

**Einfluss von Stickstoffmonoxid,
Hydroxylradikalen und Peroxynitrit
auf DNA-Schäden,
DNA-Reparatur und Mutationen**

Dissertation
zum Erlangen des Grades

"DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN"

der Johannes Gutenberg-Universität

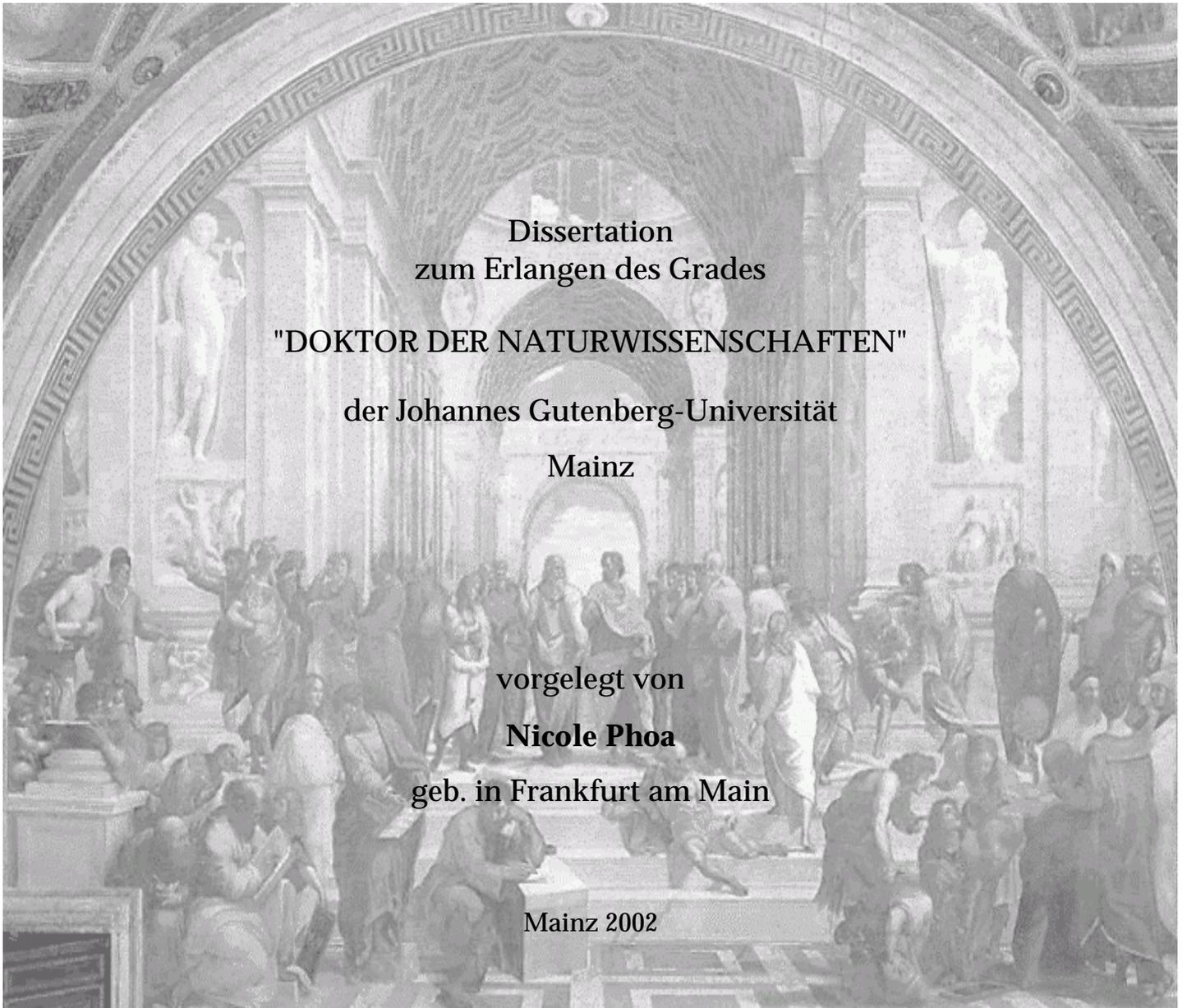
Mainz

vorgelegt von

Nicole Phoa

geb. in Frankfurt am Main

Mainz 2002



„Die Philosophenschule von Athen“, (Raffael)

**Einfluss von Stickstoffmonoxid,
Hydroxylradikalen und Peroxynitrit
auf DNA-Schäden,
DNA-Reparatur und Mutationen**

Dissertation
zum Erlangen des Grades

"DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN"

der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

vorgelegt von

Nicole Phoa

geb. in Frankfurt am Main

Mainz 2002

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2002

> *Carpe diem.* <

meinem Mann und meinen Eltern

> *Gutta cavat lapidem non vi
sed saepe cadendo.* <
(Ovid)

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einführung.....	1
1.1	Physiologische Bildung und Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO)	2
1.2	Reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffspezies.....	3
1.2.1	Endogene Quellen reaktiver Sauerstoffspezies.....	4
1.2.2	Endogene Quellen reaktiver Stickstoffspezies	6
1.2.3	Experimentelle Generierung reaktiver Spezies ³³	9
1.2.3.1	ROS durch Überexpression von Genen	9
1.2.3.2	ROS durch Ro 19-8022 in Verbindung mit sichtbarem Licht.....	10
1.2.3.3	ROS durch UVB	11
1.2.3.4	ROS durch Wasserstoffperoxid	12
1.2.3.5	ROS durch tert.-Butylhydroperoxid.....	12
1.2.3.6	ROS durch Dipropylentriamin-NONOat	13
1.2.3.7	ROS durch SIN-1.....	13
1.2.3.8	ROS durch 4-HPT	14
1.3	DNA-Modifikationen durch reaktive Spezies.....	16
1.3.1	DNA-Modifikationen durch reaktive Sauerstoffspezies	16
1.3.2	DNA-Modifikationen durch reaktive Stickstoffspezies	18
1.4	Biologische Konsequenzen der durch ROS verursachten oxidativen DNA-Modifikationen und einer erhöhten NO-Produktion	21
1.4.1	Biologische Konsequenzen oxidativer DNA-Schäden.....	21
1.4.2	Biologische Konsequenzen erhöhter NO-Produktion	23
1.5	Reparatur von DNA-Schäden	25
1.5.1	Basenexzisionsreparatur	25
1.5.2	Nukleotidexzisionsreparatur	30
1.5.3	Einzelstrangbruchreparatur	32
1.6	Bedeutung reaktiver Spezies in der Krebsentstehung	32
1.7	Zielsetzung	34
2	Material und Methoden.....	35
2.1	Material	35
2.1.1	Geräte.....	35
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	38
2.1.3	Chemikalien und Reagenzien.....	39
2.1.4	DNA / Primer	42
2.1.5	Antikörper	43
2.1.6	Enzyme	43
2.1.7	Zelllinien und Bakterienstämme.....	44
2.1.8	Lösungen, Puffer, Medien.....	44
2.1.8.1	Präparation der PM2-DNA	44
2.1.8.2	Präparation der pSV2- <i>gpt</i> DNA.....	45
2.1.8.3	Modifikation / Enzyminkubation und Agarosegelelektrophorese der beiden Plasmide PM2 und pSV2- <i>gpt</i>	46
2.1.8.3.1	Modifikation.....	46
2.1.8.3.2	Enzyminkubation.....	47

2.1.8.3.3	Agarosegelelektrophorese.....	48
2.1.8.4	Plasmidtransformation.....	48
2.1.8.4.1	Herstellung kompetenter Bakterien	48
2.1.8.4.2	Transformation.....	49
2.1.8.4.3	Plasmidisolierung	50
2.1.8.5	HPLC-Analytik	51
2.1.8.6	Puffer und Medien für die Zellkultur	51
2.1.8.7	Alkalische Elution.....	52
2.1.8.7.1	Filterelution der DNA	52
2.1.8.7.2	Fluorimetrische Bestimmung der DNA.....	54
2.1.8.7.3	Schädigung der Zellen für die Alkalische Elution.....	54
2.1.8.8	Nitritbestimmung	55
2.1.8.9	Glutathionbestimmung	55
2.1.8.10	Mikrokerntest.....	56
2.1.8.11	SDS-Gel Elektrophorese und Färbung mit Coomassie.....	56
2.1.8.12	Immunoblotting (Western Blot).....	58
2.2	Methoden	59
2.2.1	Präparation der PM2-DNA (Salditt et al. 1972).....	59
2.2.1.1	Herstellung des Phagenlysates.....	59
2.2.1.2	Herstellung der Agar-Platten.....	59
2.2.1.3	Bestimmung der Aktivität des Phagenlysates.....	60
2.2.1.4	Bakterienkultivierung und Aufreinigung des Plasmids PM2	60
2.2.1.5	Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der	62
	DNA.....	62
2.2.2	Präparation der Plasmid-DNA pSV2- <i>gpt</i>	62
2.2.2.1	Bakterienkultivierung und Aufreinigung des Plasmids pSV2- <i>gpt</i>	62
2.2.2.2	Konzentrationsbestimmung der DNA.....	63
2.2.3	Relaxationsassay zur Schadensanalyse an der PM2-DNA und dem pSV2- <i>gpt</i> -Plasmid (<i>in vitro</i>)	63
2.2.3.1	Prinzip.....	63
2.2.3.2	Modifizierung der DNA (Schadensinduktion)	64
2.2.3.2.1	Schädigung der PM2-DNA und des Plasmids pSV2- <i>gpt</i> mit SIN-1	64
2.2.3.2.2	Schädigung der PM2-DNA mit SIN-1 in Gegenwart von BSA (bovinem Serumalbumin, Rinderserumalbumin)	65
2.2.3.2.3	Schädigung des Plasmids pSV2- <i>gpt</i> mit 4-HPT.....	65
2.2.3.2.4	Schädigung der PM2-DNA mit DPTA-NONOat.....	65
2.2.3.3	Enzyminkubation.....	65
2.2.3.4	Agarosegel-Elektrophorese.....	66
2.2.3.5	Auswertung.....	66
2.2.4	Plasmidtransformation.....	67
2.2.4.1	Prinzip.....	67
2.2.4.2	Präparation kompetenter Bakterien	69
2.2.4.3	Herstellung der Agar-Platten.....	70
2.2.4.4	Modifizierung des Plasmids pSV2- <i>gpt</i>	70
2.2.4.5	Transformation.....	70
2.2.4.6	Überprüfung der Kompetenz/Überlebensrate	71
2.2.4.7	Überprüfung der Transformationsausbeute.....	71
2.2.4.8	Ausplattierung der transformierten Bakterien und Auswertung	71
2.2.4.9	Picken von Mutanten und Kryokonservierung der Bakterien.....	72

2.2.4.10	Plasmidisolierung	72
2.2.4.11	DNA-Sequenzanalyse.....	73
2.2.5	HPLC-Analyse	73
2.2.5.1	Schädigung des Plasmids pSV2- <i>gpt</i> mit SIN-1 bzw. 4-HPT.....	73
2.2.5.2	Enzymatische DNA-Totalhydrolyse	73
2.2.5.3	HPLC-Auftrennung.....	74
2.2.5.4	Auswertung.....	74
2.2.6	Zellkultur.....	75
2.2.6.1	Allgemeine Arbeitstechniken	75
2.2.6.2	Kryokonservierung und Auftauen von Säugerzellen	75
2.2.6.3	Zelllinien.....	76
2.2.7	Alkalische Elution.....	76
2.2.7.1	Prinzip.....	76
2.2.7.2	Versuchsaufbau.....	78
2.2.7.3	Behandlung der Zellen für die Alkalische Elution	78
2.2.7.3.1	Inkubation mit Natriumbutyrat	78
2.2.7.3.2	Schädigung mit Ro 19-8022 und sichtbarem Licht.....	79
2.2.7.3.3	Schädigung mit H ₂ O ₂	79
2.2.7.3.4	Behandlung mit DPTA-NONOat	79
2.2.7.3.5	Schädigung mit SIN-1.....	79
2.2.7.3.6	Schädigung mit UVB.....	79
2.2.7.3.7	Schädigung mit tBuOOH	80
2.2.7.3.8	Bestimmung der DNA-Reparatur	80
2.2.7.4	Auftragen der Zellen, Zellyse, Enzyminkubation und Alkalische Elution.....	80
2.2.7.5	Auswertung.....	81
2.2.8	Zelltoxizitätstest / Proliferationsfaktor	82
2.2.8.1	Durchführung	82
2.2.8.2	Behandlung der Zellen zur Bestimmung des Proliferationsfaktors	83
2.2.9	Enzymatische Glutathion-Bestimmung	83
2.2.9.1	Prinzip.....	83
2.2.9.2	Durchführung	84
2.2.10	Mikrokerntest.....	84
2.2.10.1	Prinzip.....	84
2.2.10.2	Durchführung und Auswertung.....	85
2.2.11	Nitritbestimmung	86
2.2.11.1	Prinzip.....	86
2.2.11.2	Durchführung	86
2.2.12	Nachweis des p53-Proteins in B6 Mausfibroblasten.....	86
2.2.12.1	Vorbereitung der Proben.....	86
2.2.12.2	Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradtford.....	86
2.2.12.3	SDS-Gel Elektrophorese	87
2.2.12.3.1	Prinzip.....	87
2.2.12.3.2	Durchführung	87
2.2.12.4	Proteintransfer (Western Blot)	88
2.2.12.4.1	Prinzip.....	88
2.2.12.4.2	Durchführung	88

3	Ergebnisse	90
3.1	Untersuchungen von oxidativen DNA-Schäden an zellfreier DNA, deren Toxizität und Mutagenität.....	90
3.1.1	Untersuchung von SIN-1.....	90
3.1.1.1	Schädigung von PM2-DNA mit SIN-1.....	90
3.1.1.2	Schädigung des Plasmids pSV2- <i>gpt</i> mit SIN-1	92
3.1.1.3	Nachweis von 8-oxodG im Plasmid pSV2- <i>gpt</i> nach Schädigung mit SIN-1	95
3.1.1.4	Transformationsrate und Mutagenität in Bakterien	97
3.1.1.5	Sequenzanalyse des <i>gpt</i> -Gens der Mutanten.....	99
3.1.2	Untersuchung von 4-HPT	101
3.1.2.1	Schädigung mit 4-HPT	101
3.1.2.2	Nachweis von 8-oxodG im Plasmid pSV2- <i>gpt</i> nach Schädigung mit 4-HPT	104
3.1.2.3	Transformationsrate und Mutagenität in Bakterien	105
3.1.2.4	Sequenzanalyse des <i>gpt</i> -Gens der Mutanten.....	108
3.1.3	Untersuchung von Dipropylentriamin-NONOat	110
3.2	Untersuchungen in Säugerzellen	111
3.2.1	Einfluss endogen gebildeten Stickstoffmonoxids	111
3.2.1.1	Stickstoffmonoxid-Konzentrationen in B6 Mausfibroblasten.....	111
3.2.1.2	Bestimmung des p53-Status der Zellen.....	112
3.2.1.3	Untersuchungen mittels der Alkalischen Elutionsmethode	114
3.2.1.3.1	Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Schäden in B6 Mausfibroblasten	114
3.2.1.3.2	Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden in B6 Mausfibroblasten	115
3.2.1.3.2.1	Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden durch Ro 19-8022	115
3.2.1.3.2.2	Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden durch Wasserstoffperoxid.....	116
3.2.1.3.3	Reparatur oxidativer durch Ro 19-8022 induzierter DNA-Schäden in B6 Mausfibroblasten	119
3.2.1.4	Einfluss endogener NO-Generierung auf die Mikrokernrate in B6 Mausfibroblasten	120
3.2.1.4.1	Mikrokernrate in B6 Mausfibroblasten unter dem Einfluss vermehrter endogener NO-Bildung.....	120
3.2.1.4.2	Mikrokerninduktion in B6 Mausfibroblasten durch Ro 19-8022	121
3.2.1.4.3	Mikrokerninduktion in B6 Mausfibroblasten durch Wasserstoffperoxid	122
3.2.1.5	Einfluss endogen gebildeten Stickstoffmonoxids auf die Zellproliferation (Zelltoxizitätstest)	124
3.2.1.5.1	Toxizität der erhöhten endogenen NO-Bildung	124
3.2.1.5.2	Zellproliferation nach Behandlung mit Ro 19-8022	125
3.2.1.5.3	Zellproliferation nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid	126
3.2.1.6	Glutathionspiegel in B6 Mausfibroblasten	127
3.2.1.6.1	Glutathionspiegel in ungeschädigten Zellen.....	127
3.2.1.6.2	Glutathionspiegel in B6 Mausfibroblasten nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid	128
3.2.2	Einfluss exogen generierten Stickstoffmonoxids	130
3.2.2.1	Untersuchungen mittels der Alkalischen Elutionsmethode	130

3.2.2.1.1	Oxidative DNA-Schäden in B6 Mausfibroblasten unter dem Einfluss erhöhter exogener NO-Bildung.....	130
3.2.2.1.2	Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden in B6 Mausfibroblasten	132
3.2.2.1.2.1	Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden durch Ro 19-8022.....	132
3.2.2.1.2.2	Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden durch UVB.....	133
3.2.2.1.2.3	Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden durch tert.- Butylhydroperoxid.....	134
3.2.2.1.3	DNA-Reparaturhemmung durch Vorbehandlung mit exogenem NO	135
3.2.2.1.3.1	Reparatur Ro 19-8022 induzierter oxidativer Basenmodifikationen....	135
3.2.2.1.3.2	Reparatur UVB induzierter DNA-Schäden.....	139
3.2.2.1.3.3	Reparatur Wasserstoffperoxid induzierter DNA-Strangbrüche.....	140
3.2.2.1.3.4	Reparatur von basenfreien Stellen.....	142
3.2.2.2	Einfluss exogener NO-Generierung auf die Mikrokernrate in B6 Mausfibroblasten	142
3.2.2.3	Einfluss exogen generierten Stickstoffmonoxids auf die Zellproliferation (Zelltoxizitätstest)	143
3.2.2.3.1	Zellproliferation nach Behandlung mit Ro 19-8022 in Verbindung mit der Toxizität der exogenen NO-Generierung.....	144
3.2.2.3.2	Zellproliferation nach Behandlung mit UVB	146
3.2.3	Einfluss exogen durch SIN-1 generierten Peroxynitrits in B6 Mausfibroblasten	148
3.2.3.1	Oxidative DNA-Schäden durch SIN-1 ermittelt mit der Alkalischen Elutionstechnik.....	148
3.2.3.2	Toxizität der SIN-1 Behandlung.....	149
4	Diskussion	150
4.1	Vergleich der Genotoxizität und Mutagenität von SIN-1, 4-HPT und Stickstoffmonoxid	150
4.2	Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Schäden.....	159
4.3	Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden.....	163
4.4	Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die DNA-Reparatur.....	165
5	Zusammenfassung.....	169
6	Abkürzungen	172
7	Literatur	175

1 Einführung

Krebs ist eine der häufigsten Todesursachen weltweit. Man weiß heute, dass neben exogenen Faktoren, wie Ernährung und Umwelt, auch endogene Faktoren, wie eine genetische Prädisposition, von entscheidender Bedeutung sind. Die zur Zeit allgemein akzeptierte Theorie der Krebsentstehung geht davon aus, dass es aufgrund von DNA-Schäden zu Mutationen in Genen kommt, die im Zusammenhang mit äußeren Faktoren zu einer Veränderung der Funktion bzw. zu einem Funktionsverlust der durch sie kodierten Proteine führen können (**Wiseman et al. 1995, Beckman & Ames 1997**). Hierbei sind insbesondere die Inaktivierung von Zellzyklus-kontrollierenden Genen, DNA-Reparaturgenen und an der Replikation beteiligten Genen als Folge gehäufte Mutationen von Bedeutung. Von grundlegendem Interesse ist daher die Entstehung von DNA-Schäden und deren Beeinflussung. In jeder Zelle werden sogenannte reaktive Spezies, wie Radikale und Peroxide, als Nebenprodukte des zellulären Metabolismus gebildet. Im Verdauungstrakt kann es z. B. bei der Verarbeitung der Nahrung und, wie auch in anderen Organen des Körpers, als Folge bakterieller Infektionen oder anderer Krankheiten zu einer vermehrten Produktion reaktiver Spezies kommen. Dieser Bildung von reaktiven Spezies und DNA-Schäden steht die natürliche Ausstattung des Körpers mit Antioxidantien, DNA-Reparaturenzymen und anderen protektiv wirkenden Enzymen entgegen. Durch die ständige Bildung und Reparatur von DNA-Modifikationen entsteht ein Gleichgewichtsspiegel endogen vorhandener DNA-Schäden, dessen Höhe von dem Ausmaß der schädigenden und schützenden Faktoren abhängt. Die Menge von 8-Hydroxyguanin (8-oxoG) in zellulärer DNA, einer DNA-Modifikation, die schon lange bekannt und wegen ihrer Häufigkeit und ihrer prämutagenen Eigenschaft bedeutend ist, wird daher auch als Biomarker für zellulären oxidativen Stress herangezogen (**Kasai & Nishimura 1993**).

Einerseits war schon lange bekannt, dass es einen Botenstoff gibt, der vom Endothel der Blutgefäße freigesetzt wird, was zu Vasodilatation und Hemmung der Plättchenaggregation führt. Dieser Faktor wurde Endothelium-Derived Relaxing Faktor (EDRF) genannt. Auf der anderen Seite wurden in der Humanmedizin NO-freisetzende Pharmaka, wie Glyceroltrinitrat oder Nitroprussid-Natrium, schon seit etwa einem Jahrhundert in der Therapie von Herz-Kreislauf-Erkrankungen eingesetzt. Doch erst 1987 wurde erstmals die endogene Bildung und Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) in Säugerzellen nachgewiesen. Die Überraschung war groß, dass Säugetiere in der Lage sein sollten, NO, das bis dahin nur als toxisches Gas, dessen Entstehung bei sehr hohen Temperaturen, wie sie bei Verbrennungsprozessen erreicht werden (Großstadt-Smog, Autoabgase), und als Atemgift bekannt war, bei 37 °C zu bilden (**Schmidt 1994, Weber 1999**). Als nach und nach klar wurde, welche wichtige und vielfältige physiologische Bedeutung diesem kleinen Molekül zukommt, wuchs das Interesse an der Forschung auf diesem Gebiet gewaltig. So wurde NO 1992 von dem Wissenschaftsmagazin Science zum *Molekül des Jahres* gewählt und 1998 erhielten Robert F. Furchgott, Louis J. Ignarro und Ferid Murad den Nobelpreis für Medizin für ihre bahnbrechenden Erkenntnisse auf dem Gebiet der NO-Forschung (**Weber 1999**). Der bis dahin sogenannte EDRF wurde als NO identifiziert und dessen Bildung und Funktion in physiologischer und pathophysiologischer Hinsicht erforscht.

Die große Bedeutung von NO wird schon aus der Tatsache klar, dass es in fast jeder Körperzelle gebildet werden kann. Aus pathophysiologischer Sicht ist interessant, dass eine Reihe von Krankheiten mit einer Überproduktion von NO einhergehen, wie Diabetes, Arthritis, Asthma, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson und Multiple Sklerose (Duchstein et al. 1999), und dass die chronisch erhöhte NO-Produktion mit einem erhöhten Krebsrisiko in Verbindung gebracht wird (Vamvakas & Schmidt 1997, Ohshima & Bartsch 1992, Tamir & Tannenbaum 1996, Wiseman & Halliwell 1996).

In der vorliegenden Arbeit sollte es darum gehen, die Zusammenhänge zwischen den beiden beschriebenen Gebieten, der Krebsentstehung einerseits und der Bildung reaktiver Spezies andererseits, zu untersuchen. Von besonderem Interesse war hierbei die Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO), Hydroxylradikalen und Peroxynitrit als sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen gebildete reaktive Spezies. Die qualitativen und quantitativen Zusammenhänge zwischen den reaktiven Spezies, den DNA-Schäden und Mutationen unter besonderer Berücksichtigung der DNA-Reparatur sollten daher im Mittelpunkt stehen.

1.1 Physiologische Bildung und Bedeutung von Stickstoffmonoxid (NO)

Die Bildung von NO wird durch sogenannte NO-Synthasen katalysiert. Aus einem Molekül L-Arginin wird durch enzymatische 5-Elektronen-Oxidation über N-Hydroxy-L-arginin je ein Molekül NO und L-Citrullin gebildet (Abb. 1.1).

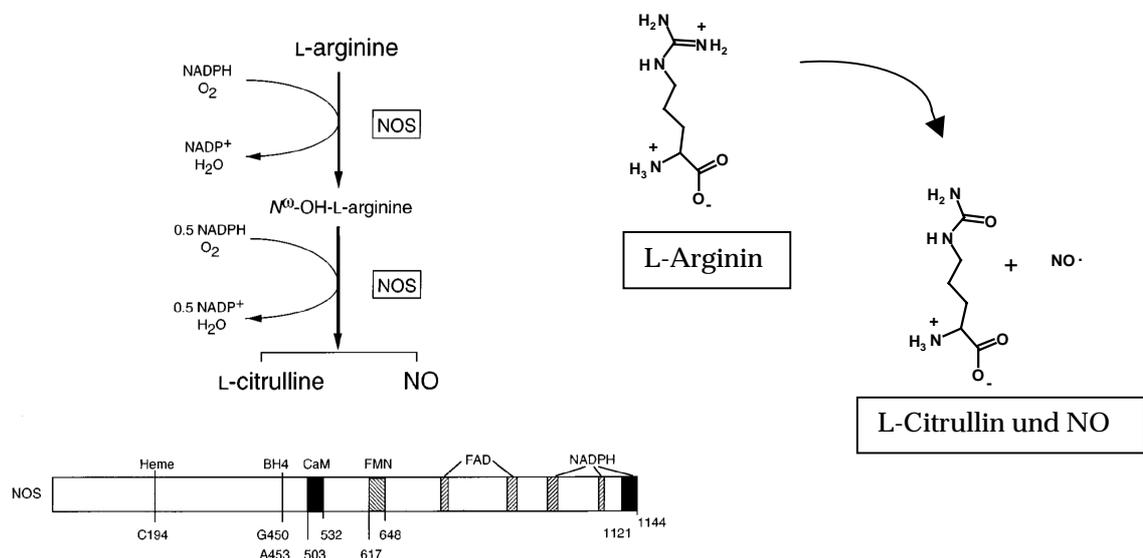


Abb. 1.1 Freisetzung von NO aus L-Arginin (oben); Struktureller Aufbau des Gens der NO-Synthasen (unten) (Mac Micking et al. 1997).

In Säugetieren unterscheidet man drei verschiedene Isoenzyme (NOS-I,-II,-III), die von drei verschiedenen Genen kodiert werden. Allen gemeinsam ist der strukturelle Aufbau, sie unterscheiden sich jedoch in der Regulation ihrer Bildung und ihrer enzymatischen Aktivität (**Keefers 1995**). Für ihre Funktion der Bildung von NO benötigen sie molekularen Sauerstoff, reduziertes Nicotinamidadenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH), Häm, Flavinadenin-Dinukleotid (FAD) und -Mononukleotid (FMN) und Tetrahydrobiopterin (BH₄). Außerdem binden alle drei Isoenzyme an das calciumbindende Regulatorprotein Calmodulin (**Schmidt 1994, MacMicking et al. 1997**). NOS-I, auch nNOS genannt, wird im zentralen Nervensystem gebildet, wo NO an der Neurotransmission beteiligt ist, während NOS-III, auch eNOS genannt, im Endothel und Epithel von Säugerzellen exprimiert wird. Im Endothel des Blutgefäßsystems z. B. wird durch NO die Gefäßrelaxation und die Hemmung der Thrombozytenaggregation und in der Lunge die Bronchodilatation vermittelt. Diese beiden Formen der NO-Synthase werden konstitutiv exprimiert und sind Ca²⁺/Calmodulinabhängig, d. h. sie werden durch einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration von 100 nM auf > 200 nM aktiviert. Im Gegensatz dazu ist die Expression der NOS-II, auch iNOS genannt, induzierbar, und zwar durch verschiedene Entzündungsfaktoren, wie γ -INF, Interleukine, TNF oder durch bakterielle Toxine. Ihre Aktivität ist formal Ca²⁺/Calmodulinabhängig, da schon geringe Ca²⁺-Konzentrationen zu einer Aktivierung führen und Calmodulin irreversibel am Enzym gebunden ist (**Schmidt 1994**). Diese Isoform wird in Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen und Granulozyten exprimiert, wurde aber auch in β -Zellen des Pankreas, in Hepatozyten, in Zellen der glatten Muskulatur, in Hautfibroblasten und in manchen Nierenzellen nachgewiesen (**Schmidt 1994, Werner et al. 1995, Schmidt & Walter 1994**). Eine der wichtigsten physiologischen Funktionen von NO, das als Botenstoff manigfaltige Bedeutung hat, ist die Aktivierung der Guanylatcyclase, die zur Bildung von cGMP führt. Dazu sind nur geringe NO-Konzentrationen von etwa 100 nM nötig. Diese werden von der konstitutiven eNOS und nNOS gebildet und ermöglichen den Ablauf der Signaltransduktion in den Geweben. Nach Aktivierung der eNOS wurden sogar bis zu 450 nM NO in Endothelzellen nachgewiesen (**Duchstein et al. 1999**). NO-Konzentrationen, die um ein Vielfaches höher liegen, sind z. B. nötig zur Abwehr von pathogenen Keimen, bei der auch die parallele Bildung von Superoxid durch körpereigene Immunzellen eine Rolle spielt („oxidative burst“). Sie können wahrscheinlich nur von der iNOS nach Induktion gebildet werden. Diese hohen NO-Konzentrationen haben das Potential vielfältige Effekte in Zellen auszulösen und sind teilweise zytotoxisch (**Schmidt 1994, Keefers 1995, MacMicking et al. 1997**) (**vergleiche 1.4**). Auch die DNA ist in diesem Zusammenhang als Target von Bedeutung (**Ohshima & Bartsch 1994**).

1.2 Reaktive Sauerstoffspezies und Stickstoffspezies

Während des Zellmetabolismus werden bei Reduktions- und Oxidationsprozessen reaktive Spezies, wie Radikale intrazellulär gebildet, die zum Teil für die Signaltransduktion nötig sind. Man kann sich jedoch vorstellen, dass auch die Möglichkeit einer Zellschädigung durch diese reaktiven Spezies besteht. Um davor zu schützen verfügen alle aeroben Lebewesen über ein antioxidatives

Verteidigungssystem, bestehend aus Enzymen, wie Superoxiddismutase (SOD), Katalase und Glutathionperoxidase (GPx), und Substanzen mit geringem Molekulargewicht, wie Glutathion, Vitamin C und E und Carotinoide (**Halliwell & Aruoma 1991**). Kommt es zu einer Störung des intrazellulären Gleichgewichtes der Bildung und der Entgiftung der reaktiven Spezies, z. B. überschießende Produktion oder Antioxidantiendepletion, dann man spricht von oxidativem Stress (**Sies 1991**). **Tab. 1.1** zeigt eine Übersicht reaktiver Sauerstoff-(ROS) und Stickstoffspezies (RNS).

Bezeichnung	Formel
Superoxidanion	$O_2^{\cdot-}$
Hydroperoxyl-Radikal	HO_2^{\cdot}
Wasserstoffperoxid	H_2O_2
Hydroxylradikal	OH^{\cdot}
Peroxyradikal (z.B. R= Lipidrest)	ROO^{\cdot}
Alkoxyradikal*	RO^{\cdot}
Singulett-Sauerstoff	1O_2
Hypochlorige Säure*	$HOCl$
Stickstoffmonoxid	NO^{\cdot}
Stickstoffdioxid	NO_2^{\cdot}
Peroxynitrit	$ONOO^{\cdot}$
Distickstofftrioxid*	N_2O_3

Tab. 1.1 Reaktive Spezies nach **Ohshima & Bartsch (1994)**, modifiziert*.

Im folgenden soll die Bildung reaktiver Spezies genauer beleuchtet werden.

1.2.1 Endogene Quellen reaktiver Sauerstoffspezies

Bei endogen gebildeten ROS handelt es sich meist um *Superoxidradikal-Anionen*. Dies beruht auf der Tatsache, dass bei vielen zellulären Oxidationsreaktionen ein monovalenter Elektronentransfer auf molekularen Sauerstoff stattfinden kann, bei dem Superoxidradikal-Anionen gebildet werden. Die sequenzielle Reduktion ist in **Abb. 1.2** dargestellt.

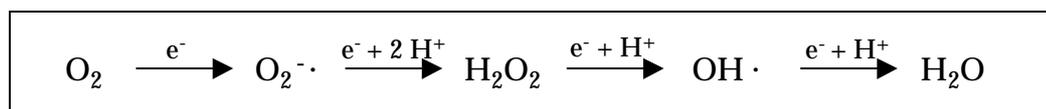


Abb. 1.2 Sequenzielle Reduktion von molekularem Sauerstoff über Superoxidanion, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale.

Außer bei der Atmungskette werden Superoxidradikal-Anionen auch im Zuge anderer Enzymreaktionen gebildet (Markant et al. 1995).

Dazu gehören:

- Arachidonsäuremetabolismus (Lipoxygenase, Cyclooxygenase)
- Katecholaminoxidationen (Monoaminoxidase)
- Beim „respiratory burst“ von Abwehrzellen durch das membranständige Enzym NADPH-Oxidase (siehe 1.1 und 1.2.2.) (Abb. 1.3)
- Purinabbau
- Cytochrom P450-katalysierte Reaktionen
- Autoxidation von Oxyhämoglobin, Thiolen und anderen reduzierten Verbindungen



Abb. 1.3 Superoxidbildung in Neutrophilen nach (Duchstein et al. 1999).

Das Superoxidanion kann biologische Membranen nicht durchdringen. Es unterliegt unter physiologischen Bedingungen einer spontanen Dismutation zu Wasserstoffperoxid (Abb. 1.4), deren Geschwindigkeit durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) um den Faktor 9 gesteigert werden kann (Markant et al. 1995).



Abb. 1.4 Wasserstoffperoxidbildung aus Superoxid.

Wasserstoffperoxid kann außerdem durch spezifische, peroxisomal lokalisierte Oxidasen, wie der D-Amino-, Harnsäure- und der Glykolat-Oxidase gebildet werden (Southorn & Powis 1988). Weder Wasserstoffperoxid noch Superoxidradikale können selbst direkt Schäden in der DNA hervorrufen. Wasserstoffperoxid ist jedoch im Gegensatz zu Superoxidradikalen in der Lage, Membranen zu durchdringen. Beide Spezies sind als Vorstufen aggressiverer Spezies anzusehen. So setzt das Hämprotein Myeloperoxidase H_2O_2 mit Halogeniden zu unterhalogenigen Säuren um, wie z.B. HOCl. Durch Superoxidanionen werden Metallionen, insbesondere Eisen und Kupfer, reduziert. Die reduzierten Metallionen sind dann ihrerseits in der Lage, H_2O_2 in der sogenannten Fentonreaktion zu Hydroxylradikalen und deren Anionen umzusetzen. Insgesamt spricht man von der metallkatalysierten Haber-Weiss-Reaktion (Halliwell & Aruoma 1991, Halliwell & Gutteridge 1984) (Abb. 1.5).

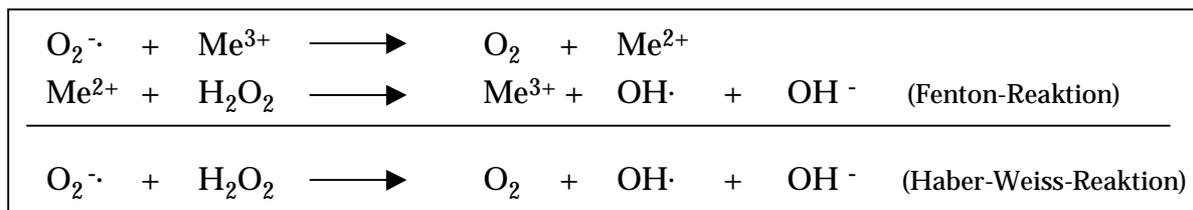


Abb. 1.5 Metallkatalysierte Bildung von Hydroxylradikalen.

