

Einfluss von Chromatin-Modulatoren  
auf  
Bildung, Reparatur und Mutagenität  
von DNA-Schäden

Dissertation zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von  
**Bettina Stein**  
geboren in Pirmasens

Mainz 2011



Die Welt ist voll von Sachen und es ist wirklich nötig,  
dass sie jemand findet!

Astrid Lindgren

Meinen Eltern und Johannes



---

---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress .....	3
1.1.1	Endogene Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies .....	4
1.1.2	Exogene Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies.....	5
1.2	Antioxidantien .....	5
1.2.1	Nicht-enzymatische Antioxidantien.....	6
1.2.2	Enzymatische Antioxidantien .....	7
1.3	Oxidative DNA Modifikationen .....	8
1.4	Biologische Konsequenzen oxidativer DNA-Schäden .....	10
1.5	Experimentelle Generierung zellulärer DNA-Modifikationen .....	11
1.5.1	Oxidative DNA-Modifikationen durch Ro19-8022 .....	11
1.5.2	DNA-Modifikationen durch UV-B.....	11
1.5.3	Einzelstrangbrüche durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	12
1.6	Mechanismen der DNA-Reparatur .....	13
1.6.1	Direkte Reparatur (Schadensreversion) .....	13
1.6.2	Basenexzisionsreparatur (BER) .....	13
1.6.3	Nukleotidexzisionsreparatur (NER).....	17
1.6.4	Postreplikative Reparatur (Mismatch Reparatur).....	18
1.6.5	Doppelstrangbruch-Reparatur.....	19
1.7	Chromatin .....	20
1.7.1	Definition und Struktur .....	20
1.7.2	Der Histon Code .....	21
1.7.3	Chromatinacetylierung.....	22
1.7.4	Sirtuine .....	23
1.8	Chromatinmodulatoren .....	25
1.8.1	Resveratrol .....	25
1.8.2	Histondeacetylase-Inhibitoren .....	26
1.9	Zielsetzung .....	28
2	Material und Methoden .....	29
2.1	Material.....	29
2.1.1	Geräte und Software .....	29
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	31
2.1.3	Chemikalien.....	32

---

2.1.4	Enzyme und DNA.....	35
2.1.5	Antikörper und Marker .....	35
2.1.6	Zelllinien.....	36
2.1.6.1	AS52-Zellen.....	36
2.1.6.2	HeLa-Zellen.....	36
2.1.7	Puffer, Lösungen und Medien .....	36
2.1.7.1	Zellkultur.....	36
2.1.7.2	Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit .....	37
2.1.7.3	Alkalische Elution .....	37
2.1.7.4	Mutationstest .....	39
2.1.7.5	Gehaltsbestimmung Glutathion.....	40
2.1.7.6	Proteinbestimmung .....	41
2.1.7.7	Zellzyklusbestimmung.....	41
2.1.7.8	Western Blot.....	42
2.1.7.9	Enzymatische Hydrolyse von Chromatin mit DNase I.....	44
2.2	Methoden .....	47
2.2.1	Zellkultur .....	47
2.2.1.1	Kultivieren von Zellen.....	47
2.2.1.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	47
2.2.2	Bestimmung der Proliferation .....	48
2.2.2.1	Prinzip.....	48
2.2.2.2	Durchführung.....	48
2.2.3	Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit.....	49
2.2.3.1	Prinzip.....	49
2.2.3.2	Durchführung.....	49
2.2.4	Alkalische Elution .....	49
2.2.4.1	Prinzip.....	49
2.2.4.2	Durchführung.....	50
2.2.4.3	Schnelle Alkalische Elution .....	52
2.2.5	Behandlung der Zellen für die Alkalische Elution .....	52
2.2.5.1	Schädigung mit Ro19-8022 und sichtbarem Licht .....	52
2.2.5.2	Schädigung mit UV-B.....	53
2.2.5.3	Schädigung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	53
2.2.6	Mutationstest.....	54
2.2.6.1	Prinzip.....	54
2.2.6.2	Bestimmung spontaner Mutationsraten.....	55
2.2.6.3	Bestimmung induzierter Mutationsraten.....	56

---

2.2.7	Gehaltsbestimmung Glutathion .....	57
2.2.7.1	Prinzip.....	57
2.2.7.2	Durchführung.....	57
2.2.8	Proteinbestimmung.....	58
2.2.8.1	Prinzip.....	58
2.2.8.2	Durchführung.....	58
2.2.9	Zellzyklusbestimmung .....	59
2.2.9.1	Prinzip.....	59
2.2.9.2	Durchführung.....	59
2.2.10	Western-Blot .....	60
2.2.10.1	Prinzip.....	60
2.2.10.2	Durchführung.....	60
2.2.11	Bestimmung der globalen DNA-Zugänglichkeit in Chromatin mittels enzymatischer Hydrolyse mit DNaseI .....	62
2.2.11.1	Prinzip.....	62
2.2.11.2	Durchführung.....	62
2.2.12	Statistische Auswertung.....	63
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>64</b>
3.1	Resveratrol.....	64
3.1.1	Bestimmung der globalen DNA-Zugänglichkeit unter Einfluss von Resveratrol.....	64
3.1.2	Bestimmung der Proliferation unter Einfluss von Resveratrol in AS52-Zellen.....	65
3.1.3	Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit unter Einfluss von Resveratrol .....	67
3.1.4	Bestimmung der Zellzyklusverteilung unter Einfluss von Resveratrol.....	67
3.1.5	Beeinflussung der Bildung und Reparatur oxidativer DNA-Schäden durch Resveratrol.....	69
3.1.5.1	Koloniebildungsfähigkeit von AS52-Zellen unter Einfluss von Ro19-8022.....	69
3.1.5.2	Schadensinduktion in AS52-Zellen in Gegenwart von Resveratrol.....	70
3.1.5.3	Basalspiegel, Schadensinduktion und Reparatur oxidativer DNA-Schäden unter Einfluss von Resveratrol .....	71
3.1.6	Beeinflussung durch UV-B induzierter Läsionen durch Resveratrol .....	73
3.1.7	Beeinflussung durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> induzierter Einzelstrangbrüche durch Resveratrol.....	77
3.1.7.1	Schädigung adhärenter Zellen bei 37°C .....	77
3.1.7.2	Schädigung von Zellen in Suspension bei 0°C.....	80
3.1.8	Einfluss eines SIRT1-Inhibitors auf die durch Resveratrol verlangsamte Reparatur.....	82
3.1.9	Einfluss eines HDAC-Inhibitors auf die durch Resveratrol verlangsamte Reparatur .....	85
3.1.10	Einfluss von DTT auf die durch Resveratrol verlangsamte Reparatur oxidativer DNA-Schäden .....	86
3.1.10.1	Einfluss eines MEK- und eines p38-Inhibitors auf die durch Resveratrol verlangsamte Reparatur.....	88

3.1.10.2	Einfluss von Resveratrol auf die p53-Expression in AS52-Zellen .....	91
3.1.11	Beeinflussung von HeLa-Zellen durch Resveratrol .....	95
3.1.11.1	Einfluss von Resveratrol auf die Entstehung spontaner Mutationen in AS52- Zellen .....	101
3.1.12	Einfluss von Resveratrol auf die Entstehung induzierter Mutationen in AS52- Zellen .....	102
3.1.13	Proliferation von AS52-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Resveratrol.....	103
3.1.13.1	Bestimmung der Zellzyklusverteilung nach 72-stündiger Resveratrolinkubation .....	104
3.2	HDAC-Inhibitoren .....	106
3.2.1	Bestimmung der globalen DNA-Zugänglichkeit unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren .....	106
3.2.2	Proliferation von AS52-Zellen unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren .....	106
3.2.3	Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren.....	108
3.2.4	Zellzyklusverteilung in AS52-Zellen unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren.....	109
3.2.5	Bestimmung des Gesamt-Glutathiongehalts von AS52-Zellen unter Einfluss von HDAC- Inhibitoren.....	110
3.2.6	Oxidative Schäden durch Ro19-8022 unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren .....	111
3.2.7	DNA-Schäden durch UV-B unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren .....	113
3.2.8	Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Entstehung spontaner Mutationen in AS52-Zellen	115
3.2.9	Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Entstehung induzierter Mutationen in AS52-Zellen	115
3.2.10	Proliferation von AS52-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit HDAC-Inhibitoren .....	117
3.2.11	Zellzyklusverteilung nach 72-stündiger Inkubation mit HDAC-Inhibitoren.....	118
4	Diskussion.....	120
4.1	Beeinflusst die Chromatinstruktur die Entstehung von DNA-Schäden und deren Reparatur in AS52-Zellen? .....	120
4.2	Lässt sich die durch Resveratrol verlangsamte Reparatur durch oxidativen Stress und/oder eine hochregulierte antioxidative Abwehr erklären? .....	125
4.3	Lässt sich die durch Resveratrol verlangsamte Reparatur durch eine Veränderung der p53-Expression erklären? .....	126
4.4	Ist die durch Resveratrol verlangsamte Reparatur nur eine Akkumulation von AP- Läsionen? .....	127
4.5	Sind die durch Resveratrol beobachteten Effekte auf einen anderen Zelltyp übertragbar? .....	127
4.6	Lässt sich die durch HDAC-Inhibitoren verminderte Mutationsrate durch eine verlangsamte Proliferation erklären? .....	128
5	Zusammenfassung .....	130
6	Literaturverzeichnis .....	132
7	Abbildungsverzeichnis .....	153
8	Tabellenverzeichnis .....	157



---

## Abkürzungsverzeichnis

6-TG:	6-Thioguanin
8-oxoG:	7,8-Dihydro-8-oxoguanin
Abb:	Abbildung
APE1:	AP-Endonuklease 1
AP-Läsion:	apurinische / apyrimidinische Stelle in der DNA
BER:	Basenexzisionsreparatur
bp:	Basenpaare
BSA:	Rinderserumalbumin
BSO:	Buthioninsulfoximin
bzw.:	beziehungsweise
CAT:	Katalase
CHO:	Chinesische Hamster Ovarienzelllinie
CPD:	Cyclobutanpyrimidindimer
CS:	Cockayne Syndrom
dest.:	destilliert
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNase I:	Deoxyribonuclease I
DSB:	Doppelstrangbruch
DTNB:	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure)
DTT:	Dithiothreitol
E. coli:	Escherichia coli
EDTA:	Ethylendiamintetraacetat
FCS:	Fetales Kälberserum
FEN1:	flap-Endonuklease 1
Fpg:	Formamidopyrimidinglykosylase
GGR:	globale genomische Reparatur
GPX:	Glutathionperoxidase
GSH:	Glutathion
HAT:	Histonacetyltransferase
HDAC:	Histondeacetylase
HDACI:	Histondeacetylase-Inhibitor

---

HPRT:	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase
HR:	Homologe Rekombination
Lsg.:	Lösung
MGMT:	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MPA:	Mycophenolsäure
NER:	Nukleotidexzisionsreparatur
PBS:	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCNA:	proliferating cell nuclear factor
RFC:	Replikationsfaktor C
Ro19-8022:	[R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl)carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol]
ROS:	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm:	Umdrehungen pro Minute
SDS:	Natrium-dodecylsulfat
SOD:	Superoxiddismutase
SSB:	Einzelstrangbruch
T4-EndoV:	T4 Endonuklease V
TCR:	Transkriptionsgekoppelte Reparatur
TEAH:	Tetraethylammoniumhydroxid
Tris:	2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
TSA:	Trichostatin A
UZ:	Ultrazentrifuge
XP:	Xeroderma Pigmentosum
XRCC1:	X-ray repair cross complementing group 1

---

---

## 1 Einleitung

Die Wahrscheinlichkeit, an Krebs zu erkranken, steigt mit zunehmendem Alter. Nicht zuletzt deshalb stellen Krebserkrankungen, nach solchen des Herz-/Kreislaufsystems (~42%) mit 25% die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar (Statistisches Bundesamt 2010). Die Aufklärung der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sowie die Identifizierung möglicher therapeutischer Targets sind folglich von großem Interesse.

Die Krebsentstehung unterliegt sowohl exogenen als auch endogenen Einflüssen. Zu den exogenen Faktoren zählen Kanzerogene wie z.B. Aflatoxine, polycyclische Kohlenwasserstoffe, Zigarettenrauch und Strahlung, deren Exposition der Mensch weitestgehend selbst beeinflussen kann. Allerdings spielen auch die endogenen Einflüsse, vornehmlich die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), eine wichtige Rolle. Diese führen zu oxidativen Modifikationen der DNA-Basen, welche sich bei der Replikation als Mutationen manifestieren können. Kommt es zu multiplen Mutationen in Tumorsuppressorgenen (z.B. p53, p16, APC) und / oder Onkogenen (z.B. *ras*, *c-myc*) kann es über einen mehrstufigen Prozess zum unkontrollierten Zellwachstum und somit einer malignen Entartung kommen.

Die durch endogene reaktive Sauerstoffspezies entstehenden oxidativen DNA-Läsionen werden in der Regel durch ein Zusammenspiel aus zellulärer antioxidativer Abwehr (Antioxidantien, Glutathion uvm.) und spezifischen DNA-Reparaturmechanismen im Gleichgewicht, dem sogenannten Gleichgewichtsspiegel, gehalten. Dieses ist vereinfacht in Abbildung 1.1 dargestellt. Gerät der Gleichgewichtsspiegel von DNA-Schäden hin zu einem erhöhten Basalspiegel außer Kontrolle, so steigt die Wahrscheinlichkeit der Manifestation von Mutationen und letztlich auch der Krebsentstehung. Die Reparatur mutagener DNA-Läsionen wie z.B. 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG) ist für die Krebsentstehung somit von großer Bedeutung. So können auch Mutationen in DNA-Reparaturgenen indirekt die Mutationshäufigkeit erhöhen (Mutatorhypothese) (Loeb et al., 2003).

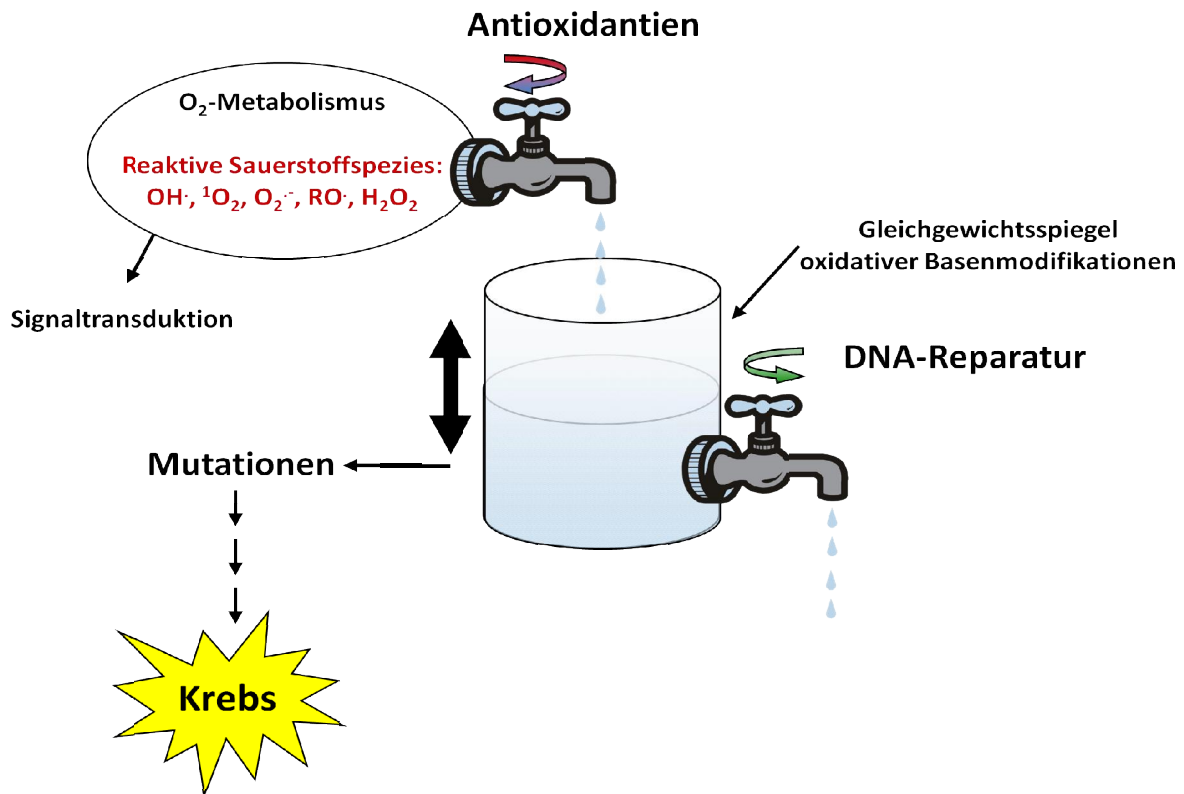


Abbildung 1.1: Basalspiegel oxidativer DNA-Modifikationen, modifiziert nach: (Bercht, 2006; Epe, 2002; Fußer, 2010)

Aufgrund der Tatsache, dass die DNA in der Chromatinstruktur verpackt vorliegt, liegt die Frage nahe, ob auch der Zustand des Chromatins die Reparatur von DNA-Schäden und die Entstehung von Mutationen beeinflussen kann. Die Zugänglichkeit der DNA im Chromatin wird nach heutigem Kenntnisstand zum einen über posttranslationale Modifikationen (PTMs) von Histonen, wie Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung und Ubiquitinierung, zum anderen über Verschiebung bzw. Entfernung von Histonen oder gar ganzen Nukleosomen reguliert (Dinant et al., 2008). Es wird vermutet, dass solche Mechanismen ebenfalls bei der DNA-Schadenserkennung und der Schadensreparatur beteiligt sind, um den hierfür benötigten Proteinen und Proteinkomplexen die nötige Zugänglichkeit zur geschädigten DNA-Stelle zu ermöglichen (Escargueil et al., 2008). Allerdings gibt es bisher nur wenig Kenntnis über den tatsächlichen Einfluss der Chromatinstruktur und von Chromatin-Modulatoren auf die Bildung und Prozessierung von DNA-Schäden.

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss des Kondensationsgrades des Chromatins auf die Entstehung und Reparatur von DNA-Läsionen sowie auf die Entstehung spontaner und induzierter Mutationen untersucht werden.

## 1.1 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress

Im Zuge des aeroben Metabolismus entstehen durch Reduktion von molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) zu  $H_2O$  fortwährend reaktive Sauerstoffspezies (s. Abbildung 1.2). Deren Menge wird physiologischerweise durch ein Gleichgewicht an Prooxidantien und Antioxidantien reguliert. Verschiebt sich dieses zu Gunsten der Prooxidantien resultiert ein erhöhter Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies und man spricht von „Oxidativem Stress“ (Sies, 1986).

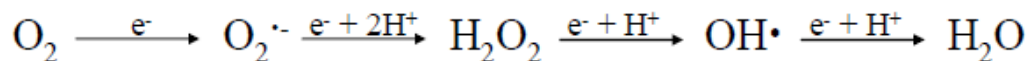


Abbildung 1.2: Sequentielle Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser

Unter dem Begriff reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) lassen sich verschiedene, meist kurzlebige Sauerstoffradikale sowie Verbindungen mit elektronisch angeregtem Sauerstoff zusammenfassen. Einige der wichtigsten ROS sind in Tabelle 1.1 aufgeführt:

Tabelle 1.1: Reaktive Sauerstoffspezies und ihre geschätzte Halbwertszeit in Zellen (Sies et al., 1992)

Spezies	Halbwertszeit [s]
$HO^{\cdot}$ , Hydroxylradikal	$10^{-9}$
$O_2^{\cdot-}$ , Superoxidationradikal	Dismutation
$^1O_2$ , Singulett-Sauerstoff	$10^{-6}$
$H_2O_2$ , Wasserstoffperoxid	stabil (enzymatischer Abbau)
$RO^{\cdot}$ , Alkoxyradikal	$10^{-6}$
$ROO^{\cdot}$ , Peroxylradikal	7
$NO^{\cdot}$ , Stickstoffmonoxid	1 - 10
$ONOO^{\cdot}$ , Peroxynitrit	0,05 - 1

Reaktive Sauerstoffspezies sind beteiligt an Krebsentstehung, Alterungsprozessen und Entzündungsreaktionen (Maynard et al., 2009), sowie an zellulären Prozessen wie z.B. der Signaltransduktion (Palmer and Paulson, 1997). Trotz ihrer meist recht kurzen Halbwertszeit sind sie in der Lage, mit Makromolekülen wie Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren zu reagieren und somit erhebliche Schäden, wie z.B. oxidative DNA-Läsionen (Sies, 1991), zu verursachen. Der bedeutendste Entstehungsort für endogene ROS sind die Mitochondrien (Wallace, 1999), welche eine Vielzahl proapoptotischer Faktoren (Cytochrom c, aif, endoG) enthalten (Danial and Korsmeyer, 2004). Auch

durch exogene Faktoren, wie  $\gamma$ - oder UV-Strahlung, kann es zu einer vermehrten Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies kommen (Epe, 1991).

### 1.1.1 Endogene Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies

Bei der bereits in 1.1 erwähnten ROS-Entstehung im Zuge der mitochondrialen Atmungskette entstehen durch sequentielle Reduktion von molekularem Sauerstoff zu  $H_2O$  in erster Linie Superoxidanion-Radikale. Weitere endogene Quellen für diese Spezies sind unter anderem (Klotz, 2007):

- Arachidonsäuremetabolismus
- „Respiratory Burst“ von Abwehrzellen durch NADPH-Oxidase
- Purinabbau durch Xanthin-Oxidasen
- Xenobiotika-Metabolismus (Cytochrom-P-450-System)

Das Superoxidanion-Radikal selbst ist nicht sehr reaktiv; zudem kann es aufgrund seiner Ladung nicht frei durch Membranen diffundieren. Es unterliegt allerdings einer spontanen Dismutation zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ). Auch eine enzymkatalysierte Dismutation durch Superoxiddismutasen ist möglich und läuft etwa  $10^6$ -mal schneller ab (Klotz et al., 2003).

Im Gegensatz zum Superoxidanionradikal kann  $H_2O_2$  aufgrund seiner geringen Polarität Membranen leicht durchdringen.  $H_2O_2$  ist eine recht reaktionsträge Verbindung, er kann aber durch Fenton-Reaktion (Abbildung 1.3) zu hochreaktiven Hydroxylradikalen umgesetzt werden (Halliwell, 1996; Halliwell and Gutteridge, 1984; Halliwell and Gutteridge, 1990).

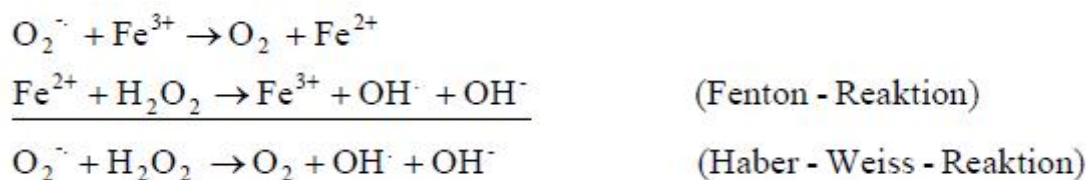


Abbildung 1.3: Metallkatalysierte Bildung von Hydroxylradikalen

Hydroxylradikale zeichnen sich durch eine sehr hohe Reaktivität, aber auch durch eine kurze Halbwertszeit aus. Dies hat zur Folge, dass sie mit nahezu allen zellulären Molekülen wie Kohlenhydraten, Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren reagieren können (Halliwell and Gutteridge, 1990), Bildungs- und Reaktionsort allerdings sehr nah beieinander liegen müssen. Zu den typischen,

durch  $\text{OH}^\cdot$  entstehenden DNA-Schäden zählen Einzel- und Doppelstrangbrüche, oxidative Modifikationen, AP-Läsionen sowie DNA-Protein-Quervernetzungen (Halliwell and Aruoma, 1991).

Als weitere reaktive Spezies ist Singulett-Sauerstoff  $^1\text{O}_2$  zu nennen, welches durch endogene Photosensibilisatoren (wie z.B. Protoporphyrin IX) (Epe et al., 1993) oder auch als Nebenprodukt enzymatischer Reaktionen entsteht. Im Vergleich zum Hydroxylradikal ist Singulett-Sauerstoff sehr viel weniger reaktiv, besitzt allerdings eine deutlich längere Halbwertszeit. Es kann aufgrund dessen leicht diffundieren und zählt zu den wichtigsten Ursachen für die Entstehung von 8-oxoG (Epe, 1991).

### 1.1.2 Exogene Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies

Wie bereits in 1.1 erwähnt können auch exogene Faktoren zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies beitragen. Dies kann der Fall sein nach Exposition verschiedener Substanzen wie z.B. Chemotherapeutika (Anthracycline (Kovacic and Osuna, 2000), Chinone), oder auch Photosensibilisatoren (Ro19-8022) in Kombination mit sichtbarem Licht (Will et al., 1999). Zudem kann oxidativer Stress ausgelöst werden durch UV- (Eiberger et al., 2008) oder auch ionisierende Strahlung.

## 1.2 Antioxidantien

Antioxidantien sind Substanzen, die in vergleichsweise niedrigen Konzentrationen in der Lage sind, Oxidationen zu verzögern oder zu verhindern (Halliwell and Gutteridge, 1990). Sie können effektiv ROS abfangen und lassen sich unterteilen in nicht-enzymatische und enzymatische Antioxidantien.

Ein kleiner Ausschnitt des zellulären Abwehrsystems ist in Abbildung 1.4 dargestellt.

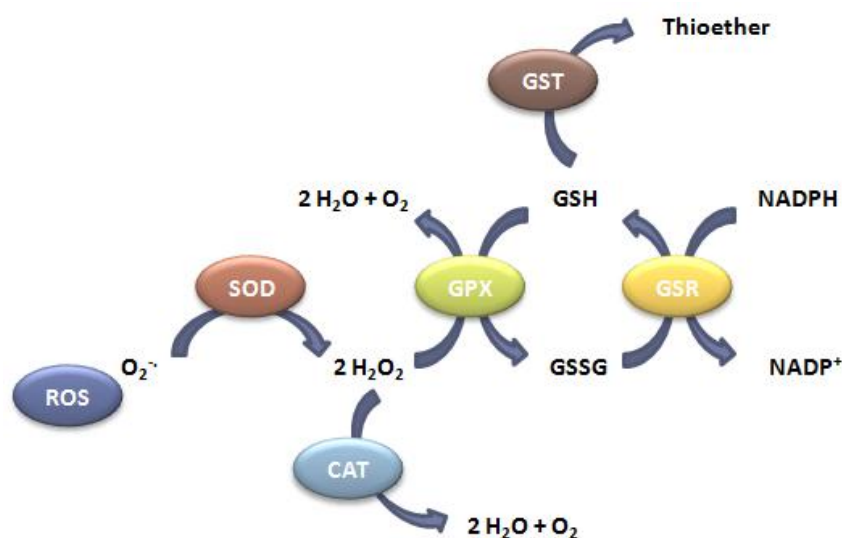


Abbildung 1.4: Enzymatische antioxidative Schutzmechanismen ROS: reaktive Sauerstoffspezies; SOD: Superoxid-Dismutase; CAT: Katalase; GPX: Glutathion-Peroxidase; GSR: Glutathion-Reduktase; GST: Glutathion-S-Transferase

---

### 1.2.1 Nicht-enzymatische Antioxidantien

Zu den wichtigsten nicht-enzymatischen Antioxidantien zählen die Vitamine C und E, Carotinoide, verschiedenen Polyphenole und Glutathion.

Vitamin C (Ascorbinsäure) gehört zu den wasserlöslichen Vitaminen und zeigt aufgrund seiner leichten Oxidierbarkeit gute Eigenschaften als Radikalfänger.

Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) ist ein lipophiles Vitamin, welches als Antioxidant vorwiegend in Zellmembranen (Burton and Ingold, 1989) Lipide vor Oxidation schützt (Pryor, 2000). Das bei dieser Reaktion entstehende  $\alpha$ -Tocopherolradikal wird in einem antioxidativen Redoxzyklus durch Vitamin C wieder regeneriert.

Carotinoide, die im Pflanzen- und Tierreich weit verbreitet sind, zählen ebenfalls zu den Antioxidantien, da sie aufgrund vieler konjugierter Doppelbindungen (Mortensen et al., 2001) in der Lage sind, effektiv Hydroxylradikale und Singulett-Sauerstoff abzufangen.

Die Polyphenole sind eine große Gruppe sekundärer, ubiquitär vorkommender, Pflanzeninhaltsstoffe und sind wichtiger Bestandteil der menschlichen Ernährung (Rice-Evans et al., 1996). Durch Bildung von Phenoxyradikalen können sie radikalische Kettenreaktionen stoppen, wobei die Stabilität des gebildeten Radikals stark abhängig ist von Substituenten und der Anzahl an Hydroxylgruppen (Valko et al., 2006). Einige Polyphenole wirken zudem als Chelatoren für verschiedene Metalle, wodurch die Fenton-Reaktion von Wasserstoffperoxid verhindert werden kann (Rice-Evans, 2001). Unter bestimmten Bedingungen wie hoher Konzentration, der Anwesenheit von Eisen oder auch einem hohen pH-Wert können Polyphenole allerdings auch prooxidative Effekte zeigen, wodurch auch ihre zum Teil zytotoxischen Eigenschaften erklärt werden könnten (Rice-Evans, 2001). Zur Gruppe der Polyphenole zählt auch Resveratrol, welches in einem späteren Abschnitt (1.8.1) noch näher beschrieben wird.

Den wichtigsten zellulären antioxidativen Schutz bietet Glutathion (GSH,  $\gamma$ -L-Glutamyl-L-cysteinglycin). Glutathion ist eine Pseudotripeptid, welches durch die  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetase aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin gebildet wird. Es besitzt eine freie Thiolgruppe und kann seinerseits Elektronen auf reaktive Sauerstoffspezies übertragen. Hydroxylradikale und Singulett-Sauerstoff können so direkt abgefangen werden. In oxidierte Form liegt es als Glutathiondisulfid (GSSG) vor und kann durch die Glutathionreduktase (GSR) unter NADPH-Verbrauch



---

wieder zu GSH reduziert werden. Im Zusammenspiel mit der Glutathionperoxidase (GPX) kann GSH Wasserstoffperoxid und Lipidperoxide detoxifizieren (Masella et al., 2005). Zudem wird Glutathion im Phase II Metabolismus durch Glutathion-S-Transferasen zur Konjugation an Xenobiotika verwendet (Coles and Kadlubar, 2003).

### 1.2.2 Enzymatische Antioxidantien

Zum enzymatischen Abwehrsystem der Zellen zählen unter anderem die Superoxiddismutasen (SODs), die Glutathionperoxidase (GPX) und die Katalase (CAT) (s. hierzu auch Abbildung 1.4).

Die Gruppe der Superoxiddismutasen katalysiert die Dismutation des Superoxidanionradikals zu Sauerstoff und  $H_2O_2$ . Es sind heute drei Isoformen bekannt: die cytosolische Cu/Zn-SOD (SOD1), die mitochondriale Mn-SOD (SOD2) und die extrazellulär lokalisierte SOD3.

Das Enzym Glutathionperoxidase (GPX) vermittelt, wie bereits in 1.2.1 beschrieben, die Detoxifizierung von Hydroperoxiden unter Oxidation von GSH.

Auch die Katalase (CAT) ist in der Lage  $H_2O_2$  zu  $H_2O$  umzusetzen. Sie ist vorwiegend in Peroxisomen lokalisiert (Valko et al., 2006).

Die Regulation vieler der soeben beschriebenen antioxidativen Enzyme erfolgt über den Keap1-Nrf2-ARE Signalweg. Er spielt eine wichtige Rolle beim Schutz der Zellen vor endogenem und exogenem Stress (Kensler et al., 2007). Das Keap1-Protein (Kelch ECH associating protein 1) interagiert im physiologischen Zustand im Cytoplasma mit Nrf2 (Itoh et al., 1999). Es hat die Funktion eines negativen Regulators bezogen auf Nrf2 und fungiert als Sensor für Xenobiotika und oxidativen Stress (Motohashi and Yamamoto, 2004). Erfolgt ein solches Stresssignal, wird Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor) frei, kann in den Zellkern translozieren und seine Funktion als Transkriptionsfaktor ausüben. Es bindet an das „antioxidative response element“ (ARE) und steuert so die basale und induzierbare Expression zahlreicher detoxifizierender und antioxidativer Gene (Motohashi and Yamamoto, 2004), darunter z.B. SOD, GPX, GSR und GST (Kensler et al., 2007).

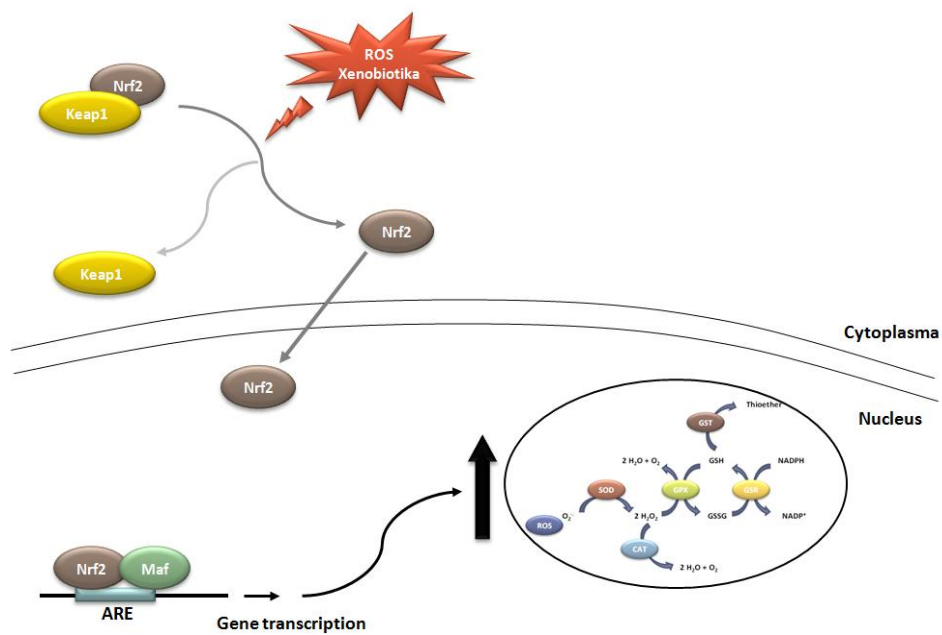


Abbildung 1.5: Keap1-Nrf2-ARE Signalweg

### 1.3 Oxidative DNA Modifikationen

Durch Reaktion der in 1.1 beschriebenen reaktiven Sauerstoffspezies mit Bestandteilen der DNA können die unterschiedlichsten DNA-Schäden entstehen. Mehr als 100 solcher Modifikationen konnten bis heute identifiziert werden (Bjelland and Seeberg, 2003; Dizdaroglu, 1992; Halliwell and Aruoma, 1991). Hierzu zählen Einzel- und Doppelstrangbrüche, AP-Läsionen, oxidierte Basen, DNA-Quervernetzungen (Epe, 1996) sowie DNA-Protein-Quervernetzungen (Halliwell and Aruoma, 1991; Wallace, 2002). Einige oxidative DNA-Modifikationen sind in Abbildung 1.6 dargestellt:

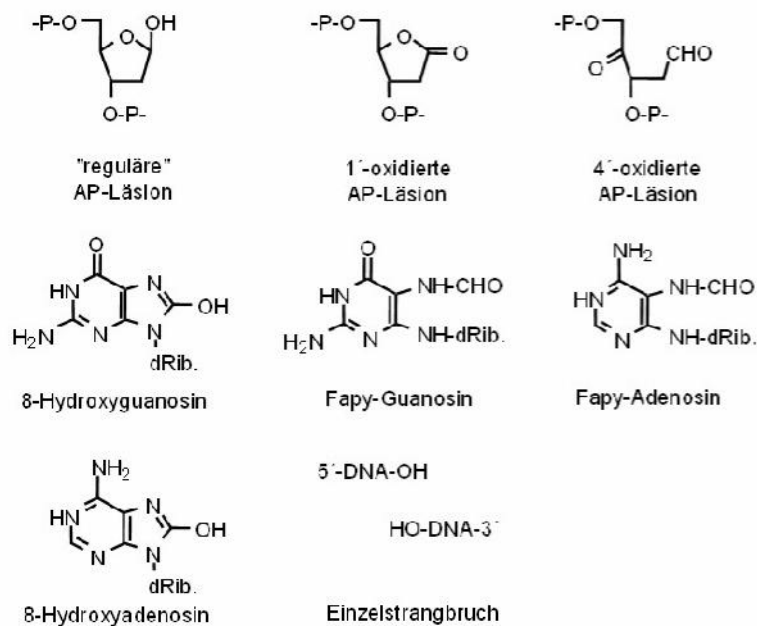


Abbildung 1.6: DNA-Basenmodifikationen

Die bedeutendste unter den oxidativen DNA-Modifikationen ist das 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG), welches durch Addition eines OH-Radikals an Position 8 des Guanins entsteht (Epe, 1996; Loft and Poulsen, 1996) oder auch durch Singulett-Sauerstoff (Devasagayam et al., 1991; Halliwell and Aruoma, 1991). Aufgrund des besonders niedrigen Oxidationspotentials des Guanins im Vergleich zu den anderen Basen (Huttermann, 1982) ist 8-oxoG die am häufigsten vorkommende Modifikation und zeigt zudem ein hohes prämutagenes Potential, da es leicht Fehlpaarungen mit Adenin eingeht. Desweiteren kann aus dem primär gebildeten Radikal durch Öffnung des Imidazolrings Fapy-Guanin (2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin) entstehen (Asagoshi et al., 2000; Cadet et al., 2000; Dizdaroglu, 1992).

Analog zur Oxidation von Guanin kann auch Adenin modifiziert werden, wenn auch sehr viel seltener. Auch die Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin können oxidativ zu 5,6-Dihydropyrimidin-Derivaten wie Glykolen oder Hydraten und deren Fragmentierungsprodukten modifiziert werden (Halliwell and Aruoma, 1991).

Durch Wasserstoffabstraktion an den Desoxyribooseresten kommt es über Zuckerradikale zu Einzel- bzw. Doppelstrangbrüchen und apurinischen Stellen (AP-Läsionen) (Teoule, 1987). Oxidierte AP-Läsionen entstehen durch radikalischen Angriff an Position 1, 2 oder 4 des Zuckers (Epe, 1996), nicht oxidierte AP-Läsionen durch spontane Depurinierung (Lindahl, 1993).

---

## 1.4 Biologische Konsequenzen oxidativer DNA-Schäden

DNA-Modifikationen können in Zellen auf verschiedene Arten prozessiert werden (Friedberg, 2003), wovon drei hier kurz beschrieben werden sollen. Zum ersten kann ein DNA-Schaden über die verschiedenen Reparaturwege (s. 1.6) erkannt und sowohl vollständig als auch fehlerfrei repariert werden. Ist ein Schaden nicht zu reparieren oder sind zu viele in der Zelle vorhanden, kann diese in die Apoptose oder die Nekrose gehen (Roos and Kaina, 2006). Falls aber ein DNA-Schaden fehlerhaft oder gar nicht repariert wird, kann es bei der nächsten Zellteilung zur Fixierung als Mutation kommen, welche den ersten Schritt zur malignen Entartung der Zelle bedeutet. Im Folgenden werden die Konsequenzen einiger DNA-Modifikationen beschrieben.

8-oxoG kann aufgrund der Tatsache, dass es in seiner stabileren Keto-Form vorliegt, leicht eine Fehlpaarung mit Adenin während der Replikation eingehen (Shibutani et al., 1991; Tchou and Grollman, 1993). So kommt es im Weiteren häufig zu G:C → T:A Transversionen mit einer Mutationshäufigkeit von 2,5% bis 4,8% (Moriya, 1993).

Formamidopyrimidine wie Fapy-Guanin und Fapy-Adenin besitzen kein mutagenes Potential. Sie können allerdings durch Blockade der Polymerase I einen Replikationsstopp verursachen (Laval, 1996; O'Connor et al., 1989) und wirken somit zytotoxisch (Tudek et al., 1992).

Pyrimidindimere zählen zu den „bulky lesions“ (sperrige Schäden) und können sowohl die Replikation als auch die Transkription stören (Borden et al., 2002; Witkin, 1976).

AP-Läsionen können durch enzymatische oder spontane Hydrolyse zu Einzelstrangbrüchen prozessiert werden (Burney et al., 1999) oder es kann zu einer Transkriptions- bzw. Replikationsblockade kommen (Yu et al., 2003). Darüber hinaus sind Basenfehlpaarungen während der Replikation möglich; so werden z.B. in Säugerzellen gegenüber AP-Läsionen überwiegend Guanine eingebaut (Klinedinst and Drinkwater, 1992).

Einzelstrangbrüche werden in der Regel sehr schnell repariert (Caldecott, 2001), dennoch ist ein gewisses mutagenes Potential nicht auszuschließen (Epe, 1996).

Doppelstrangbrüche verursachen große Deletionen und Chromosomenaberrationen. Sie sind zytotoxisch und mutagen.

## 1.5 Experimentelle Generierung zellulärer DNA-Modifikationen

### 1.5.1 Oxidative DNA-Modifikationen durch Ro19-8022

Die Substanz Ro19-8022 wurde von der Firma Hoffmann-La Roche im Rahmen der Entwicklung neuer Tranquillantien synthetisiert und ist ein partieller Agonist am Benzodiazepin-Rezeptor (Facklam et al., 1992; Mehta and Shank, 1995). Es handelt sich um eine stark gelb fluoreszierende, polare Verbindung mit dem systematischen Namen [R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl)carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol. Ro19-8022 erwies sich in Kombination mit sichtbarem Licht als mutagen im Ames-Test und generiert in PM2-DNA ein für Singulett-Sauerstoff ( $^1O_2$ ) typisches Schadensprofil (Epe and Hegler, 1994). Ro19-8022 zeigt photosensibilisierende Eigenschaften und hat seine Absorptionsmaxima bei 425, 315 und 250 nm (Will, 1995). Für die vorliegende Arbeit wurde dies ausgenutzt um oxidative DNA-Modifikationen, insbesondere 8-oxoG, zu generieren, welches zu ~75% entsteht (Will, 1999).

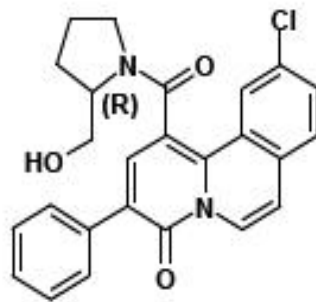


Abbildung 1.7: Strukturformel von Ro19-8022

### 1.5.2 DNA-Modifikationen durch UV-B

UV-Strahlung (Ultraviolettstrahlung) ist eine kurzwellige, energiereiche, elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich von 100 bis 400 nm. Sie ist die wesentliche Ursache der Hautalterung und der Entstehung von Hautkrebs beim Menschen (Findlay, 1979; Henriksen et al., 1990). Für die vorliegende Arbeit wurde UV-B Strahlung (280 – 320 nm) zur Generierung zellulärer DNA-Schäden benutzt. DNA und RNA besitzen absorbierende Chromophore mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 260 – 265nm und können durch UV-Strahlung direkt angeregt werden. Das Ausmaß und Verhältnis verschiedener Basenmodifikationen ist von der Wellenlänge der induzierenden Strahlung abhängig (Ananthaswamy and Pierceall, 1990). Durch direkte Anregung der DNA mit UV-B entstehen in erster Linie Cyclobutanpyrimidindimere (CPDs) (Mitchell et al., 1991) durch [2+2]-Cycloaddition der photochemisch reaktiven 5,6-Doppelbindung benachbarter Pyrimidinbasen und Pyrimidin-(6-4)-Photoprodukte (Lippke et al., 1981; Sancar and Rupp, 1983). Sehr hohe Dosen UV-B können auch oxidative DNA-Modifikationen generieren, bei denen es sich teilweise

---

um 8-oxoG handelt (Beehler et al., 1992; Budiyanto et al., 2002). Im langwelligen UV-A Bereich absorbiert die DNA hingegen nur schwach.

### 1.5.3 Einzelstrangbrüche durch $H_2O_2$

Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) wurde verwendet um Einzelstrangbrüche zu erzeugen, der detaillierte Mechanismus ist allerdings nicht genau geklärt. Es werden Eisen(II)ionen oder Kupfer(II)ionen benötigt (Jezowska-Bojczuk et al., 2002; Nakamura et al., 2003), die wahrscheinlich über eine Fenton-Reaktion die Bildung von Hydroxylradikalen vermitteln (Jezowska-Bojczuk et al., 2002).

---

---

## 1.6 Mechanismen der DNA-Reparatur

Um die Integrität des Genoms vor den Auswirkungen von DNA-Modifikationen bzw. Mutationen zu schützen, haben sich im Lauf der Evolution komplexe Reparaturmechanismen entwickelt. Denn die Folge einer Mutation ist in den seltensten Fällen positiv. Bis heute wurden im Menschen 150 verschiedene Gene identifiziert, die an solchen Reparaturmechanismen beteiligt sind (Wood et al., 2005), einige stehen auch in engem Zusammenhang mit der Ursachenforschung menschlicher Krankheiten (Ronen and Glickman, 2001; Yu et al., 1999) wie dem Cockayne Syndrom (Rass et al., 2007), Xeroderma pigmentosum, dem Nijmegen Breakage Syndrom (Hoeijmakers, 2001) und vielen anderen.

Die Reparatur von DNA-Modifikationen lässt sich unterteilen in Einzelmechanismen, die jeweils spezifisch sind für bestimmte Arten von Modifikationen, es kann allerdings auch zu Interaktionen zwischen den einzelnen Wegen kommen (Kovtun and McMurray, 2007). Die wichtigsten dieser Reparaturwege werden im Folgenden näher beschrieben.

### 1.6.1 Direkte Reparatur (Schadensreversion)

Dieser sehr einfache, in einem Schritt verlaufende, Reparaturmechanismus spielt keine wesentliche Rolle für die Entfernung oxidativer DNA-Läsionen, ist aber wichtig für die Reparatur alkylierter Basen. So kann beispielsweise die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) O<sup>6</sup>-Methylguanin durch irreversible Übertragung der Methylgruppe auf einen Cysteinrest des Enzyms reparieren (Daniels et al., 2004; Eker et al., 2009). Das nun methylierte MGMT unterliegt einem ubiquitin-abhängigen Abbau (Srivenugopal et al., 1996).

Als weiteres Beispiel sind die AlkB-Enzyme ABH2 und ABH3 zu nennen, die 1-Methylguanin und 3-Methylcytosin durch oxidative Demethylierung reparieren (Aas et al., 2003; Duncan et al., 2002).

UV-induzierte Photoprodukte wie Cyclobutanpyrimidindimere (CPDs) oder (6-4)-Photoprodukte können durch lichtabhängige Photolyasen entfernt werden, allerdings nicht im Menschen (Eker et al., 2009).

### 1.6.2 Basenexzisionsreparatur (BER)

Bei der Basenexzisionsreparatur (BER) handelt es sich um den wichtigsten Reparaturweg für DNA-Modifikationen, die durch Oxidation, Alkylierung, Desaminierung oder Depurinierung / Depyrimidinierung entstehen (Robertson et al., 2009). Für den Hauptweg („short-patch“) werden unter *in-vitro*-Bedingungen lediglich vier unterschiedliche Proteine (DNA-Glykosylase, AP-Endonuklease oder AP-DNA-Lyase, DNA-Polymerase und DNA-Ligase) benötigt (Kubota et al., 1996).

Wie in Abbildung 1.8 dargestellt, gibt es zusätzlich zum erwähnten „short patch“ auch einen sogenannten „long patch“.

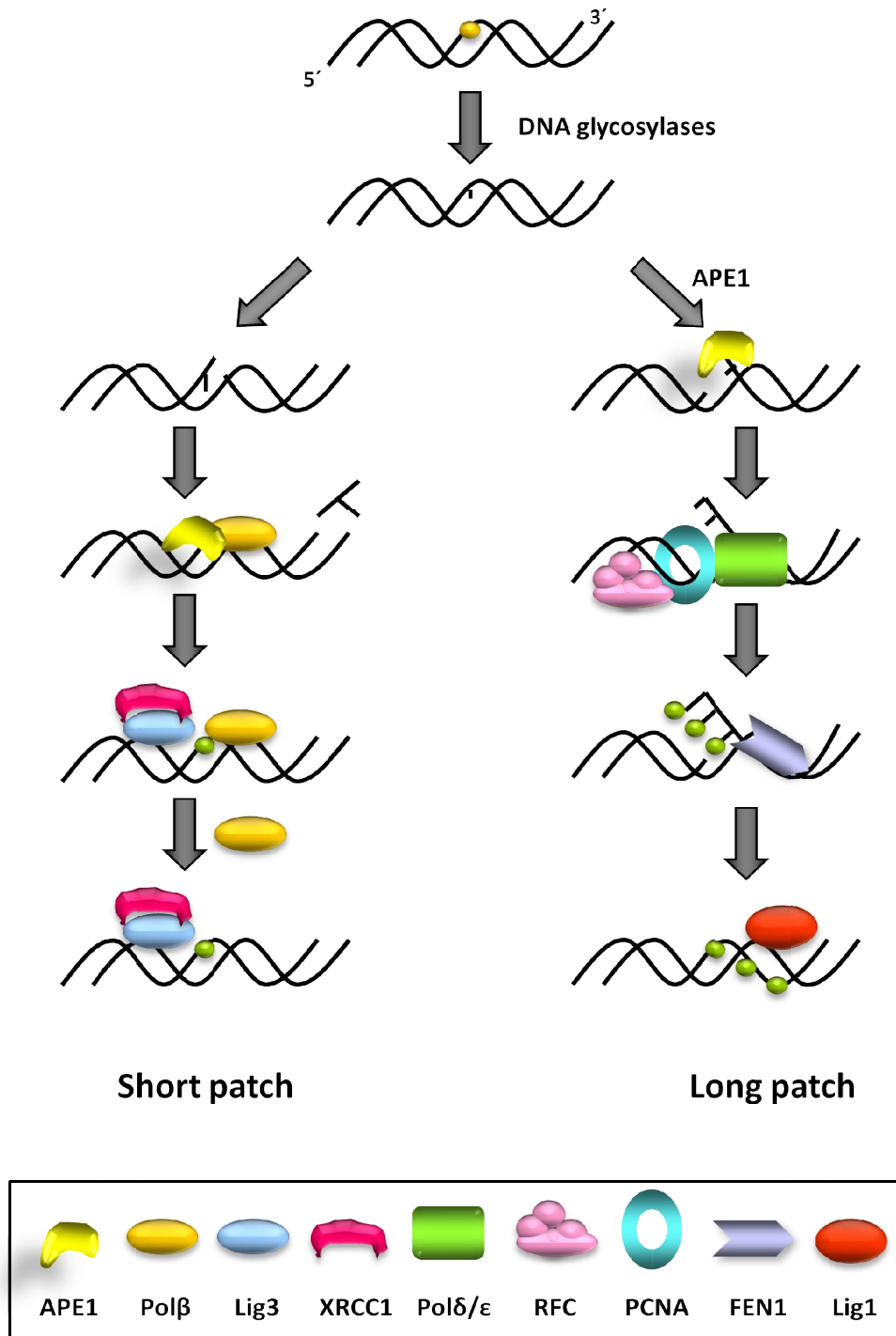


Abbildung 1.8: Basenexzisionsreparatur, modifiziert nach (Sancar et al., 2004)



---

Im ersten Schritt wird die modifizierte Base durch eine substrat-spezifische DNA-Glykosylase entfernt, welche entweder mono- oder bifunktionell sein kann. Monofunktionelle Glykosylasen (wie die Uracil-DNA-Glykosylase, UNG) spalten lediglich die glykosidische Bindung zwischen Base und Zuckerrest und hinterlassen eine intakte AP-Läsion (Scharer and Jiricny, 2001), welche weiter durch eine AP-Endonuklease (APE1) erkannt und in einen DNA-Einzelstrangbruch überführt wird. Bifunktionelle Glykosylasen (wie die 8-Hydroxyguanin-DNA-Glykosylase OGG1) spalten ebenfalls die glykosidische Bindung, trennen aber zudem die Phosphodiesterbindung, die 3´ von der gebildeten AP-Läsion liegt, durch  $\beta$ - bzw.  $\beta$ - $\delta$ -Elimination ( $\beta$ -Lyase-Aktivität) (Scharer and Jiricny, 2001). Zurück bleibt ein Einzelstrangbruch mit einem durch einen Zuckerphosphatrest blockierten 3´-Ende und einem 5´-Phosphatrest (McCullough et al., 1999). Dieser wird ebenfalls durch APE1 entfernt. Die weitere Prozessierung des Schadens erfolgt durch die Polymerase  $\beta$  und anschließendes Schließen des Rückgrats durch die Ligase III. Diese Schritte werden koordiniert durch das Plattformprotein XRCC1 (Krokan et al., 2000; Kubota et al., 1996).

Alternativ zur beschriebenen „short patch“ BER, bei der lediglich ein Nukleotid ersetzt wird, kann die Reparatur auch über die „long patch“ BER ablaufen, wobei 2 – 8 Nukleotide ersetzt werden. Nach Generierung eines Einzelstrangbruchs durch APE1 erfolgt Rekrutierung von Polymerase  $\beta$ ,  $\delta$  oder  $\epsilon$ . Der alte DNA-Strang wird verdrängt und durch die Polymerase ein 2 – 8 Nukleotide langer neuer Strang synthetisiert (Frosina et al., 1996). Der alte überhängende Strang wird nun durch die flap-Endonuklease (FEN1) in Abhängigkeit vom Replikationsfaktor C (RFC) und dem proliferating cell nuclear factor (PCNA) abgeschnitten (Klungland and Lindahl, 1997) und der neue DNA-Strang durch die Ligase I geschlossen (Levin et al., 1997).

Wie die Regulation zwischen short- und long-patch-BER erfolgt ist im Letzten nicht geklärt. Möglich sind eine Abhängigkeit von der die AP-Stelle erzeugenden Glykosylase (Fortini et al., 1999), dem Typ der AP-Läsion (Slupphaug et al., 2003) oder auch dem Zellzyklus (Levin et al., 1997; Otterlei et al., 1999; Slupphaug et al., 1991). Desweiteren wird auch eine Abhängigkeit von der ATP-Konzentration im Bereich der AP-Stelle diskutiert (Petermann et al., 2003).

Die Erkennungsspektren einiger bakterieller und menschlicher DNA-Reparaturenendonukleasen sind in Tabelle 1.2 zusammengefasst.

Tabelle 1.2: Erkennungsspektren einer Auswahl menschlicher und bakterieller Glykosylasen (nach Epe, 1995; Gros et al., 2002; Bjelland und Seeberg, 2003; Dizdaroglu, 2005)

Bakterielles Enzym	Fpg	Endo III	Endo IV	Exo III	T4-Endo V	Endo VIII	MutY <sup>g</sup>
Humanes funkt. Homolog	hOgg1	hNth <sup>a</sup>		Ape1		NEIL 1-3	hMYH <sup>g</sup>
AP-Läsion							
Regulär	+	+	+	+	+	+	
1'-oxidiert			+	+		+	
4'-oxidiert	+	+	+	(+) <sup>c</sup>	+	+	
Basenmodifikation							
8-Hydroxyguanin	+						
Fapy-Guanin	+	(+) <sup>d</sup>				+	
Fapy-Adenin	(+) <sup>e</sup>	+				+	
Pyrimidindimere					+		
Adenin:8oxoG							(+) <sup>g</sup>

<sup>a</sup> anderer Name für Thymidinglykol-DNA-Glykosylase

<sup>b</sup> kein menschliches Homolog

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

<sup>d</sup> nicht prozessiert von Endo III

<sup>e</sup> nicht prozessiert von hOgg1

<sup>f</sup> mit 8-Hydroxyguanin fehlgepaartes Adenin wird entfernt

<sup>g</sup> erzeugt keinen Einzelstrangbruch, sondern AP-Stelle

Die unterschiedliche Substratspezifität der Reparaturenendonukleasen kann genutzt werden zur qualitativen und quantitativen Untersuchung von DNA-Schäden mittels Alkalischer Elution (s. 2.2.4) oder dem PM2-DNA-Relaxationsassay. Die für diese Arbeit verwendeten Reparaturenendonukleasen werden im Folgenden kurz beschrieben.

Die Formamidopyrimidinglykosylase (Fpg) ist das bakterielle (*E. coli*) und funktionelle Homolog des humanen hOgg1 (Boiteux et al., 1990). Es handelt sich um eine bifunktionelle Glykosylase mit AP-Lyaseaktivität (Bailly et al., 1989; O'Connor and Laval, 1989) die 8-oxoG, AP-Läsionen und Formamidopyrimidine (Fapy-Guanin und Fapy-Adenin) erkennt. Essentiell für die DNA-Bindung ist ein Zink-Finger-Motiv am C-terminalen Ende (O'Connor et al., 1993).

Die T4 Endonuklease V (T4-EndoV) stammt aus dem Bakteriophagen T4 und erkennt AP-Läsionen und Cyclobutanpyrimidindimere (CPDs). Mittels Glykosylaseaktivität erfolgt eine hydrolytische Spaltung der 5'-Glycosylbindung eines der beiden Pyrimidinreste, im Anschluss wird durch AP-Lyaseaktivität die Phosphodiesterbindung zwischen den Nukleotiden getrennt (Minton et al., 1975; Nakabeppu et al., 1982).

### 1.6.3 Nukleotidexzisionsreparatur (NER)

Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) erkennt in erster Linie so genannte „bulky lesions“, DNA-Schäden die zu Helix-Distortionen führen. Typische Substrate sind Pyrimidindimere und DNA-Addukte (de Laat et al., 1999; Friedberg, 2001; Ura and Hayes, 2002). Die NER lässt sich unterteilen in zwei Wege. Zum einen die GGR (globale genomische Reparatur), die in nicht-codierenden Bereichen des Genoms, stillen Genen und dem nicht-transkribierten Strang aktiver Gene arbeitet (Noussipiel, 2007). Zum anderen die TCR (transkriptionsgekoppelte Reparatur), die gewährleistet, dass der transkribierte Strang aktiver Gene bevorzugt gegenüber dem restlichen Genom repariert wird (Friedberg, 1996; Tornaletti, 2009). Eine Übersicht der NER ist in Abbildung 1.9 dargestellt.

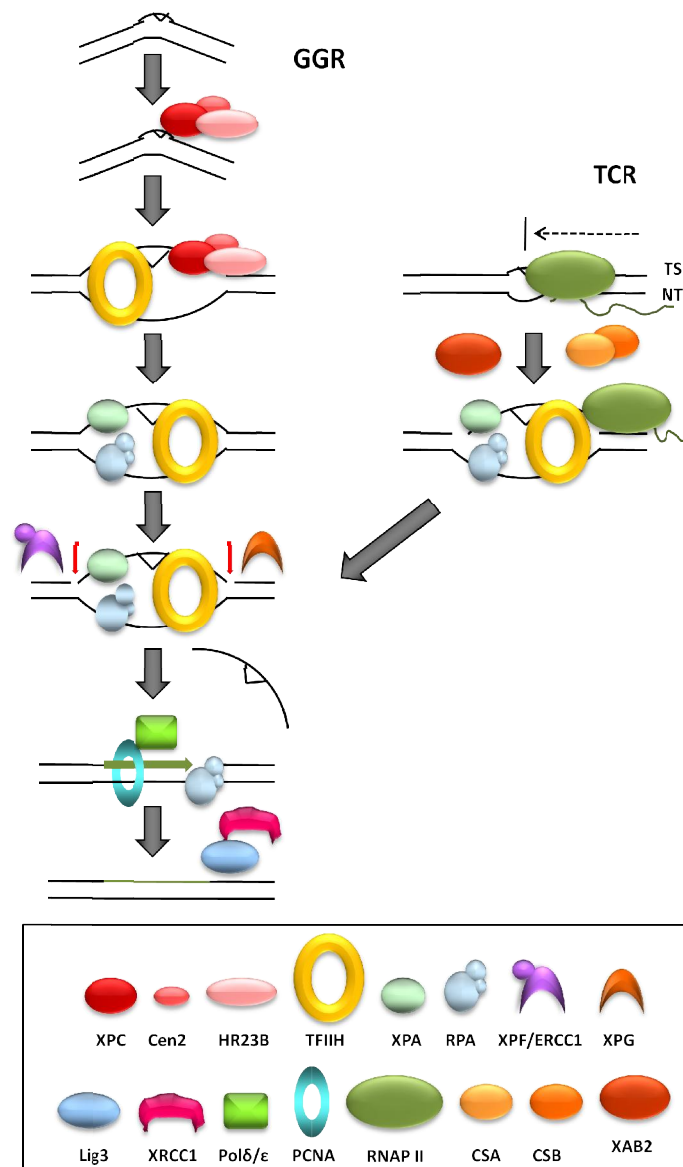


Abbildung 1.9: Nukleotidexzisionsreparatur, modifiziert nach (Sancar et al., 2004)

---

GGR und TCR unterscheiden sich lediglich in der Art der Schadenserkennung (Tornaletti, 2009). So erfolgt diese bei der TCR durch den Arrest der RNA-Polymerase an der Schadensstelle, im Fall der GGR durch einen Komplex aus den drei Proteinen XPC, HR23B und Centrin 2. XPC ist für die Bindung an die DNA zuständig und besitzt eine hohe Affinität für geschädigte DNA (Sugasawa et al., 1998). HR23B interagiert mit XPC und verstärkt dessen Aktivität, während Centrin 2 den gesamten Komplex stabilisiert (Nospikel, 2007). Einige NER-Substrate wie z.B. CPDs (Kim et al., 1995) verursachen nur eine leichte Distortion der DNA, die durch Bindung des DDB Komplexes so verstärkt wird (Tang and Chu, 2002), dass sie von XPC erkannt werden kann. Im Anschluss an die Schadenserkennung wird der Transkriptionsfaktor TFIIH rekrutiert, ein Komplex aus zehn Untereinheiten, darunter auch die Proteine XPB und XPD. Diese entwinden die DNA, wodurch die Endonukleasen XPG 3'- und ERCC1-XPF 5'- vom Schaden einschneiden können und so ein 25 bis 30 Oligomer (Matsunaga et al., 1995; Moggs et al., 1996; Svoboda et al., 1993) herausgeschnitten wird. Komplementär zum Gegenstrang kann nun durch die Polymerase  $\delta$  oder  $\epsilon$  (Popanda and Thielmann, 1992) in Zusammenarbeit mit PCNA (Nichols and Sancar, 1992; Shivji et al., 1992) die Lücke gefüllt und der Strang durch die Ligase III zusammen mit XRCC1 geschlossen werden.

