at the gpt locus in Chinese hamster ovary (AS52) cells. *Mutation Res.*, 220, 241-253.
- Tudek, B., Laval, J. and Boiteux, S. (1992) Biological properties of imidazol ring-opened N7-methylguanine in M13mp18 phage DNA. *Nucleic Acids Res.*, 20, 3079-3084.
- Umemura, T., Sai, K., Takagi, A., Hasegawa, R. and Kurokawa, Y. (1995) A possible role of oxidative stress in potassium bromate (KBrO<sub>3</sub>) carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 16, 593-597.
- Vaux, D.L. and Strasser, A. (1996) The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 2239-2244.
- Vidmar, J.J. and Cupples, C.G. (1993) Mut Y repair is mutagenic in mut T<sup>-</sup> strains of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.*, 39, 892-894.
- von Sonntag, C. (1987) The chemical basis of radiation biology. Taylor & Francis, London.
- Wagner, J., Hiroyuki, K. and Fuchs, R.P.P. (1997) Leading versus lagging strand mutagenesis induced by 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in *E. coli*. *J. Mol. Biol.*, 265, 302-309.
- Wagner, J.R., Hu, C.C. and Ames, B.N. (1992) Endogenous oxidative damage of deoxycytidine in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 3380-3384.
- Weiss, S.J. (1989) Tissue destruction by neutrophils. *New England J. Med.*, 320, 365-376.
- Wertz, I.E. and Hanley, M.R. (1996) Diverse molecular provocation of programmed cell death. *TIBS*, 21, 359-364.
- Whyte, M.K., Meagher, L.C., MacDermot, J., and Haslett, C. (1993) Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. *J. Immunol.*, 150, 5124-5134.

- Will, O. (1995) Untersuchung zellulärer DNA-Schäden induziert durch Ro 19-8022 in Gegenwart von Licht und deren Charakterisierung mit Hilfe von Reparaturoendonukleasen. Diplomarbeit an der Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
- Will, O. (1999) Steady-State-Level oxidativer DNA-Modifikationen in Säugerzellen und ihre Beeinflussbarkeit. Dissertation, Institut für Pharmazie, Universität Mainz.
- Will, O., Schindler, D., Boiteux, S. and Epe, B. (1998) Fanconi's anaemia cells have normal steady-state levels and repair of oxidative DNA base modifications sensitive to Fpg protein. *Mutat. Res.*, 409, 65-72.
- Will, O., Gocke, E., Eckert, I., Schulz, I., Pflaum, M., Mahler, H.C. and Epe, B. (1999) Oxidative DNA damage and mutations induced by a polar photosensitizer, Ro 19-8022. *Mutat. Res.*, 435, 89-101.
- Will, O., Mahler, H.C., Arrigo, A.P. and Epe, B. (1999) Influence of glutathione levels and heat-shock on the steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 20, 333-337.
- Wiseman, H., Kaur, H. and Halliwell, B. (1995) DNA damage and cancer: measurement and mechanism. *Cancer Lett.*, 93, 113-120.
- Wood, M.L., Dizdaroglu, M., Gajewski, E. and Essigmann, J.M. (1990) Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochemistry*, 29, 7024-7032.
- Wood, R.D. (1996) DNA Repair in eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 135-167.
- Wood, R.D., Esteve, A., Morningstar, M.L., Kuziemko, G.M. and Essigmann, J.M. (1992) Genetic effects of oxidative DNA damage: comparative mutagenesis of 7,8-dihydro-8-guanine and 7,8-dihydro-8-oxoadenine in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, 20, 6023-6032.
- Yokota, J., Wada, M., Shimosato, Y., Terada, M. and Sugimura, T. (1987) Loss of heterozygosity on chromosomes 3, 13 and 17 in small-cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 9252-9256.
- Zdzienicka, M.Z., van der Schans, G.P., Natarajan, A.T., Thompson, L.H., Nauteboom, I. and Simons, J.W. (1992) A Chinese hamster ovary cell mutant (EM-C11) with sensitivity to simple alkylating agents and a very high level of sister chromatid exchanges. *Mutagenesis*, 7, 265-269.

**Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht:**

Hollenbach, S., Dhénaut, A., Eckert, I., Radicella, J.P. and Epe, B. (1999) Overexpression of Ogg1 in mammalian cells: effects on induced and spontaneous oxidative DNA damage and mutagenesis. *Carcinogenesis*, 20, 1863-1868.

Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T. and Barnes, D.E. (1999) Accumulation of pre-mutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Stephan Ludwig Karl Hollenbach  
Anschrift: Berliner Ring 118  
97877 Wertheim/Main  
Geburtsdatum: 16. Oktober 1970  
Geburtsort: Wertheim/Main

### Schulbildung

1977 - 1981 Grundschole, Wertheim-Wartberg  
1981 - 1990 Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium, Wertheim

### Wehrdienst

1990 - 1991 Grundwehrdienst

### Studium

05/1991 - 04/1995 Pharmaziestudium an der Julius-Maximilians-Universität,  
Würzburg; Abschluß: 2. Staatsexamen

### Beruf

05/1995 - 04/1996 Praktisches Jahr  
1. Halbjahr Apotheke am Engelsberg, Wertheim  
2. Halbjahr STADA AG, Bad Vilbel  
16. Juli 1996 Approbation als Apotheker  
seit 09/1996 Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Pharmazie  
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

## Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Stephan Hollenbach

Mainz, im November 1999