Die Toxizität von Superoxid ist außer auf die Bildung von Hydroxylradikalen auch auf die Reaktion mit NO unter Entstehung von Peroxynitrit zurückzuführen (Duchstein et al. 1999) (siehe 1.2.2.).

Hydroxyl-Radikale sind sehr reaktiv. Ihre Halbwertszeit ist daher sehr kurz (8,7 ns in menschlichen Zellen) (Tomita et al. 1995), sie reagieren sofort mit nahezu allen zellulären Molekülen (Lipiden, Proteinen, Nukleinsäuren und Kohlenhydraten) und sind daher für die Zelle von hoher Toxizität (Halliwell & Aruoma 1991, Halliwell & Gutteridge 1984, Southborn & Powis 1988).

Auch *Singulett-sauerstoff* kann in Zellen gebildet werden (Epe 1991), und zwar entweder bei Belichtung von endogenen Photosensibilisatoren, wie Flavinen oder Porphyrinen, durch Energieübertragung (Epe 1993) oder in sehr geringen Mengen als Nebenprodukt von Oxidasereaktionen (Peroxidasen, Cytochromen und Lipoxygenase). Singulett-sauerstoff besitzt eine geringere Reaktivität als Hydroxylradikale. Seine Halbwertszeit im Gewebe beträgt weniger als 0,5 μ s (Patterson et al. 1990), ist jedoch ausreichend lang, um durch Membranen diffundieren zu können (Reichweite 1-2 μ m). Die Reaktivität von Singulett-sauerstoff reicht aus, um mit der DNA zu reagieren. In nukleärer DNA konnte 8-oxoG detektiert werden (Epe 1991).

Zu den reaktiven Sauerstoffspezies werden auch *Alkyl- (R·)*, *Alkoxy- (RO·)* und *Peroxyradikale (ROO·)* gezählt. Sie entstehen aus ungesättigten Fettsäuren in Lipidmembranen besonders bei Anwesenheit von katalysierenden Metallionen durch Angriff reaktiver Sauerstoff- oder Stickstoffspezies und durch die Enzyme Cyclooxygenase und Lipoxygenase (Marnett & Plataras 2001). Als Folgeprodukte der Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren entstehen reaktive *elektrophile Verbindungen*, wie Acrolein, Crotonaldehyd, Malondialdehyd und 4-Hydroxynonenal, die die DNA angreifen und zu Ethenoaddukten führen (Marnett & Plataras 2001, Marnett 2000, Bartsch & Nair 2000).

1.2.2 Endogene Quellen reaktiver Stickstoffspezies

Wie unter 1.1. beschrieben, hat das kleine Molekül NO mannigfaltige Funktionen und entsteht ubiquitär im Körper durch eine der drei Isoformen der NO-Synthase. Die induzierbare Form der NO-Synthase, iNOS, ist dabei in der Lage, große Mengen NO auch über einen längeren Zeitraum (mehrere Tage) nach einem Stimulus zu

bilden (MacMicking et al. 1997). NO verfügt als Radikal über eine ungepaartes Elektron. Im Gegensatz zu anderen Radikalen ist es jedoch sehr reaktionsträge und weist nur eine geringe Dimerisierungstendenz auf (Weber 1999). Aufgrund seiner langen Halbwertszeit von 1-10 s und wegen seiner geringen Polarität kann es durch Zellmembranen diffundieren (Duchstein et al. 1999, Burney et al. 1999). Dies ist wichtig zur Ausübung der Funktion als Botenstoff. Andererseits besteht natürlich auch die Möglichkeit, dass NO mit anderen intrazellulär gebildeten Radikalen reagiert bzw. selbst oxidiert oder reduziert wird. Bei der Oxidation entsteht hierbei das Nitrosylkation, das mit Wasser spontan zu salpetriger Säure (Nitrit) abreagiert, während bei der Reduktion das Nitroxylat-Anion entsteht, das Anion des Nitrosowasserstoffs, das dann dimerisieren und schnell irreversibel zu Wasser und Lachgas zerfallen kann.

Die genannten Reaktionen sind in **Abb. 1.6** aufgezeigt.

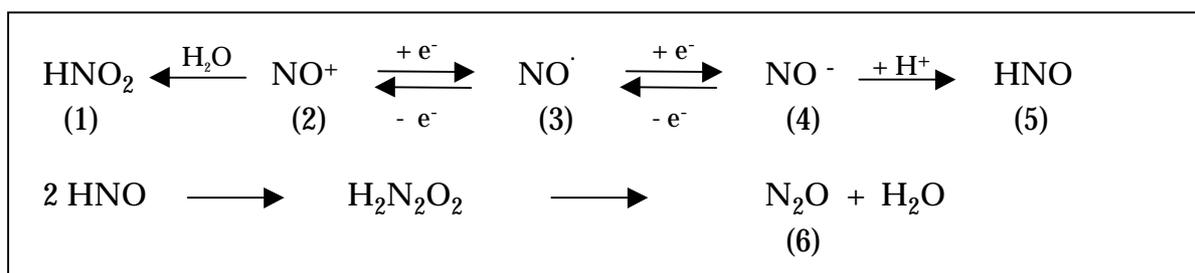


Abb. 1.6 Reaktionen von NO nach Weber (1999).

- | | |
|------------------------|----------------------|
| (1) Salpetrige Säure | (2) Nitrosylkation |
| (3) Stickstoffmonoxid | (4) Nitroxylat-Anion |
| (5) Nitrosowasserstoff | (6) Lachgas |

Grundsätzlich können alle diese Reaktionen von biologischen Systemen durchgeführt werden (Weber 1999). Von besonderer Bedeutung sind aber die Reaktionen von NO in Gegenwart von Sauerstoff. Hier kommt es nach Autoxidation zur Bildung von Peroxynitritradikalen und nach Reaktion mit dem Ausgangsstoff NO zur Entstehung von NO_2 , einem Radikal, das wegen seiner starken oxidierenden Eigenschaften sofort weiter reagiert. Hierbei kann Nitrit entstehen, durch dessen Dimerisierung N_2O_4 oder nach Reaktion von NO_2 mit wiederum NO bildet sich N_2O_3 . Die beiden Stickoxide können reagieren dann mit Wasser weiter zu Nitrit und Nitrat (Weber 1999). Die Zusammenhänge sind in **Abb. 1.7** dargestellt. Insbesondere das höhere Stickoxid N_2O_3 ist sehr reaktiv gegenüber Nukleophilen und kann mit vielen zellulären Bestandteilen reagieren, z. B. Thiolgruppen von Proteinen und Aminen (Weber, 1999, Grisham et al. 2000).

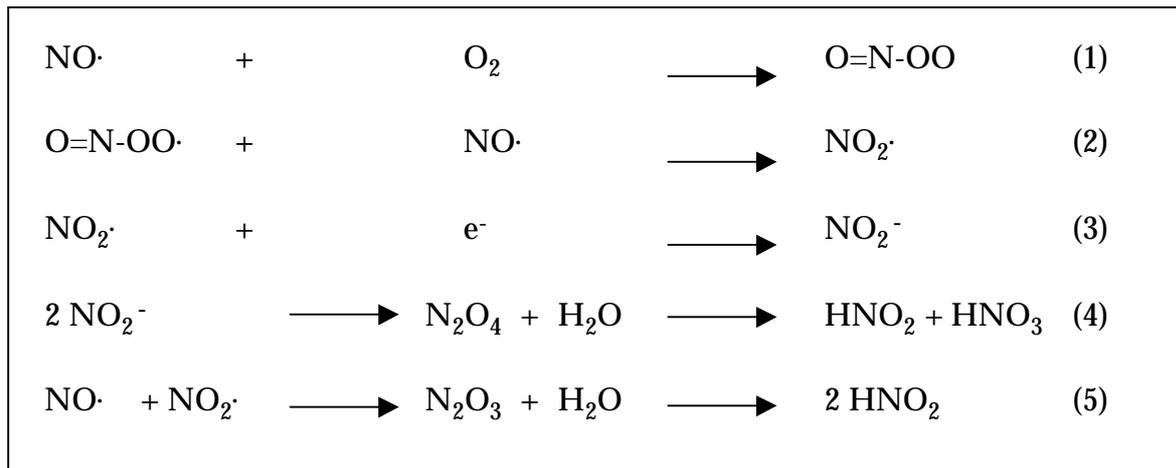


Abb. 1.7 Reaktionen von NO mit Sauerstoff nach **Weber (1999)** zu
 (1) Peroxynitritradikal (2) Stickstoffdioxid
 (3) Nitrit (4) Salpetrige und Salpetersäure
 (5) Salpetrige Säure

Von herausragender biologischer Bedeutung ist die Reaktion von NO mit Superoxid, wobei quasi quantitativ, diffusionskontrolliert Peroxynitrit entsteht (**Duchstein et al. 1999, Huie & Padmaja 1993**). Die Entstehung von Superoxid ist unter **1.2.1.** beschrieben. Alternativ kann Peroxynitrit auch durch Reaktion von Hydroxylradikalen mit Stickstoffdioxid oder über das Peroxynitritradikal durch Reaktion mit Biomolekülen unter Wasserstoffionenabspaltung entstehen (**Weber 1999**). Peroxynitrit ist sehr reaktiv, seine biologische Halbwertszeit wird mit 0,05-1 s angegeben. Es reagiert daher sofort mit in der Nähe befindlichen zellulären Strukturen, wie Aminosäuren (Proteinen), besonders Tyrosin, Lipiden und Nukleinsäuren, insbesondere den Purinbasen der DNA (**Duchstein et al. 1999**). Dabei scheint die Reaktion über ein Nitrosopercarboxycarbonat-Anion zu verlaufen, das bei physiologischem CO_2 -Gehalt von etwa 1 mM in Zellen sofort aus Peroxynitrit und Kohlendioxid gebildet wird (**Lymar & Hurst 1995, Uppu et al. 1996a**). Eine herausragende Rolle spielt die Generierung von Peroxynitrit im Zuge der parallelen Freisetzung von NO und Superoxid wohl beim sogenannten „oxidative burst“ in Makrophagen und anderen Immunzellen (Monozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten) zur Abwehr von Pathogenen, aber auch in Endothel- und in Gliazellen im Gehirn (**Duchstein et al. 1999**).

Die wichtigsten Zusammenhänge zwischen der Entstehung und den Reaktionen von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies sind in **Abb. 1.8** dargestellt.

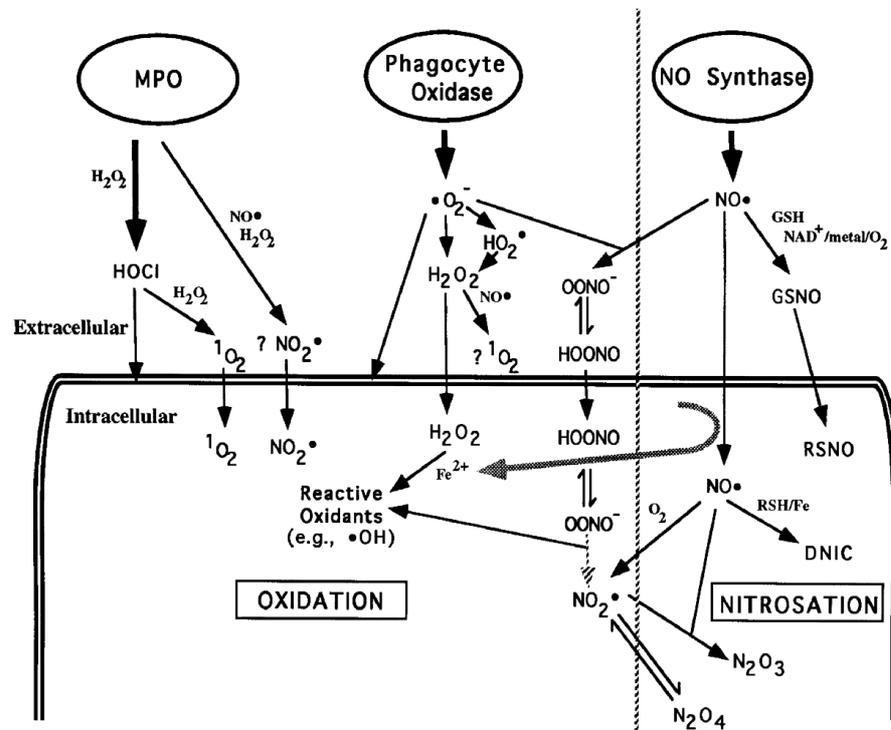


Abb. 1.8 Zusammenhänge zwischen reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies nach Fang (1997).
DNIC = Dinitrosyl-Eisen-Komplexe
MPO = Myeloperoxidase (siehe 1.2.2.)

1.2.3 Experimentelle Generierung reaktiver Spezies

In diesem Abschnitt sollen die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden Substanzen charakterisiert werden, die zur Generierung von reaktiver Spezies verwendet wurden.

1.2.3.1 ROS durch Überexpression von Genen

Man kann Gene, die für bestimmte Proteine kodieren, wie z. B. β -Lactamasen (Antibiotikaresistenz) oder Luciferase etc., in Zellen einbringen und dort zur Expression bringen. Diesen Vorgang nennt man Transfektion. Nach der Transfektion werden die Zellen, die das Gen bzw. den Vektor aufgenommen haben, selektiert, wozu auf dem transfizierten Vektor meist gleichzeitig ein Selektionsmarker, bei dem es sich wiederum um ein bestimmtes Gen handelt, eingefügt wird, und weiter vermehrt. Die transfizierten Gene können konstitutiv, d. h. immerwährend, oder erst nach Zugabe von spezifischen Substraten, die an einen auf dem eingebrachten Gen liegenden Promotor binden und ein Ablesen des Gens veranlassen, exprimiert werden. So können je nach Fragestellung Zelllinien etabliert werden, die zur *in vitro*-Untersuchung bestimmter Fragestellungen dienen.

Die zelluläre Bildung von reaktiven Stickstoffspezies ist in 1.2.2. beschrieben. Auch ist bekannt, dass unter bestimmten physiologischen bzw. pathophysiologischen Bedingungen eine erhöhte NO-Produktion *in vivo* beobachtet wird.

Zur Nachahmung einer erhöhten endogenen NO-Produktion wurden in der vorliegenden Arbeit Mausfibroblasten verwendet, in die das Gen für die induzierbare NO-Synthase (iNOS) transfiziert worden war. Diese Zellen wurden im Vergleich mit den nur mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen (Vector-only-Zellen) untersucht (vergleiche auch 2.2.6.3.).

1.2.3.2 ROS durch Ro 19-8022 in Verbindung mit sichtbarem Licht

Ro 19-8022 wurde von U. Widmer von der Firma Hoffmann-La Roche, Basel, nach Fischer et al. (1990) synthetisiert und sollte ursprünglich als Transquilizer entgesetzt werden. Als sich jedoch im Ames-Test herausstellte, dass die Substanz mutagene Eigenschaften besitzt, wurde sie aus der Entwicklung gezogen (**nicht publizierte Daten**). Abb. 1.9 zeigt die Strukturformel von Ro 19-8022. Der systematische Name lautet : [R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl)-carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol].

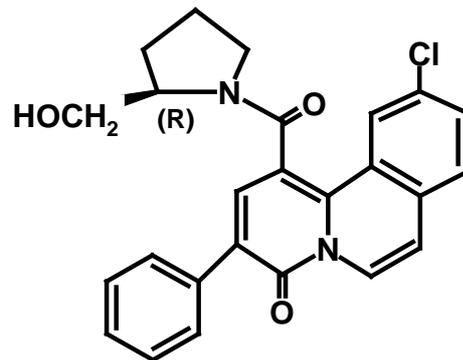


Abb. 1.9 Strukturformel von Ro 19-8022 {[R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl)-carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol]}.

In zellfreien Experimenten an PM2-DNA konnte gezeigt werden, dass Ro 19-8022 in Kombination mit sichtbarem Licht (400-800 nm) DNA-Schäden hervorruft. Durch Experimente in D₂O-Puffer wurde Singulett-Sauerstoff (¹O₂) als ultimal mit der DNA-reagierende Spezies ermittelt (Epe & Hegler 1994, Will 1995). Bei Ro 19-8022 handelt es sich um einen Photosensibilisator. Die Absorptionsmaxima der Substanz liegen bei 425 nm, 315 nm und 250 nm.

Im Schadensprofil überwiegen DNA-Modifikationen, die sensitiv zu der DNA-Reparaturenuklease Fpg-Protein sind (siehe 1.5.1), in hohem Masse gegenüber anderen DNA-Modifikationen und Einzelstrangbrüchen. Von den Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen konnte ein Anteil von 69 % als 8-oxoG durch HPLC/ECD Analyse ermittelt werden (Will et al. 1999).

An zellulärer DNA wurden ein ähnliches Schadensprofil gefunden, in dem auch überwiegend Fpg-sensitive Modifikationen detektiert wurden. Außerdem wurden Mutationen und die Bildung von Mikrokernen nach Behandlung von AS 52 Zellen

mit Ro 19-8022 in Kombination mit sichtbarem Licht als genotoxische Effekte der Verbindung gefunden (Will et al. 1999).

Ein Schadensprofil in AS 52 (CHO-Zellen) ist in Abb. 1.10 dargestellt.

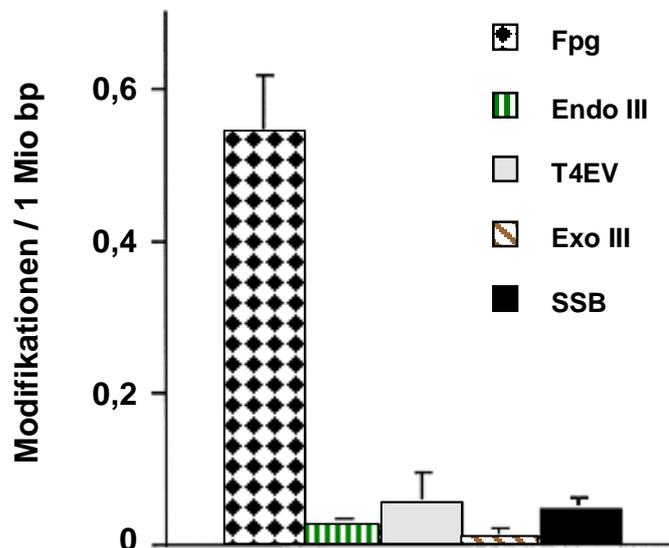


Abb. 1.10 Schadensprofil in AS 52-Zellen nach Behandlung mit Ro 19-8022 (50 nM) in Kombination mit sichtbarem Licht (14 kJ/m²; 400-500 nm), bei 0 °C. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen ± S.D. (Will et al. 1999).

In der vorliegenden Arbeit wurde Ro 19-8022 zur Generierung Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen verwendet.

1.2.3.3 ROS durch UVB

Die Bezeichnung UVB wird verwendet für Strahlung im Bereich von 280-320 nm. Diese kann durch direkte Anregung der DNA zu DNA-Modifikationen führen oder die DNA indirekt durch Bildung reaktiver Spezies über Radikalmechanismen im bestrahlten Gewebe schädigen. Es entstehen hierbei vorwiegend Cyclobutanpyrimidindimere (Mitchell et al. 1991) durch direkte [2+2]-Cycloaddition benachbarter Thymidine und Pyrimidin-(6-4)-photoprodukte (Lippke et al. 1981). Jedoch wurden auch oxidative DNA-Schäden, sensitiv zu Fpg-Protein, mit der Alkalischen Elutionstechnik in mit UVB bestrahlter DNA gefunden (Kielbassa et al. 1997), bei denen es sich zumindest zum Teil um 8-Hydroxyguanin handelt (Beehler et al. 1992).

In der vorliegenden Arbeit wurde UVB zur experimentellen Generierung von Pyrimidindimeren eingesetzt.

1.2.3.4 ROS durch Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wurde in der vorliegenden Arbeit zur experimentellen Generierung von Einzelstrangbrüchen verwendet. Der Mechanismus der DNA-Schädigung ist nicht vollständig aufgeklärt. Er verläuft wahrscheinlich über die Bildung von Hydroxylradikalen durch intrazelluläre Reaktion von Wasserstoffperoxid mit Übergangsmetallen, wie Eisen- und Kupferionen. Hierbei scheinen die reduzierten Formen der Übergangsmetalle (Fe^{2+} bzw. Cu^+) katalytisch aktiver zu sein als die oxidierten Formen (**Halliwell & Gutteridge 1990**). Jedoch kann unter bestimmten Umständen zum Teil auch Superoxid an der Bildung der Hydroxylradikale durch H_2O_2 beteiligt sein, wie durch Experimente mit Superoxiddismutase (SOD) gezeigt werden konnte (**Aruoma et al. 1989**).

1.2.3.5 ROS durch tert.-Butylhydroperoxid

Tert.-Butylhydroperoxid (tBuOOH) wurde zur experimentellen Generierung von Einzelstrangbrüchen und AP-Läsionen in Zellen verwendet. Die Strukturformel von tBuOOH ist in **Abb. 1.11** gezeigt.

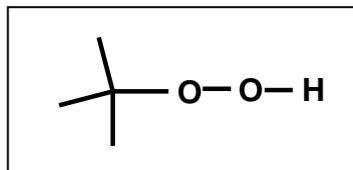


Abb. 1.11 Strukturformel von tBuOOH (tert.-Butylhydroperoxid).

Es ist sehr wenig bekannt über den Mechanismus der Schadensinduktion durch tBuOOH. Von **Guidarelli et al. (1997a)** wurde gezeigt, dass in U937 (menschliche myeloische Leukämie Zellen) durch tBuOOH Strangbrüche induziert werden, wobei eine Ca^{2+} -abhängige Bildung von H_2O_2 in den Mitochondrien beteiligt zu sein scheint. Es wird auch diskutiert, dass die durch tBuOOH beobachtete erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration zelluläre Endonukleasen aktivieren könnte, was zum Einschneiden der DNA und somit zu Einzelstrangbrüchen führen würde (**Latour et al. 1995, Guidarelli et al. 1997b**). Auch Eisenionen scheinen am Mechanismus der Strangbruchbildung über Fentonkatalyse beteiligt zu sein (**Latour et al. 1995**). Neben dem DNA-schädigenden Potential sind die Induktion der Lipidperoxidation, Glutathiondepletion und die Inhibition der ATP-Synthese durch tBuOOH beobachtet worden (**Guidarelli et al. 1997a**). Im Gegensatz zu H_2O_2 , das zu oxidativen DNA-Schäden führt (**Epe, 1995**), führte tBuOOH in Hepatocyten der Ratte nicht zu einer Induktion von 8-Hydroxyguanin (**Latour et al. 1995**).

1.2.3.6 ROS durch Dipropylentriamin-NONOat

Zur experimentellen Generierung von Stickstoffmonoxid (NO) stehen sogenannte „NONOate“ (1-substituierte Diazen-1-ium-1,2-diolate) zur Verfügung. Deren Synthese erfolgt durch Reaktion von NO unter Überdruck in Gegenwart von Nucleophilen. Je nach Art des Nucleophiles entstehen hierbei NO-Donatoren mit unterschiedlicher Halbwertszeit (Hrabie et al. 1993, Duchstein et al. 1999). Die Zerfallsgeschwindigkeit ist abhängig von der Temperatur und dem pH-Wert.

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Dipropylentriamin-NONOat (DPTA-NONOat) besitzt bei 37 °C in physiologischer Pufferlösung (pH 7,4), wie z. B. Zellkulturmedium, eine Halbwertszeit von 3 h. Der Zerfall ist säurekatalysiert und 1. Ordnung. Pro Mol Substanz werden 2 Mol NO freigesetzt (Keefer et al. 1996). Die Zerfallsreaktion ist in Abb.1.12 dargestellt.

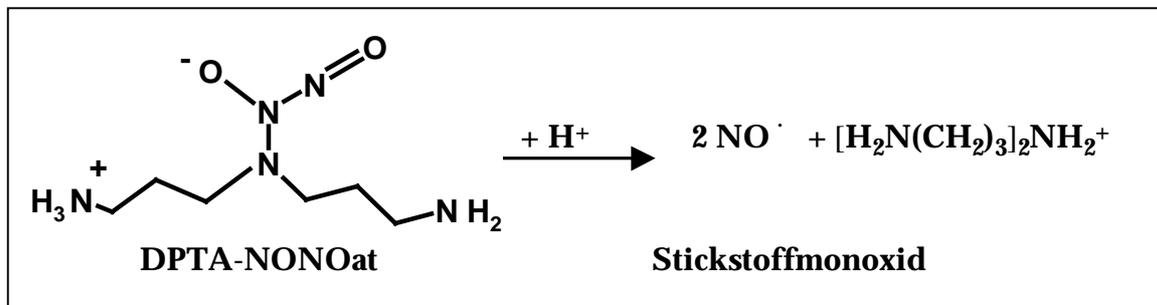


Abb. 1.12 Generierung von Stickstoffmonoxid aus DPTA-NONOat bzw. 3,3'-[Hydroxy-nitrosohydrazino-]bis-1-propanamin (Keefer et al. 1996).

1.2.3.7 ROS durch SIN-1

Zur Generierung von Peroxynitrit *in vitro* wurde 3-Morpholinosydnonimin (SIN-1) verwendet. Bei SIN-1 handelt es sich um den reaktiven Metaboliten von Molsidomin, einem auch zur Therapie der koronaren Herzkrankheit eingesetzten Arzneistoff, bei dessen spontanem Zerfall in Lösung in Gegenwart von Sauerstoff Superoxid und Stickstoffmonoxid in äquimolaren Mengen gebildet werden (Bohn & Schönafinger 1989, Feelisch et al. 1989). Der Mechanismus des Zerfalls von SIN-1 ist in Abb. 1.13 dargestellt. Die Halbwertszeit von SIN-1 in wässriger gepufferter Lösung wurde durch HPLC-Analytik mit UV-Detektion bestimmt. Bei pH 7,4 und 37 °C (100 mM Phosphatpuffer) beträgt sie 15 min. Da die gebildeten Zwischenprodukte jedoch stabiler sind als SIN-1, also langsamer zerfallen, ergibt sich für die NO-Freisetzung aus SIN-1 eine Halbwertszeit von 38 min., wie durch die Analyse der Bildung des Metaboliten SIN-1C ermittelt wurde (Noack & Feelisch 1989, Feelisch et al. 1989).

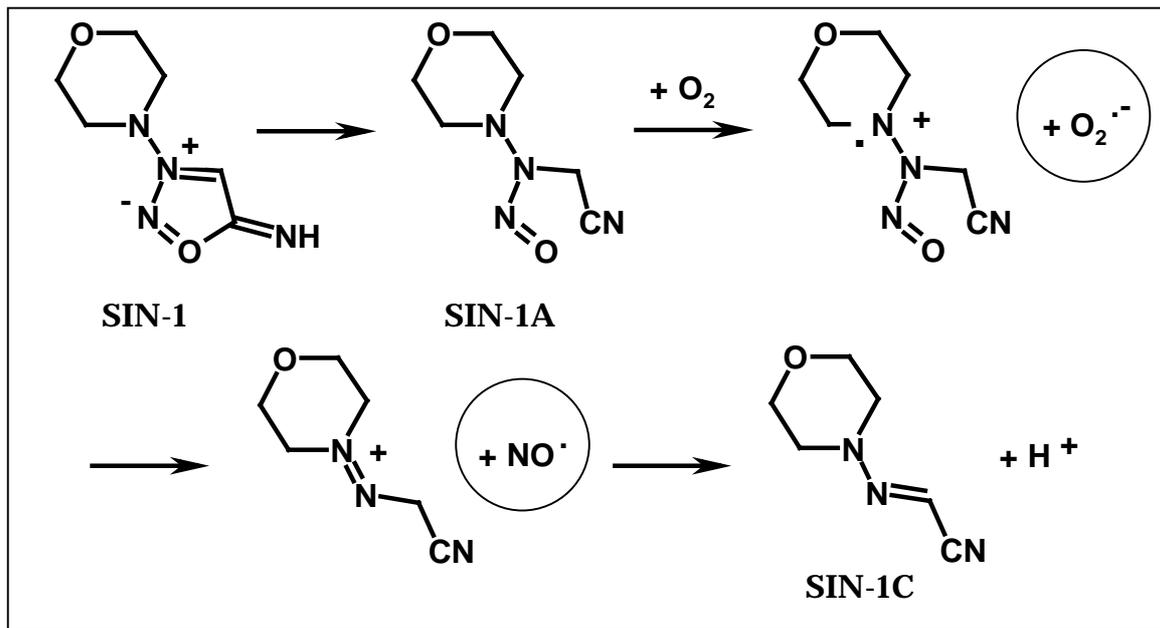


Abb. 1.13 Generierung von Superoxid und Stickstoffmonoxid durch SIN-1 (Duchstein et al. 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde SIN-1 zur Generierung von Peroxynitrit verwendet, dass durch Reaktion der beiden in unmittelbarer Nähe zueinander gebildeten reaktiven Spezies Superoxid und NO (vergleiche 1.2.2.). Die Peroxynitrit-Generierung aus SIN-1 konnte von Epe et al. (1996a) in zellfreien Experimenten an PM2-DNA bestätigt werden.

1.2.3.8 ROS durch 4-HPT

N-Hydroxypyridin-4(1H)-thion (4-NHPT; 4-HPT) wurde zur experimentellen Generierung von Hydroxylradikalen verwendet. Die Substanz kann lösungsmittelabhängig in zwei tautomeren Formen vorliegen, der Thiolform und der Thionform.

Das Tautomeriegleichgewicht ist in **Abb. 1.14** aufgezeigt.

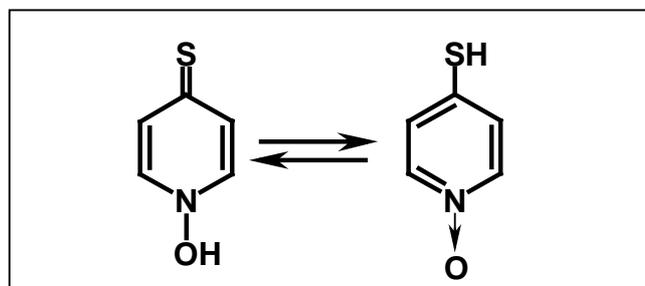


Abb. 1.14 Tautomeriegleichgewicht zwischen der Thiolform (links) und der Thionform (rechts) von 4-HPT nach Aveline & Redmond 1999.

In unpolaren, organischen Lösungsmitteln liegt das Gleichgewicht auf Seiten der Thiolform, während in polaren, protischen Lösungsmitteln die Thionform vorherrscht, die nach Anregung in einen Triplettzustand übergehen kann. In den meisten Lösungsmitteln liegen jedoch beide tautomeren Formen im Gleichgewicht miteinander vor. Im Grundzustand besitzt die gelöste Verbindung zwei Absorptionsmaxima, bei 295 nm und bei 340-360 nm (Aveline & Redmond 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Verbindung nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht zu oxidativen DNA-Schäden in zellfreier PM2-DNA (Epe et al. 1996) und in Kalbsthymus-DNA (Adam et al. 1995) führte. In Experimenten, die unter Zusatz verschiedener Scavenger durchgeführt wurden, wie tert.-Butanol, Katalase, Superoxiddismutase (SOD) und in D₂O-Puffer, konnte gezeigt werden, dass Hydroxylradikale die nach Anregung mit Licht gebildeten ultimal mit der DNA reagierenden Spezies sind (Epe et al. 1996).

Eine Generierung von Hydroxylradikalen ist über folgenden Mechanismus denkbar (Aveline & Redmond 1999), (Abb. 1.15).

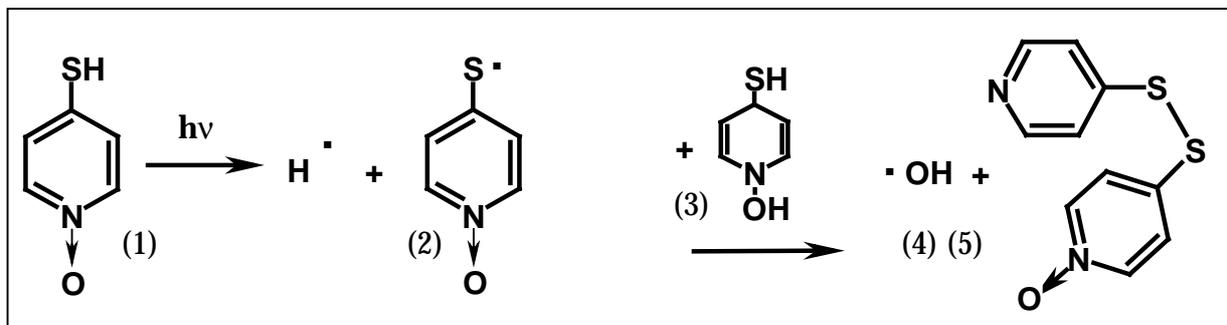


Abb. 1.15 Am Zerfall von 4-HPT beteiligte Reaktionen (Aveline & Redmond 1999).

Aus der Thiolform (1) von 4-HPT entsteht nach Bestrahlung unter Abspaltung eines Wasserstoffradikals ein N-oxy-4-pyridinethiyl-Radikal (2), das nach Reaktion mit der Thionform der Ausgangssubstanz (3) unter Bildung eines Disulfidadduktes (5) Hydroxylradikale (4) freisetzen kann.

1.3 DNA-Modifikationen durch reaktive Spezies

Die Zahl der DNA-Modifikationen, die durch reaktive Spezies generiert werden, ist sehr hoch. Etwa 100 verschiedene Modifikationen wurden identifiziert, darunter Einzel- und Doppelstrangbrüche, Basenmodifikationen, basenfreie Stellen (AP-Läsionen, apurinische bzw. apyrimidinische Stellen), DNA-Quervernetzungen (Epe 1995) und DNA-Protein-Quervernetzungen (Halliwell & Aruoma 1991).

1.3.1 DNA-Modifikationen durch reaktive Sauerstoffspezies

Abb. 1.16 zeigt die chemische Struktur einiger DNA-Modifikationen. Die meisten von ihnen werden nach Reaktion der DNA mit Hydroxylradikalen gebildet, die aufgrund ihrer hohen Reaktivität sehr unselektiv an der DNA angreifen. Sie können jedoch auch, wie unter 1.2.1. beschrieben, aus Superoxidradikalen und Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Übergangsmetallionen gebildet werden. Zur experimentellen Generierung von Hydroxylradikalen wird häufig γ -Strahlung verwendet.

Durch Wasserstoffabstraktionen an den Desoxyriboseres ten kann es über Zuckerradikale zur Ausbildung von AP-Läsionen (basenfreien Stellen, die durch Spaltung der N-glykosidischen Bindung zwischen Base und Zucker entstehen) oder zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen kommen (Halliwell & Aruoma 1991). Oxidierte AP-Läsionen können durch zusätzlichen radikalischen Angriff an 1', 2'- oder 4'-Position des Zuckers entstehen (Epe 1995). Durch spontane Depurinierung entstehen zu einem geringen Anteil auch AP-Läsionen (Lindahl 1993), diese sind dann nicht oxidiert. Durch Angriff von Hydroxylradikalen an Position 8 des Guanin entstehen über das 8-Hydroxy-7,8-dihydroguanin-Radikal als Zwischenstufe 8-Hydroxyguanin und 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin, bekannt als FAPY-Guanin entstehen (Halliwell & Aruoma 1991, Cadet et al. 1999). Ebenso kann Adenin durch Hydroxylradikale modifiziert werden, wobei unter anderem 8-Hydroxyadenin und FAPY-Adenin entstehen (Halliwell & Aruoma 1991). Hydroxylradikale können Guanin außerdem durch Angriff an Position 4 und 5 oxidativ angreifen. Pyrimidine werden oxidativ an Position 5 und 6 angegriffen. Entstehende Modifikationen sind verschiedene 5,6-Dihydrothymidin-Derivate, wie *cis*- und *trans*-Glykole, und Hydrate des Cytosin und Thymin sowie deren Fragmentierungsprodukte, wie 5-Hydroxy-5-methylhydantoin (Halliwell & Aruoma 1991, Breimer & Lindahl 1985). 5-Hydroxycytosin kann durch Wasserabspaltung aus Cytosinglykolen gebildet werden.