Wie in 1.7 noch genauer beschrieben wird, ist die DNA zusammen mit den Histonen zu Nukleosomen und diese wiederum zum Chromatin dicht gepackt. Nukleosomen sind dynamische Strukturen und so gibt es immer Teile nukleosomaler DNA, die in gleichem Maße zugänglich ist wie nackte DNA (Polach and Widom, 1995). Dennoch stellt sich die Frage wie die großen, für die NER benötigten, Proteinkomplexe einen dort vorliegenden Schaden erkennen und reparieren können (Pfeifer, 1997; Thoma, 1999). XPC-HR23B kann auch an DNA binden, die um Histonoktamere gewunden ist und somit den Schaden erkennen. Sobald dies geschehen ist, können ATP-abhängige Chromatinremodeling-Faktoren eine gezielte Umorganisation des Chromatins im Bereich des Schadens induzieren, um den weiteren Ablauf der NER zu ermöglichen (Thoma, 1999). Zudem ist das Ausmaß und die Verteilung des durch UV-Strahlung induzierten Schadens abhängig von der DNA-Sequenz, der lokalen Struktur der DNA und ihrer Assoziation mit chromosomalen Proteinen (Pfeifer, 1997; Thoma, 1999).

#### 1.6.4 Postreplikative Reparatur (Mismatch Reparatur)

Ungepaarte oder fehlgepaarte Basen können auf vielfältige Weise entstehen, so z.B. durch Fehler während der Replikation, durch spontane oder induzierte Basen-Modifikationen oder auch während der Rekombination (Marti et al., 2002). Für die postreplikative Reparatur solcher DNA-Läsionen ist die Mismatch-Reparatur verantwortlich. In Bakterien bindet das Protein MutS an den mismatch und

aktiviert zusammen mit MutL die Endonuklease MutH, welche die falsch gepaarten Basen herausschneidet und weiter prozessiert (Kunz et al., 2009).

### 1.6.5 Doppelstrangbruch-Reparatur

Doppelstrangbrüche (DSB) entstehen durch exogene Faktoren wie ionisierende Strahlung oder Chemotherapeutika, aber auch durch endogen generierte ROS sowie mechanischen Stress auf die Chromosomen (Khanna and Jackson, 2001). Sie können über zwei voneinander unabhängige Wege repariert werden, der Homologen Rekombination (HR) oder dem Nicht-homologen Endjoining (NHEJ). Bei der homologen Rekombination werden die geschädigten Stränge repariert durch Eindringen in ein homologes Duplex, welches nun als Template zur Neusynthese genutzt werden kann. So kann die korrekte Information erhalten bleiben (Pardo et al., 2009; Sancar et al., 2004). Beim Nicht-homologen Endjoining werden die losen Enden der Stränge über einige wenige Schritte direkt ligiert. Dieser Reparaturweg ist sehr anfällig für Fehler und es kommt gewöhnlich zu kleinen Sequenz-Deletionen (Khanna and Jackson, 2001).

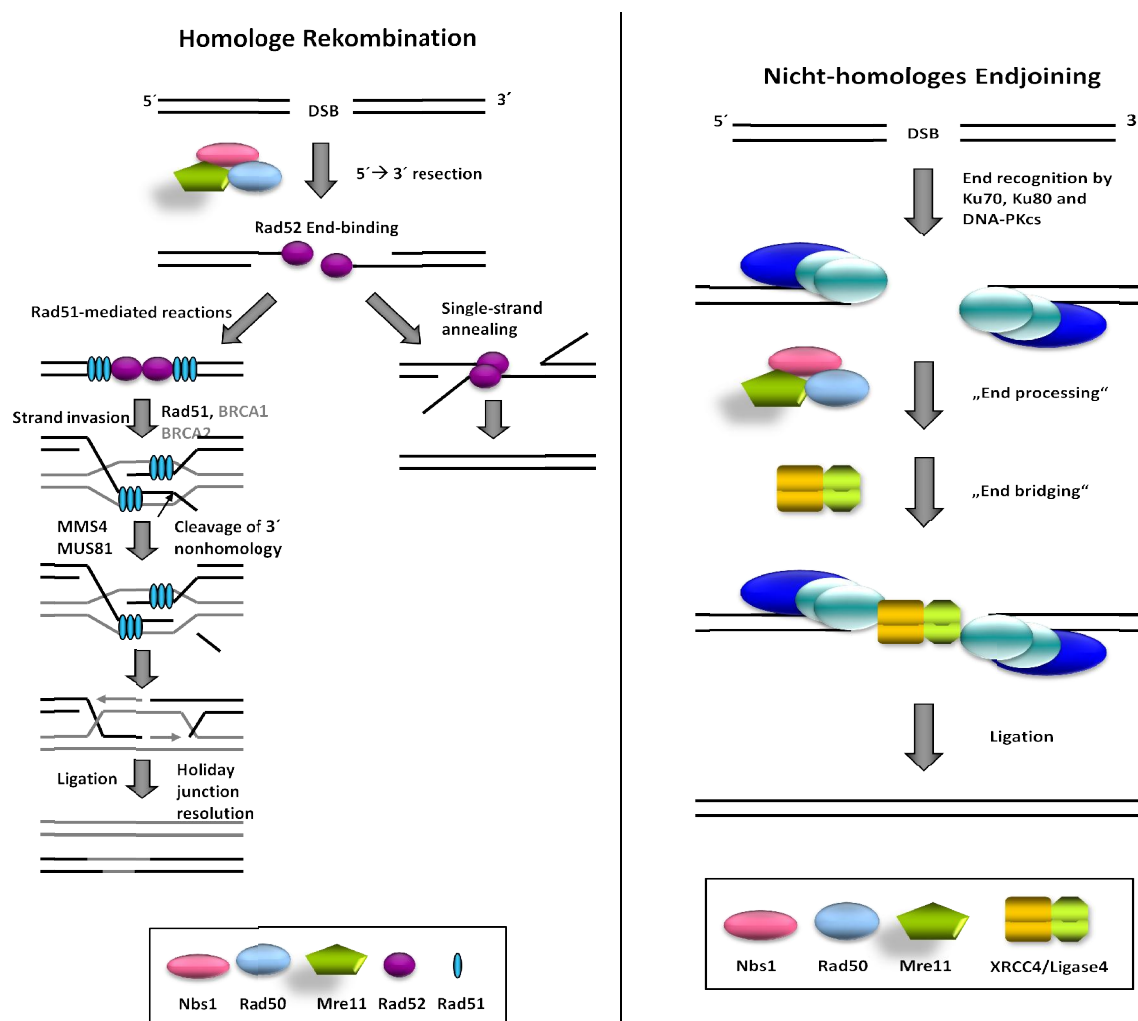


Abbildung 1.10: HR und NHEJ, modifiziert nach (Sancar et al., 2004)

---

## 1.7 Chromatin

### 1.7.1 Definition und Struktur

Im Zellkern eukaryotischer Zellen liegt die DNA in stark verdichteter Form, dem Chromatin, vor. Dies wird ermöglicht durch Interaktion der DNA mit verschiedenen Histonproteinen. Trotz dieser stark kondensierten Verpackung muss die DNA dennoch stets schnell zugänglich sein für Mechanismen wie Replikation, Reparatur oder Rekombination. Die Chromatinstruktur befindet sich deshalb in ständiger Dynamik.

Das Chromatin lässt sich unterteilen in Euchromatin, den dekontensierten und transkriptionsaktiven, und Heterochromatin, den kondensierten und transkriptionsinaktiven Bereichen. Der Grad der Kondensation wird gesteuert durch chemische Modifikationen von Histonproteinen und Rekrutierung spezieller Proteine. Die Sequenzen der Histone sind zwischen vielen Spezies stark konserviert und weisen einen hohen Anteil basischer Aminosäuren auf. Aus den Nukleosomen heraus ragen Amino-Termini (N-termini, histone tails), auf deren kovalenter Modifikation der sogenannte „Histon Code“ beruht.

Es gibt fünf Typen von Histonproteinen (H1, H2A, H2B, H3 und H4) (Phillips and Johns, 1965), welche mit der DNA die Primärstruktur des Chromatins bilden. Die kleinste Organisationseinheit sind hierbei die Nukleosomen, die regelmäßig auf einem DNA-Strang aufgereiht sind („beads on a string“). Ein einzelnes Nukleosom besteht aus 147 bp DNA, die in ~1,7 Windungen um das Nucleosome core particle (NCP) geschlungen ist (Luger et al., 1997). Dieses wiederum ist ein Proteinoktamer bestehend aus den vier Histonen H2A, H2B, H3 und H4, die jeweils doppelt vorliegen. Die einzelnen Nukleosomen sind miteinander durch eine ca. 20 – 80 bp lange Linker-DNA verbunden. (s. hierzu Abbildung 1.11). Durch Interaktion der Nukleosomen untereinander und durch Rekrutierung des fünften Histonproteins H1 bildet sich die Sekundärstruktur, die „30 nm fiber“, des Chromatins aus. Sind mehrere solcher „30 nm fibers“ miteinander assoziiert, so spricht man von der Tertiärstruktur des Chromatins (Woodcock and Dimitrov, 2001).



Erst seit einiger Zeit ist bekannt, dass über den Histon Code epigenetische Funktionen, wie z.B. die Regulation der Transkription, gesteuert werden. Dies geschieht wohl durch Proteine, die die posttranslationalen Modifikationen erkennen, somit den Histon Code „lesen“ können und daraufhin nachgeschaltete Prozesse in Gang kommen können. Der Histon Code kann aber auch unmittelbare Effekte ausüben, z.B. kann durch bestimmte Modifikationen die Interaktion der Histon-Enden mit der DNA moduliert werden.

Auf eine bestimmte posttranslationale Histonmodifikation, die Acetylierung, soll im folgenden Abschnitt näher eingegangen werden.

### 1.7.3 Chromatinacetylierung

Die Acetylierung von Histonen erfolgt an Lysinresten der Amino-termini und wird reguliert über ein dynamisches Gleichgewicht zwischen Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs). Die Histonacetyltransferasen lassen sich in zwei Kategorien unterteilen: Typ A HATs, die im Kern lokalisiert sind, und Typ B HATs, die im Cytoplasma lokalisiert und an der Acetylierung von *de novo* synthetisierten Histonen beteiligt sind (Sterner and Berger, 2000). Die menschlichen Histondeacetylasen sind in drei Gruppen eingeteilt (s. Tabelle 1.4). Bei HDACs der Gruppen 1, 2 und 3 handelt es sich um  $Zn^{2+}$ -abhängige Deacetylasen (Hildmann et al., 2007), die Sirtuine sind  $NAD^+$ -abhängig (Vaquero et al., 2007).

Tabelle 1.4: Einteilung von Histondeacetylasen (Hildmann 2007)

Gruppe	Untergruppe	Gruppenmitglieder
1		HDAC 1, -2, -3, -8
2	Ila	HDAC 4, -5, -7, -9
	Ilb	HDAC 6, -10
3		HDAC 11
Sirtuine		SIRT 1 - 7

Durch Acetylgruppen an den Histonen werden physische Interaktionen der Histon-Enden mit der DNA vermindert. Grund dafür ist, dass die eigentlich positive Ladung der Lysin-Stickstoffatome durch die Acetylierung aufgehoben wird und somit nicht mehr in ionische Wechselwirkungen mit den negativen Phosphatgruppen des DNA Rückgrats treten kann (Grunstein, 1997). Es bildet sich dadurch eine „offenere“, für Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerase II zugänglichere Struktur aus (Lee et al., 1993; Luger and Richmond, 1998; Tse et al., 1998). Acetylierte Histone sind ein Merkmal für transkriptionsaktives Euchromatin. Neben diesem unmittelbaren Einfluss der Acetylierung kann ein transkriptionssteigernder Effekt auch über Effektormoleküle hervorgerufen werden. Die



Deacetylierung von Histonen geht im Umkehrschluss mit einer erniedrigten Transkription (gene silencing) und der Ausbildung von unzugänglicherem Heterochromatin einher.

Im folgenden Abschnitt soll noch kurz spezieller auf die Gruppe der Sirtuine eingegangen werden, da diese für die vorliegende Arbeit eine besondere Rolle spielen.

#### 1.7.4 Sirtuine

Das erste identifizierte Sirtuin, Sir2 (silent information regulator 2), stammt aus *Saccharomyces cerevisiae* (Klar et al., 1979) und gibt der gesamten Familie den Namen. Sir2 ist eine NAD<sup>+</sup>-abhängige Histondeacetylase (Imai et al., 2000; Landry et al., 2000) und ist beteiligt an der Regulation wichtiger Mechanismen wie DNA-Reparatur (McAinsh et al., 1999; Mills et al., 1999; Tsukamoto et al., 1997), chromosomale Stabilität und Langlebigkeit. Auch die positiven Effekte der Kalorienrestriktion werden in Verbindung gebracht mit Sir2, bzw. seinen Orthologen. Eine Überexpression des humanen SIRT1 in Mäusen zeigt ähnliche Charakteristika wie eine Kalorienrestriktion, nämlich eine erhöhte metabolische Aktivität, erniedrigte Cholesterin-, Insulin- sowie Glucosespiegel (Bordone et al., 2007). In Würmern (Tissenbaum and Guarente, 2001) und Fliegen (Rogina and Helfand, 2004) wurde eine erhöhte Lebensdauer durch Überexpression von SIRT1 nachgewiesen.

Die humane Sir2 Familie besteht aus sieben Vertretern (SIRT 1 – 7) NAD<sup>+</sup>-abhängiger Histon- und Proteindeacetylasen und ist in verschiedene Klassen unterteilt (s. Abbildung 1.12).

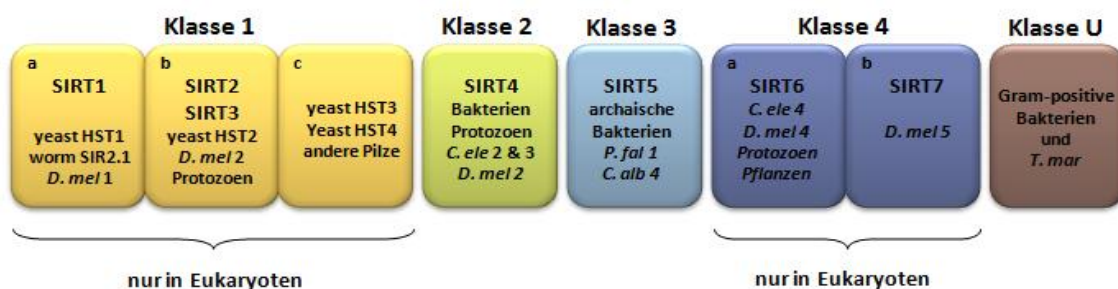


Abbildung 1.12: Klassifizierung der Sirtuine; nach (Michan and Sinclair, 2007)

Die Sirtuin-Proteine haben eine gemeinsame katalytische Domäne von 275 Aminosäuren und sie sind lokalisiert im Zellkern (SIRT 1, 6 und 7), mitochondrial (SIRT 3,4 und 5) und im Cytoplasma (SIRT 2) (Blander and Guarente, 2004; North and Verdin, 2004; Saunders and Verdin, 2007).

Das am besten bekannte humane Sirtuin SIRT1, das Orthologe von Sir2, ist beteiligt an der Histonmodifizierung durch Deacetylierung an Position 9 des Histons H3 und an Position 16 des Histons H4. Insgesamt sind bis heute 34 Substrate von SIRT1 bekannt (Baur, 2010), von denen viele

---

nicht-histon Targets sind. Das erste identifizierte nicht-histon Target ist p53 (Luo et al., 2001; Vaziri et al., 2001), dessen Deacetylierung in unterdrückter transkriptioneller Aktivität resultiert. Desweiteren beeinflusst SIRT1 FOXO-Transkriptionsfaktoren (Brunet et al., 2004), unterdrückt NFκB-abhängige Entzündungsreaktionen und fördert Gluconeogenese und Fettsäureoxidation über PGC1α (peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1α) (Lagouge et al., 2006; Rodgers et al., 2005). SIRT1-knockout-Mäuse zeigen unter anderem chromosomale Instabilität, eine verminderte Ausbildung von Heterochromatin, Veränderungen im Zellzyklus sowie eine verminderte DNA-Reparatur (Fan and Luo, 2010; Wang et al., 2008).

Das pflanzliche Polyphenol Resveratrol gilt als Aktivator des humanen SIRT1 *in vitro* (Howitz et al., 2003) und wird im nun folgenden Abschnitt eingehender beschrieben.

## 1.8 Chromatinmodulatoren

### 1.8.1 Resveratrol

Resveratrol (trans-3, 4',5 – Trihydroxystilben) wurde zunächst als Phytoalexin charakterisiert, ein von Pflanzen als Reaktion auf exogene Infektionen oder Stress synthetisiertes Polyphenol (Langcake and Pryce, 1977). Resveratrol findet sich in den unterschiedlichsten Pflanzen wie Weintrauben, Maulbeeren und Erdnüssen (Baur and Sinclair, 2006). In Weintrauben wird es in erster Linie in der Traubenschale produziert und liegt so durch Fermentation bei der Weinherstellung vor allem in Rotwein in einer Konzentration von 0,1 – 15 mg/l vor (Careri et al., 2004).

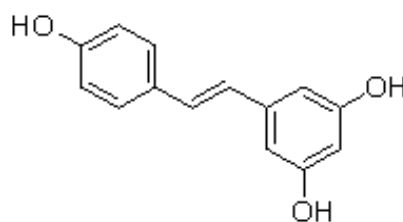


Abbildung 1.13: Strukturformel von Resveratrol

Von großem wissenschaftlichem Interesse ist Resveratrol seit es in Zusammenhang mit dem French Paradox gebracht wurde. Trotz dem vergleichsweise hohen Konsum gesättigter Fette in Frankreich, ist die Mortalität aufgrund kardiovaskulärer Ereignisse im europaweiten Vergleich deutlich gesenkt. Der moderate Konsum von Wein (30 – 50 g/Tag) wird hierzu in Korrelation gebracht (Renaud and de Lorgeril, 1992). Resveratrol vermindert die Gewebsschädigung während einer akuten Ischämie (Bradamante et al., 2000), verbessert vaskuläre Funktionen (Orallo et al., 2002) und inhibiert die Plättchenaggregation *in vitro* (Bertelli et al., 1995) und *in vivo* (Shen et al., 2007; Wang et al., 2002) über direkte und irreversible Inhibierung von COX1 (Szewczuk et al., 2004). Neben seinen protektiven Effekten für kardiovaskuläre Ereignisse zeigt Resveratrol auch präventive Eigenschaften für eine Vielzahl anderer Erkrankungen wie Diabetes (Milne et al., 2007)(verbesserte Insulinresistenz) (Baur and Sinclair, 2006; Lagouge et al., 2006), Neurodegenerative Erkrankungen (Anekonda, 2006) und die Alterung (Markus and Morris, 2008). Es inhibiert die Cyclooxygenasen 1 und 2 (Jang et al., 1997), die Tumor-induzierte Neovaskularisierung (Kimura and Okuda, 2001; Tseng et al., 2004) und verursacht Veränderungen im Zellzyklus. Anhängig vom Zelltyp kann es zur Akkumulation in der G1-Phase (Ahmad et al., 2001), der S-Phase (Estrov et al., 2003; Joe et al., 2002) oder der G2/M-Phase (Liang et al., 2003) kommen. Resveratrol inhibiert Kinasen (Armour et al., 2009; Shakibaei et al., 2009), beeinflusst den Östrogen- (Gehm et al., 1997), den Aryl-Hydrocarbon- (Ciolino et al., 1998) und den Cannabinoid-Rezeptor 1 (CB1) (Seely et al., 2009). Auch eine Induktion von Phase II Enzymen wurde beobachtet (Hebbar et al., 2005).

---

Als SIRT1-Aktivatoren wurde Resveratrol von Howitz et al. (Howitz et al., 2003) mit Hilfe des Fluor de Lys Assays identifiziert. Dieses Ergebnis wird bis heute kontrovers diskutiert, möglich ist, dass Resveratrol alleine mit dem verwendeten Fluorophor interagiert (Borra et al., 2005). Auch andere bisher entwickelte SIRT1-Aktivatoren erzeugen dieses falsch-positive Ergebnis. Dennoch stehen viele Eigenschaften von Resveratrol in Einklang mit erhöhter SIRT1-Aktivität. Entgegen der Tatsache, dass Resveratrol viele Kinasen inhibiert, wird die AMP-aktivierte Kinase (AMPK) von Resveratrol aktiviert (Dasgupta and Milbrandt, 2007; Zang et al., 2006). Als eine Folge der nun angeschalteten AMPK-abhängigen Prozesse kommt es zu erhöhter NAD<sup>+</sup>-Konzentration, welche wiederum die SIRT1-Aktivität stimulieren könnte (Canto et al., 2009). Dies gilt als möglicher Mechanismus einer indirekten SIRT1-Aktivierung durch Resveratrol (Dittenhafer-Reed et al., 2011).

Die Eigenschaft von Resveratrol SIRT1 zu aktivieren wurde für diese Arbeit ausgenutzt um Chromatin verstärkt zu deacetylieren und so eine stark kondensierte, heterochromatinähnliche Struktur zu erzeugen.

### 1.8.2 Histondeacetylase-Inhibitoren

Epigenetische Ereignisse haben eine Schlüsselrolle bei der Krebsentstehung (Yoo and Jones, 2006). Am besten untersucht ist hierbei der in 1.7.2 beschriebene Histon Code. Es ist bekannt, dass in Krebszellen eine verminderte Histonacetylierung vorliegt (Fraga et al., 2005; Nakagawa et al., 2007; Yoo and Jones, 2006), welche in der Regel einhergeht mit einem Stilllegen von Genen (Mutskov and Felsenfeld, 2004) und einer verminderten DNA-Reparatur (Masumoto et al., 2005). Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACI), die zu den sogenannten „epigenetischen Arzneistoffen“ gehören, stehen deshalb im Fokus der Forschung und stellen eine neue Klasse Krebstherapeutika dar. Sie induzieren Zellzyklusarrest, Differenzierung und Apoptose, hemmen die tumorale Angiogenese (Richon et al., 2000; Sandor et al., 2000) und wirken immunmodulatorisch (Bolden et al., 2006) (s. auch Abbildung 1.14). Normale Zellen sind gegenüber HDACI-induzierter Apoptose relativ resistent (Marks et al., 2001). Zudem wird diskutiert, dass durch die HDACI-induzierte Histonhyperacetylierung Tumorsuppressorgene aktiviert und Onkogene unterdrückt werden könnten (Yoo and Jones, 2006).

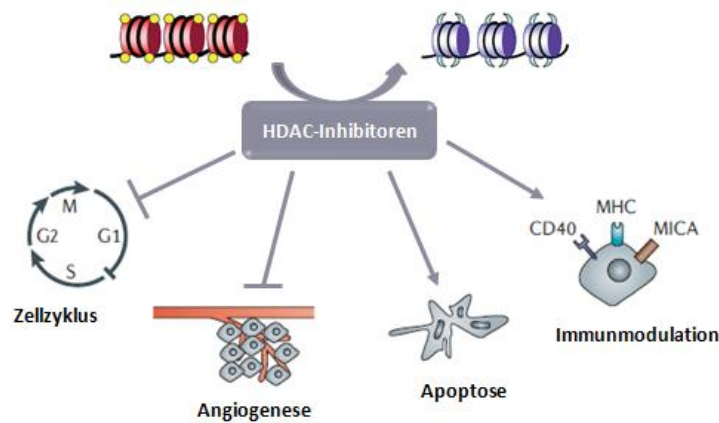


Abbildung 1.14: Effekte von HDAC-Inhibitoren auf Krebszellen, modifiziert nach (Bolden et al., 2006)

Histondeacetylase-Inhibitoren lassen sich in vier Gruppen unterteilen, wie in Tabelle 1.5 dargestellt ist.

Tabelle 1.5: Einteilung einiger exemplarischer Histondeacetylase-Inhibitoren (nach Yoo, 2006 und Bolden, 2006)

Klasse	Verbindung	Dosisbereich	HDAC-Spezifität	Referenzen	Klinische Studien
Kurzketttige Fettsäuren	Na-Butyrat	mM	Klasse I, IIa	(Stadtman and Barker, 1949)	Phase I, II
	Na-Valproat	mM	Klasse I, IIa	(Raffoux et al., 2005; Yang et al., 2005)	Phase I, II
Hydroxamsäuren	TSA	nM	Klasse I, II	(Yoshida et al., 1990)	präklinisch
Cyclische Tetrapeptide	Apicidin	nM	HDACs 1&3	(Marshall et al., 2002)	
Benzamide	MS-275	μM	HDACs 1, 2, 3 & 8	(Furumai et al., 2001; Jose et al., 2004)	Phase I, II

Die zu den kurzketttigen Fettsäuren gehörenden HDACIs Valproinsäure (Gottlicher et al., 2001) und Natriumbutytrat waren die ersten identifizierten Histondeacetylase-Inhibitoren (Candido et al., 1978; Sealy and Chalkley, 1978). Diese beiden und die aus *Streptomyces* stammende Hydroxamsäure Trichostatin A (TSA) (Yoshida et al., 1990) wurden für die vorliegende Arbeit verwendet. Der inhibitorische Effekt auf Histondeacetylasen wurde ausgenutzt, um in Zellen eine hyperacetylierte, decondensierte und euchromatin-ähnliche Struktur zu erzeugen.

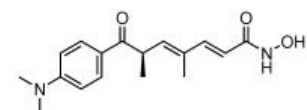
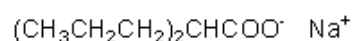
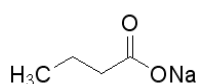


Abbildung 1.15: Strukturformeln von Na-Butyrat, Na-Valproat und Trichostatin A

---

## 1.9 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses der Chromatinstruktur auf die Induktion und Reparatur von DNA-Schäden sowie die Entstehung von Mutationen. Um den Kondensationsgrad von Zellen zu modulieren, wurden diese zum einen mit Resveratrol, zum anderen mit den HDAC-Inhibitoren Natriumbutyrat (Na-Butyrat) und Trichostatin A (TSA) behandelt. Resveratrol vermittelt eine globale Chromatinkondensation, also eine dicht gepackte, schlecht zugängliche chromosomale DNA, für die eine verminderte Suszeptibilität gegenüber schädigenden Agenzien sowie eine verschlechterte Reparatur erwartet wird. Durch HDAC-Inhibitoren hingegen ergibt sich ein dekontensiertes und somit gut zugängliches Chromatin mit evtl. erhöhter Schadensinduktion aber auch verbesserter Reparaturgeschwindigkeit.

Die Induktion oxidativer Läsionen, deren Reparatur repräsentativ für die Basenexzisionsreparatur (BER) verwendet wurde, erfolgte mit Hilfe des Photosensibilisators Ro19-8022 in Kombination mit sichtbarem Licht. Weiterhin wurden durch UV-B-Strahlung Cyclobutanpyrimidindimere (CPDs) generiert, welche über die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) prozessiert werden. Als dritte Art von DNA-Schäden erfolgte die Induktion von Einzelstrangbrüchen mit Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Das Ausmaß induzierter Läsionen sowie deren Reparaturgeschwindigkeit wurde bestimmt mit Hilfe der Alkalischen Elution unter Verwendung der Reparaturenzyme Fpg (zur Detektion oxidativer Modifikationen) und T4-EndoV (zur Detektion von CPDs). Neben der Induktion von DNA-Schäden und deren Reparatur wurde die Beeinflussung weiterer zellulärer Parameter, wie z.B. Proliferation, Zellzyklus und Glutathionspiegel, durch die verwendeten chromatinmodulierenden Substanzen überprüft.

Als Konsequenz sowohl einer veränderten Induktion von DNA-Läsionen als auch einer veränderten Reparaturgeschwindigkeit ist eine Beeinflussung der Entstehung von Mutationen zu erwarten. Daher wurden sowohl die Entstehung spontaner als auch durch UV-B induzierter Mutationen unter dem Einfluss von Resveratrol und den HDAC-Inhibitoren (Na-Butyrat, TSA) in AS52-Zellen untersucht.

---

---

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Software

Autoclav	Technoclav 50 6.0 bzw. 2.0 (Fedegari Autoclav SPA, Albuzzo, Italien)
Autoradiographiekassette	Typ G, Rego, Augsburg
Biofuge	28RS und Sigma 3K-2 (HeraeusInstruments, Osterode am Harz) Eppendorf 5415D (Eppendorf, Hamburg)
Brutschränke (Zellkultur)	CO <sub>2</sub> -Inkubator BB16, BB6060 O2 und Hera-Cell (Heraeus Instruments, Hanau)
Coulter-Counter	Z2TM (Beckman Coulter, Fullerton, USA)
Destillations-Apparatur	Destamat (Heraeus, Hanau)
Dounce Homogenisator	Wheaton, Millville, USA
Durchflusszytometer	FACScalibur FACS System mit CellQuest™ Pro Software (Becton Dickinson, Heidelberg)
Fluorimeter	TKO 100, DNA Fluorimeter (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA) SFM 25 Fluorimeter (Kontron Istruments, Zürich, Schweiz)
Fraktionssammler	Ultrorac 2070 II (Pharmacia / LKB, Uppsala, Schweden) und MM 10, Neolab 4 mit Zeitnehmer SM 999 (Neolab, Heidelberg)
Gefrierbehälter (Zellen)	Flüssigstickstoffcontainer TW 750 RS (Taylor Wharton, Theodore AI, USA)
Gefrierschrank (-20°C)	KG 3666-23 (Liebherr)
Gefrierschrank (-70°C)	Colora UF 85-300S (Colora, Lorch)
GelDoc 1000 Geldokumentationssystem mit Molecular Analyst Software	BioRad, München
Gelkammer, SDS-PAGE	MGV-202, C.B.S. Scientific, Kalifornien, USA
Gelkammer, Agarosegel	
Halogenlampe (1000 W)	Osram SLG 1000-Studio (Osram, München)

---

	mit Flecta Halogen Mini-Brenner (Reflekta)
Handventilator, batteriebetrieben	Hello Kitty
Heissluftsterilisator	WTC Binder, Tuttlingen
Kühlzentrifuge	Sorvall Superspeed RC2-B (Sorvall, Conn., USA)
Lichtmikroskop	Telaval 31 (Zeiss, Oberkochen)
Magnetrührer	Ikamag RET-G (Ika-Werk, Janke &Kunkel, Staufen i. Br.)
Multipette	Pipette DISCOVERY Comfort DV12 (Abimed, Langenfeld)
Peristaltikpumpe	ISM 759 (20 Kanäle), (Ismatec Laboratoriumstechnik, Schweiz)
pH-Meter	pH 526 (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim)
Pipetten	Pipetman P 20, P 100, P 200, P 1000, P 5000, P 10000 (Gilson, Frankreich)
Pipettierhilfe	Pipettus-akku (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)
Power Supply	Power Pac 300, BioRad, München Power Pac Basic, BioRad, München
Rotoren für Kühlzentrifuge	SS-34, GS-3 (Sorvall, New.t.on, Conn., USA)
Schüttler	Orbit LS, Labnet, Ried im Innkreis, Österreich
Schüttelinkubator	Typ Certomat R+H (B. Braun, Melsungen, Deutschland)
Spektralphotometer	WPA Biowave, S 2100 (Whatman Biometra, Göttingen)
Sterile Werkbank	Lamin Air HB 2472 und HB 2448 (Heraeus Instruments, Hanau)
Transferkammer	Mini-Trans Blot Gel, BioRad, München
Trockenschrank	(Heraeus Instruments, Hanau)
Ultraschall-Homogenisator	SONOPULS; HD 70 mit Sonotrode MS 73 und (Sonifier) HF-Generator GM 70 (70 W, 20 kHz) (Bachofer, Reutlingen)
Ultrazentrifuge (ZU)	Optima LE-80K (Beckmann Instruments, Palo Alto, Kalifornien, USA)
UV-B Lampe	TL20W/12RS Philips Licht, Hamburg



---

UV-Sensoren	UV-B (Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH, Ettlingen)
Vortexer	Vortex Genie 2, Model G-560E (Scientific Industries, Bohemia, N.Y., USA)
Waagen	PB 3002, Delta Range, max. 3100g (Mettler Toledo, Schweiz) AG 245, max. 210g (Mettler Toledo, Schweiz)
Wasserbad (heizbar bis 100°C)	Köttermann Type 3042 (Köttermann, Uetze-Hänigsen, Deutschland)
Zentrifugen	Hettich Micro Rapid/K und HettichUniversal/K2S (Hettich, Tuttlingen)
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	
Blotting-Film	Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Freiburg
Einmalpipetten, steril	Hartenstein, Würzburg
Filter (Alkal. Elution)	Isopore Membranfilter, 2 µm, Ø: 25 mm, (Millipore, Schwalbach)
Filterhalter (Alkal. Elution)	Swinnex SX 2500 (Millipore, Schwalbach)
Filterpapier und Faltenfilter	Schleicher & Schuell, Dassel Gel-Blotting Papier, Whatman, USA
Glasgeräte	Schott Spezialglas GmbH, Mainz
Glaspipetten (Zellkultur)	Hartenstein, Würzburg
Kryo-Röhrchen, steril	Nunc Kryo, 1,5 ml (A/S Nunc, Roskilde, Dänemark)
Kulturröhrchen PP, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Nitrocellulosemembran	Hybond-C Extra, GE Healthcare, Freiburg
Parafilm	Parafilm
Pasteurpipetten	Hartenstein, Würzburg
Pipettenspitzen (Einweg)	Eppendorf AG, Hamburg Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (Einweg) 5 & 10ml	Hartenstein, Würzburg
Plastikkleinwaren	Eppendorf, Hamburg
Plastikspitzen (Einweg)	Hartenstein, Würzburg
Safelock® Caps (1,5 / 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Spritzen (Alkal. Elution)	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter (0,22 µM)	Schleicher & Schüll, Dassel
Sterilfilter (0,22 µM; Bottle-Top)	Nunc, Wiesbaden

---

Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen, Plastik	Greiner Bio-One, Frickenhausen

### 2.1.3 Chemikalien

Acid Orange 10 (Orange G)	Roth, Karlsruhe
Acrylamid	Rotiphorese Gel 30 (37,5:1), Roth, Karlsruhe
Adenin	Sigma Aldrich, Steinheim
Agarose	Invitrogen GmbH, Darmstadt
Aktivkohle	Merck, Darmstadt
Aminopterin	Sigma Aldrich, Steinheim
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Sigma Aldrich, Steinheim
Ampicillin	Sigma Aldrich, Steinheim
Auftragepuffer	Rotiload 1, Roth, Karlsruhe
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Biorad-Farbstoffkonzentrat	BioRad, Hercules, CA, USA
Bisbenzimid (Hoechst Nr. 33258)	Sigma Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Coomassie-Brilliant Blue	Sigma Aldrich, Steinheim
di-Kaliumhydrogenphosphat x 3 H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
5,5'-Dithio-bis (2-Nitrobenzoesäure)	Sigma Aldrich, Steinheim
Dithioerythritol	Sigma Aldrich, Steinheim
DL-Buthioninsulfoximin	Sigma Aldrich, Steinheim
DMEM Medium high Glucose	PAA, Cölbe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich, Steinheim
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
EGTA (Ethylenglycoltetraessigsäure)	Sigma Aldrich, Steinheim
Eichlösungen Puffer (pH 5, 7, 8, 10, 11)	Merck, Darmstadt
Eisessig	Roth, Karlsruhe

---

Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, technisch	Merck, Darmstadt
Ethanol, absolut	Roth, Karlsruhe
Ethidumbromid	Sigma Aldrich, Steinheim
EX-527	Sigma Aldrich, Steinheim
Fixierer	Rapid Fixer, Ifford, England
Formaldehyd 36%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formamid 90%	Sigma Aldrich, Steinheim
Giemsa-Lösung	Sigma Aldrich, Steinheim
Glutathion (Glu-Cys-Gly)	Sigma Aldrich, Steinheim
Glutamin	PAA, Cölbe
Glycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycerol	Sigma Aldrich, Steinheim
Ham's F12	PAA, Cölbe
Harnstoff	Sigma Aldrich, Steinheim
Hepes	Sigma Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isoton II-Lösung	Beckman Coulter, Krefeld
Kälberserum, fötales	PAA, Cölbe
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Kohlendioxid (CO <sub>2</sub> )	Linde, Höllriegelskreuth
Lumineszenz-Reagenz	Western Lightning-ECL, PerkinElmer, Rodgau
Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat x 7 H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Roth, Karlsruhe
Mycophenolsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	BioRad, Hercules, USA
NADPH, Tetranatriumsalz	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumbutyrat	Sigma Aldrich, Steinheim

---

Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat x 1 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	PAA, Cölbe
Natriumvalproat	Sigma Aldrich, Steinheim
(±)-Nutlin-3	Cayman Chemicals, Michigan, USA
Papierentwickler	Ilford, England
PD169316	Sigma Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAA, Cölbe
Phenol	Sigma Aldrich, Steinheim
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Sigma Aldrich, Steinheim
Propidiumjodid	Sigma Aldrich, Steinheim
Proteaseinhibitor (complete Mini)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Resveratrol (>98% HPLC grade)	Sigma Aldrich, Steinheim
	Evonik Degussa, Essen
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ro19-8022	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
D(+)-Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure 25%, 37%	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure 96%	Merck, Darmstadt
Stickstoff, flüssig	Linde, Höllriegelskreuth
Sulfosalicylsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
Temed	Roth, Karlsruhe
Tetraethylammoniumhydroxid (TEAH)	Merck, Darmstadt
6-Thioguanin	Sigma Aldrich, Steinheim
Thymidin	Sigma Aldrich, Steinheim
Trichloressigsäure	Roth, Karlsruhe
Trichostatin A	Sigma Aldrich, Steinheim
Tris-HCl	Sigma Aldrich, Steinheim

---



---

Triton-X 100	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin /EDTA-Lösung	PAA, Cölbe
Tween 20	Roth, Karlsruhe
U-0126	LC Laboratories, Woburn, USA
Wasserstoffperoxid-Lösung (8,8 M)	Sigma Aldrich, Steinheim
Xanthin	Sigma Aldrich, Steinheim

#### 2.1.4 Enzyme und DNA

Deoxyribonuclease (DNase I) [1U/μl]	Fermentas, St. Leon-Roth
Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase aus <i>E. coli</i> ; (rein)	zur Verfügung gestellt von S. Boiteux.
Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase aus <i>E. coli</i> ; (Rohextrakt)	hergestellt von M. Osterod nach (Boiteux et al., 1990).
Katalase (40 422 U/mg) aus Rinderleber	Serva, Heidelberg
Glutathionreduktase	Roche
Proteinase K (lyophilisiert)	Roth, Karlsruhe
Ribonuclease A (RNase)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
T4-Endonuklease V ( <i>E. coli</i> )	Präparation nach Nakabeppu et al. (Nakabeppu, 1982), modifiziert durch Pflaum (Pflaum, 1996), hergestellt durch M. Pflaum bzw. C. Flohr und I. Schulz (Mainz)
Kalbsthymus-DNA	Sigma Aldrich, Steinheim

#### 2.1.5 Antikörper und Marker

AK p53 (primär)	p53 sc-6243, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
AK anti-rabbit (sekundär)	goat anti-rabbit IgG-HRP, sc-2004, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
AK β-Actin (primär)	β-Actin (C4) sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
AK anti-mouse (sekundär)	goat anti-mouse IgG-HRP, sc-2005, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
DNA-Marker	GeneRuler™ 1kb Plus DNA Standard, Fermentas, St. Leon-Roth

Proteinmarker	Page Ruler Prestained Protein Ladder, Fermentas, St. Leon-Roth
---------------	--

## 2.1.6 Zelllinien

### 2.1.6.1 AS52-Zellen

Es handelt sich um eine adhären wachsende Ovarienzelllinie des chinesischen Hamsters (CHO), erhalten von W.J. Caspary (Laboratory of Environmental Carcinogenesis and Mutagenesis, Research Triangle Park, North Carolina, USA). 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 – Phosphoribosyl-Transferase (XPRT bzw. XGPRT) kodiert, eingeführt (Mulligan and Berg, 1980). Verdopplungszeit: ~20h

### 2.1.6.2 HeLa-Zellen

Es handelt sich um eine adhären wachsende menschliche Zervixkarzinomzelllinie (Gebärmutterhalskrebs), erhalten von A. Hartwig (Universität Karlsruhe). Es sind die ersten menschlichen Zellen, von denen eine permanente Zellkultur etabliert wurde. Im Jahr 1951 wurde bei der Patientin Henrietta Lacks (HeLa) ein sehr bösartiges Karzinom am Muttermund festgestellt und einige Zellen entnommen. Die Zellen waren vom humanen Papillomavirus 18 (HPV 18) befallen und zeigten dadurch Eigenschaften wie Unsterblichkeit und eine hohe Teilungsrate. Verdopplungszeit: ~20h

## 2.1.7 Puffer, Lösungen und Medien

### 2.1.7.1 Zellkultur

PBSCMF (autoklaviert)	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>
--------------------------	--------	---

Kulturmedium für AS52-Zellen	Ham´s F12 5 % / 10% FCS 1 % Penicillin / Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg / ml)
------------------------------	---

Kulturmedium für HeLa-Zellen	DMEM high glucose
------------------------------	-------------------

10 % FCS  
 1 % Penicillin / Streptomycin-Lsg.  
 (100 U/ml, 100 µg/ml)  
 1 % Glutamin  
 1 % Na-Pyruvat

### 2.1.7.2 Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit

PBSCMF (autoklaviert)	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>
Giemsa-Lösung		10 % (V/V) Giemsa in Aqua bidest  durch Faltenfilter filtrieren lichtgeschützt lagern

### 2.1.7.3 Alkalische Elution

PBSCMF (autoklaviert)	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>
BE1 (autoklaviert)	pH 7,5	100 mM NaCl 20 mM Tris-HCl 1,0 mM Na <sub>2</sub> EDTA
BE1/BSA (autoklaviert)	pH 7,5	100 mM NaCl 20 mM Tris-HCl 1,0 mM Na <sub>2</sub> EDTA 0,10 g/l BSA
Lysepuffer	pH 10,0	100 mM Glycin 20 mM Na <sub>2</sub> EDTA 2 % SDS

---

		pH-Wert mit 2N NaOH eingestellt
Lysepuffer (mit Proteinase K)	pH 10,0	100 mM Glycin 20 mM Na <sub>2</sub> EDTA 2 % SDS pH-Wert mit 2N NaOH eingestellt 400 mg/l Proteinase K
Waschpuffer (autoklaviert)	pH 10,0	20 mM Na <sub>2</sub> EDTA pH-Wert mit 2N NaOH eingestellt
Elutionspuffer	pH 12,1	20 mM H <sub>4</sub> EDTA pH-Wert mit TEAH eingestellt
DNA-Standard		200,0 µg/ml Kalbsthymus-DNA in BE1-Puffer
Bisbenzimid-Stammlösung		0,15 mM in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> (Hoechst No. 33258) die Lösung wird aliquotiert bei -20°C gelagert
Phosphatpuffer PP 6 (autoklaviert)	pH 6,0	100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Phosphatpuffer PP 7,2 (autoklaviert)	pH 7,2	21,7 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 93,0 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> mit Bisbenzimid (1 % (v/v) Bisbenzimid-Stammlösung)
PBS (autoklaviert)	Lsg I	0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,2 g KCl 8,0 g NaCl 1,15 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2 H <sub>2</sub> O ad 500 ml Aqua dest.



---

---

pH auf 7,4 einstellen, mit NaOH oder HCl

Lsg II      0,1325 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$   
              0,1 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

nach dem Autoklavieren werden beide Lösungen  
unter sterilen Bedingungen zusammen gegeben

#### 2.1.7.4 Mutationstest

##### Adenin-Stammlösung

187 mg Adenin

100 ml 1N HCl

pH 7,5

Lagerung bei Raumtemperatur

##### Aminopterin-Stammlösung

25,0 mg Aminopterin

56,8 ml Aqua bidest

pH 7,2

Lagerung bei 4°C

Alufolie, da lichtempfindlich

##### MPA-Stammlösung

25,0 mg MPA

2,5 ml 1 N NaOH

Lagerung bei -20°C

##### Thymidin-Stammlösung

121,2 mg Thymidin

50,0 ml Aqua bidest

Lagerung bei 4°C

##### Xanthin-Stammlösung

2,50 g Xanthin

50,0 ml 1N NaOH

450 ml Aqua bidest

Lagerung bei 4°C

---

		Alufolie, da lichtempfindlich
6-Thioguanin-Lösung		5,0 mg 6-Thioguanin 1 mg Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 10 ml Aqua bidest
		Lagerung bei -20°C
Giemsa-Lösung		10 % (V/V) Giemsa in Aqua bidest
		durch Faltenfilter filtrieren lichtgeschützt lagern
Cleansing Medium		Ham's F12 500,00 ml FCS 28,60 ml Adenin-Stammlösung 6,58 ml Thymidin-Stammlösung 2,50 ml Aminopterin-Stammlösung 1,50 ml MPA-Stammlösung 0,50 ml Xanthin-Stammlösung 25,00 ml Pen./Strep. 5,00 ml
		Xanthin zuletzt zugeben, dann pH-Wert auf 7,2 einstellen (mit HCl) sterilfiltrieren FCS zugeben
2.1.7.5 Gehaltsbestimmung Glutathion		
PBSCMF (autoklaviert)	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>
Phosphat / EDTA (pH 7,5) (autoklaviert)		7,98 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,86 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,18 g Na <sub>2</sub> EDTA

---

		ad 500 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
TCA-Puffer (sterilfiltriert)		5 ml 20%ige Trichloressigsäure 40 µl EDTA (0,5 M, pH 8,0) 2 ml HCl (1 N) ad 60 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
PP / NADPH		0,3 mM Na <sub>4</sub> NADPH
DTNB -Lösung		6 mM DNTB in Phosphat/EDTA-Puffer (lichtgeschützt gelagert)
GSH-Standard		20 mM Glutathion (reduziert) in Phosphat/EDTA-Puffer (frisch hergestellt)
Glutathion-Reduktase		200 U/ml
2.1.7.6 Proteinbestimmung		
PBSCMF (autoklaviert)	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>
Lysepuffer (MIT Salz)		200 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM EDTA pH 8,0 2500 mM NaCl in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
		1 Tablette Proteinaseinhibitor / 10 ml
BSA-Stammlösung		1 mg / ml in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
2.1.7.7 Zellzyklusbestimmung		
PBSCMF (autoklaviert)	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>	
Propidiumiodid / RNase		50 µg/ml PI	
		10 µg/ml RNase	
2.1.7.8 Western Blot			
RIPA-Puffer		1 M Tris-HCl, pH 7,4	1,25ml
		1 M NaCl	3,75ml
		Triton-X 100	0,25ml
		Natrium-Deoxycholat	0,125g
		20 % SDS	0,125ml
		0,5 M EDTA	0,25ml
		Aqua dest.	Ad 25ml
		lichtgeschützt lagern bei 4-8°C	
		direkt vor dem Gebrauch PMSF-Lsg. Zugeben End-Konzentration 1mM	
PMSF 100mM		175 mg PMSF	
		in 10,0 ml Isopropanol	
Proteaseinhibitor 10x		1 Tablette in 1ml Aqua dest. Lösen	
		aliquotieren und bei -20°C lagern	
PBSCMF (autoklaviert)	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>	
SDS 20%		SDS	10 g
		Aqua dest.	ad 50 ml

---

Im Wasserbad bei 65°C lösen, Mundschutz!

APS 10%	Ammoniumpersulfat	100 mg
	Aqua dest.	1 ml
Trenngel SDS-PAGE (10%)	H <sub>2</sub> O	3,85 ml
	Acrylamid	3,4 ml
	1,5 M Tris pH 8,8	2,6 ml
	20% SDS	0,05 ml
	10% APS	0,1 ml
	Temed	0,004 ml
Sammelgel SDS-PAGE	H <sub>2</sub> O	3,425 ml
	Acrylamid	0,85 ml
	1 M Tris pH 6,8	0,65 ml
	20% SDS	0,025 ml
	10% APS	0,05 ml
	Temed	0,005 ml
Laufpuffer SDS-PAGE 5x	Tris-HCl	15,1 g
	Glycin	94 g
	SDS 20%	25 ml
	Aqua dest.	ad 1000 ml
Transferpuffer I	Tris-HCl	5,8 g
	Glycin	2,9 g
	Methanol	200 ml
	Aqua dest.	ad 1000 ml
über Nacht im Kühlschrank ausdampfen lassen		
Ponceau S Lösung 10x	Ponceau S	2 g
	Trichloressigsäure	30 g
	Sulfosalicylsäure	30 g

---

	Aqua dest.	Ad 1000 ml
Coomassie-Lösung	Coomassie Brilliant Blue	0,25 g
	Methanol/Wasser (1:1)	90 ml
	Eisessig	10 ml
	filtrieren durch Whatman Filter Nr. 1	
Entfärbelösung	Methanol	450 ml
	Aqua dest.	450 ml
	Eisessig	100 ml
TBS 10x	Tris-HCl	12,1 g
	NaCl	87,8 g
	Aqua dest.	ad 1000 ml
TBST 0,1%	TBS 10x	100 ml
	Tween 20	1 ml
	Aqua dest.	ad 1000 ml
Blocking-Lösung (Milchpulver 5%)	Milchpulver	1,5 g
	0,1% TBST	ad 30 ml

#### 2.1.7.9 Enzymatische Hydrolyse von Chromatin mit DNase I

PBSCMF (autoklaviert)	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>

#### 1M Glycinlösung

Sucrose Puffer A	0,32 mM Sucrose
	15 mM Hepes pH 7,9
	60 mM KCl

---

2 mM EDTA  
0,5 mM EGTA  
0,5 % w/v BSA  
0,2 mM PMSF  
0,5 mM DTT

in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

PMSF und DTT wurden erst unmittelbar vor  
Benutzung zugegeben

#### Sucrose Puffer B

30 % w/w Sucrose  
15 mM Hepes pH 7,9  
60 mM KCl  
2 mM EDTA  
0,5 mM EGTA  
0,5 mM DTT

DTT wurde erst unmittelbar vor Benutzung  
zugegeben

#### NUC Puffer

15 mM Hepes pH 7,9  
60 mM KCl  
15 mM NaCl  
0,34 mM Sucrose  
15 mM β-Mercaptoethanol

in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

β-Mercaptoethanol wurde erst unmittelbar vor  
Benutzung zugegeben

---

	für den Verdau mit DNase I wurde dem NUC-Puffer (ohne $\beta$ -Mercaptoethanol) 20 mM $\text{CaCl}_2$ , 10 mM $\text{MgCl}_2$ und 20 $\mu\text{g/ml}$ RNAse zugesetzt
Nuclease Stopp Puffer NSB 2x	10 mM Tris-HCl pH 8 20 mM EDTA 1 % w/v SDS  in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$
1M NaOH	
TAE 50x (nicht autoklaviert)	242 g Tris-HCl 57,1 ml Eisessig 100 ml 0,5 M EDTA pH 8
6x Ladepuffer (nicht autoklaviert)	60 % v/v Glycerol 6x TAE 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Orange G
0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid in TAE	



---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

#### 2.2.1.1 Kultivieren von Zellen

Die Kultivierung von Zellen erfolgt ausschließlich unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar – Air – Flow – Box. Bei allen in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien handelt es sich um adhärent wachsende Monolayerkulturen, die alle 2 – 3 Tage passagiert werden müssen. Hierfür wird das verbrauchte Medium aus der Zellkulturflasche entnommen und durch Spülen der Flasche mit PBSCMF verbliebene Restmengen von Medium entfernt. Um nun die Zellen vom Flaschenboden zu lösen wird eine Trypsin/EDTA – Lösung zugegeben und die Zellkulturflasche im Brutschrank bei 37°C 1 – 2 Minuten inkubiert. Durch diese Behandlung lösen sich die Zellen vom Flaschenboden und können durch Zugabe von frischem Medium in Suspension aufgenommen werden. Nach dem Zählen der Zellen mit Hilfe des Coulter-Counters werden sie in gewünschter Konzentration in neue Zellkulturflaschen zur Weiterkultivierung ausgestreut. Die Kultivierung der Zellen erfolgt hierfür im Inkubator bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 99% Luftfeuchtigkeit.

#### 2.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Um Zellen einzufrieren, und somit über Jahre lagern zu können, werden diese zunächst wie in Abschnitt 2.2.1.1 beschrieben mittels Trypsin/EDTA abgelöst, in frischem Medium aufgenommen und gezählt. Nun wird die Zellsuspension bei 4°C, 1200 U/min für 5 Minuten zentrifugiert und das erhaltene Zellpellet mit einer Mischung aus Medium und 10 % DMSO in einer Konzentration von ca. 2 Mio./ml aufgenommen. Diese Zellsuspension wird nun in Portionen zu 1,5 ml in spezielle Kryoröhrchen abgefüllt und langsam eingefroren (~ 2h bei -20°C, weitere 24h bei -80°C, anschließend in flüssigem Stickstoff). Zur Kontrolle wird nach 2 – 3 Tagen eine Auftauprobe durchgeführt.

Das Auftauen von Zellen erfolgt folgendermaßen: die Kryoröhrchen werden dem flüssigen Stickstoff entnommen, bei 37°C im Wasserbad weitestgehend aufgetaut und in 9 ml kaltes Medium überführt. Nun wird bei 4°C, 1200 U/min für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in warmem Medium resuspendiert. Die Zellen werden so in eine kleine Zellkulturflasche überführt und bei Standard – Kultivierungsbedingungen in den Brutschrank gestellt. Am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel, um nicht angewachsene Zellen zu entfernen. Die Weiterkultivierung erfolgt nun wie in 2.2.1.1 beschrieben.

## 2.2.2 Bestimmung der Proliferation

### 2.2.2.1 Prinzip

Die Bestimmung des Proliferationsfaktors gibt Aufschluss über den Einfluss einer Substanz auf Zellwachstum und eventuelle Toxizität. Hierzu werden Zellen für einen bestimmten Zeitraum mit der zu testenden Substanz inkubiert und durch Zellzahlbestimmung zu verschiedenen definierten Zeitpunkten die Proliferation bestimmt.

### 2.2.2.2 Durchführung

Die für diese Arbeit durchgeführten Proliferationsversuche sind vom Ablauf an die Suszeptibilitäts- und Reparaturversuche und die Bestimmung der induzierten Mutationen angepasst. Pro Ansatz werden auf mittlere Zellkulturplatten  $0,35 \cdot 10^6$  Zellen ausgestreut und nach 24h zum ersten Mal die Zellzahl bestimmt. Für jeden zu bestimmenden Zeitpunkt muss pro Ansatz eine Platte Zellen (Parallelplatten) ausgestreut werden. 24h nach Ausstreuen der Zellen wird die jeweilige Testsubstanz zugegeben und für 24h inkubiert. Im Anschluss daran wird erneut die Zellzahl bestimmt und eine Parallelplatte mit frischem Medium für weitere 48h wachsen gelassen und dann zum dritten Mal die Zellzahl bestimmt. Dieser Versuchsaufbau ist korrespondierend zu den Versuchen zu Schadensinduktion und Reparatur der induzierten DNA-Läsionen.

Zur Simulation des Ablaufs der Bestimmung induzierter Mutationen wird im Anschluss an die 24-stündige Inkubationszeit mit der jeweiligen Testsubstanz das Medium gewechselt und erneut Testsubstanz für weitere 48h frisch zugegeben. Die Inkubationszeit beträgt also insgesamt 72h. Im Anschluss an diese erfolgt auch hier die dritte Zellzahlbestimmung. Siehe auch den in Abbildung 2.1 dargestellten Versuchsaufbau.

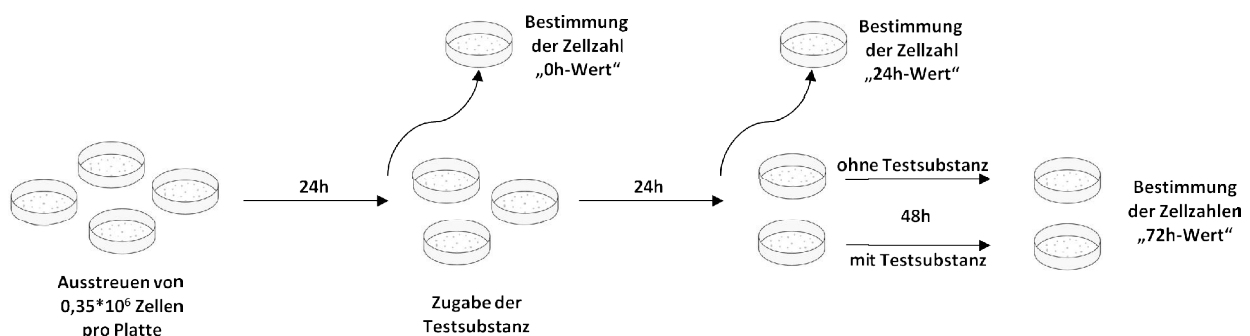


Abbildung 2.1: Versuchsaufbau für die Bestimmung der Proliferation

Die Zellzahlen werden in logarithmischer Skalierung gegenüber der Zeit aufgetragen. Desweiteren besteht die Möglichkeit, aus dem Quotienten der Zellzahl des „72h-Wertes“ und der Zellzahl des „0h-

---

Wertes“ einen Proliferationsfaktor zu berechnen. Als „0h-Wert“ wird die Zellzahl bei der ersten Zellzahlbestimmung (24h nach Ausstreuen) bezeichnet.

### 2.2.3 Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit

#### 2.2.3.1 Prinzip

Die Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit gibt Auskunft über die Toxizität einer Substanz oder Behandlung von Zellen. Hierzu wird die Anzahl der aus geschädigten Zellen entstandenen Kolonien bestimmt.

#### 2.2.3.2 Durchführung

Auf kleinen Zellkulturplatten werden pro Ansatz 200 AS52-Zellen ausgestreut (in dreifacher Ausführung) und für etwa 24 Stunden anwachsen gelassen. Nun erfolgt eine eventuelle Zugabe einer zu testenden Substanz (z.B. Resveratrol) für eine 24-stündige Inkubationszeit. Im Anschluss daran erfolgt eine eventuelle Schädigung der Zellen (z.B. mit Ro19-8022 + Licht). Waren die Zellen zuvor mit einer Testsubstanz inkubiert, wurde diese vor Schädigung in Phosphatpuffer (PBSCMF) gewaschen. Im Anschluss an die Schädigung wird erneut gewaschen und die Zellen nun mit reinem Vollmedium für 7-8 Tage im Brutschrank belassen. Bei der unbehandelten Kontrolle wird lediglich zum Zeitpunkt der Schädigung das Medium gewechselt. Die im Anschluss an die 7-8-tägige Zeit hochgewachsenen Kolonien werden mit NaCl-Lösung gewaschen und mit Methanol fixiert. Daraufhin werden sie mit Giemsa-Lösung gefärbt und ausgezählt.

Aus dem Quotienten der Kolonienzahlen der unbehandelten Kontrolle und der maximal möglichen Kolonienzahl 200, lässt sich die „absolute Koloniebildungsfähigkeit“ berechnen. Sie gibt Aufschluß über die unter Kontrollbedingungen angewachsene Zahl an Zellen. Die „relative Koloniebildungsfähigkeit“ der behandelten Proben ergibt sich aus dem Quotienten der Kolonienzahl der jeweiligen behandelten Probe und der Kolonienzahl der unbehandelten Kontrolle.

### 2.2.4 Alkalische Elution

#### 2.2.4.1 Prinzip

Die Alkalische Elution bietet die Möglichkeit, in einem hochsensitiven Verfahren Einzelstrangbrüche und, in einer modifizierten Variante, mit Hilfe von Reparaturoendonukleasen auch DNA-Basenmodifikationen in Säugerzellen zu detektieren und zu quantifizieren. Die Nachweisgrenze dieses von Kohn entwickelten Verfahrens (Kohn et al., 1976) liegt bei ~0,5 Läsionen pro  $10^7$  Basenpaaren und ist damit etwa 200 mal empfindlicher als z.B. der PM2-DNA-Relaxationsassay (Hollenbach, 1999).