Eine weitere Modifikation der Pyrimidine, die Pyrimidindimere entstehen bei Bestrahlung mit UV-Licht (260 nm) durch [2+2]-Cycloaddition zweier benachbarter Thymidine oder indirekt durch Energieübertragung über endogene Photosensibilisatoren (siehe 1.2.1). Die Bildung von (6-4)-Photoprodukten ist dagegen nur durch UV-Strahlung (260 nm) möglich.

Vor kurzem wurde über Halogenierungen von Cytosin und Uracil zu den 5-Brom-Derivaten durch die von den Enzymen Myeloperoxidase und Eosinophilen-Peroxidase gebildeten reaktiven Spezies berichtet und deren Bedeutung diskutiert (Marnett & Plastaras 2001).

Durch Angriff von α,β -ungesättigten Aldehyden wie Acrolein, Crotonaldehyd und 4-Hydroxynonenal, die bei der Fettsäureoxidation in Lipidmembranen entstehen, können Etheno- und Propanoaddukte des Guanin, Cytosin und Adenin gebildet werden. Sie sind im Gewebe von Nagetieren und Menschen nachgewiesen worden (Marnett & Plastaras 2001).

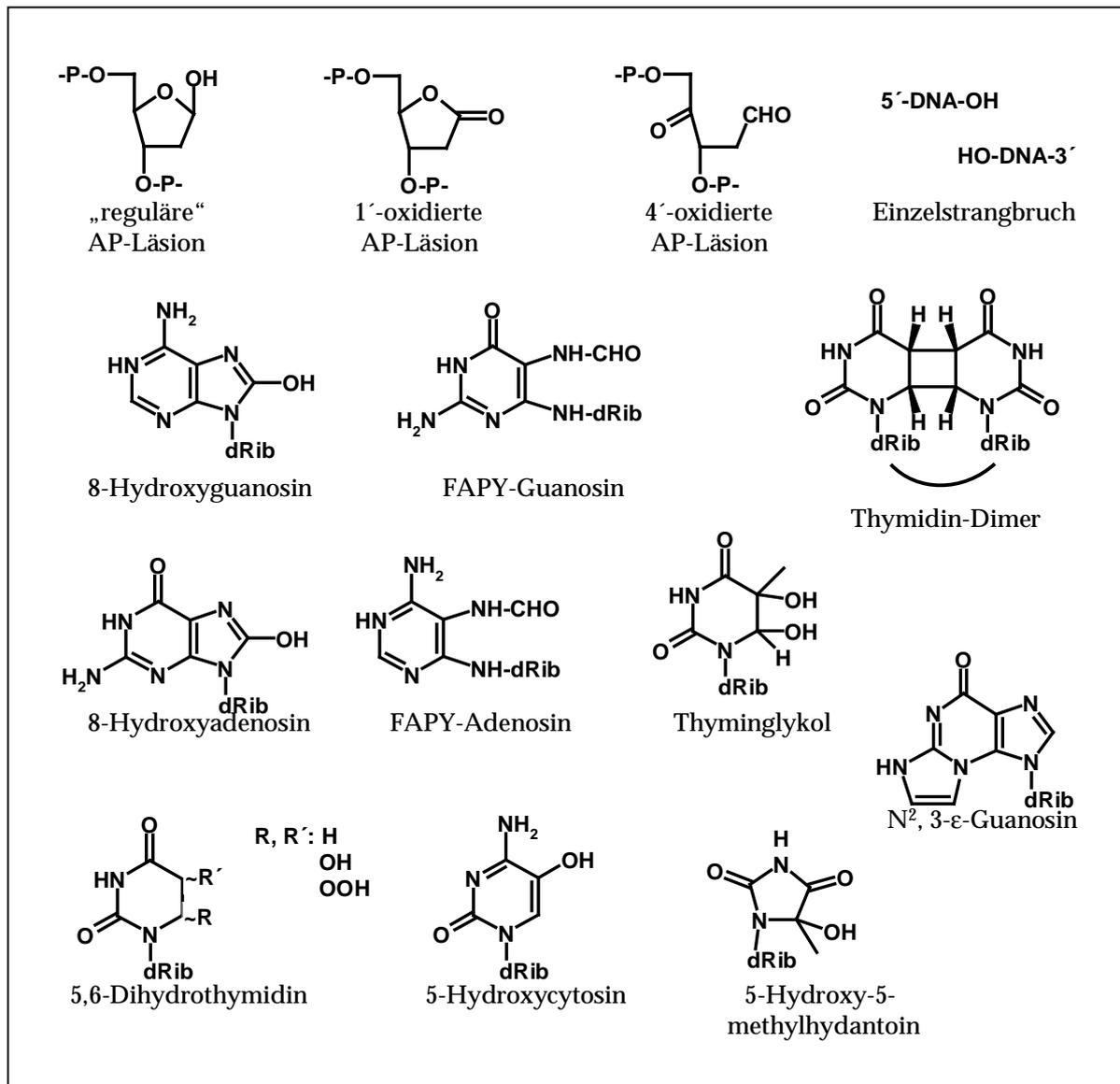


Abb. 1.16 DNA-Modifikationen durch reaktive Sauerstoffspezies.

DNA-Protein-Quervernetzungen können zwischen DNA-Basen und Aminosäuren gebildet werden. Hierbei scheint es in Gegenwart von Sauerstoff vorwiegend zu Thymin-Tyrosin-Quervernetzungen zu kommen (Nackerdien et al. 1991).

1.3.2 DNA-Modifikationen durch reaktive Stickstoffspezies

Unter physiologischen Bedingungen spielen vor allen Dingen zwei aus NO gebildete reaktive Spezies eine Rolle, N_2O_3 , das Anhydrid der salpetrigen Säure, das durch Autoxidation entsteht ($k = 3,5 \times 10^6 \text{ M}^{-2} \text{ s}^{-1}$), und Peroxynitrit, das bei Reaktion von NO mit Superoxid gebildet wird ($k = 6,7 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Burney et al. 1999).

Nach Nitrosierung von DNA-Basen durch N_2O_3 kommt es über die Bildung von Diazoniumionen zu deren Deaminierung (Burney et al. 1999, Tamir et al. 1996). Dabei entsteht durch Deaminierung von Cytosin Uracil, von 5-Methylcytosin Thymin, von Adenin Hypoxanthin und von Guanin Xanthin. Nach Behandlung von Bakterien und Zellen mit NO wurde ferner die Bildung von Einzelstrangbrüchen beobachtet, was auf radikalische Reaktionen hinweist (Wink et al. 1991, Nguyen et al. 1992, Tamir et al. 1996a, deRojas-Walker et al. 1995). Abb. 1.17 zeigt eine Übersicht der Deaminierungsprodukte der DNA-Basen.

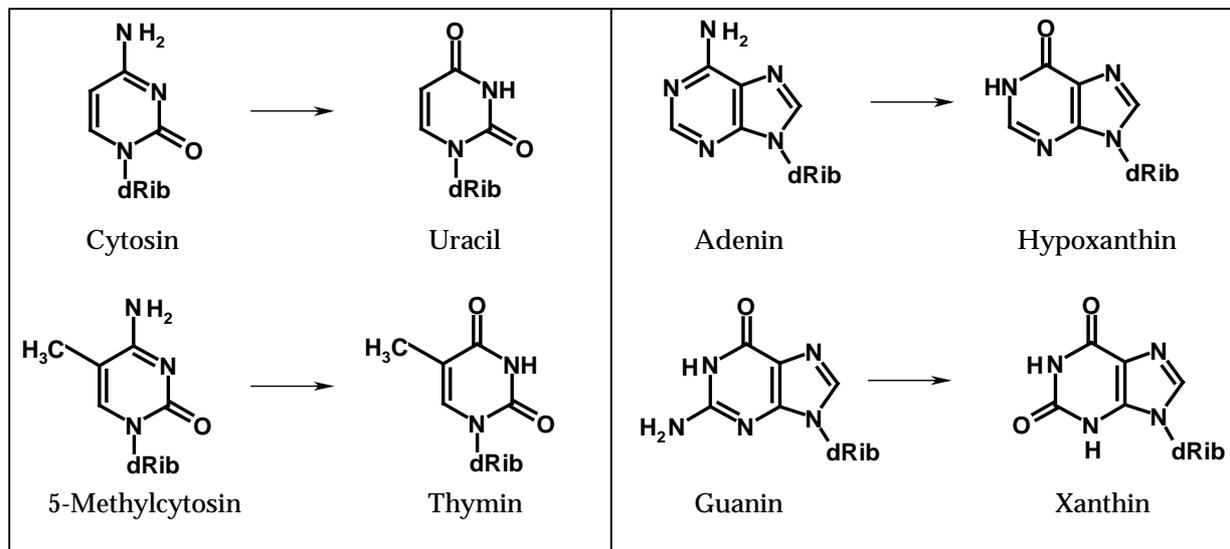


Abb. 1.17 Deaminierungsprodukte der DNA-Basen, modifiziert nach Grisham et al. 2000.

Vor kurzem wurde die Bildung eines weiteren Deaminierungsproduktes in *in vitro* Assays beschrieben, 2-Deoxyoxanosin (Suzuki et al. 2000, Abb. 1.18), wobei fraglich ist, ob dieses unter physiologischen Bedingungen gebildet wird.

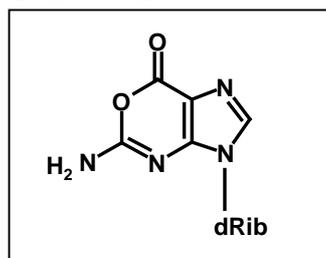


Abb. 1.18 Deaminierungsprodukt von Guanosen, 2-Deoxyoxanosin (Suzuki et al. 2000).

Möglicherweise kann N_2O_3 auch zu Quervernetzungen der DNA-Stränge führen, wobei die Art der beteiligten Basen noch zu erforschen ist (Burney et al. 1999).

Im Gegensatz zu Distickstofftrioxid führt Peroxynitrit zu oxidativer und nitrierender Modifikation der DNA-Basen (Beckman 1996), wobei Guanin als Base mit dem geringsten Oxidationspotential bevorzugt angegriffen wird (Ohshima & Bartsch 1994, Hüttermann 1982). Dabei kommt es vorwiegend zur Bildung von 8-Hydroxyguanin und 8-Nitroguanin (Yermilov et al. 1995, Burney et al. 1999, Spencer et al. 1996, Abb. 1.18) und Einzelstrangbrüchen (Salgo et al. 1995, Spencer et al. 1996, Epe et al. 1996). Daneben werden in geringeren Mengen FAPY-Guanin (siehe Abb. 1.19), 5-(Hydroxymethyl)-uracil, Xanthin (deRojas-Walker et al. 1995) und AP-Läsionen in die DNA eingefügt, wobei die Zahl der AP-Läsionen mit der Zeit zunimmt, möglicherweise über Depurinierung von DNA-Modifikationen und Einzelstrangbruchbildung. Nach neuen Erkenntnissen reagiert Peroxynitrit weiter mit 8-Hydroxyguanin (Uppu et al. 1996, Burney et al. 1999), was zu weiteren DNA-Modifikationen führt. Laufende Untersuchungen beschäftigen sich außerdem mit der möglichen Reaktion von 8-Nitroguanin mit Peroxynitrit (Burney et al. 1999). Abb. 1.19 zeigt eine Übersicht der durch Peroxynitrit nach zellfreier Behandlung von DNA nachgewiesenen DNA-Modifikationen.

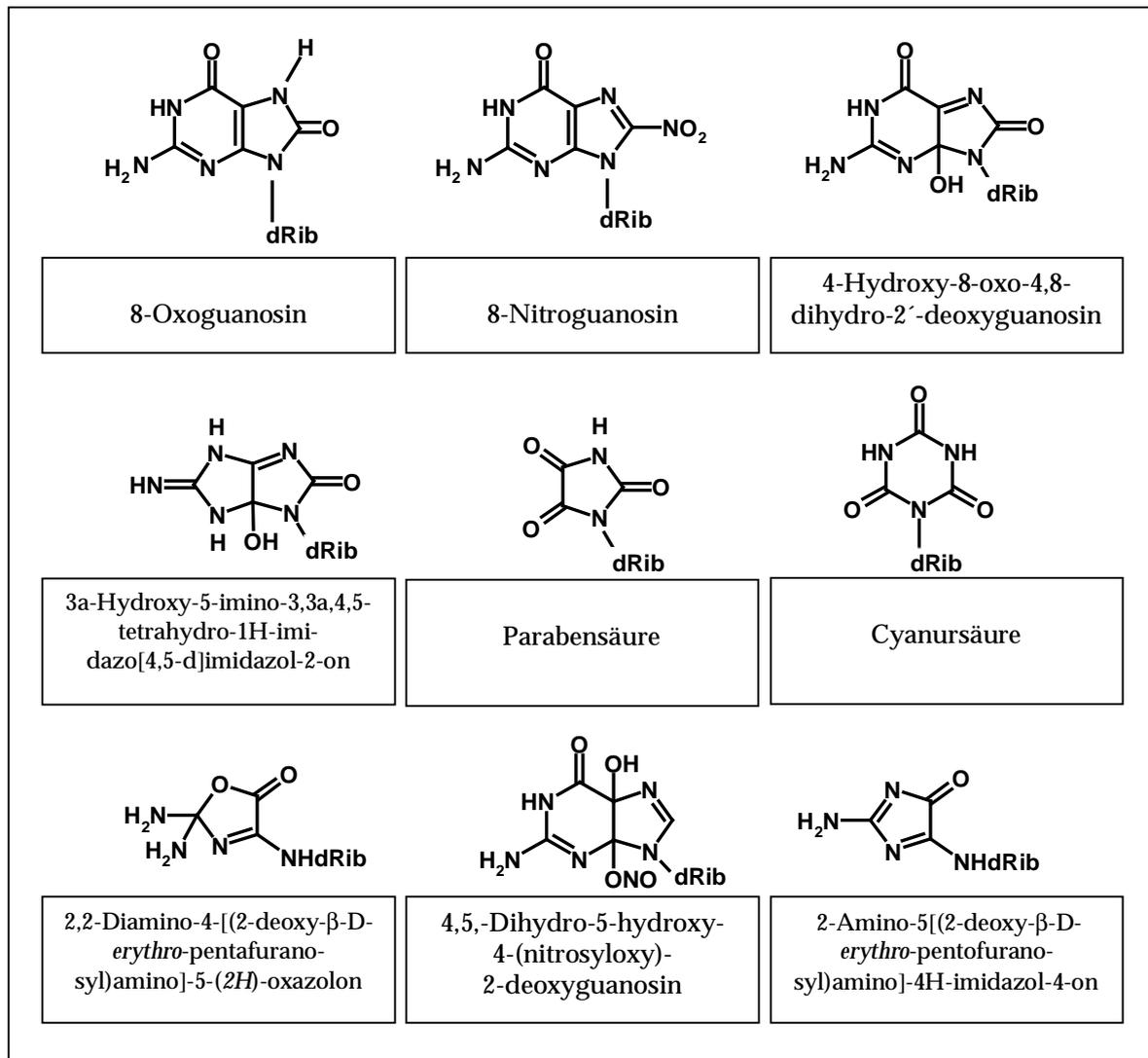


Abb. 1.19 Oxidative DNA-Basenmodifikationen durch Peroxynitrit (**Burney et al. 1999**).

Als Zwischenprodukt der Reaktion von Peroxynitrit mit 8-oxoG entsteht 3a-Hydroxy-5-imino-3,3a,4,5-tetrahydro-1H-imidazo[4,5-d]imidazol-2-on oder dessen ringoffene Form, die leicht weiter oxidiert werden zu Cyanursäure. Außerdem entsteht Parabensäure, 2,2-Diamino-4-[(2-deoxy-β-D-erythro-pentofuransyl)amino]-5-(2H)-oxazolon, dessen Imidazol-Vorläufer und die beiden Diastereoisomere (4R,S) von 4-Hydroxy-8-oxo-4,8-dihydro-2'-deoxyguanosin. Das letztgenannte kann durch Peroxynitrit oxidiert und nitrosyliert werden zu 4,5,-Dihydro-5-hydroxy-4-(nitrosyloxy)-2-deoxyguanosin, während Cyanursäure und Parabensäure gegenüber weiterer Oxidation stabil sind (**Burney et al. 1999**). Unter physiologischen Bedingungen in Zellen dürften diese DNA-Modifikationen allerdings keine Rolle spielen.

1.4 Biologische Konsequenzen der durch ROS verursachten oxidativen DNA-Modifikationen und einer erhöhten NO-Produktion

Im folgenden sollen die Konsequenzen von DNA-Modifikationen, die durch reaktive Spezies induziert wurden (**siehe 1.3**), detaillierter dargestellt werden. Im Fall von NO hat neben der Reaktion mit der DNA der Angriff an weiteren zellulären Targets wie Proteinen eine Bedeutung.

Nach Schädigung der DNA gibt es grundsätzlich drei Möglichkeiten für eine Zelle, darauf zu reagieren. Der Schaden kann repariert werden (**siehe 1.5**) oder er kann unerkant bleiben und nach Replikation zur Manifestation einer Mutation führen. Ist die Zelle sehr stark geschädigt und keine Reparatur mehr möglich, kann sie auf zwei Arten zugrunde gehen, durch Apoptose oder Nekrose. Bei der Apoptose handelt es sich um ein Selbstmordprogramm, was von der Zelle durchgeführt wird und wozu sie noch über Energiereserven und Enzymaktivitäten verfügen muss. Die Nekrose dagegen setzt einen vollständigen Aktivitätsverlust voraus, läuft unkontrolliert ab und geht mit Entzündung des umliegenden Gewebes einher (**Murphy et al. 1999**).

1.4.1 Biologische Konsequenzen oxidativer DNA-Schäden

Die biologischen Konsequenzen der durch reaktive Spezies induzierten DNA-Schäden unterscheiden sich ja nach Modifikationsart.

Xanthin, das Deaminierungsprodukt von Guanin, kann zu Mismatching und daraufhin zu GC nach AT Transitionen führen. Durch Hydrolyse kann es zu Depurinierung und zur Entstehung einer AP-Läsion kommen (**Burney et al. 1999**).

Uracil, das Deaminierungsprodukt von Cytosin, besitzt das Potential zur Mismatching und nachfolgender Bildung von GC zu AT Transitionen. Jedoch ist das mutagene Potential von Uracil nur gering, da es im zellulären Kontext sofort durch Uracylglykosylase repariert wird (**Burney et al. 1999**).

Hypoxanthin, das Deaminierungsprodukt von Adenin, führt nach Fehlpaarung zu AT nach GC Transitionen, während Deaminierung von 5-Methylcytosin über Thyminbildung für GC nach AT Transitionen verantwortlich gemacht werden kann (**Burney et al. 1999**).

AP-Läsionen können die DNA-Replikation blockieren, aber auch zu Mutationen führen (**Epe 1995**). Bei Replikation eines Shuttle-Vektors in Säugerzellen wird überwiegend Guanin gegenüber einer AP-Läsion eingebaut (**Neto et al. 1992, Klinequist & Drinkwater 1992**), während in Bakterien mit induzierter SOS-Antwort überwiegend Adenin eingebaut wird (**Loeb & Preston 1985, Lawrence et al. 1990**). Das letztere kann nach Replikation zu einer GC nach TA Transversion führen. Die basenfreie Stelle (AP-Läsion) kann aber auch durch Endonukleasen eingeschnitten werden oder spontan hydrolysieren (**Lindahl 1993**), wodurch ein Strangbruch entsteht (**Burney et**

al. 1999). Der Gleichgewichtsspiegel von AP-Läsionen wird auf $< 0,67$ pro 10^6 Nukleotide (~ 4000 pro Genom) geschätzt (Atamna et al. 2000). Experimentell in isolierten menschlichen oder Nagetier-Geweben ermittelte Werte liegen mit 50.000-200.000 Läsionen pro Genom jedoch deutlich höher (Nakamura & Swenberg 1998). Über die Mutagenität von oxidierten AP-Läsionen ist wenig bekannt (Epe 1995).

Einzelstrangbrüche, induziert durch Oxidantien, werden sehr schnell in einem zweiphasigen Prozess repariert (Churchill et al. 1991), wobei nach neueren Erkenntnissen zwei verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung stehen (Caldecott 2001, siehe 1.5.3.). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sie ein mutagenes Potential besitzen (Epe 1995).

Doppelstrangbrüche, die sowohl Deletionen als auch Chromosomenaberrationen verursachen können, sind sehr zytotoxisch und mutagen.

Aufgrund des niedrigsten Oxidationspotentials (Hütterman 1982) finden die meisten Basenmodifizierungen am Guanin statt. Die häufigste vorkommende Modifikation ist *8-Hydroxyguanin*. Es ist nach Reaktion der DNA mit Hydroxylradikalen, Singulett-Sauerstoff, angeregten Photosensibilisatoren, wie auch Ro 19-8022, und anderen Spezies detektiert worden (Will et al. 1999, Epe 1995). Bei der Replikation paart 8-oxoG gerne mit Adenin (Shibutani et al. 1991). So kommt es zu GC nach TA Transversionen in Säugetierzellen (Klein et al. 1992, Moriya 1993) und Bakterien (Wood et al. 1990, Moriya et al. 1991, Cheng et al. 1992). Die Mutationsfrequenz eines 8-oxoG-Derivates beträgt in einem einzelsträngigen Vektor in Säugetierzellen 2,5-4,8 % (Moriya 1993). Diese niedrige Mutagenität spiegelt die Effizienz der DNA-Reparatur in bakteriellen und menschlichen Zellen wider (siehe 1.5.). Sie ist jedoch hoch im Vergleich zur Mutagenität anderer DNA-Modifikationen.

8-oxoA, *FAPY-Guanin* und *FAPY-Adenin* werden durch Hydroxylradikale in geringerem Ausmaß als 8-oxoG gebildet (Dizdaroglu 1992, Fuciarelli 1990). Dabei weist 8-oxoA in dem gleichen Vektor eine geringere Mutagenität als 8-oxoG auf (Wood et al. 1992), während Formamidopyrimidine nicht mutagen sind, sondern die DNA-Replikation blockieren (Tudek et al. 1992).

2-Hydroxyadenin entsteht auch zu einem geringen Anteil durch Hydroxylradikale in der DNA (Dizdaroglu 1993). Es kann *in vitro* zu Fehleinbau von Adenin führen und so Anlass zu AT nach TA Transversionen geben (Kamiya et al. 1995).

Von den *Thyminmodifikationen* ist für *cis*-Thyminglykol bekannt, dass es zu einer Blockade der Replikation führt (Evans et al. 1993, Ide et al. 1985).

5,6-Dihydrocytosin-Derivate, wie z. B. 5-Hydroxycytosin, scheinen eine höhere Rate zu spontanen Depurinierungen zu besitzen als unmodifizierte Cytosine (O'Donnell et al. 1994), was zu Mutationen (GC nach AT Transitionen) Anlass geben kann (Burney et al. 1999). Unter zellfreien Bedingungen wurde in Abhängigkeit vom Sequenzkontext sowohl Adenin als auch Cytosin gegenüber 5-Hydroxycytosin eingebaut (Purmal et al. 1994).

Sehr wenig weiß man über die biologischen Konsequenzen von *8-Nitroguanin* (Burney et al. 1999). Man hat herausgefunden, dass es bei 37 °C schnell depurinieren (Yermilov et al. 1995a) und somit zu AP-Läsionen führen kann, welche zu Mutationen führen oder durch intrazelluläre Endonukleasen in Einzelstrangbrüche überführt werden können.

2'-Deoxyoxanosin, eingesetzt als Desoxynukleotid neben Xanthin-, Thymin-, Cytosin-, Adenin- und Guaninnukleotiden, führte in zellfreien Experimenten mit M13mp18 DNA als Matrize zu einer Misinkorporierung durch DNA Polymerasen von *2'-Deoxyoxanosin*-triphosphat (dOTP) gegenüber Thymin und somit zu einem Anstieg von GC nach AT Transitionen (Suzuki et al. 1998). Es ist jedoch unklar, ob die Bildung von *2'-Deoxyoxanosin* unter physiologischen Bedingungen überhaupt eine Rolle spielt, da die von Suzuki et al. (2000) zu ihrer Generierung eingesetzten Bedingungen sehr unphysiologisch sind.

Weitgehend unbekannt sind die Folgen der durch Reaktion von 8-oxoG mit Peroxynitrit gebildeten DNA-Modifikationen (Burney et al. 1999). Hier besteht noch großer Forschungsbedarf.

Ethno-DNA-Addukte können zu Punktmutationen führen, jedoch unterscheidet sich ihr mutagenes Potential und die Art der induzierten Mutationen in Abhängigkeit des untersuchten Systems (Marnett 2000, Marnett & Plastaras 2001), so dass ihre Relevanz noch nicht abschließend beurteilt werden kann. Der Gleichgewichtsspiegel von Guaninethenoaddukten (N²,3ε-Guanin) wird mit neun Addukten pro 10⁸ Guanin in Rattenleber angegeben und liegt im Menschen etwas höher (Marnett & Plastaras 2001). Auch über ε-C- und ε-A-Addukte in menschlichem Gewebe von unbehandelten Personen in Höhe von 5 Addukten pro 10⁸-10⁹ Nukleotiden wird berichtet (Bartsch & Nair 2000).

1.4.2 Biologische Konsequenzen erhöhter NO-Produktion

Außer durch die Reaktion mit der DNA kann NO auch über andere Mechanismen auf die Mutagenese und Kanzerogenese Einfluss nehmen. Physiologischerweise führt die Reaktion von NO mit der Guanylatcyclase zu deren Aktivierung, was die wichtigste Funktion von NO als Botenstoff ist. Daneben kann NO aber auch mit einer Reihe weiterer Häm-enthaltenden Proteine interagieren. Diese Reaktionen können zu „negativen Folgen“ für die Zelle führen. Sie sind auf erhöhte NO-Konzentrationen zurückzuführen, die nach Induktion von der iNOS gebildet werden. Im Fall der Reaktion von NO mit dem Cytochrom P450 und dem Hämoglobins z. B. kommt zu einer Inhibierung. Außerdem kann NO auch mit Eisen-Schwefel-Komplex-haltigen Enzymen und anderen eisenhaltigen Enzymen reagieren. Dabei kommt es zu einer Hemmung des Citratzyklus (Aconitasehemmung) und der Atmungskette (mitochondrialer Komplex I und II) und zu einer Erniedrigung des intrazellulären Eisengehaltes. Auch die Hemmung der DNA-Synthese ist nach Reaktion von NO mit der Ribonukleotidreduktase, beobachtet worden (Schmidt 1994, Keefer 1995, MacMicking et al. 1997, Ohshima & Bartsch 1994, Hentze & Kuhn 1996). Von Bedeutung ist außerdem noch die Reaktion von NO mit Thiolgruppen, die auch als

Speicher- und Transportform von NO bezeichnet werden (**Murphy et al. 1999**), dessen biologische Halbwertszeit ja nur kurz ist (**siehe 1.2.2.**). Sie verläuft als Nitrosylierung über das nach Oxidation von NO gebildete N_2O_3 . Hierbei kann es durch Reaktion mit Glutathion zu einer Verarmung der Zelle mit Antioxidantien kommen (**Ohshima & Bartsch 1994**). Der Glutathiongehalt der Zelle ist aber auch für das Ausmaß der Reaktion von NO mit anderen Thiolgruppen von Bedeutung und spielt zusätzlich eine Rolle bei der Regulation der Bildung der iNOS mRNA (**Chen et al. 2000, Singh et al. 1996**). Die Reaktion mit kritischen Thiolgruppen führt wahrscheinlich im Falle der bakteriellen Reparaturenzyme Fpg-Protein, das 8-oxoG repariert, und O^6 -Methylguanin-DNA-methyltransferase zu einem Funktionsverlust (**Laval & Wink 1994, Wink & Laval 1994, Laval et al. 1997**). Auch die Reparatur H_2O_2 -induzierter DNA-Schäden wurde durch NO gehemmt (**Jaiswal et al. 2000, Jaiswal et al. 2001**). Bei Nitrosierung der SH-Gruppe der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase kommt es zur Hemmung der ATP-Synthese. Dies ist einer der Mechanismen, die für die Induktion der Apoptose durch erhöhte NO-Produktion verantwortlich sein könnten. Außerdem nimmt man an, dass PARP-Aktivierung, Schädigung der Mitochondrienmembran, Interferierung mit antiapoptotischen und den mitochondrialen Proteinen (**siehe vorstehend**), Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels und die Aktivierung von p53 bei der durch erhöhte NO-Spiegel verursachten Apoptose eine Rolle spielen (**Murphy 1999**). Ein apoptotischer Zelltod konnte in einer Makrophagenzelllinie (RAW 264.7) sowohl durch Induktion mit Lipopolysacchariden (LPS) in Kombination mit γ -Interferon (γ -IFN) als auch durch Behandlung mit NO-freisetzenden Substanzen gezeigt werden (**Messmer & Brüne 1996, Sarik et al. 1993, Kim et al. 2000**). p53 ist als Tumorsuppressorgen von besonderer Bedeutung. Seine Aktivierung kann durch erhöhte DNA-Schädigung erfolgen, die man im Falle des NO auf die Bildung von Peroxynitrit zurückführt. Die Induktion von p53 führt zu einem Zellzyklusstop. Je nach Ausmaß der Zellschädigung wird dann der Schaden repariert oder die Apoptose eingeleitet. Physiologischerweise führt p53 zu einer Inhibition der iNOS und damit zu einem Schutz vor erhöhten NO-Konzentrationen (**Murphy 1999, Mochhala & Rajnakova 1999**). Interessant ist daher, dass das p53-Gen in verschiedenen Tumoren mutiert und nicht funktionsfähig ist (**Mochhala & Rajnakova 1999**). Es ist daher nicht ausgeschlossen und in manchen Fällen sogar sicher, dass bei der Entstehung einiger Krebsarten (z. B. kolorektale Krebsarten) NO-induzierte Mutationen des p53-Gens eine Rolle spielen (**Ohshima & Bartsch 1994, Jaiswal et al. 2001**).

Neben den genannten Nitrosierungsreaktionen finden aber auch Nitrierungen statt, an der DNA (**siehe 1.4.2.**), aber auch an Proteinen. Die hier angreifende reaktive Spezies ist Peroxynitrit. Im Gewebe von mit Peroxynitrit-behandelten Tieren und in mit LPS/ γ -Interferon zur NO-Produktion stimulierten Makrophagen wurde 3-Nitrotyrosin immunhistochemisch nachgewiesen (**Gal et al. 1996**) und als weiterer Biomarker neben 8-Nitroguanin für gegenüber NO bzw. Peroxynitrit exponierten Zellen und Geweben diskutiert (**Beckman 1996, Burney et al. 1999, Pfeiffer et al. 2001**).

1.5 Reparatur von DNA-Schäden

Die DNA-Reparatur wird benötigt, um die genomische Integrität zu erhalten, sei es nach Replikationsfehlern oder nach Schädigung der DNA durch reaktive Agentien. Pro Tag pro menschlicher Zelle entstehen etwa 20.000 endogene DNA-Schäden (**Lindahl 1993**), es werden auch Werte bis zu 100.000 genannt (**Beckman and Ames 1997**). Mehr als 70 menschliche Gene sind heute inklusive ihrer Lokalisation und cDNA-Sequenz bekannt (**Wood et al. 2001**). Doch vieles ist noch unbekannt. Die Informationen wurden zum Teil durch Homologiesuche aufgrund von bekannten bakteriellen Genen oder Hefegenen erhalten oder sind bei der Erforschung der Ursachen verschiedener menschlicher Krankheiten entdeckt worden (**Yu et al. 1999**). Von den fünf derzeit bekannten Reparaturwegen (direkte Reparatur, Basenexzisionsreparatur, Nukleotidexzisionsreparatur, Mismatch-Reparatur und Strangbruchreparatur) (**Yu et al. 1999**) sollen hier nur die

- Basenexzisionsreparatur (BER)
- Nukleotidexzisionsreparatur (NER)
- Einzelstrangbruchreparatur, als eine Art der Strangbruchreparatur (neben der Doppelstrangbruchreparatur)

beschrieben werden.

1.5.1 Basenexzisionsreparatur

Bei der Basenexzisionsreparatur (BER) handelt es sich um einen mehrschrittigen Reparaturprozess. Es werden sogenannte „non-bulky“ Basenmodifikationen, die nur geringe Veränderungen der DNA-Struktur verursachen, repariert (**Yu et al. 1999**). Diese können während des normalen Zellmetabolismus durch Deaminierungen oder Alkylierungen, aber auch durch oxidative Schädigung, induziert durch reaktive Sauerstoff- oder Stickstoffspezies, oder durch Replikationsfehler entstanden sein (**Krokan et al. 2000**).

Bei der BER werden die veränderten Basen durch DNA-Glykosylasen erkannt (**siehe Tab. 3.2**) und durch Einschneiden der N-glykosidischen Bindung zwischen Base und Desoxyribose aus dem DNA-Strang entfernt, wobei eine AP-Stelle zurückbleibt. Da AP-Stellen zytotoxisch sind und mutagene Eigenschaften besitzen (**siehe 1.4.2.**), versteht es sich, dass sie weiter prozessiert werden müssen. Im Falle von monofunktionellen DNA-Glykosylasen, wie Uracil-DNA-Glykosylase (UNG), wird die AP-Läsion an ihrer 5'-Seite von der AP-Endonuklease (HAP1/APE1) eingeschnitten. Die bifunktionellen DNA-Glykosylasen, wie z. B. *hOGG1*, bewerkstelligen dies teilweise mit ihrer β -Lyase-Aktivität selbst, jedoch auf der 3'-Seite der AP-Läsion, wodurch ein Einzelstrangbruch entsteht (**Krokan et al. 1997, Krokan et al. 2000, Lindahl et al. 1997**). Bei der *short-patch-BER*, der meist durchgeführten Variante der BER, wird der noch freie verbliebene Phosphatrest durch die DNA-Polymerase β (Pol β) entfernt und die 1-Nukleotidlücke aufgefüllt. Der DNA-Strang wird dann durch DNA-Ligase III/XRCC1 wieder verschlossen, wobei XRCC1 als „Bindeglied“ zwischen Pol β und DNA-Ligase III fungiert, für die

es getrennte Bindungsstellen aufweist (Krokan et al. 1997, Krokan et al. 2000, Lindahl et al. 1997). Die *long-patch-BER* ist PCNA-abhängig (*proliferating cell nuclear antigen*). Hier werden durch Polymerase δ oder ϵ mehrere Nukleotide (es werden 2-8 (Krokan et al. 2000) oder 2-13 (Memisoglu & Samson 2000) angegeben) in 3'-Richtung ausgehend von der AP-Läsion in die DNA eingefügt. Der überstehende DNA-Strang wird durch DnaseIV/FEN1 (*flap* Endonuklease) entfernt und der entstehende DNA-Strangbruch durch DNA-Ligase I verschlossen (Krokan et al. 1997, Lindahl et al. 1997, Memisoglu & Samson 2000). Neue Erkenntnisse weisen auf eine Kopplung des *long-patch* Reparaturweges mit der Replikation und eine Abhängigkeit von Replikationsfaktoren (RF) wie RFC und RPA (replication protein A) hin (Memisoglu & Samson 2000, Krokan et al. 2000, Caldecott 2001). Die Basenexzisionsreparatur ist in Abb. 1.20 mit UNG als Beispiel einer monofunktionellen DNA-Glykosylase dargestellt.