Das Prinzip der Alkalischen Elution beruht auf der Tatsache, dass kleine, stark geschädigte DNA-Fragmente schneller durch einen Filter eluiert werden als größere, weniger stark geschädigte DNA-Fragmente. Zellen werden in Suspension auf einen Polycarbonatfilter aufgetragen (Porengröße 2  $\mu\text{m}$ ) und mit einem SDS- und Proteinase K- haltigen alkalischen Puffer (pH 10,0) lysiert. Somit werden zelluläre Bestandteile wie Proteine, RNA und Membranen vom Filter gewaschen, zurück bleibt die nackte doppelsträngige DNA. Diese kann nach Waschen mit Reparaturenukleasen inkubiert und im Anschluss mit einem alkalischen Elutionspuffer (pH 12,15) in ihre Einzelstränge überführt und fraktionsweise eluiert werden.

Das gesammelte Eluat wird neutralisiert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid versetzt, wodurch der DNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen fluorimetrisch vermessen und die Elutionsrate berechnet werden kann. Durch Kalibrierung mit  $\gamma$ -Strahlung ( $6 \text{ Gy} = 1 \text{ Einzelstrangbruch} / 10^6 \text{ bp}$ ) (Kohn et al., 1976) kann nun die Anzahl an DNA-Schäden berechnet werden.

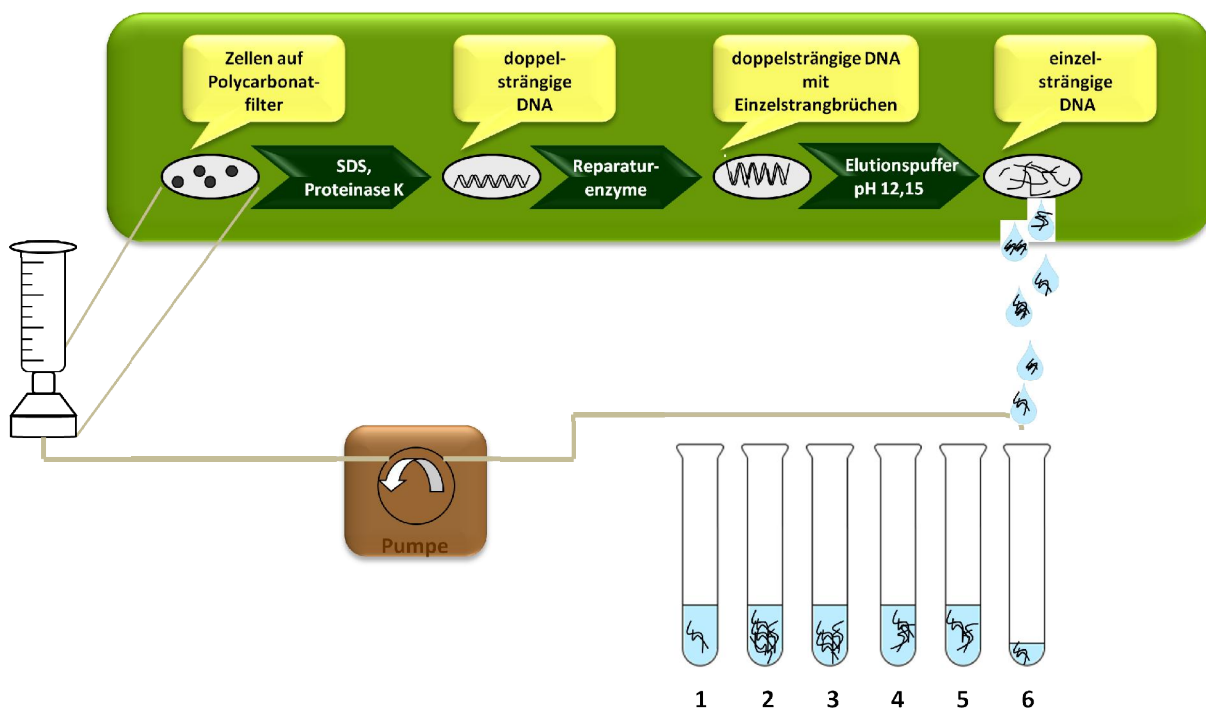


Abbildung 2.2: Prinzip der Alkalischen Elution, modifiziert nach (Eiberger, 2008)

#### 2.2.4.2 Durchführung

Die Polycarbonatfilter werden in Filterhalter eingelegt und diese blasenfrei mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  gefüllt. Im Anschluss wird zweimal mit PBSCMF gespült und die Filterhalter nun bis zum Auftragen der Zellen in ein  $4^\circ\text{C}$  kaltes Wasserbad eingebracht. Dies ist notwendig, um ein Reparieren von DNA-Schäden bis zur Lyse der Zellen zu verhindern. Eine Million Zellen werden in Suspension pro Filter aufgetragen

---

und mit Hilfe einer Mehrkanalpumpe und zweimaligem Spülen mit PBSCMF auf die Filter aufgebracht. Währenddessen wird das Wasserbad auf 25°C aufgeheizt, um dann ab einer Temperatur von mindestens 15°C zunächst 2 ml Lysepuffer mit maximaler Geschwindigkeit und anschließend weitere 5 ml Lysepuffer (+ 0,4 mg/ml Proteinase K) bei 25°C innerhalb von 90 Minuten durch die Anlage zu pumpen.

Nach abgeschlossener Lyse der Zellen werden diese sieben Mal mit BE<sub>1</sub>-Puffer gespült, um letzte Reste des Lysepuffers zu entfernen. Das Wasserbad wird währenddessen auf 37°C aufgeheizt, um eine geeignete Reaktionstemperatur für die folgende Inkubation mit Reparaturenukleasen zu gewährleisten. Für diese werden 2 ml einer frischen Enzymverdünnung in BE<sub>1</sub>/BSA-Puffer (1 µg/ml Endkonzentration) aufgetragen. Spuren in denen reine Einzelstrangbrüche gemessen werden, werden mit 2 ml reinem BE<sub>1</sub>-Puffer versetzt. Der erste Milliliter wird bei maximaler Geschwindigkeit durchgepumpt, der zweite innerhalb von 50 Minuten.

Nach der Enzyminkubation werden die Reste der Enzymlösung durch zweimaliges Waschen mit BE<sub>1</sub>-Puffer und anschließendes Waschen mit Waschpuffer entfernt. Hierbei ist darauf zu achten, dass Einzelstrangspuren nicht mit Enzymlösung verunreinigt werden. Sobald das Wasserbad eine Temperatur von 25°C erreicht hat, werden die Einwegspritzen mit 25 ml Elutionspuffer gefüllt und dieser innerhalb von 11 Stunden durchs System gepumpt. Das Eluat wird während dieser Zeit in sechs Fraktionen gesammelt und anschließend der verbliebene Überstand an Elutionspuffer in der Einwegspritze in die 6. Fraktion gepumpt. Die Polycarbonatfilter werden aus den Filterhaltern ausgebaut und zusammen mit der 6. Fraktion in Coulter-Counter-Döschen im Wasserbad bei 60°C für mindestens zwei Stunden geschüttelt. Dadurch wird die auf dem Filter verbliebene, nicht eluiert DNA in Lösung gebracht. Nach dem Schütteln wird den Döschen eine dem Volumen der anderen fünf Fraktionen entsprechende Menge entnommen und mit diesen zusammen weiter aufgearbeitet.

Jede Fraktion wird mit einer dem Fraktionsvolumen entsprechenden Menge Phosphatpuffer pH6 versetzt und für 15 min inkubiert. Im Anschluss wird mit dem wieder gleichen Volumen Phosphatpuffer pH7,2 / Bisbenzimid (1,5 µM) für weitere 15 min inkubiert und der DNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen nun fluorimetrisch vermessen (Exzitationswellenlänge 360 nm und Emissionswellenlänge 450 nm). Das Fluorimeter wird zuvor mit Hilfe eines Blindwertes (Elutionspuffer, PP pH6, 1,5 µM Bisbenzimid in PP pH7,2; Volumen entsprechend dem der Fraktionen) auf einen Nullwert eingestellt. Die Gesamtmenge an DNA pro Spur ist proportional zur Summe der Fluoreszenzintensität der jeweiligen Fraktionen. Wird nun die DNA-Menge der einzelnen

---

Fraktionen halblogarithmisch gegen den Zeitverlauf aufgetragen, erhält man eine Gerade, deren Steigung direkt proportional zur Anzahl der Einzelstrangbrüche ist. Eine zufällige Verteilung der Schäden in der Kern-DNA ist Voraussetzung für diese Berechnungsmethode. Letztendlich kann die absolute Zahl an Einzelstrangbrüchen und für die verwendete Reparaturenendonuklease sensitiven Modifikationen (ESS) mit folgender Gleichung berechnet werden (Epe et al., 1993):

$$\text{ESS} + \text{SSB} = m \times (-2,24 * 10^6)$$

ESS (Zahl der Endonuklease-sensitive Modifikationen), SSB (Zahl der Einzelstrangbrüche), m (mittlere Steigung der Gerade)

Formel 1: Formel zur Berechnung von ESS und SSB

Hierbei beschreibt m die Steigung der Geraden und -2,24 den für die vorliegenden Bedingungen experimentell ermittelten Faktor (Epe et al., 1993; Pflaum, 1996).

#### 2.2.4.3 Schnelle Alkalische Elution

Mit der zuvor beschriebenen Durchführung der Alkalischen Elution lassen sich Schäden bis etwa 0,8 Strangbrüche pro  $10^6$  bp detektieren. Um stärker geschädigte DNA zu vermessen kann die Methode dahingehend geändert werden, dass die Pumpgeschwindigkeit für die Elution der DNA auf 30 ml/h erhöht wird. Somit wird die DNA anstatt in 11 Stunden in nur 52 Minuten in die sechs Fraktionen eluiert. Die Empfindlichkeit der Methode nimmt dadurch etwas ab, es können so aber Schäden von bis zu 3 pro  $10^6$  bp detektiert werden.

Die weitere Aufarbeitung und Vermessung der Fraktionen erfolgt wie in 2.2.4.2 beschrieben. Wie für die langsame Alkalische Elution wird auch hier mit  $\gamma$ -Strahlung kalibriert. Der so ermittelte Faktor für die schnelle Alkalische Elution liegt bei -8,6 (Ballmaier, 1997).

#### 2.2.5 Behandlung der Zellen für die Alkalische Elution

Im Vorfeld der Alkalischen Elution werden die aufzutragenden Zellen mit PBSCMF gewaschen und abtrypsiniert (s. 2.2.1.1). Anschließend werden sie in kaltem Medium aufgenommen und von nun an auf Eis gehalten. Nach Bestimmung der Zellzahl können die Zellen wie oben beschrieben auf die Filter aufgetragen werden.

##### 2.2.5.1 Schädigung mit Ro19-8022 und sichtbarem Licht

Zur Schädigung mit dem Photosensibilisator Ro19-8022 werden adhärente Zellen zweimal mit PBSCMF gewaschen um Medienrückstände zu entfernen und eine mit Ro19-8022-Stammlösung hergestellte PBS-Verdünnung (50 bzw. 100 nM) zugegeben. Die Zellen werden nun in der

---

Zellkulturflasche auf Eis mit einem Abstand von 38 cm für 10 Minuten mit sichtbarem Licht (1000 Watt Halogenlicht im Bereich von 400 – 800 nm) bestrahlt. Im Anschluss wird die Ro19-8022-Lösung unmittelbar entfernt und erneut zweimal mit PBSCMF gewaschen. Um den induzierten Schaden zu bestimmen werden die Zellen nun abtrypsinisiert und wie in 2.2.5 beschrieben aufgetragen. Soll die Reparatur des induzierten Schadens bestimmt werden, wird 37°C warmes Medium zugegeben und die Zellen für die gewünschte Reparaturzeit im Brutschrank inkubiert.

#### 2.2.5.2 Schädigung mit UV-B

Zur Schädigung mit UV-B werden adhärenente Zellen (auf mittleren Zellkulturplatten) zweimal mit PBSCMF gewaschen und im Anschluss mit 10,0 ml kaltem PBS versetzt. Die Platten werden nun ohne Deckel mit einer UV-B-Lampe in einem Abstand von einem Meter acht Sekunden bestrahlt. Dies entspricht einer Dosis von 2,88 J/m<sup>2</sup>. Das PBS wird nun abgenommen und die Zellen umgehend abtrypsinisiert um den induzierten Schaden zu messen. Für eine eventuelle Reparatur wird, wie in 2.2.5.1 beschrieben, warmes Medium zugegeben und die Zellen für die Reparaturzeit im Brutschrank inkubiert.

#### 2.2.5.3 Schädigung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

In der vorliegenden Arbeit wurde die Generierung von Einzelstrangbrüchen zum einen in adhärenenten Zellen bei 37°C, zum anderen in Zellen in Suspension bei 0°C durchgeführt. Bei 37°C herrscht bereits während der Schädigung ein Gleichgewicht zwischen Schadensentstehung und Reparatur, es ist somit nicht möglich, die besonders schnell reparierten Schäden zu detektieren. Schädigt man bei 0°C, so ist die Reparatur der Zellen während der Schädigung weitestgehend unterbunden, und man hat die Möglichkeit, auch die Reparatur solcher Schäden zu vermessen. Es besteht die Theorie, dass diese beiden „Arten“ von Einzelstrangbruchreparatur sich unterscheiden.

##### 2.2.5.3.1 Schädigung adhärenenter Zellen bei 37°C

Zur Schädigung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 37°C werden adhärenente Zellen zweimal mit warmem PBSCMF gewaschen und dann 5,0 ml warmes, serumfreies Medium pro kleine Zellkulturflasche zugegeben. Nun wird eine auf Eis gehaltene wässrige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Verdünnung entsprechend der gewünschten Endkonzentration zupipettiert und gut umgeschüttelt. Die Zellen werden nun zur Schädigung für 15 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wird die Reaktion mit Katalase abgestoppt, die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Medium-Mischung entnommen und erneut zweimal mit PBSCMF gewaschen. Zur Bestimmung der Suszeptibilität bzw. entsprechender Reparaturwerte wird direkt abtrypsinisiert oder warmes Medium zugegeben, wie bereits in 2.2.5.1 und 2.2.5.2 beschrieben.

---

### 2.2.5.3.2 Schädigung von Zellen in Suspension bei 0°C

Zur Schädigung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 0°C werden Zellen abtrypsiniert, in warmem Vollmedium wieder aufgenommen und in ein Greiner-Röhrchen überführt. Dieses verbleibt für fünf Minuten im Brutschrank zur Regeneration der Zellen. Nun werden die Zellen zentrifugiert (1100 rcf, 4°C, 3min), mit PBSCMF gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wird nun in kaltem serumfreiem Medium resuspendiert, die Zellzahl mittels Coulter-Counter bestimmt und eine Konzentration der Zellsuspension von 2\*10<sup>6</sup> Zellen/ml eingestellt. Bereits während der Zentrifugation werden entsprechende Verdünnungen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Katalase hergestellt und auf Eis gelagert. Die eigentliche Schädigung erfolgt in Greiner-Röhrchen, welche in einem Wasser-Eis-Gemisch gehalten werden. Pro Röhrchen (pro Ansatz) wird 1 ml der Zellsuspension mit 50 µl einer entsprechenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Verdünnung versetzt, wobei die Zugabe zeitversetzt entsprechend der Reparaturzeiten erfolgt. Nun wird 15 min schüttelnd inkubiert und die Schädigung im Anschluss durch Zugabe von Katalase (315 U/ml) gestoppt. Die Reparatur erfolgt nun durch Zugabe von warmem Medium und Lagern der Röhrchen im Wasserbad bei 37°C. Der 0h-Wert wird mit kaltem Medium versetzt und alle Ansätze so schnell wie möglich auf die Alkalische Elution aufgetragen.

## 2.2.6 Mutationstest

### 2.2.6.1 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. Hierfür wurde das hemizygoten *HPRT*-Gen auf dem X-Chromosom deletiert und stattdessen mit Hilfe eines Plasmids eine Kopie der *gpt*-Sequenz in ein Autosom insertiert. Das *gpt*-Gen codiert, ebenso wie *HPRT*, für eine Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT), einem Enzym des Salvage-Pathway. Neben seiner physiologischen Funktion kann die HGPRT das Purinanalogon 6-Thioguanin (6-TG) toxifizieren, nämlich zu 6-Thioguanosin-monophosphat verstoffwechseln, was zu einer starken Behinderung der RNA-Synthese und damit der Proteinbiosynthese führt. Durch Zugabe von 6-TG zum Kulturmedium werden somit alle Zellen abgetötet, die ein intaktes *gpt*-Gen besitzen. Dadurch ist es möglich solche Zellen zu selektieren, die entweder spontan oder durch Behandlung mit einem Mutagen eine Mutation und einen daraus folgenden Funktionsverlust im *gpt*-Gen erlitten haben.

Um vor Versuchsbeginn die Zellpopulation von bereits mutierten Zellen zu befreien, kann durch die Zugabe des Folsäure-Antagonisten Aminopterin die *De-novo*-Synthese von Nukleinsäuren blockiert werden. Dadurch sterben alle *gpt*-Mutanten ab, da sie den Ausfall der *De-novo*-Synthese nicht über



den alternativen Salvage-Pathway kompensieren können (Tindall and Stankowski, 1989; Tindall et al., 1984; Tindall et al., 1986).

### 2.2.6.2 Bestimmung spontaner Mutationsraten

Vor Versuchsbeginn werden die AS52-Zellen durch Kultivierung in MPA-Cleansing-Medium für 5 Tage von bereits vorhandenen Mutanten befreit. Im Anschluss werden die Zellen in verschiedenen Ansätzen unter permanenter Zugabe der jeweiligen Testsubstanzen (Na-Butyrat, Na-Valproat, Trichostatin A und Resveratrol) über längere Zeit unter exponentiellen Wachstumsbedingungen kultiviert. Die verwendeten Konzentrationen der Testsubstanzen wurden dementsprechend gewählt. In regelmäßigen Abständen (1 Mal pro Woche) wird die Anzahl der spontan entstandenen *gpt*-Mutanten bestimmt (Glaab and Tindall, 1997). Diese werden in Korrelation gebracht mit der über die beim Passagieren bestimmten Zellzahl errechneten Generation der Zellen.

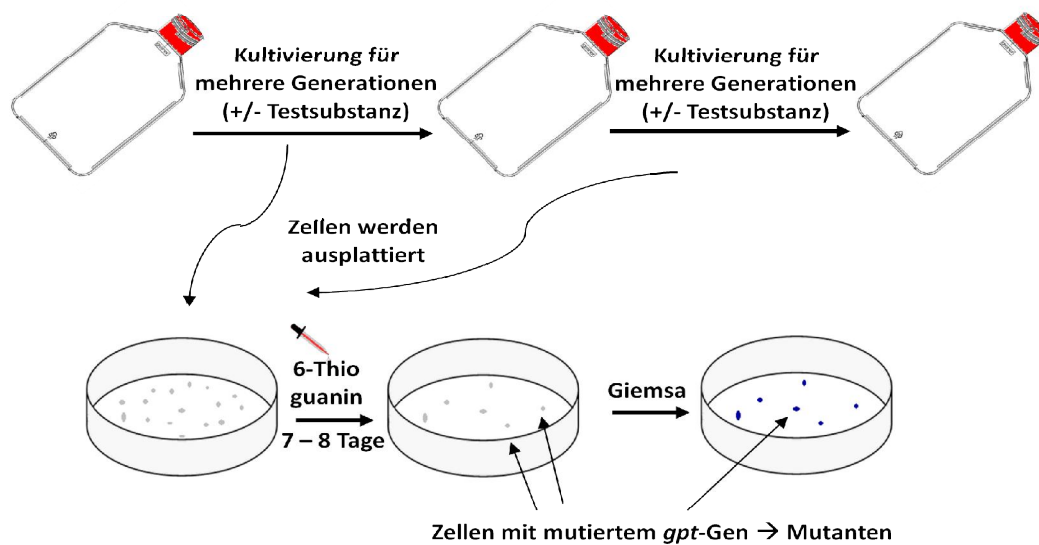


Abbildung 2.3: Versuchsaufbau zur Bestimmung spontaner Mutationsraten

Zur Bestimmung der Anzahl der Mutanten werden pro Ansatz drei kleine Zellkulturplatten mit jeweils 200 Zellen zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit und fünf mittlere Zellkulturplatten mit  $10^6$  Zellen zur Bestimmung der Mutantenzahl ausgestreut. Zu den Mutantenplatten wird 6-TG zugegeben. Nach 7 – 8 Tagen im Brutschrank, werden die Platten mit NaCl gewaschen, die Zellkolonien mit Methanol fixiert, mit Giemsa-Lösung gefärbt und im Anschluss ausgezählt.

### 2.2.6.3 Bestimmung induzierter Mutationsraten

Ebenso wie für die Bestimmung spontaner Mutationsraten werden auch hier AS52-Zellen für 5 Tage in MPA-Cleansing-Medium kultiviert. Im Anschluss werden sie für 2 – 3 weitere Tage auf Recovery-Medium gehalten und dann der eigentliche Versuch gestartet. Hierfür werden pro Ansatz  $0,75 \cdot 10^6$  Zellen auf Zellkulturplatten ausgestreut und über 24h anwachsen gelassen. Nun wird die entsprechende Testsubstanz für 24-stündige Inkubation zugegeben. Im Anschluss daran wird das Medium abgenommen, zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen und 10,0 ml kaltes PBS zugegeben. So werden die Zellen mit geöffnetem Deckel in einem Meter Abstand unter der UV-B Lampe bestrahlt ( $60\text{sec} = 21,6 \text{ J/m}^2$ ;  $120\text{sec} = 43,2 \text{ J/m}^2$ ;  $180\text{sec} = 64,8 \text{ J/m}^2$ ), um DNA-Schäden bzw. daraus entstehende Mutationen zu induzieren. Die jeweiligen Kontrollzellen werden nicht bestrahlt. Nach der Bestrahlung wird das PBS abgenommen und frisches warmes Medium zugegeben. Die Zellen werden nun bis zum sogenannten „1. Splitten“, welches 48h nach Bestrahlung stattfindet, im Brutschrank inkubiert. Je nach Ansatz wird für diese 48h erneut die jeweilige Testsubstanz zugegeben oder nicht.

Beim „1. Splitten“ werden die Zellen von den Zellkulturplatten abtrypsinisiert, gezählt und genau eine Million pro Ansatz wieder neu ausgestreut. Diese werden weiterkultiviert bis zum „2. Splitten“ nach weiteren 96h, bei dem erneut eine Million Zellen pro Ansatz für 72h weiterkultiviert werden. Nun werden die Zellen abtrypsinisiert und pro Ansatz drei kleine Zellkulturplatten mit jeweils 200 Zellen zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit und fünf mittlere Zellkulturplatten mit jeweils 200000 Zellen zur Bestimmung der induzierten Mutationen ausgestreut. Die Platten werden, wie in 2.2.6.2, nach 7 – 8 Tagen mit Giemsa angefärbt und ausgezählt.

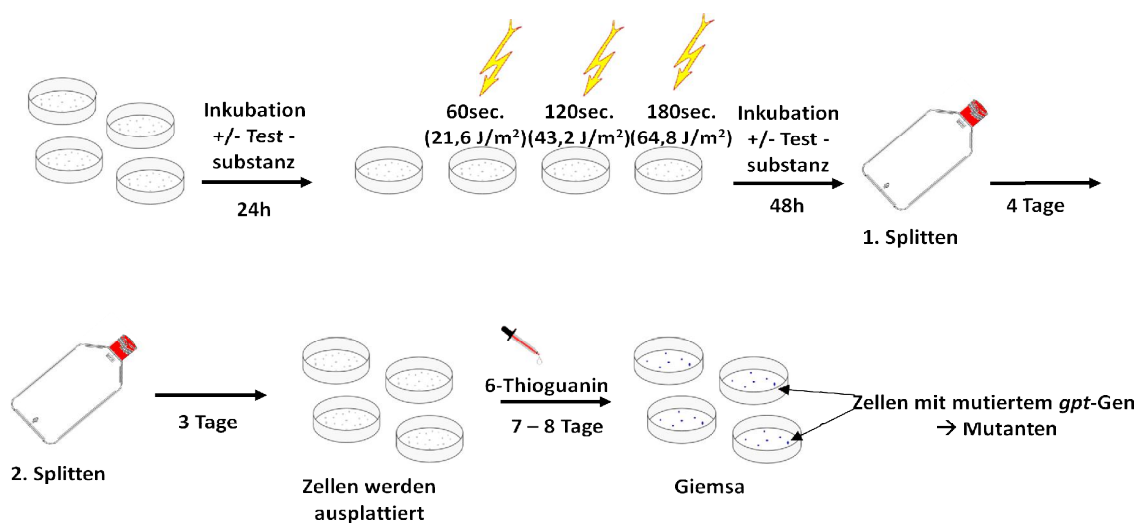


Abbildung 2.4: Versuchsaufbau zur Bestimmung induzierter Mutationsraten

## 2.2.7 Gehaltsbestimmung Glutathion

### 2.2.7.1 Prinzip

Zur Bestimmung des Gesamt-Glutathiongehalts, bestehend aus der reduzierten Form GSH und der oxidierten Form GSSG, wird die Methode nach Griffith ((Griffith and Meister, 1985) angewandt. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass Thiolgruppen wie z.B. GSH durch 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellmann's Reagenz) unter Bildung von 5'-Thio-(2-nitrobenzoesäure) (TNB) zum Disulfid (GSSG) oxidiert werden (s. a)). Das GSSG wird dann wiederum durch die ebenfalls im Reaktionsgemisch anwesende Glutathion-Reduktase unter NADPH/H<sup>+</sup>-Verbrauch wieder zum GSH reduziert (s. b)). Der Kreislauf kann nun von Neuem beginnen. Die Konzentration der an der Reaktion beteiligten Substanzen DTNB, NADPH/H<sup>+</sup> und Glutathion-Reduktase sind so gewählt, dass die Geschwindigkeit der gesamten Reaktion (s. c)) proportional zur Konzentration des gesamten GSH-Gehalts abläuft. Die Absorption des sich bildenden TNB wird spektralphotometrisch bei 412 nm über die Zeit vermessen.



### 2.2.7.2 Durchführung

Zur Bestimmung der GSH-Spiegel in adhärenenten Zellen werden diese abtrypsinisiert und in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Nach Zentrifugation (4°C, 1200 U/min, 8min) wird das Zellpellet mit 5 ml kaltem PBSCMF gewaschen und erneut zentrifugiert (4°C, 1200 U/min, 8min). Das nun erhaltene Pellet wird in genau 5,0 ml kaltem PBSCMF gründlich resuspendiert und hieraus 200 µl zur Bestimmung der Zellzahl im Coulter-Counter entnommen. Die verbliebene Zellsuspension wird ein drittes Mal zentrifugiert (4°C, 1200 U/min, 8min) und der Überstand sorgfältig abpipettiert. Aufgrund der zuvor bestimmten Zellzahl werden die Zellen nun in einer Konzentration von 1 Mio/ml in TCA-Puffer aufgenommen, in ein 1,5 ml Cap überführt und von nun an auf Eis gehalten.

Zur Herstellung eines Proteinextrakts wird die TCA-Zellsuspension sonifiziert. Hierbei werden die Zellwände mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators (3x20 Impulse, 10kHz, 35W) zerstört und zelluläre Proteine können in Lösung gehen. Im Anschluss werden die entstandenen Zellfragmente abzentrifugiert (4°C, 12000 U/min, 10min) und der Überstand für die folgende photometrische

---

Bestimmung in ein frisches Cap überführt. Hierfür werden in eine Einmalküvette die folgenden Reaktionsbestandteile in angegebener Reihenfolge pipettiert:

700µl	PP/NADPH-Puffer
160µl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub> (200µl – Probeµl)
40µl	Probe
100µl	DTNB-Lösung
4µl	Glutathion-Reduktase

Nach Zugabe der Glutathion-Reduktase wird die Probe umgehend vermessen, da hiermit die in Abschnitt 2.2.7.1 beschriebene, der Bestimmung zu Grunde liegende, chemische Reaktion stattfindet. Die photometrische Messung bei 412 nm erfolgt alle 30 Sekunden über einen Zeitraum von 2 Minuten. Analog wird für jeden Versuch eine Kalibriergerade mit frisch hergestellter GSH-Standardlösung erstellt. Die GSH-Standardlösung ist 0,1 mM in Phosphat / EDTA-Puffer und wird in den Volumina 5, 10, 20, 30, 40 und 80 µl anstatt der Probe zum Reaktionsgemisch gegeben. Die Menge an H<sub>2</sub>O wird entsprechend angepasst.

## 2.2.8 Proteinbestimmung

### 2.2.8.1 Prinzip

Die Bestimmung des Proteingehalts von Zellextrakten wurde photometrisch mittels BioRad-Farbreagenz durchgeführt. Hierbei bindet Coomassie-Brilliant Blau G-250 an Proteine, wobei eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm nach 595 nm erfolgt und somit eine photometrische Gehaltsbestimmung möglich ist. Zur Kalibrierung wird Rinderserumalbumin verwendet.

### 2.2.8.2 Durchführung

Zur Bestimmung des Proteingehalts werden Zellen entsprechend behandelt (z.B. mit Resveratrol für 24h) und im Anschluss ein Zellextrakt hergestellt. Hierfür werden die Zellen abtrypsiniert, gezählt und zweimal mit PBSCMF gewaschen. Das nun erhaltene Zellpellet wird in 200 µl Lysepuffer MIT Salz (+ Proteinaseinhibitoren) aufgenommen. Nun werden die Zellen sonifiziert (2\*6 sec.) und in der Ultrazentrifuge zentrifugiert (50000 rpm, 45 min., 4°C). Der erhaltene Überstand wird nun für die photometrische Proteinbestimmung verwendet. Hierfür werden 2 µl der Probe mit 798 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> und 200 µl BIORAD-Farbreagenz versetzt und 15 Minuten im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wird die Probe photometrisch vermessen. Parallel erfolgt die Erstellung der Kalibriergeraden mit einer BSA-Stammlösung (1 mg / ml). Von dieser werden 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15 und 18 µl sowie jeweils 2 µl des Lysepuffers zum Reaktionsgemisch pipettiert. Die Menge an H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> wird dementsprechend angepasst (Gesamtvolumen der Reaktion 1000 µl).

## 2.2.9 Zellzyklusbestimmung

### 2.2.9.1 Prinzip

Zur Zellzyklusbestimmung wird der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid verwendet, der in die DNA fixierter Zellen interkalieren kann. Bei der anschließenden durchflusszytometrischen Messung werden die Zellen nach ihrem DNA-Gehalt aufgetrennt. So lassen sich die einzelnen Zellzyklusphasen (G1: einfacher Chromosomensatz, G2/M: doppelter Chromosomensatz, S: zwischen G1 und G2/M) unterscheiden und aufgrund der Anzahl der Zellen pro DNA-Menge die Zellzyklusverteilung der Zellpopulation bestimmen (s. auch Abbildung 2.5).

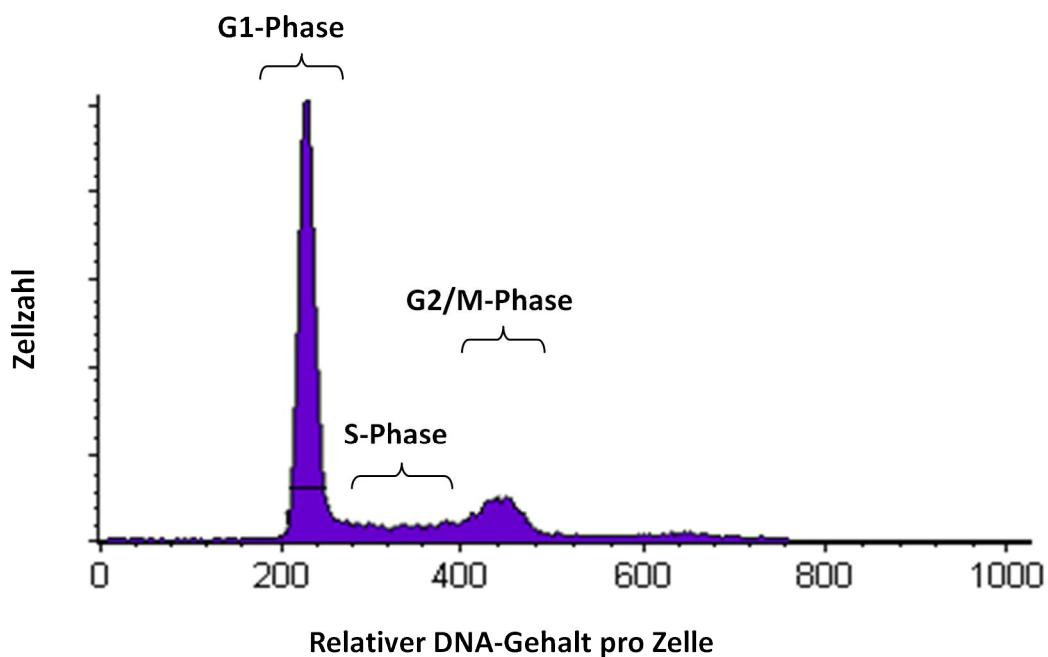


Abbildung 2.5: Graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Messung zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung mit Propidiumiodid

### 2.2.9.2 Durchführung

Für die Zellzyklusbestimmung mittels Durchflusszytometer wird eine entsprechende Menge Zellen ausgestreut und am nächsten Tag, nach Anwachsen der Zellen, die jeweilige Testsubstanz für 24-stündige Inkubation zugegeben. Im Anschluss werden die Zellen mit Trypsin abgelöst und im Coulter-Counter gezählt. Vier bis fünf Millionen Zellen werden der Zellsuspension entnommen und drei Minuten bei 4°C und 1100 rcf zentrifugiert. Nun wird zweimal mit PBSCMF gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 100 µl PBSCMF resuspendiert und dann unter Schütteln (auf dem Vortexer) 1000 µl 95 %iger eiskalter Ethanol zugetropft. Die so fixierten Zellen werden nun bei -20°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Hierfür wird erneut zweimal mit PBSCMF gewaschen und die Zellen dann in PBSCMF + 50 µg/ml Propidiumiodid + 10 µg/ml RNase resuspendiert und 30min bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nun können die Zellen im Durchflusszytometer vermessen werden.

---

## 2.2.10 Western-Blot

### 2.2.10.1 Prinzip

Der Western- Blot bietet die Möglichkeit, die Expression von Proteinen eines Gesamtproteinextraktes spezifisch nachzuweisen. Die Proteine eines solchen Zellextraktes werden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt. Die so separierten Proteine werden nun durch Anlegen einer Spannung auf eine Membran „geblottet“, wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten bleibt. Die Proteine haften auf der Membran mittels hydrophober Wechselwirkungen und können nun durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden.

### 2.2.10.2 Durchführung

#### 2.2.10.2.1 Herstellung der Zellextrakte

Entsprechend behandelte adhärenente Zellen werden zweimal mit PBSCMF (RT) gewaschen und anschließend 15 min auf Eis mit RIPA-Puffer (+ PMSF) schüttelnd inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen mit einem Zellschaber abgekratzt und die Zellsuspension in ein Cap überführt. Es wird erneut mit RIPA-Puffer gewaschen, dieser mit der Zellsuspension vereinigt und 30 – 60 min auf Eis inkubiert. Es folgt Zentrifugation (10 min, 10000g, 4°C) und anschließende Proteinbestimmung mittels Bradford-Reagenz (s. 2.2.8). Der Rest des Überstandes wird unter Zugabe eines Proteinaseinhibitors aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### 2.2.10.2.2 SDS-PAGE und Protein-Blotting

Der Zellextrakt wird nun in einem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Zunächst durchlaufen die Proben ein Sammelgel, in dem sie zu einer konzentrierten, diskreten Bande verdichtet werden, um im folgenden 10 %igen Trenngel nach Proteingröße aufgetrennt zu werden. Um nun die Proteine vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran zu übertragen, werden beide zusammen mit zwei Faser-Pads und zwei Filterpapieren, welche zuvor in Transferpuffer eingelegt waren, in eine entsprechende Transferkammer eingelegt. Auch das Gel und die Membran werden zuvor in Transferpuffer getränkt. Nun wird alles blasenfrei in Transferpuffer in folgender Reihenfolge übereinandergeschichtet: Faser-Pad – Filterpapier – Membran – Gel – Filterpapier – Faser-Pad (s. auch Abbildung 2.6). Beim Einsetzen in die Transferkammer ist darauf zu achten, dass die Membran der Anode zugewandt ist. Die Kammer wird mit kaltem Transferpuffer gefüllt und der Blot unter Anlegen einer Spannung von 20 V für eine Stunde gestartet. Im Anschluss wird die Membran entnommen und kann zur Kontrolle eines erfolgreichen Transfers mit Ponceau S Lösung angefärbt

werden. Auch das Gel kann angefärbt werden mit Coomassie Brilliant Blue, um sicherzugehen, dass alle Proteine aus dem Gel entfernt wurden.

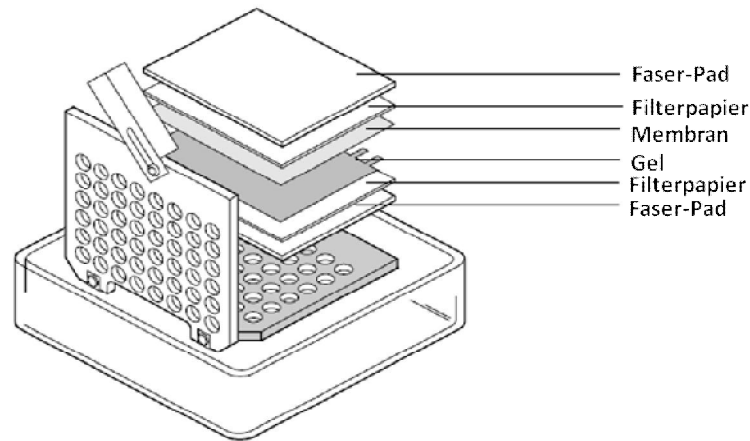


Abbildung 2.6: Anordnung zum Blotten der Membran; aus: Mini Trans-Blot Instruction Manual; Bio-Rad, USA

#### 2.2.10.2.3 Inkubation mit Antikörpern

Um zunächst freie Bindungsstellen zu blockieren, wird die Membran eine Stunde mit 5 %iger Milchpulverlösung inkubiert. Eine unspezifische Bindung des Antikörpers wird so verhindert. Nach Waschen mit 0,1 %iger TBST-Lösung erfolgt die Inkubation des 1. Antikörpers in 1 %iger Milchpulverlösung bei 4°C unter Schütteln über Nacht. Im Anschluss wird erneut mehrmals mit 0,1 %iger TBST gewaschen und nun der 2. Antikörper für eine 1 – 2stündige Inkubation bei Raumtemperatur zugegeben (in 1 %iger Milchpulverlg.). Danach wird nochmals dreimal mit 0,1 % TBST gewaschen, bevor die Entwicklung der Membran erfolgt.

#### 2.2.10.2.4 Immundetektion

Die Detektion erfolgt auf dem Prinzip einer Antigen – Antikörper – Bindung. Der 1. Antikörper bindet spezifisch an das zu untersuchende Protein, während der 2. Antikörper gegen die Fc-Region des ersten gerichtet ist. Der 2. Antikörper ist zudem mit horse-raddish-peroxidase (HRP) gelabelt, worüber die Detektion stattfindet. Die nun folgenden Schritte werden in einer Dunkelkammer durchgeführt. Zunächst wird die Membran dem TBST-Puffer entnommen und eine Minute mit dem Lumineszenz-Reagenz gemäß den Angaben des Herstellers inkubiert. Im Anschluss wird die Membran blasenfrei in Klarsichtfolie eingepackt, zusammen mit Kodak-Blottingfilm in einer Autoradiographiekassette fixiert und diese fest verschlossen. Die Belichtung des Blottingfilms erfolgt nun mittels Chemilumineszenz, welche resultiert aus der durch HRP katalysierten Umsetzung von Luminol (im Lumineszenz-Reagenz enthalten) zu seiner oxidierten Form. Die Belichtungszeit beträgt 10 s – 30 min, die genaue Zeit ist abhängig von der Bindung des 2. Antikörpers und muss

---

experimentell ermittelt werden. Im Anschluss wird der Blottingfilm entnommen, zunächst in Entwickler, dann in Fixierer eingelegt und am Ende in Wasser gewaschen. Die Membran kann wieder in 0,1 % TBST eingelegt werden und so für evtl. weitere Antikörperinkubation aufbewahrt werden.

## 2.2.11 Bestimmung der globalen DNA-Zugänglichkeit in Chromatin mittels enzymatischer Hydrolyse mit DNaseI

### 2.2.11.1 Prinzip

Die Methode bietet die Möglichkeit, indirekt den Kondensationsgrad chromosomaler DNA zu bestimmen. Hierbei wird die unterschiedliche Zugänglichkeit der DNA für die verwendete Endonuclease DNase I ausgenutzt. Kondensiertes Chromatin, welches dicht gepackt ist, weist eine deutlich schlechtere Zugänglichkeit auf als dekondensiertes Chromatin. In Abhängigkeit davon kann die DNase unterschiedlich stark in die DNA einschneiden, es entstehen Bruchstücke mit unterschiedlicher Größenverteilung, welche im Agarosegel aufgetrennt werden können. So lassen sich im direkten Vergleich Unterschiede im Kondensationsgrad verschiedener Proben nachweisen.

### 2.2.11.2 Durchführung

Entsprechend behandelte adhärente Zellen werden durch Zugabe von 36 %igem Formaldehyd (25 ml Medium + 0,714 ml 36 %iges Formaldehyd) 17 min auf dem Schüttler bei Raumtemperatur fixiert. Im Anschluss wird überschüssiges Formaldehyd durch Zugabe einer 1 M Glycin-Lösung abgefangen und so der Fixierungsprozess gestoppt. Die nun fixierten Zellen werden mit 20 ml eiskaltem PBSCMF/0,5 mM PMSF gewaschen und anschließend in 10 ml PBSCMF / 0,5 mM PMSF mit einem Zellschaber abgekratzt. Die Zellsuspension wird in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt, die Zellkulturflasche mit weiteren 10 ml PBSCMF / 0,5 mM PMSF ausgespült und die vereinigte Zellsuspension bei 1800 RPM und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wird der Überstand abgenommen, das Zellpellet in 5 ml Sucrosepuffer A resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden nun mittels Dounce Homogenisator („Tight“, ca. 20 mal Auf- und Abbewegen) aufgeschlossen und das Chromatin durch Zentrifugation mit einem 1step Sucrosedichtegradienten von Kernmembran, anhaftenden Organellen und weiteren Zellfragmenten getrennt. Hierfür wird in ein 15 ml Greiner-Röhrchen 5 ml Sucrosepuffer B gegeben und mit dem Homogenisat vorsichtig überschichtet. Die Zentrifugation erfolgt bei 3000 RPM und 4°C für 15 Minuten. Im Anschluss wird der Überstand abgenommen und das Chromatin in zunächst 1 ml, dann in weiteren 9 ml NUC-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (2300 RPM, 4°C, 5min) wird der Überstand sorgfältig abgenommen und das Chromatin in 400 µl NUC-Puffer aufgenommen. Für die anschließende photometrische DNA-Mengenbestimmung ( $OD_{260}$  und  $OD_{280}$ ) werden direkt 10 µl entnommen und mit 790 µl 1N NaOH verdünnt (1:80). Je nach DNA-Gehalt wird die Chromatinsuspension so aliquotiert, dass sich jeweils



---

ca 10 OD<sub>260</sub>-Einheiten in einem Aliquot befinden. Die Proben können nun direkt weiterverarbeitet werden oder bei -80°C gelagert werden.

Für den Verdau des Chromatins mit DNase I werden die Aliquote zunächst mit NUC-Puffer auf ein einheitliches Volumen (200 µl) gebracht, hiervon pro Ansatz 20 µl entnommen und auf Eis gelagert. Die Verdünnungen der DNase I erfolgen mit NUC-Puffer + Ca/Mg/RNase. Von diesen werden 20 µl zu den 20 µl Chromatinsuspension gegeben und die Enzymreaktion bei 37°C im Wasserbad gestartet. Nach 30 minütiger Inkubationszeit wird die Reaktion durch Zugabe von 40 µl Nuclease-Stopp-Puffer (NSB 2x) gestoppt und die Proben nun bei 65°C im Wasserbad über Nacht inkubiert. Im Anschluss werden die Proben mit jeweils 20 µl 6x Ladepuffer versetzt und im 1,2 %igen Agarosegel bei 90V (ca. 70min) aufgetrennt. Die Auswertung erfolgt nach Färbung mit Ethidiumbromid mittels GelDoc und Molecular Analyst Software.

### 2.2.12 Statistische Auswertung

Der Vergleich zwischen zwei Mittelwerten wurde mit Hilfe des Student's T-Test durchgeführt. Die Analyse erfolgte jeweils mit einem ungepaarten, zweiseitigen Test mit einer Welch-Korrektur für die Annahme von ungleichen Varianzen.

Es wurden folgende Stufen der Signifikanz verwendet:

- |       |             |                              |
|-------|-------------|------------------------------|
| (*)   | $p < 0,05$  | statistisch signifikant      |
| (**)  | $p < 0,01$  | statistisch sehr signifikant |
| (***) | $p < 0,001$ | statistisch hoch signifikant |

### 3 Ergebnisse

Der Einfluss des Kondensationsgrades der Chromatinstruktur auf die Entstehung und Reparatur von DNA-Schäden ist bis heute nicht geklärt und sollte in der vorliegenden Arbeit näher untersucht werden. Die zugrunde liegende Hypothese beruht auf der unterschiedlichen Zugänglichkeit der im Chromatin verpackten DNA in Abhängigkeit des Kondensationsgrades. So ist zu erwarten, dass eine offene, dekondensierte und somit gut zugängliche Chromatinstruktur einerseits eine erhöhte Schadensinduktion, andererseits aber auch eine verbesserte Reparatur zur Folge hat. Im Umkehrschluss könnte eine kompakte, kondensierte und schlecht zugängliche Chromatinstruktur zu einem erniedrigten Schadensausmaß und einer verschlechterten Reparatur führen.

Um die Chromatinstruktur in Zellen zu modifizieren, wurden zum einen HDAC-Inhibitoren (Natriumbutyrat, Trichostatin A) verwendet, die über eine verminderte Histondeacetylierung ein hyperacetyliertes, dekondensiertes und somit offenes Chromatin erzeugen. Zum anderen wurde Resveratrol verwendet, welches über eine SIRT1-Aktivierung zu verstärkter Deacetylierung und einem somit kondensierten und kompakten Chromatin führt. Im folgenden Abschnitt sollen nun zunächst die Effekte einer Resveratrolbehandlung gezeigt werden.

#### 3.1 Resveratrol

##### 3.1.1 Bestimmung der globalen DNA-Zugänglichkeit unter Einfluss von Resveratrol

Zu Beginn wurde der Einfluss einer 24-stündigen Inkubation mit Resveratrol auf die globale DNA-Zugänglichkeit untersucht. Eine Chromatinkondensation unter diesen Bedingungen wurde bereits in HeLa-Zellen nachgewiesen (Anderhub, 2008) und sollte nun auch für die hier verwendeten AS52-Zellen, eine Ovarienzelllinie des chinesischen Hamsters (s.a. 2.1.6.1), bestätigt werden.

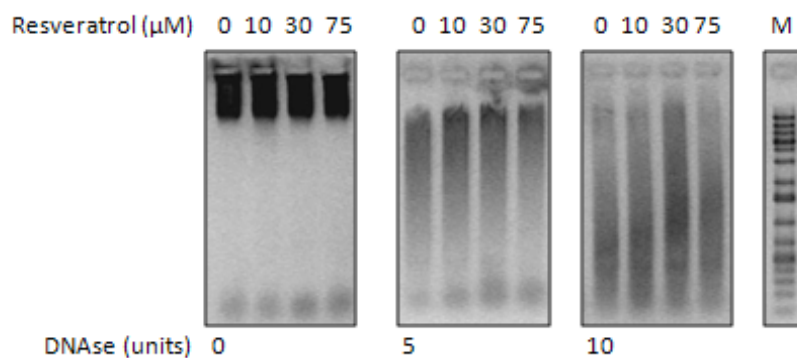


Abbildung 3.1: Globale DNA-Zugänglichkeit unter Einfluss von Resveratrol Zur Analyse der DNA-Zugänglichkeit wurden AS52-Zellen für 24h mit Resveratrol behandelt und im Anschluss wie in 2.2.11.2 beschrieben aufgearbeitet. Die DNase-katalysierte Hydrolyse des Chromatins erfolgte mit den jeweiligen Enzymaktivitäten für 30 min bei 37°C. Zur Auswertung wurden die Proben im 1,2 %igen Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht.

Wie in Abbildung 3.1 zu sehen ist, führt eine 24-stündige Inkubation mit Resveratrol konzentrationsabhängig zu einer schlechteren Zugänglichkeit der DNA für DNase I, also einer Kondensation des Chromatins. Im Gelbild lässt sich dies erkennen anhand der DNA-Verteilung der einzelnen Banden. In der unbehandelten Kontrolle läuft die DNA weit nach unten, sie wurde von der DNase folglich in viele kleine Bruchstücke geschnitten. Mit zunehmender Resveratrolkonzentration läuft die DNA weiter oben im Gel, wurde also von der DNase aufgrund schlechterer Zugänglichkeit deutlich weniger geschnitten als in der unbehandelten Kontrolle. Besonders deutlich ist dies nach enzymatischer Hydrolyse mit 5U DNase zu erkennen.

### 3.1.2 Bestimmung der Proliferation unter Einfluss von Resveratrol in AS52-Zellen

Um einen geeigneten Konzentrationsbereich für die Behandlung mit Resveratrol zu ermitteln, wurden zunächst Proliferationsversuche in AS52-Zellen durchgeführt. Da ein Effekt hin zu einer kondensierten Chromatinstruktur erst nach 24-stündiger Resveratrolinkubation zu beobachten ist (Anderhub, 2008), wurde Resveratrol auch für die Proliferationsversuche für 24h inkubiert und die Zellen im Anschluss für weitere 48h mit frischem Vollmedium weiterwachsen gelassen (s. 2.2.2). Die reinen Wachstumskurven zeigen (Abbildung 3.2), dass bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Resveratrol keine Beeinflussung der Proliferation im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen auftritt. Ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  Resveratrol wachsen die Zellen sichtlich langsamer, zumindest während der 24-stündigen Inkubationszeit. Nachdem Resveratrol gewegewaschen und in reinem Vollmedium weiterkultiviert wurde, wachsen die Zellen wieder annähernd normal weiter.

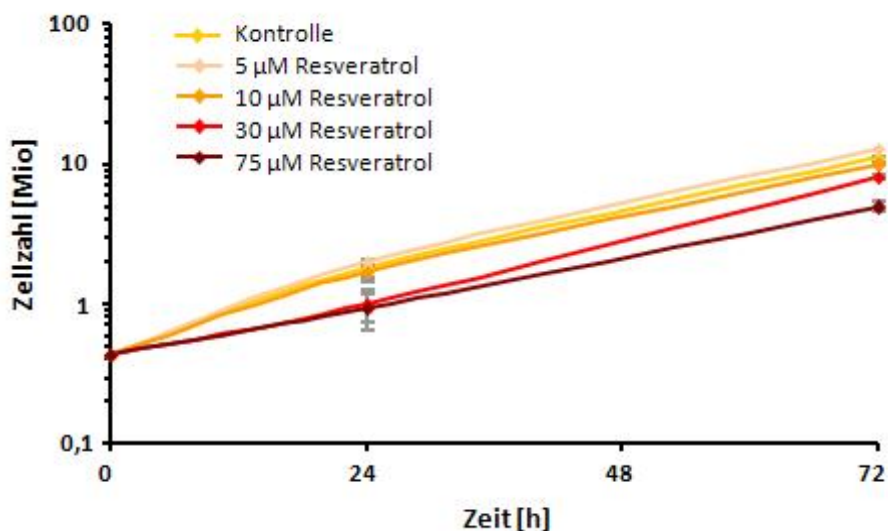


Abbildung 3.2: Proliferation von AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol Zur Bestimmung der Proliferation wurden  $0,35 \cdot 10^6$  Zellen ausgestreut, nach 24h erfolgte die Zugabe der angegebenen Resveratrolkonzentrationen für eine 24-stündige Inkubationszeit. Im Anschluss daran wurde das zugegebene Resveratrol mit Phosphatpuffer (PBSCMF) gewegewaschen und die Zellen für die restliche Dauer (48h) des Versuchs in reinem Zellkulturmedium weiterkultiviert. Der Zeitpunkt „0“ entspricht der Resveratrolzugabe. Das verwendete Lösungsmittel für Resveratrol war Ethanol, welches nach Zugabe in einer Endkonzentration von 0,1% vorlag.  $n = 2$

Dies lässt sich auch anhand der Proliferationsfaktoren, den Quotienten aus der Zellzahl zu einem bestimmten Zeitpunkt und der Zellzahl zum Zeitpunkt „0“, sehr gut erkennen. Die Proliferationsfaktoren für den Zeitraum der Resveratrolinkubation (0-24h) (Abbildung 3.3) sind unter Zugabe von 30  $\mu\text{M}$  und 75  $\mu\text{M}$  Resveratrol deutlich verringert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Dahingegen zeigen sich die Proliferationsfaktoren für den Zeitraum nach der Resveratrolbehandlung (24-72h) (Abbildung 3.4) unverändert zur Kontrolle, im Fall von 30  $\mu\text{M}$  Resveratrol kommt es sogar zu einer leichten Stimulation der Proliferation. Die Zellen „erholen“ sich also im Anschluss an eine Behandlung mit Resveratrol und wachsen wieder normal weiter.

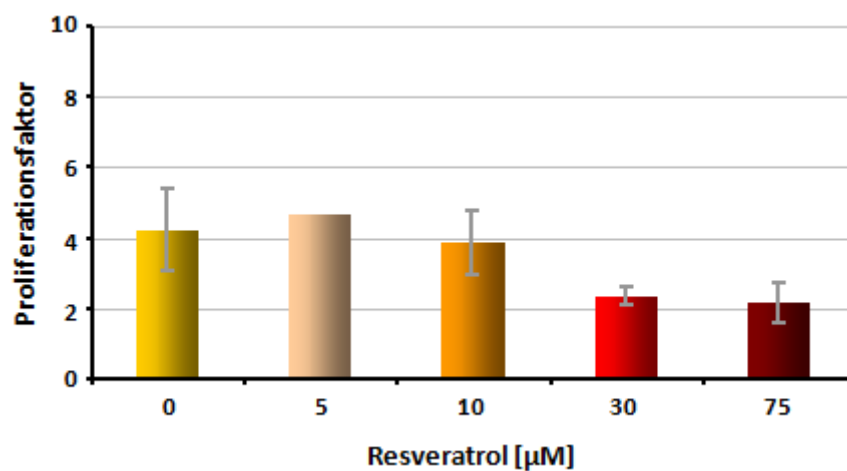


Abbildung 3.3: Proliferationsfaktoren für AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol Die Proliferationsfaktoren wurden berechnet durch Bildung des Quotienten aus den jeweiligen Zellzahlen zum Zeitpunkt 24h und den Zellzahlen zum Zeitpunkt 0h.

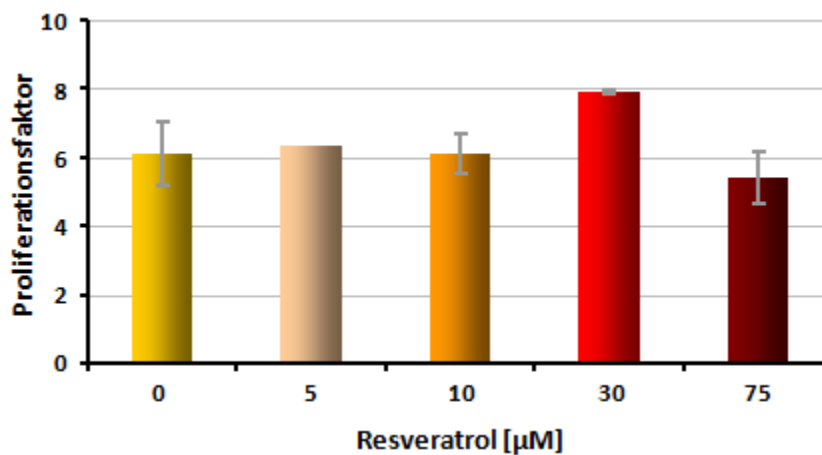


Abbildung 3.4: Proliferationsfaktoren für AS52-Zellen im Anschluss an eine Resveratrolbehandlung Die Proliferationsfaktoren wurden berechnet durch Bildung des Quotienten aus den jeweiligen Zellzahlen zum Zeitpunkt 72h und den Zellzahlen zum Zeitpunkt 24h.

### 3.1.3 Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit unter Einfluss von Resveratrol

Um die beobachtete Beeinflussung der Proliferation weiter zu charakterisieren, wurde zudem die Fähigkeit, nach Resveratrolinkubation Kolonien auszubilden, bestimmt, um eine eventuelle Toxizität der Substanz zu erkennen. Bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Resveratrol ist die Koloniebildungsfähigkeit von AS52-Zellen nahezu unbeeinflusst. Ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  Resveratrol zeigt sich bereits eine leichte Toxizität, die bei 75  $\mu\text{M}$  Resveratrol noch deutlich zunimmt und die relative Koloniebildungsfähigkeit auf ca. 0,4 senkt (s. Abbildung 3.5). Zum Teil könnte sich das beobachtete Ergebnis so erklären lassen, dass AS52-Zellen unter höheren Konzentrationen von Resveratrol deutlich kleinere Kolonien ausbilden (aufgrund der verminderten Proliferation (s. Abbildung 3.3)), welche bei der Entfernung des Resveratrols ebenfalls mit weggewaschen werden. Somit würden allein aufgrund dieses „Wascheffektes“ weniger Zellen zur Koloniebildung zur Verfügung stehen als in der unbehandelten Kontrolle. Dennoch scheint Resveratrol in diesem Versuchsmodell deutlich toxische Effekte mit zunehmender Konzentration aufzuweisen.

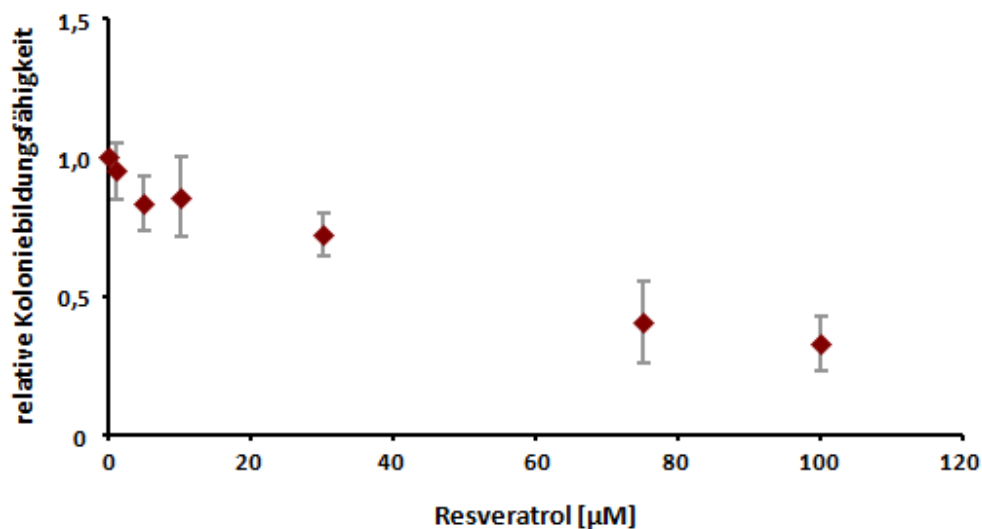


Abbildung 3.5: Koloniebildungsfähigkeit in AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol Zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit wurden 200 Zellen ausgestreut, nach 24h erfolgte die Zugabe von Resveratrol für eine 24-stündige Inkubationszeit. Im Anschluss daran wurde Resveratrol in PBSCMF weggewaschen und die Zellen in reinem Zellkulturmedium weiterkultiviert. Zur Bestimmung der relativen Koloniebildungsfähigkeit wurde die Zahl hochgewachsener Klone bezogen auf die Zahl an Klone in einer unbehandelten Kontrolle. Als Lösungsmittel für Resveratrol diente Ethanol, welches nach Zugabe in einer Endkonzentration von 0,1 % vorlag. n=3

### 3.1.4 Bestimmung der Zellzyklusverteilung unter Einfluss von Resveratrol

Wie bereits in 1.8.1 beschrieben kann Resveratrol abhängig vom Zelltyp zu unterschiedlicher Beeinflussung des Zellzyklus führen. Um zu sehen, wie sich dies in den verwendeten AS52-Zellen verhält, wurden die Zellzyklusphasen mittels Propidiumiodid durchflusszytometrisch bestimmt. Wie in Abbildung 3.6 deutlich zu sehen ist, zeigt eine 24-stündige Behandlung der Zellen mit 10  $\mu\text{M}$

Resveratrol keine Beeinflussung des Zellzyklus im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. In höherer Konzentration akkumulieren die Zellen zunehmend in der S-Phase, was einhergeht mit einer Abnahme von Zellen in der G1-Phase. Der Prozentsatz an Zellen in der G2/M-Phase bleibt nahezu unverändert.