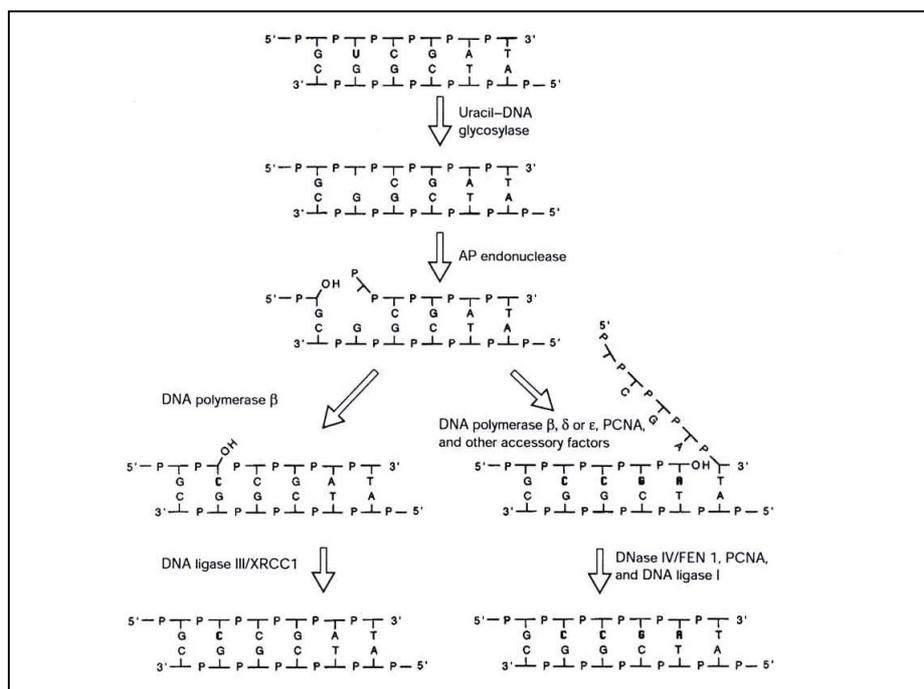


Abb. 1.20 Basenexzisionsreparatur in Säugern (Lindahl et al. 1997).

Neueste Befunde weisen darauf hin, dass die *long-patch*-Variante der BER replikationsgekoppelt (an der Replikationsgabel) erfolgt.

Die Erkennungsspektren der im Relaxationsassay (**vergleiche 2.2.3.3.**) verwendeten bakteriellen Reparaturenendonukleasen und einiger menschlicher DNA-Glykosylasen sind in **Tab. 1.2** dargestellt.

Bakt. Enzym	Fpg	Endo III	Endo IV	T4EV	Exo III
Menschl. funktionelles Homolog	hOGG1	hNTH ^a	keines	~ NER-Komplex	HAP1 ^b
AP-Läsionen					
normal	+	+	+	+	+
1'-oxidiert	-	-	+	-	+
4'-oxidiert	+	+	+	+	(+) ^c
Basenmodifikationen					
8-Hydroxyguanin	+	-	-	-	-
FAPY-Guanin	+	(+) ^e	-	-	-
FAPY-Adenin	(+) ^d	(+) ^e	-	-	-
5,6-Dihydro-pyrimidine	-	+	-	-	-
Pyrimidindimere	-	-	-	+	-

^a anderer Name Thymidinglykol-DNA-glykosylase

^b nach **Mol et al. 2000**

^c Erkennung benötigt sehr hohe Enzymkonzentrationen (200 U/ml)

^d nicht prozessiert von hOGG1

^e nicht prozessiert von Endo III

Tab. 1.2 Erkennungsspektren bakterieller (**Epe 1995**) und menschlicher DNA-Glykosylasen, modifiziert durch siehe Angaben in Fussnote, ergänzt durch Eintragung der menschlichen funktionell homologen Enzyme.

Hier soll eine kurze Übersicht über die Struktur einiger wichtiger DNA-Reparaturenzyme gegeben werden:

- Fpg-Protein

Das bakterielle Fpg-Gen kodiert für ein 30,2 kDa großes Protein, bestehend aus 269 Aminosäuren mit einem isoelektrischen Punkt bei pH 8,5. Es enthält ein Zink-Atom (Zn²⁺) pro Molekül. Am carboxyterminalen Ende des Fpg-Proteins befindet sich ein Zinkfingermotiv, in dem 4 Cysteinreste enthalten sind, die das Zink-Ion komplexieren. Diese Zinkfingerstruktur ist für die Glykosylase-Aktivität des Proteins essentiell, wobei schon die Modifizierung eines Cysteinrestes mit einem Funktionsverlust verbunden ist. Die von Fpg erkannten DNA-Modifikationen sind in **Tab. 1.2** dargestellt. Für die Erkennung von 8-oxoG gilt, dass es in 8-oxoG/C-Paaren besser erkannt wird als in 8-oxoG/A-Paaren. 8-oxoG und FAPY-Guanin werden beide gleich gut erkannt. Neben der Glykosylase-Aktivität besitzt das Fpg-Protein eine Endonukleaseaktivität, wodurch die DNA an AP-Läsionen durch β - δ Elimination eingeschnitten wird. Das Fpg-Protein katalysiert auch den Einschnitt an 5'-Desoxyribose-Resten der DNA (**Boiteux 1993**).

- hOGG1 Protein

Das menschliche Ogg1-Gen ist lokalisiert auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 (3p26) (Bruner et al. 2000). Es besteht keine Sequenzhomologie zu dem bakteriellen Fpg-Protein und nur zu 33 % zum Hefe-OGG1 (Laval et al. 1998). Durch alternatives Spleissen der mRNA ergeben sich zwei Formen des hOGG1, die sich in ihrem carboxyterminalen Ende unterscheiden. Das α -hOGG1 besteht aus 345 Aminosäuren und hat eine Masse von 39 kDa, es ist im Kern lokalisiert. Das β -hOGG1 besteht aus 424 Aminosäuren und hat eine Masse von 47 kDa, es ist in den Mitochondrien lokalisiert. Beide Formen zeigen die gleiche katalytische Aktivität: sie erkennen und entfernen mit ihrer Glykosylase-Aktivität 8-oxoG und FAPY-Guanin aus der DNA und können mit ihrer β -Lyase-Aktivität die DNA einschneiden. Dabei ist die Aktivität an 8-oxoG/C-Paaren höher als an 8-oxoG/T- oder G-Paaren. 8-oxoG/A-Paare werden noch schlechter erkannt. Für die Substraterkennung wichtig ist das Helix-Haarnadel-Helix-Motiv, gefolgt von einer Glycin/Prolin-reichen Schleife mit einer konservierten Asparaginsäure (HhH-GPD-Motiv), das charakteristisch für das aktive Zentrum in der Superfamilie der Endonuklease III-artigen Enzyme ist. Dabei spielt im OGG1-Protein das Lys²⁴⁹ eine zentrale Rolle, das eine Schiff'sche Base zur modifizierten Base bei der Enzymreaktion als Intermediat mit seiner ϵ -Aminofunktion ausbildet und außerdem auch die Lyase der 3'-Phosphodiesterbindung katalysiert (Bruner et al. 2000).

- hNTH/hNTH1/Thymidinglykol-DNA-glykosylase

Das menschliche NTH1-Gen (16p 13.2-.3) kodiert für das homologe Enzym des E. coli Enzyms Endonuklease III (Endo III), die Thymidinglykol-DNA-Glykosylase, mit einer Größe von 60 kDa (Yu et al. 1999). Es besitzt das für die EndoIII-artigen Enzyme charakteristische HhH-GPD-Motiv (siehe hOGG1), das für die Enzymaktivität, und außerdem ein Eisen-Schwefel-Kluster ([4Fe-4S]²⁺), das für die Proteinfaltung entscheidend ist (Krokan et al. 1997). Neben der Glykosylase-Aktivität an Dihydropyrimidinen und Harnstoffderivaten werden auch AP-Läsionen auf ihrer 3'-Seite eingeschnitten (AP-Endonuklease-Funktion/ β -Lyase) (Laval et al. 1998, Memisoglu et al. 2000, Yu et al. 1999, Krokan et al. 1997).

- HAP1/APE1

Das menschliche Homolog HAP1 zu dem E. coli Enzym Exonuklease III (Exo III) hat eine Größe von 36 kDa (14q11.2-14q12) (Ronen & Glickman, Yu et al. 1999). Charakteristische Struktur ist eine 4fache α , β -Sandwichfaltung am aktiven Zentrum und ein zweiwertiges Magnesium-Ion (Mg²⁺). Das Enzym ist durch Metallchelatoren inaktivierbar, es wird konstitutiv exprimiert. Die Expression kann jedoch auch durch DNA-schädigende Agentien und reaktive Spezies induziert werden. HAP1 hat eine 5'-AP-Endonuklease- (Hauptfunktion) und eine 3'-Reparaturdiesterase-Funktion, die 3'-Phosphate, 3'-Phosphoglykolate und 3'- α , β -ungesättigte Aldehyde aus dem DNA-Strang entfernt (Mol et al. 2000). Außerdem ist HAP1 an der direkten Reparatur einiger „bulky“ exozyklischen Addukte beteiligt (Laval et al. 1998). Für die BER von Bedeutung ist, dass das Enzym die Uracil- und Thymin-DNA-Glykosylasen sowie OGG1 (Vidal et al. 2001) stimuliert bzw. nach der Entfernung der Base aus ihrer

Bindung mit der DNA verdrängt und die Endonuklease-Funktion übernimmt. HAP1 interagiert auch mit Pol β und stimuliert diese (Mol et al. 2000).

- DNA-Ligasen

Die Gene für die menschlichen DNA-Ligasen I-IV liegen auf verschiedenen Chromosomen. Gemeinsam ist ihnen der Aufbau der katalytischen Struktur, „core-region“, bestehend aus zwei antiparallelen β -Abschnitten, die von α -Helices und kleinen Schleifen umgeben sind. Bei der Enzymreaktion wird unter Verbrauch von einem Molekül ATP unter Abspaltung von Pyrophosphat ein kovalentes Enzym-AMP-Addukt über eine ϵ -Aminogruppe von Lysin ausgebildet. Die AMP-Gruppe wird dann auf den 5'-Phosphatrest der DNA-Lücke übertragen und schließlich unter Verschluss der DNA-Strangenden abgespalten. Der letzte Schritt ist im Falle der Ligase I von der katalytischen Funktion eines Histidinrestes des Enzyms abhängig. Die Unterschiede in der Proteinstruktur der Ligasen, die außerhalb der „core-region“ liegen, sind weitgehend unbekannt und für die unterschiedlichen Kontexte der Funktion der Ligasen verantwortlich (Timpson et al. 2000, Ronen & Glickman 2001).

- DNA-Ligase I (19q13.2-13.3; 58,2 kb; 102 kDa); beteiligt an Replikation, Verschluss von Okazaki-Fragmenten, dabei unter anderem Interaktion mit Pol δ und PCNA; beteiligt bei BER (siehe oben), dabei Interaktion mit Pol β ; über weitere Interaktionen mit Pol ϵ , PCNA und FEN-1 ist berichtet worden
- DNA-Ligase II geht wahrscheinlich durch Proteolyse aus Ligase III hervor, ihre Funktion ist bis dato ungeklärt
- DNA-Ligase III (17q11.2-12; 15,8 kb; LigIII α 103 kDa); beteiligt bei BER (siehe oben), dabei Interaktion mit XRCC1; beteiligt bei Einzelstrangbruchreparatur (siehe unten), dabei Interaktion mit XRCC1, Pol β und PARP; besitzt Zinkfinger-Struktur, ähnlich der von PARP, die die DNA-Lückenerkennung determiniert
- DNA-Ligase IV (13q33-34; 96,1 kDa); beteiligt bei Doppelstrangbruchreparatur durch „nicht-homologes“ Verschließen der DNA-Enden, dabei Interaktion mit XRCC4 wichtig

- Pol β

Das Gen für die menschliche Polymerase β (Pol β) ist auf Chromosom 8 lokalisiert (8p12-p11) (Ronen & Glickman 2001). Das Enzym (39 kDa) ist in zwei Domänen organisiert, eine 8 kDa aminoternale Domäne mit einer 5'-Phosphatgruppen-Erkennungsstelle, einer ssDNA-Bindungsstelle und Desoxyribosephosphat (dRP) - Lyase-Aktivität (β -Lyase) und eine 31 kDa carboxy-terminale Polymerasedomäne, die in drei Unterdomänen organisiert ist. (Wegen ihres Aufbaus ähnlich einer linken Hand werden diese als Handflächen-, Finger- und Daumendomäne bezeichnet). Die 8 kDa-Domäne ist aus 5 α -Helices zusammengesetzt und beinhaltet ein HhH-Motiv (siehe hOGG1) mit für die DNA-Bindung wichtigem Mg $^{2+}$ -Ion. Die Enzymreaktion verläuft über Ausbildung einer Schiff'schen Base zwischen dem Lys 72 und dem Zuckerrest, wobei noch 4 weitere Lysinreste und ein Arginin an der korrekten Positionierung des Substrates beteiligt sind. Für die Bindung der Polymerase-Domäne an einer Nukleotidlücke ist die 8 kDa-Domäne wichtig, deren HhH-Motiv und 5'-Phosphatgruppenbindung, sowie ein weiteres HhH-Motiv der Finger-

Unterdomäne, das auch ein Mg^{2+} -Ion komplexiert hat. Die beiden HhH-Motive binden die DNA auf beiden Seiten des Substrates, wobei die beiden Metallionen an der korrekten Positionierung des Substrates und an der Erleichterung der Phosphodiesterbindungsbildung des einzusetzenden Nukleotids beteiligt sind. Dabei sind ein Tyr²⁷¹, Asn²⁷⁹ und Arg²⁸³ an der Ausbildung der Bindungstasche für das „neue“ Nukleotid beteiligt, während Asp²⁷⁶ und Lys²⁸⁰ in van der Waals-Kontakt mit der hereinkommenden Base und der Template-Base stehen, wobei nur die Bindung des korrekten Nukleotids zur Konformationsänderung „induced fit“ des Proteins und optimaler Bindung an DNA-Template und Substrat führt.

Die Polymerase-Aktivität ist schneller als die dRP-Lyase-Aktivität, so dass meist zuerst ein Nukleotid eingesetzt wird, bevor die 5'-Phosphatgruppe geschnitten wird. Ist kein leichtes Entfernen der 5'-dRP-Gruppe möglich oder ist diese verändert, besteht die Möglichkeit für Pol β , mehrere Nukleotide einzufügen und mit FEN-1 zu kooperieren, wobei dann der überstehende DNA-Strang durch FEN-1 geschnitten wird (alternativer Weg der BER). Daneben sind Interaktionen mit DNA-Ligase I, HAP1 (*short-patch BER*) und XRCC1/Ligase III (*long-patch BER*) sowie PARP (Einzelstrangbruchreparatur) bekannt und für die Koordination der entsprechenden Enzymreaktionen wichtig. Die DNA-Polymerase β verfügt auch über eine AP-Lyase-Aktivität, jedoch ist diese 200fach weniger effizient als die Aktivität an schon vorbereiteten 5'-Desoxyribosephosphatenden.

Eine Rolle von Pol β bei der NER, DNA Replikation, Meiose und Rekombination wird angenommen (**Beard & Wilson 2000**).

1.5.2 Nukleotidexzisionsreparatur

Durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) werden überwiegend sogenannte „bulky-DNA-adducts“ repariert, die zu einer Helix-Distorsion führen. Dazu gehören Acetylaminofluoren-, Cisplatin- und Psoralen-Basenaddukte, Thymidindimere und (6-4)-Photoaddukte, jedoch können auch alle bisher bekannten kovalenten Basenmodifikationen durch die NER prozessiert werden. Der Reparaturprozess verläuft, wie die BER in vier Schritten: Schadenserkenkung/DNA-Strangaufwindung, zweimaliges Einschneiden des veränderten DNA-Strangs, Einfügen von Nukleotiden und Verschließen der DNA-Stränge. Das Hauptenzym, die Exinuklease, ist beim Menschen ein Komplex aus 16 Polypeptiden (bei *E. coli* sind es die 3 Enzyme des *uvrABC*-Systems). Dazu gehören 7 Peptide, bezeichnet mit XPA-XPG als Komplementationsgruppen der Xeroderma pigmentosum-Krankheit, die Replikationsfaktoren RFC und RPA (**siehe 1.5.1**), der Transkriptionsfaktor TFIIH, PCNA, ERCC1 und ERCC3 sowie Polymerase δ und ϵ und die DNA-Ligase. Ein Komplex aus RPA und XPC ist für die Schadenserkenkung verantwortlich, wonach ein grösserer Komplex gebildet wird, der mehrere Proteine beinhaltet und die DNA-Stränge im Bereich des geschädigten Abschnittes in einem ATP-abhängigen Prozess aufwindet. Durch ERCC1-XPF wird der 3'-Einschnitt und durch XPG der 5'-Einschnitt, von der Läsion aus gesehen, durchgeführt. Insgesamt wird ein 24-32 langes Oligonukleotid aus der DNA herausgeschnitten. Die Lücke wird von der 3'-Hydroxygruppe ausgehend durch die PCNA-abhängigen Polymerasen Pol δ

und ϵ aufgefüllt und durch die DNA-Ligase verschlossen (Yu et al. 1999). Ein vereinfachtes Schema der NER ist in **Abb. 1.21** dargestellt.

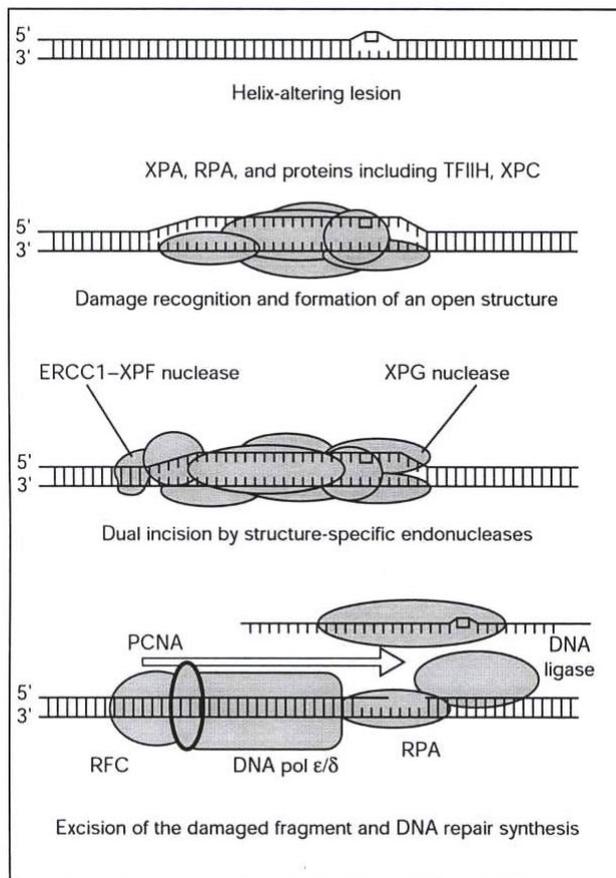


Abb. 1.21
Nukleotidexzisionsreparatur
in Säugern nach Lindahl et al.
(1997).

Eine Reihe von schweren Krankheiten, wie Xeroderma pigmentosum (XP), Cockayne's Syndrom (CS) und Trichothiodystrophy (TTD), sind auf einen Ausfall oder einen Defekt der Proteine des NER-Systems zurückzuführen. Dies führt im Falle der XP direkt zu einem erhöhten Krebsrisiko, erhöhter Lethalität und einer extremen Überempfindlichkeit gegenüber Sonnenlicht, während die Krankheiten CS und TTD zwar nicht durch eine erhöhte Krebsinzidenz, dafür aber durch schwere neurologische Störungen gekennzeichnet sind (Yu et al. 1999, Moustacchi 2000).

In aktiven Bereichen der DNA (transkribierten Bereichen) findet eine bevorzugte Reparatur statt, die sogenannte „preferential repair“. Hierbei interagieren die am Reparaturkomplex beteiligten Proteine mit den an der Transkription beteiligten. Man spricht daher auch von transkriptionsgekoppelter Reparatur (TCR). Die erwähnten CS-Proteine A und B sind beispielsweise an der TCR beteiligt (Lindahl et al. 1993).

1.5.3 Einzelstrangbruchreparatur

Einzelstrangbrüche können auf verschiedenen Wegen entstehen, direkt, durch Angriff von reaktiven Spezies an der DNA, spontan, durch Deaminierung, Depurinierung und Endonukleaseneinschnitt, im Zuge der durch Topoisomerase I katalysierten Reaktion oder indirekt im Zuge der BER (siehe 1.5.1.). Da Einzelstrangbrüche zu Doppelstrangbrüchen konvertieren können, die wiederum die Transkription inhibieren und zu Chromosomenaberrationen führen können, also zytotoxisch und mutagen sind, ist ihre Reparatur erforderlich. Die geringe Toxizität von Einzelstrangbrüchen im Vergleich zu Doppelstrangbrüchen wird auf ihre schnelle Reparatur zurückgeführt (Caldecott 2001).

Die Reparatur der indirekten Einzelstrangbrüche (SSB's), die während der BER entstehen, ist unter 1.5.1. beschrieben. Für direkt in die DNA eingefügte SSB's, die unter Zuckerfragmentierung auch mit der Abspaltung der Base einhergehen können, werden zwei Reparaturwege diskutiert. Die entstandene Lücke im DNA-Stang wird mit jeweils einem Nukleotid aufgefüllt und wieder verschlossen (*short patch*). In beiden Fällen nimmt man an, dass PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) als Sensor aktiviert wird und zuerst an den Einzelstrangbruch andockt. Dadurch wird XRCC1 sequestriert. 3'-Phosphoglykolat, 3'-Monophosphat oder 3'- α,β -ungesättigte Aldehyde als Strangbruchenden werden von APE1/HAP1 geschnitten, wonach die Reparatur mit Pol β /XRCC1/LigaseIII vollendet wird. „Normale“ 3'-Hydroxyl- oder 5'-Desoxyribose-Reste können direkt von Pol β prozessiert werden. Kürzlich wurde ein menschliches Homolog zum Phagen Protein T4, Polynukleotid Kinase (PNK), entdeckt, das eine 5'-DNA Kinase und eine 3'-DNA Phosphatase Aktivität besitzt, von dem man annimmt, dass es einige von HAP1 erkannte Strangbruchenden auch prozessieren kann. Diese Erkenntnisse werden unterstützt von Beobachtungen, dass Pol β mit PNK, HAP1 und XRCC1 und XRCC1 mit PARP, PNK, Pol β und Ligase III interagiert (Caldecott 2001).

1.6 Bedeutung reaktiver Spezies in der Krebsentstehung

Die Entstehung von Krebs verläuft in mehreren Schritten, daher kann es bis zur Ausbildung eines soliden Tumors bis zu zwanzig Jahre dauern. Man unterscheidet die Initiations-, Promotions- und Progressionsphase, wobei es in der Initiationsphase durch Mutationen zum Funktionsverlust bzw. zu einer Fehlfunktion der betroffenen Gene kommt, was schließlich zu der unkontrollierten Zellteilung der Promotionsphase führt, woran sich das Wachstum des Tumors, die Progressionsphase, anschließt.

Mutationen werden täglich in jeder normalen Zelle gebildet, jedoch ist die Häufigkeit dieses Ereignisses mit 10^{-10} Mutationen pro Nukleotid pro Zelle sehr gering. Erstaunlich ist daher, dass in Tumorgewebe eine Vielzahl von Mutationen gefunden wird. Die Bildung endogener Mutationen kann also nicht allein für die Entstehung von Krebs verantwortlich sein. So wird angenommen, dass es schon sehr

früh in der Tumorigenese zur Ausbildung eines sogenannten Mutatorphänotyps kommt, der die Entstehung weiterer Mutationen begünstigt (**Jackon & Loeb 2001**). Hierbei spielen reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS/RNS) wahrscheinlich eine entscheidende Rolle. So ist die chronisch erhöhte Generierung reaktiver Spezies, wie sie im Falle von Infektionen (**Ambs et al. 1999, Wilson et al. 1998, MacMicking et al. 1997, Fang et al.**) oder anderen Krankheiten (**Duchstein et al. 1999**), aber auch durch Umweltfaktoren, wie z. B. Rauchen auftritt, mit einem erhöhten Krebsrisiko assoziiert (**Tamir & Tannenbaum 1996, Jackon & Loeb 2001, Wiseman & Halliwell 1996, 1997, Ohshima & Bartsch 1994**). In der Anfangsphase kann es z. B. durch Mutationen in Genen der DNA-Reparatur, -Replikation oder der ROS/RNS entgiftenden Enzyme (SOD, GPx, Katalase) zu deren Funktionsverlust kommen, was zu einer erhöhten Mutationsrate (Mutatorphänotyp) führt, da sich die Zelle nicht mehr adäquat gegen die reaktiven Spezies schützen kann. Kommt es im Anschluss zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen oder zur Aktivierung von Onkogenen, wobei die Zellzykluskontrolle verloren geht, dann steht der Progression, dem unkontrollierten Wachstum der entarteten Zellen, nichts mehr entgegen (**Tamir & Tannenbaum 1996, Jackon & Loeb 2001**).

Beispiele für die Assoziation von Infektionen und chronischen Entzündungen mit der Krebsentstehung sind *Helicobacter pylori* mit Magenkrebs, *Hepatitis Viren* mit Leberkrebs, *Schistosoma haematobium* mit Blasenkrebs und Colitis ulcerosa wie auch Morbus Crohn mit Kolonkrebs. Bei den mit chronischen Entzündungen einhergehenden Zuständen kommt der Induktion der NOS-Synthese der Endothelzellen, Makrophagen und Neutrophilen mit der daraus resultierenden Generierung von ROS/RNS eine entscheidende Bedeutung zu (**Ohshima & Bartsch 1994, Wiseman & Halliwell 1996**).

Das Tumorsuppressorgen p53 und die Protoonkogene der *ras* Familie sind wichtige krebsassoziierte Gene (**Beckman & Ames 1997, Wiseman & Halliwell 1996**). In nicht-melanösen Hauttumoren hat man z. B. Mutationen in *Ki-ras* und *H-ras* gefunden und in Bronchialkarzinomen, hepatozellulären Karzinomen und kolorektalen Tumoren ein mutiertes p53-Gen (**Wiseman & Halliwell 1996**). Hierbei wurden im letztgenannten Fall vorwiegend GC→AT Transitionen, die wahrscheinlich durch Deaminierung von Cytosin entstanden sind, und für die beiden anderen p53-assoziierten Tumore vorwiegend GC→TA Transversionen, die möglicherweise durch 8-oxoG in der DNA verursacht sind, detektiert (**Wiseman & Halliwell 1996**).

1.7 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden über welchen Mechanismus bzw. welche Mechanismen Stickstoffmonoxid (NO) zur Entstehung von DNA-Schäden beitragen kann, unter welchen Bedingungen dies von Bedeutung ist und ob es zur Krebsentstehung beitragen kann. Die Analyse des kanzerogenen Potentials von Hydroxylradikalen und Peroxynitrit war eine weitere zentrale Fragestellung.

Hierzu sollte vergleichend untersucht werden, zu welchen DNA-Schäden und Mutationen Hydroxylradikale und Peroxynitrit führen, welcher Art die induzierten DNA-Modifikationen und Mutationen sind und in welchem Ausmaß sie induziert werden. Für die Untersuchungen wurde ein Transformationssystem, bestehend aus *E. coli* DT-2 und dem Plasmid SV2-*gpt* verwendet. Nach zellfreier Schädigung der DNA sollte ein Schadensprofil erstellt werden, und die nach Transformation detektierten Mutationen sollten anschließend mit den zugrundeliegenden DNA-Schäden korreliert werden. Hieraus sollten Aussagen über die Mutagenität von DNA-Modifikationen formuliert werden.

Mit Hilfe von Zellkultursystemen sollte der Einfluss von Stickstoffmonoxid (NO) auf die Gleichgewichtsspiegel, die Induzierbarkeit und die Reparatur oxidativer DNA-Schäden ermittelt werden. Hier standen Untersuchungen an NO-Synthase transfizierten Mausfibroblasten und den dazugehörigen Kontrollzellen im Mittelpunkt. Die parentale Zelllinie der beiden genannten Zelllinien diente dabei als zweite Kontrollzelllinie. Als weitere Endpunkte sollten die Effekte von NO auf die Zellproliferation, die Gleichgewichtsspiegel, die Induzierbarkeit von Mikrokernen und die intrazellulären Glutathionsspiegel untersucht werden. Eine wichtige Fragestellung war dabei, welche NO-Konzentrationen von den eingesetzten NOS-transfizierten Zellen *in vitro* gebildet werden und ob diese mit den physiologischerweise im Körper gebildeten vergleichbar sind. Um höhere NO-Konzentrationen nachzuahmen, die wie bekannt im Zuge chronischer Entzündungen und Infektionen eine Rolle spielen, wurde DPTA-NONOat eingesetzt, eine Verbindung, die NO zeitabhängig freisetzt.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Analysenwaage	AG 245, max. 210g (Mettler Toledo, Schweiz)
Autoklav	Tecnoclav 50 6.0, bzw. 2.0 (Fedegari Autoklav SPA, Albuzzo, Italien)
Bakterienschüttler	TH 25/SM25 Digi (Edmund Bühler, Bodelshausen)
Blotting Apparatur (semidry)	TransBlot® SD (BioRad, Hercules, CA, USA)
Brutschrank (Bakterien)	Kelvitron E, B6200 (Heraeus Instruments, Hanau)
Brutschränke (Zellkultur)	CO ₂ -Inkubator BB16, BB6060 O ₂ und Hera-Cell (Heraeus Instruments, Hanau)
Computer	Power Macintosh 8200/120 und 7200/90
Coulter Counter	Modell N Industry (Coulter Electronics, Luton, Großbritannien)
DNA-Gel-Vermessung	BioRad Gel Doc 1000 (BioRad, Hercules, CA, USA)
DNA-Gel-Auswertung	Molecular Analyst (V 2.1, 1995, BioRad, Hercules, CA, USA)
Distille	Destamat® (Heraeus, Hanau)
Elektrophorese-Apparatur (SDS-Gele)	BioRad, Hercules, CA, USA
Eppendorf Pipetten	Pipetman P 20, P 200, P 1000, P 5000, P 10000 (Gilson, Villiers-le-Bel, Frankreich)
Fluoreszenz-Mikroskop	mit Filter 46 63 01-9901 (Zeiss, Oberkochen) und Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim, mit Filtersystem
Fluorimeter	TKO 100, DNA Fluorimeter (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA)
Folienschweißgerät	Typ. 255 (Fa. Schott)
Fraktionssammler	MM 10, Neolab 4 mit Zeitnehmer SM 999 (Neolab, Heidelberg)
Gefrierschrank (-20°C)	KG 3666-23 (Liebherr)
Gefrierschrank (-70°C)	Colora UF 85-300 S (Colora, Lorch)
Gelapparatur für	Mechanikwerkstatt, Institut für Toxikologie, DNA-Agarosegele Universität Würzburg
Glassäule mit Fritte	BioRad, Hercules, CA, USA (für DNA-Filtration)

Halogenlampe, 1000 Watt	Osram SLG 1000-Studio (Osram, München) mit Flecta Halogen Mini-Brenner, 1000 Watt (Reflekta)
Heissluftsterilisator Heizblock	WTC Binder, Tuttlingen Thermoblock-Thermostat (Gebr. Liebisch, Bielefeld)
HPLC-Anlage (Steuerung) HPLC-Detektoren	Kontron Analytic (Kontron AG, Zürich, Schweiz) UV-Detektor : Kontron UV-Spektrophotometer Uvikon 730 LC (Kontron AG, Zürich, Schweiz) Elektrochemischer Detektor : Coulochem II mit Meßzelle : High Sensitivity Analytical Cell Model 5011 (ESA, Chelmsford, MA, USA)
HPLC-Mischkammer	M 800 (Kontron AG, Zürich, Schweiz)
HPLC-Probenaufgabesystem	Rheodyne 7125 (Cotati, Kalifornien, USA)
HPLC-Pumpe	HPLC Compact Pump, Modell 2250 (Bischoff, Leonberg)
HPLC-Säule	Prontosil 120-3, ODSAQ,SC-04 (125 x 4.0mm), 3.0µM Korngröße (Bischoff, Leonberg)
HPLC-Software	Power Chrom V2.0.2 (AD Instruments, Castle Hill, Australien)
HPLC-Vorsäule	PC ODS-Hypersil 0446 1805, 5µm (Bischoff, Leonberg)
Kamera	Leica DC 200 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim), Polaroid (Polaroid Corp., Cambridge, Mass., USA)
Kühlschränke Kryobehälter (Zellen)	KG 3666-32 (Liebherr) Flüssigstickstoffcontainer TW 750 RS (Taylor Wharton, Theodore, AL, USA)
Laboratoriumshomogenisator	Potter S (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen)
Lichtmikroskop Lichtintensmessgerät	Telaval 31 (Zeiss, Oberkochen) Luxmeter 110 (PRC Krochmann GmbH, Berlin) mit geeichtem Photoelement GaP
Lichttisch	Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg
Magnetrührer	Ikamag RET-G (Ika-Werk, Janke &Kunkel GmbH & Co KG, Staufen i. Br.)
Mikrowelle	Micromat 175 Z (AEG) und Dimension 4 (Panasonic Service, Wiesbaden)
Multipette Peristaltikpumpe	Eppendorf GmbH, Hamburg ISM 759 (20 Kanäle), (Ismatec Laboriumstechnik, mit Schläuchen Schweiz)

PH-Meter	pH 526, Multical (Wissenschaftlich-technische Werkstätten, Weilheim)
Pipettierhilfe	pipetus-akku (Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt)
Plattengießgerät	Tecnomat (Integra Biosciences AG, Wallisellen, Schweiz)
Rotoren für UZ	Ti 60, VTi 50 (Beckman Instruments, Palo Alto, Kalifornien, USA)
Schüttelbäder	heizbar bis 100°C (Köttermann GmbH & Co, Uetze-Hänigsen, Deutschland)
Spannungsgerät	Power PAC- 300 (BioRad, Hercules, CA, USA) (Western Blot)
Spannungsgerät (Protein-, DNA-Gele)	Power PAC- 3000 (Biorad, BioRad, Hercules, CA, USA)
Sterile Werkbank	Lamin Air® HB 2472 und HB 2448 (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
Thermostat für Haake W19 Tischschüttler	Haake D8 (Haake, Karlsruhe) GFL 3015 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel)
Trockenschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 (Bandelin Electronic, Berlin)
Ultraschallstab	Sonoplus Homogenisator HD 70 mit Sonotrode MS 73 und HF-Generator (Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen)
Ultrazentrifuge (UZ)	Optima LE-80K (Beckman Instruments, Palo Alto, Kalifornien, USA)
UV-B Lampe	Philips TL20W/12 RS (Philips Licht, Hamburg), in Fassung Regiolux ILF-k (Regiolux, Königsberg)
UV-Licht-Tisch (Gele)	Gel Doc 1000, Mini Transluminator (BioRad, Hercules, CA, USA)
UV/VIS Photometer	Ultraspec II, LKB-Biochrom (Biochrom-Cambridge, England)
Vortexer	Vortex Genie 2, Model G-560E (Scientific Industries, INC, Bohemia, N.Y., USA)
Waage	PB 3002, Delta Range, max. 3100g (Mettler Toledo, Schweiz)
Wasserbad (heizbar bis 100°C)	Köttermann Type 3042 (Köttermann GmbH & Co, Uetze-Hänigsen, Deutschland)
Wasserbad	Haake K, Haake LH mit Kältethermostat Haake F3 (Haake, Karlsruhe)
Wasserbad	Haake Fisons W19 (Haake, Karlsruhe)

Zentrifuge (Zellkultur)	Hettich Universal/K2S (Hettich, Tuttlingen) und Labofuge 400R (Heraeus, Hanau)
Zentrifugen	Mikro Rapid/K (Hettich, Tuttlingen), Biofuge 28RS (Heraeus Instruments GmbH, Osterode)
Zytozentrifuge	Cytospin 3 (Shandon, Astmoor, England)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Bakterienplatten	Greiner GmbH, Nürtingen
Blottingpapier (Westernblot)	Schleicher & Schuell, Dassel
Cellulosenitrat-Membran (Westernblot)	Protran Nitrocellulose, NC (Schleicher & Schuell, Dassel)
Deckgläschen	Knittel Gläser
Einmalspritzen (Plastik)	2ml PRIMO (Codan Medical ApS, Roedby, Dänemark) 5ml, 10ml Quadroject Plus (Dispomed WITT oHG, Gelnhausen-Hailer)
Eppendorf-Reaktionsgefäße	500µl, 1500µl, 2000µl (Eppendorf AG, Hamburg)
Filter (Alkalische Elution)	Polycarbonat-Membran, 2µm, Ø: 25mm Isopore™ (Millipore, Irland)
Filterhalter für die Alkalische Elution	Swinnex SX 2500 (Millipore, Holstein, Frankreich)
Filterpapier und Faltenfilter	Schleicher & Schüll, Dassel
Lochfilter	Shandon Filter Cards (Schleicher & Schüll, Dassel)
Fluoreszenzküvetten	Elkay Ultra-Vu (Elkay Products, Inc., Shrewsbury MA, USA); Hellma 105251-QS (Hellma GmbH, Mühlheim)
Glasgeräte	Schott Spezialglas GmbH, Mainz
Glaspipetten (Zellkultur)	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Impfschlingen	1µl, 10µl (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Kanülen, steril	21G x 1 ½, Nr.2 (Dispomed WITT oHG, Gelnhausen-Hailer)
Kryoröhrchen	Nunc Kryo, 1,5ml (A/S Nunc, Roskilde, Dänemark)
Kulturröhrchen	PP, steril (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Multipettenaufsätze	Combitips 50ml (Eppendorf AG, Hamburg)
Objektträger	geschnitten, mit Mattrand (Knittel Gläser)
Pasteurpipetten	Flint Glass (Chase Instruments Corp., Glen Falls, NY, USA)
Pipettenspitzen (Einweg)	Eppendorf AG, Hamburg