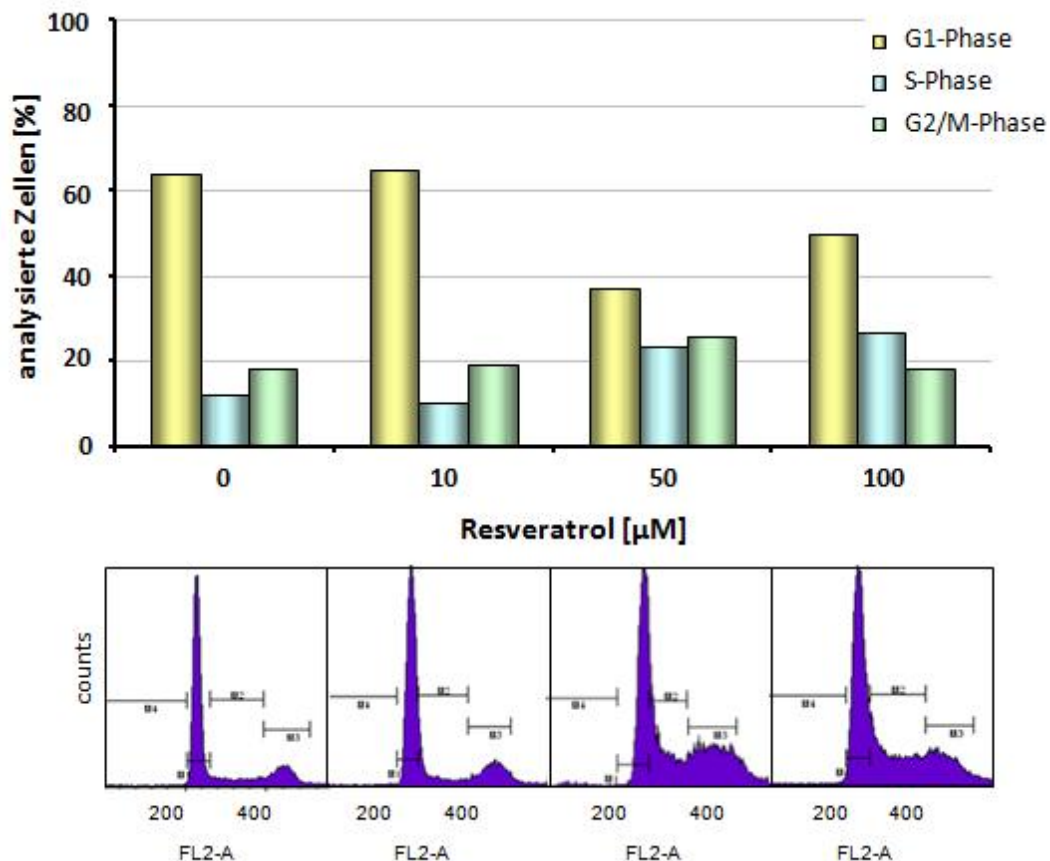


Abbildung 3.6: Zellzyklusverteilung in AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol Die Zellzyklusverteilung wurde durchflusszytometrisch mit Propidiumiodid nach 24-stündiger Resveratrolinkubation bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt die Verteilung der Zellzyklusphasen; apoptotische Zellen bzw. Zellen in G0 sind nicht mit aufgetragen. Das verwendete Lösungsmittel für Resveratrol war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1%. n=1-2

Für die folgenden Untersuchungen zur Induktion und Reparatur von DNA-Schäden wurde Resveratrol aufgrund der Vorversuche in den Konzentrationen 10 µM, 30 µM und 75 µM eingesetzt. Die höchste Konzentration zeigt zwar eine deutliche Beeinflussung der Proliferation und auch eine gewisse Toxizität, da der Kondensationseffekt auf die Chromatinstruktur allerdings erst ab einer Konzentration von 30 µM und mehr zu beobachten ist (s. Abbildung 3.1) wurde dennoch die Konzentration von 75 µM Resveratrol für die Induktions- und Reparaturversuche ausgewählt. Zudem wurden auch zwei Konzentrationen (10 µM und 30 µM) aus dem nicht-toxischen Bereich für einen Teil der Versuche verwendet.

### 3.1.5 Beeinflussung der Bildung und Reparatur oxidativer DNA-Schäden durch Resveratrol

Um eine Beeinflussung der Bildung und Reparatur oxidativer DNA-Schäden durch Resveratrol zu untersuchen, wurden AS52-Zellen mit Hilfe des Photosensibilisators Ro19-8022 und sichtbarem Licht geschädigt, wobei in erster Linie 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG) entsteht. Diese oxidative DNA-Modifikation wird über die Basenexzisionsreparatur prozessiert, deren Beeinflussung durch Resveratrol so beobachtet werden kann.

#### 3.1.5.1 Koloniebildungsfähigkeit von AS52-Zellen unter Einfluss von Ro19-8022

Um zunächst eine für AS52-Zellen nicht toxische und somit für die Schadensinduktion geeignete Ro19-8022-Konzentration zu ermitteln, wurde eine Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit durchgeführt. Bis zu einer Konzentration von 150 nM Ro19-8022 tritt keine nennenswerte Toxizität auf, erst in noch höherer Konzentration wird Ro19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht deutlich toxisch (Abbildung 3.7). Dies entspricht den Erfahrungswerten und ermöglicht, zur Schadensinduktion die Standardbedingungen von 50 nM Ro19-8022 für 10 min bei 0°C und Bestrahlung mit sichtbarem Licht zu verwenden.

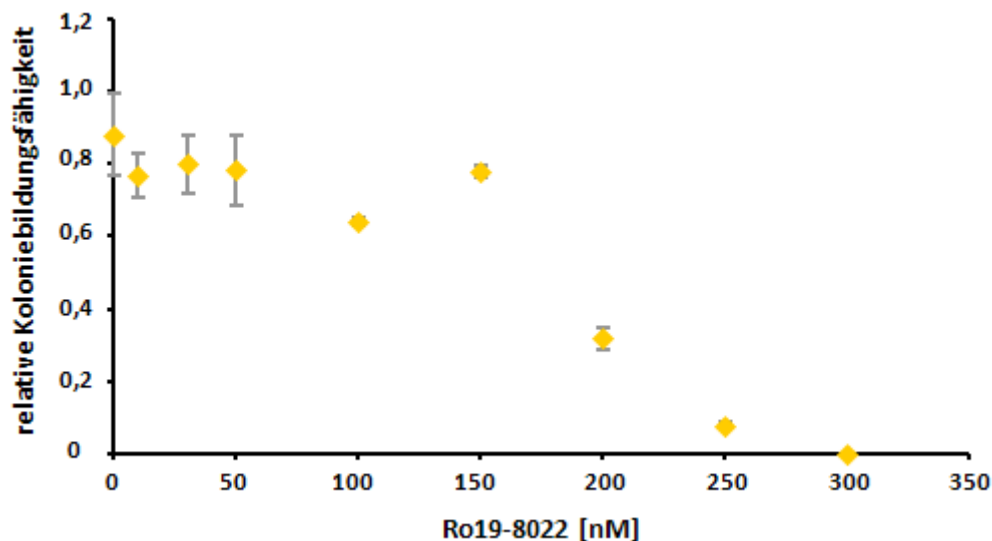


Abbildung 3.7: Koloniebildungsfähigkeit in AS52-Zellen unter Einfluss von Ro19-8022 Zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit wurden 200 Zellen ausgestreut und für 48h anwachsen gelassen. Im Anschluss erfolgte die Schädigung mit Ro19-8022 und Licht. Als Kontrolle wurde zusätzlich eine Probe in Phosphatpuffer (PBS) ohne Ro19-8022 mit Licht bestrahlt. Zur Bestimmung der relativen Koloniebildungsfähigkeit wurde die Anzahl hochgewachsener Klone bezogen auf die Anzahl an Klonen einer unbehandelten Kontrolle (ohne Ro19-8022 im Dunkeln). n=2

Um zusätzlich auf einen synergistischen Effekt von Ro19-8022 und Resveratrol zu prüfen, wurde auch für diese Bedingungen die Koloniebildungsfähigkeit bestimmt. Hier zeigt sich, dass Ro19-8022 + Licht in Kombination mit Resveratrol bis zu einer Konzentration von 100 nM keinen zusätzlichen toxischen Einfluss auf AS52-Zellen ausübt im Vergleich zur Resveratrolbehandlung (s. auch Abbildung 3.5)

alleine. Die Koloniebildungsfähigkeit bleibt nach Bestrahlung mit den verschiedenen Ro19-8022-Konzentrationen auf dem gleichen Niveau, das bereits die alleinige Behandlung mit Resveratrol aufweist.

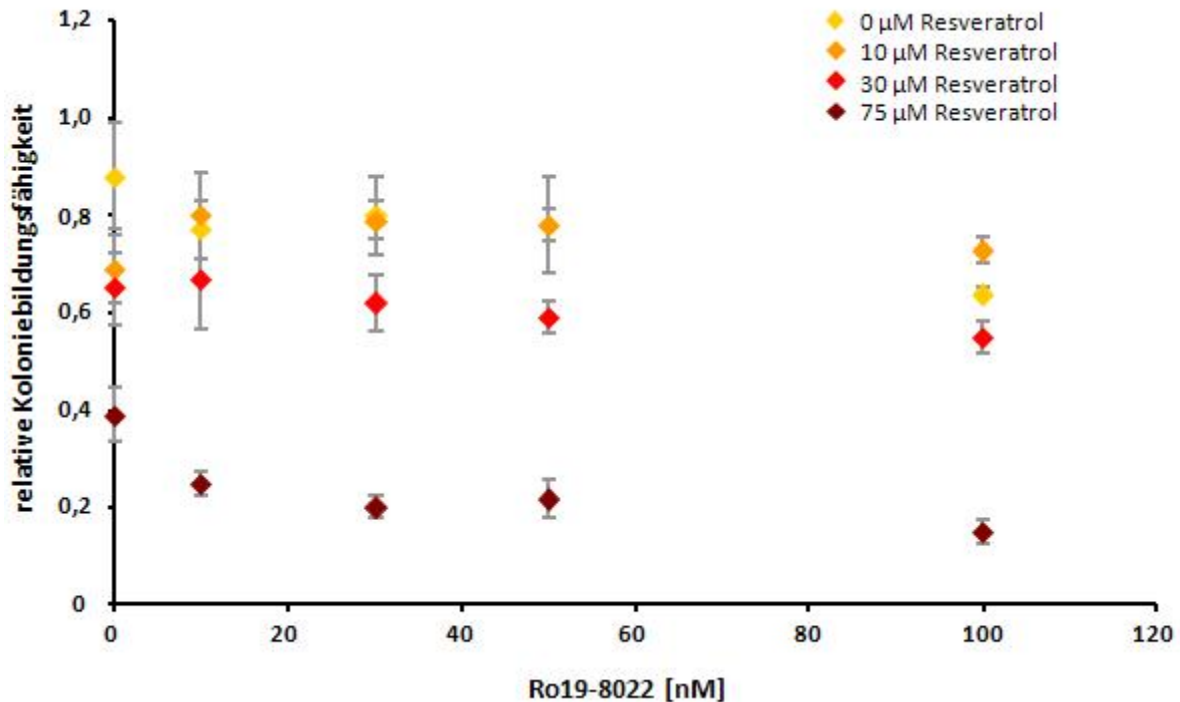


Abbildung 3.8: Koloniebildungsfähigkeit von AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol und Ro19-8022 Zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit wurden 200 Zellen ausgestreut, nach 24h erfolgte die Zugabe von Resveratrol für eine 24-stündige Inkubationszeit. Im Anschluss wurde Resveratrol gewaschen und es erfolgte die Schädigung mit Ro19-8022 + Licht. Für jede Resveratrolkonzentration wurde als zusätzliche Kontrolle ohne Ro19-8022 in reinem Phosphatpuffer mit Licht bestrahlt (0 nM Ro19-8022). Zur Bestimmung der relativen Koloniebildungsfähigkeit wurde die Zahl hochgewachsener Klone bezogen auf die Zahl an Klonen der unbehandelten Kontrolle (Inkubation ohne Ro19-8022 und Resveratrol im Dunklen); diese ist der Abbildung 3.5 zu entnehmen. Das verwendete Lösungsmittel für Resveratrol war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1%. n=2

Aufgrund der Daten kann die Schadensinduktion in AS52-Zellen mit den Standardbedingungen von 50 nM Ro19-8022 für 10 min mit sichtbarem Licht auf Eis durchgeführt werden.

### 3.1.5.2 Schadensinduktion in AS52-Zellen in Gegenwart von Resveratrol

Da es Befunde gibt, dass Resveratrol als Radikalfänger wirken kann (Fauconneau et al., 1997), sollte ein solcher direkter „Scavenger Effekt“ von Resveratrol während der Schädigung überprüft werden. Die Daten in Abbildung 3.9 wurden mit Hilfe der Alkalischen Elution (s. 2.2.4) angefertigt, zur Quantifizierung oxidativer Läsionen wurde die bakterielle DNA-Glykosylase Fpg verwendet (s. Tabelle 1.2). Die Ergebnisse zeigen, dass die Anwesenheit von Resveratrol während der Schädigung in den verwendeten Konzentrationen nicht zu einer erniedrigten Schadensinduktion führt. Da für die eigentlichen Versuche zu Schadensinduktion- und Reparatur Resveratrol nach 24-stündiger Inkubationszeit vor der Schädigung in Phosphatpuffer (PBSCMF) gewaschen und erst für eine



eventuelle Reparaturzeit wieder frisch zugegeben wurde, ist ein Einfluss von Resveratrol als Radikalfänger für die geplanten Versuche auszuschließen.

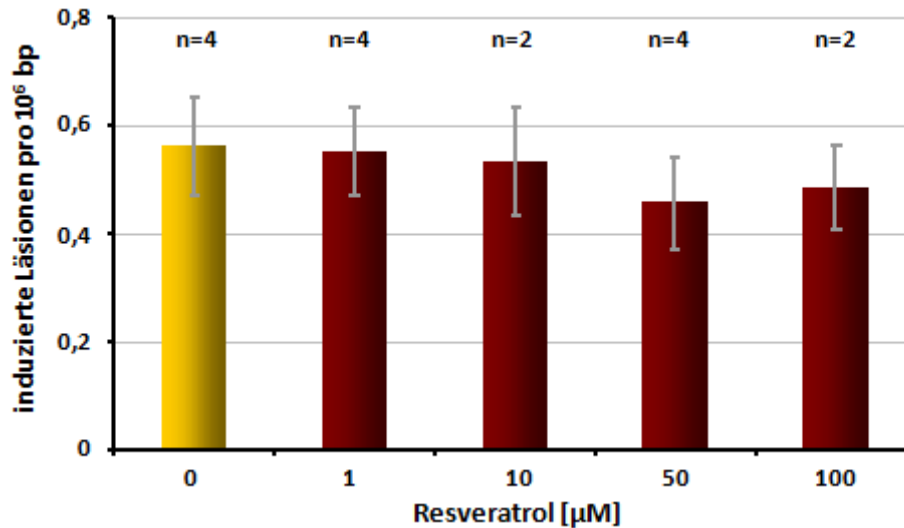


Abbildung 3.9: Schadensinduktion in AS52-Zellen in Gegenwart von Resveratrol Die Induktion Fpg-sensitiver Läsionen erfolgte mittels 50 nM Ro19-8022 + Licht (10 min, 166 kJ/m<sup>2</sup>, 0°C, in PBS). Resveratrol wurde in den angegebenen Konzentrationen für die Zeit der Schädigung zusätzlich zugegeben. Das verwendete Lösungsmittel für Resveratrol war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1%. Mittelwerte +/- SD

### 3.1.5.3 Basalspiegel, Schadensinduktion und Reparatur oxidativer DNA-Schäden unter Einfluss von Resveratrol

Die Basalspiegel Fpg-sensitiver Läsionen (Abbildung 3.10) sind nach 24-stündiger Behandlung mit Resveratrol leicht erhöht, allerdings nicht in signifikantem Maße.

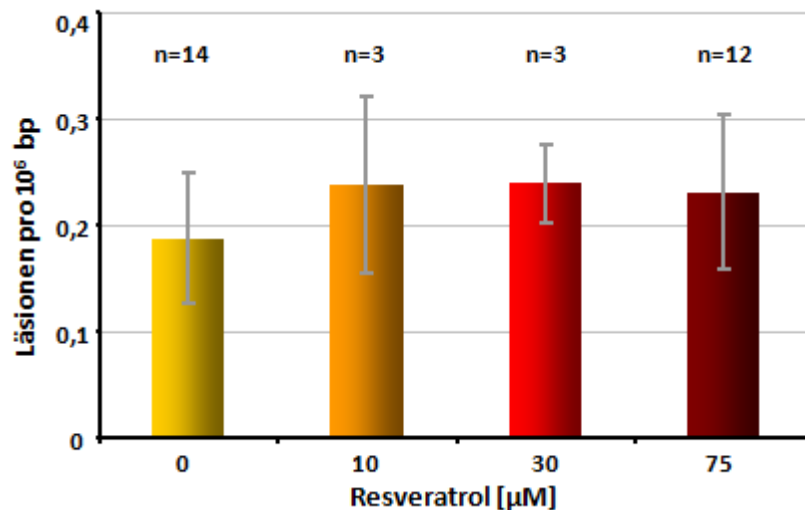


Abbildung 3.10: Basalspiegel Fpg-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol Die Basalspiegel wurden nach 24-stündiger Inkubation mit den angegebenen Resveratrolkonzentrationen mittels Alkalischer Elution gemessen. Das verwendete Lösungsmittel für Resveratrol war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1%. Mittelwerte +/- SD

Die Schädigung mit Ro19-8022 + Licht erfolgte, wie bereits beschrieben (2.2.5.1), direkt im Anschluss an die 24-stündige Resveratrolinkubation. Die Suszeptibilität (Abbildung 3.11), also die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber der Schädigung, ist durch Resveratrol im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen nicht signifikant verändert. Ein leichter Trend hin zu einer erniedrigten Schadensinduktion ist erkennbar. Besonders deutlich wird dies nach Behandlung mit 30  $\mu\text{M}$  Resveratrol.

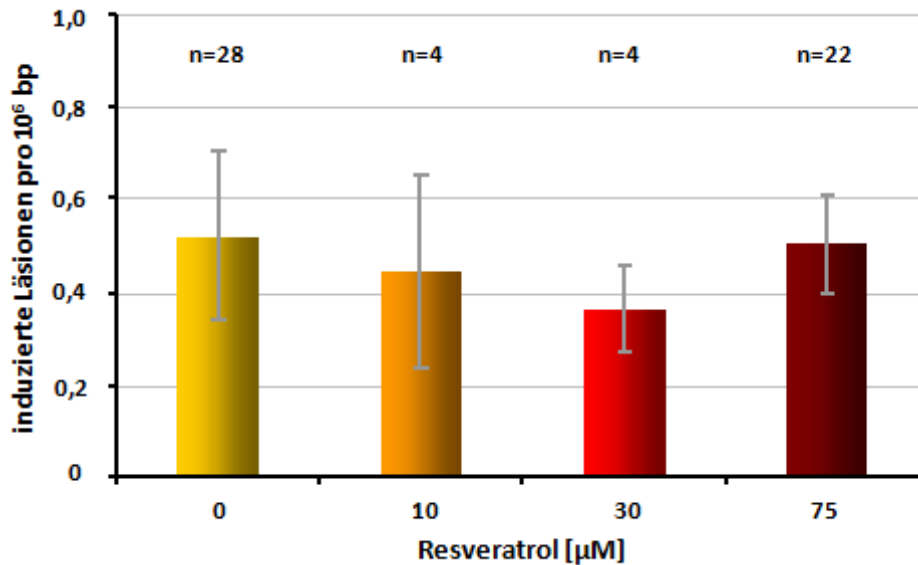


Abbildung 3.11: Einfluss von Resveratrol auf die Induktion Fpg-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen Die Induktion Fpg-sensitiver Läsionen erfolgte mittels 50 nM Ro19-8022 + Licht (10 min,  $166 \text{ kJ/m}^2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit den angegebenen Resveratrolkonzentrationen. Vor der Schädigung wurde Resveratrol in PBSCMF gewaschen. Das verwendete Lösungsmittel für Resveratrol war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %. Mittelwerte +/- SD

Die Reparatur der induzierten oxidativen Läsionen wurde für die Zeitpunkte 2h, 3h und 6h bestimmt (Abbildung 3.12). Die Zellen, die vor der Schädigung und auch während der Reparaturzeit mit 75  $\mu\text{M}$  Resveratrol behandelt wurden, zeigen eine verlangsamte Schadensreparatur im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Zum Reparaturzeitpunkt 3h ist dies eindeutig signifikant. Hier liegt der Restschaden in den Kontrollzellen im Mittel bei 34 %, in den mit 75  $\mu\text{M}$  Resveratrol behandelten Zellen lediglich bei 65 %. Aufgrund dieses deutlichen Unterschiedes wurde dieser Zeitpunkt ausgewählt, um auch die niedrigeren Resveratrolkonzentrationen 10  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  zu testen (Abbildung 3.13). Diese sind in der Reparaturkapazität unverändert zur Kontrolle. Es lässt sich keine echte Konzentrationsabhängigkeit erkennen, vielmehr scheint es so, als wäre eine bestimmte Resveratrolkonzentration notwendig, um plötzlich den Effekt auf die Reparaturgeschwindigkeit zu erhalten.

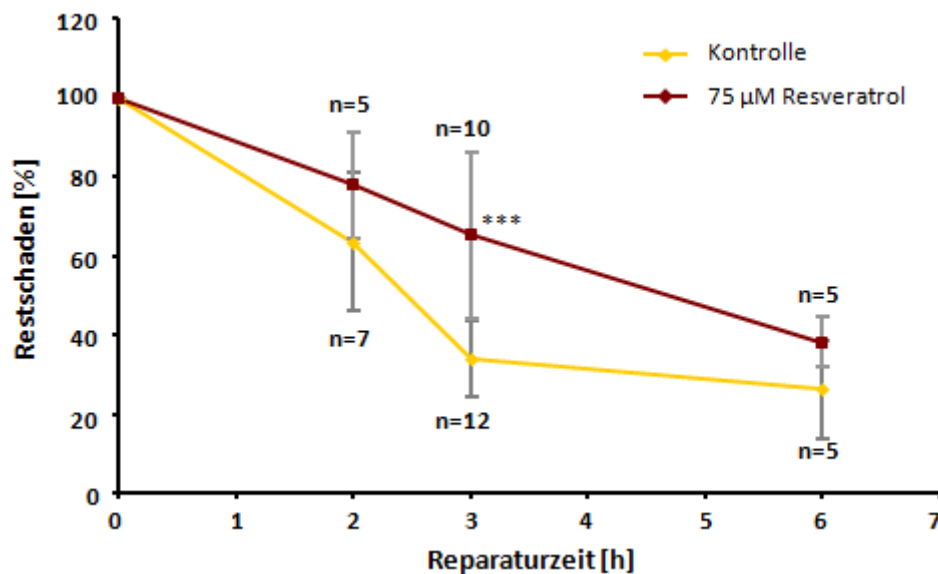


Abbildung 3.12: Reparatur Fpg-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen unter Einfluss von 75 µM Resveratrol Die Induktion Fpg-sensitiver Läsionen erfolgte mittels 50 nM Ro19-8022 + Licht (10 min, 166 kJ/m<sup>2</sup>, 0°C, in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 75 µM Resveratrol. Resveratrol wurde für die Zeit der Schädigung gewaschen, im Anschluss für die jeweilige Reparaturzeit wieder zugegeben. Der Restschaden ist bezogen auf das Ausmaß induzierter Läsionen. Das verwendete Lösungsmittel für Resveratrol war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %. Mittelwerte +/- SD

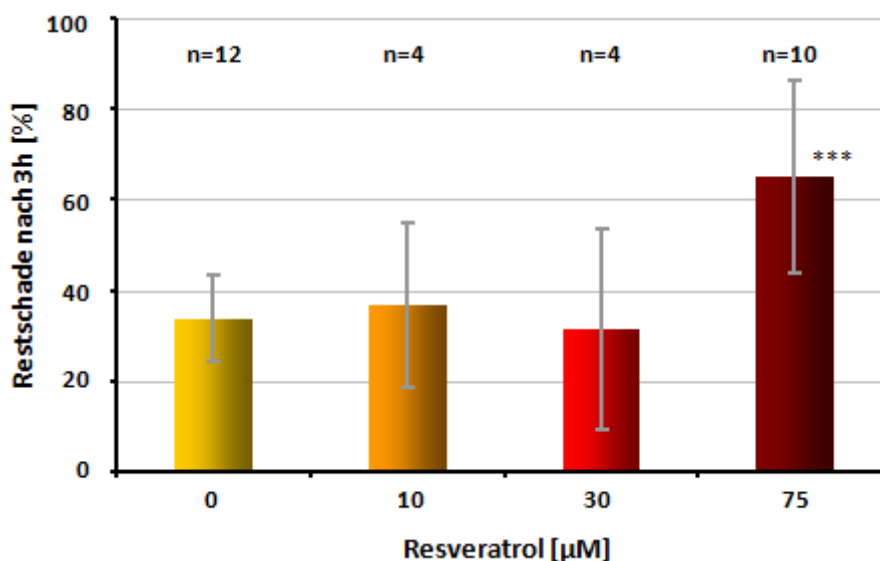


Abbildung 3.13: Restschaden Fpg-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen nach 3h unter Einfluss von Resveratrol Die Induktion Fpg-sensitiver Läsionen erfolgte mittels 50 nM Ro19-8022 + Licht (10 min, 166 kJ/m<sup>2</sup>, 0°C, in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit den angegebenen Resveratrolkonzentrationen. Resveratrol wurde für die Zeit der Schädigung gewaschen, im Anschluss für die 3-stündige Reparaturzeit wieder zugegeben. Der Restschaden ist bezogen auf das Ausmaß induzierter Läsionen. Das verwendete Lösungsmittel für Resveratrol war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1%. Mittelwerte +/- SD

### 3.1.6 Beeinflussung durch UV-B induzierter Läsionen durch Resveratrol

Eine Schädigung mit UV-B-Strahlung induziert in erster Linie Pyrimidindimere, welche im Wesentlichen über die Nukleotidexzisionsreparatur prozessiert werden. Genau wie bei der Schädigung

mit Ro19-8022 erfolgte auch hier die Schadensinduktion nach 24-stündiger Resveratrolinkubation. Während der Schädigung war Resveratrol weggewaschen, für die Reparaturzeit wieder frisch zugegeben. Die Basalspiegel und induzierten Läsionen wurden in der Alkalischen Elution mit Hilfe der T4 Endonuklease V (T4-EndoV), welche Cyclobutanpyrimidindimere (CPDs) und AP-Läsionen erkennt (s. Tabelle 1.2), quantifiziert.

Der Basalspiegel T4-EndoV-sensitiver Läsionen nach Behandlung mit 30  $\mu\text{M}$  Resveratrol ist erhöht im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, nach den übrigen Konzentrationen Resveratrol sind die Basalspiegel unverändert (s. Abbildung 3.14). Allerdings ist der Grundschaden, bei dem es sich in erster Linie um AP-Läsionen handelt, mit weniger als 0,1 Läsionen pro  $10^6$  Basenpaaren so niedrig, dass echte Unterschiede in diesem Bereich schwer zu messen sind. Insgesamt ist der T4-EndoV-sensitive Untergrundschaden äußerst gering und beeinflusst Induktions- und Reparaturergebnisse nicht.

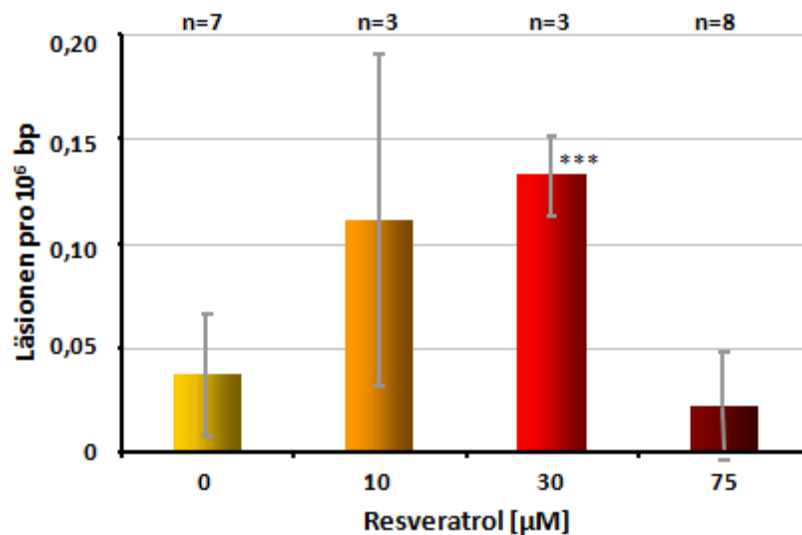


Abbildung 3.14: Basalspiegel T4-EndoV-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol Die Basalspiegel wurden nach 24-stündiger Inkubation mit den angegebenen Resveratrolkonzentrationen mittels Alkalischer Elution gemessen. Das verwendete Lösungsmittel für Resveratrol war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1%. Mittelwerte +/- SD

Die Schadensinduktion nach UV-B in AS52-Zellen ist durch Resveratrol unbeeinflusst im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Abbildung 3.15), allerdings ist auch hier wieder, wie schon nach Ro19-8022, eine leichte Tendenz hin zu einem erniedrigten Schadensausmaß ersichtlich. Eine deutliche Beeinflussung der Suszeptibilität durch Strahlung wie UV-B ist allerdings nicht zu erwarten, da diese nicht durch sterische Einflüsse wie eine kompaktere Chromatin-Struktur behindert wird.

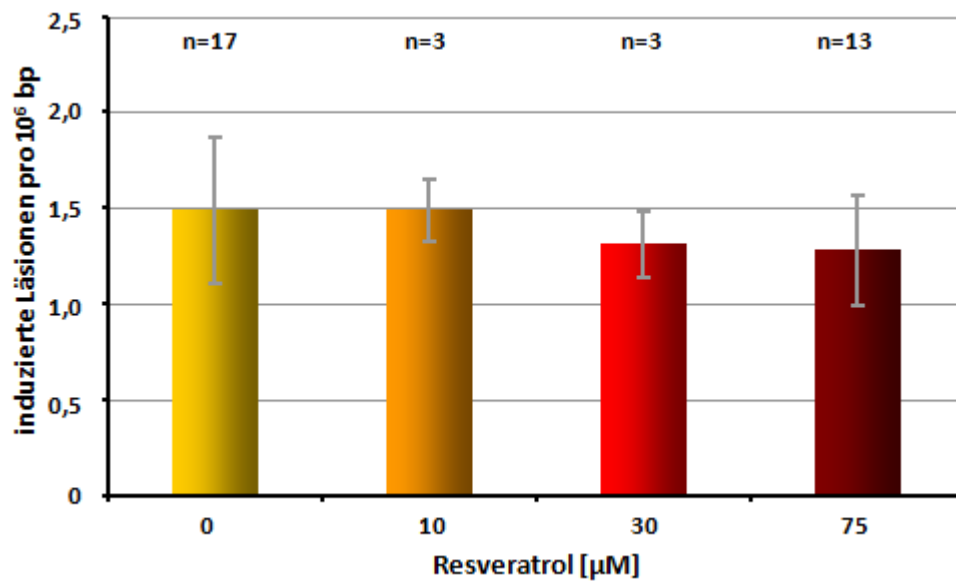


Abbildung 3.15: Einfluss von Resveratrol auf die Induktion T4-EndoV-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen Die Induktion T4-EndoV-sensitiver Läsionen erfolgte mittels UV-B ( $2,88 \text{ J/m}^2$ , in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit den angegebenen Resveratrolkonzentrationen. Vor der Schädigung wurde Resveratrol in PBSCMF gewaschen. Für Resveratrol, diente Ethanol als Lösungsmittel in einer Endkonzentration von 0,1%. Mittelwerte  $\pm$  SD

Die Reparatur von Pyrimidindimeren unter Einfluss von 75  $\mu\text{M}$  Resveratrol ist zu allen gemessenen Reparaturzeitpunkten (4h, 8h und 16h) signifikant verlangsamt, wie in Abbildung 3.16 deutlich zu sehen ist. Zum Zeitpunkt 8h wurden auch die beiden niedrigeren Resveratrolkonzentrationen vermessen (Abbildung 3.17). Hier zeigt sich, dass 10  $\mu\text{M}$  Resveratrol noch keinen Einfluss auf die Reparaturgeschwindigkeit hat. Mit 30  $\mu\text{M}$  Resveratrol hingegen hat man bereits den gleichen hemmenden Effekt, der auch mit 75  $\mu\text{M}$  Resveratrol zu sehen ist. Auch hier, wie auch schon bei der Reparatur oxidativer Läsionen, zeigt sich dieser „Alles-oder-Nichts“-Effekt. Allerdings ist im Fall der Nukleotidexzisionsreparatur bereits eine Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  Resveratrol ausreichend. Die Werte der Reparaturzeitpunkte 8h und 16h sind für die Proliferation korrigiert, um „Verdünnungseffekte“ auszuschließen.

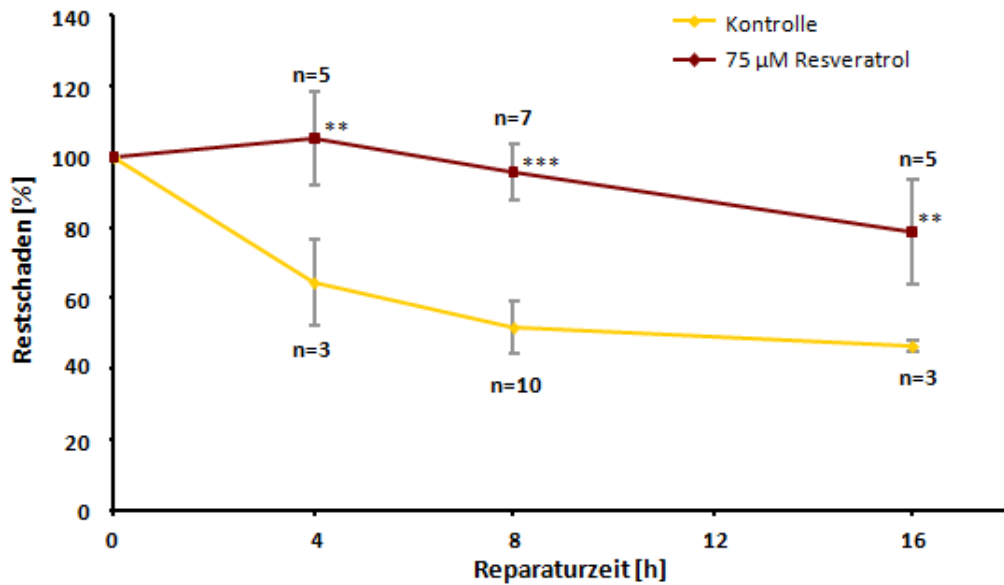


Abbildung 3.16: Reparatur T4-EndoV-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol Die Induktion T4-EndoV-sensitiver Läsionen erfolgte mittels UV-B ( $2,88 \text{ J/m}^2$ , in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit  $75 \text{ µM}$  Resveratrol. Resveratrol wurde für die Zeit der Schädigung gewaschen, im Anschluss für die jeweilige Reparaturzeit wieder zugegeben. Der Restschaden ist bezogen auf das Ausmaß induzierter Läsionen. Das verwendete Lösungsmittel für Resveratrol war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1%. Mittelwerte  $\pm$  SD

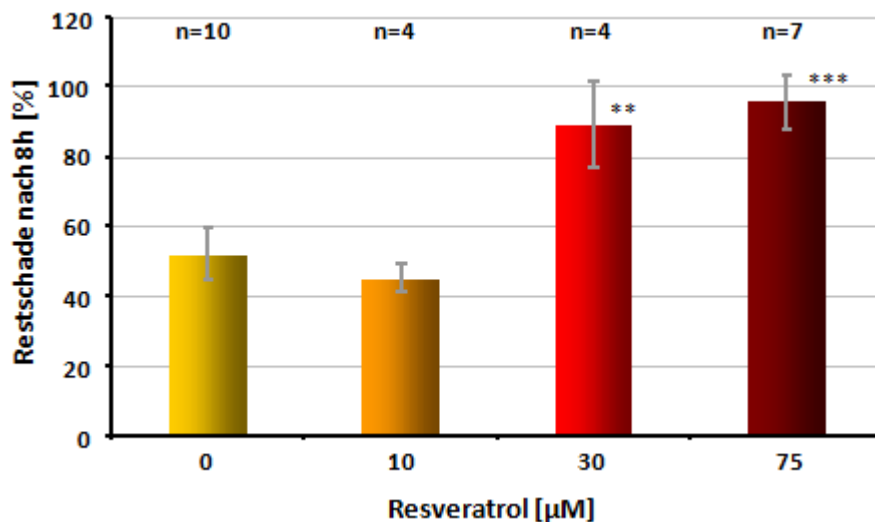


Abbildung 3.17: Restschaden T4-EndoV-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen nach 8h unter Einfluss von Resveratrol Die Induktion T4-EndoV-sensitiver Läsionen erfolgte mittels UV-B ( $2,88 \text{ J/m}^2$ , in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit den angegebenen Resveratrolkonzentrationen. Resveratrol wurde für die Zeit der Schädigung gewaschen, im Anschluss für die 3-stündige Reparaturzeit wieder zugegeben. Der Restschaden ist bezogen auf das Ausmaß induzierter Läsionen. Das verwendete Lösungsmittel für Resveratrol war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1%. Mittelwerte  $\pm$  SD

Um sicherzustellen, dass es sich bei dem gezeigten Ergebnis tatsächlich um eine verlangsamte Reparatur von Pyrimidindimeren handelt, und nicht z.B. um eine Akkumulation von AP-Läsionen, welche ebenfalls von der T4-EndoV erkannt würden, wurde der folgende Versuch durchgeführt. Hier wurde eine Reparaturzeit von 8h gewählt und das Schadensausmaß nicht nur mit T4-EndoV bestimmt, sondern auch mit Fpg und einer Kombination aus beiden Enzymen. Da beide die gleiche

Art von AP-Läsionen erkennen und bei einer Schädigung mit UV-B keine oxidativen Läsionen zu erwarten sind, könnten zusätzlich entstehende AP-Läsionen erkannt werden. Wie aus Abbildung 3.18 ersichtlich ist, entstehen weder bei der Schädigung noch während der Reparaturzeit oxidative Schäden oder AP-Läsionen. In ersterem Fall müsste das von „T4-EndoV + Fpg“ erkannte Schadensausmaß von dem abweichen, welches T4-EndoV alleine erkennt. Eine Bildung von AP-Läsionen hingegen wäre erkennbar an einer Abweichung zum Schadensausmaß, welches Fpg alleine erkennt. Beides ist aber nicht der Fall. Bei den detektierten Läsionen muss es sich folglich zu annähernd 100% um Pyrimidindimere handeln. Auch in diesem unabhängigen Versuch bestätigt sich also die durch Resveratrol nahezu komplette Inhibierung der Reparatur.

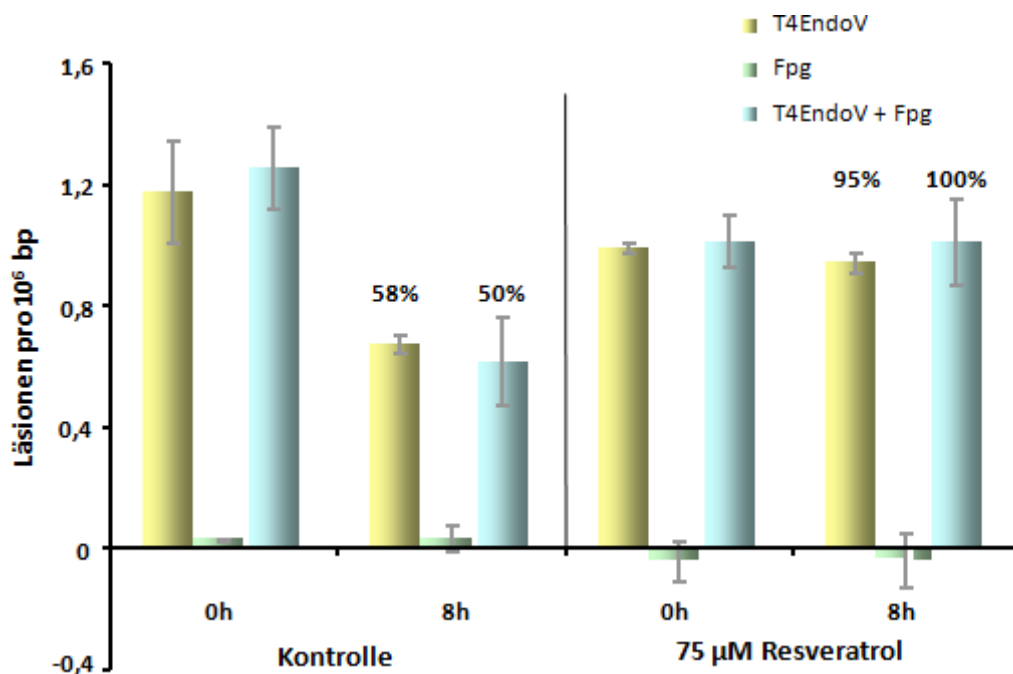


Abbildung 3.18: Reparatur T4-EndoV- und Fpg-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol Die Induktion der Läsionen erfolgte mittels UV-B ( $2,88 \text{ J/m}^2$ , in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit  $75 \mu\text{M}$  Resveratrol. Resveratrol wurde für die Zeit der Schädigung gewaschen, im Anschluss für die 8-stündige Reparaturzeit wieder zugegeben. Das verwendete Lösungsmittel für Resveratrol war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1%.  $n=2$ ; Mittelwerte  $\pm$  SD

### 3.1.7 Beeinflussung durch $\text{H}_2\text{O}_2$ induzierter Einzelstrangbrüche durch Resveratrol

#### 3.1.7.1 Schädigung adhärenter Zellen bei $37^\circ\text{C}$

Um zunächst eine geeignete  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration für die späteren Reparaturversuche zu ermitteln, wurde die Induktion von Einzelstrangbrüchen in Abhängigkeit von der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration bestimmt. Bei der Schädigung mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist dies notwendig, da es starke zelltypabhängige Unterschiede in der Empfindlichkeit bzw. Schadensinduktion gibt. Der Abbildung 3.19 ist zu entnehmen, dass die unbehandelten Kontrollzellen einen linearen Anstieg induzierter Einzelstrangbrüche (SSBs) mit zunehmender  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration aufweisen. Die mit Resveratrol für 24 Stunden behandelten Zellen

weisen bis etwa 75  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  ebenfalls diese Linearität auf, dann allerdings kommt es zu einem sprunghaften Anstieg induzierter Einzelstrangbrüche. Die mit Resveratrol behandelten Zellen scheinen ab einer gewissen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration deutlich empfindlicher zu sein. Eine weitere Erklärung könnte sein, dass es sich nicht um eine erhöhte Schadensinduktion, sondern um eine Akkumulation der induzierten Einzelstrangbrüche handelt. Bereits während der Schädigung bei 37°C findet eine Reparatur der induzierten Einzelstrangbrüche statt (s. auch 2.2.5.3), welche nach Resveratrolbehandlung deutlich inhibiert ist (s. Abbildung 3.21).

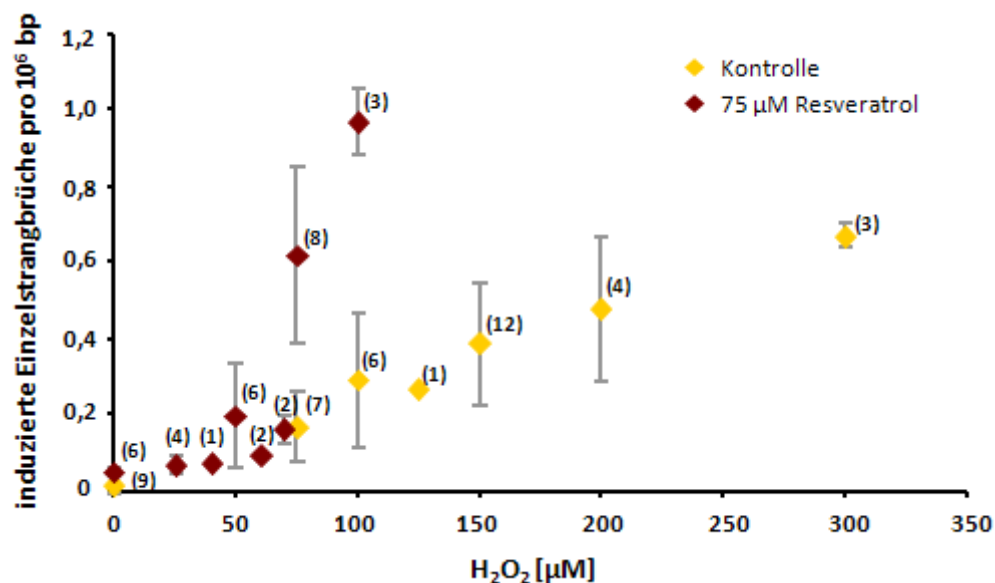


Abbildung 3.19: Einfluss von Resveratrol auf die Induktion von Einzelstrangbrüchen durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei 37°C in AS52-Zellen. Die Induktion der Einzelstrangbrüche erfolgte mittels  $\text{H}_2\text{O}_2$  (15 min, 37°C, in serumfreiem Medium) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 75  $\mu\text{M}$  Resveratrol. Vor der Schädigung wurde Resveratrol in PBSCMF gewaschen. Das für Resveratrol verwendete Lösungsmittel war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1%. n ist angegeben in Klammern, Mittelwerte  $\pm$  SD.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für die folgenden Reparaturversuche, bei denen ein annähernd gleicher Schaden in allen Zellen induziert werden sollte, zur Schädigung der unbehandelten Zellen eine  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration von 150  $\mu\text{M}$  und für die mit Resveratrol behandelten Zellen von 75  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  verwendet. Die Schadensinduktion unter diesen Bedingungen ist in Abbildung 3.20 noch einmal dargestellt und liegt bei etwa 0,5 Einzelstrangbrüche /  $10^6$  bp.



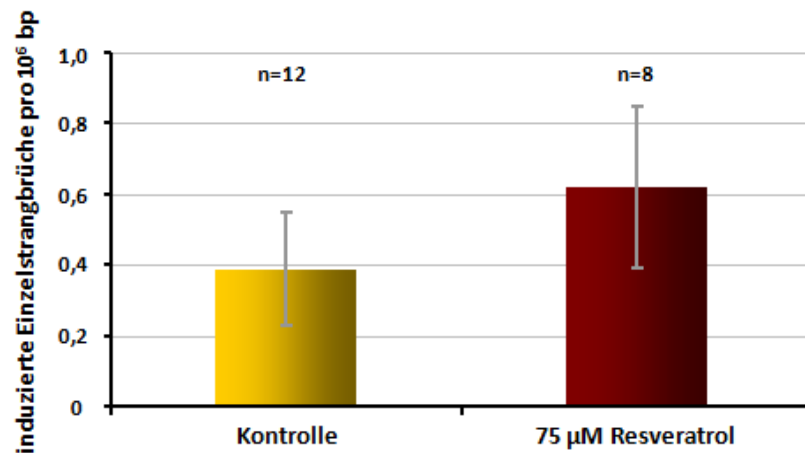


Abbildung 3.20: Induktion von Einzelstrangbrüchen unter Einfluss von Resveratrol in AS52-Zellen Die Induktion der Einzelstrangbrüche erfolgte mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Kontrollzellen: 150 μM, Resveratrolzellen: 75 μM; 15 min, 37°C, in serumfreiem Medium) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 75 μM Resveratrol. Vor der Schädigung wurde Resveratrol in PBSCMF gewaschen. Das für Resveratrol verwendete Lösungsmittel war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %. Mittelwerte +/- SD

Die Reparatur wurde bestimmt für die Reparaturzeitpunkte 7,5, 15, 30 und 60 Minuten. Die Graphik (Abbildung 3.21) zeigt eindeutig, dass durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierte Einzelstrangbrüche in AS52-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit 75 μM Resveratrol deutlich langsamer repariert werden im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Besonders deutlich ist dies bis zu einer Reparaturzeit von 30 min. Doch auch nach einer Stunde zeigen die mit Resveratrol behandelten Zellen einen Restschaden von über 20 %, wohingegen die Kontrollzellen zu diesem Zeitpunkt bereits nahezu 100 % des induzierten Schadens repariert haben.

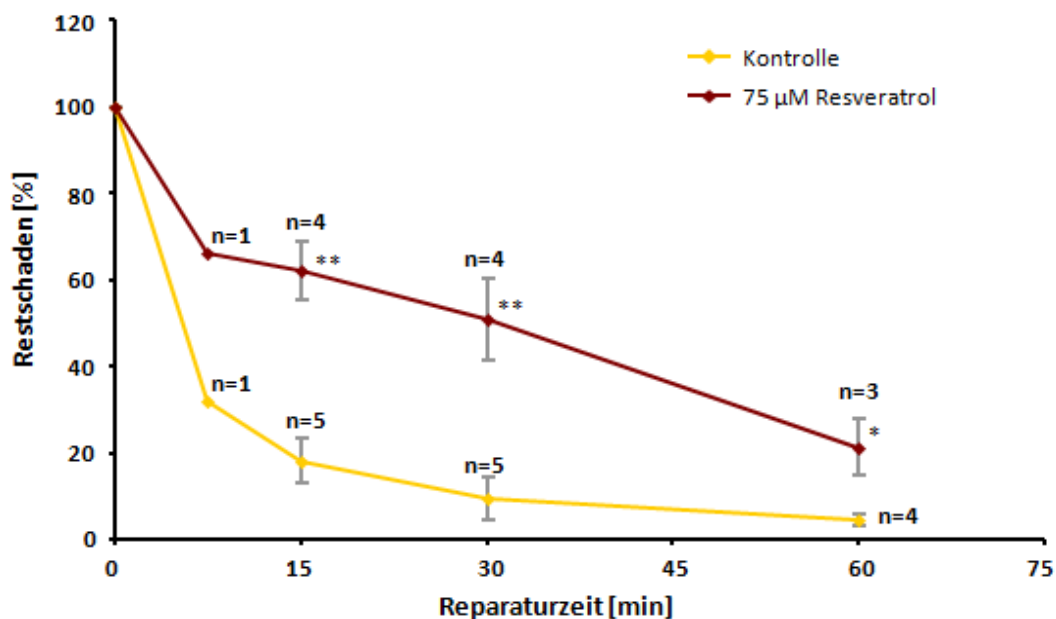


Abbildung 3.21: Reparatur von Einzelstrangbrüchen unter Einfluss von Resveratrol in AS52-Zellen Die Induktion der Einzelstrangbrüche erfolgte mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15 min, 37°C, in serumfreiem Medium) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 75 μM Resveratrol. Resveratrol wurde für die Zeit der Schädigung gewaschen, im Anschluss für die jeweilige Reparaturzeit wieder zugegeben. Der Restschaden ist bezogen auf das Ausmaß induzierter Einzelstrangbrüche. Das für Resveratrol verwendete Lösungsmittel war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1%. Mittelwerte +/- SD

### 3.1.7.2 Schädigung von Zellen in Suspension bei 0°C

Zusätzlich zur Schädigung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 37°C wurden AS52-Zellen auch mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 0°C geschädigt, da die Art der induzierten Einzelstrangbrüche und deren Reparatur sich bei diesen beiden Schädigungsweisen voneinander unterscheiden (s. 2.2.5.3). Auch für die Schädigung bei 0°C wurde die Induktion von Einzelstrangbrüchen in Abhängigkeit von der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration bestimmt. Bei dieser Art der Schädigung zeigen sowohl Kontroll- als auch mit Resveratrol behandelte Zellen einen linearen Anstieg induzierter Einzelstrangbrüche, der ab etwa 300 µM in ein Plateau übergeht (Abbildung 3.22). Dennoch ist wieder deutlich zu sehen, dass die mit Resveratrol behandelten Zellen etwas empfindlicher sind.

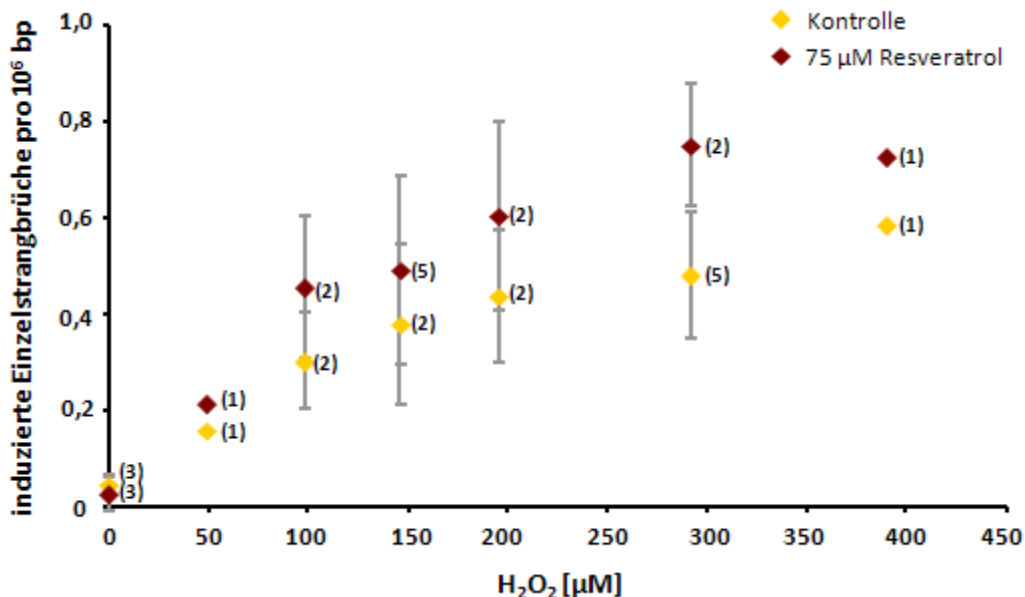


Abbildung 3.22: Einfluss von Resveratrol auf die Induktion von Einzelstrangbrüchen durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 0°C in AS52-Zellen Die Induktion der Einzelstrangbrüche erfolgte mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15min., 0°C, in serumfreiem Medium, 2 Mio Zellen/ml) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 75 µM Resveratrol. Vor der Schädigung wurde Resveratrol in PBSCMF gewaschen. Das für Resveratrol verwendete Lösungsmittel war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %. n ist angegeben in Klammern, Mittelwerte +/- SD

Um für die Reparaturversuche ein annähernd gleiches Schadensausmaß zu induzieren, wurde für Kontrollzellen eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 292 µM, für mit Resveratrol behandelte Zellen lediglich 146 µM gewählt. Die Schädigung unter diesen Bedingungen ist in Abbildung 3.23 dargestellt. Der mittlere Schaden liegt bei etwa 0,5 Einzelstrangbrüche / 10<sup>6</sup> bp.

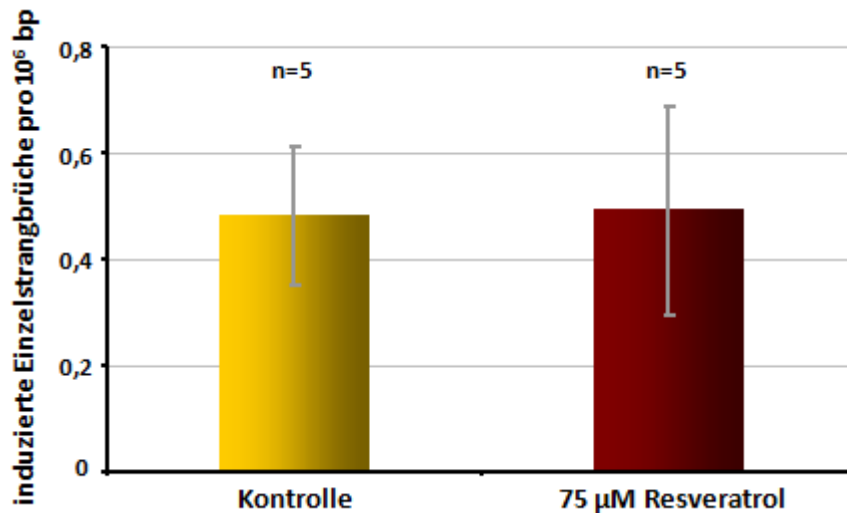


Abbildung 3.23: Induktion von Einzelstrangbrüchen unter Einfluss von Resveratrol in AS52-Zellen Die Induktion der Einzelstrangbrüche erfolgte mittels H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (15 min, 0°C, in serumfreiem Medium) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 75 μM Resveratrol. Vor der Schädigung wurde Resveratrol in PBSCMF gewaschen. Das für Resveratrol verwendete Lösungsmittel war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %. Mittelwerte +/- SD

Die Reparatur wurde hier für die Reparaturzeitpunkte 2, 5, 10 und 15 Minuten bestimmt. Zunächst fällt auf, dass die Halbwertszeit der Einzelstrangbrüche nach Generierung bei 0°C deutlich geringer ist als nach Generierung bei 37°C. Als Erklärung kommt in Frage, dass hierbei vor allem besonders schnell zu reparierende, „unkomplizierte“ Einzelstrangbrüche detektiert werden, welche bei einer Schadensinduktion bei 37°C bereits während der Schädigung repariert werden und somit weniger zum untersuchten Schaden beitragen. Wie der Graphik (Abbildung 3.24) zu entnehmen ist, wird die Reparatur der bei 0°C induzierten Einzelstrangbrüche durch Resveratrol deutlich weniger beeinflusst als die der bei 37°C induzierten Einzelstrangbrüche. Erst zu den späteren Reparaturzeitpunkten 10 und 15 min wird die durch Resveratrol verlangsamte Reparatur deutlich. Dies könnte darauf hindeuten, dass Resveratrol wenig Einfluss ausübt auf die Reparatur der besonders schnell reparierten Einzelstrangbrüche, wie sie bei der 0°C-Schädigung detektiert werden können. Die „langsamer“ reparierenden Einzelstrangbrüche, welche bei der 37°C-Schädigung untersucht werden, erfahren durch Resveratrol hingegen eine deutliche Reparaturverlangsamung (vgl. auch 2.2.5.3)

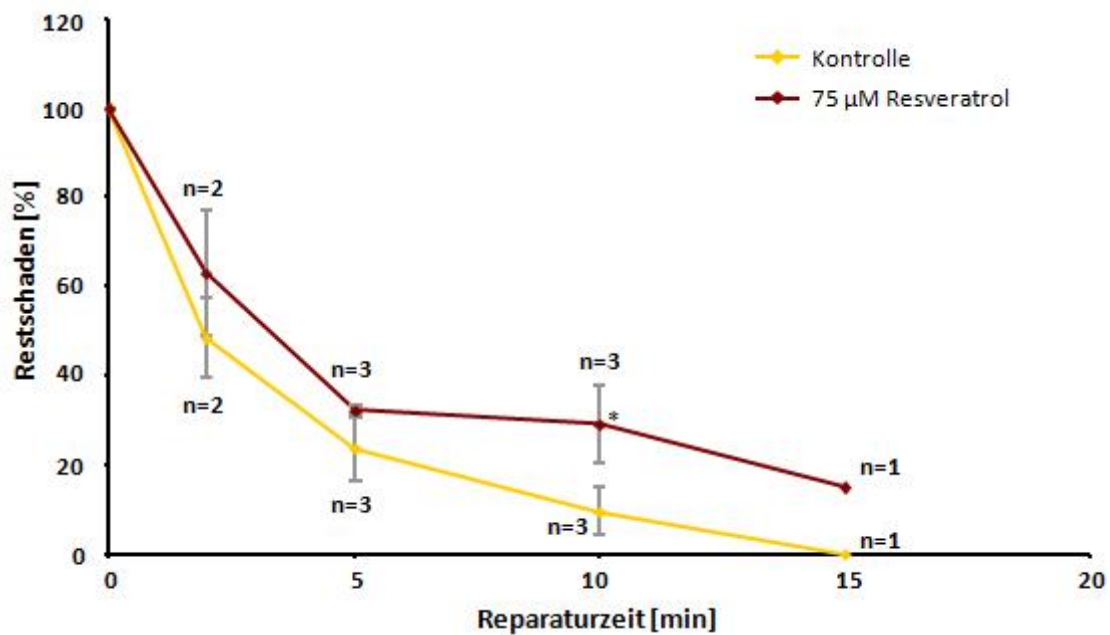


Abbildung 3.24: Reparatur von Einzelstrangbrüchen unter Einfluss von Resveratrol in AS52-Zellen Die Induktion der Einzelstrangbrüche erfolgte mittels  $H_2O_2$  (15 min,  $0^\circ C$ , in serumfreiem Medium) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit  $75 \mu M$  Resveratrol. Resveratrol wurde für die Zeit der Schädigung gewaschen, im Anschluss für die jeweilige Reparaturzeit wieder zugegeben. Der Restschaden ist bezogen auf das Ausmaß induzierter Einzelstrangbrüche. Das für Resveratrol verwendete Lösungsmittel war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %. Mittelwerte  $\pm$  SD

### 3.1.8 Einfluss eines SIRT1-Inhibitors auf die durch Resveratrol verlangsamte Reparatur

Wie bereits beschrieben, gibt es Hinweise, dass Resveratrol einen aktivierenden Einfluss auf die Deacetylase SIRT1 ausübt (1.7.4.). Sollte eine dadurch verursachte Kondensation des Chromatins für die beobachtete verlangsamte Schadensreparatur unter Einfluss von Resveratrol verantwortlich sein, könnte die Reparaturhemmung durch eine Inhibierung von SIRT1 verhindert werden. Als SIRT1-Inhibitor wurde EX-527 verwendet. Die Zellen wurden in An- und Abwesenheit von Resveratrol für 24 Stunden vorinkubiert und im Anschluss geschädigt. Nach einer Schädigung mit Ro19-8022 + Licht (Abbildung 3.25) lässt sich erkennen, dass nach 3-stündiger Reparatur bereits der SIRT1-Inhibitor alleine einen leicht hemmenden Effekt auf die Reparatur ausübt, allerdings ist dies nicht signifikant. In Kombination mit Resveratrol ist eine leichte Verbesserung der Reparatur im Vergleich mit den mit Resveratrol behandelten Zellen erkennbar, auch dies ist aber nicht signifikant. Eine vollständige Aufhebung der Reparaturinhibition ist durch eine SIRT1-Inhibierung nicht zu erreichen.