Plasmidisolierungs-Kit	QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN GmbH, Hilden)
Plasmidpräparations-Kit	Quiagen Plasmid Mega Kit (QIAGEN GmbH, Hilden)
Plastikspitzen (Einweg)	5ml, 10ml (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Plastiktubes, verschweißbar	Quick-Seal-Tubes (Beckman Instruments, Palo Alto, Kalifornien, USA)
Quecksilberdampf-Lampe für Fluoreszenzmikroskop	HBO Quecksilberdampf Kurzbogenlampe, (Osram, München)
Spritzen (Alkalische Elution)	20cc-Spritze, Luerlok (Becton Dickinson & Co., Rutherford, USA)
Sterilfilter	Porengröße 0.22µm (Schleicher & Schüll, Dassel)
Tropftrichter (für Mikrokernpräparation)	Shandon Cytoclip (Shandon, Pittsburg, USA)
Whatmanpapier (Westernblot)	(Schleicher & Schuell, Dassel)
Zellkulturflaschen	Greiner, Nürtingen
Zellkulturschalen	Outilux, Style 100x20mm (Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, USA)
Zellschaber (steril)	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Zentrifugenröhrchen (Plastik)	15ml, 50ml (Greiner, Nürtingen)
Zentrifugenröhrchen (Glas)	Gorex-Röhrchen, 15ml, 50ml (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)

2.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe (Rotiphorese Gel 30®)
Agarose (Typ I, low EEO)	Sigma Aldrich, Steinheim
Agarose Beads zur Gelfiltration	BioRad, Hercules, CA, USA (BIO-Gel:A-1,5m, 200-400mesh)
Aktivkohle	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Arginin	Sigma Aldrich, Steinheim
Bacto-Agar	Difco Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Frankreich
Bacto-Trypton (Pepton)	Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe

BCIP/NPT-Tabletten (SIGMA FAST™) (5-Brom-4-chlor-indolyl-phosphat/ Nitroblautetrazoliumsalsz)	Sigma Aldrich, Steinheim
Biorad-Farbstoffkonzentrat	BioRad, Hercules, CA, USA
Bisbenzimid (Hoechst Nr. 33258)	Sigma Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Tert.-Butylhydroperoxid (tBuOOH) (80%ige Lösung)	Sigma Aldrich, Steinheim
Caesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Calciumchlorid x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G,	Sigma Aldrich, Steinheim C.I. Nr. 42655
Dextran-Natriumsalz	Pharmacia Upjohn GmbH, Dänemark
Dipropylen-triamine-NONOat (DPTA-NONOat; 3,3'-[Hydroxy- nitrosohydrazino-]bis-1-propanamine)	Sigma Aldrich, Steinheim
Dithioerythritol	Sigma Aldrich, Steinheim
DL-Buthioninsulfoxim	Sigma Aldrich, Steinheim
DMEM Medium high Glucose	PAA, Cölbe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich, Steinheim
DTNB, Ellmann´s Reagenz (5,5´-Dithio-(2-nitrobenzoesäure))	Serva, Heidelberg
EDTA (Tetramethylethylendiamin)	Merck, Darmstadt
Eichlösungen Puffer (pH 5, 7, 8, 10, 11)	Sigma Aldrich, Steinheim
Eindeckmittel	EDL-2 (Linaris, Bettingen am Main)
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
D-Glucose x 1 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Glutathion (Glu-Cys-Gly)	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycerol	Sigma Aldrich, Steinheim
Griess-Ilosvays-Reagenz	Merck, Darmstadt
Guanosin (2´-Deoxyguanosine)	Sigma Aldrich, Steinheim
HAM´s F12-Medium	PAA, Cölbe
HAT (Hypoxanthin/Amino- pterin/ Thymidin)	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Hefeextrakt	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
HEPES- Puffer	PAA, Cölbe

4-HPT (4-Hydroxypyridon)	zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Dr. W. Adams
8-Hydroxyguanosin (2-Amino-6,8-dihydroxypurin)	Sigma Aldrich, Steinheim
Igepal CA-630 [tert-Octylphenoxy- poly(oxythylene)ethanol]	Sigma Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isoton -II-Lösung	Beckman Coulter, Krefeld
Kälberserum (fetales)	PAA, Cölbe
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Kaliumhydrogenphosphat x 3 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Methanol, Roti®solv (HPLC, Gradient grade)	Roth, Karlsruhe
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Sigma Aldrich, Steinheim
NADPH, Tetranatriumsalz	Boehringer, Mannheim
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumbutyrat	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat x 1 H ₂ O	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumnitrit	Sigma Aldrich, Steinheim
Nutrient broth	Difco Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Frankreich
PEG 3000 (Polyethylenglycol)	Merck, Darmstadt
PEG 6000 Serva, Heidelberg	
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAA, Cölbe
Phenol (Roti®-phenol)	Roth, Karlsruhe
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Sigma Aldrich, Steinheim

Proteinlängenstandard (SDS-7, Dalton Mark VII-L)	Sigma Aldrich, Steinheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Ro 19-8022 [R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H- benzo[a]chinolizin-1-yl)-carbonyl]- 2-pyrrolidin-methanol]	Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Salzsäure 25%, 37%	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure 96%	Merck, Darmstadt
SIN-1 (3-Morpholinonydnomin)	Sigma Aldrich, Steinheim
Tetraethylammoniumhydroxid (TEAH)	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	BioRad, Hercules, CA, USA
Thiamin HCl	Sigma Aldrich, Steinheim
6-Thioguanin (2-Amino-6-mercaptapurin)	Sigma Aldrich, Steinheim
Thymidin (1-[2-Deoxy- β -D-ribofuranosyl]-5-methyluracil)	Sigma Aldrich, Steinheim
Trichloressigsäure	Serva, Heidelberg
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan)	Sigma Aldrich, Steinheim
Tris-HCl	Sigma Aldrich, Steinheim
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim
Trockenmilchpulver	Neuform, Lüneburg
Trypanblau-Lösung 0,4%ig	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin /EDTA-Lösung	PAA, Cölbe
Wasserstoffperoxid	Sigma Aldrich, Steinheim

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden , soweit verfügbar, in p.a. - Qualität bestellt und verwendet.

Ro 19-8022 wurde freundlicherweise von Herrn Dr. E. Gocke von der Fa. Hoffmann-LaRoche AG (Basel, Schweiz) zur Verfügung gestellt.

2.1.4 DNA / Primer

- PM2 DNA: Größe : 10000 bp; DNA des Bakteriophagen PM2, Präparation nach **Salditt et al. (1972)** in Zusammenarbeit mit Ina Schulz, Mainz (siehe unter 2.2.1.).

- pSV2-*gpt*-Plasmid: Größe : 5200 bp; Präparation in Zusammenarbeit mit I. Schulz (siehe unter 2.2.2.).
- Kalbsthymus-DNA (Serva, Heidelberg)
- *rev 3* -Primer (Länge : 20 bp; 5'-CCAGAATACTTACTGGAAAC-3'); Firma GENTERprise™ (Gesellschaft für Genanalyse und Biotechnologie mbH, Mainz)

2.1.5 Antikörper

- Goat-anti-Mouse IgG, Alkaline Phosphatase Conjugate, Krikegaard & Perry Laboratories Inc, Gaithersburg, MD, USA
- Mouse Monoclonal Antibody, p53 Tumor Suppressor Protein Ab-3 (Clone BP53-12), gereinigt, Neomarkers Laboratory, Freemont, CA, USA

2.1.6 Enzyme

- Alkalische Phosphatase; EC 3.1.3.1, aus Rinder-Darmschleimhaut (Sigma Aldrich, Steinheim)
- DNase I; aus Rinder-Bauschspeicheldrüse (Sigma Aldrich, Steinheim)
- Phosphodiesterase II (Milz-Exonuklease, 3'-Exonuklease, *Spleen Exonuclease*); aus Rinder-Milz (Sigma Aldrich, Steinheim)
- Phosphodiesterase I (5'-Exonuklease, *Snake venom Exonuclease*); EC 3.1.4.1, aus *Crotalus Atrox* Schlangengift (Sigma Aldrich, Steinheim)
- Exonuklease III; aus *Escherichia coli* BE257/pSGR 3 (Boehringer, Mannheim; Sigma Aldrich, Steinheim)
- Endonuklease III; zur Verfügung gestellt von Serge Boiteux (Institute Gustave Roussy, Villejuif, Frankreich)
- Endonuklease IV; zur Verfügung gestellt von J. Levin und B. Demple (Harvard University Cambridge, USA)
- T4-Endonuklease V; aus *E. coli* A32480/DEN V, Präparation nach **Nakabeppu et al. (1982)**, modifiziert durch **Pflaum (1996)**, und hergestellt durch M. Pflaum (Mainz)
- Fpg-Protein (Formamidopyrimidin-Glycosylase); zur Verfügung gestellt von S. Boiteux (Institute Gustave Roussy, Villejuif, Frankreich), und hergestellt als Rohextrakt von O. Will und M. Pflaum nach **Boiteux et al. 1990**.
- Proteinase K, lyophilisiert; aus *Tritirachium album* (Roth, Karlsruhe)
- Glutathion-Reduktase (GR); aus Hefe, 600 U/ml (Boehringer Mannheim)
- Leupeptin, Trifluoroacetat-Salz; Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert (Sigma Aldrich, Steinheim)
- Antipain; Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert (Sigma Aldrich, Steinheim)

- Aprotinin; Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert (Sigma Aldrich, Steinheim)
- RNase A (Stammlösung 100 mg/ml); gelagert bei 4°C (QIAGEN GmbH, Hilden)

2.1.7 Zelllinien und Bakterienstämme

- B6 Mausfibroblasten, immortalisiert, Thymidinkinase negativ (*tk*⁻); zur Verfügung gestellt von M. Hentze, EMBL, Heidelberg
 - a) B6-Wildtyp-Zellen; (*tk*⁻) (parentale Zelllinie, „Wildtyp-Zellen“)
 - b) B6-Vector-only-Kontrollzellen; stabil transfiziert mit einem Vektor, der eine virale Thymidinkinase (*tk*⁺), und einem Vektor, der eine Luciferase enthält („B6-Vector-only-Zellen“, „B6-VO Zellen“, „Vector-only“)
 - c) B6-INOS-Zellen; stabil transfiziert mit einem Vektor, der eine virale Thymidinkinase (*tk*⁺), und einem Vektor, der eine Mausmakrophagen iNOS (induzierbare NO-Synthase, iNOS) enthält („B6-INOS“, „INOS“)
- *Escherichia coli* DT-2 (*gpt*⁻); zur Verfügung gestellt von Eugenia Dogliotti, Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien
- *Escherichia coli* “sure strain” (Träger des Plasmids pSV2-*gpt*, Ampicillin-resistent); zur Verfügung gestellt von William Caspary, Cancer Genetic Group, Laboratory of Environmental Carcinogenesis and Mutagenesis, Research Triangle Park, NC, USA
- *Alteromonas espejiana* BAL-31 (marine Bakterien, *Alteromonas*), vormals *Pseudomonas*, nach neuer Klassifizierung auch *Pseudoalteromonas*
- *Alteromonas espejiana*-Bakterien mit Phagen PM2

2.1.8 Lösungen, Puffer, Medien

2.1.8.1 Präparation der PM2-DNA

AMS (autoklaviert)		3,5 g KCl 7,5 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O 130 g NaCl ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest.}
BE1-Puffer (autoklaviert)	pH 7,5	100 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 1,0 mM Na ₂ EDTA

NTC-Puffer (autoklaviert)	pH 7,5	58,45 g NaCl 1,42 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O 2,54 g Tris/HCl 0,472 g Tris
Nutrient broth (autoklaviert)		8 g Nutrient broth ad 600 ml mit H ₂ O _{dest.}
MgSO ₄ -Lösung (autoklaviert)		60 g MgSO ₄ x 7 H ₂ O ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest.}
Nährmedium für <i>Alteromonas</i>		600 ml Nutrient broth 200 ml AMS 200 ml MgSO ₄ -Lösung (Lösungen werden nach dem Autoklavieren gemischt.)
Top-Agar (autoklaviert)		0,8 g Bacto-Trypton 0,5 g Bacto-Agar ad 60 ml mit H ₂ O _{dest.} 20 ml AMS 20 ml MgSO ₄ -Lösung (AMS und MgSO ₄ nach dem Autoklavieren zugeben.)
Fällungslösung		125 mM Natriumacetat in EtOH absolut

2.1.8.2 Präparation der pSV2-*gpt* DNA

Kulturmedium (LB-Medium; Luria-Bertani) (autoklaviert)	pH 7,0	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest.} (pH Einstellung mit NaOH)
Ampicillin-Stammlösung (sterilfiltriert)		100 mg/ml

Puffer P1 (Resuspensionspuffer)	pH 8,0	50 mM Tris/HCl 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A nach Zusatz der RNase A bei 4°C lagern
Puffer P2 (Lysepuffer)		200 mM NaOH 1% SDS
Puffer P3 (Neutralisationspuffer)	pH 5,5	3,0 M Kaliumacetat (pH Einstellung mit Eisessig)
QBT-Puffer (Equilibrierungspuffer)	pH 7,0	750 mM NaCl 50 mM MOPS 15% Isopropanol 0,15% Triton X-100
QC-Puffer (Waschpuffer)	pH 7,0	1,0 M NaCl 50 mM MOPS 15% Isopropanol
QF-Puffer (Elutionspuffer)	pH 8,5	1,25 mM NaCl 50 mM Tris/HCl 15% Isopropanol (pH Einstellung mit HCl)
BE1-Puffer	pH 7,5	100 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 1,0 mM Na ₂ EDTA

2.1.8.3 Modifikation / Enzyminkubation und Agarosegelelektrophorese der beiden Plasmide PM2 und pSV2-gpt

2.1.8.3.1 Modifikation

Phosphatpuffer (I _{1/2}); (autoklaviert)	pH 7,4	5 mM KH ₂ PO ₄ 50 mM NaCl
---	--------	--

BE1-Puffer (autoklaviert)	pH 7,5	100 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 1,0 mM Na ₂ EDTA
Fällungslösung		125 mM Natriumacetat in EtOH absolut
Ethanol 70%		70% Ethanol (v/v) in H ₂ O _{dest.}
SIN-1 Stammlösung		5 mM SIN-1 in I _{1/2} (entsprechend 1,033 mg/ml)
4-HPT Stammlösung		20 mM 4-HPT in I _{1/2} (entsprechend 2,54 mg/ml)
DPTA-NONOat Stammlösung		20 mM DPTA-NONOat in I _{1/2} (entsprechend 3,824 mg/ml)
BSA Stammlösung		4,0 mg/ml in H ₂ O _{dest.}

2.1.8.3.2 Enzyminkubation

BE1-Puffer (autoklaviert)	pH 7,5	100 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 1,0 mM Na ₂ EDTA
BE1(15)/BSA- Puffer (autoklaviert)	pH 7,5	20 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 1(15) mM Na ₂ EDTA 0,1 g/l BSA (BSA-Zusatz nach dem Autoklavieren)
TC-Puffer (autoklaviert)	pH 8,0	50 mM Tris/HCl 25 mM CaCl ₂ 0,1 g/l BSA (BSA-Zusatz nach dem Autoklavieren)
Stoppuffer	pH 7,8	40 mM Tris/HCl 5 mM Na-Acetat 21 mM EDTA 0,05 % Bromphenolblau 70 % Glycerin 4 % SDS

2.1.8.3.3 Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer (10fach) (Kammerpuffer)	pH 7,8	400 mM Tris/HCl 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA (pH Einstellung mit 2N H ₂ SO ₄)
--	--------	---

Ethidiumbromid-Stammlsg.		1 g/l H ₂ O _{dest.}
--------------------------	--	---

BE1-Puffer (autoklaviert)	pH 7,5	100 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 1,0 mM Na ₂ EDTA
------------------------------	--------	--

Stoppuffer	pH 7,8	40 mM Tris/HCl 5 mM Na-Acetat 21 mM EDTA 0,05 % Bromphenolblau 70 % Glycerin 4 % SDS
------------	--------	---

2.1.8.4 Plasmidtransformation**2.1.8.4.1 Herstellung kompetenter Bakterien**

Kulturmedium (LB-Medium; Luria-Bertani) (autoklaviert)	pH 7,0	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest.} (pH Einstellung mit NaOH)
---	--------	---

TSB-Puffer (Transformationspuffer) (sterilfiltriert)	pH 6,1	1 % Bacto-Trypton (m/v) 0,5 % Hefeextrakt (m/v) 1 % NaCl (m/v) 10 % PEG 3000 (m/v) 5 % DMSO (v/v) 20mM MgSO ₄ x 7 H ₂ O ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest.} (frisch hergestellt)
--	--------	--

2.1.8.4.2 Transformation

KCM-Puffer (5fach) (autoklaviert)	500 mM KCl 150 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 250 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (aliquotiert bei -20°C lagerbar)
LB-Platten	1000 ml LB-Medium (pH 7,0) 15 g Bacto-Agar (autoklavieren, auf 50°C temperieren und Platten gießen, ca. 20 ml/Platte)
M9-Salze (20fach) pH 7,0 (autoklaviert)	170 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 60 g KH_2PO_4 10 g NaCl 20 g NH_4Cl ad 1000 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ (pH Einstellung mit 10 N NaOH)
Ampicillin-Stammlösung (sterilfiltriert)	100 mg/ml in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$
6-Thioguanin-Stammlösung (sterilfiltriert)	10 mg/ml in 10 N NaOH
M9-Platten (Minimal-Salz-Platten)	15 g Bacto-Agar 0,1 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ ad 900 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$, autoklavieren, auf 50°C temperieren und zugeben: 50 ml M9-Salze (20fach, autoklaviert) 2 ml $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (1 M, autoklaviert) 15 ml Bacto-Trypton (100 g/l, autoklaviert) 4 ml Thiaminlösung (10 mg/ml, sterilfiltriert) 10 ml Glukoselösung 20 % (w/v) (autoklaviert) Platten gießen bei 50°C , ca. 20 ml/Platte

M9-Transformantenplatten	M9-Platten mit Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin (vor dem Ausplattieren zusetzen)
M9-Mutantenplatten	M9-Platten mit Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin 20 µg/ml 6-Thioguanin (vor dem Ausplattieren zusetzen)
Topagar (autoklaviert)	1 % Bacto-Agar (0,5 g/50 ml H ₂ O _{dest.})

2.1.8.4.3 Plasmidisolierung

LB-Medium (Luria-Bertani) (autoklaviert)	pH 7,0	10 g Bacto-Trypton 5 g Hefeextrakt 10 g NaCl 100 µg/ml Ampicillin 20 µg/ml 6-Thioguanin ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest.} (pH Einstellung mit NaOH)
Ampicillin-Stammlösung (sterilfiltriert)		100 mg/ml in H ₂ O _{dest.}
6-Thioguanin-Stammlösung (sterilfiltriert)		10 mg/ml in 10 N NaOH

Puffer P1, P2, N3, PB, PE Es werden die Puffer der Fima QIAGEN verwendet, die zur Plasmidisolierung im Kit QIAprep Spin Miniprep Kit geliefert werden. Da es sich bei der Zusammensetzung der Puffer um ein Firmengeheimnis handelt, kann sie hier leider nicht angegeben werden.

Puffer P1 Dem Puffer wird 100 µg/ml RNase A vor Verwendung zugesetzt, anschließend wird er bei 4°C gelagert.

2.1.8.5 HPLC-Analytik

TM-Puffer (autoklaviert)	pH 8,5	40 mM Tris/HCl 10 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O
HPLC-Laufpuffer (sterilfiltriert)	pH 5,5	50 mM NaH ₂ PO ₄ x 1 H ₂ O 10 % Methanol (v/v) Roti®solv (pH-Einstellung mit NaOH)
8-oxodG-Stammlösung		5 pmol/μl H ₂ O _{dest.}
dT-Stammlösung		1 nmol/μl H ₂ O _{dest.}
dG-Stammlösung		1 nmol/μl H ₂ O _{dest.}
DNase I (Desoxyribonuklease I)		5 U/μl H ₂ O _{dest.}
Phosphodiesterase II (Milz-Exonuklease)		0,5 mU/μl H ₂ O _{dest.}
Phosphodiesterase I (Schlangengift-Exonuklease)		5 mU/μl H ₂ O _{dest.}
Alkalische Phosphatase		500 mU/μl TM-Puffer

2.1.8.6 Puffer und Medien für die Zellkultur

PBSCMF (10fach) (autoklaviert)	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 2 g KH ₂ PO ₄ ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest.}
PBSCMF (autoklaviert)	10 % PBSCMF (10fach) (v/v) in H ₂ O _{dest.}
CaCl ₂ -Lsg. (autoklaviert)	1,35 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest.}

MgCl ₂ -Lsg. (autoklaviert)	1,0 g MgCl ₂ · 6 H ₂ O ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest.}
PBS (sterilfiltriert)	700 ml H ₂ O _{dest} 100 ml PBSCMF (10fach) 100 ml CaCl ₂ -Lsg. 100 ml MgCl ₂ -Lsg.
PBSG (sterilfiltriert)	1000 ml PBS 1,0 g Glucose
Trypsin/EDTA (1fach)	0,5 g/l Trypsin 0,2 g/l EDTA in PBS
HEPES-Puffer	1 M Hepes
HAT (50fach)	0,1 mM Hypoxanthin 0,4 μM Aminopterin 16 μM Thymidin
Kulturmedium für B6-Wildtyp-Zellen	DMEM high Glucose 10 % FCS 1 % Penicillin (P)/Streptomycin (S) (100 U/ml (P) / 100 μg/ml (S))
Kulturmedium für B6-Vector-only-Zellen und INOS-Zellen	DMEM high Glucose 10 % FCS 1 % Penicillin (P)/Streptomycin (S) 1fach HAT

2.1.8.7 Alkalische Elution

2.1.8.7.1 Filterelution der DNA

PBSCMF (10fach) (autoklaviert)	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 2 g KH ₂ PO ₄ ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest.}
-----------------------------------	---

PBSCMF (autoklaviert)		10 % PBSCMF (10fach) (v/v) in H ₂ O _{dest}
BE1-Puffer (autoklaviert)	pH 7,5	100 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 1 mM Na ₂ EDTA
BE1-Puffer (ohne EDTA) (autoklaviert)	pH 7,5	100 mM NaCl 20 mM Tris/HCl
BE1/BSA-Puffer (autoklaviert)	pH 7,5	20 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 1 mM Na ₂ EDTA 0,5 g/l BSA (BSA-Zusatz nach dem Autoklavieren)
BE15/BSA-Puffer modifiziert (autoklaviert)	pH 7,5	20 mM Tris/HCl 75 mM KCl 15 mM Na ₂ EDTA 0,5 g/l BSA (BSA-Zusatz nach dem Autoklavieren)
TC/BSA-Puffer (autoklaviert)	pH 8,0	50 mM Tris/HCl 25 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O 0,5 g/l BSA (BSA-Zusatz nach dem Autoklavieren)
Lysepuffer/ Proteinase K	pH 10,0	100 mM Glycin 20 mM Na ₂ EDTA 2 % SDS 400 mg/l Proteinase K
Waschpuffer (autoklaviert)	pH 10,0	20 mM Na ₂ EDTA

Elutionspuffer	pH 12,15	20 mM H ₄ EDTA (5,84 g H ₄ EDTA ad 950 ml mit H ₂ O _{dest.} ad 1000 ml mit TAEH) (pH-Einstellung mit TEAH)
----------------	----------	--

2.1.8.7.2 Fluorimetrische Bestimmung der DNA

DNA-Standardlösung		50 mg/l Kalbsthymus-DNA in BE1
Bisbenzimid-Stammlösung (Hoechst No. 33258)		0,15 mM in H ₂ O _{dest.} (Lagerung aliquotiert bei -20°C)
pH 6-Puffer / Phosphatpuffer I (autoklaviert)	pH 6,0	0,1 M Na-Phosphat
pH 7,2-Puffer (Phosphatpuffer II / Bisbenzimid) (autoklaviert)	pH 7,2	0,1 M Na-Phosphat 1 % (v/v) Bisbenzimid-Stamm- lösung (Zusatz der Bisbenzimid-Lösung nach dem Autoklavieren vor der Verwendung)

2.1.8.7.3 Schädigung der Zellen für die Alkalische Elution

Natriumbutyrat- Stammlösung		1 M in H ₂ O _{dest} (sterilfiltriert, Lagerung in 60 µl Aliquots bei -20°C)
Ro 19-8022- Stammlösung		40 µM in Ethanol absolut (Lagerung bei -20°C)
H ₂ O ₂ -Stammlösung		50 mM in H ₂ O _{dest} (sterilfiltriert, immer frisch hergestellt)
DPTA-NONOat Stammlösung		0,125 oder 0,25 mM in 10 mM NaOH (sterilfiltriert, immer frisch angesetzt)

SIN-1 Stammlösung 300 mM in PBSCMF
(sterilfiltriert, immer frisch angesetzt)

Tert.-Butylhydroperoxid Stammlösung 80 mM in DMEM high Glukose
(ohne FCS/PS Zusatz)

2.1.8.8 Nitritbestimmung

Nitrit-Stammlösung 10 mM NaNO_2 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

Kulturmedium für B6-Vector-only-Zellen und INOS-Zellen DMEM high Glucose
10 % FCS
1 % Penicillin/Streptomycin
1fach HAT

2.1.8.9 Glutathionbestimmung

TCA-Puffer 5 ml 20%ige Trichloressigsäure (m/v)
40 μl 0,5 M EDTA
2 ml 1 N HCl
ad 60 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

Phosphat/EDTA- pH 7,5 7,98 g Na_2HPO_4
Puffer 0,86 g NaH_2PO_4 (0,125 M Phosphat)
(autoklaviert) 1,18 g Na_2EDTA (6,3 mM EDTA)
ad 500 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$

Phosphat/NADPH-Lösung 0,3 mM Na_4NADPH
(13,3 mg Na_4NADPH in 50 ml
Phosphat/EDTA-Puffer)
(bei 4°C 3 Tage verwendbar)

DTNB-Reagenz 6 mM DTNB
(23,8 mg DTNB in 10 ml
Phosphat/EDTA-Puffer)
(bei 4°C 7 Tage verwendbar)

Glutathion-Standardlösung 20 mM GSH
(30,73 mg GSH in 5 ml
Phosphat/EDTA-Puffer)

Glutathion-Reduktase- Stammlösung	600 U/ml
--------------------------------------	----------

2.1.8.10 Mikrokerntest

Bisbenzimid-Stammlösung (Hoechst No. 33258)	0,15 mM in H ₂ O _{dest.} (Lagerung aliquotiert bei -20°C)
--	--

PBSCMF (10fach) (autoklaviert)	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 2 g KH ₂ PO ₄ ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest.}
-----------------------------------	---

PBSCMF/Bisbenzimid (autoklaviert)	10 % PBSCMF (10fach) (v/v) 5 µg/ml Bismenzimid in H ₂ O _{dest.} (Zusatz der Bisbenzimid-Lösung nach dem Autoklavieren vor der Verwendung)
--------------------------------------	---

2.1.8.11 SDS-Gel Elektrophorese und Färbung mit Coomassie

Farbreagenz zur Proteinbestimmung	Biorad-Farbstoffkonzentrat (Cat.-Nr. 500-0006, BioRad)
--------------------------------------	---

SDS-Auftragepuffer (2fach)	100 mM Tris/HCL, pH 6,8 4 % SDS (m/v) 0,2 % Bromphenolblau (m/v) 20 % Glycerin (v/v) 100 mM DTE (DTE wird erst unmittelbar vor Gebrauch zugesetzt.)
-------------------------------	---

Protein-Längenstandard	Sigma SDS-7 Dalton Mark VII-L für SDS-Gelelektrophorese, gelöst in 1fach SDS-Auftragepuffer 3,5 mg Proteine/1,5 ml (Lagerung aliquotiert bei -20°C)
------------------------	---

Tris-Puffer I	pH 8,8	1,5 M Tris (pH-Einstellung mit 5 M HCl)
---------------	--------	--

Tris-Puffer II	pH 6,8	1 M Tris (pH-Einstellung mit 25 %iger HCl)
Acrylamidmix		Rotiphorese Gel 30® 30%ige wässrige Acrylamid-Lösung mit 0,8 % Bisacrylamid
SDS-Lösung		10 % SDS (w/v) in H ₂ O _{dest}
Ammoniumpersulfat-Lösung		10 % (m/v) in H ₂ O _{dest} (bei 4°C 7 Tage verwendbar)
Kammerpuffer	pH 8,3	25 mM Tris 250 mM Glycin 0,1 % SDS (w/v)
Trenngel, 12%		2,5 ml H ₂ O _{dest} 3,0 ml Acrylamidmix 1,875 ml Tris-Puffer I (pH 8,6) 75 µl SDS-Lösung 3 µl TEMED 75 µl Ammoniumpersulfat-Lösung
Sammelgel		1,7 ml H ₂ O _{bidest} 425 µl Acrylamid/Bisacrylamid 315 µl Tris-Puffer II (pH 6,8) 25 µl SDS-Lösung 2,5 µl TEMED 25 µl Ammoniumpersulfat-Lösung
Färbelösung		500 mg Coomassie Brilliant Blue G 180 ml MeOH/H ₂ O (1:1; v/v) 20 ml Eisessig (Lösung vor Gebrauch filtriert)
Entfärbelösung		180 ml MeOH/H ₂ O (1:1; v/v) 20 ml Eisessig

2.1.8.12 Immunoblotting (Western Blot)

Transferpuffer (Tourbin) (autoklaviert)	pH 8,3	3,03 g Tris (25 mM) 14,44 g Glycin (192 mM) 20 % Methanol (v/v) ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest.}
TBS-T-Puffer	pH 7,6	1,21 g Tris 4,0 g NaCl ad 500 ml mit H ₂ O _{dest.} 0,5 ml Tween 20 (0,1 %) (pH-Einstellung mit konz. HCl) (Tween-Zugabe nach pH-Einstellung)
Ponceau-S-Färbepuffer		1 g Ponceau S 3 % TCA ad 500 ml mit H ₂ O _{dest.}
Magermilchsuspension		10 % Magermilchpulver (m/v) in TBS-T-Puffer
Lysepuffer für Zellen		150 mM NaCl 50 mM Tris/HCl 5 mM Na ₂ EDTA 1 % Igepal (v/v) 10 µg/ml Leupeptin 10 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Antipain (Die Proteinaseinhibitoren und das Igepal werden erst kurz vor der Verwendung zugesetzt.)

Falls nichts Abweichendes angegeben, wurden alle Puffer und Lösungen vor der Verwendung autoklaviert bzw. schon steril von den entsprechenden Firmen geliefert.

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation der PM2-DNA (Salditt et al. 1972)

Bei dem Phagen PM2 handelt es sich um einen lipidhaltigen DNA-Virus mit einem Genom von 10000 bp. Bakteriophagen sind Viren, die im allgemeinen dadurch gekennzeichnet sind, dass sie bestimmte Bakterien befallen, d. h. in diese eindringen, und ihren Wirt anschließend dazu bringen, die Phagen-DNA zu vermehren. Dies kann geschehen, indem die Phagen-DNA in das Bakteriengenom integriert wird oder während sie weiterhin in zirkulärer Form im Cytoplasma der Bakterienzelle vorliegt. Nach hinreichender Vermehrung der Phagen-DNA kann diese durch Zellyse, wobei die Wirtszelle zugrunde geht, oder durch Exocytose, wobei die Wirtszelle überlebt, freigesetzt werden. Der PM2-Phage ist speziell für die marinen Bakterien *Alteromonas espejiana* BAL-31 infektiös. Das Plasmid wird als extrachromosomal vorliegende DNA nach Infektion durch die Bakterien vermehrt und anschließend durch Zellyse ins Medium freigesetzt.

2.2.1.1 Herstellung des Phagenlysates

Am Vortag wird nachmittags eine Übernachtskultur angesetzt, indem 10 ml Nährmedium im Schikanekolben mit Bakterien beimpft werden und über Nacht bei 28°C und ca. 150 rpm im Schüttelinkubator geschüttelt werden. Am darauffolgenden Tag werden 3 ml Kultur mit 100 ml Nährmedium verdünnt, die OD_{600nm} wird regelmäßig überprüft und bei einer OD von 0,4 wird ein Cap (1ml) gefrorener *Alteromonas* + Phagen, die dazu schnell unter heißem fließenden Wasser aufgetaut werden, der Kultur zugegeben und weiter im Schüttler inkubiert. Die OD wird nun in regelmäßigen Abständen gemessen. Sie steigt zuerst noch an, fällt dann aber bis zu einer OD von ca. 0,1 – 0,3 als Zeichen der Bakterienlyse durch die Phagen ab. Nach vollständiger Bakterienlyse wird bei 10000 g und 4°C für 40 min. zentrifugiert, um unlysierte Bakterien abzutrennen. Der Überstand wird bei 4°C bis zur Verwendung aufbewahrt. Es ist zu beachten, dass die Aktivität der Phagen alle 7 Tage um ca. 30 % zurückgeht.

2.2.1.2 Herstellung der Agar-Platten

Der Nutrient broth Lösung werden vor dem Autoklavieren 10 g Bacto-Agar zugegeben, der den Platten ihre feste Konsistenz nach dem Abkühlen verleiht. In noch heißem Zustand wird wie unter 2.1.8.1. das Nährmedium gemischt und nach Temperierung auf 50°C im Wasserbad werden die Platten gegossen. Dazu werden entweder von Hand oder mit der Plattengießmaschine 20 ml pro Kulturschale pipettiert. Nach Auskühlen der Agarplatten über Nacht bei Raumtemperatur, um das Kondenswasser zu minimieren, können die fertigen Agarplatten bei 4°C maximal 10 Tage aufbewahrt werden bzw. stehen zur Verwendung bereit.

2.2.1.3 Bestimmung der Aktivität des Phagenlysates

Das Phagenlysat wird frisch abzentrifugiert (**siehe 2.2.1.1.**), und es werden Phagenverdünnungen bis 10^{-12} durch Zugabe von Nährmedium hergestellt (Bsp.: Verdünnung 10^{-2} bedeutet $10 \mu\text{l} + 990 \mu\text{l}$ Medium.) . Die Verdünnungen 10^{-7} bis 10^{-12} werden ausplattiert. Hierzu werden $200 \mu\text{l}$ einer frischen Übernachtskultur von *Alteromonas*-Bakterien mit $100 \mu\text{l}$ Phagenverdünnung gemischt und 30 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend werden 2 ml Topagar, der hierzu in der Mikrowelle verflüssigt und auf 50°C temperiert wurde, zu $100 \mu\text{l}$ Phagen-Bakterien-Mischung zugegeben, es wird gemischt und jeder Ansatz auf eine Agarplatte ausplattiert. Nach Abkühlung der Platten wird für 24 h im Brutschrank bei 28°C inkubiert. Durch Auszählung der Plaques wird die Aktivität des Phagenlysates nach **Gleichung 2.2.1** bestimmt.

$$(\text{Anzahl der Plaques}) \times 3 \times 10 \times \text{Verdünnung} = \text{Phagen} / \text{ml Phagenlysat} \quad (2.2.1)$$

Faktor 3 : Verdünnung der Phagen-Bakterien-Mischung 1 : 3

Faktor 10 : Korrektur auf 1 ml Volumen

2.2.1.4 Bakterienkultivierung und Aufreinigung des Plasmids PM2

Am Vortag wird eine Übernachtskultur von 500 ml Volumen (**siehe auch 2.2.1.1.**) mit *Alteromonas*-Bakterien hergestellt. Am Morgen des nächsten Tages werden $10 \times 1 \text{ l}$ Nährmedium mit je 40 ml Übernachtskultur beimpft und bei 28°C im Schüttelinkubator mit 150 rpm oder im Schüttelwasserbad inkubiert. Die OD 600 nm wird regelmäßig ermittelt und bei Erreichen einer OD von 0,6 werden 10^{10} Phagen des nochmals frisch zentrifugierten Phagenlysates (**siehe 2.2.1.1.**) zugegeben. Es wird weiter inkubiert und der Verlauf der OD verfolgt. Bei Erreichen einer OD von 1 wird 1 ml *Alteromonas*-Phagen abgenommen und mit $250 \mu\text{l}$ Glycerin in flüssigem Stickstoff schockgefroren; bei -70°C gelagert stehen sie für weitere Präparationen zur Verfügung. Nach vollständiger Bakterienlyse ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,1 - 0,2$) werden die Lysate auf zwei 5 l Erlenmeyerkolben verteilt. Pro Liter Lysat werden 43 g PEG 6000 zugegeben und nach vollständigem Auflösen 2,35 g Natrium-Dextransulfat pro Liter Lysat. Bei 4°C werden die Kolben in Schräglage 28–36 h stehen gelassen. Der Überstand/Medium wird entfernt und verworfen. Die roten Phagenrückstände werden vereinigt. Von jetzt an wird immer auf Eis gearbeitet, auch die verwendeten Geräte werden vorgekühlt, um eine Schädigung der Phagen-DNA zu vermeiden. Zum Entfernen des restlichen Mediums wird bei 4°C und 10000 g 25 min. zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die darunterliegende rosa-farbene Schicht und die Fraktion (Flüssigkeit und Pellet) darunter, die am phagenreichsten ist, werden aus allen Zentrifugenröhrchen zur weiteren Bearbeitung in je ein Becherglas überführt. Zu jeder der beiden Fraktionen wird die zweifache Menge an NTC-Puffer in Gramm dazugegeben und eine Suspension hergestellt. Anschließend wird bei 4°C und 18000 g 25 min. zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert oder, falls er noch trüb erscheint, also noch Phagen enthält, nochmals zentrifugiert. Die Pellets werden mit einem sterilen Spatel in den Potter überführt. Die Röhrchen werden mit 5 ml NTC-Puffer nachgespült, der dann auch in den Potter gegeben

wird. Es wird NTC-Puffer in den Potter dazugegeben, entsprechend 3 ml Puffer pro l Ausgangskultur. Bei maximaler Geschwindigkeit wird durch 8 – 10maliges Auf- und Abbewegen des Potterstabes homogenisiert. Das milchig trübe Homogenisat wird bei 4°C und 12000 g 20 min. zentrifugiert. Der Überstand, der die Phagen enthält, wird aufgefangen und der Rückstand nochmals nach Zugabe von 1,4 ml NTC-Puffer pro Liter Ausgangskultur im Potter homogenisiert. Die Suspension wird nochmals zentrifugiert und der Überstand mit dem ersten Überstand vereinigt. Die vereinigten Überstände werden in der Ultrazentrifuge bei 4°C und 23000 rpm 3 h zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert und verworfen. Das zurückbleibende Pellet (phagenhaltig) wird mit 3 ml NTC-Puffer bedeckt und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C in Schräglage aufbewahrt. Es wird auf 20 ml mit NTC-Puffer ergänzt und im Potter, wie oben beschrieben, homogenisiert. Pro ml werden 0,39 g CsCl zur Proteinausfällung eingewogen und gelöst. Zur Abtrennung der ausgefällten Proteine wird bei 4°C und 5000 rpm 10 min. zentrifugiert. Währenddessen werden 50 ml einer NTC-Puffer-CsCl-Lösung (Zugabe von 19,5 g CsCl zu 50 ml NTC-Puffer) der Dichte 1,28 g/ml hergestellt, die Lösung wird durch Zugabe von CsCl bzw. NTC-Puffer genau eingestellt. Nach der Zentrifugation wird der Überstand ebenfalls auf eine Dichte von 1,28 g/ml eingestellt. Die eingestellte phagenhaltige Lösung wird mit Hilfe einer Einwegspritze mit Kanüle in ein Quick-Seal Tube luftblasenfrei eingefüllt, mit der NTC/CsCl-Lösung aufgefüllt und die Lösung wird mit Paraffin überschichtet. Das Tube wird zugeschweißt und zusammen mit einem mit NTC/CsCl-gefüllten Ausgleichsröhrchen in den Rotor zur Horizontal-Gradientenzentrifugation eingestellt. Die Zentrifugation erfolgt in der UZ bei 4°C und 35000 rpm für mind 12 h über Nacht, dabei ist die Bremse ausgestellt. Nach der Zentrifugation ist die Phagenfraktion als opalfarbene Bande im Quick-Seal-Tube zu sehen. Diese Fraktion wird in 2 ml Caps aufgefangen. Zur weiteren Aufreinigung wird die Agarosesäule, die in BE1-Puffer mit 0,04% Natriumazid gelagert war, 6mal mit 10 ml BE1-Puffer gespült, die Tropfgeschwindigkeit sollte ca. 1-2 Tropfen pro Sekunde betragen. Anschließend wird die phagenhaltige Lösung in die Mitte der Säule aufgetragen und mit 3mal 10 ml BE1-Puffer eluiert. Es werden Fraktionen von 1-2 ml Größe aufgefangen. Die Agarosesäule wird wiederum mit 3mal 10 ml BE1-Puffer gespült und in Natriumazid-haltigem BE1-Puffer aufbewahrt. Die opalfärbten Fraktionen werden vereinigt. (Zur Überprüfung, ob eine aufgefangene Lösung DNA enthält, kann der Quotient der OD 260/280 nm, wie unter 2.2.1.5. beschrieben, bestimmt werden. Fraktionen, die einen Quotienten > 1,4 aufweisen, werden verwendet.) Als letzter Reinigungsschritt wird eine Phenolisierung der DNA durchgeführt. Hierzu werden die vereinigten Eluate mit dem gleichen Volumen Phenol, dem 10% 10%-ige SDS-Lösung zugesetzt wurde, gemischt, die Mischung wird in ein Gorex-Röhrchen überführt und bei 4°C und 10000 rpm für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wird nochmals mit dem gleichen Volumen reinen Phenols gemischt und wieder zentrifugiert. Zur Entfernung des Phenols wird der Überstand mit dem gleichen Volumen Chloroform gemischt und nochmals wie oben für 10 min. zentrifugiert. Jetzt wird die DNA nach Überführung des Überstandes in ein frisches Gorexröhrchen durch Zugabe des 2,5fachen Volumens Fällungslösung ausgefällt. Nach 60 min. Fällung bei 4°C wird 30 min. bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und das DNA-Pellet mit 3 – 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Es wird 15 – 30 min. bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert und der Ethanol möglichst rückstandsfrei entfernt. Die hochreine PM2-DNA wird in 1 ml BE1-Puffer gelöst. Nach 2.2.1.5. wird die Konzentration bestimmt.

2.2.1.5 Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der DNA

Die DNA-Lösung wird 1:50 bzw. 1:100 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ verdünnt und die Absorption bei 260 nm in einer Quarzküvette gegen $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gemessen. Für die Berechnung der Konzentration gilt bei einer Schichtdicke von 1 cm (Durchmesser der Küvette): $1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 50 \mu\text{g DNA /ml}$. Die Konzentration wird außerdem mit Hilfe eines Agarosegels, wie unter 2.2.4.4. beschrieben, überprüft. Die Messung des Quotienten aus $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ nm macht eine Aussage über die Reinheit der DNA. Der Quotient sollte zwischen 1,7 – 1,9 liegen, ansonsten ist eine nochmalige Reinigung der Präparation erforderlich.

2.2.2 Präparation der Plasmid-DNA pSV2-gpt

2.2.2.1 Bakterienkultivierung und Aufreinigung des Plasmids pSV2-gpt

Am Vorabend wird eine Übernachtskultur der Bakterien *E.coli* „sure strain“ (*amp^r*) angesetzt, indem 50 ml LB-Medium, dem 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin zugesetzt wurden, in einen Schikanekolben gefüllt und mit den Bakterien beimpft werden. Im Schüttelinkubator wird bei 37°C und ca. 200 rpm über Nacht inkubiert. Am Morgen des nächsten Tages wird die Kultur 1: 50 mit Ampicillinhaltigem LB-Medium verdünnt und im Schüttelinkubator bei 37°C und 150 rpm weiter inkubiert. Das Wachstum wird verfolgt, indem die optische Dichte bei 600 nm ($\text{OD}_{600\text{nm}}$) regelmäßig bestimmt wird gegen einen Vergleich von reinem LB-Medium. Nach Erreichen einer $\text{OD}_{600\text{nm}}$ von 1 (entsprechend einer Anzahl von 10^9 Bakterien/ml) werden die Zellen 15 min. bei 4°C und 6000 g zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und verworfen.

Die weitere Aufreinigung folgt den Vorgaben des QIAGEN Plasmidreinigungs-Handbuchs (01/97) für „low-copy“ Plasmide, da es sich bei dem Plasmid pSV2-gpt um ein „low-copy“ Plasmid handelt. Hierzu werden die Bakterienpellets in 100 ml Resuspensionspuffer (P1) resuspendiert. Zur Zellyse wird das gleiche Volumen Lysepuffer (P2) zugegeben, durch 5maligen „auf den Kopf“ drehen vorsichtig gemischt und 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Neutralisation wird wiederum das gleiche Volumen Neutralisationspuffer zugegeben, wie oben gemischt und 30 min. auf Eis inkubiert. Zur Trennung der Plasmide von chromosomaler DNA und festen Bakterienzellbestandteilen wird der Ansatz bei 4°C und 20000 g 30 min. zentrifugiert. Der Überstand wird nochmals zur vollständigen Abtrennung fester Partikel unter den gleichen Bedingungen 15 min. zentrifugiert. Der Überstand wird nun auf eine mit 35 ml QBT-Puffer equilibrierte QIAGEN-tip-2500 Säule langsam aufgetragen. Bei diesem Reinigungsschritt wird die Plasmid-DNA wegen niedriger NaCl-Konzentration am Säulenmaterial adsorbiert. Anschließend wird mit 4mal 50 ml QC-Puffer gewaschen und mit 50 ml QF-Puffer eluiert. Die DNA wird aus dem Eluat durch Zugabe von 0,7 Anteilen Isopropanol gefällt und 30 min. bei 4°C und 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wird abdekantiert und verworfen. Das Pellet wird mit 3 – 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen. Es folgt eine weitere Zentrifugation

bei 4°C und 15000 g für 15 min., wonach der Ethanol möglichst rückstandsfrei abpipettiert wird. Das DNA-Pellet wird für ca. 10 min. an Luft getrocknet und dann in 500 µl BE1-Puffer aufgenommen. Die Konzentration wird nach 2.2.2.2. bestimmt.

2.2.2.2 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentrationsbestimmung erfolgt wie unter 2.2.1.5. beschrieben.

2.2.3 Relaxationsassay zur Schadensanalyse an der PM2-DNA und dem pSV2-*gpt*-Plasmid (*in vitro*)

2.2.3.1 Prinzip

Die beiden Plasmiden PM2 und pSV2-*gpt* liegen natürlicherweise in einer superhelikalen Form vor. Wird nun ein Einzelstrangbruch (Unterbrechung des Zucker-Phosphat-Gerüsts der DNA) in das Plasmid eingeführt, führt dies zur Relaxation des Plasmids; es geht in die offen zirkuläre Form über. Ein Doppelstrangbruch würde zu einer Linearisierung der DNA führen (soll hier nicht als Fragestellung behandelt werden). Da sich die beiden DNA-Formen, also die superhelikale und die offen zirkuläre Form, in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld bei Agarosegel-Elektrophorese unterscheiden, lassen sie sich so auftrennen. Die Quantifizierung der DNA-Mengen wird anschließend mittels Fluoreszenzmessung durchgeführt. Natürlicherweise weisen die beiden Plasmide nur einen geringen Anteil an Einzelstrangbrüchen aus. Das Prinzip des Relaxationsassays ist in **Abb. 2.1** dargestellt.

Eine exogene Schädigung führt nun zu zusätzlichen Einzelstrangbrüchen und anderen Modifikationen der DNA. Durch Einsatz von bifunktionellen DNA-Reparaturenendonukleasen, die spezifische DNA-Modifikationen erkennen, mit ihrer Glycosylase-Funktion die modifizierte Base entfernen und mit ihrer AP-Endonuklease-Funktion einen Einzelstrangbruch in die DNA einführen, kann auf die Art und das Ausmaß der durch ein exogenes Agens induzierten DNA-Modifikationen geschlossen werden. Man erhält sogenannte DNA-Schadensprofile, die auch als Fingerabdruck der ultimal mit der DNA reagierenden Spezies bezeichnet werden.

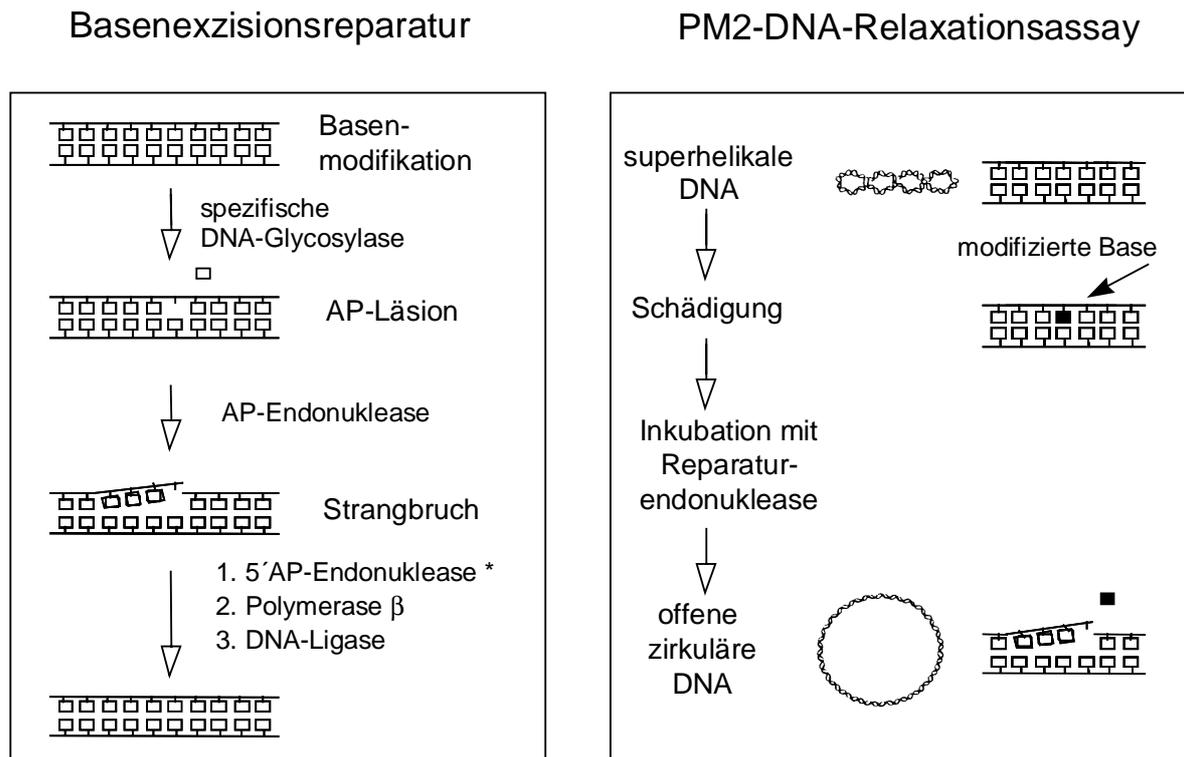


Abb. 2.1 Prinzip des Plasmid-Relaxationsassays (rechts) und *in vivo* Basenexzisionsreparatur (links), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von **Dr. M. Pflaum**, (geringfügig modifiziert).

* nur im Falle von monofunktionellen DNA-Glykosylasen (siehe 1.5.1).

2.2.3.2 Modifizierung der DNA (Schadensinduktion)

Die Modifizierung erfolgt in Phosphatpuffer (I $\frac{1}{2}$). Die Konzentration der DNA während der Schädigung beträgt 0,01 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und pro Probe werden 0,2 μg DNA benötigt. Wenn nichts anderes angegeben ist, wird auf Eis gearbeitet, um eine ungewollte Schädigung der DNA zu vermeiden. Nach der Schädigung, bzw. auch zu einer Probe ungeschädigter DNA als Kontrolle, wird die DNA durch Zugabe des 2,5fachen Volumens an Fällungslösung ausgefällt. Nach 30 min. Fällungszeit bei -20°C wird 30 min. bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen. Zur Abtrennung des Ethanols wird wiederum 30 min. bei 4°C und 12000 rpm zentrifugiert und der Überstand möglichst rückstandsfrei abpipettiert. Das DNA Pellet wird in BE1-Puffer entsprechend einer Konzentration von 0,2 $\mu\text{g}/20\mu\text{l}$ aufgenommen und steht zur weiteren Schadensanalyse bereit bzw. kann bei -20°C gelagert werden.

2.2.3.2.1 Schädigung der PM2-DNA und des Plasmids pSV2-gpt mit SIN-1

Dem Reaktionsansatz (DNA/Phosphatpuffer) wird SIN-1-Stammlösung (siehe 2.1.8.3.1.) bis zu Konzentrationen von 10-20 μM zugesetzt. Anschließend erfolgt die Schädigung durch Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 1 h. Zur Untersuchung der Bedeutung von SIN-1 in Bezug auf DNA-Schäden und Mutationen wird mit

50-500 μM SIN-1 geschädigt. Ein großer DNA-Ansatz wird geschädigt, der nach Ausfällung in 3 Teile aufgeteilt wird : einer für den PM2-Assay (2.2.3.3.), einer für die Transformation (2.2.4.) und einer für die HPLC-analytische Bestimmung von 8-oxodG (2.2.5.).

2.2.3.2.2 Schädigung der PM2-DNA mit SIN-1 in Gegenwart von BSA (bovinem Serumalbumin, Rinderserumalbumin)

Dem Reaktionsansatz (DNA/Phosphatpuffer) wird SIN-1-Stammlösung (siehe 2.1.8.3.1.) bis zu einer Konzentration von 20 μM zugesetzt, und außerdem noch BSA-Stammlösung (siehe 2.1.8.3.1.) bis zu Konzentrationen von 1-1000 $\mu\text{g/ml}$. Anschließend erfolgt die Schädigung wie unter 2.2.3.2.1. beschrieben.

2.2.3.2.3 Schädigung des Plasmids pSV2-gpt mit 4-HPT

Dem Reaktionsansatz (DNA/Phosphatpuffer) wird eine Stammlösung (siehe 2.1.8.3.1.) von 4-HPT bis zu Konzentrationen von 100-500 μM zugesetzt. Anschließend wird der Ansatz auf eine Tüpfelplatte (auf Eis) überführt und 20 min. bei 33 cm Abstand mit 1000 Watt, entsprechend einer Energiedosis von 450 kJ/m^2 , bestrahlt.

2.2.3.2.4 Schädigung der PM2-DNA mit DPTA-NONOat

Dem Reaktionsansatz (DNA/Phosphatpuffer) wird eine Stammlösung (siehe 2.1.8.3.1.) von DPTA-NONOat bis zu Konzentrationen von 1-10 mM zugesetzt. Anschließend wird der Ansatz im Wasserbad bei 37°C 3 h inkubiert.

2.2.3.3 Enzyminkubation

20 μl der DNA-Lösung aus 2.2.3.2. werden auf Eis mit 10 μl einer mit dem entsprechenden Puffer verdünnten Lösung von Reparaturenendonuklease vermischt. Die Art des Puffers und die Konzentration der Endonuklease richten sich nach deren Aktivität und Art und sind in nachfolgender **Tabelle 2.1** aufgeführt.

Die Enzyminkubation erfolgt im Wasserbad 30 min. bei 37°C. Zur Detektion von Einzelstrangbrüchen wird die DNA mit 10 μl BE1/BSA-Puffer inkubiert. Durch Zugabe von 10 μl Stopppuffer wird die Reaktion beendet.

Tabelle 2.1 Im Relaxationsassay verwendete Reparaturenendonukleasen mit Arbeitspuffer und Einsatzkonzentration

Enzym	Puffer	Stammkonzentration/ Vorverdünnung	Anwendungskonzentration
Fpg (bis V209)	BE ₁ / 0,1 mg BSA	4,9 mg / ml VV : 30 µg / ml	1 µg / ml
Fpg (ab V 209)	BE ₁ / 0,1 mg BSA	2,6 mg / ml VV : 30 µg / ml	1 µg / ml
Endo III	BE ₁ / 0,1 mg BSA	2,0 mg / ml VV : 20 µg / ml	30 oder 100 ng / ml
Endo IV	BE ₁ / 0,1 mg BSA	3,0 mg / ml (80000 U / mg) VV : 30 µg / ml	1 µg / ml
T ₄ E _v	BE ₁₅ / 0,1 mg BSA	50 µg / ml VV : wird nicht gebraucht	170 ng / ml
Exo III	TC/ 0,5 mg BSA	100 U / µl VV : 6000 U / ml	200 U / ml
OGG1	BE ₁ / 0,1 mg BSA	1,7 mg / ml VV : 30 µg / ml	1 µg / ml

2.2.3.4 Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung der superhelikalen, offen zirkulären und linearisierten DNA-Formen erfolgt mittels horizontaler Agarosegel-Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel. Hierzu werden 800 mg Agarose in 10 ml des 10fach TAE-Puffers, aufgefüllt mit 90 ml Wasser, in einem Erlenmeyerkolben unter Sieden bis zur vollständigen Auflösung erhitzt. Verdampftes Wasser wird ergänzt. Nach Abkühlung auf 60°C wird die Agaroselösung in eine vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach Aushärtung (ca. 30 min. bei Raumtemperatur) wird der Kammerpuffer zugesetzt.

In jede Tasche des Gels wird ein Reaktionsansatz (40 µl) aus 2.2.3.3. eingefüllt. Die elektrophoretische Trennung erfolgt bei 80 V innerhalb 90 min.. Anschließend wird das Gel zur Färbung in ein Ethidiumbromidbad (0,5 mg/ml H₂O) überführt und 1 h auf dem Tischschüttler gefärbt. Alternativ kann die Färbung auch über Nacht im Kühlschrank bei 4°C durchgeführt werden.

2.2.3.5 Auswertung

Nach erfolgter Färbung wird das Gel gewässert und auf einen UV-Licht-Tisch (302 nm) gelegt. Mit Hilfe einer CCD-Kamera, die mit dem Computer verbunden ist, wird mit einer Belichtungszeit von 10 Sekunden das Gel fotografiert und gespeichert. Die quantitative Bestimmung der Anteile der verschiedenen DNA-Formen erfolgt durch Integration der Fluoreszenzintensitäten der Banden in Abhängigkeit der Laufstrecke mit Hilfe des Bildanalysenprogramms Molecular Analyst®. Die Anzahl der Einzelstrangbrüche pro Plasmid kann nun mit der **Gleichung 2.2.2** berechnet werden (**Lloyd et al. 1978**). Hierbei wird angenommen, dass die Wahrscheinlichkeit des Ereignisses Einzelstrangbruch für alle Plasmidmoleküle gleich ist. Dass heißt, es wird eine Poissonverteilung zugrunde

gelegt, wobei auch berücksichtigt wird, dass ein zweiter Einzelstrangbruch in dem selben Molekül zu keiner weiteren Konformationsänderung führt. Außerdem wird für die unterschiedliche Interkalation des Ethidiumbromids in die verschiedenen DNA-Formen ein Korrekturfaktor berücksichtigt.

$$SSB_g = - \ln \frac{1,42 \cdot s}{1,42 \cdot s + r} \quad (2.2.2)$$

- SSB_g : Gesamtzahl der Einzelstrangbrüche
 1,42 : Korrekturfaktor für geringere Interkalation des Ethidiumbromids in die superhelikale DNA-Form
 s : Integral unter der Fläche der superhelikalen DNA
 r : Integral unter der Fläche der relaxierten/offen-zirkulären DNA

Um die Anzahl der durch die Inkubation mit den Reparaturenendonukleasen erhaltenen Einzelstrangbrüche zu erhalten, werden die direkten (durch das Agens induzierten) Einzelstrangbrüche, die in der Probe ermittelt wurden, die nur mit BE1/BSA-Puffer behandelt wurde, von der Anzahl der Brüche in den enzymbehandelten Proben nach **Gleichung 2.2.3** abgezogen.

$$ESS = SSB_g - SSB_d \quad (2.2.3)$$

- ESS : endonuklease-sensitive Läsionen
 SSB_d : direkte Einzelstrangbrüche

Ein Beispiel eines Agarosegels ist in **Abb. 2.2** zu sehen:

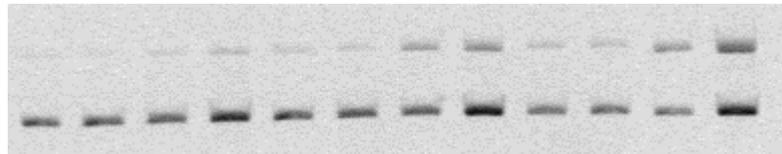


Abb. 2.2 Agarosegelbeispiel (PM2-DNA geschädigt mit 0-4 μM SIN-1, je Konzentration sind von links nach rechts Doppelbestimmungen von Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Modifikationen durchgeführt worden.)

2.2.4 Plasmidtransformation

2.2.4.1 Prinzip

Prinzip Als Transformation bezeichnet man im Allgemeinen die Aufnahme von DNA in höhere Zellen, wie z.B. Bakterienzellen und Säugetierzellen. Physiologischerweise wird nur äußerst selten DNA von Zellen aufgenommen. Die Häufigkeit kann jedoch erhöht werden, indem man Zellen unter besonderen Bedingungen mit gelöster DNA inkubiert. Als Beispiel seien hier die Elektroporation, die CaCl_2 -Methode (chemische/physikalische Methode) oder direkt die Mikroinjektion genannt. Durch die beiden erstgenannten Behandlungen werden die

Zellen in einen Zustand gebracht, in dem sie eine erhöhte Bereitschaft zeigen, z.B. Fremd-DNA, wie Plasmide, aufzunehmen. Diesen Zustand bezeichnet man als Kompetenz. Nach erfolgter Aufnahme wird entsprechend aufgebaute DNA dann vermehrt (Replikation, Transkription, Translation finden statt.) Unterscheiden sich die Bakterien, die DNA aufgenommen haben, durch die aufgenommene DNA determinierte Eigenschaften, können sie von nicht transformierten Bakterien durch Selektion unterschieden werden.

Bei Verwendung des Bakterienstamms *E.coli* DT-2 und des Plasmids pSV2-*gpt* ist es möglich, DNA-Schäden und deren mögliche Folgen, nämlich Mutationen, zu untersuchen (Ashman & Davidson 1984; Richardson et al. 1987; Palombo & Dogliotti 1989). Das Plasmid pSV2-*gpt* enthält zwei hierfür wichtige Genabschnitte. Der eine, *amp^r*, kodiert für eine β -Lactamase, die ein Wachstum auf Ampicillin-haltigen Agarplatten ermöglicht, was man sich bei der Selektion von Transformanten zu Nutze macht, und der zweite, *gpt*, kodiert für die bakterielle Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (XGPRT), ein Enzym des Reservestoffwechsels der Purinsynthese. Dieses Enzym hat normalerweise die Aufgabe, Xanthin oder Guanin mit 5-Phosphoribosyl-1-diphosphat (PRPP) unter Abspaltung von Diphosphat (PP) in Xanthin- bzw. Guanin- monophosphat (XMP bzw. GMP) umzusetzen, wobei XMP einen Precursor von GMP darstellt. Die Zusammenhänge sind in **Abb. 2.3** nochmals verdeutlicht.

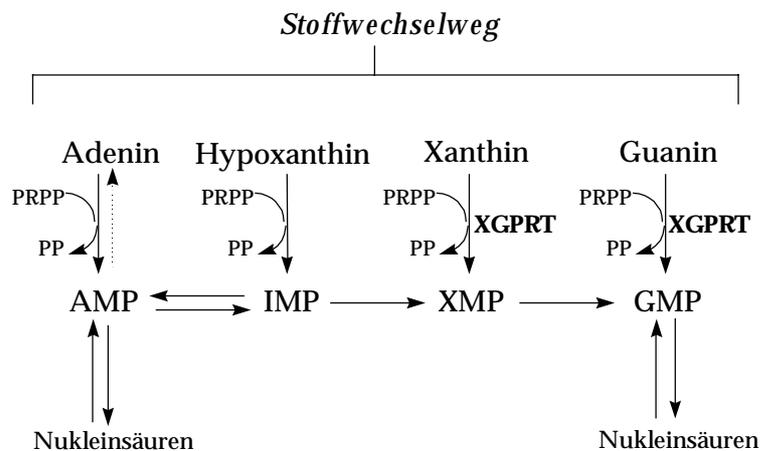


Abb. 2.3 Vereinfachte Darstellung des Purinstoffwechsels (nach Mulligan & Berg 1981). Senkrechte Pfeile kennzeichnen die Wiederverwertungsreaktionen.
AMP = Adenosin-monophosphat
IMP = Inosin-monophosphat

Das Enzym XGPRT ist auch in der Lage, das Purinanalogon 6-Thioguanin (tg) zum entsprechenden Monophosphat zu verstoffwechseln, was zu einer starken Behinderung der RNA-Synthese und damit der Proteinbiosynthese führt. Der hier verwendete *E.coli* DT-2 Stamm, der kein *gpt*-Gen besitzt (*gpt*⁻), deckt seinen Bedarf an Purinmonophosphaten über einen anderen Stoffwechselweg, die *de-novo*-Synthese. Er kann daher auf tg-haltigen Agarplatten wachsen. Hat nun eine Bakterienzelle dieses Stamms ein pSV2-*gpt*-Plasmid aufgenommen, kann man Transformanten am Wachstum auf amp-haltigen Agarplatten erkennen. Bei Aufnahme eines Plasmids mit

intaktem *gpt*-Gen wären die Bakterien nicht in der Lage, auf tg-haltigen Agarplatten zu wachsen. Schädigt man das Plasmid jedoch vor der Transformation und führt so DNA-Schäden ein, können aus diesen bei Replikation des Plasmids in den Bakterien Mutationen, als Fixierung des DNA-Schadens, entstehen. Hat eine Mutation im *gpt*-Gen stattgefunden, die zu einem Ausfall des Gens oder einem nicht funktionierenden Genprodukt führt, können diese Bakterien, man spricht von Mutanten, auf amp-/tg-haltigen Agarplatten wachsen (Tindall et al. 1984, 1986, 1989). Aus der Kolonienzahl von Bakterien auf amp- und amp-/tg-haltigen Agarplatten lassen sich Transformations- und Mutationsrate sowie Mutationsfrequenz berechnen.

Der Aufbau des bakteriellen pSV2-*gpt*-Plasmids ist in **Abb. 2.4** dargestellt.

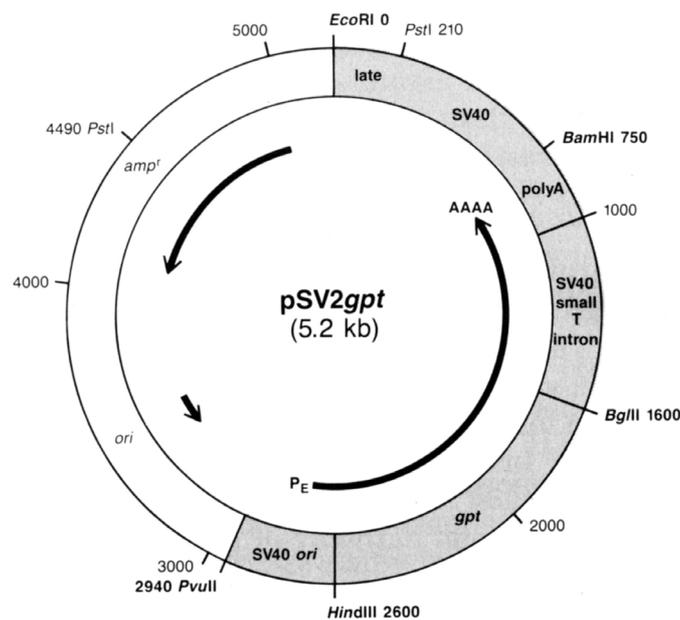


Abb. 2.4 Schematische Darstellung des Plasmids pSV2-*gpt*. Das *E. coli gpt*-Gen steht unter Kontrolle des starken SV40 Promotors, lokalisiert im SV40 Origin (SV40 *ori*), dem SV40 small T Intron und der SV40 Polyadenylierungsstelle (polyA, AAAA) (Sambrook et al. 1989a).

2.2.4.2 Präparation kompetenter Bakterien

Am Tag vorher wird eine Übernachtskultur angesetzt, indem 50 ml LB-Medium mit Bakterien *E. coli* DT-2 (*gpt*) beimpft werden und über Nacht bei ca. 150 rpm und 37°C im Schüttelinkubator inkubiert werden. Am Morgen des darauffolgenden Tages wird der Ansatz 1 : 10 mit LB-Medium verdünnt und weiter inkubiert. Zur Kontrolle des Wachstums wird die optische Dichte OD_{600nm} bestimmt. Bei Erreichen einer OD von ca. 0,4 (die Bakterien befinden sich nun in der Phase exponentiellen Wachstums) wird die Bakteriensuspension 10 min. bei 4°C und 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand wird abdekantiert und das Pellet wird vorsichtig in 25 ml kaltem TSB-Puffer, dem 15% Glycerin zugesetzt wurde, auf Eis resuspendiert. Anschließend wird die Suspension zu 200-1000 µl Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.2.4.3 Herstellung der Agar-Platten

Die Herstellung erfolgt wie unter 2.2.1.2. beschrieben, jedoch werden hier dem Medium 15 g Bacto-Agar zur Verleihung der festen Konsistenz nach dem Abkühlen zugegeben. Für dieses Testsystem werden drei verschiedene Plattenarten benötigt: LB-Platten für die Überprüfung der Kompetenz, M9-Transformantenplatten (mit Zusatz von Ampicillin) zur Ermittlung der Transformationsrate und M9-Mutantenplatten (mit Zusatz von Ampicillin und Thioguanin) zur Ermittlung der Mutationrate. Die genaue Angabe der Bestandteile ist unter 2.1.8.4.2. aufgeführt.

2.2.4.4 Modifizierung des Plasmids pSV2-gpt

Die Modifizierung erfolgt mit SIN-1-Konzentrationen von 50-500µM wie unter 2.2.3.2. und 2.2.3.2.1. beschrieben. Nach Ausfällung wird im Unterschied zu 2.2.3.2. das DNA-Pellet in BE1-Puffer zu einer Konzentration von 1 µg/20ml aufgenommen. Die genaue DNA-Konzentration wird bestimmt, indem 20 µl DNA-Lösung entsprechend ca. 0,2 µg/20µl DNA mit 10 µl Stoppuffer auf ein Agarosegel gegen einen Standard von 0,2 µg DNA aufgetragen werden. Durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten kann nach Färbung mit Ethidiumbromid (siehe auch 2.2.3.4.) die Konzentration der Probe berechnet werden.

Zur Untersuchung von 4-HPT in Bezug auf DNA-Schäden und Mutationen wird mit 100µM und 1-12mal mit 200µM 4-HPT geschädigt (2.2.3.2.3.), ohne die DNA dazwischen auszufällen. Nach Ausfällung wird, wie für SIN-1 beschrieben, verfahren. Ein großer DNA-Ansatz wird geschädigt, der in 3 Teile aufgeteilt wird: einer ist für die Analyse im PM2-Assay (2.2.3.3.), einer für die Transformation (2.2.4.) und einer für die HPLC-analytische Bestimmung von 8-oxodG (2.2.5.) vorgesehen.