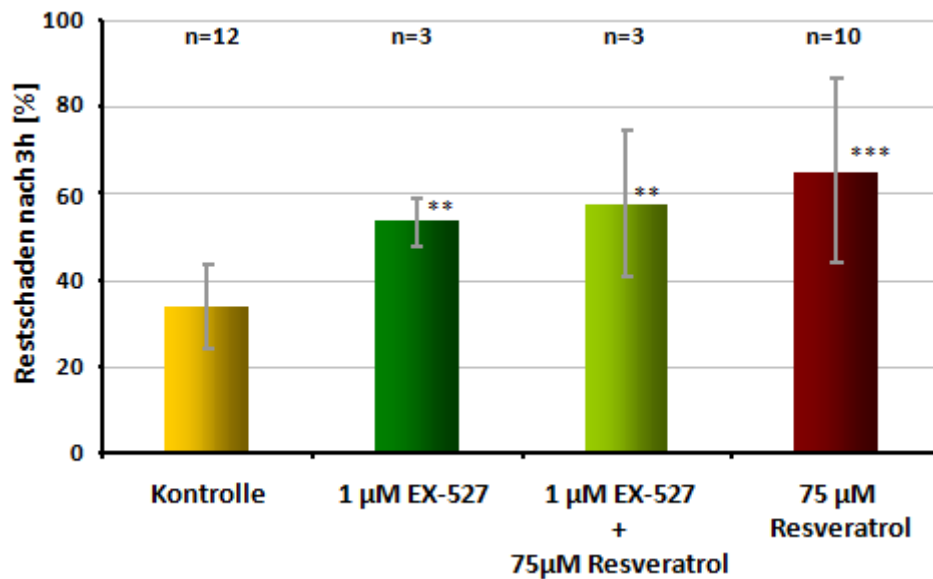


Abbildung 3.25: Restschaden Fpg-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen nach 3h unter Einfluss von Resveratrol und EX-527 Die Induktion Fpg-sensitiver Läsionen erfolgte mittels 50 nM Ro19-8022 + Licht (10 min, 166 kJ/m<sup>2</sup>, 0°C, in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 75 µM Resveratrol und 1 µM EX-527. Resveratrol und EX-527 wurden für die Zeit der Schädigung weggewaschen, im Anschluss für die 3-stündige Reparaturzeit wieder zugegeben. Der Restschaden ist bezogen auf das Ausmaß induzierter Läsionen. Das verwendete Lösungsmittel für beide Substanzen war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,2 % . Mittelwerte +/- SD

Auch nach Schadensinduktion mit UV-B (Abbildung 3.26) ist die Reparaturhemmung nicht durch zusätzliche SIRT1-Inhibierung revertierbar. Im Gegensatz zur Schädigung mit Ro19-8022 + Licht hat der SIRT1-Inhibitor alleine keinerlei Einfluss auf die Reparatur im Vergleich zur Kontrolle.

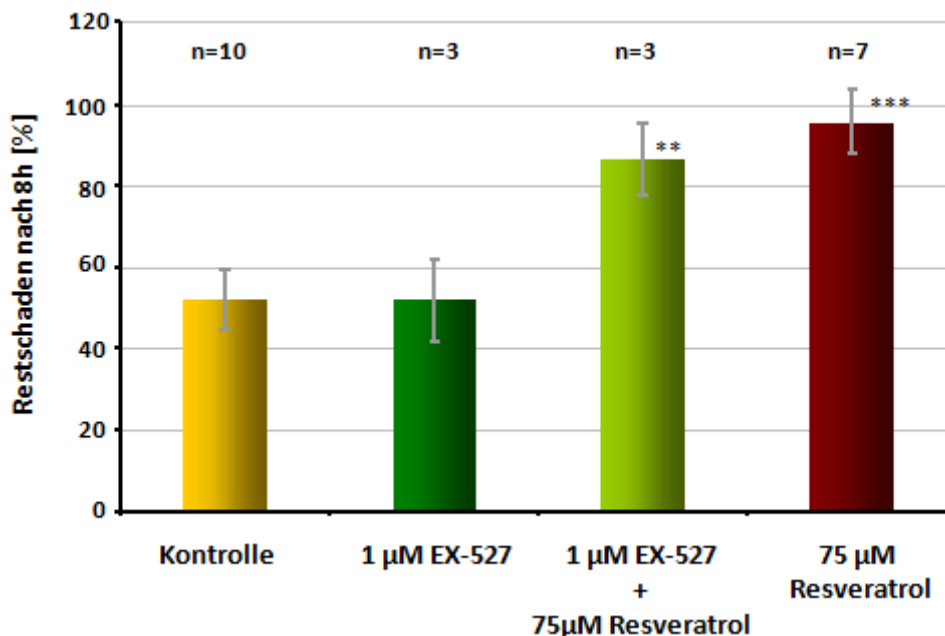


Abbildung 3.26: Restschaden T4-EndoV-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen nach 8h unter Einfluss von Resveratrol und EX-527 Die Induktion T4-EndoV-sensitiver Läsionen erfolgte mittels UV-B (2,88 J/m<sup>2</sup>, in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 75 µM Resveratrol und 1 µM EX-527. Resveratrol und EX-527 wurden für die Zeit der Schädigung weggewaschen, im Anschluss für die 8-stündige Reparaturzeit wieder zugegeben. Der Restschaden ist bezogen auf das Ausmaß induzierter Läsionen. Das für beide Substanzen verwendete Lösungsmittel war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,2 % . Mittelwerte +/- SD

Das gleiche Bild wie nach UV-B-Schädigung zeigt sich auch nach Induktion von Einzelstrangbrüchen mit  $H_2O_2$  bei  $37^\circ C$  (Abbildung 3.27). Der SIRT1-Inhibitor EX-527 alleine zeigt keine Veränderung der Reparatur im Vergleich zur Kontrolle. Aber auch eine Verbesserung der durch Resveratrol verlangsamten Reparatur ist nicht zu beobachten. Tendenziell zeigt sich die Reparaturgeschwindigkeit eher noch etwas langsamer als mit Resveratrol alleine. Bei dieser Art der Schädigung wurde zudem außer  $1 \mu M$  EX-527 auch eine höhere Konzentration von  $20 \mu M$  eingesetzt. Indem eine vielfache Konzentration des Inhibitors verwendet wurde, sollte sichergestellt werden, dass die der Literatur entnommene Konzentration von  $1 \mu M$  des Inhibitors (Solomon et al., 2006) ausreicht, um seine Wirkung zu entfalten. Dies scheint so zu sein, da  $20 \mu M$  keinen zusätzlichen Effekt aufweisen.

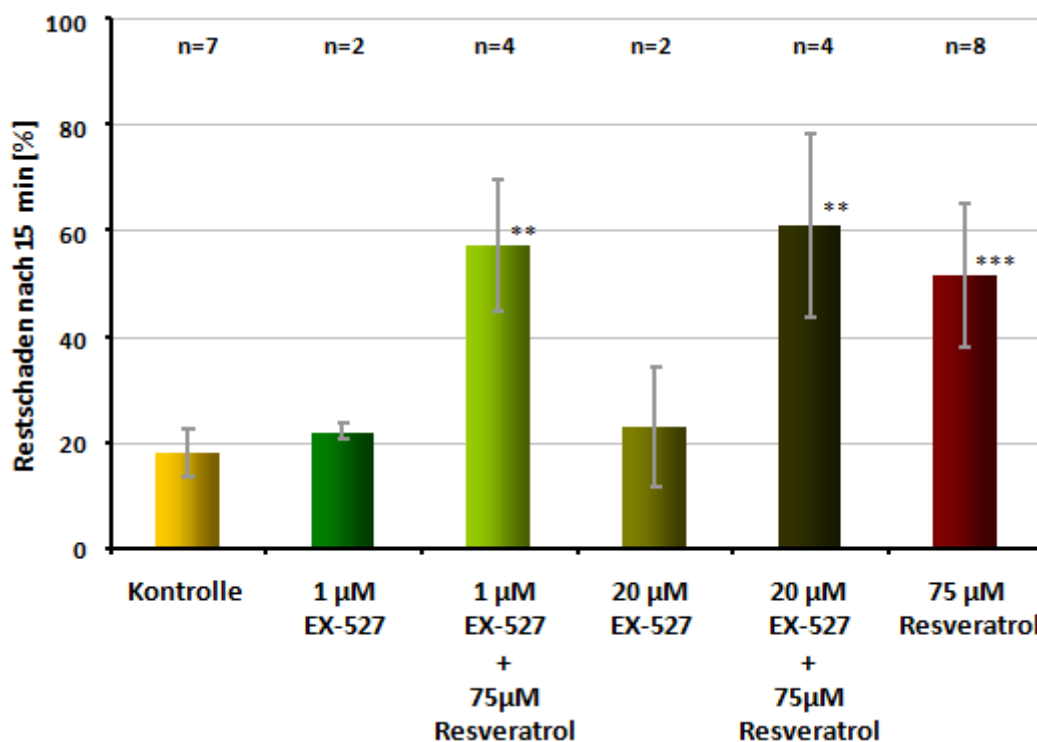


Abbildung 3.27: Reparatur von Einzelstrangbrüchen in AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol und EX-527 Die Induktion der Einzelstrangbrüche erfolgte mittels  $H_2O_2$  (15 min,  $37^\circ C$ , in serumfreiem Medium) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit  $75 \mu M$  Resveratrol und  $1 \mu M$  oder  $20 \mu M$  EX-527. Resveratrol und EX-527 wurden für die Zeit der Schädigung weggewaschen, im Anschluss für die jeweilige Reparaturzeit wieder zugegeben. Der Restschaden ist bezogen auf das Ausmaß induzierter Einzelstrangbrüche. Das für beide Substanzen verwendete Lösungsmittel war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,2 %. Mittelwerte  $\pm$  SD

Eine Aktivierung von SIRT1 durch Resveratrol scheint nicht die mechanistische Erklärung für die beobachtete Reparaturverlangsamung zu sein. Unabhängig davon könnte eine alleinige Inhibierung von SIRT1 die Basenexzisionsreparatur beeinflussen, für die Nukleotidexzisionsreparatur hingegen scheint SIRT1 von geringerer Bedeutung zu sein.

### 3.1.9 Einfluss eines HDAC-Inhibitors auf die durch Resveratrol verlangsamte Reparatur

Um auf eine weitere Weise zu untersuchen, ob eine kondensierte Chromatinstruktur für die Reparatureffekte verantwortlich sein könnte, wurde Resveratrol in Kombination mit dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A für 24 Stunden vorinkubiert. Da TSA einen gegenteiligen Effekt auf das Chromatin ausübt wie Resveratrol, könnte dadurch auch der Einfluss auf die Reparatur aufgehoben werden. Der Versuch wurde nach Schädigung mit UV-B durchgeführt, da hier im Vergleich zu oxidativen Schäden durch Ro19-8022 + Licht der hemmende Einfluss von Resveratrol auf die Reparatur sehr viel ausgeprägter ist. Wie die Abbildung 3.28 zeigt, bringt eine kombinierte Inkubation mit Trichostatin A im Vergleich zu Resveratrol alleine keine Veränderung. Auch hier ist die Reparatur deutlich verlangsamt. Eine Inkubation mit Trichostatin A alleine zeigt keinen Einfluss im Vergleich zur Kontrolle, was in einem späteren Abschnitt des Ergebnisteils (3.2.7) noch genauer besprochen wird.

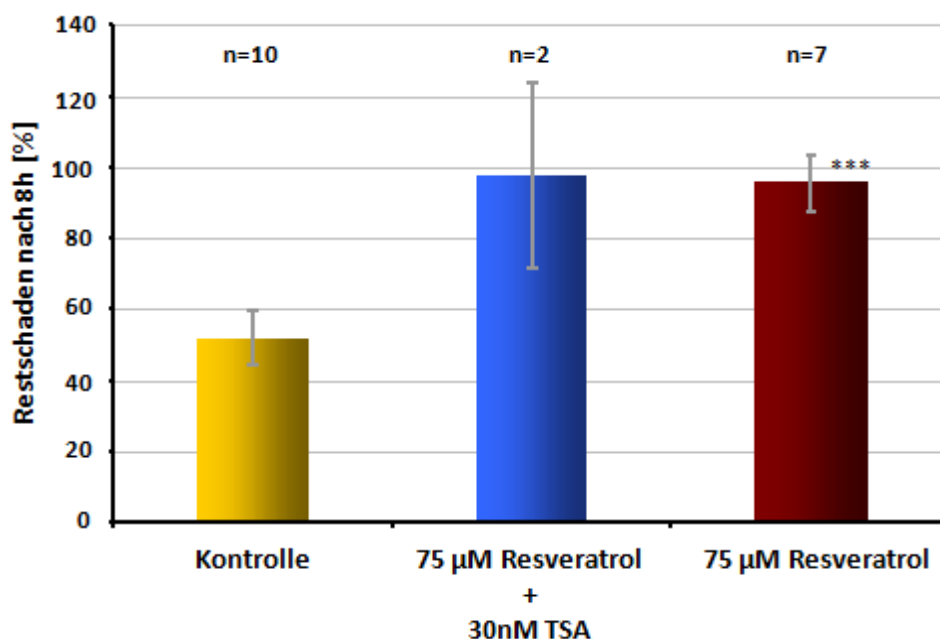


Abbildung 3.28: Restschaden T4-EndoV-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen nach 8h unter Einfluss von Resveratrol und TSA. Die Induktion T4-EndoV-sensitiver Läsionen erfolgte mittels UV-B ( $2,88 \text{ J/m}^2$ , in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit den  $75 \text{ µM}$  Resveratrol und  $30 \text{ nM}$  TSA. Resveratrol und TSA wurden für die Zeit der Schädigung gewaschen, im Anschluss für die jeweilige Reparaturzeit wieder zugegeben. Der Restschaden ist bezogen auf das Ausmaß induzierter Läsionen. Das verwendete Lösungsmittel für beide Substanzen war Ethanol in einer Endkonzentration von  $0,2 \text{ %}$ . Mittelwerte  $\pm$  SD

Aufgrund dieser Daten und den Reparaturdaten mit dem SIRT1-Inhibitor EX-527 lässt sich schließen, dass die durch Resveratrol beobachtete Verlangsamung der DNA-Reparatur nicht alleine auf Veränderungen in der Chromatinstruktur zurückgeführt werden kann.

### 3.1.10 Einfluss von DTT auf die durch Resveratrol verlangsamte Reparatur oxidativer DNA-Schäden

Die durch Resveratrol verursachte Verlangsamung der Reparatur könnte also andere Ursachen als die Kondensation der Chromatinstruktur haben. So wäre es denkbar, dass durch Resveratrol ein gewisser oxidativer Stress induziert wird, welcher aufgrund Oxidation wichtiger Reparaturproteine eine verlangsamte Schadensreparatur erklären könnte (Eiberger, 2008). Um diese Möglichkeit zu überprüfen wurden AS52-Zellen wie zuvor beschrieben mit 50 nM Ro19-8022 und sichtbarem Licht geschädigt und für die 3-stündige Reparaturzeit 1 mM DTT (D,L-Dithiotreitol) zugegeben. Die Zugabe von DTT würde oxidierte Proteine wieder reduzieren und somit die so verlangsamte Reparatur normalisieren. Wie die Abbildung 3.29 zeigt, hat DTT auf die Reparatur der unbehandelten Zellen einen tendenziell beschleunigenden Einfluss. In annähernd gleichem Maße wird auch die Reparatur der mit Resveratrol behandelten Zellen beschleunigt. Dies ist allerdings nicht signifikant. DTT vermag den inhibitorischen Effekt von Resveratrol auf die Reparatur nicht aufzuheben.

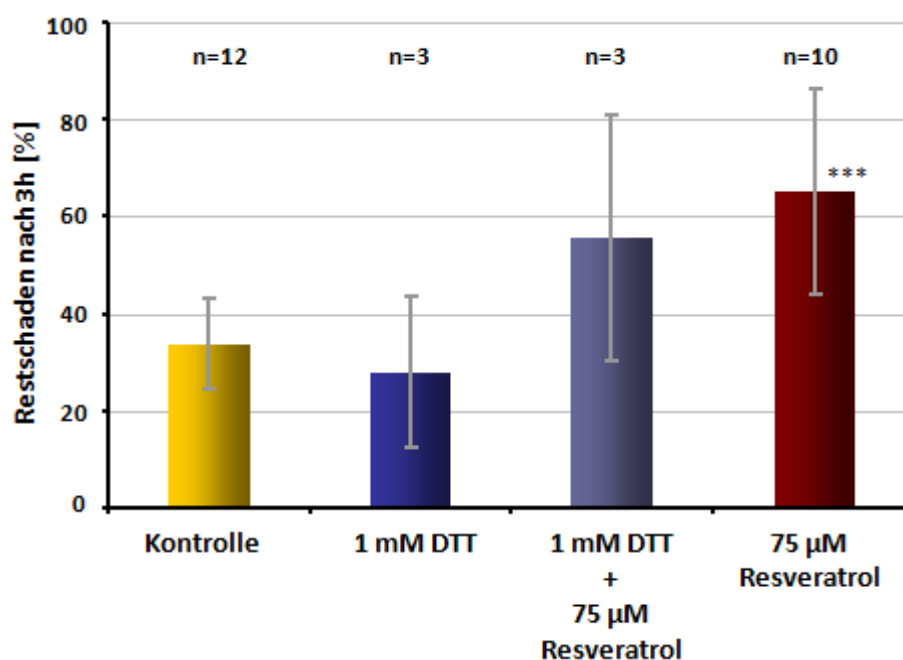


Abbildung 3.29: Restschaden Fpg-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen nach 3h unter Einfluss von Resveratrol und DTT Die Induktion Fpg-sensitiver Läsionen erfolgte mittels 50 nM Ro19-8022 + Licht (10 min, 166 kJ/m<sup>2</sup>, 0°C, in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 75 µM Resveratrol. Resveratrol wurde für die Zeit der Schädigung gewaschen, im Anschluss für die 3-stündige Reparaturzeit wieder zugegeben. 1 mM DTT wurde für die 3-stündige Reparaturzeit zusätzlich zugegeben. Der Restschaden ist bezogen auf das Ausmaß induzierter Läsionen. Das verwendete Lösungsmittel war Ethanol (Resveratrol) in einer Endkonzentration von 0,1% und H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> (DTT). Mittelwerte +/- SD

In ähnlicher Weise ließe sich die beobachtete Reparaturverlangsamung durch erniedrigte zelluläre Glutathion-Spiegel erklären. So führt eine Depletion von Glutathion mit BSO ebenso wie oxidativer Stress zu einer Inhibierung der Reparatur (Eiberger, 2008). Die Bestimmung des Gesamt-Glutathiongehalts in AS52-Zellen erfolgte nach 24-stündiger Resveratrolinkubation wie in 2.2.7



beschrieben. Der Gesamt-Glutathiongehalt wurde auf die Proteinmenge bezogen (Abbildung 3.30), wobei die Gesamtproteinmenge pro  $10^6$  Zellen in den unterschiedlich behandelten Zellen nahezu identisch war (50 – 60  $\mu\text{g}$  /  $10^6$  Zellen). Die niedrigen Resveratrolkonzentrationen 10  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  zeigen keinen Einfluss auf die GSH-Spiegel, wohingegen 75  $\mu\text{M}$  Resveratrol diese signifikant ansteigen lässt. Die durch Resveratrol verlangsamte Reparatur scheint hiermit also nicht in Verbindung zu stehen.

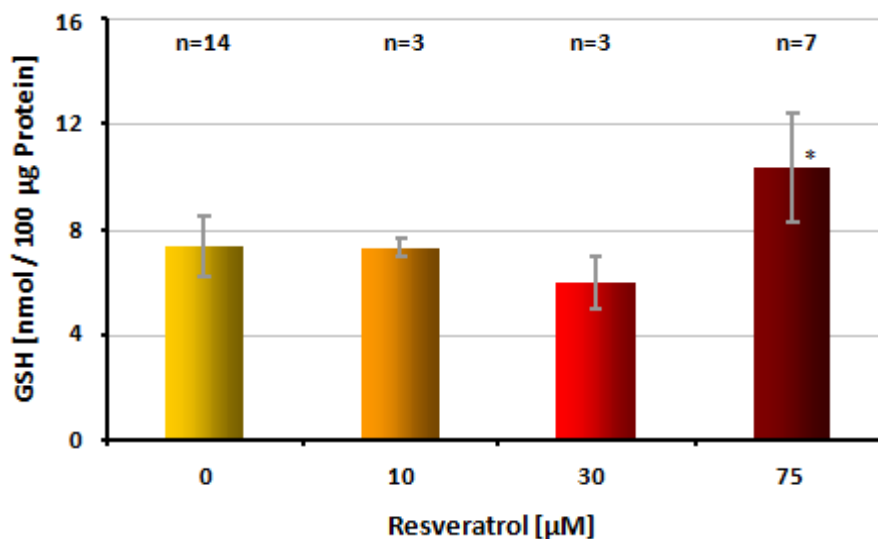


Abbildung 3.30: Gesamt-Glutathiongehalt in AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol Der Gesamt-Glutathiongehalt und die Proteinmengen wurden nach 24-stündiger Inkubationszeit mit den angegebenen Resveratrolkonzentrationen gemessen wie in 2.2.7 und 2.2.8 beschrieben. Das für Resveratrol verwendete Lösungsmittel war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1%. Mittelwerte  $\pm$  SD

Da SIRT1 eine wichtige Rolle beim Schutz vor oxidativem Stress zugeschrieben wird (Pardo et al., 2011) und somit die Erhöhung der Glutathionspiegel durch Resveratrol SIRT1-abhängig sein könnte, wurde eine Beeinflussung der durch Resveratrol erhöhten Glutathionspiegel durch den bereits beschriebenen SIRT1-Inhibitor EX-527 untersucht. Wie der Abbildung 3.31 zu entnehmen ist, hat der SIRT1-Inhibitor alleine nach 24-stündiger Inkubation keinen Einfluss auf den Glutathiongehalt von AS52-Zellen. Auch in Kombination mit Resveratrol ist kein Unterschied festzustellen. Die durch 75 $\mu\text{M}$  Resveratrol erhöhten GSH-Spiegel bleiben unverändert hoch.

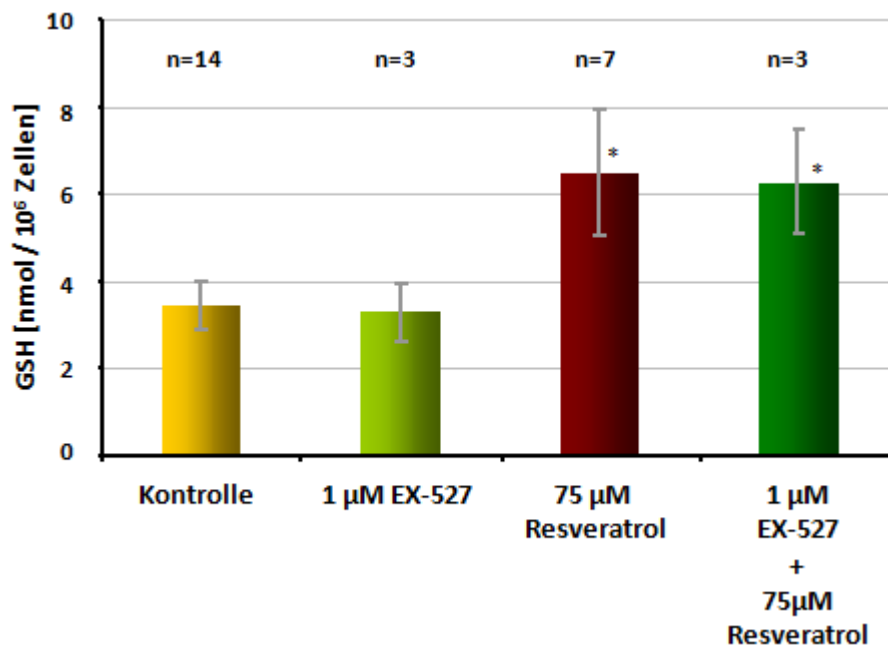


Abbildung 3.31: Gesamt-Glutathiongehalt unter Einfluss von Resveratrol und dem SIRT1-Inhibitor EX-527 in AS52-Zellen. Der Gesamt-Glutathiongehalt wurde nach 24-stündiger Inkubationszeit mit den 75  $\mu\text{M}$  Resveratrol und 1  $\mu\text{M}$  EX-527 gemessen (s. auch Abbildung 3.30). Das verwendete Lösungsmittel für beide Substanzen war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,2%. Mittelwerte  $\pm$  SD.

### 3.1.10.1 Einfluss eines MEK- und eines p38-Inhibitors auf die durch Resveratrol verlangsamte Reparatur

Resveratrol wird ein modulierender Einfluss auf die MAP-Kinasen-Signalkaskade zugesprochen (Maher et al., 2011). So soll Resveratrol aktivierend auf die Phosphorylierung von ERK 1/2 wirken und somit downstream die Translokation von Nrf2 in den Zellkern fördern. Hierdurch kommt es zu einer Erhöhung der antioxidativen Stressantwort. Generell können MAP-Kinasen wie p38 und ERK 1/2 auch indirekt, z.B. durch oxidativen Stress, aktiviert werden. Aus dieser Überlegung heraus sollten der MEK-Inhibitor U-0126 und der p38-Inhibitor PD 169316 in Kombination mit Resveratrol im Reparaturversuch getestet werden. Die für die beiden Inhibitoren verwendeten Konzentrationen wurden der Literatur entnommen (Gonzalez-Aragon et al., 2010; Goueli, 1998). Nach Schädigung der Zellen mit UV-B und 8-stündiger Reparaturzeit ist ersichtlich (Abbildung 3.32), dass keiner der beiden Inhibitoren die durch Resveratrol verursachte Reparaturinhibition aufzuheben vermag. Eine alleinige Behandlung der Zellen mit den Inhibitoren beeinflusst die Reparatur im Vergleich zu Kontrollzellen nicht.

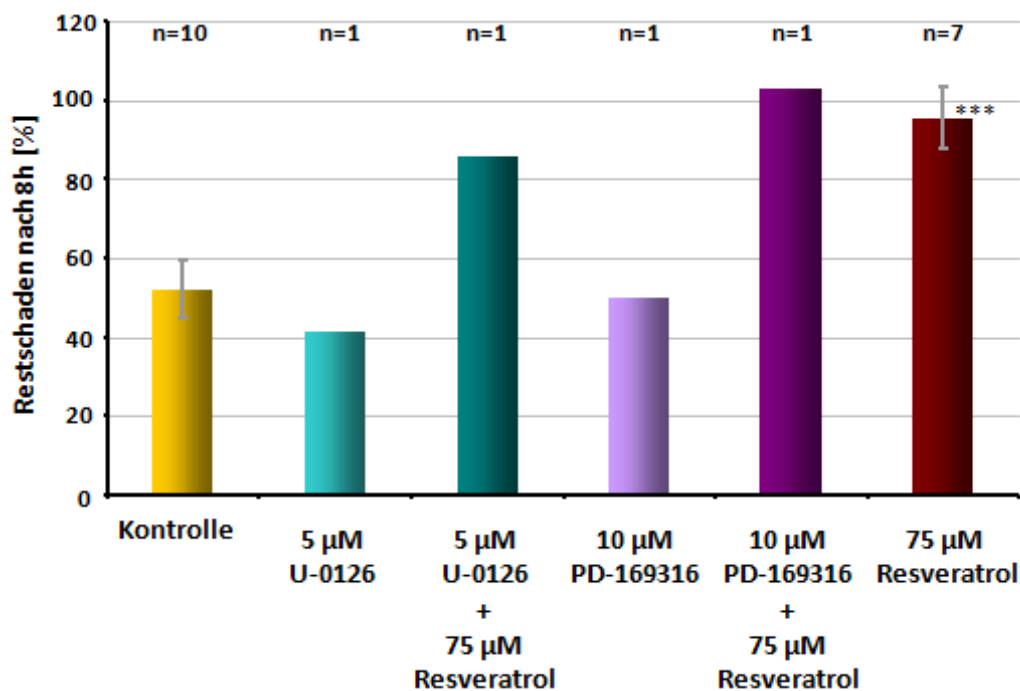


Abbildung 3.32: Restschaden T4-EndoV-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen nach 8h unter Einfluss von Resveratrol und U-0126 / PD 169316 Die Induktion T4-EndoV-sensitiver Läsionen erfolgte mittels UV-B ( $2,88 \text{ J/m}^2$ , in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit  $75 \mu\text{M}$  Resveratrol und  $5 \mu\text{M}$  U-0126 bzw.  $10 \mu\text{M}$  PD169316. Resveratrol und U-0126 / PD169316 wurden für die Zeit der Schädigung gewaschen, im Anschluss für die jeweilige Reparaturzeit wieder zugegeben. Der Restschaden ist bezogen auf das Ausmaß induzierter Läsionen. Die verwendeten Lösungsmittel waren Ethanol (Resveratrol und PD169316) in einer Konzentration von 0,1% / 0,2% und DMSO (U-0126) in einer Konzentration von 0,1 % . Mittelwerte +/- SD

Der Einfluss der MAPK-Inhibitoren sollte ebenfalls auf die Reparatur oxidativer Basenmodifikationen nach Schädigung mit Ro19-8022 und sichtbarem Licht untersucht werden. Dies war jedoch nicht möglich, da beide Inhibitoren nach 24-stündiger Inkubation in Kombination mit Ro19-8022 und sichtbarem Licht eine deutliche Toxizität zeigen. Dies wurde bestätigt durch Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit unter diesen Bedingungen (Abbildung 3.33). Allerdings ist bereits die Bestrahlung ohne Ro19-8022 ausreichend, um im Fall von PD 169316 das Hochwachsen von Klonen nahezu komplett zu unterbinden. Im Fall von U-0126 ist die Toxizität erst in Kombination mit Ro19-8022 deutlich zu sehen. Die MAPK-Signalwege scheinen für die AS52-Zellen wichtiger zu sein nach Bestrahlung in Gegenwart von Ro19-8022 bzw. sichtbarem Licht als nach Bestrahlung mit UV-B.

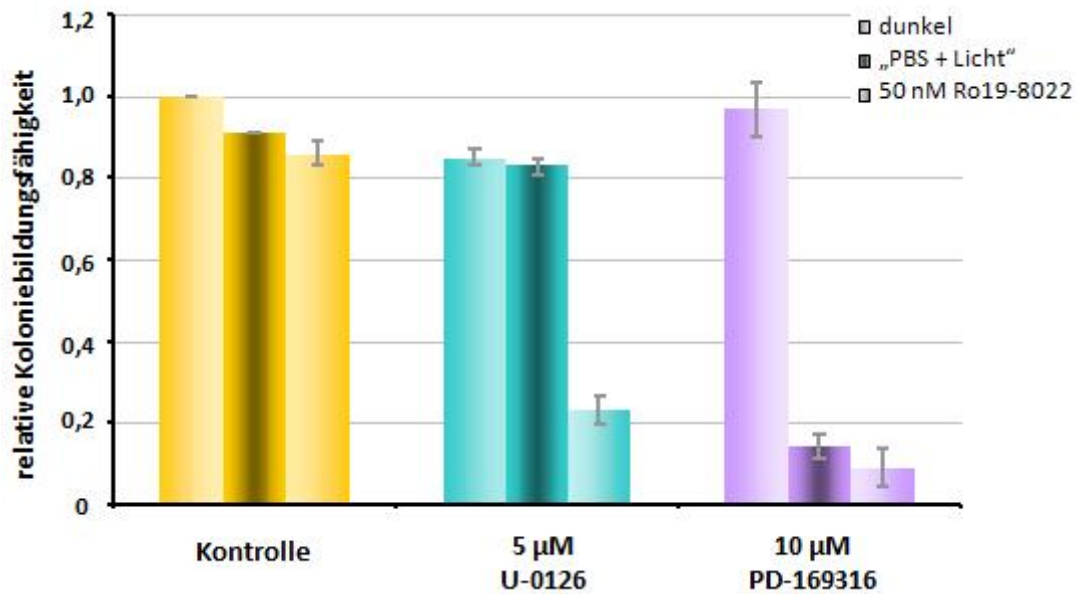


Abbildung 3.33: Koloniebildungsfähigkeit in AS52-Zellen unter Einfluss von Ro19-8022 und U-0126 / PD 169316 Zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit wurden 200 Zellen ausgestreut, nach 24h erfolgte die Zugabe von 10 µM PD169316 bzw. 5 µM U-0126 für eine 24-stündige Inkubationszeit. Im Anschluss wurden die Substanzen in PBSCMF gewaschen und es erfolgte die Schädigung mit 50 nM Ro19-8022 + Licht. Die Zellen wurden nun in reinem Zellkulturmedium für 7-8 Tage zu Kolonien hochwachsen gelassen. Zur Bestimmung der relativen Koloniebildungsfähigkeit wurde die Anzahl hochgewachsener Klone der mit den Inhibitoren behandelten Proben bezogen auf die Anzahl an Klonen der unbehandelten Kontrolle. Das verwendete Lösungsmittel war Ethanol (PD169316) und DMSO (U-0126) in einer Endkonzentration von 0,1 %. Mittelwerte +/- SD

Auch die durch Resveratrol beobachtete Erhöhung der Glutathionspiegel könnte über den MAPK-Signalweg vermittelt sein, und der Einfluss der beiden MAPK-Inhibitoren sollte deshalb überprüft werden. Wie die Abbildung 3.34 zeigt, hat der MEK-Inhibitor alleine keinerlei Einfluss auf den Gesamtglutathiongehalt im Vergleich zur Kontrolle. In Kombination mit Resveratrol sind die GSH-Spiegel ebenfalls unverändert im Vergleich zu Resveratrol alleine, woraus geschlossen werden kann, dass die durch Resveratrol bewirkte Erhöhung der GSH-Spiegel nicht ERK-vermittelt sind. Im Fall einer Inhibierung von p38 mit PD169316 sind bereits durch den Inhibitor alleine die GSH-Spiegel deutlich gesenkt im Vergleich zur Kontrolle und nicht reproduzierbar. Dies könnte in Zusammenhang mit der beobachteten Toxizität des Inhibitors stehen (Abbildung 3.33), weshalb die Daten hier nicht gezeigt werden.

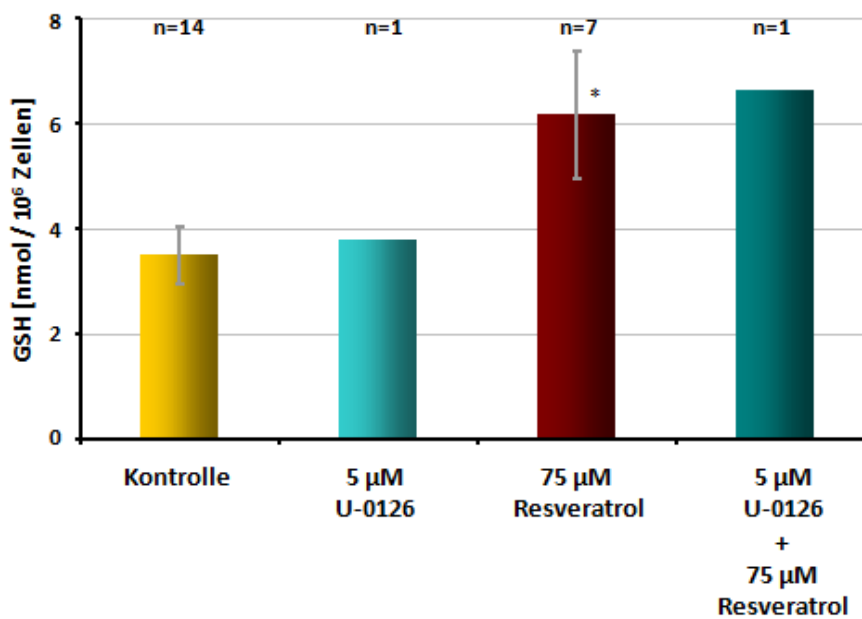


Abbildung 3.34: Gesamt-Glutathiongehalt unter Einfluss von Resveratrol und dem MEK-Inhibitor U-0126 in AS52-Zellen. Der Gesamt-Glutathiongehalt wurde nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 75  $\mu$ M Resveratrol und 5  $\mu$ M U-0126 gemessen. Das verwendete Lösungsmittel war Ethanol (Resveratrol) in einer Endkonzentration von 0,1 % und DMSO (U-0126) in einer Endkonzentration von 0,1 %. Mittelwerte  $\pm$  SD

### 3.1.10.2 Einfluss von Resveratrol auf die p53-Expression in AS52-Zellen

Ein weiteres möglicherweise durch Resveratrol beeinflusstes Target, über das sich eine verlangsamte Reparatur erklären ließe, ist p53. Zum einen ist p53 ein bekanntes Target von SIRT1 (s. 1.7.4). Es wird durch SIRT1 deacetyliert und somit vermehrt abgebaut (Iyengar and Farnham, 2011). Resveratrol könnte so über SIRT1-Aktivierung diesen Effekt verstärken. Zum anderen wurde über Resveratrol eine ERK-vermittelte Erhöhung der p53-Ser15 Phosphorylierung und somit der p53-abhängigen Induktion der Apoptose berichtet (Lin et al., 2006). Um nun eine mögliche Beeinflussung der p53-Expression durch Resveratrol in AS52-Zellen zu untersuchen, wurden Western Blots angefertigt. Hierfür wurden Zellen mit oder ohne 75  $\mu$ M Resveratrolbehandlung (24h) mit verschiedenen Dosen UV-B bestrahlt, um die Expression von p53 anzuregen. Im Anschluss an die Bestrahlung wurden die Zellen 4 Stunden im Brutschrank inkubiert und die Zellextrakte für den Western Blot hergestellt. Abbildung 3.35 zeigt den Blot, der für die folgenden Diagramme mit der Image J-Software ausgewertet wurde. Die p53-Expression wurde hierbei in Relation zur  $\beta$ -Actin-Ladekontrolle gesetzt.

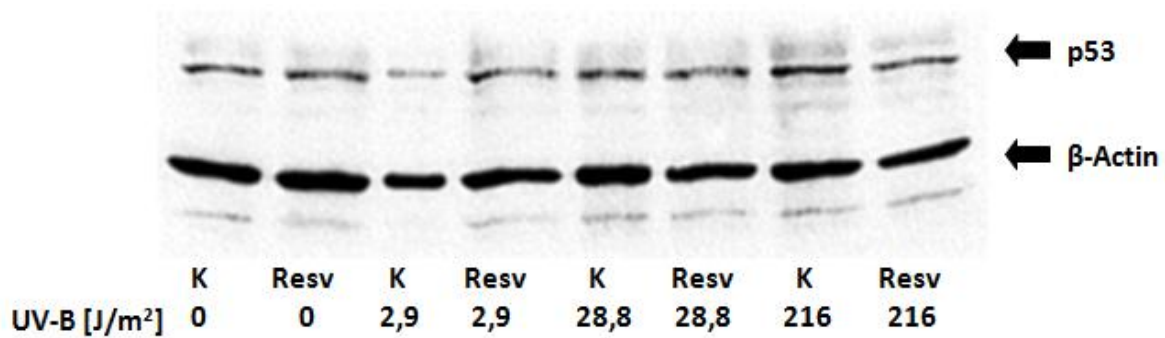


Abbildung 3.35: Western Blot der Expression von p53 nach UV-B Bestrahlung

Das Diagramm (Abbildung 3.36) zeigt, dass eine 24-stündige Behandlung der Zellen mit 75  $\mu$ M Resveratrol die p53-Expression nicht verändert. Auch eine anschließende Bestrahlung der Zellen mit UV-B zeigt keine deutliche Veränderung der p53-Expression (Abbildung 3.37). Nach den höheren Dosen 28,8 und 216 J/m<sup>2</sup> UV-B sieht man eine Tendenz zu leicht erhöhten p53-Spiegeln. Dieser Effekt ist in Kontroll- und mit Resveratrol behandelten Zellen identisch.

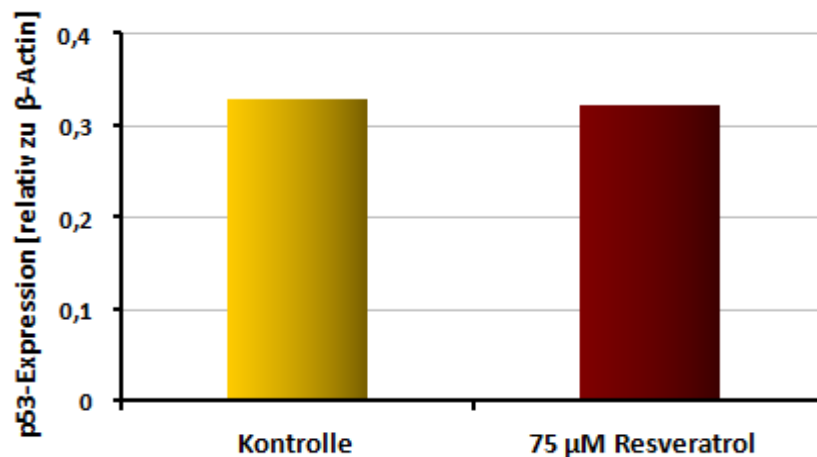


Abbildung 3.36: Einfluss von Resveratrol auf die p53-Expression in AS52-Zellen Die Zellen wurden 24 + 4h mit oder ohne 75  $\mu$ M Resveratrol inkubiert (Kontrolle = 0  $\mu$ M Resveratrol), im Anschluss Zellextrakte hergestellt und ein Western Blot angefertigt (s. 2.2.10.2), die Auswertung erfolgte mit Image J, die p53-Expression ist relativ zur  $\beta$ -Actin-Ladekontrolle angegeben. Primärer AK p53 sc-6243, sekundärer AK goat anti-rabbit IgG-HRP sc-2004; Primärer AK  $\beta$ -Actin sc-47778, sekundärer AK goat anti-mouse IgG-HRP sc-2005.

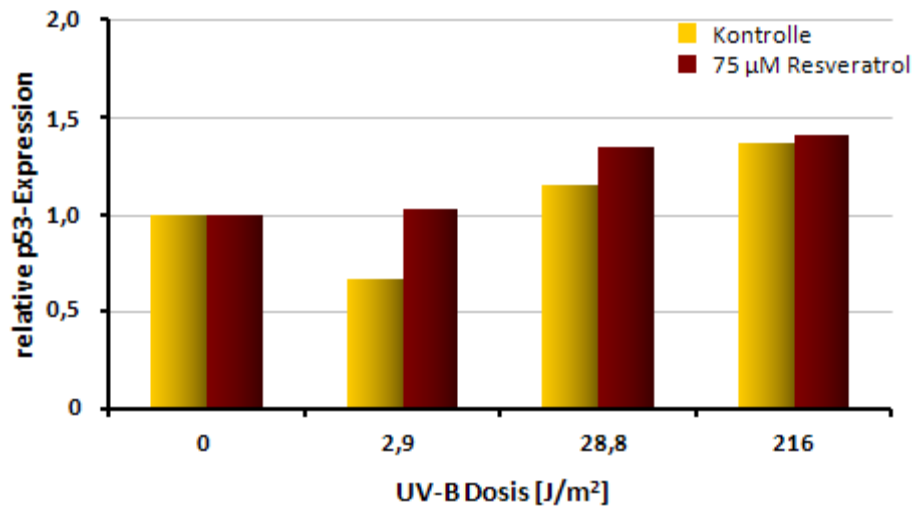


Abbildung 3.37: Einfluss einer UV-B Bestrahlung auf die p53-Expression in AS52-Zellen. Die Zellen wurden 24h mit oder ohne 75 µM Resveratrol inkubiert (Kontrolle = 0 µM Resveratrol), im Anschluss mit den angegebenen Dosen UV-B bestrahlt und die Zellen für weitere 4h unter Zugabe von Resveratrol (oder ohne) im Brutschrank inkubiert. Danach wurden Zellextrakte hergestellt und ein Western Blot angefertigt (s. 2.2.10.2), die Auswertung erfolgte mit Image J. Die p53-Expression aller Proben wurde bezogen auf die jeweilige  $\beta$ -Actin-Ladekontrolle. Die Expressionen der mit UV-B bestrahlten Proben sind relativ zur Expression der unbestrahlten Proben angegeben. Primärer AK p53 sc-6243, sekundärer AK goat anti-rabbit IgG-HRP sc-2004; Primärer AK  $\beta$ -Actin sc-47778, sekundärer AK goat anti-mouse IgG-HRP sc-2005.

Um einen möglichen kleinen Einfluss von Resveratrol auf p53 besser sehen zu können, wurden die Zellen zusätzlich mit dem p53-Aktivator ( $\pm$ )-Nutlin-3 behandelt. Der Western Blot ist in Abbildung 3.38 zu sehen.

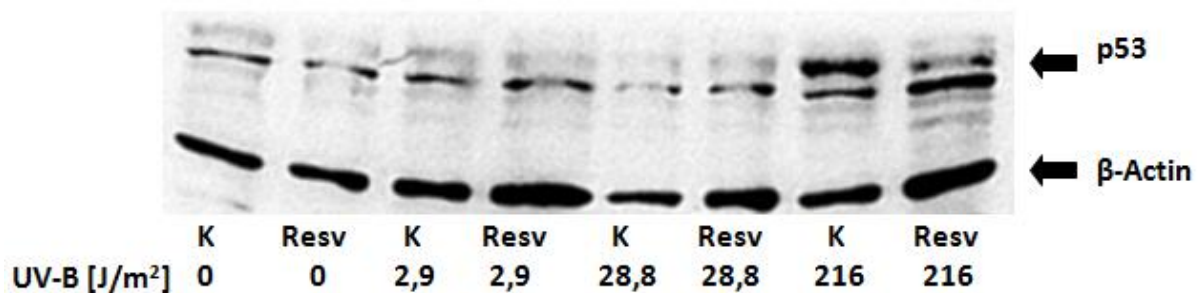


Abbildung 3.38: Western Blot der Expression von p53 nach UV-B Bestrahlung und ( $\pm$ )-Nutlin-3 Behandlung

Eine Auswertung ergibt (Abbildung 3.39), dass ( $\pm$ )-Nutlin-3 in unbestrahlten AS52-Zellen lediglich einen leicht aktivierenden Einfluss auf die p53-Expression ausübt. In den mit Resveratrol behandelten Zellen ist dieser etwas deutlicher als in Kontrollzellen.

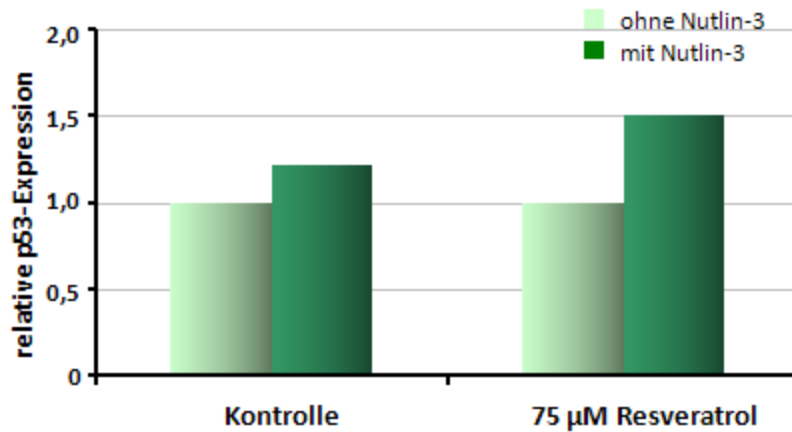


Abbildung 3.39: Einfluss von ( $\pm$ )-Nutlin-3 auf die p53-Expression in AS52-Zellen Die Zellen wurden 24 + 4h mit oder ohne 75  $\mu$ M Resveratrol (Kontrolle = 0  $\mu$ M Resveratrol), sowie mit oder ohne 10  $\mu$ M ( $\pm$ )-Nutlin-3 inkubiert, im Anschluss Zellextrakte hergestellt und ein Western Blot angefertigt (s. 2.2.10.2), die Auswertung erfolgte mit Image J. Die p53-Expression aller Proben ist relativ zur  $\beta$ -Actin-Ladekontrolle berechnet. Die Expressionen der Proben mit ( $\pm$ )-Nutlin-3 ist relativ zu den Expressionen der Proben ohne ( $\pm$ )-Nutlin-3 angegeben. Primärer AK p53 sc-6243, sekundärer AK goat anti-rabbit IgG-HRP sc-2004; Primärer AK  $\beta$ -Actin sc-47778, sekundärer AK goat anti-mouse IgG-HRP sc-2005.

Nach Bestrahlung mit UV-B zeigt sich erst nach der höchsten Dosis von 216 J/m<sup>2</sup> eine Erhöhung der p53-Expression auf das 1,5- bis 2-fache (Abbildung 3.40). Die Vorbehandlung mit Resveratrol hat keinen Einfluss auf die Expressionserhöhung von p53 durch UV-B. Eine Beteiligung von p53 an der durch Resveratrol beobachteten Verlangsamung der DNA-Reparatur scheint aufgrund dieser Ergebnisse nicht wahrscheinlich.

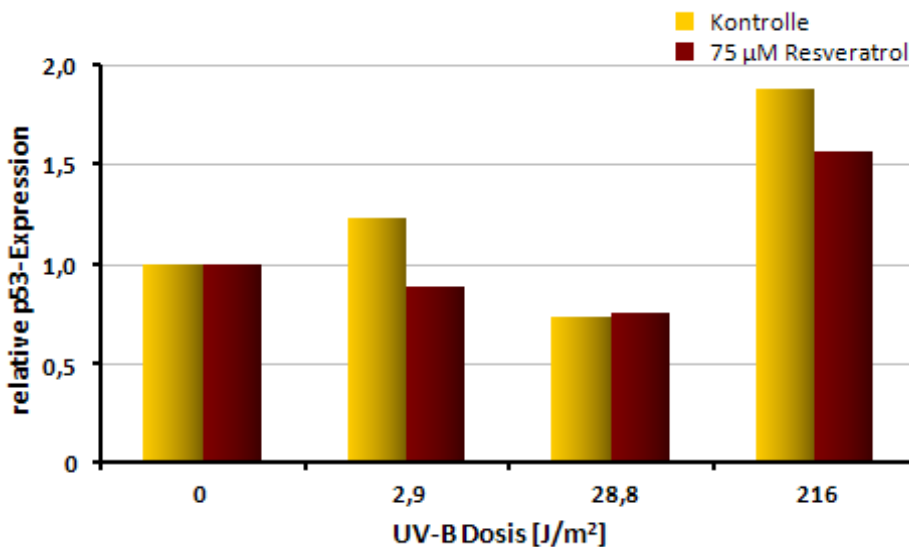


Abbildung 3.40: p53-Expression nach ( $\pm$ )-Nutlin-3 Behandlung und UV-B Bestrahlung in AS52-Zellen Die Zellen wurden 24h mit oder ohne 75  $\mu$ M Resveratrol (Kontrolle = 0  $\mu$ M Resveratrol), sowie alle Proben mit 10  $\mu$ M ( $\pm$ )-Nutlin-3 inkubiert, im Anschluss mit den angegebenen Dosen UV-B bestrahlt und die Zellen für weitere 4h unter Zugabe von Resveratrol (oder ohne) und ( $\pm$ )-Nutlin-3 im Brutschrank inkubiert. Danach wurden Zellextrakte hergestellt und ein Western Blot angefertigt (s. 2.2.10.2), die Auswertung erfolgte mit Image J. Die p53-Expression aller Proben wurde bezogen auf die jeweilige  $\beta$ -Actin-Ladekontrolle. Die Expressionen der mit UV-B bestrahlten Proben sind relativ zur Expression der unbestrahlten Proben angegeben. Primärer AK p53 sc-6243, sekundärer AK goat anti-rabbit IgG-HRP sc-2004; Primärer AK  $\beta$ -Actin sc-47778, sekundärer AK goat anti-mouse IgG-HRP sc-2005.



### 3.1.11 Beeinflussung von HeLa-Zellen durch Resveratrol

Nachdem alle bisherigen Versuche in Hamsterzellen durchgeführt wurden, sollten die hier beobachteten Ergebnisse auch in Zellen eines anderen Organismus überprüft werden. Ausgewählt wurden hierfür HeLa-Zellen, bei denen es sich um menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms handelt.

Zunächst erfolgte auch hier eine Proliferationsbestimmung mit einem breiten Konzentrationsbereich Resveratrol über 24 Stunden. Hierbei zeigte sich, dass in HeLa-Zellen bereits ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Resveratrol eine leichte Hemmung der Proliferation zu beobachten ist, die mit steigender Konzentration noch deutlich zunimmt (Abbildung 3.41). Im Gegensatz dazu waren AS52-Zellen durch Resveratrol erst bei höheren Konzentrationen beeinflusst (s. Abbildung 3.2). Auch anhand der Proliferationsfaktoren über den Zeitraum der 24-stündigen Resveratrolinkubation lässt sich erkennen, dass die HeLa-Zellen ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Resveratrol deutlich langsamer wachsen (s. Tabelle 3.1). Dieser Einfluss scheint revertierbar, was ersichtlich wird anhand der Proliferationsfaktoren über den 48-stündigen Zeitraum nach der Resveratrolinkubation. Bis zu einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Resveratrol steigt die Wachstumsrate sogar über die der unbehandelten Kontrolle an. Ein ähnlicher Effekt war ebenfalls in AS52-Zellen zu beobachten (s. Abbildung 3.4). Ab 30  $\mu\text{M}$  Resveratrol ist die Verlangsamung der Reparatur jedoch über den gesamten Zeitraum deutlich zu sehen.

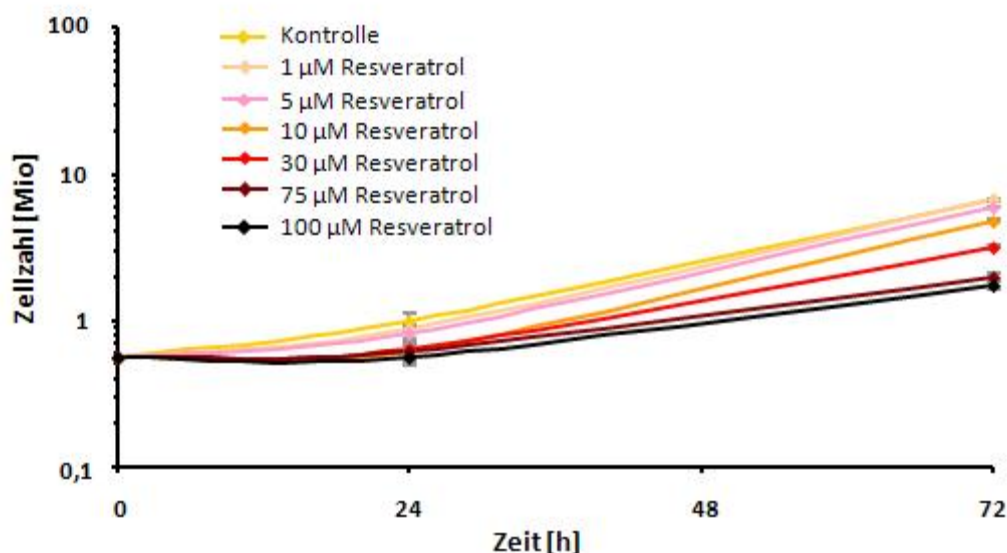


Abbildung 3.41: Proliferation in HeLa-Zellen unter Einfluss von Resveratrol Zur Bestimmung der Proliferation wurden  $0,35 \cdot 10^6$  Zellen ausgestreut, nach 24h erfolgte die Zugabe von Resveratrol für eine 24-stündige Inkubationszeit. Im Anschluss daran wurde Resveratrol in PBSCMF gewaschen und die Zellen in reinem Zellkulturmedium weiter kultiviert. Der Zeitpunkt „0“ entspricht der Resveratrolzugabe. Das verwendete Lösungsmittel für Resveratrol war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %. n = 2, Mittelwerte +/- SD

Tabelle 3.1: Proliferationsfaktoren für HeLa-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Resveratrol  
Die Proliferationsfaktoren für den Zeitraum 0-24h wurden ermittelt aus dem Quotienten der Zellzahlen zum Zeitpunkt 24h und den Zellzahlen zum Zeitpunkt 0h. Die Proliferationsfaktoren für den Zeitraum 24-72h wurden ermittelt aus dem Quotienten der Zellzahl zum Zeitpunkt 72h und den Zellzahlen zum Zeitpunkt 24h.

	Resveratrol [ $\mu\text{M}$ ]						
	0	1	5	10	30	75	100
Proliferationsfaktor 0 – 24h	1,8	1,6	1,5	1,1	1,1	1,1	1,0
Proliferationsfaktor 24 – 72h	6,6	7,5	7,3	7,8	5,1	3,3	3,1

Auch der Einfluss von Resveratrol auf die Glutathion-Spiegel wurde vor Beginn der Untersuchungen zu Induktion und Reparatur von DNA-Schäden bestimmt. Wie in AS52-Zellen erfolgte auch hier die Versuchsdurchführung nach 24-stündiger Resveratrolinkubation. Wie schon bei der Hemmung der Proliferation (s. Abbildung 3.41), reagieren HeLa-Zellen gegenüber Resveratrol empfindlicher als AS52-Zellen. So zeigt sich hier schon mit 30  $\mu\text{M}$  Resveratrol ein signifikant erhöhter Glutathiongehalt, der auch mit 75  $\mu\text{M}$  Resveratrol nicht weiter zunimmt (Abbildung 3.42).

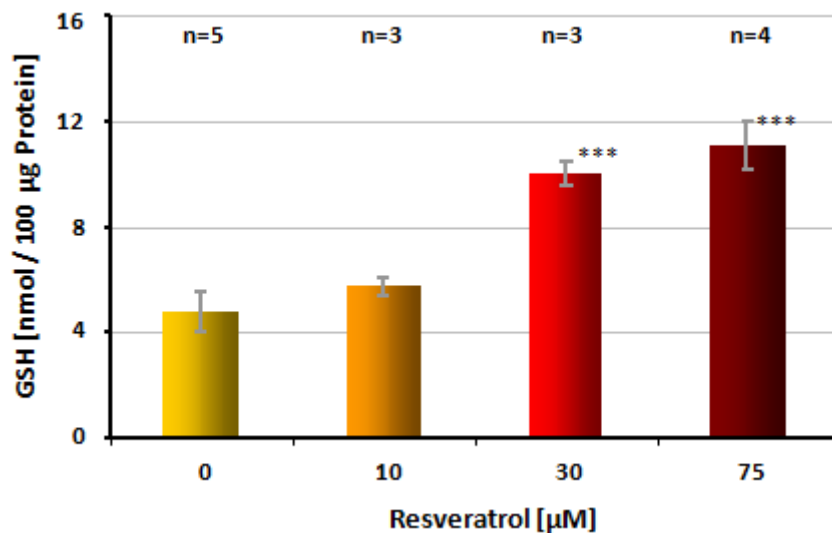


Abbildung 3.42: Einfluss von Resveratrol auf den Gesamt-Glutathiongehalt in HeLa-Zellen Der Gesamt-Glutathiongehalt und die Proteinmengen wurden nach 24-stündiger Inkubationszeit mit den angegebenen Resveratrolkonzentrationen gemessen (s. 2.2.7 und 2.2.8). Das für Resveratrol verwendete Lösungsmittel war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %. Mittelwerte  $\pm$  SD

Das Ausmaß der Fpg-sensitiven Basalspiegel (Abbildung 3.43) ist durch Resveratrol nicht signifikant verändert, aber es gibt eine leichte Tendenz hin zu einem erhöhten Grundschaden.