Alle für die Transformation und HPLC eingesetzten Konzentrationen der Agentien werden auch im PM2-Assay untersucht, zur Kontrolle, um sicher zu stellen, dass sie wirklich oberhalb der Detektionsgrenze liegen.

2.2.4.5 Transformation

Die benötigte Menge kompetenter Bakterien aus 2.2.4.4. wird 1 h auf Eis aufgetaut. Vor der Verwendung werden die Bakteriensuspensionen vereinigt. Für jede Probe wird eine 3fach Bestimmung durchgeführt. In folgender Reihenfolge werden in ein 2 ml Reaktionsgefäß pipettiert, 20 µl 5fach KCM-Puffer, 70 µl H₂O_{dest.}, 10 ml der gewünschten DNA-Lösung und 100 µl kompetente Bakterien. Es wird für 20 min. auf Eis und für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Dem Ansatz wird 1 ml auf 37°C vorgewärmtes LB-Medium zugesetzt und bei 37°C und 200 rpm im Schüttelinkubator geschüttelt. Hierbei erfolgt die Expression des Amp-Gens, das für eine β-Lactamase codiert.

Die eingesetzte DNA kann modifiziert oder unmodifiziert sein. Die Menge sollte mind. 100 pg, besser 1-10 ng/10µl, betragen. Die optimale Konzentration richtet sich nach der Kompetenz der Bakterien. Siehe hierzu auch 2.2.4.6..

2.2.4.6 Überprüfung der Kompetenz/Überlebensrate

Die Transformation wird, wie unter 2.2.4.5. beschrieben, mit drei verschiedenen Plasmidkonzentrationen durchgeführt: 1 ng/10µl ; 10 ng/10µl ; 100 ng/10µl. Je 50 µl werden auf LB-Platten (ohne amp) nach Zugabe von 2 ml LB-Topagargemisch (1 : 1), das auf 50°C temperiert wurde, ausplattiert (**siehe auch 2.2.4.8.**). Nach Inkubation im Brutschrank bei 37°C für 24 h werden die Kolonien pro Platte ausgezählt, bzw. diejenige Konzentration der DNA, die zu den meisten Kolonien geführt hat, wird bei dieser Bakteriencharge für die Transformation, gleichgültig ob geschädigtes oder ungeschädigtes Plasmid transformiert wird, verwendet.

2.2.4.7 Überprüfung der Transformationsausbeute

Die Transformationsausbeute gibt an, wieviele Bakterien die Behandlung überlebt, ein Plasmid aufgenommen haben und das Amp-Gen erfolgreich exprimieren. Die Transformation wird, wie unter 2.2.4.5. beschrieben, mit derjenigen DNA-Konzentration (ungeschädigte DNA) durchgeführt, die nach 2.2.4.6. als die geeignetste bestimmt wurde. Vor dem Ausplattieren wird eine Verdünnungsreihe der transformierten Bakterien von 10⁻² bis 10⁻⁸ hergestellt, indem mit 37°C-warmem LB-Medium verdünnt wird. Beispiel : 10 µl Ansatz + 990 µl LB-Medium entsprechen einer Verdünnung von 10⁻². Je 50 µl des Ansatzes werden mit 2 ml auf 50°C temperiertem LB-Topagargemisch (1 : 1) sowohl auf LB-Platten als auch auf M9-Transformantenplatten (amp-haltig) ausplattiert. Nach 24stündiger Inkubation im Brutschrank bei 37°C werden die Kolonien auf den Platten ausgezählt, meist ist auf den LB-Platten nur eine Verdünnung zählbar. Die Transformationsausbeute ergibt sich aus nachstehender **Gleichung 2.2.4**, wobei die Platten gleicher Verdünnung miteinander ins Verhältnis gesetzt werden:

$$K_T / (K_{LB} \times \text{Verdünnung}) = \text{Anteil an Bakterien, die Transformation überlebt haben und das Amp-Gen erfolgreich exprimieren.} \quad (2.2.4)$$

K_T : Anzahl der Kolonien auf M9-Transformantenplatten
 K_{LB} : Anzahl der Kolonien auf LB-Platten

2.2.4.8 Ausplattierung der transformierten Bakterien und Auswertung

50 µl des Ansatzes aus 2.2.4.5. werden in eine 2 ml Cap überführt und mit 2 ml eines 1:1-Gemisch aus LB-Medium und Topagar auf M9-Transformantenplatten ausplattiert. Hierzu wird der Topagar in der Mikrowelle gelöst, mit dem gleichen Volumen LB-Medium gemischt und Ampicillin-Stammlösung wird bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml zugesetzt. Das fertige Gemisch wird im Wasserbad auf 50°C temperiert. Je 1 ml jedes Ansatzes wird in ein 5 ml Kulturröhrchen überführt und nach Zugabe von 2 ml LB-Topagargemisch, das sowohl amp als auch tg enthält, auf M9-Transformantenplatten ausplattiert. Die Platten werden nach Abkühlung 24 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Kolonien werden ausgezählt.

Die Transformationsrate ergibt sich aus **Gleichung 2.2.5**.

$$K_T / 50 \times 1200 \times 100 = \text{transformierte Bakterien} / \mu\text{g Plasmid} \quad (2.2.5)$$

K_T : Anzahl der Kolonien auf M9-Transformantenplatten
 50×1200 : Korrektur auf Ausgangsvolumen des Ansatzes
 100 : Umrechnung auf μg (bei Transformation mit 10 ng)

Die Mutationsrate ergibt sich aus **Gleichung 2.2.6**.

$$K_M / 1000 \times 1200 \times 100 = \text{transformierte Bakterien} / \mu\text{g Plasmid} \quad (2.2.6)$$

K_M : Anzahl der Kolonien auf M9-Mutantenplatten
 1000×1200 : Korrektur auf Ausgangsvolumen des Ansatzes
 100 : Umrechnung auf μg (bei Transformation mit 10 ng)

Die Mutationsfrequenz wird gemäß **Gleichung 2.2.7** berechnet:

$$\text{Mutationsrate} / \text{Transformationsrate} = \text{Mutationsfrequenz} \quad (2.2.7)$$

2.2.4.9 Picken von Mutanten und Kryokonservierung der Bakterien

Mutanten von Platten mit einer Mutationsfrequenz, die mind. 5fach über dem Untergrund liegt, werden gepickt (jedoch von jeder Platte nur eine Mutante) und auf einer M9-Mutantenplatte ausgestrichen. Es wird 24 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. 10 ml Nährmedium (amp/tg-haltig) wird mit einer einzelnen Kolonie beimpft und über Nacht bei 37°C und 150 rpm im Schüttelinkubator geschüttelt. Aus der dicht gewachsenen Bakteriensuspension wird direkt das Plasmid nach **2.2.4.11** isoliert. Alternativ kann ein 1 ml Aliquot nach Zusatz von 20% Glycerin in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -70°C gelagert werden.

2.2.4.10 Plasmidisolierung

Die Isolierung der Plasmide erfolgt mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits® (QIAGEN GmbH, Hilden) nach Vorschrift des Handbuchs QIAprep Miniprep (QIAGEN, 03/01). Von einer Übernachtskultur der Mutanten in 10 ml LB-Medium mit amp-/tg-Zusatz werden 2mal 1,8 ml bei 13000 rpm 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und verworfen. Das Bakterienpellet wird in 250 μl Puffer P1 vollständig resuspendiert, anschließend werden 250 μl Puffer P2 zugegeben und durch 5maliges Umdrehen bei verschlossenem Deckel gemischt. Man wartet einige Zeit, jedoch nicht länger als 5 min., während die modifizierte alkalische Lyse (**Birnboim & Doly 1979**) stattfindet, und gibt dann 250 μl Puffer N3 dazu, wobei der Ansatz wieder durch 5maliges Umdrehen gemischt wird. Es wird 10 min. bei 13000 rpm zur Trennung von chromosomaler DNA und Bakterienbruchstücken zentrifugiert. Der Überstand wird auf eine QIAprep-Säule pipettiert, die in ein 2 ml Cap eingehängt wurde. Es wird 1 min. zentrifugiert bei 13000 rpm, wobei

Adsorption der Plasmid-DNA an das Silika-Säulenmaterial in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen stattfindet (Vogelstein & Gillespie 1979). Das Eluat wird verworfen, und die adsorbierte DNA durch Zugabe von 0,5 ml PB-Puffer und 0,75 ml PE-Puffer gewaschen, wobei nach jedem Waschpuffer für 1 min. bei 13000 rpm zentrifugiert wird. Die Eluate werden verworfen. Vor der Elution wird die beladene Säule in ein frisches steriles Cap eingesetzt. Mit 30 µl H₂O_{dest.} wird des Plasmid dann durch Zentrifugation für 1 min. bei 13000 rpm eluiert. Die DNA-Konzentration wird bestimmt, indem zu 5 µl DNA-Lösung 15 µl H₂O_{dest.} und 10 µl Stoppuffer zugegeben und auf ein Agarosegel gegen einen Standard von 0,2 µg DNA aufgetragen werden. Durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten kann nach Färbung mit Ethidiumbromid (siehe auch 2.2.3.4.) die Konzentration der Probe berechnet werden.

2.2.4.11 DNA-Sequenzanalyse

Die nach 2.2.4.11. isolierten Mutantenplasmide werden von der Firma GENterprise™ (Gesellschaft für Genanalyse und Biotechnologie mbH, Mainz) mittels vier mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Didesoxynucleotiden (Dye-Terminator™) in Kombination mit Desoxynucleotid-triphosphaten (dNTP's) und dem *rev-3* Primer (5'-CCAGAATACTTACTGGAAAC-3') mit Startposition 539 (vom Startcodon des *gpt*-Gens gezählt) über eine Länge von 459 bp sequenziert. Durch Vergleich der so ermittelten Sequenzen lassen sich Aussagen über die Art und die Lage der Mutation im *gpt*-Gen machen.

2.2.5 HPLC-Analyse

2.2.5.1 Schädigung des Plasmids pSV2-*gpt* mit SIN-1 bzw. 4-HPT

Die Modifizierung erfolgt wie unter 2.2.3.2., 2.2.3.2.1. und 2.2.4.4. beschrieben. Nach Ausfällung wird im Unterschied zu 2.2.3.2. das DNA-Pellet (entsprechend ca. 8 µg Gesamt-DNA-Menge) in 200 µl TM-Puffer aufgenommen. Die Proben können bis zur HPLC-analytischen Untersuchung bei -20°C gelagert werden.

2.2.5.2 Enzymatische DNA-Totalhydrolyse

Die in TC-Puffer gelöste DNA wird mit DNase I (10 U/50µg DNA), Phosphodiesterase II (Milzexonuklease, 0,5 mU/50µg DNA), Phosphodiesterase I (Schlangengift-Exonuklease, 25 mU/50µg DNA) und alkalischer Phosphatase (500 mU/50µg DNA) für 2 h im Wasserbad bei 37°C hydrolysiert (Richter et al. 1988). Hierbei werden von der DNase I, einer Desoxyribonukleat 5'-oligonukleotido-hydrolase als Endonuklease, 5'-Phosphodiester-Bindungen der DNA hydrolysiert. Die Schlangengiftexonuklease ist eine 5'-Exonuklease, auch als Oligonukleat 5'-Nukleotidohydrolase bezeichnet, im Gegensatz zur Milzexonuklease, die als 3'-Exonuklease 3'-Phosphatenden zu 3'-Mononukleotiden hydrolysiert. Bei der alkalischen Phosphatase handelt es sich schließlich um eine 5'-Phosphomonoester-phosphohydrolase. Das Hydrolysat wird anschließend nach 2.2.5.3. untersucht.

2.2.5.3 HPLC-Auftrennung

Die Auftrennung der Proben erfolgt über eine RP-18-Säule mit HPLC-Laufpuffer bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min. Der Trennsäule ist eine Hypersil Vorsäule vorgeschaltet, um die Trennsäule nicht mit den Hydrolyseenzymen zu belasten. Der Verlauf der Trennung wird über 15 min. durch einen UV-Monitor bei 290 nm und mittels eines elektrochemischen Detektors mit coulometrischer Methode (Messzelle : 300 mV, 2 nA; Voroxidation :100 mV, 100 µA) verfolgt.

2.2.5.4 Auswertung

Die Identifizierung von 8-oxodG, dG und dT erfolgt über Vergleich der Retentionszeit des jeweiligen Standards, und die Quantifizierung durch Vergleich der Peakflächen der Probe, berechnet aus dem Produkt der Peakhöhe und Halbwertsbreite, mit denen der Standards, deren Konzentration bekannt ist. Die Anzahl von 8-oxodG oder auch der anderen Basen pro 10^6 bp kann mit der **Gleichung 2.2.8** berechnet werden.

$$Z_{8\text{-oxodG}} = \frac{F_{\text{probe}} \times n_{\text{Std.}} \times MW_{\text{bp}}}{F_{\text{Std.}} \times m_{\text{DNA}}} \quad (2.2.8)$$

$Z_{8\text{-oxodG}}$: Anzahl 8-oxodG pro 10^6 bp
F_{Probe}	: Fläche des Probenpeaks (mm^2)
$F_{\text{Std.}}$: Fläche des 8-oxodG-Standard-Peaks
$n_{\text{Std.}}$: Menge des 8-oxodG-Standards
MW_{bp}	: Molekulargewicht eines Basenpaares (g/mol)

Die Menge lysierter DNA der Probe wird durch Vergleich der Peakflächen von dT und dG nach **Gleichung 2.2.9** ermittelt.

$$\frac{G}{T} = \frac{F_{\text{Guanosin}} / F_{\text{Thymidin}}}{n_{\text{Guanosin}} / n_{\text{Thymidin}}} \quad (2.2.9)$$

G/T	: Verhältnis von CG zu AT-Basen
F_{Thymidin}	: Fläche des Thymidin-Peaks (mm^2)
F_{Guanosin}	: Fläche des Guanosin-Peaks (mm^2)
n_{Thymidin}	: Stoffmenge des injizierten Thymidin-Standards (pmol)
n_{Guanosin}	: Stoffmenge des injizierten Guanosin-Standards (pmol)

Extrapoliert man die im Relaxationsassay (2.2.3.) gemessenen, durch niedrige Konzentrationen an Agens induzierten Fpg-sensitiven Modifikationen auf die höheren Konzentrationen an Agens, die zu einem in der HPLC meßbaren 8-oxodG-Gehalt führten, so kann man den Anteil von 8-oxodG an den Fpg-sensitiven Läsionen berechnen.

2.2.6 Zellkultur

2.2.6.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Alle Zellkulturarbeiten werden unter sterilen Bedingungen in einer Laminar-Flow-Box, auch als Sterilwerkbank bezeichnet, durchgeführt. Die hier beschriebenen Zelllinien werden alle bei 37°C, 5% CO₂ und 99% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Passagierung der Zellen erfolgt je nach Verdopplungszeit, jedoch wird spätestens nach 4 – je nach Zellart- Tagen ein Mediumwechsel durchgeführt. Unter Passagieren versteht man das Ablösen der adhärent wachsenden Zellen, das Verdünnen mit Medium und das Wiederaussäen. Hierzu wird mit einer Pipette das alte Medium abgesaugt, 1mal mit PBSCMF gewaschen und 30 sec. mit Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, wobei die Zellen sich langsam ablösen. Die Trypsin/EDTA-Lösung wird entfernt, und es wird gewartet, bis sich die Zellen durch leichtes Abklopfen vollständig ablösen. Der Ablösevorgang wird im Lichtmikroskop kontrolliert. Anschließend werden die Zellen in Medium resuspendiert und durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die im FCS enthaltenen Bestandteile inaktivieren zugleich das Trypsin. Die Zellzahl wird bestimmt, und die Zellen verdünnt ausgesät. Zur Zellzahlbestimmung wird hier ein Coulter Counter™ Zellzählgerät verwendet, wobei 200 µl Zellsuspension 1:50 mit Isoton II (physiologischer Kochsalzlösung) verdünnt werden. Für Experimente mit Zellen werden vorkonfluente Zellen verwendet, d.h. Zellen, die sich noch in der Wachstumsphase befinden.

2.2.6.2 Kryokonservierung und Auftauen von Säugerzellen

Man kann Zellen über einen längeren Zeitraum, bis zu Jahren lagern, indem man sie kryokonserviert. Hierzu werden nach 2.2.6.1. abgelöste, resuspendierte Zellen 7 min. bei 4°C und 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und das Zellpellet in gekühltem Medium, das 10% Anteil an DMSO hat, zu einer Zelldichte von 2-3 Mio/ml aufgenommen und schnell in 1 ml Portionen in Kryoröhrchen aliquotiert, die sofort bei -20°C gelagert werden. Nach 2 h Lagerung bei -20°C werden die Kryoröhrchen über Nacht bei -70°C aufbewahrt und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen kryokonservierter Zellen erfolgt in der Handwärme, wonach sie sofort in 10 ml kaltes Kulturmedium überführt werden. Zur Entfernung des zelltoxischen DMSO wird zentrifugiert, wie oben beschrieben, der Überstand dekantiert und das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h im CO₂-Inkubator wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Experimente an aufgetauten Zellen werden erst nach mindestens 2 Passagierungen durchgeführt.

2.2.6.3 Zelllinien

B6-Wildtyp-Zellen (Wildtyp-Zellen)

B6-Wildtyp-Zellen (*tk*) sind immortalisierte Mausfibroblasten. Sie wachsen adhärenthärent, als Monolayer. Zum Ablösen wird bei Raumtemperatur 15-30 sec. mit Trypsin inkubiert und zum Vereinzeln 5mal auf- und abpipettiert. Die Verdopplungszeit der Zellen beträgt 18-20 h.

B6-Vector-only- Kontrollzellen (B6-VO) bzw. B6-INOS-Zellen (B6-INOS)

Beide Zelllinien (*tk*⁺) sind immortalisierte Mausfibroblasten, die adhärenthärent als Monolayer wachsen. Sie können in Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin-haltigem Zellkulturmedium selektiert/ kultiviert werden. Zum Ablösen der B6-Vector-only- bzw. der B6-INOS-Zellen wird bei Raumtemperatur 15-30 sec. mit Trypsin inkubiert und zum Vereinzeln 5mal auf- und abpipettiert. Die Verdopplungszeit der Zellen beträgt 20-22 h.

B6-INOS-Zellen sind stabil transfiziert mit dem murinen Makrophagen iNOS-Gen und dem Herpes simplex Virus Thymidinkinase Gen. Die Transfektion erfolgte mittels Calciumphosphat-Copräzipitation. Das iNOS-Gen wird stabil exprimiert und die Expression kann zusätzlich induziert werden durch Zugabe von 5 mM Natriumbutyrat ins Zellkulturmedium (**Pantopoulos & Hentze 1995**).

B6-Vector-only-Zellen sind stabil transfiziert mit Luciferase cDNA und dem Herpes simplex Virus Thymidinkinase Gen, wobei keine Expression der Luciferase stattfindet (**Pantopoulos & Hentze 1995**). Die Vector-only-Zellen zeigen auch keine iNOS-Expression. Die beschriebene Transfektion der Vector-only-Zellen wird im folgenden zur Vereinfachung der Beschreibung als Transfektion mit dem leeren Vektor bezeichnet.

2.2.7 Alkalische Elution

2.2.7.1 Prinzip

Die Alkalische Elution ist eine sehr empfindliche Methode zur Quantifizierung von DNA-Schäden *in vitro*. Mit der von **Kohn et al. (1973, 1976, modifiziert)** entwickelten Technik lassen sich Einzelstrangbrüche, DNA-DNA- und DNA-Proteinquervernetzungen nachweisen. Führt man einen zusätzlichen Schritt ein, indem man mit Reparaturenzymen, ähnlich wie im Relaxationsassay, inkubiert (**siehe auch 2.2.3.**), so lassen sich auch Basenmodifikationen nachweisen; sie werden als zusätzliche Einzelstrangbrüche sichtbar. Mit der Alkalischen Elution lassen sich DNA-Schäden mit einer Empfindlichkeit von 1 Läsion pro 10⁷ bp nachweisen; damit ist sie eine empfindlichere Methode als der Relaxationsassay und die HPLC/ECD-Analyse. Das Prinzip der Alkalischen Elution ist in **Abb. 2.5** dargestellt.

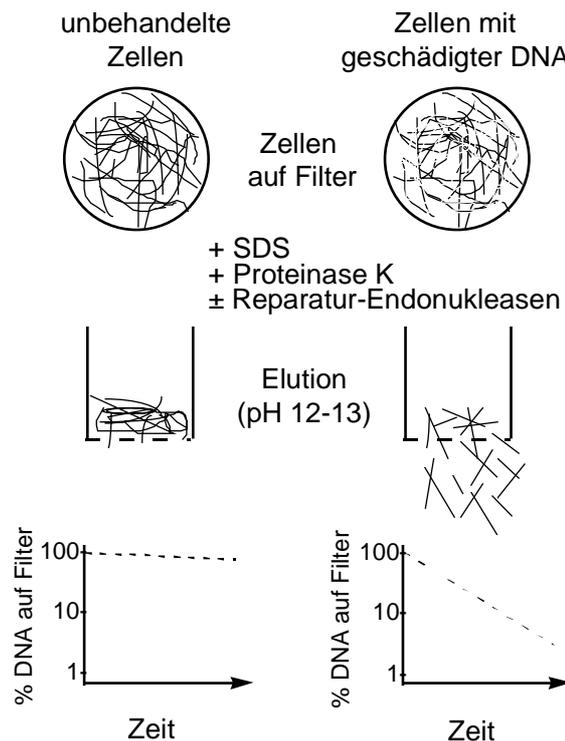


Abb. 2.5 Prinzip der Alkalischen Elution.

Zur Durchführung werden in Suspension befindliche Zellen auf Polycarbonatfilter aufgetragen und durch Spülen mit einem Detergenz- und Proteinase K-haltigen Puffer (Lysepuffer) lysiert. Hierbei werden Zellbestandteile, RNA und die durch die Proteinase abgebauten Proteine vom Filter gespült. Die doppelsträngige DNA bleibt auf dem Filter zurück. Anschließend wird gewaschen, um den Lysepuffer zu entfernen, und mit den Reparaturenzymen inkubiert. Zum Schluss wird der alkalische Elutionspuffer (pH 12,15) zugegeben, wobei die DNA in die einzelsträngige Form übergeht, und die Elution durch die Filter gestartet. Die Elutionsgeschwindigkeit richtet sich nach der Länge der DNA-Bruchstücke, wobei kürzere Bruchstücke, entsprechend höher geschädigter DNA, schneller eluieren als längere. Nach der fraktionierten Elution wird neutralisiert und der DNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen und die Menge der auf dem Filter verbliebenen DNA mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffs fluorimetrisch bestimmt. Man berechnet die Elutionsrate der DNA, die proportional zum Gehalt an Einzelstrangbrüchen und alkalilabilen Läsionen ist. Die Kalibrierung der Methode erfolgt durch Vermessung einer mit γ -Strahlen geschädigten Probe: 6 Gy γ -Strahlung erzeugen 1 Läsion pro 10^6 bp (**Kohn et al. 1976**).

2.2.7.2 Versuchsaufbau

Polycarbonatfilter befinden sich auf einem Frittenboden, der in einen Filterhalter eingelegt ist, auf dem eine als Vorrats-/Zugabegefäß dienende Einwegspritze aufgebracht ist. Die Ausgänge der Filterhalterungen sind durch Dialyseschläuche über eine Peristaltik-Mehrkanalpumpe mit dem Fraktionssammler verbunden. Zur Temperierung der DNA während der verschiedenen Durchführungsschritte sind die Filterhalter in ein sowohl heiz- als auch kühlbares Wasserbad eingetaucht.

Der Versuchsaufbau ist in **Abb. 2.6** schematisch dargestellt.

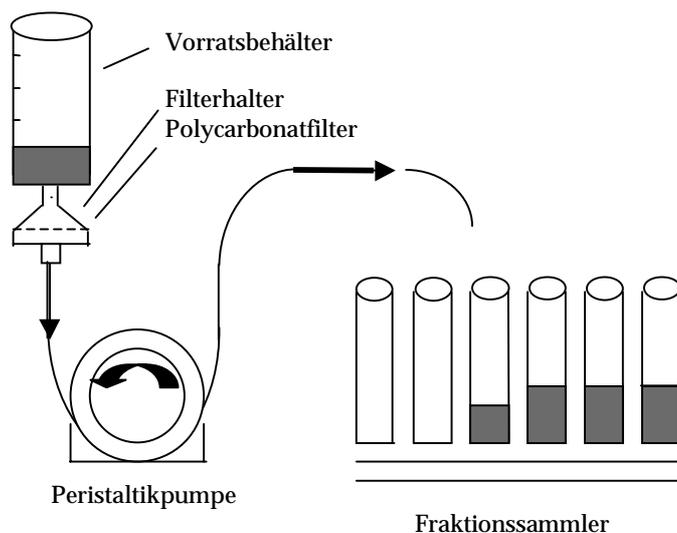


Abb. 2.6 Schematisch dargestellter Versuchsaufbau der Alkalischen Elution.

2.2.7.3 Behandlung der Zellen für die Alkalische Elution

Die hier verwendeten adhärent wachsenden Zelllinien werden vor der Elution bzw. gegebenenfalls nach Behandlung zweimal mit PBSCMF gewaschen und anschließend trypsinisiert (**siehe auch 2.2.6.1.**). Nach dem Ablösen werden die Zellen sofort in kaltem Medium resuspendiert, auf Eis gestellt und sofort die Filter aufgetragen. Dies geschieht, um eine Reparatur, die bei höherer Temperatur stattfinden könnte, zu vermeiden.

Werden unbehandelte Zellen verwendet, so spricht man von einer Bestimmung des Steady-State-Levels an oxidativen DNA-Schäden.

2.2.7.3.1 Inkubation mit Natriumbutyrat

Die Zellen werden dem CO₂-Inkubator entnommen. Es wird Natriumbutyrat (Nab.)-Stammlösung bis zu einer Konzentration von 5 mM in des Medium pipettiert und für 12 bzw. 24 h weiterinkubiert. Anschließend werden die Zellen zusätzlich geschädigt oder direkt auf die Alkalische Elution aufgetragen (**siehe 2.2.7.1.**).

2.2.7.3.2 Schädigung mit Ro 19-8022 und sichtbarem Licht

Die adhärennten Zellen werden zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen, anschließend wird in jede Flasche eine im Greinerröhrchen vorbereitete Lösung aus PBSCMF und Ro 19-8022 der Konzentration 40 nM pipettiert und auf Eis mit sichtbarem Licht (1000 Watt Halogenlicht im Bereich von 400-800 nm) bei einem Abstand von 38 cm 10 min. entsprechend einer Energiedosis von 166 kJ/m² bestrahlt. Nach der Schädigung wird wiederum zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen. Die Zellen werden trypsinisiert, in kaltem Medium resuspendiert und auf die Filter aufgetragen (1 Mio Zellen pro Filter).

2.2.7.3.3 Schädigung mit H₂O₂

Die adhärennten Zellen werden zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen, 10 ml PBSCMF bzw. PBSG werden in jede Flasche mittlerer Größe (75 cm², 250 ml) gegeben und anschließend H₂O₂-Stammlösung bis zu einer Konzentration von 25 bzw. 50 µM H₂O₂ zupipettiert. Die Schädigung erfolgt auf Eis auf einem Tischschüttler für 20 min.. Anschließend wird wie unter 2.2.7.3.2. nach der Schädigung verfahren.

2.2.7.3.4 Behandlung mit DPTA-NONOat

Die Zellen werden dem CO₂-Inkubator entnommen. Es wird ein entsprechendes Volumen DPTA-NONOat Stammlösung bis zu Konzentrationen von 0,25-2,5 mM in das Medium pipettiert, Hepes-Puffer zur Konstanthaltung des pH-Wertes zugegeben (Endkonzentration 5 mM) und für 3 h weiter bei 37°C inkubiert. Anschließend wird wie unter 2.2.7.3.2. nach der Schädigung verfahren.

Für die Versuche mit dem zerfallenen NONOat wird die NONOat Stammlösung für mind. 24 h bei 37°C und weitere 24 h in Zellkulturmedium verdünnt aufbewahrt. Die Halbwertszeit des DPTA-NONOats beträgt bei 37°C 3 h.

2.2.7.3.5 Schädigung mit SIN-1

Die Zellen werden dem CO₂-Inkubator entnommen. Es wird ein entsprechendes Volumen SIN-1-Stammlösung bis zu Konzentrationen von 1,25 bzw. 2,5 mM in das Medium pipettiert, Hepes-Puffer zur Konstanthaltung des pH-Wertes zugegeben (Endkonzentration 5 mM) und für 1 h weiter bei 37°C inkubiert. Anschließend wird wie unter 2.2.7.3.2. nach der Schädigung verfahren.

2.2.7.3.6 Schädigung mit UVB

Zur UVB-Schädigung werden die Zellen in Zellkulturschalen kultiviert. Vor der Schädigung werden die Zellen zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen und 10 ml PBSCMF in jede Schale pipettiert. Bei 50 cm Abstand wird 5 min. bei geöffnetem Deckel mit in die Lampe eingelegtem Gitter bestrahlt (entsprechend einer

Energiedosis von $3,9 \pm 0,33 \text{ J/m}^2$). Anschließend wird wie unter 2.2.7.3.2. nach der Schädigung verfahren.

2.2.7.3.7 Schädigung mit tBuOOH

Vor der Schädigung werden die Zellen zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen. 10 ml auf 37°C vorgewärmtes Medium werden in jede zu schädigende Zellkulturflasche pipettiert. Hierzu wird eine frisch hergestellte Stammlösung von tBuOOH pipettiert, so dass die Endkonzentration 100 µM tBuOOH erreicht. Die Schadensinduktion erfolgt bei 37°C für 15 min. im CO₂-Inkubator. Anschließend wird wie unter 2.2.7.3.2. nach der Schädigung verfahren. Zur Bestimmung des Wertes ohne Reparatur für die anschließende Detektion von Endonuklease-sensitiven Modifikationen werden die Zellen nach der Schädigung für 15 min. in Medium im Brutschrank belassen, damit schon Einzelstrangbrüche repariert werden können.

2.2.7.3.8 Bestimmung der DNA-Reparatur

Die Zellen werden nach der Schädigung zweimal mit PBSCMF gewaschen. Anschließend werden sie in Medium für die vorgesehene Reparaturzeit wieder bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Reparatur wird verfahren wie unter 2.2.7.3.1. beschrieben.

Die Zellen, die zur Bestimmung des induzierten Schadens herangezogen werden sollen (0 h-Wert), werden erst geschädigt, wenn die Reparaturzeit der reparierenden Zellen fast beendet ist. Nach der Schädigung des „0 h-Wertes“ wird mit allen Ansätzen verfahren wie unter 2.2.7.3.1. beschrieben.

Bei einer Reparaturzeit länger als 8 h muß, da sich hier die Zellteilung schon bemerkbar macht, für die Proliferation der Zellen während der Reparaturzeit korrigiert werden. Hierzu wird zum Zeitpunkt des Reparaturbeginns eine Probe abgelöst und die Anzahl der Zellen mittels Coulter Counter nach Abtrypsinieren (2.2.6.1.) bestimmt. Erfolgt vor der Schädigung eine Präinkubation, so werden zur Korrektur für die Proliferation zum Zeitpunkt des Reparaturbeginns der anderen Proben sowohl eine behandelte (präinkubierte) als auch eine unbehandelte Probe abgelöst und gezählt. Selbstverständlich ist hierbei, dass für einen Reparaturversuch in alle Ansätze gleich viele Zellen ausgesät werden.

2.2.7.4 Auftragen der Zellen, Zellyse, Enzyminkubation und Alkalische Elution

Polycarbonatfilter mit Porendurchmesser von 2 µm werden luftblasenfrei, mit H₂O_{dest.} befeuchtet, auf einen Frittenboden gelegt, der in einen Filterhalter eingelegt wird. Das ganze System ist mit H₂O_{dest.} luftblasenfrei befüllt. Das Wasserbad, in das die Filterhalter eintauchen, wird auf 4°C temperiert, um während des Auftragevorgangs jegliche Reparatur zu vermeiden. Die Zellsuspension (1 Mio Zellen pro ml) wird aufgegeben und mit 2 ml Lysepuffer mit einer Pumpgeschwindigkeit von 80 ml/h auf die Filter gespült, wozu vorher auf 16-20°C

temperiert wird. Bei einer Temperatur von 25°C werden 5 ml Lysepuffer/Proteinase K mit einer Pumpgeschwindigkeit von 3 ml/h durchgepumpt. Anschließend wird 7mal mit 5 ml BE1-Puffer gewaschen, wobei nach jedem Waschdurchgang Reste des Puffers entfernt werden. Es wird auf 37°C temperiert und die Enzyminkubation 60 min. mit 2 ml Enzymlösung bei einer Pumpgeschwindigkeit von 2 ml/h durchgeführt. Angaben zu den Puffern und den Konzentrationen der Enzyme sind in **Tabelle 2.2** aufgeführt.

Nach der Enzyminkubation werden Reste der Enzymlösungen vom Filter entfernt. Es wird zweimal mit 5 ml BE1-Puffer und einmal mit 4,5 ml Waschpuffer bei einer Pumpgeschwindigkeit von 80 ml/h gespült. Anschließend werden die Vorratsbehälter mit Elutionspuffer befüllt. Bei 37°C erfolgt die Elution über 12 h bei einer Pumpgeschwindigkeit von 1,9 ml/h. Der Fraktionssammler wechselt alle 2 h die Auffanggläser, so dass insgesamt 6 Fraktionen entstehen.

Tabelle 2.2 Arbeitspuffer und Konzentrationen der in der Alkalischen Elution verwendeten Reparaturenukleasen.

Enzym	Puffer	Stammkonzentration	Anwendungskonzentration
Fpg	BE ₁ / 0,5mg BSA	4,9 mg / ml	1 µg / ml
Endo III	BE ₁ / 0,5mg BSA	2,0 mg / ml	30 ng / ml
T ₄ E _v	BE ₁₅ / 0,5mg BSA	50 µg / ml	100 ng / ml
Exo III	TC/ 0,5mg BSA	100 U / µl	100 U / ml (0,5 µg / ml)
Fpg-Rohextrakt (bis V120)	BE ₁ / 0,5mg BSA	840 µg / ml	700 ng / ml
Fpg-Rohextrakt (ab V120)	BE ₁ / 0,5mg BSA	910 µg / ml	700 ng / ml

2.2.7.5 Auswertung

Nach der Elution wird der restliche, noch im Vorratsgefäß verbliebene Elutionspuffer, in die 6. Fraktion gepumpt (80 ml/h). Die Frittenböden mit den Filtern werden mit dem Volumen Elutionspuffer, das sich in der dazugehörigen 6.Fraktion befindet, 2 h bei 60°C geschüttelt, um die auf dem Filter verbliebene DNA in Lösung zu bringen. Nach dem Schütteln wird ein den anderen Fraktionsgrößen entsprechendes Volumen (3,8 ml) entnommen.

Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes wird jede Fraktion mit dem gleichen Volumen (3,8 ml, entsprechend dem Fraktionsvolumen) von auf Raumtemperatur temperiertem Phosphatpuffer I (pH 6,0) neutralisiert. Nach 15 min. Inkubationszeit bei Raumtemperatur, während dieser Zeit geht die DNA in die doppelsträngige Form über, wird das gleiche Volumen (3,8 ml) Phosphatpuffer II/ Bisbenzimid (1,5 µM) zu jeder Fraktion zur Fluoreszenzfärbung dazugegeben und wieder 15 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung erfolgt durch Anregung des Bisbenzimid 33258-DNA-Komplexes bei 360 nm und

Bestimmung der Emission bei 450 nm. Als Blindwert dient hierbei eine Mischung aus gleichen Volumina (je 3,8 ml) Elutionspuffer, Phosphatpuffer I und Phosphatpuffer II/Bisbenzimid (1,5 µM). Der absolute DNA-Gehalt wird durch Messung einer Probe Elutionspuffer, die 10 µg DNA enthält und genauso vorbereitet wird, wie die anderen Fraktionen, bestimmt.