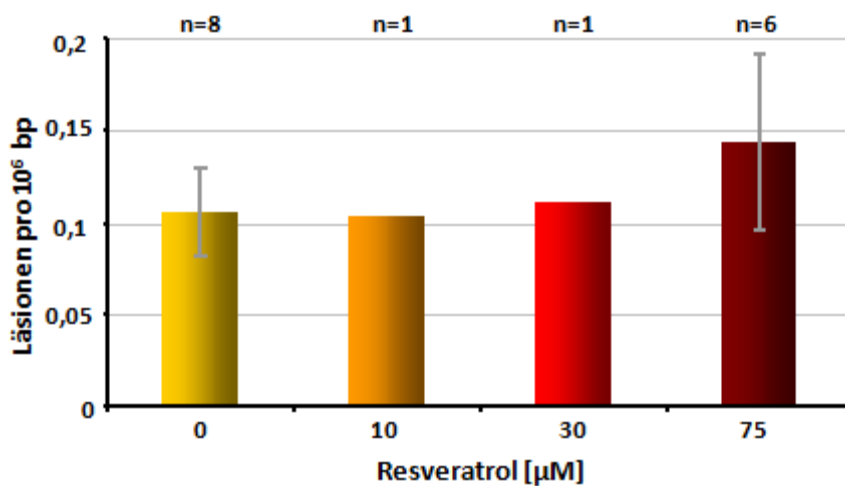


Abbildung 3.43: Einfluss von Resveratrol auf die Basalspiegel Fpg-sensitiver Läsionen in HeLa-Zellen Die Basalspiegel wurden nach 24-stündiger Inkubation mit den angegebenen Resveratrolkonzentrationen mittels Alkalischer Elution gemessen. Das verwendete Lösungsmittel für Resveratrol war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %. Mittelwerte +/- SD

Um ein geeignetes Schadensausmaß oxidativer Läsionen zu induzieren, erfolgte die Bestrahlung mit Licht in HeLa-Zellen in Gegenwart von 100 nM Ro19-8022. Das Ausmaß induzierter Läsionen nach 10 µM Resveratrol ist vergleichbar zur Kontrolle, mit 30 µM und 75 µM Resveratrol zeigt sich eine leichte Erhöhung der induzierten Schäden, welche allerdings nicht signifikant ist (Abbildung 3.44). Im Gegensatz dazu war die Suszeptibilität in AS52-Zellen, zwar nicht signifikant, aber tendenziell eher erniedrigt.

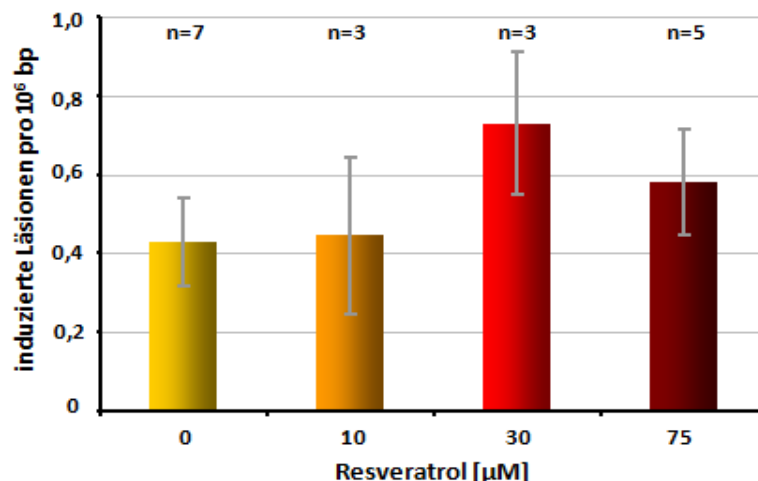


Abbildung 3.44: Einfluss von Resveratrol auf die Induktion Fpg-sensitiver Läsionen in HeLa-Zellen Die Induktion Fpg-sensitiver Läsionen erfolgte mit 100 nM Ro19-8022 (10 min, 332 kJ/m<sup>2</sup>, 0°C, in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit den angegebenen Resveratrolkonzentrationen. Vor der Schädigung wurde Resveratrol in PBSCMF gewaschen. Das verwendete Lösungsmittel für Resveratrol war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %. Mittelwerte +/- SD

Zur Bestimmung der Reparaturgeschwindigkeit wurde die Zahl nicht reparierter Läsionen nach 2h, 3h und 6h in Zellen gemessen, welche mit oder ohne 75 µM Resveratrol behandelt waren. Für die Konzentrationen 10 µM und 30 µM wurde lediglich der Restschaden nach 3h bestimmt. Wie die

Daten in Abbildung 3.45 und Abbildung 3.46 eindeutig zeigen, wird die Reparaturkapazität in HeLa-Zellen durch Resveratrol nicht beeinflusst. Anders als in AS52-Zellen zeigt hier auch die hohe Konzentration von 75  $\mu\text{M}$  Resveratrol eine unbeeinträchtigte Reparatur im Vergleich zur Kontrolle.

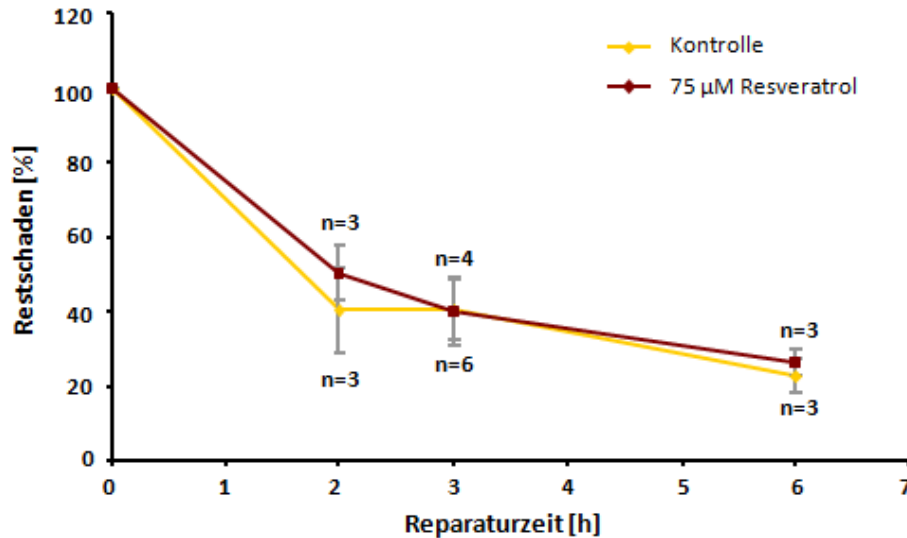


Abbildung 3.45: Reparatur Fpg-sensitiver Läsionen in HeLa-Zellen unter Einfluss von Resveratrol Die Induktion Fpg-sensitiver Läsionen erfolgte mit 100 nM Ro19-8022 (10 min, 332 kJ/m<sup>2</sup>, 0°C, in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 75  $\mu\text{M}$  Resveratrol. Resveratrol wurde für die Zeit der Schädigung gewaschen, im Anschluss für die jeweilige Reparaturzeit wieder zugegeben. Der Restschaden ist bezogen auf das Ausmaß induzierter Läsionen. Das für Resveratrol verwendete Lösungsmittel war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %. Mittelwerte +/- SD

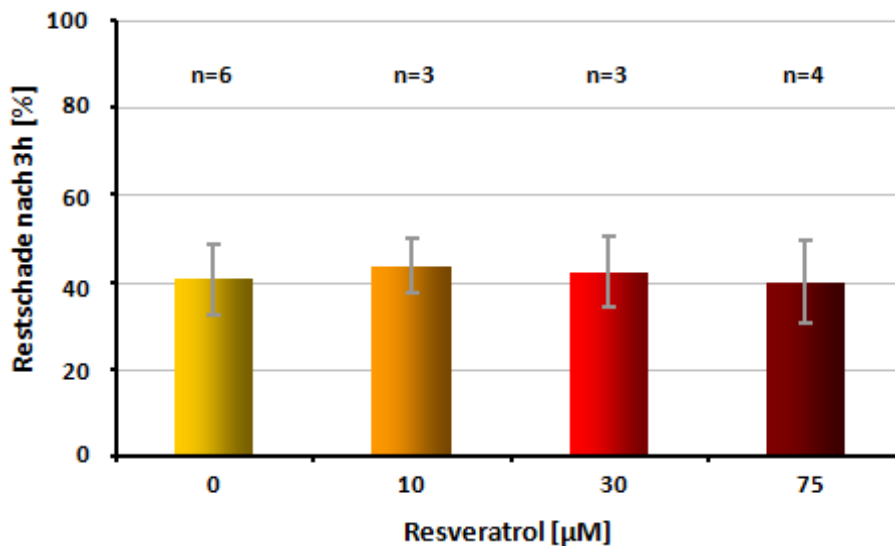


Abbildung 3.46: Restschaden Fpg-sensitiver Läsionen in HeLa-Zellen nach 3h unter Einfluss von Resveratrol Die Induktion Fpg-sensitiver Läsionen erfolgte mit 100 nM Ro19-8022 (10 min, 332 kJ/m<sup>2</sup>, 0°C, in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit Resveratrol. Resveratrol wurde für die Zeit der Schädigung gewaschen, im Anschluss für die 3-stündige Reparaturzeit wieder zugegeben. Der Restschaden ist bezogen auf das Ausmaß induzierter Läsionen. Das für Resveratrol verwendete Lösungsmittel war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %. Mittelwerte +/- SD

Die Basalspiegel T4-EndoV-sensitiver Läsionen, in erster Linie AP-Läsionen, sind durch Resveratrol unbeeinflusst (Abbildung 3.47).

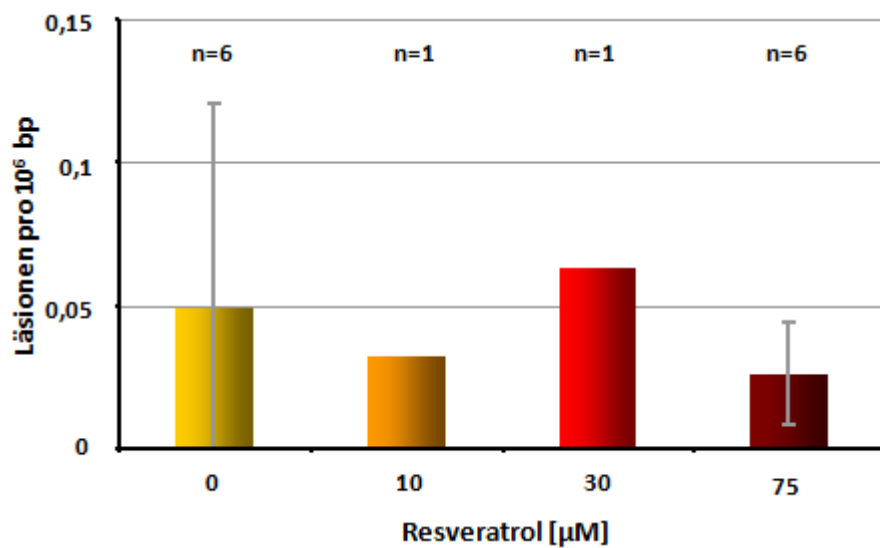


Abbildung 3.47: Einfluss von Resveratrol auf die Basalspiegel T4-EndoV-sensitiver Läsionen in HeLa-Zellen Die Basalspiegel wurden nach 24-stündiger Inkubation mit den angegebenen Resveratrolkonzentrationen mittels Alkalischer Elution gemessen. Das für Resveratrol verwendete Lösungsmittel war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1%. Mittelwerte +/- SD

Die Induktion T4-EndoV-sensitiver Läsionen durch UV-B erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie in AS52-Zellen (s. 3.1.6). Auch hier ist eine durch Resveratrol erhöhte Schadensinduktion erkennbar, die für die Konzentration 75 µM signifikant ist (Abbildung 3.48). Erneut zeigt sich hier, wie schon nach Ro19-8022, in HeLa-Zellen ein deutlicher Einfluss von Resveratrol, anders als in AS52-Zellen (s. 3.1.6).

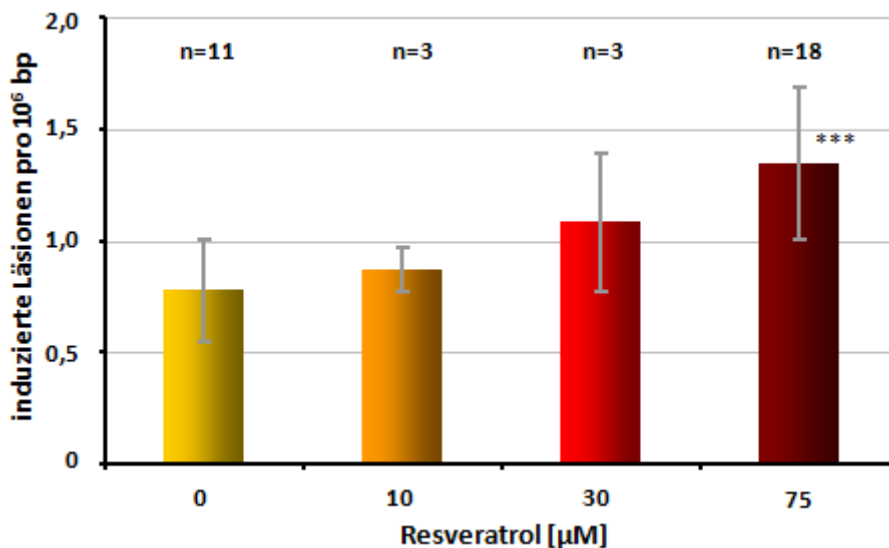


Abbildung 3.48: Einfluss von Resveratrol auf die Induktion T4-EndoV-sensitiver Läsionen in HeLa-Zellen Die Induktion T4-EndoV-sensitiver Läsionen erfolgte mittels UV-B (2,88 J/m<sup>2</sup>, in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit den angegebenen Resveratrolkonzentrationen. Resveratrol wurde vor der Schädigung in PBSCMF gewaschen. Das verwendete Lösungsmittel für Resveratrol war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %. Mittelwerte +/- SD

Im Gegensatz zur Reparatur oxidativer Läsionen zeigt sich nach UV-B unter Einfluss von 75  $\mu\text{M}$  Resveratrol wieder eine leichte Verlangsamung der Reparatur, die nach 16h Reparatur signifikant ist (Abbildung 3.49). Auch die Konzentrationen 10  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  zeigen diese Tendenz (Abbildung 3.50). Allerdings ist der Einfluss von Resveratrol in HeLa-Zellen deutlich geringer als in AS52-Zellen (s. 3.1.6).

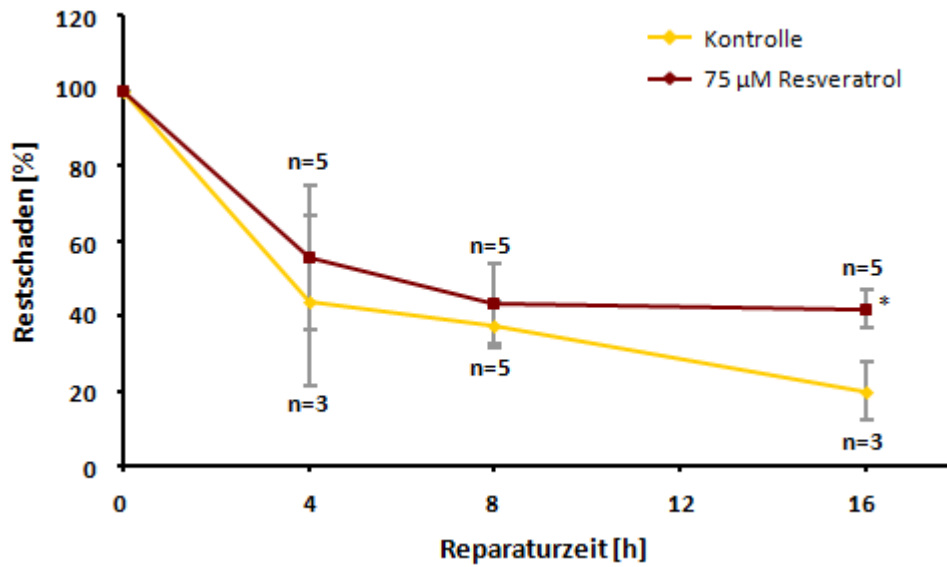


Abbildung 3.49: Reparatur T4-EndoV-sensitiver Läsionen in HeLa-Zellen unter Einfluss von Resveratrol Die Induktion T4-EndoV-sensitiver Läsionen erfolgte mittels UV-B ( $2,88 \text{ J/m}^2$ , in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 75  $\mu\text{M}$  Resveratrol. Resveratrol wurde für die Zeit der Schädigung gewaschen, im Anschluss für die jeweilige Reparaturzeit wieder zugegeben. Der Restschaden ist bezogen auf das Ausmaß induzierter Läsionen. Das verwendete Lösungsmittel für Resveratrol war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %. Mittelwerte  $\pm$  SD

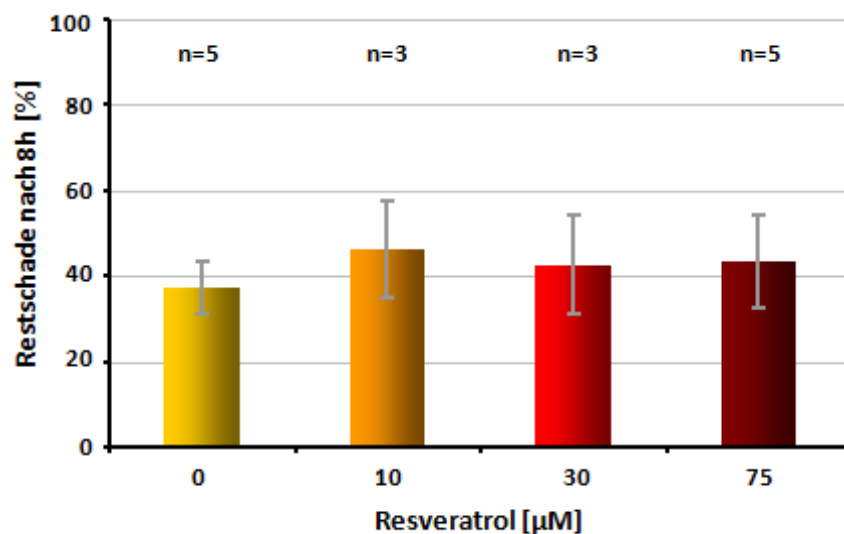


Abbildung 3.50: Restschaden T4-EndoV-sensitiver Läsionen in HeLa-Zellen nach 8h unter Einfluss von Resveratrol Die Induktion T4-EndoV-sensitiver Läsionen erfolgte mittels UV-B ( $2,88 \text{ J/m}^2$ , in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit Resveratrol. Resveratrol wurde für die Zeit der Schädigung gewaschen, im Anschluss für die 8-stündige Reparaturzeit wieder zugegeben. Der Restschaden ist bezogen auf das Ausmaß induzierter Läsionen. Das für Resveratrol verwendete Lösungsmittel war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %. Mittelwerte  $\pm$  SD

---

Die in AS52-Zellen durch Resveratrol beobachteten Effekte können also nur zum Teil auf den anderen Zelltyp HeLa übertragen werden. So zeigen sich hinsichtlich Proliferation und Glutathionspiegeln die gleichen Einflüsse in beiden Zelllinien, wenn auch mit unterschiedlicher Empfindlichkeit. Bezogen auf Schadensinduktion und Reparatur allerdings ist der Einfluss von Resveratrol eher gegensätzlich (bezüglich Schadensinduktion s. Abbildung 3.11, Abbildung 3.15, Abbildung 3.44 und Abbildung 3.48) oder zumindest deutlich weniger bis gar nicht ausgeprägt (bezüglich Reparatur s. Abbildung 3.12, Abbildung 3.16, Abbildung 3.45 und Abbildung 3.49).

#### 3.1.11.1 Einfluss von Resveratrol auf die Entstehung spontaner Mutationen in AS52- Zellen

Um mögliche Konsequenzen des Einflusses von Resveratrol auf Suszeptibilität und Reparatur zu prüfen, sollte ein Einfluss von Resveratrol auf die Entstehung von Mutationen untersucht werden. Wie bereits in 2.2.6.2 beschrieben, eignet sich die AS52-Zelllinie zur Untersuchung spontan entstehender Mutationen und wurde daher für alle Versuche herangezogen. Die Kultivierung der Zellen über die Generationen erfolgte unter permanenter Anwesenheit von Resveratrol im Zellkulturmedium. Es wurde für den Versuch eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Resveratrol verwendet. Die AS52-Zellen wurden vor Versuchsbeginn fünf Tage in Cleansing-Medium kultiviert, um bereits vorhandene Mutanten abzutöten (s. 2.2.6.1). Wie die Abbildung 3.51 deutlich zeigt, hat Resveratrol in der Konzentration 10  $\mu\text{M}$  keinerlei Einfluss auf die Entstehung spontaner Mutationen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Eine höhere Resveratrolkonzentration konnte für dieses Versuchsmodell nicht verwendet werden, da die Verlangsamung der Proliferation die Messungen über die Generationen erschweren und das Ergebnis vermutlich verfälschen würde.

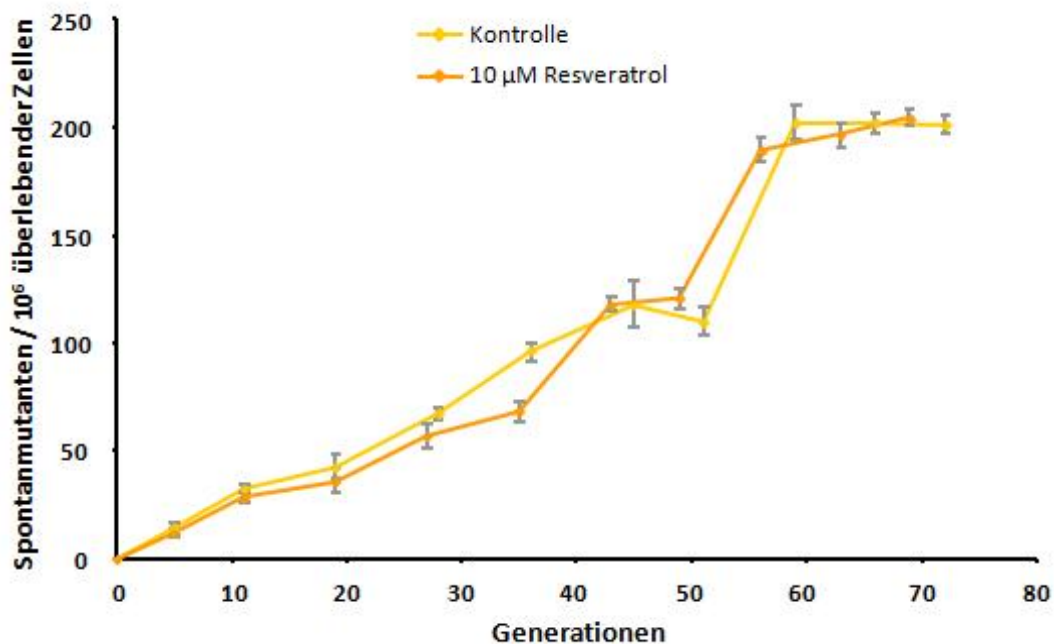


Abbildung 3.51: Spontane Mutationen in AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol Die spontanen Mutationsraten wurden bestimmt in regelmäßigen Abständen über die angegebenen Generationen hinweg. 10  $\mu\text{M}$  Resveratrol waren permanent im Zellkulturmedium anwesend (s. 2.2.6.2). Das für Resveratrol verwendete Lösungsmittel war Ethanol in einer Konzentration von 0,1 %. Die spontanen Mutanten und die Generationen wurden für die jeweilige Koloniebildungsfähigkeit korrigiert. Mittelwerte  $\pm$  SD

### 3.1.12 Einfluss von Resveratrol auf die Entstehung induzierter Mutationen in AS52- Zellen

Um einen Einfluss von Resveratrol auf die Entstehung induzierter Mutationen zu untersuchen, wurden AS52-Zellen wie in 2.2.6.3 beschrieben mit Resveratrol behandelt. Nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 10  $\mu\text{M}$  Resveratrol erfolgte die Schadensinduktion mit verschiedenen Dosen UV-B. Im Anschluss daran wurden die Zellen entweder in normalem Zellkulturmedium weiterkultiviert, oder aber für weitere 48h mit 10  $\mu\text{M}$  Resveratrol inkubiert. Im Anschluss an diese 48h wurden die Zellen abgelöst und jeweils  $10^6$  Zellen wieder ausgestreut. Dies erfolgte nach weiteren vier Tagen erneut, damit manifestierte Mutationen weitergegeben werden können. Nach weiteren drei Tagen wurden die Zellen wie beschrieben ausplattiert und für 7-8 Tage zu Kolonien hochwachsen gelassen (s. 2.2.6.3). Die Induktion von Mutationen erfolgt in dem verwendeten UV-B-Dosisbereich linear. Wie die Abbildung 3.52 zeigt, hat die 24-stündige Vorinkubation von Resveratrol vor UV-B-Bestrahlung keinen Einfluss auf das Ausmaß entstehender Mutationen. Auch die anschließende Inkubation für weitere 48h bringt keine Änderung der Zahl induzierter Mutationen mit sich.



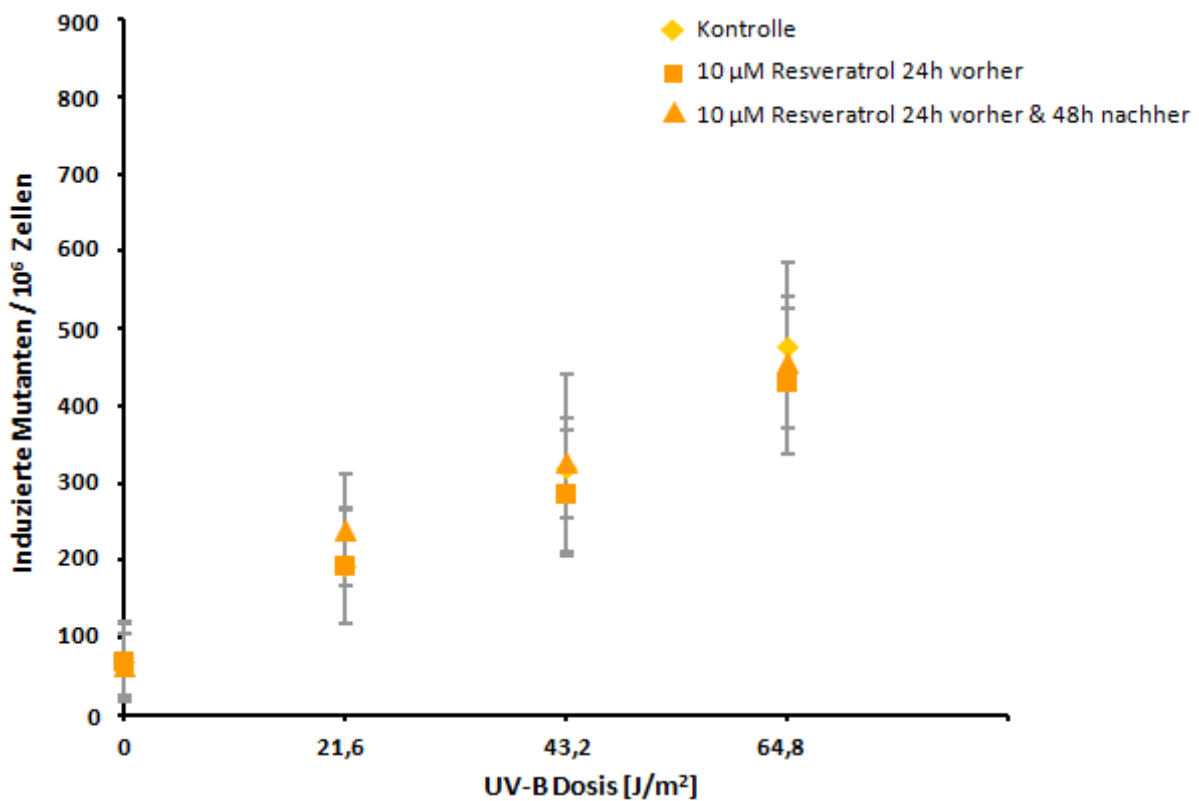


Abbildung 3.52: Induzierte Mutationen in AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol Die Induktion der Mutationen erfolgte mittels UV-B (21,6 J/m<sup>2</sup>, 43,2 J/m<sup>2</sup> und 64,8 J/m<sup>2</sup>, in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 10 μM Resveratrol. Resveratrol wurde für die Zeit der Schädigung gewaschen und wenn angegeben im Anschluss an die Schädigung für weitere 48h wieder zugegeben. Das verwendete Lösungsmittel für Resveratrol war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %. n=4; Mittelwerte +/- SD

### 3.1.13 Proliferation von AS52-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Resveratrol

Für den Versuchsablauf zur Bestimmung induzierter Mutationen wurde Resveratrol nicht nur für 24 Stunden zu den Zellen gegeben, wie in allen zuvor gezeigten Versuchen, sondern auch für eine Inkubationszeit von insgesamt 72 Stunden (24h Vorinkubation + 48h nach Bestrahlung). Um sicherzustellen, dass sich die Zellen unter diesen Bedingungen annähernd so teilen wie die Kontrollzellen, was entscheidend ist für die Weitergabe von Mutationen, wurde auch für diese Bedingungen die Proliferation von AS52-Zellen bestimmt. In der für die Mutationsbestimmung verwendeten Resveratrolkonzentration von 10 μM Resveratrol ist auch über eine Inkubationszeit von 72h die Proliferation unbeeinflusst gegenüber der Kontrolle. Erst in höheren Konzentrationen sieht man wieder die deutliche Abnahme der Teilungsrate, weshalb diese für die Mutationsversuche nicht verwendet wurden.

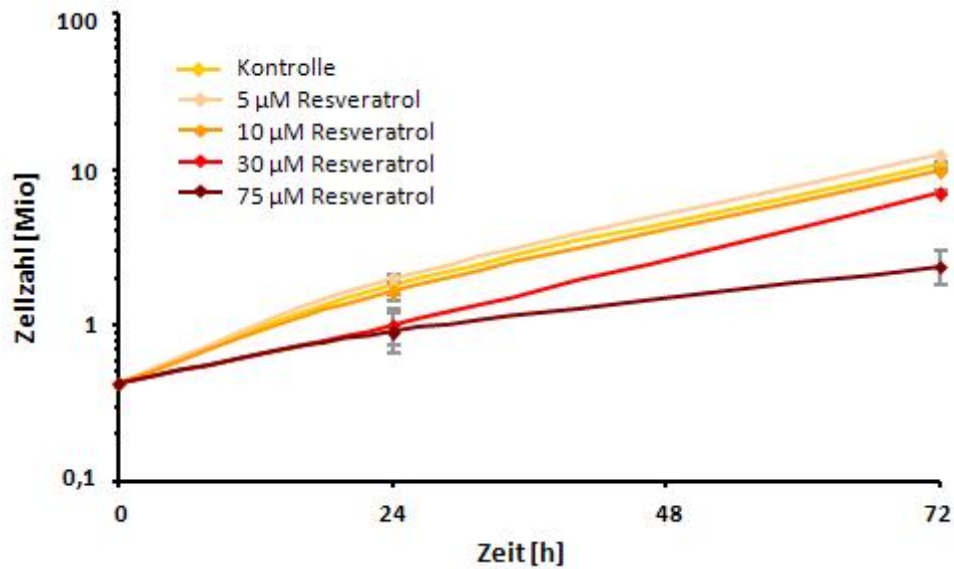


Abbildung 3.53: Proliferation von AS52-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Resveratrol Zur Bestimmung der Proliferation wurden  $0,35 \cdot 10^6$  Zellen ausgestreut, nach 24h erfolgte die Zugabe von Resveratrol für eine 72-stündige Inkubationszeit. Der Zeitpunkt „0“ entspricht der Resveratrolzugabe. Das verwendete Lösungsmittel für Resveratrol war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %. n=2, Mittelwerte +/- SD

### 3.1.13.1 Bestimmung der Zellzyklusverteilung nach 72-stündiger Resveratrolinkubation

Für die verwendete Resveratrolkonzentration von 10 µM wurde ebenfalls die Verteilung der Zellzyklusphasen bestimmt, um den fehlenden Einfluss auf die Zellteilung zu verifizieren. Wie dem Diagramm (Abbildung 3.54) deutlich zu entnehmen ist, ist die Verteilung der Zellzyklusphasen nach 72-stündiger Resveratrolinkubation identisch zur Kontrolle.

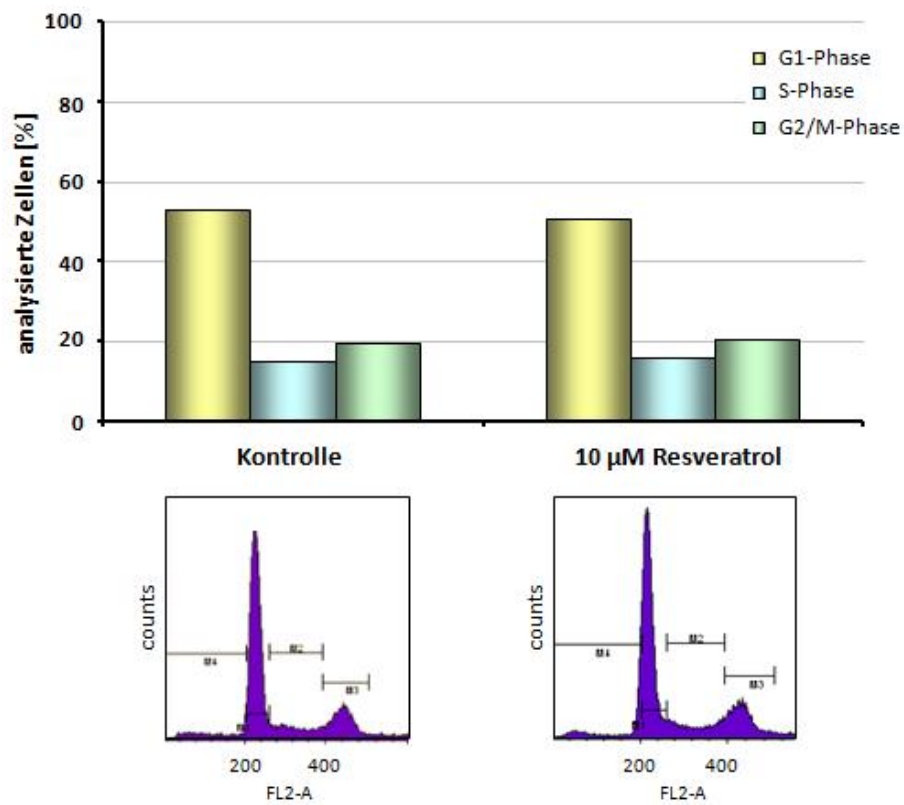


Abbildung 3.54: Zellzyklusverteilung nach 72-stündiger Resveratrolinkubation Die Zellzyklusverteilung wurde durchflusszytometrisch mit Propidiumiodid nach 72-stündiger Resveratrolinkubation bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt die Verteilung der Zellzyklusphasen; apoptotische Zellen bzw. Zellen in G0 sind nicht mit aufgetragen. Das verwendete Lösungsmittel für Resveratrol war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %.

### 3.2 HDAC-Inhibitoren

Um die Beeinflussung von Schadensinduktion, Reparatur und der Entstehung von Mutationen durch eine dekondensierte, offene Chromatinstruktur zu untersuchen wurden AS52-Zellen für 24 Stunden mit den HDAC-Inhibitoren Trichostatin A (TSA) oder Natriumbutyrat (Na-Butyrat, BA) behandelt.

#### 3.2.1 Bestimmung der globalen DNA-Zugänglichkeit unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren

Wie bereits für eine Behandlung mit Resveratrol (s. 3.1.1), sollte auch die Beeinflussung der DNA-Zugänglichkeit durch HDAC-Inhibitoren in AS52-Zellen überprüft werden. Wie der Abbildung 3.55 zu entnehmen ist, resultiert eine 24-stündige Behandlung mit 2 mM Natriumbutyrat und 30 nM TSA in einer erhöhten Zugänglichkeit der DNA für DNase I und somit in einer dekondensierten, offeneren Chromatinstruktur. Eine Behandlung mit 0,3 mM Natriumbutyrat zeigt diesen Effekt unter den vorliegenden Bedingungen noch nicht.

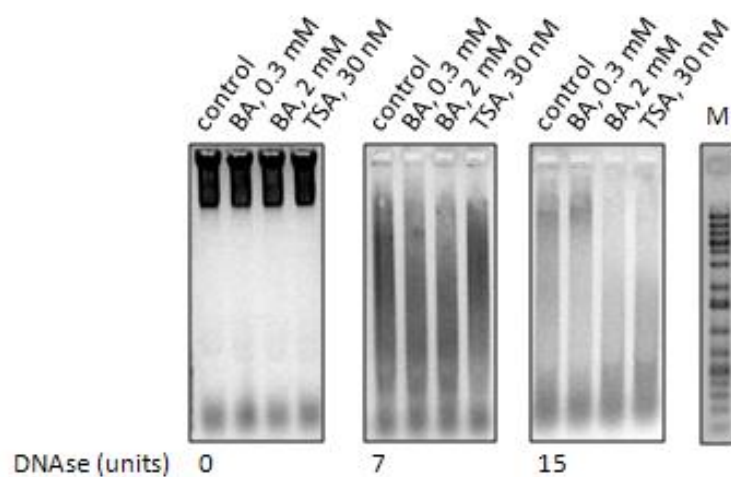


Abbildung 3.55: Globale DNA-Zugänglichkeit unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren Zur Analyse der DNA-Zugänglichkeit wurden AS52-Zellen für 24h mit Na-Butyrat oder TSA behandelt und im Anschluss wie in 2.2.11.2 beschrieben aufgearbeitet. Die DNase-katalysierte Hydrolyse des Chromatins erfolgte mit den jeweiligen Enzymaktivitäten für 30min bei 37°C. Zur Auswertung wurden die Proben im 1,2 %igen Agarosegel aufgetrennt und mittels Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht

#### 3.2.2 Proliferation von AS52-Zellen unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren

Um weiterhin geeignete Konzentrationen für die verwendeten HDAC-Inhibitoren zu ermitteln, wurde eine Bestimmung der Proliferation durchgeführt. Hierzu wurden die beiden HDAC-Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen für 24h zu den Zellen gegeben. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen für weitere 48h in Vollmedium ohne Resveratrol weiterwachsen gelassen. Die Proliferationskurven für eine Behandlung mit Na-Butyrat (Abbildung 3.56) zeigen, dass die Proliferation durch 0,3 mM und 2 mM Na-Butyrat nicht beeinflusst wird. Ab einer Konzentration von 5 mM Butyrat ist eine leichte Verlangsamung des Zellwachstums zu beobachten. Der HDAC-Inhibitor

Trichostatin A zeigt in keiner der verwendeten Konzentrationen von 10 nM bis 50 nM nach 24-stündiger Inkubationszeit eine deutliche Beeinflussung der Proliferation (Abbildung 3.57).

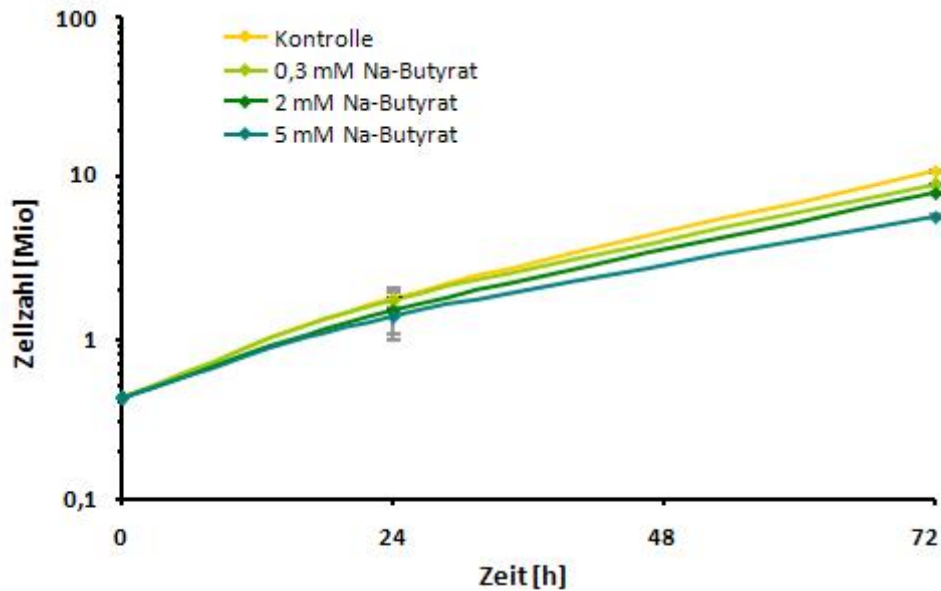


Abbildung 3.56: Proliferation von AS52-Zellen unter Einfluss von Na-Butyrat Zur Bestimmung der Proliferation wurden  $0,35 \cdot 10^6$  Zellen ausgestreut, nach 24h erfolgte die Zugabe der angegebenen Butyratkonzentrationen für eine 24-stündige Inkubationszeit. Im Anschluss wurde Na-Butyrat in PBSCMF gewaschen und die Zellen in reinem Zellkulturmedium weiterkultiviert. Der Zeitpunkt „0“ entspricht der Na-Butyrat-Zugabe. Das verwendete Lösungsmittel für Na-Butyrat war  $H_2O_{dest}$ . n = 2, Mittelwerte +/- SD

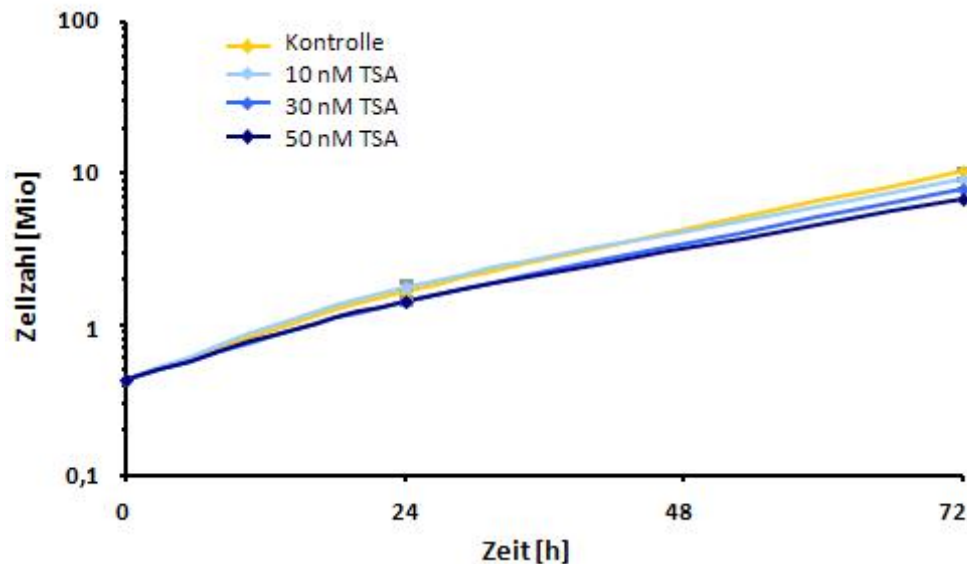


Abbildung 3.57: Proliferation von AS52-Zellen unter Einfluss von Trichostatin A Zur Bestimmung der Proliferation wurden  $0,35 \cdot 10^6$  Zellen ausgestreut, nach 24h erfolgte die Zugabe der angegebenen TSA-Konzentrationen für eine 24-stündige Inkubationszeit. Im Anschluss wurde TSA in PBSCMF gewaschen und die Zellen in reinem Zellkulturmedium weiterkultiviert. Der Zeitpunkt „0“ entspricht der TSA-Zugabe. Das verwendete Lösungsmittel für TSA war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %. n = 2, Mittelwerte +/- SD

Für die weiteren Versuche wurden die HDAC-Inhibitoren in den Konzentrationen 0,3 mM und 2 mM Na-Butyrat sowie 30 nM Trichostatin A verwendet.

### 3.2.3 Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren

Zur Vervollständigung der Daten wurde auch für die beiden HDAC-Inhibitoren Na-Butyrat und Trichostatin A eine Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit durchgeführt. Die Abbildung 3.58 zeigt, dass eine 24-stündige Behandlung der AS52-Zellen bis zu einer Konzentration von 5 mM Na-Butyrat keinen nennenswerten toxischen Einfluss ausübt. Die Fähigkeit zur Ausbildung von Kolonien ist nach allen Konzentrationen Na-Butyrat auf nahezu dem gleichen Niveau wie in der unbehandelten Kontrolle. Auch Trichostatin A zeigt in den hier verwendeten Konzentrationen bis 50 nM keine Toxizität (Abbildung 3.59).

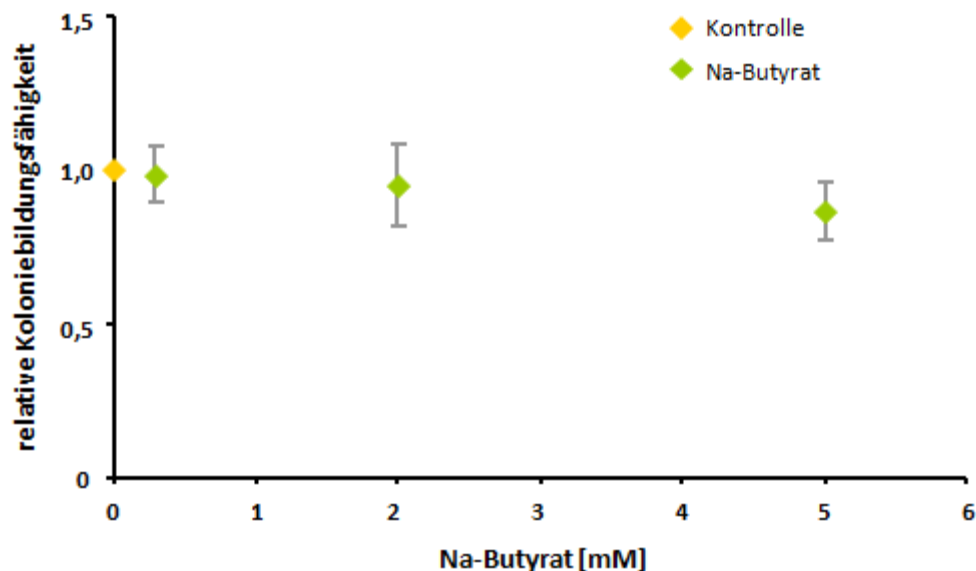


Abbildung 3.58: Koloniebildungsfähigkeit von AS52-Zellen unter Einfluss von Na-Butyrat Zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit wurden 200 Zellen ausgestreut, nach 24h erfolgte die Zugabe der angegebenen Butyratkonzentrationen für eine 24-stündige Inkubationszeit. Im Anschluss wurde Na-Butyrat in PBSCMF gewaschen und die Zellen in reinem Zellkulturmedium weiterkultiviert. Zur Bestimmung der relativen Koloniebildungsfähigkeit wurde die Anzahl hochgewachsener Klone bezogen auf die Anzahl an Klonen der unbehandelten Kontrolle. Das verwendete Lösungsmittel für Na-Butyrat war  $H_2O_{dest}$ . n=2, Mittelwerte +/- SD

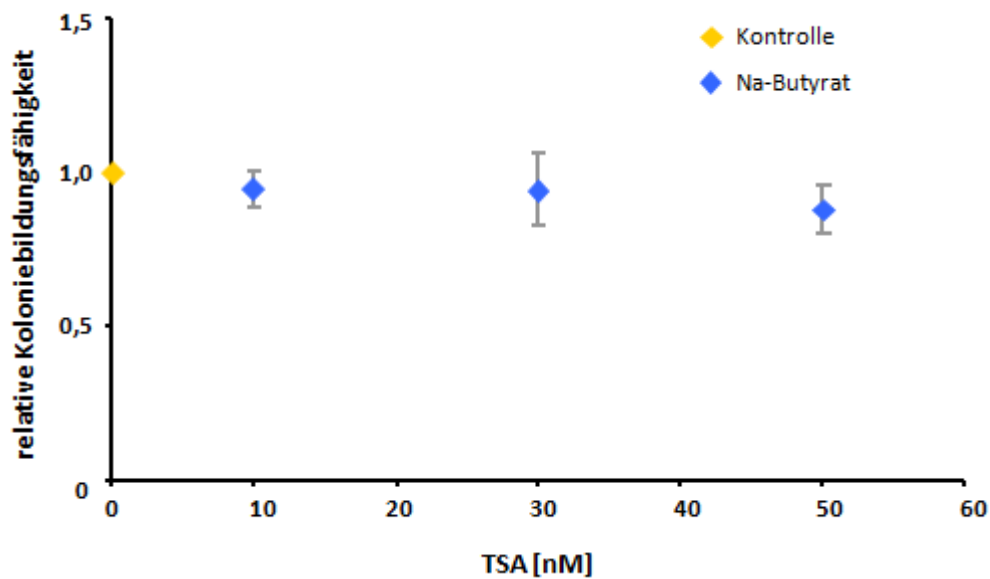


Abbildung 3.59: Koloniebildungsfähigkeit von AS52-Zellen unter Einfluss von Trichostatin A Zur Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit wurden 200 Zellen ausgestreut, nach 24h erfolgte die Zugabe der angegebenen TSA-Konzentrationen für eine 24-stündige Inkubationszeit. Im Anschluss wurde TSA in PBSCMF gewaschen und die Zellen in reinem Zellkulturmedium weiterkultiviert. Zur Bestimmung der relativen Koloniebildungsfähigkeit wurde die Anzahl hochgewachsener Klone bezogen auf die Anzahl an Klonen einer unbehandelten Kontrolle. Das für TSA verwendete Lösungsmittel war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %. n=2, Mittelwerte +/- SD

### 3.2.4 Zellzyklusverteilung in AS52-Zellen unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren

Um eine Beeinflussung der Zellen durch die verwendeten HDAC-Inhibitoren weiter zu charakterisieren, wurde die Verteilung der Zellzyklusphasen nach 24-stündiger Inkubation durchflusszytometrisch bestimmt. Wie der Abbildung 3.60 zu entnehmen ist, bewirkt keine der verwendeten Konzentrationen eine deutliche Veränderung der Zellzyklusverteilung. Lediglich nach 2 mM Na-Butyrat und 30 nM TSA ist eine leichte Abnahme der Zellen in der S-Phase zu sehen, allerdings in einem zu vernachlässigenden Ausmaß.

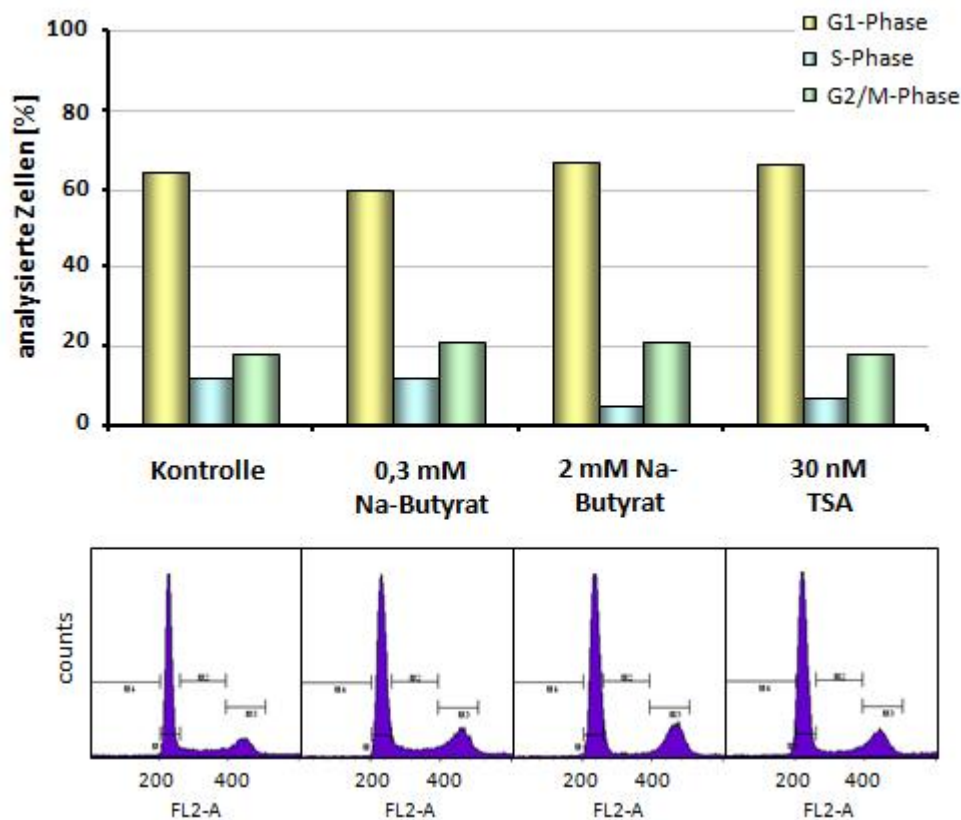


Abbildung 3.60: Zellzyklusverteilung in AS52-Zellen unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren Die Zellzyklusverteilung wurde durchflusszytometrisch mit Propidiumiodid nach 24-stündiger Inkubation mit den angegebenen HDAC-Inhibitoren (Na-Butyrat und Trichostatin A) bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt die Verteilung der Zellzyklusphasen; apoptotische Zellen bzw. Zellen in G0 sind nicht mit aufgetragen. Die verwendeten Lösungsmittel waren  $H_2O_{dest}$  (Na-Butyrat) und Ethanol (TSA) in einer Endkonzentration von 0,1 %. n=1-2

### 3.2.5 Bestimmung des Gesamt-Glutathiongehalts von AS52-Zellen unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren

Desweiteren erfolgte eine Bestimmung des Gesamt-Glutathiongehalts von AS52-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit den HDAC-Inhibitoren. Die Abbildung 3.61 zeigt deutlich, dass eine Behandlung mit Na-Butyrat und TSA in den verwendeten Konzentrationen nicht zu einer Veränderung des Gesamt-Glutathiongehalts bezogen auf die Gesamt-Proteinmenge führt. Letztere war in allen Ansätzen nahezu identisch (ca.  $80 \mu\text{g} / 10^6$  Zellen).



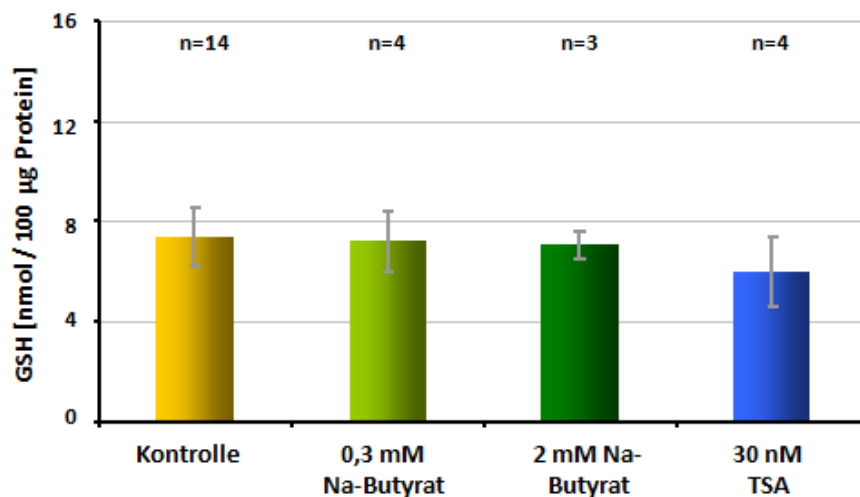


Abbildung 3.61: Gesamt-Glutathiongehalt in AS52-Zellen unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren. Der Gesamt-Glutathiongehalt und die Proteinmengen wurden nach 24-stündiger Inkubationszeit mit den angegebenen HDAC-Inhibitoren (Na-Butyrat und Trichostatin A) gemessen (s. 2.2.7 und 2.2.8). Die verwendeten Lösungsmittel waren  $H_2O_{dest}$  (Na-Butyrat) und Ethanol (TSA) in einer Endkonzentration von 0,1 %. Mittelwerte +/- SD

### 3.2.6 Oxidative Schäden durch Ro19-8022 unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren

Um die Beeinflussung oxidativer Läsionen durch HDAC-Inhibitoren zu untersuchen, wurde, ebenso wie nach Behandlung mit Resveratrol, nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 50 nM Ro19-8022+ Licht für 10 Minuten bei 0°C mit sichtbarem Licht bestrahlt. Der Fpg-sensitive Untergrundschaden (Abbildung 3.62) ist durch die HDAC-Inhibitoren nicht verändert.

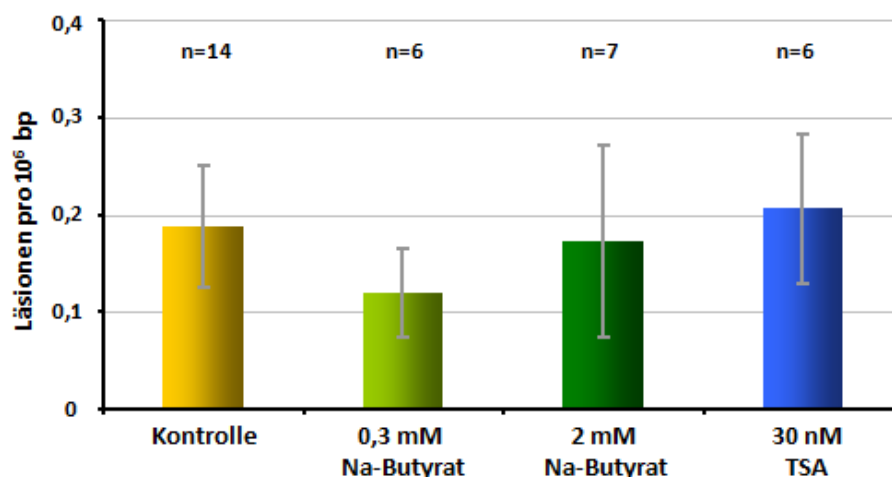


Abbildung 3.62: Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Basalspiegel Fpg-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen. Die Basalspiegel wurden nach 24-stündiger Inkubation mit den angegebenen HDAC-Inhibitoren (Na-Butyrat und Trichostatin A) mittels Alkalischer Elution gemessen. Die verwendeten Lösungsmittel waren  $H_2O_{dest}$  (Na-Butyrat) und Ethanol (TSA) in einer Endkonzentration von 0,1 %. Mittelwerte +/- SD

Das Ausmaß induzierter Fpg-sensitiver Läsionen ist nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren tendenziell erhöht im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3.63). In den Konzentrationen 2 mM Na-Butyrat und 30 nM TSA ist dies signifikant.

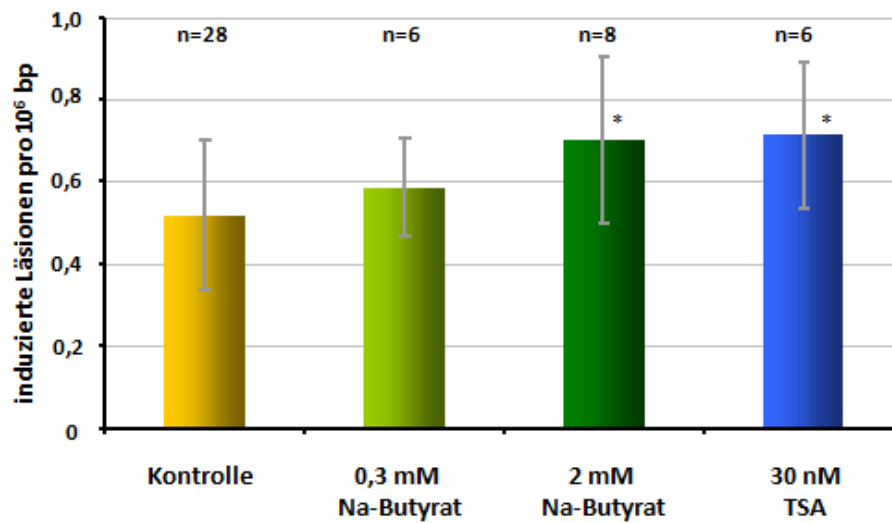


Abbildung 3.63: Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Induktion Fpg-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen Die Induktion Fpg-sensitiver Läsionen erfolgte mittels 50nM Ro19-8022 (10min, 166 kJ/m<sup>2</sup>, 0°C, in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit den angegebenen HDAC-Inhibitoren (Na-Butyrat und Trichostatin A). Vor der Schädigung wurden die Substanzen in PBSCMF gewaschen. Die verwendeten Lösungsmittel waren H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> (Na-Butyrat) und Ethanol (TSA) in einer Endkonzentration von 0,1 %. Mittelwerte +/- SD

Die Reparatur der induzierten oxidativen Läsionen wurde für die Reparaturzeitpunkte 3h und 6h bestimmt (Abbildung 3.64). Die Behandlung mit den angegebenen HDAC-Inhibitoren beeinflusst die Reparaturgeschwindigkeit von AS52-Zellen nicht im Vergleich zur Kontrolle. Die Reparaturkinetiken sind nahezu identisch.

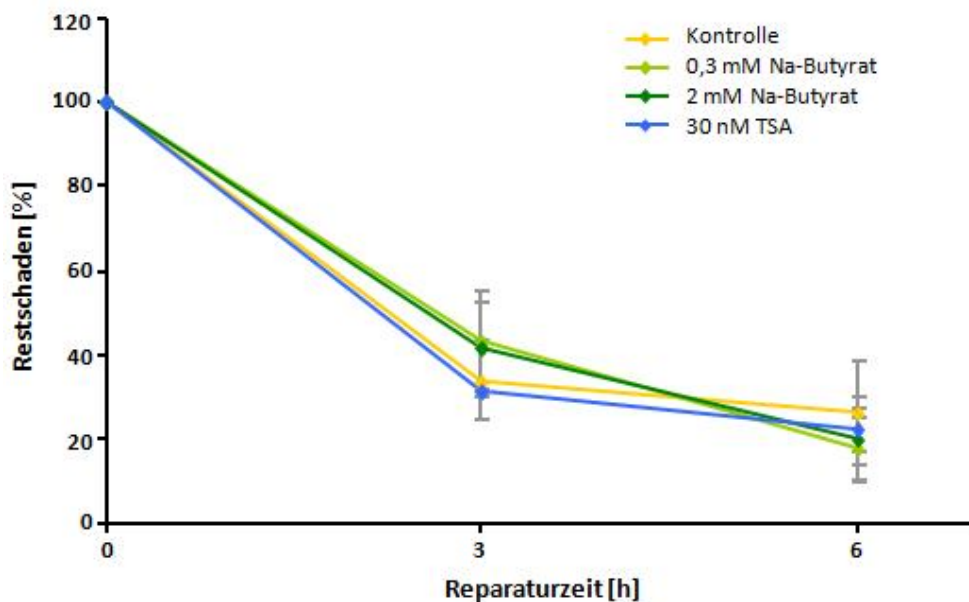


Abbildung 3.64: Reparatur Fpg-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren Die Induktion Fpg-sensitiver Läsionen erfolgte mittels 50 nM Ro19-8022 (10 min, 166 kJ/m<sup>2</sup>, 0°C, in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit den angegebenen HDAC-Inhibitoren (Na-Butyrat und Trichostatin A). HDAC-Inhibitoren wurden für die Zeit der Schädigung weggewaschen, im Anschluss für die jeweilige Reparaturzeit wieder zugegeben. Der Restschaden ist bezogen auf das Ausmaß induzierter Läsionen. Die verwendeten Lösungsmittel waren H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> (Na-Butyrat) und Ethanol (TSA) in einer Endkonzentration von 0,1 %. n: Kontrolle s. Abbildung 3.12, Na-Butyrat 0,3 mM = 3, Na-Butyrat 2 mM = 4, TSA = 3; Mittelwerte +/- SD

### 3.2.7 DNA-Schäden durch UV-B unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren

Auch ein Einfluss auf T4-EndoV-sensitive Läsionen durch UV-B durch die verwendeten HDAC-Inhibitoren sollte untersucht werden. Die Schädigungsbedingungen entsprechen auch hier denen der „Resveratrolbehandlung“ (s. 3.1.6). Die T4-EndoV-sensitiven Basalspiegel (v.a. AP-Läsionen) sind durch die verwendeten HDAC-Inhibitoren nicht verändert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 3.65).

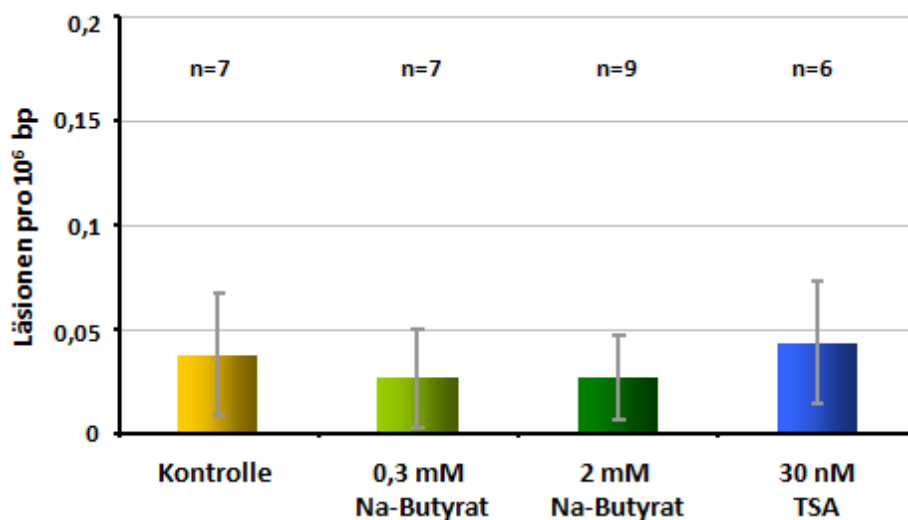


Abbildung 3.65: Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Basalspiegel T4-EndoV-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen. Die Basalspiegel wurden nach 24-stündiger Inkubation mit den angegebenen HDAC-Inhibitoren (Na-Butyrat und Trichostatin A) mittels alkalischer Elution gemessen. Die verwendeten Lösungsmittel waren  $H_2O_{dest}$  (Na-Butyrat) und Ethanol (TSA) in einer Endkonzentration von 0,1 %. Mittelwerte  $\pm$  SD.

Die Induktion T4-EndoV-sensitiver Läsionen nach UV-B ist auch hier, genau wie nach Ro19-8022 + Licht (s. Abbildung 3.63), nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren tendenziell leicht erhöht. Allerdings ist dies hier nicht signifikant. Wie schon bei der Ergebnisbesprechung der mit Resveratrol behandelten AS52-Zellen nach UV-B erwähnt (s. 3.1.6), ist eine Beeinflussung der Schadensinduktion durch UV-B-Strahlung aber auch nicht zu erwarten.

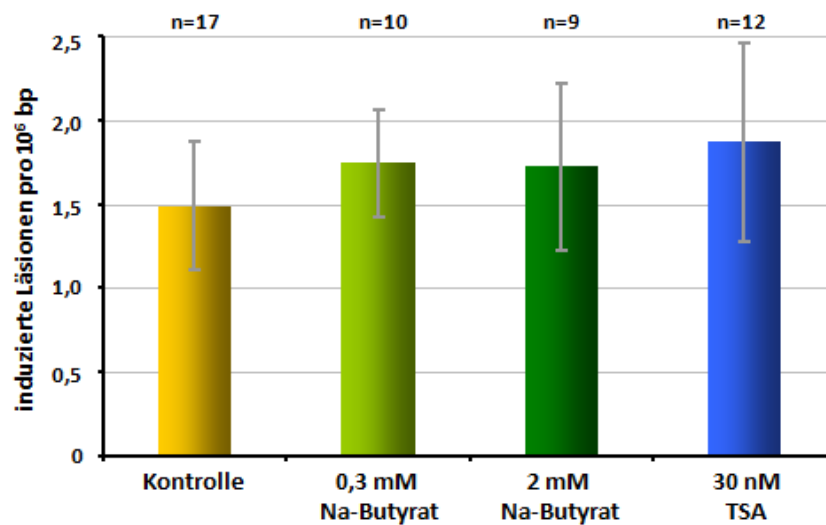


Abbildung 3.66: Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Induktion T4-EndoV-sensitiver Läsionen Die Induktion T4-EndoV-sensitiver Läsionen erfolgte mittels UV-B (2,88 J/m<sup>2</sup>, in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit den angegebenen HDAC-Inhibitoren (Na-Butyrat und Trichostatin A). Vor der Schädigung wurden die Substanzen in PBSCMF gewaschen. Die verwendeten Lösungsmittel waren H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> (Na-Butyrat) und Ethanol (TSA) in einer Endkonzentration von 0,1 %. Mittelwerte +/- SD

Die Reparatur induzierter T4-EndoV-sensitiver Schäden wurde zu den Reparaturzeitpunkten 4h, 8h und 16h bestimmt (Abbildung 3.67). Ebenso wie nach Ro19-8022 in Kombination mit Licht (s. Abbildung 3.64) haben auch hier die HDAC-Inhibitoren keinerlei Einfluss auf die Reparaturgeschwindigkeit im Vergleich zur Kontrolle. Die Werte der Reparaturzeitpunkte 8h und 16h sind für die Proliferationsfaktoren korrigiert, um „Verdünnungseffekte“ auszuschließen.

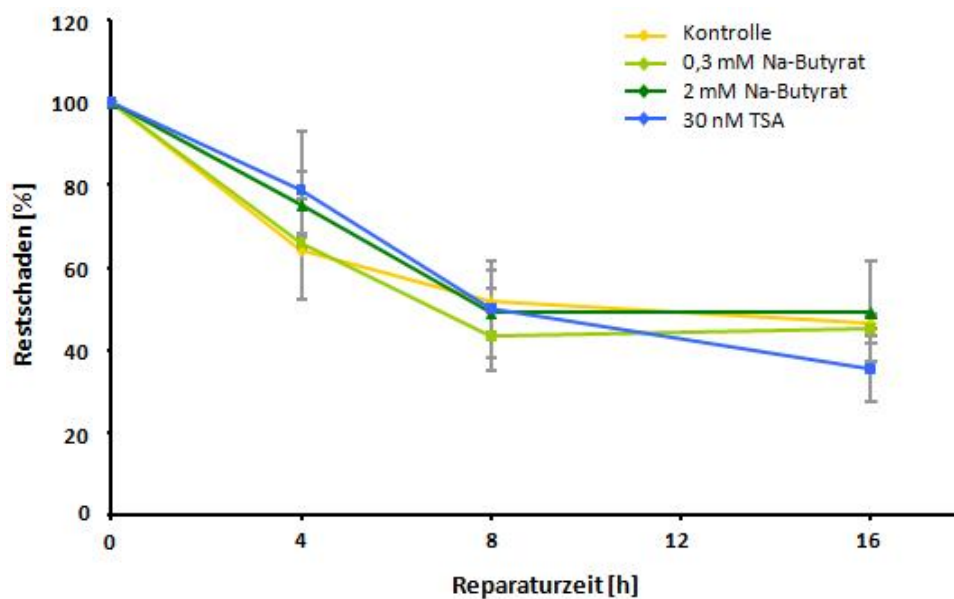


Abbildung 3.67: Reparatur T4-EndoV-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren Die Induktion T4-EndoV-sensitiver Läsionen erfolgte mittels UV-B (2,88 J/m<sup>2</sup>, in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit den angegebenen HDAC-Inhibitoren (Na-Butyrat und Trichostatin A). HDAC-Inhibitoren wurden für die Zeit der Schädigung gewaschen, im Anschluss für die jeweilige Reparaturzeit wieder zugegeben. Die verwendeten Lösungsmittel waren H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> (Na-Butyrat) und Ethanol (TSA) in einer Endkonzentration von 0,1 %. n: Kontrolle s. Abbildung 3.16, Na-Butyrat & TSA = 3-4; Mittelwerte +/- SD

### 3.2.8 Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Entstehung spontaner Mutationen in AS52-Zellen

Zur Bestimmung der spontan entstehenden Mutationen unter dem Einfluss von HDAC-Inhibitoren wurden AS52-Zellen wie in 2.2.6.2 beschrieben mit 0,3 mM Na-Butyrat, 30 nM TSA und 0,3 mM Na-Valproat behandelt. Im Verlauf der Generationen ist eindeutig zu erkennen (Abbildung 3.68), dass alle verwendeten HDAC-Inhibitoren die Entstehung spontaner Mutationen im Vergleich zur Kontrolle dramatisch verringern. Am stärksten ist dieser Effekt unter Behandlung mit Trichostatin A ausgeprägt.

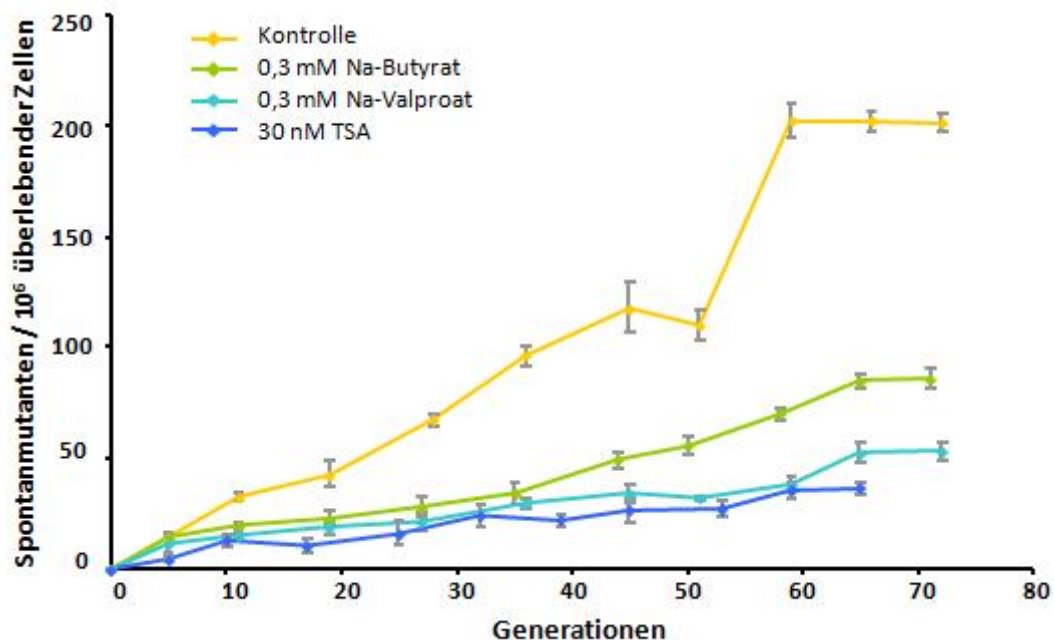


Abbildung 3.68: Spontane Mutationen in AS52-Zellen unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren Die spontanen Mutationsraten wurden bestimmt in regelmäßigen Abständen über die angegebenen Generationen hinweg. HDAC-Inhibitoren (Na-Butyrat, Trichostatin A und Na-Valproat) waren in den angegebenen Konzentrationen permanent im Zellkulturmedium anwesend. Die verwendeten Lösungsmittel waren H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> (Na-Butyrat und Na-Valproat) und Ethanol (TSA) in einer Endkonzentration von 0,1 %. Die spontanen Mutanten und die Generationen wurden für die jeweilige Koloniebildungsfähigkeit korrigiert. Mittelwerte +/- SD

### 3.2.9 Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Entstehung induzierter Mutationen in AS52-Zellen

Auch eine Beeinflussung der Entstehung durch UV-B induzierter Mutationen wurde untersucht. Die Schädigung mit UV-B erfolgte nach 24-stündiger Inkubation von AS52-Zellen mit 0,3 mM Na-Butyrat bzw. 30 nM TSA. Im Anschluss an die Schädigung wurde entweder reines Vollmedium zugegeben oder aber es folgte eine Inkubation mit dem entsprechenden HDAC-Inhibitor für weitere 48 Stunden. Der weitere Versuchsablauf ist 2.2.6.3 zu entnehmen. Die Behandlung mit Na-Butyrat zeigt für die

beiden niedrigeren UV-B-Dosen keinen Einfluss auf die Entstehung induzierter Mutationen. Erst in der höchsten UV-B-Dosis ist eine signifikante Erniedrigung der Mutationsrate durch Na-Butyrat sichtbar. Dies gilt nur für die Bedingungen einer an die Schädigung anschließenden weiteren 48-stündigen Inkubation mit Na-Butyrat. Wurde Na-Butyrat nur für 24h vor der UV-B-Bestrahlung zugegeben ist kein Unterschied in der Mutationshäufigkeit im Vergleich zur Kontrolle erkennbar (Abbildung 3.69). Eine Behandlung mit 30 nM TSA äußert sich für alle verwendeten UV-B-Dosen in einer signifikant erniedrigten Generierung von Mutationen. Dies gilt für die auch nach Schadensinduktion mit TSA behandelten Zellen. Für die beiden höheren UV-B-Dosen ist auch mit alleiniger 24-stündiger Vorinkubation der Zellen bereits eine signifikante Reduktion induzierter Mutationen zu beobachten.

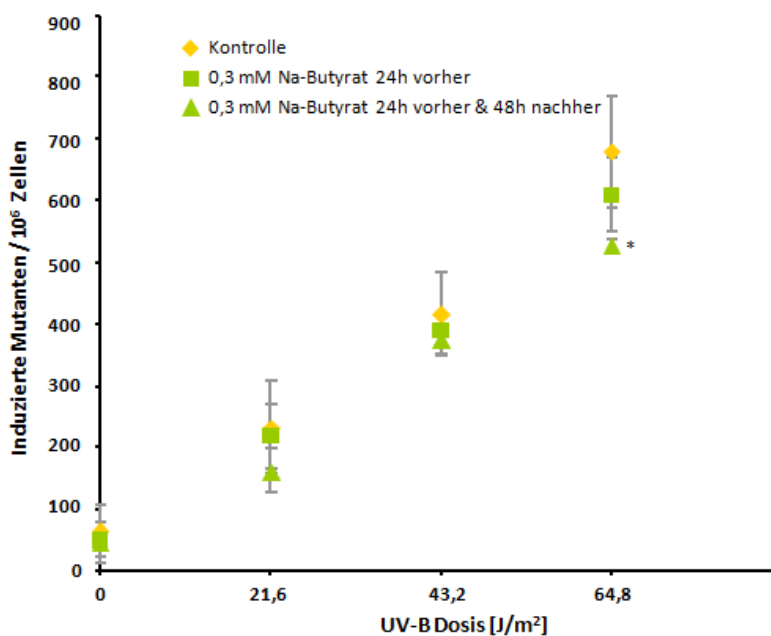


Abbildung 3.69: Induzierte Mutationen in AS52-Zellen unter Einfluss von Na-Butyrat Die Induktion der Mutationen erfolgte mittels UV-B (21,6 J/m<sup>2</sup>, 43,2 J/m<sup>2</sup> und 64,8 J/m<sup>2</sup>, in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 0,3 mM Na-Butyrat. Na-Butyrat wurde für die Zeit der Schädigung gewaschen und wenn angegeben im Anschluss für weitere 48h wieder zugegeben. Das verwendete Lösungsmittel war H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>, n=3; Mittelwerte +/- SD

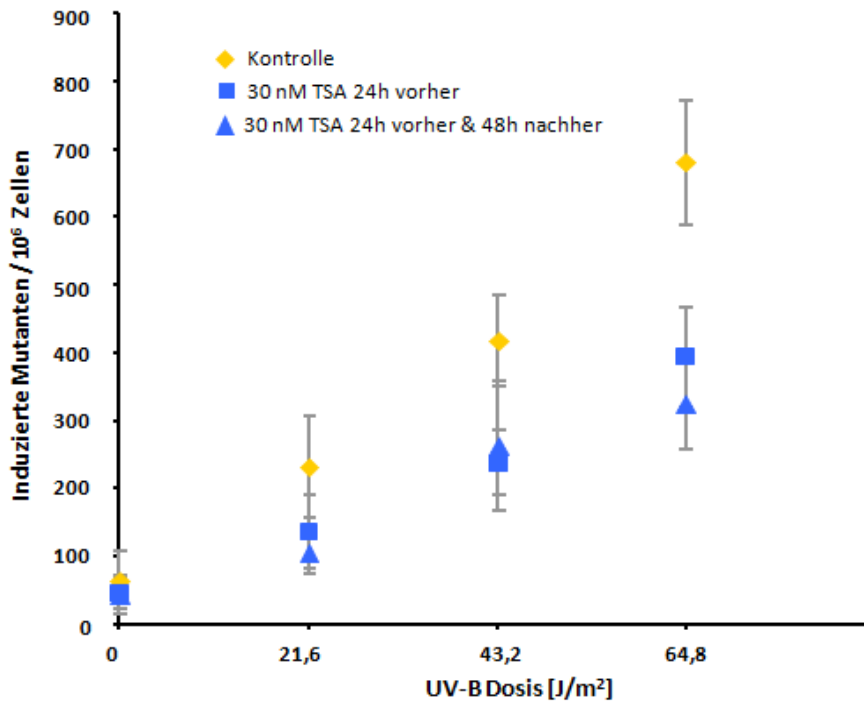


Abbildung 3.70: Induzierte Mutationen in AS52-Zellen unter Einfluss von Trichostatin A Die Induktion der Mutationen erfolgte mittels UV-B (21,6 J/m<sup>2</sup>, 43,2 J/m<sup>2</sup> und 64,8 J/m<sup>2</sup>, in PBS) nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 30 nM Trichostatin A. TSA wurde für die Zeit der Schädigung gewaschen und wenn angegeben im Anschluss für weitere 48h wieder zugegeben. Das verwendete Lösungsmittel war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %. n=3; Mittelwerte +/- SD

### 3.2.10 Proliferation von AS52-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit HDAC-Inhibitoren

Um eine Verfälschung der Mutationsdaten durch eine Beeinflussung der Proliferation auszuschließen, wurde diese für eine 72-stündige Inkubationszeit mit den beiden HDAC-Inhibitoren bestimmt. Na-Butyrat zeigt erst ab einer Konzentration von 2 mM für 72h eine deutliche Verlangsamung der Proliferation. In der für die Mutationsversuche verwendeten Konzentration von 0,3 mM Na-Butyrat ist die Proliferation unbeeinflusst im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3.71). Eine Konzentration von 10 nM TSA zeigt noch keine eindeutige Beeinflussung der Proliferation. Eine Konzentration von 30 nM TSA zeigt bereits eine leichte Verlangsamung des Zellwachstums, welche mit 50 nM TSA noch deutlich zunimmt (Abbildung 3.72).

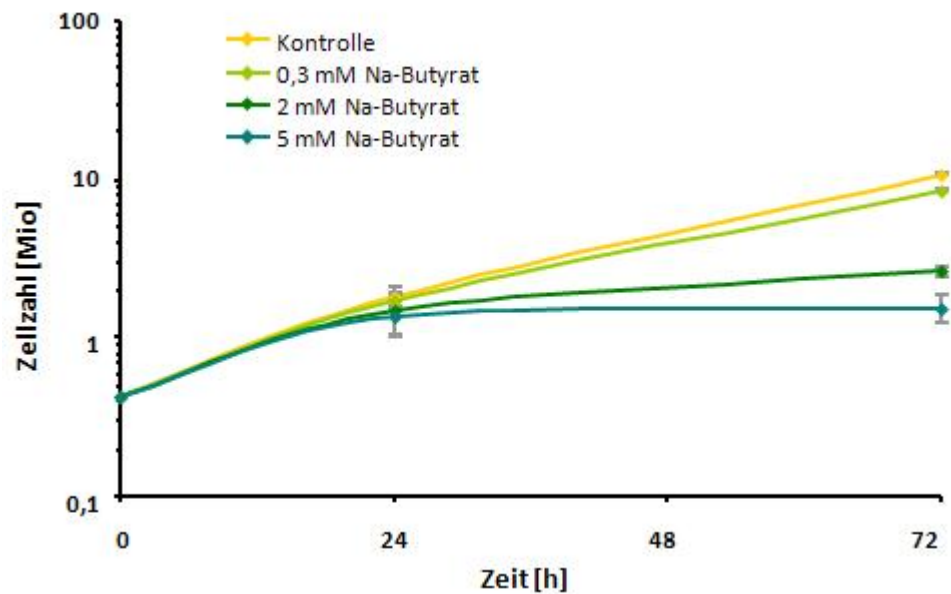


Abbildung 3.71: Proliferation von AS52-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Na-Butyrat Zur Bestimmung der Proliferation wurden  $0,35 \cdot 10^6$  Zellen ausgestreut, nach 24h erfolgte die Zugabe der angegebenen Butyratkonzentrationen für eine 72-stündige Inkubationszeit. Der Zeitpunkt „0“ entspricht der Butyratzugabe. Das verwendete Lösungsmittel war und  $H_2O_{dest}$ . n = 2, Mittelwerte +/- SD

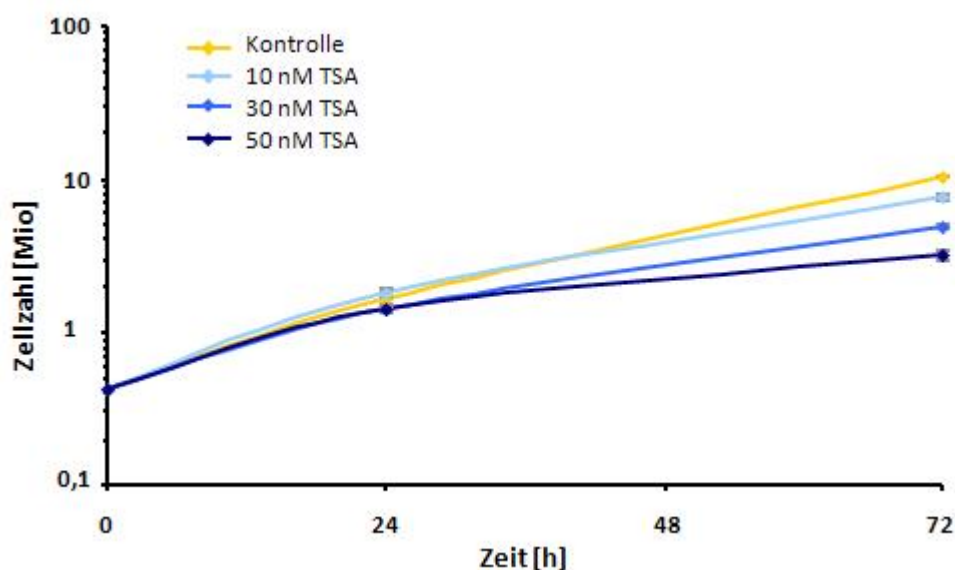


Abbildung 3.72: Proliferation von AS52-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Trichostatin A Zur Bestimmung der Proliferation wurden  $0,35 \cdot 10^6$  Zellen ausgestreut, nach 24h erfolgte die Zugabe der angegebenen TSA-Konzentrationen für eine 72-stündige Inkubationszeit. Der Zeitpunkt „0“ entspricht der TSA-Zugabe. Das verwendete Lösungsmittel war Ethanol in einer Endkonzentration von 0,1 %. n = 2, Mittelwerte +/- SD

### 3.2.11 Zellzyklusverteilung nach 72-stündiger Inkubation mit HDAC-Inhibitoren

Auch eine mögliche Beeinflussung des Zellzyklus durch eine 72-stündige Behandlung mit den verwendeten HDAC-Inhibitoren wurde untersucht. Die Abbildung 3.73 zeigt, dass die Verteilung der Zellzyklusphasen weder durch Na-Butyrat noch durch TSA in den verwendeten Konzentrationen geändert wird im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.



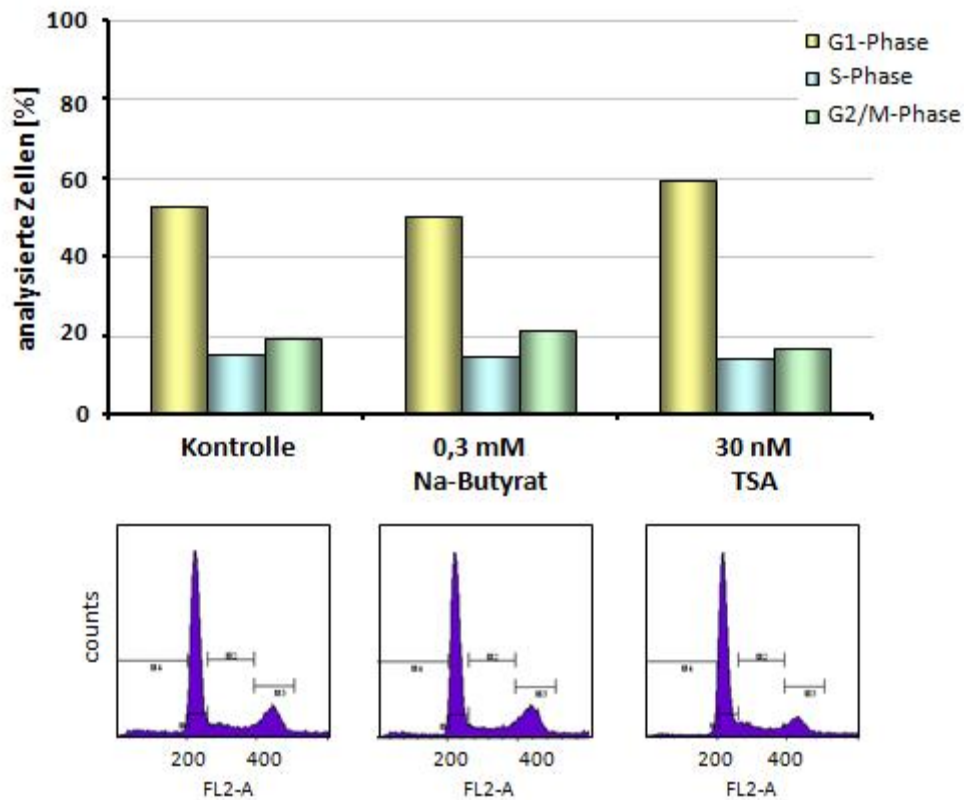


Abbildung 3.73: Zellzyklusverteilung in AS52-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit HDAC-Inhibitoren. Die Zellzyklusverteilung wurde durchflusszytometrisch mit Propidiumiodid nach 72-stündiger Inkubation mit den angegebenen HDAC-Inhibitoren (Na-Butyrat und Trichostatin A) bestimmt. Das Balkendiagramm zeigt die Verteilung der Zellzyklusphasen; apoptotische Zellen bzw. Zellen in G0 sind nicht aufgetragen. Die verwendeten Lösungsmittel waren  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  (Na-Butyrat) und Ethanol (TSA) in einer Endkonzentration von 0,1 %. n=1-2

---

## 4 Diskussion

### 4.1 Beeinflusst die Chromatinstruktur die Entstehung von DNA-Schäden und deren Reparatur in AS52-Zellen?

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Frage war, ob der Kondensationsgrad des Chromatins zum einen die Schadensinduktion, zum anderen die Reparatur von DNA-Schäden beeinflusst. Erwartet wurde, dass eine offene Chromatinstruktur ein erhöhtes Schadensausmaß sowie eine verbesserte Reparatur bewirkt, ein kompaktes, kondensiertes Chromatin hingegen zu weniger induzierten Schäden, aber auch einer verlangsamten Reparatur führt. Dass eine Regulation der DNA-Zugänglichkeit, in erster Linie über posttranslationale Modifikation von Histonen, in engem Wechselspiel mit DNA-Schadenserkennung und -reparatur steht, gilt als sehr wahrscheinlich. Bereits seit langem ist bekannt, dass es in Folge einer Bestrahlung mit UV-B zu verstärkter Histonacetylierung und einer somit besseren DNA-Zugänglichkeit zur Schadensstelle kommt (Smerdon and Lieberman, 1978). Der gesamte Prozess der Nukleotidexzisionsreparatur wird in engen Zusammenhang mit chromatinmodulierenden Prozessen gebracht (Gale and Smerdon, 1990; Ramanathan and Smerdon, 1989; Wellinger and Thoma, 1997). Auch Doppelstrangbrüche bewirken eine spezifische Histonmodifikation, nämlich die Phosphorylierung des Ser 139 des Histons H2AX zum  $\gamma$ -H2AX (Rogakou et al., 1998).

Um nun einen generellen Einfluss des Kondensationsgrades des Chromatins auf Reparatur und Suszeptibilität zu untersuchen, wurden AS52-Zellen, wie in Abschnitt 3 beschrieben, entweder mit Resveratrol, einem Aktivator der Deacetylase SIRT1 (Baur et al., 2006; Dittenhafer-Reed et al., 2011; Howitz et al., 2003) oder aber mit den Histondeacetylaseinhibitoren Trichostatin A und Natriumbutyrat behandelt. Resveratrol vermittelt eine kondensierte, schlecht zugängliche chromosomale DNA, was zu einer verminderten Suszeptibilität und einer verschlechterten Reparatur führen kann. Die HDAC-Inhibitoren bewirken durch verminderte Deacetylierung von Histonen eine eher offene und gut zugängliche Chromatinstruktur. Es wird erwartet, dass dadurch eine erhöhte Schadensinduktion sowie eine verbesserte Reparatur resultieren. Dass die verwendeten Substanzen nach 24-stündiger Inkubation den erwarteten Effekt auf die Chromatinstruktur ausüben, konnte mit Hilfe der Hydrolyse mit DNase I gezeigt werden. Die Behandlung mit Resveratrol zeigt eine Chromatinkondensation (Abbildung 3.1), die Behandlung mit Natriumbutyrat und TSA eine Chromatindekondensation (Abbildung 3.55). Aufgrund dieser Daten wurden alle verwendeten Substanzen immer mit 24-stündiger Vorinkubationszeit verwendet. Eine 4-stündige Inkubation ist für die chromatinmodulatorischen Effekte nicht ausreichend (Anderhub, 2008).

---

Bereits die Messung der Proliferationsgeschwindigkeit unter Einfluss von Resveratrol (Abbildung 3.2) zeigt, dass diese Substanz deutlich in die Zellphysiologie einzugreifen scheint. Das Zellwachstum ist bereits ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  Resveratrol deutlich verlangsamt, allerdings scheinen sich die Zellen nach Wegnahme der Substanz zu „erholen“ (Abbildung 3.4). Die beiden HDAC-Inhibitoren TSA und Natriumbutyrat, die zu offenerer Chromatinstruktur führen, beeinflussen die Proliferation von AS52-Zellen hingegen nur unmerklich (Abbildung 3.57 & Abbildung 3.56). Diese Ergebnisse spiegeln sich auch in den Zellzyklusdaten wieder. Resveratrol (Abbildung 3.6) zeigt mit zunehmender Konzentration eine Akkumulation von Zellen in der S-Phase, was in Einklang mit Befunden in anderen Zellen steht (Estrov et al., 2003; Joe et al., 2002). Die HDAC-Inhibitoren (Abbildung 3.60) zeigen in den verwendeten Konzentrationen keine Beeinflussung des Zellzyklus. Anhand der Toxizitätsdaten ist ersichtlich, dass eine 24-stündige Inkubation mit Resveratrol (Abbildung 3.5) nicht nur hemmend auf das Zellwachstum wirkt, sondern bereits ab 30  $\mu\text{M}$  leichte toxische Effekte hervorruft, die mit 75  $\mu\text{M}$  noch deutlich stärker werden. Im Vergleich dazu zeigen die beiden HDAC-Inhibitoren (Abbildung 3.58 & Abbildung 3.59) im verwendeten Konzentrationsbereich keinerlei toxische Eigenschaften.

Aufgrund der dieser Arbeit zugrunde liegenden Hypothese war zu erwarten, dass eine Resveratrolbehandlung und die dadurch erreichte kondensierte Chromatinstruktur zu einer erniedrigten Schadensinduktion führt, eine Behandlung mit HDAC-Inhibitoren im Umkehrschluss zu einem erhöhten Ausmaß induzierter Läsionen. Diese Erwartung wird für eine Induktion oxidativer Läsionen durch den Photosensibilisator Ro19-8022 + Licht zumindest tendenziell erfüllt. Resveratrol (Abbildung 3.11) zeigt eine leicht erniedrigte Suszeptibilität in den Konzentrationen 10  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$ , allerdings sind die Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht signifikant. Im Gegensatz dazu ist nach Behandlung mit 2 mM Na-Butyrat und 30 nM TSA (Abbildung 3.63) eine deutliche, signifikante Erhöhung des induzierten oxidativen Schadens zu erkennen. Für eine Schadensinduktion mit UV-B-Strahlung, bei der hauptsächlich Pyrimidindimere entstehen, bestätigt sich die Erwartung in beiden Fällen nur als leichte Tendenz (Abbildung 3.15 & Abbildung 3.66). Deutliche Unterschiede sind bei dieser Art der Schädigung auch nicht zu erwarten, da die Absorption der UV-B-Strahlung durch die DNA durch sterische Veränderung des Chromatins vermutlich wenig behindert wird (Regan and Yoshida, 1995). Dennoch gibt es Anhaltspunkte, dass die chromosomale Umgebung die durch UV-B-Strahlung generierte Schadensverteilung beeinflusst (Ura and Hayes, 2002). Die Verteilung solcher Läsionen ist abhängig von der Assoziation der DNA mit chromosomalen Proteinen (Pfeifer, 1997). So können beispielsweise Proteine oder Proteinkomplexe, welche die B-Form der DNA stören, sowohl das Ausmaß als auch die Art der durch UV-B-Strahlung induzierten

---

DNA-Schäden beeinflussen (Thoma, 1999). Gegenüber einer Induktion von Einzelstrangbrüchen mit Wasserstoffperoxid bei 37°C sind mit Resveratrol vorbehandelte AS52-Zellen deutlich empfindlicher als unbehandelte Kontrollzellen (Abbildung 3.19). So wird in „Resveratrolzellen“ bereits mit 75 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ein Schaden von ~0,5 Einzelstrangbrüche / 10<sup>6</sup> bp induziert, in Kontrollzellen ist für dieses Schadensausmaß eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration von 150 µM notwendig. Eine Erklärung für das erhöhte Ausmaß an Einzelstrangbrüchen könnte sein, dass diese kumulieren aufgrund der durch Resveratrol deutlich inhibierten Reparatur (Abbildung 3.21), welche auch während der Schädigung bei 37°C stattfindet. Ebenfalls die Schadensinduktion bei 0°C (Abbildung 3.22) in Suspension zeigt diese Tendenz, allerdings ist der Unterschied zwischen Resveratrolbehandlung und Kontrolle geringer. Im Gegensatz zu den nach Ro19-8022 + Licht und UV-B beobachteten Effekten auf die Induktion von Schäden, passt die durch Resveratrol erhöhte Empfindlichkeit gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nicht zur Erwartung. Die Generierung von Einzelstrangbrüchen durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verläuft über eine Fenton-Reaktion (s. 1.5.3) und ist somit abhängig vom Eisengehalt und dessen Oxidationsstufen. Polyphenole, zu denen auch Resveratrol zählt, können Eisen durch Komplexbildung in unterschiedlicher Weise beeinflussen (Perron and Brumaghim, 2009). Zudem kommt es unter Resveratroleinfluss zu einer Induktion der Hämoxygenase I (Chen et al., 2005a), welche Häm unter anderem zu Eisen abbaut. Der Eisenhaushalt wird durch Resveratrol also auf verschiedene Weise beeinflusst, wodurch sich möglicherweise das erhöhte Ausmaß über Fenton-Reaktion induzierter Einzelstrangbrüche erklären lässt.

Bezüglich der Beeinflussung der Reparatur induzierter Schäden war laut Hypothese zu erwarten, dass mit Resveratrol behandelte Zellen langsamer bzw. schlechter reparieren, wohingegen die mit HDAC-Inhibitoren behandelten Zellen besser bzw. schneller reparieren sollten. Die Reparatur der durch Ro19-8022 + Licht induzierten oxidativen Läsionen (u.a. 8-oxoG), die nach heutigem Wissensstand überwiegend über die Basenexzisionsreparatur erfolgt, verläuft nach 24-stündiger Vorinkubation mit 75 µM Resveratrol deutlich langsamer im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 3.12). Besonders deutlich ist dies zu den Reparaturzeitpunkten 2h und 3h. Nach 6-stündiger Reparaturzeit scheint die Reparatur in Kontrollzellen etwas zu stagnieren, wohingegen die „Resveratrolzellen“ gleichmäßig weiterreparieren und somit etwas „aufholen“. Der beobachtete Effekt ist lediglich bei der hohen Konzentration Resveratrol zu sehen, 10 µM und 30 µM Resveratrol haben keinerlei Einfluss (Abbildung 3.13). Auch die Reparatur der durch UV-B induzierten Läsionen (Cyclobutanpyrimidindimere) ist durch Resveratrol eindeutig verlangsamt (Abbildung 3.16). Der Effekt ist hier noch sehr viel deutlicher als nach Ro19-8022 + Licht. Zudem ist bereits eine Resveratrolkonzentration von 30 µM ausreichend, um die Inhibierung der Reparatur zu beobachten (Abbildung 3.17). Der Befund zeigt, dass neben der Basenexzisionsreparatur auch die

---

Nukleotidexzisionsreparatur durch Resveratrol deutlich inhibiert wird. Eine echte Konzentrationsabhängigkeit ist nicht zu erkennen. Eher scheint es sich um einen „Alles-oder-Nichts“-Effekt zu handeln. Eine bestimmte Konzentration Resveratrol ist erforderlich, um den Einfluss auf die Reparaturgeschwindigkeit auszulösen. Im Fall der Basenexzisionsreparatur ist dies mit 30  $\mu\text{M}$  Resveratrol noch nicht erreicht, es sind 75  $\mu\text{M}$  notwendig. Im Gegensatz dazu wird im Fall der Nukleotidexzisionsreparatur mit 30  $\mu\text{M}$  Resveratrol bereits eine fast 100%-ige Inhibierung der Reparatur beobachtet. Die Reparatur von Einzelstrangbrüchen nach  $\text{H}_2\text{O}_2$  zeigt ein ähnliches Bild. Die Reparatur von Strangbrüchen, welche bei 37°C in adhären Zellen induziert wurden, ist durch 75  $\mu\text{M}$  Resveratrol eindeutig verlangsamt (Abbildung 3.21). Wurden die Einzelstrangbrüche hingegen in abgelösten Zellen bei 0°C induziert, so zeigt sich die Reparatur durch Resveratrol deutlich weniger beeinflusst (Abbildung 3.24). Erst zu den späteren Reparaturzeitpunkten 10 min und 15 min wird die verlangsamte Reparatur hier sichtbar. Die sehr schnelle Reparatur von Einzelstrangbrüchen scheint durch Resveratrol deutlich weniger beeinflusst, als die später einsetzende, langsamere Reparatur (vgl. 2.2.5.3). Eine Vorbehandlung mit den HDAC-Inhibitoren TSA und Natriumbutyrat hingegen beeinflusst weder die Reparatur oxidativer Läsionen noch die UV-induzierter Läsionen (Abbildung 3.64 & Abbildung 3.67). Gerade die Nukleotidexzisionsreparatur (s. 1.6.3) benötigt für Schadenserkenkung und Prozessierung der Läsionen Platz im Bereich der Schadensstelle für die hier beteiligten, teils großen Proteinkomplexe (Pfeifer, 1997; Thoma, 1999). Aus diesem Grund zieht die Erkennung von z.B. Cyclobutanpyrimidindimeren oder 6-4-Photoproducten eine ATP-abhängige Umorganisation der lokalen Chromatinstruktur nach sich (Thoma, 1999; Ura and Hayes, 2002), um den weiteren Ablauf der Nukleotidexzisionsreparatur zu gewährleisten. Die nötige Zugänglichkeit zur Schadensstelle und eine möglichst optimale DNA-Reparatur gehört folglich zu den natürlichen zellulären Mechanismen. Daher ist es nicht sehr verwunderlich, dass durch die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren, welche global die Chromatinstruktur öffnen, keine Beschleunigung der Reparaturkapazität zu erreichen ist. Auch für die Basenexzisionsreparatur, die mit Hilfe von nur kleinen, einzelnen Proteinen abläuft, ist die Zugänglichkeit zum Schaden nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Die durch HDAC-Inhibitoren erzeugte bessere Erreichbarkeit der DNA ist somit auch hier nicht von Bedeutung.

Die Tatsache, dass die durch Resveratrol zu beobachtende Verlangsamung bzw. Inhibierung der Reparatur sehr deutlich ist und nach allen Arten der Schädigung auftritt, lässt sich am besten durch eine Beeinflussung der Chromatinstruktur erklären. Dies wurde daher weiter untersucht. Resveratrol wird eine Aktivierung der (Histon-)Deacetylase SIRT1 zugesprochen, wodurch die verstärkte Chromatinkondensation zustande kommen könnte (Comizzoli et al., 2009; Thrower and Bloom, 2001). Aufgrund dessen erfolgte der Versuch, durch Inhibierung von SIRT1 mit dem SIRT1-Inhibitor

---

EX-527, die durch Resveratrol zu beobachtende Reparaturverlangsamung zu revertieren. EX-527 gehört zu einer Reihe von Indolen, welche als potente und für SIRT1 selektive Inhibitoren charakterisiert wurden (Napper et al., 2005). Der Abbildung 3.25, Abbildung 3.26 und Abbildung 3.27 ist zu entnehmen, dass weder die Reparatur oxidativer Läsionen, durch UV-B-induzierter Läsionen noch durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierter Einzelstrangbrüche durch zusätzliche Inhibierung von SIRT1 in Resveratrol-behandelten Zellen beschleunigt werden kann. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine Beeinflussung von SIRT1 durch Resveratrol nicht in direkter Verbindung mit der Verlangsamung der DNA-Reparatur steht. Um weiterhin einen Zusammenhang mit einer kondensierten Chromatinstruktur zu überprüfen, wurde Resveratrol in Kombination mit dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A für 24 Stunden inkubiert. Die in Abbildung 3.1 und Abbildung 3.55 gezeigten, gegenteiligen Effekte von Resveratrol und TSA auf das Chromatin könnten sich gegenseitig aufheben. Der Versuch wurde nach Schädigung mit UV-B durchgeführt, da hier die Reparaturinhibierung durch Resveratrol am deutlichsten zu Tage tritt. Wie der Graphik (Abbildung 3.28) klar zu entnehmen ist, lässt sich auf diese Weise die verlangsamte Reparatur nicht beschleunigen. Aufgrund dieser Ergebnisse ist es eher unwahrscheinlich, dass die Verlangsamung der Reparatur durch Resveratrol nur auf eine kondensierte Chromatinstruktur zurückzuführen ist. Auch die übrigen Ergebnisse bezüglich Schadensinduktion und DNA-Reparatur erfüllen nicht alle die zugrunde liegende Arbeitshypothese. Schaut man sich die Entstehung von DNA-Schäden an, so scheint ein dekondensiertes Chromatin mit somit gut zugänglicher DNA (erzeugt durch Inkubation mit HDAC-Inhibitoren) zu einem erhöhten Schadensausmaß zu führen, die Reparatur dieser Schäden ist allerdings nicht positiv beeinflusst. Denkbar ist als Erklärung, dass für die Reparatur in den unbehandelten, sehr schnell wachsenden AS52-Zellen die Chromatinstruktur nicht geschwindigkeitsbestimmend ist, diese also durch eine besser zugängliche chromosomale DNA nicht weiter zu beschleunigen ist.

Neben Suszeptibilität und Reparatur wurde als weiterer Endpunkt die Entstehung von Mutationen untersucht. Da die Entstehung von Mutationen in engem Zusammenhang mit Schadeninduktion und DNA-Reparatur steht, wäre durch Unterschiede in der Chromatinstruktur auch eine veränderte Mutationsrate zu erwarten. So bewirkt einerseits ein offenes Chromatin ein erhöhtes Ausmaß an DNA-Schäden, welche wiederum zu Mutationen führen können. Andererseits muss aber auch die nötige Zugänglichkeit zu Schadensstellen für eine optimale Reparatur gewährleistet werden. Die dynamische Umorganisation des Chromatins bedarf also eines empfindlichen Gleichgewichts (Cann and Dellaire, 2011). Die Entstehung spontaner Mutationen in AS52-Zellen wird jedoch durch permanente Inkubation mit Resveratrol nicht verändert im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3.51). Auch die Zahl durch UV-B induzierter Mutationen ist durch Resveratrol unverändert (Abbildung 3.52).

---

Aufgrund der Reparaturinhibierung wäre am ehesten mit erhöhten Mutationsraten zu rechnen gewesen, doch konnte ein solcher Zusammenhang nicht gezeigt werden. Eine permanente Inkubation mit den HDAC-Inhibitoren TSA und Natriumbutyrat führt dagegen zu drastisch gesenkten spontanen Mutationsraten (Abbildung 3.68) und auch die Entstehung induzierter Mutationen ist gesenkt. Nach Natriumbutyrat ist dies tendenziell zu sehen (Abbildung 3.69), TSA hat hier einen deutlicheren, signifikanten Einfluss (Abbildung 3.70). Dies ist nicht erklärbar durch die beobachtete erhöhte Schadensinduktion, da diese eher erhöhte Mutationsraten erwarten ließe. Zudem zeigte sich die Reparatur unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren unverändert zur Kontrolle. Den gesenkten Mutationsraten muss demzufolge ein anderer Mechanismus zugrunde liegen, worauf in einem späteren Abschnitt noch eingegangen werden soll.

#### 4.2 Lässt sich die durch Resveratrol verlangsamte Reparatur durch oxidativen Stress und/oder eine hochregulierte antioxidative Abwehr erklären?

Aufgrund der Tatsache, dass die durch Resveratrol verminderte Reparaturgeschwindigkeit in AS52-Zellen nicht auf eine veränderte Chromatinstruktur zurückgeführt werden konnte, wurde auf weitere möglicherweise zugrunde liegende Mechanismen geprüft. Es ist bekannt, dass strahlungsinduzierter „Oxidativer Stress“ zu einer Inhibierung der Reparatur führen kann (Eiberger et al., 2008). Dafür verantwortlich gemacht wird unter anderem die Oxidation von OGG1, welche zu einem Verlust der Aktivität dieser Reparatur-Glykosylase führt (Bravard et al., 2006), wodurch der initiale Schritt der Basenexzisionsreparatur verhindert wird. Um zu prüfen, ob ein solcher Mechanismus an der durch Resveratrol verlangsamten Reparatur oxidativer Läsionen beteiligt ist, wurde der Versuch in Anwesenheit von DTT wiederholt (Abbildung 3.29). DTT würde oxidiertes OGG1 reduzieren und die so verlangsamte Reparatur normalisieren (Eiberger, 2008). Nach Schädigung mit Ro19-8022 + Licht wurde DTT für die dreistündige Reparaturzeit zugegeben. Da dies die Reparatur der mit Resveratrol behandelten Zellen nicht deutlich beschleunigt, scheint eine Oxidation von OGG1 hier nicht kausal beteiligt zu sein. Auch eine Acetylierung von OGG1 kann dessen Funktion beeinträchtigen und wäre durch SIRT1-Aktivierung durchaus denkbar. Allerdings hat die Inhibierung von SIRT1, wie bereits beschrieben (Abbildung 3.25), keinen positiven Einfluss auf die retardierte Reparatur, weshalb auch eine Acetylierung von OGG1 als Mechanismus ausscheidet.

Dies steht im Einklang damit, dass Resveratrol eigentlich die Eigenschaft zugesprochen wird, oxidativen Stress reduzieren zu können (Kairisalo et al., 2011; Rocha et al., 2011). Zudem konnte in verschiedenen Zellkultur- und Mausmodellen eine durch Resveratrol hochregulierte Genexpression verschiedener an der antioxidativen Abwehr beteiligter Proteine, wie GPX, CAT, SOD und HO1 nachgewiesen werden (Fusser et al., 2011; Juan et al., 2005; Li et al., 2006; Ungvari et al., 2007). Eine

Erhöhung des Gesamtglutathiongehalts in AS52-Zellen (Abbildung 3.30) konnte als Anzeichen einer erhöhten antioxidativen Abwehr beobachtet werden. Nach 24-stündiger Behandlung mit Resveratrol steigt der Glutathiongehalt auf das Doppelte des Normalspiegels an. Dies scheint sich allerdings weder positiv auf die Induktion oxidativer Läsionen (Abbildung 3.11) noch auf deren Reparatur (Abbildung 3.12) auszuwirken. Es wird vermutet, dass die durch Resveratrol gesteigerte antioxidative Abwehr über den Nrf2-ARE-Signalweg (s. 1.2.2) vermittelt wird (Chen et al., 2005a). An diesem sind auch MAP-Kinasen wie ERK1/2 beteiligt und es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibierung von MEK, welches up-stream von ERK1/2 liegt, mit dem MEK-Inhibitor U-0126, die Resveratrol-vermittelte Hochregulierung von HO-1 verhindert (Chen et al., 2005b). Erst vor kurzem wurde eine direkte Aktivierung von ERK durch Resveratrol in *Drosophila* (Maher et al., 2011), sowie in Ratten- und menschlichen Zellen (Lin et al., 2006) festgestellt. Um auszuschließen, dass die Beeinflussung des MAPK-Signalweges durch Resveratrol an der schon beschriebenen Reparaturinhibierung beteiligt ist, wurden AS52-Zellen zusätzlich zu Resveratrol mit dem MEK-Inhibitor U-0126 oder dem p38-Inhibitor PD169316 für 24 Stunden behandelt. Anhand der Abbildung 3.32 ist jedoch deutlich zu sehen, dass die Inhibierung der beiden MAP-Kinasen keinen positiven Einfluss auf die Reparatur UV-B-induzierter Läsionen unter Resveratrol haben. Nach Schädigung mit Ro19-8022 in Kombination mit Licht konnte der Versuch nicht durchgeführt werden, da, wie der Koloniebildungsfähigkeit (Abbildung 3.33) zu entnehmen ist, beide Inhibitoren unter diesen Bedingungen eine deutliche Toxizität aufweisen. Die Funktion des MAPK-Signalweges scheint in Verbindung mit oxidativen Läsionen von deutlich größerer Bedeutung zu sein als in Verbindung mit UV-B-induzierten Schäden. Die Bestimmung des Gesamtglutathiongehalts nach Inkubation mit dem MEK-Inhibitor U-0126 in Kombination mit Resveratrol (Abbildung 3.34) zeigt, dass die erhöhten GSH-Spiegel nach Resveratrol nicht ERK-abhängig sind. Eine mechanistische Beteiligung des MAPK-Signalweges an der durch Resveratrol verursachten retardierten Reparatur in AS52-Zellen konnte also nicht nachgewiesen werden.

#### 4.3 Lässt sich die durch Resveratrol verlangsamte Reparatur durch eine Veränderung der p53-Expression erklären?

Wie bereits in 1.7.4 erwähnt, ist p53 ein wichtiges Target der Deacetylase SIRT1. Durch Deacetylierung von p53 kommt es zu dessen Inaktivierung (Vaziri et al., 2001). Ein solcher Effekt könnte somit durch eine Resveratrol-abhängige SIRT1-Aktivierung verstärkt werden. Auf der anderen Seite wurde kürzlich eine ERK-vermittelte Erhöhung der p53-Ser15 Phosphorylierung und somit der p53-abhängigen Induktion der Apoptose durch Resveratrol in MCF-7 Brustkrebszellen beobachtet (Lin et al., 2006). p53 spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Nukleotidexzisionsreparatur, da p53 wiederum p48 (XPE) aktiviert, welches, zugehörig zum DDB-Komplex (s. 1.6.3), an der Schadenserkennung von Pyrimidindimeren beteiligt ist (Sugasawa, 2010). Eine Modulation der p53-



---

Expression durch Resveratrol könnte somit an der beobachteten Verlangsamung der Reparatur beteiligt sein, weshalb diese mittels Western Blot überprüft wurde. Die Abbildung 3.36 zeigt, dass eine Behandlung mit 75  $\mu$ M Resveratrol die p53-Grundexpression nicht ändert im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auch nach Bestrahlung mit UV-B (Abbildung 3.37) ist keine eindeutige Erhöhung der p53-Expression zu beobachten und auch hier gibt es keinen Unterschied zwischen Kontroll- und mit Resveratrol behandelten Zellen. Um einen möglicherweise nur kleinen Resveratroleffekt zu verstärken, wurden die Zellen zusätzlich mit dem p53-Aktivator ( $\pm$ )-Nutlin-3 behandelt. Bei diesem handelt es sich um einen Inhibitor von MDM2, welches als negativer Regulator die proteosomale Degradierung von p53 fördert. Durch dessen Inhibierung kommt es somit zu einer erhöhten p53-Expression (Vassilev et al., 2004). Auch unter diesen Versuchsbedingungen war kein Unterschied zwischen Kontroll- und mit Resveratrol behandelten Zellen zu erkennen, was eine Beteiligung von p53 an den durch Resveratrol beobachteten Effekten unwahrscheinlich macht.

#### 4.4 Ist die durch Resveratrol verlangsamte Reparatur nur eine Akkumulation von AP-Läsionen?

Nachdem kein eindeutiger Mechanismus für die Reparaturinhibierung durch Resveratrol gefunden werden konnte, entstand die Frage, ob es sich tatsächlich um eine verlangsamte Reparatur handelt. Im Fall der durch UV-B induzierten Läsionen, deren Reparatur die deutlichste Inhibierung aufweist, sollte es sich in erster Linie um Pyrimidindimere handeln. Da das für die Alkalische Elution verwendete Reparaturenzym T4-EndoV zudem AP-Läsionen erkennt, bestünde die Möglichkeit, dass Pyrimidindimere zwar repariert werden, in ähnlichem Maße aber AP-Läsionen entstehen. So würde der Anschein erweckt, es fände keine Reparatur statt. Um eine solche Situation auszuschließen, wurde die Alkalische Elution der UV-B geschädigten Zellen mit T4-EndoV, Fpg und einer Kombination beider Enzyme wiederholt (Abbildung 3.18). Der Graphik ist zu entnehmen, dass weder direkt nach Schädigung noch nach einer achtstündigen Reparatur AP-Läsionen zu detektieren sind. Auch oxidative Läsionen werden nicht induziert. Resveratrol verursacht demzufolge tatsächlich eine Inhibierung der Reparatur von Pyrimidindimeren in AS52-Zellen.

#### 4.5 Sind die durch Resveratrol beobachteten Effekte auf einen anderen Zelltyp übertragbar?

Alle bisherigen Daten wurden in AS52-Zellen, einer CHO-Zelllinie, durchgeführt. Diese Zellen wurden ausgewählt, da sie die Möglichkeit bieten, spontan entstehende Mutationen zu detektieren (s. 2.2.6.1). Es handelt sich allerdings um Hamsterzellen und die Ergebnisse sind nicht notwendigerweise auf Zellen des Menschen übertragbar. Daher sollte in HeLa-Zellen, einer menschlichen Zelllinie, überprüft werden, ob die beobachteten zellulären Effekte durch Resveratrol auch in einer anderen

---

Zelllinie auftreten. Anhand der Proliferationsdaten (Abbildung 3.41) ist ersichtlich, dass auch in HeLa-Zellen mit zunehmender Resveratrolkonzentration ein hemmender Einfluss auf das Wachstum erfolgt. Im Vergleich mit A52-Zellen (Abbildung 3.2), bei denen die Proliferation erst ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  Resveratrol beeinflusst wird, zeigen HeLa-Zellen einen solchen Effekt bereits nach 10  $\mu\text{M}$  Resveratrol. Sie scheinen in dieser Hinsicht also etwas empfindlicher zu sein. Ähnliches zeigt sich auch im Gesamtglutathiongehalt (Abbildung 3.42). Bereits 30  $\mu\text{M}$  Resveratrol sind in HeLa-Zellen ausreichend, um die Glutathionspiegel auf das Doppelte ansteigen zu lassen, wohingegen diese Konzentration die Glutathionspiegel in A52-Zellen noch nicht beeinflusst. Eine Erhöhung tritt hier erst nach 75  $\mu\text{M}$  Resveratrol auf (Abbildung 3.30). HeLa-Zellen sind in Bezug auf die beiden Parameter Proliferation und Glutathionspiegel etwas empfindlicher gegenüber einer Resveratrolbehandlung als A52-Zellen, die Tendenz der Beeinflussung ist aber in beiden Zelllinien die Gleiche.

Betrachtet man die Schadensinduktion durch Ro19-8022 +Licht, so fällt auf, dass die Suszeptibilität in HeLa-Zellen durch Resveratrol tendenziell leicht erhöht ist (Abbildung 3.44), wohingegen in A52-Zellen eine unveränderte bis leicht gesenkte Suszeptibilität zu beobachten war. Die Reparatur dieser Läsionen verläuft in HeLa-Zellen unter Einfluss von Resveratrol unverändert zur Kontrolle (Abbildung 3.45). Auch nach Bestrahlung mit UV-B ist eine durch Resveratrol erhöhte Schadensinduktion zu sehen (Abbildung 3.48), diese wird mit 75  $\mu\text{M}$  Resveratrol sogar signifikant. Die Reparatur T4-EndoV-sensitiver Läsionen verläuft unter Resveratoleinfluss auch in HeLa-Zellen etwas langsamer als in Kontrollzellen (Abbildung 3.49), der Unterschied ist allerdings deutlich geringer als in A52-Zellen. Ein Zusammenhang zwischen erhöhtem Gesamtglutathiongehalt oder der beeinträchtigten Proliferation durch Resveratrol mit der retardierten Reparatur ist daher unwahrscheinlich. Die in diesen Bereichen deutlich empfindlicheren HeLa-Zellen sind auf Reparaturebene weniger beeinflusst als A52-Zellen. Die Daten lassen darauf schließen, dass die durch Resveratrol beobachteten Effekte, insbesondere die Verlangsamung der Reparatur, quantitativ zelltypabhängig sind.

#### 4.6 Lässt sich die durch HDAC-Inhibitoren verminderte Mutationsrate durch eine verlangsamte Proliferation erklären?

Die Entstehung von Mutationen steht nicht nur in engem Zusammenhang mit der Reparatur von DNA-Schäden, sondern auch mit der Replikation, also der Weitergabe modifizierter Basen. Somit ist für die Versuchsbedingungen die Proliferation von Zellen entscheidend. Sich langsamer teilende Zellen sind auch nur in vermindertem Maße in der Lage, Mutationen zu manifestieren. Unterschiedliche Wachstumsraten könnten somit das Ergebnis verfälschen. Zur Bestimmung der spontanen Mutationen wurden daher für Resveratrol und HDAC-Inhibitoren Konzentrationen

---

gewählt, unter denen die AS52-Zellen möglichst unbeeinflusst wachsen, zudem wurde die bestimmte Anzahl an Mutationen bezogen auf die entsprechende Generationszeit der Zellen. Die durch Natriumbutyrat und Natriumvalproat beobachteten verminderten spontanen Mutationsraten sind also nicht durch Proliferationsveränderungen erklärbar. Im Fall von Trichostatin A ist eine leichte Hemmung der Wachstumsgeschwindigkeit sichtbar (Abbildung 3.68). Allerdings ist dies vernachlässigbar im Vergleich zu den durch TSA drastisch gesenkten Mutationsraten. Allein durch den leichten antiproliferativen Effekt kann diese nicht erklärt werden. Auch im Fall der induzierten Mutationen ist die Vergleichbarkeit der Proliferation von entscheidender Bedeutung. Eine Behandlung mit 0,3 mM Natriumbutyrat zeigt lediglich einen geringen Einfluss auf die Entstehung von Mutationen (Abbildung 3.69). Die Proliferationsdaten (Abbildung 3.56 & Abbildung 3.71) zeigen, dass diese Konzentration in AS52-Zellen weder nach 24-stündiger noch nach 72-stündiger Inkubationszeit wachstumshemmend wirkt. Eine Behandlung mit 30 nM TSA senkt die Anzahl induzierter Mutationen signifikant (Abbildung 3.70). Eine 24-stündige Inkubationszeit beeinflusst die Proliferation nicht (Abbildung 3.57), nach 72 Stunden ist allerdings eine leichte Wachstumshemmung sichtbar (Abbildung 3.72). Da die verminderten Mutationsraten aber bereits schon nach 24-stündiger TSA-Behandlung zu beobachten sind (120 sec.; 180 sec.) kann eine Verfälschung der Ergebnisse durch antiproliferative Einflüsse auch hier ausgeschlossen werden. Verminderte Basalspiegel von DNA-Läsionen, ein erniedrigtes Ausmaß induzierter Schäden oder auch eine verbesserte DNA-Schadensreparatur wären eine mögliche Erklärung für gesenkte Mutationsraten. Die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren resultiert jedoch in tendenziell erhöhten induzierten Schäden und einer völlig unbeeinflussten Reparaturkapazität. Der beobachtete Einfluss auf die Entstehung von Mutationen muss also andere Ursachen haben. Die für die Mutationsversuche verwendeten AS52-Zellen enthalten ein bakterielles *gpt*-Geb, welches mit Hilfe eines Plasmids in das zelluläre Genom integriert wurde und einen Hotspot für spontane Mutationen enthält (s. 2.1.6.1). Die korrekte Transkription dieses Gens ist also entscheidend für das Versuchsmodell. Denkbar wäre eine Beeinflussung der Transkription aufgrund der durch HDAC-Inhibitoren verstärkten Acetylierung von Histonen und einem so veränderten epigenetischen Code, welcher zum Beispiel ein Stilllegen von Genen bewirken könnte. Allerdings sind acetylierte Histone eher assoziiert mit transkriptionsaktivem Euchromatin (Lee et al., 1993; Luger and Richmond, 1998; Tse et al., 1998), was diese Theorie unwahrscheinlich macht. Ein zugrundeliegender Mechanismus für die durch HDAC-Inhibitoren deutlich gesenkten Mutationsraten konnte bisher nicht gefunden werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

---

## 5 Zusammenfassung

Die Entstehung von Mutationen, und somit der erste Schritt der Kanzerogenese, steht in engem Zusammenhang mit der Effektivität der DNA-Reparatur. Werden zur Fehlpaarung neigende (prämutagene) DNA-Schäden, wie z.B. die oxidative Läsion 8-oxoG, zu langsam oder auch fehlerhaft repariert, so führt dies zwangsläufig zu einer Erhöhung der Mutationsrate. Das Zusammenspiel zwischen Schadensentstehung und dessen Reparatur ist somit von großem Interesse. Ein wichtiger Faktor, der dieses Gleichgewicht beeinflussen könnte, ist die Chromatinstruktur, die entscheidend ist für die DNA-Zugänglichkeit.

Die Frage, ob und in welchem Ausmaß der globale Kondensationsgrad des Chromatins die Entstehung und Reparatur von DNA-Schäden und damit die Entstehung von Mutationen beeinflusst, war der Ausgangspunkt für die vorliegende Arbeit. Um die Chromatinstruktur zu modulieren, wurden zum einen Resveratrol, zum anderen die HDAC-Inhibitoren Natriumbutyrat und Trichostatin A eingesetzt. Resveratrol führt, möglicherweise über eine SIRT1-Aktivierung, zu einem kondensierten und schlecht zugänglichen Chromatin. Die HDAC-Inhibitoren hingegen resultieren durch verstärkte Acetylierung von Histonen in einer global dekondensierten, offenen Chromatinstruktur. Mit Hilfe des Photosensibilisators Ro19-8022 in Kombination mit sichtbarem Licht, UV-B-Strahlung und Wasserstoffperoxid wurden in so veränderten Zellen verschiedene Arten von DNA-Schäden induziert, welche jeweils spezifisch sind für unterschiedliche Reparaturwege. Das Ausmaß induzierter Läsionen sowie deren Reparatur wurden mittels Alkalischer Elution und entsprechenden Reparaturenukleasen bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen eine durch Resveratrol unbeeinflusste Schadensinduktion, andererseits jedoch eine deutliche Verlangsamung der Reparatur verschiedener Arten von DNA-Läsionen (oxidative Läsionen, Cyclobutanpyrimidindimere, Einzelstrangbrüche) und somit auch verschiedener Reparaturwege in AS52-Zellen. Die HDAC-Inhibitoren hingegen verursachen ein erhöhtes Ausmaß induzierter Läsionen, jedoch keine Änderung der Reparaturgeschwindigkeit. Die Entstehung spontaner und induzierter Mutationen zeigt sich durch Resveratrol unbeeinflusst, HDAC-Inhibitoren resultieren in signifikant erniedrigten Mutationsraten in AS52-Zellen. Letzterer Effekt ist durch die beobachteten Einflüsse auf Reparatur und Suszeptibilität in den Zellen nicht erklärbar und bedarf einer mechanistischen Aufklärung. Die durch Resveratrol beobachtete Reparatur-Retardierung wurde mechanistisch weiter untersucht. Durch Inhibierung von SIRT1, einer durch Resveratrol aktivierten Deacetylase, konnte dessen Beteiligung an der Reparaturverlangsamung ausgeschlossen werden.

---

Auch eine Beteiligung von oxidativem Stress, dem MAPK-Signalweg (ERK 1/2, p38) oder p53 konnte ausgeschlossen werden. Die Durchführung der Reparaturversuche mit menschlichen HeLa-Zellen zeigten, dass die durch Resveratrol verursachten Effekte quantitativ stark zelltypabhängig sind. Während die Reparatur in HeLa-Zellen deutlich weniger beeinflusst wird, sind dennoch andere Parameter wie Proliferation und Glutathionspiegel eher stärker verändert wie in AS52-Zellen. Der Mechanismus der durch Resveratrol verursachten Reparaturhemmung bedarf somit weiterer Untersuchungen.

---

## 6 Literaturverzeichnis

- Aas, P.A., Otterlei, M., Falnes, P.O., Vagbo, C.B., Skorpen, F., Akbari, M., Sundheim, O., Bjoras, M., Slupphaug, G., Seeberg, E. and Krokan, H.E. (2003) Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature*, 421, 859-863.
- Ahmad, N., Adhami, V.M., Afaq, F., Feyes, D.K. and Mukhtar, H. (2001) Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Clin Cancer Res*, 7, 1466-1473.
- Ananthaswamy, H.N. and Pierceall, W.E. (1990) Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. *Photochem Photobiol*, 52, 1119-1136.
- Anderhub, S. (2008) Einfluss der Chromatinstruktur auf die Genexpression. Johannes Gutenberg Universität, Mainz.
- Anekonda, T.S. (2006) Resveratrol--a boon for treating Alzheimer's disease? *Brain Res Rev*, 52, 316-326.
- Armour, S.M., Baur, J.A., Hsieh, S.N., Land-Bracha, A., Thomas, S.M. and Sinclair, D.A. (2009) Inhibition of mammalian S6 kinase by resveratrol suppresses autophagy. *Aging (Albany NY)*, 1, 515-528.
- Asagoshi, K., Yamada, T., Terato, H., Ohyama, Y., Monden, Y., Arai, T., Nishimura, S., Aburatani, H., Lindahl, T. and Ide, H. (2000) Distinct repair activities of human 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase and formamidopyrimidine DNA glycosylase for formamidopyrimidine and 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *J Biol Chem*, 275, 4956-4964.
- Bailly, V., Verly, W.G., O'Connor, T. and Laval, J. (1989) Mechanism of DNA strand nicking at apurinic/apyrimidinic sites by Escherichia coli [formamidopyrimidine]DNA glycosylase. *Biochem J*, 262, 581-589.
- Ballmaier, D. (1997) Oxidative DNA-Modifikationen durch extrazellulär und intrazellulär gebildete reaktive Sauerstoffspezies. Julius-Maximilians Universität, Würzburg.
- Baur, J.A. (2010) Biochemical effects of SIRT1 activators. *Biochim Biophys Acta*, 1804, 1626-1634.
- Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P.J., Poosala, S., Becker, K.G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K.W., Spencer, R.G., Lakatta, E.G., Le Couteur, D., Shaw, R.J., Navas,

- 
- P., Puigserver, P., Ingram, D.K., de Cabo, R. and Sinclair, D.A. (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, 444, 337-342.
- Baur, J.A. and Sinclair, D.A. (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 493-506.
- Beehler, B.C., Przybyszewski, J., Box, H.B. and Kulesz-Martin, M.F. (1992) Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine within DNA of mouse keratinocytes exposed in culture to UVB and H2O2. *Carcinogenesis*, 13, 2003-2007.
- Bercht, M. (2006) Generierung und Prozessierung oxidativer DNA-Schäden. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Bertelli, A.A., Giovannini, L., Giannesi, D., Migliori, M., Bernini, W., Fregoni, M. and Bertelli, A. (1995) Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int J Tissue React*, 17, 1-3.
- Bjelland, S. and Seeberg, E. (2003) Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res*, 531, 37-80.
- Blander, G. and Guarente, L. (2004) The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem*, 73, 417-435.
- Boiteux, S., O'Connor, T.R., Lederer, F., Gouyette, A. and Laval, J. (1990) Homogeneous Escherichia coli FPG protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/aprimidinic sites. *J Biol Chem*, 265, 3916-3922.
- Bolden, J.E., Peart, M.J. and Johnstone, R.W. (2006) Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 769-784.
- Borden, A., O'Grady, P.I., Vandewiele, D., Fernandez de Henestrosa, A.R., Lawrence, C.W. and Woodgate, R. (2002) Escherichia coli DNA polymerase III can replicate efficiently past a T-T cis-syn cyclobutane dimer if DNA polymerase V and the 3' to 5' exonuclease proofreading function encoded by dnaQ are inactivated. *J Bacteriol*, 184, 2674-2681.
- Bordone, L., Cohen, D., Robinson, A., Motta, M.C., van Veen, E., Czopik, A., Steele, A.D., Crowe, H., Marmor, S., Luo, J., Gu, W. and Guarente, L. (2007) SIRT1 transgenic mice show phenotypes resembling calorie restriction. *Aging Cell*, 6, 759-767.
- Borra, M.T., Smith, B.C. and Denu, J.M. (2005) Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *J Biol Chem*, 280, 17187-17195.

- 
- Bradamante, S., Piccinini, F., Barenghi, L., Bertelli, A.A., De Jonge, R., Beemster, P. and De Jong, J.W. (2000) Does resveratrol induce pharmacological preconditioning? *Int J Tissue React*, 22, 1-4.
- Bravard, A., Vacher, M., Gouget, B., Coutant, A., de Boisferon, F.H., Marsin, S., Chevillard, S. and Radicella, J.P. (2006) Redox regulation of human OGG1 activity in response to cellular oxidative stress. *Mol Cell Biol*, 26, 7430-7436.
- Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., Hu, L.S., Cheng, H.L., Jedrychowski, M.P., Gygi, S.P., Sinclair, D.A., Alt, F.W. and Greenberg, M.E. (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*, 303, 2011-2015.
- Budiyanto, A., Ueda, M., Ueda, T. and Ichihashi, M. (2002) Formation of cyclobutane pyrimidine dimers and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in mouse and organ-cultured human skin by irradiation with broadband or with narrowband UVB. *Photochem Photobiol*, 76, 397-400.
- Burney, S., Caulfield, J.L., Niles, J.C., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. (1999) The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat Res*, 424, 37-49.
- Burton, G.W. and Ingold, K.U. (1989) Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant. *Ann N Y Acad Sci*, 570, 7-22.
- Cadet, J., Bourdat, A.G., D'Ham, C., Duarte, V., Gasparutto, D., Romieu, A. and Ravanat, J.L. (2000) Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. *Mutat Res*, 462, 121-128.
- Caldecott, K.W. (2001) Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. *Bioessays*, 23, 447-455.
- Candido, E.P., Reeves, R. and Davie, J.R. (1978) Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell*, 14, 105-113.
- Cann, K.L. and Dellaire, G. (2011) Heterochromatin and the DNA damage response: the need to relax. *Biochem Cell Biol*, 89, 45-60.
- Canto, C., Gerhart-Hines, Z., Feige, J.N., Lagouge, M., Noriega, L., Milne, J.C., Elliott, P.J., Puigserver, P. and Auwerx, J. (2009) AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature*, 458, 1056-1060.
- Careri, M., Corradini, C., Elviri, L., Nicoletti, I. and Zagnoni, I. (2004) Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of cis-resveratrol and trans-resveratrol:



- development, validation, and application of the method to red wine, grape, and winemaking byproducts. *J Agric Food Chem*, 52, 6868-6874.
- Chen, C.Y., Jang, J.H., Li, M.H. and Surh, Y.J. (2005a) Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 331, 993-1000.
- Chen, J., Zhou, Y., Mueller-Steiner, S., Chen, L.F., Kwon, H., Yi, S., Mucke, L. and Gan, L. (2005b) SIRT1 protects against microglia-dependent amyloid-beta toxicity through inhibiting NF-kappaB signaling. *J Biol Chem*, 280, 40364-40374.
- Ciolino, H.P., Daschner, P.J. and Yeh, G.C. (1998) Resveratrol inhibits transcription of CYP1A1 in vitro by preventing activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Res*, 58, 5707-5712.
- Coles, B.F. and Kadlubar, F.F. (2003) Detoxification of electrophilic compounds by glutathione S-transferase catalysis: determinants of individual response to chemical carcinogens and chemotherapeutic drugs? *Biofactors*, 17, 115-130.
- Comizzoli, P., Wildt, D.E. and Pukazhenthil, B.S. (2009) In vitro compaction of germinal vesicle chromatin is beneficial to survival of vitrified cat oocytes. *Reprod Domest Anim*, 44 Suppl 2, 269-274.
- Danial, N.N. and Korsmeyer, S.J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell*, 116, 205-219.
- Daniels, D.S., Woo, T.T., Luu, K.X., Noll, D.M., Clarke, N.D., Pegg, A.E. and Tainer, J.A. (2004) DNA binding and nucleotide flipping by the human DNA repair protein AGT. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 714-720.
- Dasgupta, B. and Milbrandt, J. (2007) Resveratrol stimulates AMP kinase activity in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 7217-7222.
- de Laat, W.L., Jaspers, N.G. and Hoeijmakers, J.H. (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev*, 13, 768-785.
- Devasagayam, T.P., Steenken, S., Obendorf, M.S., Schulz, W.A. and Sies, H. (1991) Formation of 8-hydroxy(deoxy)guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. *Biochemistry*, 30, 6283-6289.
- Dinant, C., Houtsmuller, A.B. and Vermeulen, W. (2008) Chromatin structure and DNA damage repair. *Epigenetics Chromatin*, 1, 9.
- Dittenhafer-Reed, K.E., Feldman, J.L. and Denu, J.M. (2011) Catalysis and mechanistic insights into sirtuin activation. *Chembiochem*, 12, 281-289.

- 
- Dizdaroglu, M. (1992) Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res*, 275, 331-342.
- Duncan, T., Trewick, S.C., Koivisto, P., Bates, P.A., Lindahl, T. and Sedgwick, B. (2002) Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 16660-16665.
- Eiberger, W. (2008) Einfluss von oxidativem Stress auf die DNA-Reparatur in Säugerzellen. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Eiberger, W., Volkmer, B., Amouroux, R., Dherin, C., Radicella, J.P. and Epe, B. (2008) Oxidative stress impairs the repair of oxidative DNA base modifications in human skin fibroblasts and melanoma cells. *DNA Repair (Amst)*, 7, 912-921.
- Eker, A.P., Quayle, C., Chaves, I. and van der Horst, G.T. (2009) DNA repair in mammalian cells: Direct DNA damage reversal: elegant solutions for nasty problems. *Cell Mol Life Sci*, 66, 968-980.
- Epe, B. (1991) Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem Biol Interact*, 80, 239-260.
- Epe, B. (1996) DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 127, 223-249.
- Epe, B. (2002) Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice? *Biol Chem*, 383, 467-475.
- Epe, B. and Hegler, J. (1994) Oxidative DNA damage: endonuclease fingerprinting. *Methods Enzymol*, 234, 122-131.
- Epe, B., Pflaum, M. and Boiteux, S. (1993) DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems. *Mutat Res*, 299, 135-145.
- Escargueil, A.E., Soares, D.G., Salvador, M., Larsen, A.K. and Henriques, J.A. (2008) What histone code for DNA repair? *Mutat Res*, 658, 259-270.
- Estrov, Z., Shishodia, S., Faderl, S., Harris, D., Van, Q., Kantarjian, H.M., Talpaz, M. and Aggarwal, B.B. (2003) Resveratrol blocks interleukin-1beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kappaB, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells. *Blood*, 102, 987-995.
- Facklam, M., Schoch, P., Bonetti, E.P., Jenck, F., Martin, J.R., Moreau, J.L. and Haefely, W.E. (1992) Relationship between benzodiazepine receptor occupancy and functional effects in vivo of four ligands of differing intrinsic efficacies. *J Pharmacol Exp Ther*, 261, 1113-1121.
- Fan, W. and Luo, J. (2010) SIRT1 Regulates UV-Induced DNA Repair through Deacetylating XPA. *Mol Cell*, 39, 247-258.

- 
- Fauconneau, B., Waffo-Teguo, P., Huguet, F., Barrier, L., Decendit, A. and Merillon, J.M. (1997) Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sci*, 61, 2103-2110.
- Findlay, G.M. (1979) Ultra-violet light and skin cancer. *CA Cancer J Clin*, 29, 169-171.
- Fortini, P., Parlanti, E., Sidorkina, O.M., Laval, J. and Dogliotti, E. (1999) The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells. *J Biol Chem*, 274, 15230-15236.
- Fraga, M.F., Ballestar, E., Villar-Garea, A., Boix-Chornet, M., Espada, J., Schotta, G., Bonaldi, T., Haydon, C., Ropero, S., Petrie, K., Iyer, N.G., Perez-Rosado, A., Calvo, E., Lopez, J.A., Cano, A., Calasanz, M.J., Colomer, D., Piris, M.A., Ahn, N., Imhof, A., Caldas, C., Jenuwein, T. and Esteller, M. (2005) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet*, 37, 391-400.
- Friedberg, E.C. (1996) Relationships between DNA repair and transcription. *Annu Rev Biochem*, 65, 15-42.
- Friedberg, E.C. (2001) How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer*, 1, 22-33.
- Friedberg, E.C. (2003) DNA damage and repair. *Nature*, 421, 436-440.
- Frosina, G., Fortini, P., Rossi, O., Carrozzino, F., Raspaglio, G., Cox, L.S., Lane, D.P., Abbondandolo, A. and Dogliotti, E. (1996) Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem*, 271, 9573-9578.
- Furumai, R., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Yoshida, M. and Horinouchi, S. (2001) Potent histone deacetylase inhibitors built from trichostatin A and cyclic tetrapeptide antibiotics including trapoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 87-92.
- Fußer, M. (2010) Einfluss von Resveratrol auf oxidative DNA-Schäden und Mutagenese. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.
- Fusser, M., Nesse, G.J., Khobta, A., Xia, N., Li, H., Klungland, A. and Epe, B. (2011) Spontaneous mutagenesis in *Csbm/mOgg1*<sup>-/-</sup> mice is attenuated by dietary resveratrol. *Carcinogenesis*, 32, 80-85.
- Gale, J.M. and Smerdon, M.J. (1990) UV induced (6-4) photoproducts are distributed differently than cyclobutane dimers in nucleosomes. *Photochem Photobiol*, 51, 411-417.

- 
- Gehm, B.D., McAndrews, J.M., Chien, P.Y. and Jameson, J.L. (1997) Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 14138-14143.
- 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.
- Gonzalez-Aragon, D., Alcain, F.J., Ariza, J., Jodar, L., Barbarroja, N., Lopez-Pedrerera, C. and Villalba, J.M. (2010) ES936 stimulates DNA synthesis in HeLa cells independently on NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 inhibition, through a mechanism involving p38 MAPK. *Chem Biol Interact*, 186, 174-183.
- Gottlicher, M., Minucci, S., Zhu, P., Kramer, O.H., Schimpf, A., Giavara, S., Sleeman, J.P., Lo Coco, F., Nervi, C., Pelicci, P.G. and Heinzl, T. (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *Embo J*, 20, 6969-6978.
- Goueli, S.A. (1998) U0126: A Novel, Selective and Potent Inhibitor of MAP Kinase Kinase (MEK). *Promega Notes*, Vol. 69, p. 6.
- Griffith, O.W. and Meister, A. (1985) Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 4668-4672.
- Grunstein, M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, 389, 349-352.
- Halliwell, B. (1996) Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr*, 16, 33-50.
- Halliwell, B. and Aruoma, O.I. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*, 281, 9-19.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (1984) Role of iron in oxygen radical reactions. *Methods Enzymol*, 105, 47-56.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M. (1990) The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys*, 280, 1-8.
- Hebbar, V., Shen, G., Hu, R., Kim, B.R., Chen, C., Korytko, P.J., Crowell, J.A., Levine, B.S. and Kong, A.N. (2005) Toxicogenomics of resveratrol in rat liver. *Life Sci*, 76, 2299-2314.
- Henriksen, T., Dahlback, A., Larsen, S.H. and Moan, J. (1990) Ultraviolet-radiation and skin cancer. Effect of an ozone layer depletion. *Photochem Photobiol*, 51, 579-582.

- 
- Hildmann, C., Riester, D. and Schwienhorst, A. (2007) Histone deacetylases--an important class of cellular regulators with a variety of functions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 75, 487-497.
- Hoeijmakers, J.H. (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, 411, 366-374.
- Hollenbach, S. (1999) Bedeutung endogener Faktoren für Steady-State Level und Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen in Säugerzellen. Johannes Gutenberg Universität, Mainz.
- Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.L., Scherer, B. and Sinclair, D.A. (2003) Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 425, 191-196.
- Huttermann, J. (1982) Solid-state radiation chemistry of DNA and its constituents. *Ultramicroscopy*, 10, 25-40.
- Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M. and Guarente, L. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, 403, 795-800.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D. and Yamamoto, M. (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev*, 13, 76-86.
- Iyengar, S. and Farnham, P.J. (2011) KAP1 Protein: An Enigmatic Master Regulator of the Genome. *J Biol Chem*, 286, 26267-26276.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C. and Pezzuto, J.M. (1997) Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 275, 218-220.
- Jezowska-Bojczuk, M., Szczepanik, W., Lesniak, W., Ciesiolka, J., Wrzesinski, J. and Bal, W. (2002) DNA and RNA damage by Cu(II)-amikacin complex. *Eur J Biochem*, 269, 5547-5556.
- Joe, A.K., Liu, H., Suzui, M., Vural, M.E., Xiao, D. and Weinstein, I.B. (2002) Resveratrol induces growth inhibition, S-phase arrest, apoptosis, and changes in biomarker expression in several human cancer cell lines. *Clin Cancer Res*, 8, 893-903.
- Jose, B., Oniki, Y., Kato, T., Nishino, N., Sumida, Y. and Yoshida, M. (2004) Novel histone deacetylase inhibitors: cyclic tetrapeptide with trifluoromethyl and pentafluoroethyl ketones. *Bioorg Med Chem Lett*, 14, 5343-5346.

- 
- Juan, S.H., Cheng, T.H., Lin, H.C., Chu, Y.L. and Lee, W.S. (2005) Mechanism of concentration-dependent induction of heme oxygenase-1 by resveratrol in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol*, 69, 41-48.
- Kairisalo, M., Bonomo, A., Hyrskyluoto, A., Mudo, G., Belluardo, N., Korhonen, L. and Lindholm, D. (2011) Resveratrol reduces oxidative stress and cell death and increases mitochondrial antioxidants and XIAP in PC6.3-cells. *Neurosci Lett*, 488, 263-266.
- Kensler, T.W., Wakabayashi, N. and Biswal, S. (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 47, 89-116.
- Khanna, K.K. and Jackson, S.P. (2001) DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*, 27, 247-254.
- Kim, J.K., Patel, D. and Choi, B.S. (1995) Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity. *Photochem Photobiol*, 62, 44-50.
- Kimura, Y. and Okuda, H. (2001) Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice. *J Nutr*, 131, 1844-1849.
- Klar, A.J., Fogel, S. and Macleod, K. (1979) MAR1-a Regulator of the HMa and HMalpha Loci in *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. *Genetics*, 93, 37-50.
- Klinedinst, D.K. and Drinkwater, N.R. (1992) Mutagenesis by apurinic sites in normal and ataxia telangiectasia human lymphoblastoid cells. *Mol Carcinog*, 6, 32-42.
- Klotz, L.O. (2007) Reaktive Sauerstoffspezies: Mechanismen der Erzeugung und der (Zyto-) Toxizität.
- Klotz, L.O., Kroncke, K.D. and Sies, H. (2003) Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. *Photochem Photobiol Sci*, 2, 88-94.
- 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.
- Kohn, K.W., Erickson, L.C., Ewig, R.A. and Friedman, C.A. (1976) Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry*, 15, 4629-4637.
- Kovacic, P. and Osuna, J.A., Jr. (2000) Mechanisms of anti-cancer agents: emphasis on oxidative stress and electron transfer. *Curr Pharm Des*, 6, 277-309.

- 
- Kovtun, I.V. and McMurray, C.T. (2007) Crosstalk of DNA glycosylases with pathways other than base excision repair. *DNA Repair (Amst)*, 6, 517-529.
- Krokan, H.E., Nilsen, H., Skorpen, F., Otterlei, M. and Slupphaug, G. (2000) Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett*, 476, 73-77.
- Kubota, Y., Nash, R.A., Klungland, A., Schar, 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.
- Kunz, C., Saito, Y. and Schar, P. (2009) DNA Repair in mammalian cells: Mismatched repair: variations on a theme. *Cell Mol Life Sci*, 66, 1021-1038.
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P. and Auwerx, J. (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell*, 127, 1109-1122.
- Landry, J., Sutton, A., Tafrov, S.T., Heller, R.C., Stebbins, J., Pillus, L. and Sternglanz, R. (2000) The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5807-5811.
- Langcake, P. and Pryce, R.J. (1977) A new class of phytoalexins from grapevines. *Experientia*, 33, 151-152.
- Laval, J. (1996) Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. *Pathol Biol (Paris)*, 44, 14-24.
- Lee, D.Y., Hayes, J.J., Pruss, D. and Wolffe, A.P. (1993) A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell*, 72, 73-84.
- Levin, D.S., Bai, W., Yao, N., O'Donnell, M. and Tomkinson, A.E. (1997) An interaction between DNA ligase I and proliferating cell nuclear antigen: implications for Okazaki fragment synthesis and joining. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 12863-12868.
- Li, Y., Cao, Z. and Zhu, H. (2006) Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress. *Pharmacol Res*, 53, 6-15.
- Liang, Y.C., Tsai, S.H., Chen, L., Lin-Shiau, S.Y. and Lin, J.K. (2003) Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of CDK7 and p34CDC2 kinases in colon carcinoma HT29 cells. *Biochem Pharmacol*, 65, 1053-1060.

- 
- Lin, H.Y., Lansing, L., Merillon, J.M., Davis, F.B., Tang, H.Y., Shih, A., Vitrac, X., Krisa, S., Keating, T., Cao, H.J., Bergh, J., Quackenbush, S. and Davis, P.J. (2006) Integrin alphaVbeta3 contains a receptor site for resveratrol. *Faseb J*, 20, 1742-1744.
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362, 709-715.
- Lippke, J.A., Gordon, L.K., Brash, D.E. and Haseltine, W.A. (1981) Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 3388-3392.
- Loeb, L.A., Loeb, K.R. and Anderson, J.P. (2003) Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 776-781.
- Loft, S. and Poulsen, H.E. (1996) Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med*, 74, 297-312.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389, 251-260.
- Luger, K. and Richmond, T.J. (1998) The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev*, 8, 140-146.
- Luo, J., Nikolaev, A.Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L. and Gu, W. (2001) Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*, 107, 137-148.
- Maher, P., Dargusch, R., Bodai, L., Gerard, P.E., Purcell, J.M. and Marsh, J.L. (2011) ERK activation by the polyphenols fisetin and resveratrol provides neuroprotection in multiple models of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 20, 261-270.
- Marks, P., Rifkind, R.A., Richon, V.M., Breslow, R., Miller, T. and Kelly, W.K. (2001) Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer*, 1, 194-202.
- Markus, M.A. and Morris, B.J. (2008) Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging. *Clin Interv Aging*, 3, 331-339.
- Marshall, J.L., Rizvi, N., Kauh, J., Dahut, W., Figuera, M., Kang, M.H., Figg, W.D., Wainer, I., Chaissang, C., Li, M.Z. and Hawkins, M.J. (2002) A phase I trial of depsipeptide (FR901228) in patients with advanced cancer. *J Exp Ther Oncol*, 2, 325-332.
- Marti, T.M., Kunz, C. and Fleck, O. (2002) DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J Cell Physiol*, 191, 28-41.



- 
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C. and Giovannini, C. (2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*, 16, 577-586.
- Masumoto, H., Hawke, D., Kobayashi, R. and Verreault, A. (2005) A role for cell-cycle-regulated histone H3 lysine 56 acetylation in the DNA damage response. *Nature*, 436, 294-298.
- Matsunaga, T., Mu, D., Park, C.H., Reardon, J.T. and Sancar, A. (1995) Human DNA repair excision nuclease. Analysis of the roles of the subunits involved in dual incisions by using anti-XPG and anti-ERCC1 antibodies. *J Biol Chem*, 270, 20862-20869.
- Maynard, S., Schurman, S.H., Harboe, C., de Souza-Pinto, N.C. and Bohr, V.A. (2009) Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis*, 30, 2-10.
- McAinsh, A.D., Scott-Drew, S., Murray, J.A. and Jackson, S.P. (1999) DNA damage triggers disruption of telomeric silencing and Mec1p-dependent relocation of Sir3p. *Curr Biol*, 9, 963-966.
- McCullough, A.K., Dodson, M.L. and Lloyd, R.S. (1999) Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures. *Annu Rev Biochem*, 68, 255-285.
- Mehta, A.K. and Shank, R.P. (1995) Interaction of abecarnil, bretazenil, and RO 19-8022 with diazepam-sensitive and -insensitive benzodiazepine sites in the rat cerebellum and cerebral cortex. *Life Sci*, 57, 2215-2222.
- Michan, S. and Sinclair, D. (2007) Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*, 404, 1-13.
- Mills, K.D., Sinclair, D.A. and Guarente, L. (1999) MEC1-dependent redistribution of the Sir3 silencing protein from telomeres to DNA double-strand breaks. *Cell*, 97, 609-620.
- Milne, J.C., Lambert, P.D., Schenk, S., Carney, D.P., Smith, J.J., Gagne, D.J., Jin, L., Boss, O., Perni, R.B., Vu, C.B., Bemis, J.E., Xie, R., Disch, J.S., Ng, P.Y., Nunes, J.J., Lynch, A.V., Yang, H., Galonek, H., Israelian, K., Choy, W., Iffland, A., Lavu, S., Medvedik, O., Sinclair, D.A., Olefsky, J.M., Jirousek, M.R., Elliott, P.J. and Westphal, C.H. (2007) Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*, 450, 712-716.
- Minton, K., Durphy, M., Taylor, R. and Friedberg, E.C. (1975) The ultraviolet endonuclease of bacteriophage T4. Further characterization. *J Biol Chem*, 250, 2823-2829.

- 
- Mitchell, D.L., Jen, J. and Cleaver, J.E. (1991) Relative induction of cyclobutane dimers and cytosine photohydrates in DNA irradiated in vitro and in vivo with ultraviolet-C and ultraviolet-B light. *Photochem Photobiol*, 54, 741-746.
- Moggs, J.G., Yarema, K.J., Essigmann, J.M. and Wood, R.D. (1996) Analysis of incision sites produced by human cell extracts and purified proteins during nucleotide excision repair of a 1,3-intrastrand d(GpTpG)-cisplatin adduct. *J Biol Chem*, 271, 7177-7186.
- Moriya, M. (1993) Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C-->T.A transversions in simian kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 1122-1126.
- Mortensen, A., Skibsted, L.H. and Truscott, T.G. (2001) The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Arch Biochem Biophys*, 385, 13-19.
- Motohashi, H. and Yamamoto, M. (2004) Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med*, 10, 549-557.
- Mulligan, R.C. and Berg, P. (1980) Expression of a bacterial gene in mammalian cells. *Science*, 209, 1422-1427.
- Mutskov, V. and Felsenfeld, G. (2004) Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. *Embo J*, 23, 138-149.
- Nakabeppu, Y., Yamashita, K. and Sekiguchi, M. (1982) Purification and characterization of normal and mutant forms of T4 endonuclease V. *J Biol Chem*, 257, 2556-2562.
- Nakagawa, M., Oda, Y., Eguchi, T., Aishima, S., Yao, T., Hosoi, F., Basaki, Y., Ono, M., Kuwano, M., Tanaka, M. and Tsuneyoshi, M. (2007) Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. *Oncol Rep*, 18, 769-774.
- Nakamura, J., Purvis, E.R. and Swenberg, J.A. (2003) Micromolar concentrations of hydrogen peroxide induce oxidative DNA lesions more efficiently than millimolar concentrations in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 31, 1790-1795.
- Napper, A.D., Hixon, J., McDonagh, T., Keavey, K., Pons, J.F., Barker, J., Yau, W.T., Amouzegh, P., Flegg, A., Hamelin, E., Thomas, R.J., Kates, M., Jones, S., Navia, M.A., Saunders, J.O., DiStefano, P.S. and Curtis, R. (2005) Discovery of indoles as potent and selective inhibitors of the deacetylase SIRT1. *J Med Chem*, 48, 8045-8054.
- Nichols, A.F. and Sancar, A. (1992) Purification of PCNA as a nucleotide excision repair protein. *Nucleic Acids Res*, 20, 2441-2446.

- 
- North, B.J. and Verdin, E. (2004) Sirtuins: Sir2-related NAD-dependent protein deacetylases. *Genome Biol*, 5, 224.
- Nouspikel, T. (2007) DNA repair in differentiated cells: some new answers to old questions. *Neuroscience*, 145, 1213-1221.
- O'Connor, T.R., Boiteux, S. and Laval, J. (1989) Repair of imidazole ring-opened purines in DNA: overproduction of the formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli* using plasmids containing the *fpg+* gene. *Ann Ist Super Sanita*, 25, 27-31.
- O'Connor, T.R., Graves, R.J., de Murcia, G., Castaing, B. and Laval, J. (1993) Fpg protein of *Escherichia coli* is a zinc finger protein whose cysteine residues have a structural and/or functional role. *J Biol Chem*, 268, 9063-9070.
- O'Connor, T.R. and Laval, J. (1989) Physical association of the 2,6-diamino-4-hydroxy-5N-formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli* and an activity nicking DNA atapurinic/aprimidinic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 5222-5226.
- Orallo, F., Alvarez, E., Camina, M., Leiro, J.M., Gomez, E. and Fernandez, P. (2002) The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol Pharmacol*, 61, 294-302.
- 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.
- Palmer, H.J. and Paulson, K.E. (1997) Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression. *Nutr Rev*, 55, 353-361.
- Pardo, B., Gomez-Gonzalez, B. and Aguilera, A. (2009) DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell Mol Life Sci*, 66, 1039-1056.
- Pardo, P.S., Mohamed, J.S., Lopez, M.A. and Boriek, A.M. (2011) Induction of Sirt1 by mechanical stretch of skeletal muscle through the early response factor EGR1 triggers an antioxidative response. *J Biol Chem*, 286, 2559-2566.
- Perron, N.R. and Brumaghim, J.L. (2009) A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. *Cell Biochem Biophys*, 53, 75-100.
- Petermann, E., Ziegler, M. and Oei, S.L. (2003) ATP-dependent selection between single nucleotide and long patch base excision repair. *DNA Repair (Amst)*, 2, 1101-1114.

- 
- Pfeifer, G.P. (1997) Formation and processing of UV photoproducts: effects of DNA sequence and chromatin environment. *Photochem Photobiol*, 65, 270-283.
- Pflaum, M. (1996) Oxidative DNA-Modifikationen durch langwelliges UV-Licht und sichtbares Licht. Julius-Maximilians-Universität, Würzburg.
- Phillips, D.M. and Johns, E.W. (1965) A Fractionation of the Histones of Group F2a from Calf Thymus. *Biochem J*, 94, 127-130.
- Polach, K.J. and Widom, J. (1995) Mechanism of protein access to specific DNA sequences in chromatin: a dynamic equilibrium model for gene regulation. *J Mol Biol*, 254, 130-149.
- Popanda, O. and Thielmann, H.W. (1992) The function of DNA polymerases in DNA repair synthesis of ultraviolet-irradiated human fibroblasts. *Biochim Biophys Acta*, 1129, 155-160.
- Pryor, W.A. (2000) Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials. *Free Radic Biol Med*, 28, 141-164.
- Raffoux, E., Chaibi, P., Dombret, H. and Degos, L. (2005) Valproic acid and all-trans retinoic acid for the treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*, 90, 986-988.
- Ramanathan, B. and Smerdon, M.J. (1989) Enhanced DNA repair synthesis in hyperacetylated nucleosomes. *J Biol Chem*, 264, 11026-11034.
- Rass, U., Ahel, I. and West, S.C. (2007) Defective DNA repair and neurodegenerative disease. *Cell*, 130, 991-1004.
- Regan, J.D. and Yoshida, H. (1995) DNA UVB dosimeters. *J Photochem Photobiol B*, 31, 57-61.
- Renaud, S. and de Lorgeril, M. (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339, 1523-1526.
- Rice-Evans, C. (2001) Flavonoid antioxidants. *Curr Med Chem*, 8, 797-807.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*, 20, 933-956.
- Richon, V.M., Sandhoff, T.W., Rifkind, R.A. and Marks, P.A. (2000) Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 10014-10019.
- Robertson, A.B., Klungland, A., Rognes, T. and Leiros, I. (2009) DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci*, 66, 981-993.

- 
- Rocha, K.K., Souza, G.A., Seiva, F.R., Ebaid, G.X. and Novelli, E.L. (2011) Weekend ethanol consumption and high-sucrose diet: resveratrol effects on energy expenditure, substrate oxidation, lipid profile, oxidative stress and hepatic energy metabolism. *Alcohol Alcohol*, 46, 10-16.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S.P., Spiegelman, B.M. and Puigserver, P. (2005) Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature*, 434, 113-118.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S. and Bonner, W.M. (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 273, 5858-5868.
- Rogina, B. and Helfand, S.L. (2004) Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 15998-16003.
- Ronen, A. and Glickman, B.W. (2001) Human DNA repair genes. *Environ Mol Mutagen*, 37, 241-283.
- Roos, W.P. and Kaina, B. (2006) DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med*, 12, 440-450.
- Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kacmaz, K. and Linn, S. (2004) Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem*, 73, 39-85.
- Sancar, A. and Rupp, W.D. (1983) A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region. *Cell*, 33, 249-260.
- Sandor, V., Senderowicz, A., Mertins, S., Sackett, D., Sausville, E., Blagosklonny, M.V. and Bates, S.E. (2000) P21-dependent G1 arrest with downregulation of cyclin D1 and upregulation of cyclin E by the histone deacetylase inhibitor FR901228. *Br J Cancer*, 83, 817-825.
- Saunders, L.R. and Verdin, E. (2007) Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging. *Oncogene*, 26, 5489-5504.
- Scharer, O.D. and Jiricny, J. (2001) Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *Bioessays*, 23, 270-281.
- Sealy, L. and Chalkley, R. (1978) The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell*, 14, 115-121.
- Seely, K.A., Levi, M.S. and Prather, P.L. (2009) The dietary polyphenols trans-resveratrol and curcumin selectively bind human CB1 cannabinoid receptors with nanomolar affinities and function as antagonists/inverse agonists. *J Pharmacol Exp Ther*, 330, 31-39.

- 
- Shakibaei, M., Harikumar, K.B. and Aggarwal, B.B. (2009) Resveratrol addiction: to die or not to die. *Mol Nutr Food Res*, 53, 115-128.
- Shen, M.Y., Hsiao, G., Liu, C.L., Fong, T.H., Lin, K.H., Chou, D.S. and Sheu, J.R. (2007) Inhibitory mechanisms of resveratrol in platelet activation: pivotal roles of p38 MAPK and NO/cyclic GMP. *Br J Haematol*, 139, 475-485.
- Shibutani, S., Takeshita, M. and Grollman, A.P. (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, 349, 431-434.
- Shivji, K.K., Kenny, M.K. and Wood, R.D. (1992) Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair. *Cell*, 69, 367-374.
- Sies, H. (1986) Biochemie des oxidativen Stress. *Angew. Chem.* 98, pp. 1061-1075.
- Sies, H. (1991) Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants. *Academic Press Inc.*
- Sies, H., Stahl, W. and Sundquist, A.R. (1992) Antioxidant functions of vitamins. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids. *Ann N Y Acad Sci*, 669, 7-20.
- Slupphaug, G., Kavli, B. and Krokan, H.E. (2003) The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res*, 531, 231-251.
- Slupphaug, G., Olsen, L.C., Helland, D., Aasland, R. and Krokan, H.E. (1991) Cell cycle regulation and in vitro hybrid arrest analysis of the major human uracil-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res*, 19, 5131-5137.
- Smerdon, M.J. and Lieberman, M.W. (1978) Nucleosome rearrangement in human chromatin during UV-induced DNA-repair synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75, 4238-4241.
- Solomon, J.M., Pasupuleti, R., Xu, L., McDonagh, T., Curtis, R., DiStefano, P.S. and Huber, L.J. (2006) Inhibition of SIRT1 catalytic activity increases p53 acetylation but does not alter cell survival following DNA damage. *Mol Cell Biol*, 26, 28-38.
- Srivenugopal, K.S., Yuan, X.H., Friedman, H.S. and Ali-Osman, F. (1996) Ubiquitination-dependent proteolysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O6-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochemistry*, 35, 1328-1334.
- Stadtman, E.R. and Barker, H.A. (1949) Fatty acid synthesis by enzyme preparations of *Clostridium kluyveri*; a consideration of postulated 4-carbon intermediates in butyrate synthesis. *J Biol Chem*, 181, 221-235.

- 
- Sterner, D.E. and Berger, S.L. (2000) Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64, 435-459.
- Sugasawa, K. (2010) Regulation of damage recognition in mammalian global genomic nucleotide excision repair. *Mutat Res*, 685, 29-37.
- Sugasawa, K., Ng, J.M., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P.J., Eker, A.P., Hanaoka, F., Bootsma, D. and Hoeijmakers, J.H. (1998) Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell*, 2, 223-232.
- Svoboda, D.L., Taylor, J.S., Hearst, J.E. and Sancar, A. (1993) DNA repair by eukaryotic nucleotide excision nuclease. Removal of thymine dimer and psoralen monoadduct by HeLa cell-free extract and of thymine dimer by *Xenopus laevis* oocytes. *J Biol Chem*, 268, 1931-1936.
- Szewczuk, L.M., Forti, L., Stivala, L.A. and Penning, T.M. (2004) Resveratrol is a peroxidase-mediated inactivator of COX-1 but not COX-2: a mechanistic approach to the design of COX-1 selective agents. *J Biol Chem*, 279, 22727-22737.
- Tang, J. and Chu, G. (2002) Xeroderma pigmentosum complementation group E and UV-damaged DNA-binding protein. *DNA Repair (Amst)*, 1, 601-616.
- Tchou, J. and Grollman, A.P. (1993) Repair of DNA containing the oxidatively-damaged base, 8-oxoguanine. *Mutat Res*, 299, 277-287.
- Teoule, R. (1987) Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 51, 573-589.
- Thoma, F. (1999) Light and dark in chromatin repair: repair of UV-induced DNA lesions by photolyase and nucleotide excision repair. *Embo J*, 18, 6585-6598.
- Thrower, D.A. and Bloom, K. (2001) Dicentric chromosome stretching during anaphase reveals roles of Sir2/Ku in chromatin compaction in budding yeast. *Mol Biol Cell*, 12, 2800-2812.
- Tindall, K.R. and Stankowski, L.F., Jr. (1989) Molecular analysis of spontaneous mutations at the gpt locus in Chinese hamster ovary (AS52) cells. *Mutat Res*, 220, 241-253.
- Tindall, K.R., Stankowski, L.F., Jr., Machanoff, R. and Hsie, A.W. (1984) Detection of deletion mutations in pSV2gpt-transformed cells. *Mol Cell Biol*, 4, 1411-1415.
- Tindall, K.R., Stankowski, L.F., Jr., Machanoff, R. and Hsie, A.W. (1986) Analyses of mutation in pSV2gpt-transformed CHO cells. *Mutat Res*, 160, 121-131.

- 
- Tissenbaum, H.A. and Guarente, L. (2001) Increased dosage of a sir-2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 410, 227-230.
- Tornaletti, S. (2009) DNA repair in mammalian cells: Transcription-coupled DNA repair: directing your effort where it's most needed. *Cell Mol Life Sci*, 66, 1010-1020.
- Tse, C., Sera, T., Wolffe, A.P. and Hansen, J.C. (1998) Disruption of higher-order folding by core histone acetylation dramatically enhances transcription of nucleosomal arrays by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol*, 18, 4629-4638.
- Tseng, S.H., Lin, S.M., Chen, J.C., Su, Y.H., Huang, H.Y., Chen, C.K., Lin, P.Y. and Chen, Y. (2004) Resveratrol suppresses the angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats. *Clin Cancer Res*, 10, 2190-2202.
- Tsukamoto, Y., Kato, J. and Ikeda, H. (1997) Silencing factors participate in DNA repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, 388, 900-903.
- Tudek, B., Boiteux, S. and Laval, J. (1992) Biological properties of imidazole ring-opened N7-methylguanine in M13mp18 phage DNA. *Nucleic Acids Res*, 20, 3079-3084.
- Ungvari, Z., Orosz, Z., Rivera, A., Labinsky, N., Xiangmin, Z., Olson, S., Podlutzky, A. and Csiszar, A. (2007) Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 292, H2417-2424.
- Ura, K. and Hayes, J.J. (2002) Nucleotide excision repair and chromatin remodeling. *Eur J Biochem*, 269, 2288-2293.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160, 1-40.
- Vaquero, A., Sternglanz, R. and Reinberg, D. (2007) NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene*, 26, 5505-5520.
- Vassilev, L.T., Vu, B.T., Graves, B., Carvajal, D., Podlaski, F., Filipovic, Z., Kong, N., Kammlott, U., Lukacs, C., Klein, C., Fotouhi, N. and Liu, E.A. (2004) In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science*, 303, 844-848.
- Vaziri, H., Dessain, S.K., Ng Eaton, E., Imai, S.I., Frye, R.A., Pandita, T.K., Guarente, L. and Weinberg, R.A. (2001) hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*, 107, 149-159.
- Wallace, D.C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, 283, 1482-1488.



- 
- Wallace, S.S. (2002) Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med*, 33, 1-14.
- Wang, R.H., Sengupta, K., Li, C., Kim, H.S., Cao, L., Xiao, C., Kim, S., Xu, X., Zheng, Y., Chilton, B., Jia, R., Zheng, Z.M., Appella, E., Wang, X.W., Ried, T. and Deng, C.X. (2008) Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell*, 14, 312-323.
- Wang, Z., Huang, Y., Zou, J., Cao, K., Xu, Y. and Wu, J.M. (2002) Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro. *Int J Mol Med*, 9, 77-79.
- Wellinger, R.E. and Thoma, F. (1997) Nucleosome structure and positioning modulate nucleotide excision repair in the non-transcribed strand of an active gene. *Embo J*, 16, 5046-5056.
- Will, O. (1995) Untersuchung zellulärer DNA-Schäden induziert durch Ro19-8022 in Gegenwart von Licht und deren Charakterisierung mit Hilfe von Reparaturenukleasen. Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Will, O. (1999) Steady-State level oxidativer DNA-Modifikationen in Säugerzellen und ihre Beeinflussbarkeit. Johannes Gutenberg Universität, Mainz.
- 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, Ro19-8022. *Mutat Res*, 435, 89-101.
- Witkin, E.M. (1976) Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev*, 40, 869-907.
- Wood, R.D., Mitchell, M. and Lindahl, T. (2005) Human DNA repair genes, 2005. *Mutat Res*, 577, 275-283.
- Woodcock, C.L. and Dimitrov, S. (2001) Higher-order structure of chromatin and chromosomes. *Curr Opin Genet Dev*, 11, 130-135.
- Yang, H., Hoshino, K., Sanchez-Gonzalez, B., Kantarjian, H. and Garcia-Manero, G. (2005) Antileukemia activity of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid. *Leuk Res*, 29, 739-748.
- Yoo, C.B. and Jones, P.A. (2006) Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*, 5, 37-50.

- 
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M. and Beppu, T. (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem*, 265, 17174-17179.
- Yu, S.L., Lee, S.K., Johnson, R.E., Prakash, L. and Prakash, S. (2003) The stalling of transcription at abasic sites is highly mutagenic. *Mol Cell Biol*, 23, 382-388.
- Yu, Z., Chen, J., Ford, B.N., Brackley, M.E. and Glickman, B.W. (1999) Human DNA repair systems: an overview. *Environ Mol Mutagen*, 33, 3-20.
- Zang, M., Xu, S., Maitland-Toolan, K.A., Zuccollo, A., Hou, X., Jiang, B., Wierzbicki, M., Verbeuren, T.J. and Cohen, R.A. (2006) Polyphenols stimulate AMP-activated protein kinase, lower lipids, and inhibit accelerated atherosclerosis in diabetic LDL receptor-deficient mice. *Diabetes*, 55, 2180-2191.

---

---

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Basalspiegel oxidativer DNA-Modifikationen.....	2
Abbildung 1.2: Sequentielle Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser.....	3
Abbildung 1.3: Metallkatalysierte Bildung von Hydroxylradikalen.....	4
Abbildung 1.4: Enzymatische antioxidative Schutzmechanismen .....	5
Abbildung 1.5: Keap1-Nrf2-ARE Signalweg.....	8
Abbildung 1.6: DNA-Basenmodifikationen.....	9
Abbildung 1.7: Strukturformel von Ro19-8022.....	11
Abbildung 1.8: Basenexzisionsreparatur .....	14
Abbildung 1.9: Nukleotidexzisionsreparatur.....	17
Abbildung 1.10: HR und NHEJ .....	19
Abbildung 1.11: Aufbau des Chromatins.....	21
Abbildung 1.12: Klassifizierung der Sirtuine .....	23
Abbildung 1.13: Strukturformel von Resveratrol.....	25
Abbildung 1.14: Effekte von HDAC-Inhibitoren auf Krebszellen.....	27
Abbildung 1.15: Strukturformeln von Na-Buyart, Na-Valproat und Trichostatin A.....	27
Abbildung 2.1: Versuchsaufbau für die Bestimmung der Proliferation .....	48
Abbildung 2.2: Prinzip der Alkalischen Elution) .....	50
Abbildung 2.3: Versuchsaufbau zur Bestimmung spontaner Mutationsraten .....	55
Abbildung 2.4: Versuchsaufbau zur Bestimmung induzierter Mutationsraten.....	56
Abbildung 2.5: Graphische Darstellung der durchflusszytometrischen Messung zur Bestimmung der Zellzyklusverteilung mit Propidiumiodid.....	59
Abbildung 2.6: Anordnung zum Blotten der Membran.....	61
Abbildung 3.1: Globale DNA-Zugänglichkeit unter Einfluss von Resveratrol. ....	64
Abbildung 3.2: Proliferation von AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol .....	65
Abbildung 3.3: Proliferationsfaktoren für AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol. ....	66
Abbildung 3.4: Proliferationsfaktoren für AS52-Zellen im Anschluss an eine Resveratrolbehandlung	66
Abbildung 3.5: Koloniebildungsfähigkeit in AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol.....	67
Abbildung 3.6: Zellzyklusverteilung in AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol .....	68
Abbildung 3.7: Koloniebildungsfähigkeit in AS52-Zellen unter Einfluss von Ro19-8022.....	69

---

Abbildung 3.8: Koloniebildungsfähigkeit von AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol und Ro19-8022.....	70
Abbildung 3.9: Schadensinduktion in AS52-Zellen in Gegenwart von Resveratrol.....	71
Abbildung 3.10: Basalspiegel Fpg-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol.	71
Abbildung 3.11: Einfluss von Resveratrol auf die Induktion Fpg-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen...	72
Abbildung 3.12: Reparatur Fpg-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen unter Einfluss von 75 µM Resveratrol.....	73
Abbildung 3.13: Restschaden Fpg-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen nach 3h unter Einfluss von Resveratrol.....	73
Abbildung 3.14: Basalspiegel T4-EndoV-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol.....	74
Abbildung 3.15: Einfluss von Resveratrol auf die Induktion T4-EndoV-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen .....	75
Abbildung 3.16: Reparatur T4-EndoV-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol.....	76
Abbildung 3.17: Restschaden T4-EndoV-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen nach 8h unter Einfluss von Resveratrol.....	76
Abbildung 3.18: Reparatur T4-EndoV- und Fpg-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol.....	77
Abbildung 3.19: Einfluss von Resveratrol auf die Induktion von Einzelstrangbrüchen durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> bei 37°C in AS52-Zellen .....	78
Abbildung 3.20: Induktion von Einzelstrangbrüchen unter Einfluss von Resveratrol in AS52-Zellen...	79
Abbildung 3.21: Reparatur von Einzelstrangbrüchen unter Einfluss von Resveratrol in AS52-Zellen ..	79
Abbildung 3.22: Einfluss von Resveratrol auf die Induktion von Einzelstrangbrüchen durch H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> bei 0°C in AS52-Zellen .....	80
Abbildung 3.23: Induktion von Einzelstrangbrüchen unter Einfluss von Resveratrol in AS52-Zellen...	81
Abbildung 3.24: Reparatur von Einzelstrangbrüchen unter Einfluss von Resveratrol in AS52-Zellen ..	82
Abbildung 3.25: Restschaden Fpg-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen nach 3h unter Einfluss von Resveratrol und EX-527 .....	83
Abbildung 3.26: Restschaden T4-EndoV-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen nach 8h unter Einfluss von Resveratrol und EX-527 .....	83
Abbildung 3.27: Reparatur von Einzelstrangbrüchen in AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol und EX-527 .....	84

---

---

Abbildung 3.28: Restschaden T4-EndoV-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen nach 8h unter Einfluss von Resveratrol und TSA .....	85
Abbildung 3.29: Restschaden Fpg-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen nach 3h unter Einfluss von Resveratrol und DTT .....	86
Abbildung 3.30: Gesamt-Glutathiongehalt in AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol .....	87
Abbildung 3.31: Gesamt-Glutathiongehalt unter Einfluss von Resveratrol und dem SIRT1-Inhibitor EX-527 in AS52-Zellen.....	88
Abbildung 3.32: Restschaden T4-EndoV-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen nach 8h unter Einfluss von Resveratrol und U-0126 / PD 169316.....	89
Abbildung 3.33: Koloniebildungsfähigkeit in AS52-Zellen unter Einfluss von Ro19-8022 und U-0126 / PD 169316.....	90
Abbildung 3.34: Gesamt-Glutathiongehalt unter Einfluss von Resveratrol und dem MEK-Inhibitor U-0126 in AS52-Zellen.....	91
Abbildung 3.35: Western Blot der Expression von p53 nach UV-B Bestrahlung .....	92
Abbildung 3.36: Einfluss von Resveratrol auf die p53-Expression in AS52-Zellen .....	92
Abbildung 3.37: Einfluss einer UV-B Bestrahlung auf die p53-Expression in AS52-Zellen .....	93
Abbildung 3.38: Western Blot der Expression von p53 nach UV-B Bestrahlung und (±)-Nutlin-3 Behandlung.....	93
Abbildung 3.39: Einfluss von (±)-Nutlin-3 auf die p53-Expression in AS52-Zellen.....	94
Abbildung 3.40: p53-Expression nach (±)-Nutlin-3 Behandlung und UV-B Bestrahlung in AS52-Zellen .....	94
Abbildung 3.41: Proliferation in HeLa-Zellen unter Einfluss von Resveratrol.....	95
Abbildung 3.42: Einfluss von Resveratrol auf den Gesamt-Glutathiongehalt in HeLa-Zellen .....	96
Abbildung 3.43: Einfluss von Resveratrol auf die Basalspiegel Fpg-sensitiver Läsionen in HeLa-Zellen .....	97
Abbildung 3.44: Einfluss von Resveratrol auf die Induktion Fpg-sensitiver Läsionen in HeLa-Zellen...	97
Abbildung 3.45: Reparatur Fpg-sensitiver Läsionen in HeLa-Zellen unter Einfluss von Resveratrol ...	98
Abbildung 3.46: Restschaden Fpg-sensitiver Läsionen in HeLa-Zellen nach 3h unter Einfluss von Resveratrol.....	98
Abbildung 3.47: Einfluss von Resveratrol auf die Basalspiegel T4-EndoV-sensitiver Läsionen in HeLa-Zellen .....	99
Abbildung 3.48: Einfluss von Resveratrol auf die Induktion T4-EndoV-sensitiver Läsionen in HeLa-Zellen .....	99

---

Abbildung 3.49: Reparatur T4-EndoV-sensitiver Läsionen in HeLa-Zellen unter Einfluss von Resveratrol.....	100
Abbildung 3.50: Restschaden T4-EndoV-sensitiver Läsionen in HeLa-Zellen nach 8h unter Einfluss von Resveratrol.....	100
Abbildung 3.51: Spontane Mutationen in AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol.....	102
Abbildung 3.52: Induzierte Mutationen in AS52-Zellen unter Einfluss von Resveratrol.....	103
Abbildung 3.53: Proliferation von AS52-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Resveratrol.....	104
Abbildung 3.54: Zellzyklusverteilung nach 72-stündiger Resveratrolinkubation. ....	105
Abbildung 3.55: Globale DNA-Zugänglichkeit unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren.....	106
Abbildung 3.56: Proliferation von AS52-Zellen unter Einfluss von Na-Butyrat .....	107
Abbildung 3.57: Proliferation von AS52-Zellen unter Einfluss von Trichostatin A.....	107
Abbildung 3.58: Koloniebildungsfähigkeit von AS52-Zellen unter Einfluss von Na-Butyrat.....	108
Abbildung 3.59: Koloniebildungsfähigkeit von AS52-Zellen unter Einfluss von Trichostatin A .....	109
Abbildung 3.60: Zellzyklusverteilung in AS52-Zellen unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren.....	110
Abbildung 3.61: Gesamt-Glutathiongehalt in AS52-Zellen unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren.....	111
Abbildung 3.62: Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Basalspiegel Fpg-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen .....	111
Abbildung 3.63: Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Induktion Fpg-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen .....	112
Abbildung 3.64: Reparatur Fpg-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren .....	112
Abbildung 3.65: Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Basalspiegel T4-EndoV-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen.....	113
Abbildung 3.66: Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Induktion T4-EndoV-sensitiver Läsionen.....	114
Abbildung 3.67: Reparatur T4-EndoV-sensitiver Läsionen in AS52-Zellen unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren .....	114
Abbildung 3.68: Spontane Mutationen in AS52-Zellen unter Einfluss von HDAC-Inhibitoren .....	115
Abbildung 3.69: Induzierte Mutationen in AS52-Zellen unter Einfluss von Na-Butyrat.....	116
Abbildung 3.70: Induzierte Mutationen in AS52-Zellen unter Einfluss von Trichostatin A .....	117
Abbildung 3.71: Proliferation von AS52-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Na-Butyrat .....	118
Abbildung 3.72: Proliferation von AS52-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Trichostatin A.....	118
Abbildung 3.73: Zellzyklusverteilung in AS52-Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit HDAC-Inhibitoren. ....	119

---

---

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Reaktive Sauerstoffspezies und ihre geschätzte Halbwertszeit in Zellen .....	3
Tabelle 1.2: Erkennungsspektren einer Auswahl menschlicher und bakterieller Glykosylasen.....	16
Tabelle 1.3: Acetylierungs- und Methylierungspositionen der Histone H2A, H2B, H3 und H4 .....	21
Tabelle 1.4: Einteilung von Histondeacetylasen .....	22
Tabelle 1.5: Einteilung einiger exemplarischer Histondeacetylase-Inhibitoren .....	27
Tabelle 3.1: Proliferationsfaktoren für HeLa-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Resveratrol..	96