Die Gesamtmenge der DNA einer Probe ist linear der Summe der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Fraktionen und des Filterwertes der Probe. Man kann daher den prozentualen Anteil des DNA-Gehalt jeder Probe, der zu einem bestimmten Zeitpunkt noch auf dem Filter vorlag, berechnen. Trägt man nun den DNA-Gehalt im halblogarithmischen Maßstab gegen die Zeit auf, so erhält man eine Gerade, deren Steigung direkt proportional der Anzahl der Einzelstrangbrüche ist, wobei als Voraussetzung gilt, dass die Verteilung der Modifikationen in der DNA zufällig erfolgt.

Die absolute Zahl an Einzelstrangbrüchen errechnet sich aus **Gleichung 2.2.10.**:

$$SSB = m \cdot 2,24 \cdot 10^{-6} \quad (2.2.10)$$

SSB = Zahl der Einzelstrangbrüche pro bp
m = mittlere Steigung

Der Faktor 2,24 wurde von M. Pflaum mittels einer Kalibrierung durch γ -Strahlung bestimmt (Epe et al. 1993c, Pflaum 1996).

2.2.8 Zelltoxizitätstest / Proliferationsfaktor

2.2.8.1 Durchführung

Die Zytotoxizität einer Behandlung wurde durch Ermittlung des Proliferationsfaktors bestimmt, da alle hier verwendeten Zelllinien keine Kolonien ausbilden.

Die Zellen werden nach der Behandlung wie auch eine unbehandelte Kontrolle abgelöst, wie **unter 2.2.6.1.** beschrieben. Die Zellzahl wird mittels Coulter Counter bestimmt, 1 Mio Zellen werden ausgesät und für 48 h weiterkultiviert. Anschließend werden die Zellen wieder abgelöst und der Proliferationsfaktor bestimmt, indem die nach 48 h ermittelte Zellzahl durch die Anzahl der ausgesäten Zellen dividiert wird. Dieser Proliferationsfaktor beinhaltet sowohl die „Plating efficiency“, d. h. welcher Anteil der ausgesäten Zellen anwächst, als auch die „Cloning efficiency“, d. h. den Anteil der Zellen, der nach dem Anwachsen in der Lage ist sich zu vermehren. Die „Plating efficiency“ der B6-Vector-only-Zellen betrug $88 \pm 8 \%$.

Um allein eine Aussage über die „Cloning efficiency“ machen zu können, wurde der Proliferationsfaktor teilweise durch ein abgeändertes Protokoll bestimmt. Hierbei werden 1 Mio Zellen ausgesät, nach 24 h Kulturzeit wird die Schädigung durchgeführt und gleichzeitig eine behandelte und eine unbehandelte Probe abgelöst, um die zum Zeitpunkt „0 h“- vorhandene Zellzahl zu bestimmen; die

anderen Proben werden für 48 h weiterkultiviert, wonach wie oben die Zellzahl bestimmt wird. Der Proliferationsfaktor wird berechnet, indem die nach 48 h bestimmte Zellzahl durch die Zahl der „0 h-Kontrolle“ dividiert wird.

Ein Proliferationsfaktor von „1“ bedeutet, dass sich die Zellen nicht mehr geteilt haben. Daher ist diese Zahl in den Abbildungen des Ergebnisteils besonders gekennzeichnet. Zur Angabe der Proliferationsfaktors in Prozent werden die Proliferationsfaktoren der beiden Ansätze, die verglichen werden sollen nach Subtraktion von „1“ miteinander ins Verhältnis gesetzt.

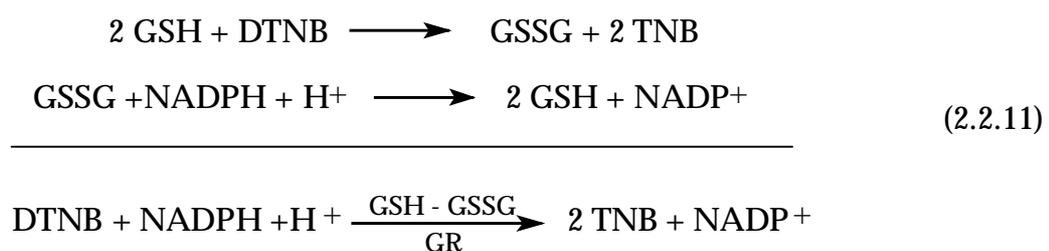
2.2.8.2 Behandlung der Zellen zur Bestimmung des Proliferationsfaktors

Die Behandlung erfolgte, wie unter 2.2.7.3. beschrieben, jedoch wurden auch andere Konzentrationen für die Schädigung verwendet. Diese sind der jeweiligen Beschreibung im Ergebnisteil zu entnehmen und werden daher hier nicht aufgeführt.

2.2.9 Enzymatische Glutathion-Bestimmung

2.2.9.1 Prinzip

Zur Ermittlung des Gesamt-Glutathion-Gehaltes ($[GSH] + 2x[GSSG]$) von Zellen wird die Methode nach **Griffith (1985)** verwendet, wobei NADPH, GR und DTNB als Reagenzien dienen. Diese enzymatische Methode beruht darauf, dass reduziertes zelluläres Glutathion mit DTNB (5,5'-Dithio-(2-nitrobenzoesäure), *Ellman's* Reagenz, nicht enzymatisch zu oxidiertem Glutathion und TNB (5'-Thio-(2-nitrobenzoesäure)) reagiert. Gleichzeitig wird GSSG enzymatisch durch die Glutathionreduktase (GR) unter Verbrauch von NADPH reduziert, welches erneut mit DTNB reagieren kann. Daraus ergibt sich folgende **Beziehung 2.2.11** :



Hierbei sind die Konzentrationen von DTNB und NADPH so gewählt, dass die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion proportional zur Gesamt-Glutathion-Konzentration ist. Indem man die Methode mit einem Glutathion-Standard kalibriert, kann man durch Bestimmung der Bildungsgeschwindigkeit des bei 412 nm photometrisch bestimmbareren TNB's auf die Gesamt-Glutathion-Konzentration der Probe rückschließen.

2.2.9.2 Durchführung

Die behandelten oder unbehandelten Zellen werden mit kaltem PBSCMF 2mal gewaschen, nach 2.2.6.1. abgelöst und in 10 ml kaltem PBSCMF aufgenommen und bei 4°C und 1000 rpm 7 min. zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, das Zellpellet in 10 ml PBSCMF resuspendiert und 200 µl Zellsuspension werden zur Zählung mit Hilfe des Coulter Counters abpipettiert. Die Suspension wird nochmals wie beschrieben zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in TCA-Puffer entsprechend einer Zelldichte von 10^7 Zellen/ml aufgenommen. Im Ultraschall-Homogenisator werden die Zellen lysiert (35 W, 3x20 Impulse, 10 kHz). Anschließend werden die festen Zellbestandteile abzentrifugiert (4°C, 10 min., 12000 rpm) und der Überstand in ein zweites Cap auf Eis überführt. 10-40 µl des Überstandes (nach 2 min. Messzeit darf die Absorption nicht > 1 sein) werden photometrisch vermessen. Hierzu werden in folgender Reihenfolge in eine Plastikkuvette pipettiert, 700 µl Phosphat/NADPH-Lösung, 100 µl DTNB-Reagenz, x µl Probe und H_2O_{dest} ad 1000 µl. Nach jedem Pipettierschritt wird der Ansatz durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Zum Schluss werden 2 µl GR-Lösung zugegeben und die Absorption gegen Luft bei 412 nm sofort und dann alle weiteren 30 sec. während insgesamt 2 min. gemessen. Man misst also die Änderung der Absorption gegen die Zeit. Zur Erstellung der Eichgerade werden 10-40 µl einer 0,1 mM GSH-Stammlösung wie beschrieben vermessen.

2.2.10 Mikrokerntest

2.2.10.1 Prinzip

Mit dem Mikrokerntest können klastogene (Chromosomenbrüche erzeugende) und aneugene (zum Verlust von Chromosomen führende) Substanzen erfasst werden, wobei die Chromosomenbrüche z. B. durch DNA-Schädigung durch die Substanz hervorgerufen werden können (**Schmuck et al. 1988**) und die Chromosomenverluste durch Störung des Mitoseapparates während der Zellteilung (**Tucker & Barrett 1986**). Es handelt sich daher um einen Test zur sehr sensitiven Ermittlung eines genotoxischen Potentials einer Substanz. Unter Mikrokernen versteht man von einer Kernmembran umgebene chromosomale Fragmente, die nicht größer als $\frac{1}{4}$ des Zellkerns sind, die deutlich von diesem getrennt liegen, jedoch nach Anfärbung etwa die gleiche Färbung aufweisen wie der Zellkern. Auch ohne Behandlung gibt es in Zellen und Geweben eine Anzahl an Mikrokernen. Unter bestimmten Umständen (z. B. Präkanzerosen, Tumoren, nach Kontakt mit Xenobiotika) können sie jedoch vermehrt auftreten. Zur Bestimmung der Mikrokernelrate werden Zellen in Suspension auf einen Objektträger aufgebracht, fixiert, mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt und mit einem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet.

2.2.10.2 Durchführung und Auswertung

Zur Mikrokerninduktion werden 0,75 Mio Zellen in eine Zellkulturflasche mittlerer Größe ausgesät. Nach 48 stündiger Kulturzeit erfolgt die Behandlung mit Nab., Ro 19-8022, H₂O₂ oder DPTA-NONOat, wie unter 2.2.7.3. beschrieben. Nach der Schädigung werden die Zellen zweimal mit PBSCMF gewaschen und für 24 h weiterkultiviert. Nach Ablösen der Zellen (2.2.6.1.) und Resuspendierung in 10 ml kaltem Zellkulturmedium werden 2-3 Tropfen Zellsuspension (Dichte etwa 1 Mio Zellen/ml) mit Hilfe von speziellen Plastiktrichtern bei 1000 rpm 5 min. in der Zytocentrifuge auf Objektträger aufgeschleudert. Pro Schädigungsansatz werden drei Objektträger präpariert. Zur Fixierung werden die Objektträger mind. 1 h in Methanol bei -20°C gelagert. Die Färbung erfolgt durch Einstellen in eine Fluoreszenzfarbstofflösung (Bisbenzimid Nr. 33258 5 µg/ml PBSCMF) für 1 min.. Die Präparate werden 2mal durch Eintauchen für je 2 min. in PBSCMF gewaschen und dann mit 8 µl Eindecklösung (EDL-2) und einem Deckgläschen bedeckt. Nach der Färbung sind die Objektträger vor Licht geschützt zu lagern. Die Auszählung der Mikrokerne erfolgt mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops mit Anregungsfilter 356 nm. Pro Präparat werden Mikrokerne pro 2000 Kerne ausgezählt, wobei unterschieden wird, ob ein, zwei oder drei Mikrokerne pro Kern ausgebildet wurden. Ein Beispiel für ein Präparat zur Auswertung auf Mikrokerne ist in **Abb. 2.7** zu sehen.

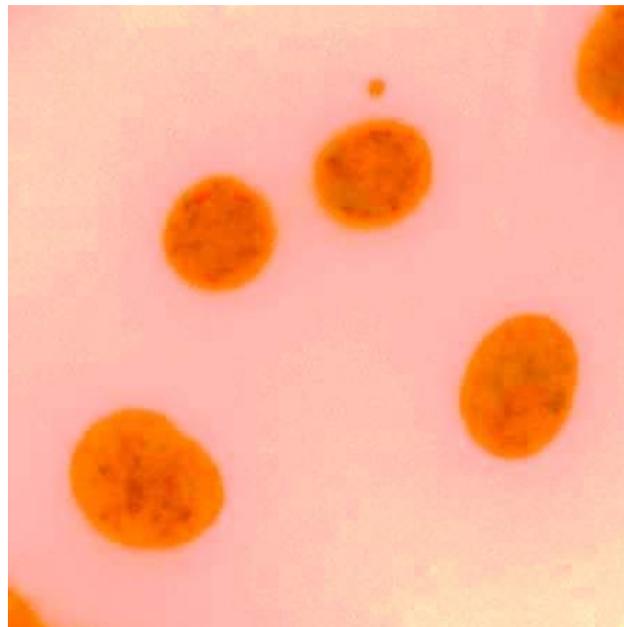


Abb. 2.7 Zellkerne und ein Mikrokern von unbehandelten B6-INOS-Zellen (gefärbt mit Bisbenzimid Nr. 33258, Farben invertiert dargestellt).

2.2.11 Nitritbestimmung

2.2.11.1 Prinzip

Die Nitritbestimmung folgt der Reaktion nach Griess-Ilosvay, wonach es im Säuren zur Ausbildung eines Azofarbstoffes aus der Diazotierungskomponente, Sulfanilsäure, und der Kupplungskomponente, 1-Naphthylamin, kommt, wenn Nitrit in der Lösung ist (**Griess 1879, Ilosvays 1889**). Die Menge des Nitrits in der Probe kann durch photometrische Messung der Absorption des gebildeten Azofarbstoffes gegen eine Eichgerade aus Lösungen bekannter Nitritkonzentrationen berechnet werden.

2.2.11.2 Durchführung

300 µl Zellkulturmedium werden mit 750 µl Griess-Ilosvays-Reagenz (Merck, Darmstadt) 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei 540 nm gemessen. Als Blindwert werden 300 µl Zellkulturmedium mit 750 µl Reagenz inkubiert. Die Methode wird im Bereich von 1 – 30 µl kalibriert.

2.2.12 Nachweis des p53-Proteins in B6 Mausfibroblasten

2.2.12.1 Vorbereitung der Proben

Eine große Zellkulturflasche (250 cm²) mit ca. 10-12 Mio behandelten oder unbehandelten Zellen wird pro Ansatz benötigt. Nach Entnahme aus dem CO₂-Inkubator wird das Medium abpipettiert und die adhären Zellen zweimal mit PBSCMF gewaschen, welches anschließend möglichst vollständig entfernt wird. Zum Ablösen werden die Zellen mit Hilfe eines sterilen Zellschabers vorsichtig von dem Boden der Zellkulturflasche abgeschabt und in 250-500 µl kaltem Lysepuffer, dem kurz vorher die Proteinaseinhibitoren und Igepal zugesetzt wurden (**siehe 2.1.8.12.**), resuspendiert. Die Suspension wird in ein Eppendorf-Cap überführt. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren werden die Zellen lysiert. Anschließend werden die Lysate bei 4°C und 12000 rpm für 10 min. zentrifugiert, um die festen Zellbestandteile abzutrennen. Der Überstand wird in ein frisches Cap überführt und der Proteingehalt nach **2.2.12.2.** bestimmt.

2.2.12.2 Bestimmung des Proteingehaltes nach Bradford

200 µl Biorad-Farbreagenz werden mit 800 µl mit H₂O_{dest.} verdünnter Proteinlösung gemischt. Nach einer Inkubationszeit von genau 5 min. wird die Absorption bei 595 nm gegen einen genauso behandelten Blindwert aus 200 µl Farbreagenz und 800 µl H₂O_{dest.} bestimmt. Zur Ermittlung der Proteinkonzentration der Probe wird eine Eichgerade aus Verdünnungen von BSA (Rinderserumalbumin) in H₂O_{dest.} mit BSA-Konzentrationen von 1-10 µg/800µl H₂O_{dest.} erstellt.

2.2.12.3 SDS-Gel Elektrophorese

2.2.12.3.1 Prinzip

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird hier zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Proteingröße verwendet. Um die Struktur der Proteine aufzulösen, wird den Proben SDS als anionisches Detergenz und ein Reduktionsmittel zugesetzt. Das SDS lagert sich an die Proteine entsprechend ihrer Größe an und überlagert durch seine negative Ladung die Eigenladungen der Proteine. Das Reduktionsmittel reduziert z. B. Disulfidbrücken der Proteine. Da die Menge des gebundenen SDS linear proportional dem Molekulargewicht der Proteine ist und unabhängig von der Aminosäuresequenz, erfolgt die Auftrennung der Proteine bei sich anschließender Elektrophorese in Abhängigkeit ihrer Molekülgröße. Hier wird ein Gel, bestehend aus Sammel- und Trenngel, verwendet, wobei es bei Anlegen der Spannung zur Aufkonzentrierung der Proteine kurz vor dem Übergang ins Trenngel kommt, was zu einer verbesserten Auftrennung der verschiedenen Proteine und zu schärferen Banden führt. Den Konzentrierungs- und Auftrennungsmechanismen liegt neben den unterschiedlichen Zusammensetzungen der beiden verwendeten Gele die Zusammensetzung des Kammer- und des Auftragepuffers zugrunde.

2.2.12.3.2 Durchführung

Die Elektrophoreseapparatur wird zusammengesetzt, wobei alle Teile fusselrei sein sollten. Das Trenngel mit 12%igem Polyacrylamidanteil wird gegossen, indem in angegebener Reihenfolge gemischt werden: 5 ml H₂O_{dest.}, 6 ml Acrylamidmix 30%ig (Rotiphorese® Gel 30), 3,75 ml Tris-Lösung (1,5 M, pH 8,8), 150 µl SDS-Lösung 10%ig, 6 µl TEMED und 150 µl Ammoniumpersulfat-Lösung 10%ig. Die Lösung wird in die Apparatur zwischen die zwei Glasplatten eingefüllt bis ca. 1 cm unterhalb der Zähne des Gelkamms, wobei die Menge des angegebenen Ansatzes für zwei Gele ausreicht. Es wird vorsichtig mit Isobutanol überschichtet, das als Verdunstungsschutz und zur Glättung der Oberfläche des Gels dient. Nach einer Polymerisationszeit von 30-45 min. kann das Sammelgel nach Entfernung des Isobutanol gegossen werden. Hierzu werden in angegebener Reihenfolge (für zwei Gele) pipettiert und gemischt: 3,4 ml H₂O_{dest.}, 850 µl Acrylamidmix 30%ig (Rotiphorese® Gel 30), 630 µl Tris-Lösung (1 M, pH 6,8), 50 µl SDS-Lösung 10%ig, 5 µl TEMED und 50 µl Ammoniumpersulfat-Lösung 10%ig. Die Lösung wird luftblasenfrei direkt auf das Trenngel pipettiert, so dass die Zähne des Kamms vollständig eintauchen. Nach einer Polymerisationszeit von 30.45 min. wird der Kamm vorsichtig entfernt. Die Apparatur wird in die Gelkammer eingesetzt und mit Kammerpuffer gefüllt. Die Geltaschen werden vorsichtig mit Kammerpuffer ausgespült und ausgerichtet.

Vor dem Auftragen der Proben werden diese nach Zusatz eines gleichen Volumens 2fach-SDS-Auftragepuffer, wie auch eine Mischung von Markerproteinen in SDS-Auftragepuffer (Längenstandard Sigma SDS-7 Dalton Mark VII-L®) 5 min. bei 95°C im Heizblock denaturiert. Die Proben (maximal 28 µl, entsprechend eines

Proteingehalts von 20-50 µg) werden in die Taschen aufgetragen. Bei 200 V erfolgt die elektrophoretische Auftrennung innerhalb etwa 60 min.. Wenn die Farbstofffront das Ende des Trenngels erreicht hat, ist die Trennung beendet. Das Gel kann, sofern kein Western Blot (2.2.12.4.) durchgeführt werden soll, nun 4 h mit Coomassie-Blue-Färbelösung auf einem Tischschüttler gefärbt werden. Das Sammelgel wird hierzu vorher entfernt. Die Entfärbung erfolgt während 24-48 h durch Bewegen auf dem Schüttelpult, wobei die Entfärbelösung mehrfach ausgetauscht werden muss. Mit Hilfe einer digitalen Kamera, Computer und Bildanalysenprogramm (Molecular Analyst®) kann das Gel anschließend fotografiert werden.

2.2.12.4 Proteintransfer (Western Blot)

2.2.12.4.1 Prinzip

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine werden hierbei auf eine Cellulosenitratmembran übertragen. Der Nachweis erfolgt anschließend immunologisch durch spezifische Markierung mit Antikörpern und Antikörpern, die z. B. mit einem Enzym markiert sind, gegen die ersten Antikörper. Die Proteine, die die Antikörper gebunden haben, werden sichtbar gemacht durch Zugabe des Substrates des antikörpergebundenen Enzyms.

2.2.12.4.2 Durchführung

Eine auf die exakte Größe des Trenngels zugeschnittene Membran aus Cellulosenitrat wird 15 min. in Tourbin-Puffer (Transferpuffer) equilibriert, ebenso wird mit 4 Lagen Blottingpapier verfahren. Bei allen Arbeitsschritten sind Handschuhe zu tragen, um Verunreinigungen des Gels und der Membran zu vermeiden. Das Trenngel wird kurz (2-3 min.) ebenfalls in Transferpuffer getaucht. Auf die Anode der Blottingapparatur werden in folgender Weise vorsichtig und luftblasenfrei eingelegt: 2 Lagen feuchtes Blottingpapier, die Cellulosenitratmembran, das Gel und wieder 2 Lagen feuchtes Blottingpapier, wobei nach jeder Schicht vorsichtig geglättet und überschüssige Flüssigkeit entfernt wird. Die einzelnen Schichten müssen bündig miteinander abschließen. Man schließt vorsichtig das Gerät durch Auflegen der Kathode. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgt während 30 min. bei 15 V. Nach dem Blotting wird die Membran zur Überprüfung des Transfers mit Ponceau-S-Färbelösung reversibel gefärbt und mit Hilfe der digitalen CCD-Kamera, Computer und Bildanalysenprogramm fotografiert. Die Entfärbung erfolgt gründlich mit TBS-T-Puffer. Das Gel wird mit Coomassie-Blue gefärbt, wie unter 2.2.12.3.2. beschrieben.

Nach gelungenem Transfer wird die Membran zur Absättigung (zum Blocken) unspezifischer Proteinbindungsstellen 1 h auf dem Tischschüttler in 5 % Trockenmilchpulver enthaltendem TBS-T-Puffer inkubiert. Es wird einmal 15 min. und zweimal 5 min. mit TBS-T-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem 1. Antikörper (Mouse Monoclonal Antibody gegen das p53 Tumor Suppressor Protein Ab-3, Clone BP53-12) erfolgt in einer 1 : 1000 Verdünnung des Antikörpers in TBS-T-Puffer/Trockenmilch(5%)-Lösung 1 h auf dem Schüttler. Die drei

Waschschritte werden wiederholt, worauf die Inkubation mit dem 2. Antikörper (Goat-anti-Mouse IgG, konjugiert mit Alkalischer Phosphatase) in 1 : 5000 Verdünnung des Antikörpers in TBS-T-Puffer/Trockenmilch(5%)-Lösung während 1 h auf dem Schüttler erfolgt. Die drei Waschschritte mit TBS-T-Puffer werden wiederholt. Die Detektion erfolgt für 5-10 min. in einer Lösung von 10 ml H₂O_{dest.} und einer SIGMA FAST BCIP/NBT-Tablette im Dunkeln. Nach ausreichender Farbentwicklung (blau-violett) wird die Membran mit H₂O_{dest.} abgespült und fotografiert .

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen von oxidativen DNA-Schäden an zellfreier DNA, deren Toxizität und Mutagenität

Nach zellfreier Schädigung von Plasmiden und anschließender Transformation in Bakterien, die als Selektionsmarker dienende Genabschnitte enthalten, können Mutanten selektiert werden (2.2.4.1.). Durch Isolierung und Sequenzierung der Plasmide aus den Mutanten lassen sich die Arten der Mutationen bestimmen und sogenannte Mutationsspektren für die die Mutationen auslösenden Substanzen erstellen. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen sollte es darum gehen, Zusammenhänge zwischen den induzierten DNA-Schäden und den erhaltenen Mutationsspektren von Hydroxylradikalen und Peroxynitrit herauszufinden. Außerdem sollten die Toxizität und die Mutagenität der beiden Agentien im gleichen System (bestehend aus dem Plasmid pSV2-gpt und den Bakterien E. coli DT-2) miteinander verglichen werden. Hierbei sollte insbesondere der Beitrag der DNA-Modifikation 8-oxoG, deren mutagenes Potential sehr hoch eingeschätzt wird (1.4.2.), an dem induziertem Mutationsspektrum herausgefunden werden. Zur Generierung von Peroxynitrit wurde SIN-1 (1.2.3.7., Epe et al. 1996a), und zur Freisetzung von Hydroxylradikalen 4-HPT in Kombination mit sichtbarem Licht (1.2.3.8., Epe et al. 1996) verwendet. Die Analyse der induzierten DNA-Schäden erfolgte mit dem in 1.2.3.1. beschriebenen DNA-Relaxationsassay, bei dem zur Schadensdetektion bifunktionelle DNA-Reparaturenendonukleasen als Sonden für eingesetzt werden. Diese erkennen spezifische DNA-Modifikationen, entfernen die modifizierte Base aus dem DNA-Strang und führen einen Einzelstrangbruch in die DNA ein. Die Zahl der erhaltenen Einzelstrangbrüche entspricht somit der Anzahl der zugrundeliegenden DNA-Modifikationen. Sie können in sogenannten DNA-Schadensprofilen dargestellt werden. Hierbei muss zwischen den Einzelstrangbrüchen, die durch die Reparaturenendonukleasen (sogenannte Endonuklease-sensitiven DNA-Modifikationen), und denen, die direkt durch das Agens induziert wurden, unterschieden werden. Im folgenden sind in den DNA-Schadensprofilen die direkten Einzelstrangbrüche bei Darstellung der Endonuklease-sensitive DNA-Modifikationen separat dargestellt und schon abgezogen.

3.1.1 Untersuchung von SIN-1

3.1.1.1 Schädigung von PM2-DNA mit SIN-1

Zur Untersuchung des durch Peroxynitrit induzierten Schadensprofils wurde PM2-DNA zellfrei mit SIN-1 geschädigt (siehe auch 2.2.3.2.1.). Bekanntermaßen führt die hierbei parallele Freisetzung von NO und $O_2\cdot^-$ zu der reaktiven DNA-schädigenden Spezies Peroxynitrit (siehe 1.2.3.7. und 1.2.2.). Nach der Schädigung wurde die Art der induzierten DNA-Schäden mit Hilfe des Plasmid-DNA-Relaxationsassays (siehe 2.2.3.) untersucht. Zur Interpretation der so ermittelten Schadensprofile wurde Tab. 1.2, die die Erkennungsspektren der eingesetzten DNA-Reparaturenendonukleasen zeigt, zugrundegelegt.

Im Schadensprofil (Abb. 3.1) überwogen Fpg-sensitive und OGG1-sensitive Läsionen im Verhältnis 2,5 : 1 gegenüber Endonuklease IV-sensitiven DNA-Modifikationen. Direkte, durch Peroxynitrit selbst eingefügte Einzelstrangbrüche entstanden im Verhältnis 0,8 : 1 zu Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen.

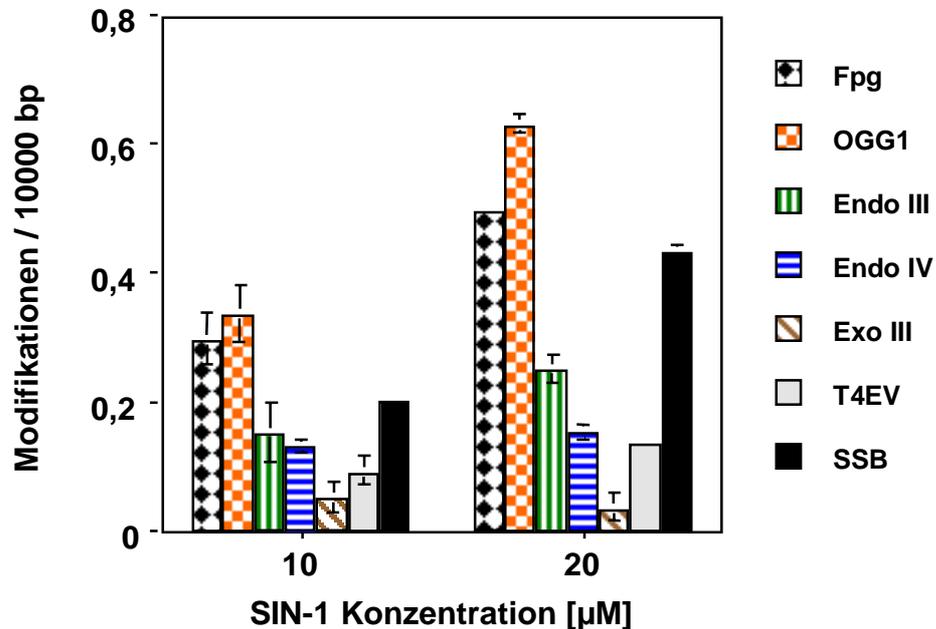


Abb. 3.1 Schadensprofil in PM2-DNA induziert durch SIN-1 (10 bzw. 20 µM) durch Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 1 h. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung ± S.D.

Da Fpg- und OGG1-Protein neben AP-Läsionen auch oxidative Purinmodifikationen erkennen (siehe Tab. 1.2), während Endonuklease IV nur AP-Läsionen erkennt (siehe Tab. 1.2), wurde daraus geschlossen, dass SIN-1 neben direkten Einzelstrangbrüchen vorwiegend oxidative Purinmodifikationen, zu denen auch 8-oxoG gehört, in der DNA induzierte. Andere Endonuklease-sensitive DNA-Modifikationen, wie oxidierte Pyrimidine, die durch Endonuklease III erkannt werden (siehe Tab. 1.2), und Pyrimidindimere, die durch T4 Endonuklease V erkannt werden (siehe Tab. 1.2), wurden nur in geringem Ausmaß bzw. nicht durch Peroxynitrit induziert. Das wurde aus dem niedrigeren Wert, der durch die beiden letztgenannten Endonukleasen ermittelten, im Vergleich zu dem mit Endonuklease IV ermittelten abgeleitet.

Interessanterweise führte die Schädigung von PM2-DNA mit SIN-1 in Gegenwart von BSA (bovinem Serumalbumin) während der Schädigung zu einer Änderung des Schadensprofils (Abb. 3.2, siehe 2.2.3.2.2.). Die Zahl der gemessenen Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen nahm mit steigender BSA-Konzentration ab, während die Zahl der Einzelstrangbrüche etwa in dem gleichen Maß zunahm. Es kam in etwa zu einer Umkehrung des Verhältnisses der beiden bestimmten Modifikationsarten zueinander. Ohne BSA-Zusatz während der Schädigung betrug das Verhältnis von SSB /Fpg 1:2, während es dagegen bei der höchsten verwendeten BSA-Konzentration von 1 mg/ml 1,6 : 1 betrug (siehe 3.1.1.1.).

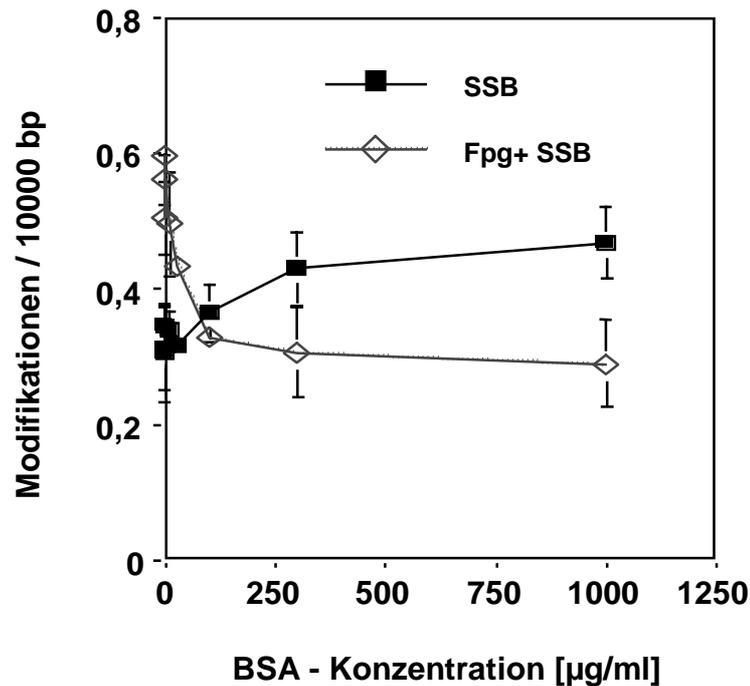


Abb. 3.2 Schädigung von PM2-DNA mit 20 µM SIN-1 (1h, 37°C) in Gegenwart von BSA (0-1000 µg/ml). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte einer Doppelbestimmung ± S.D.

3.1.1.2 Schädigung des Plasmids pSV2-*gpt* mit SIN-1

Für die weiteren Untersuchungen wurde das Plasmid pSV2-*gpt* verwendet, mit welchem nach Schädigung und Transformation in Bakterien eine Selektion von Mutanten und anschließende Analyse der Mutantenplasmide möglich ist (**siehe 1.1.4.**). Das durch SIN-1 Behandlung (**siehe 2.2.4.4.**) des Plasmids erhaltene Schadensprofil ist in **Abb. 3.3** dargestellt.

Das in dieser DNA ermittelte Schadensprofil war fast identisch mit dem in **3.1.1.1.** an PM2-DNA ermittelten, lediglich das Verhältnis von Einzelstrangbrüchen gegenüber Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen war signifikant zugunsten der Einzelstrangbrüche verschoben. Dies könnte in der geringeren Größe des Plasmids pSV2-*gpt* begründet sein. In dem untersuchten, mit dem Plasmid-DNA-Relaxationsassay detektierbaren Konzentrationsbereich (10-100 µM SIN-1) stieg die Anzahl der induzierten DNA-Schäden linear an, d.h. das Schadensprofil also das Verhältnis der verschiedenen Endonuklease-sensitiven Modifikationen und Einzelstrangbrüche zueinander änderte sich nicht.

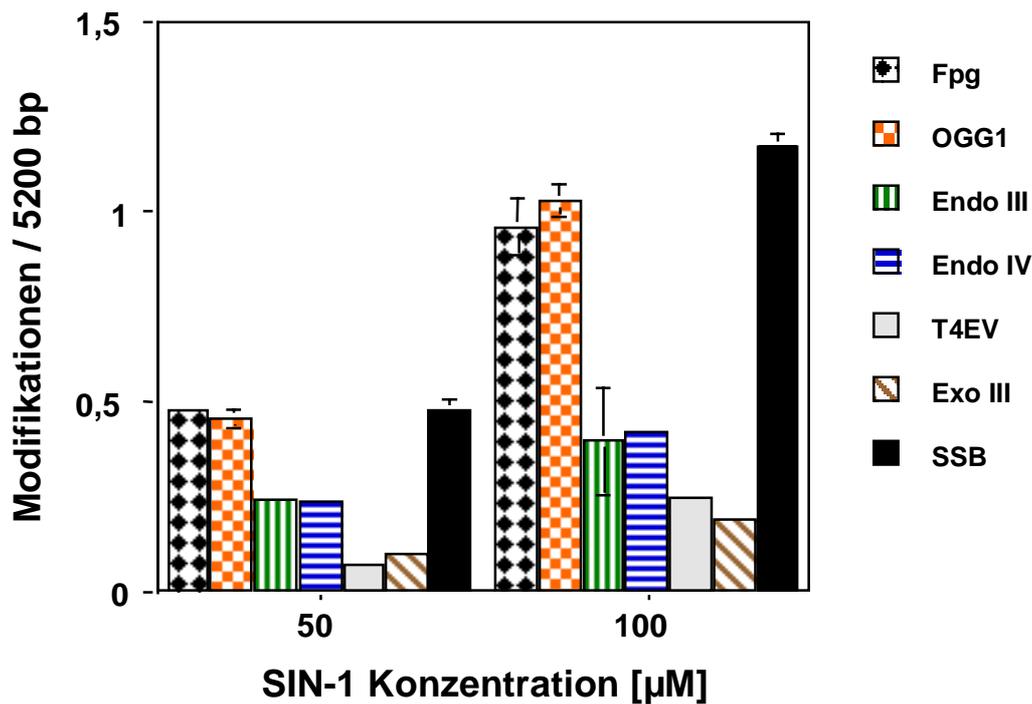


Abb. 3.3 Schadensprofil im Plasmid pSV2-*gpt* induziert durch SIN-1 (50 bzw. 100 µM) durch Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 1 h. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2-4 Bestimmungen \pm S.D.

Die Enzyminkubation (2.2.3.3.) wurde im Anschluss daran mit einer Kombination von Reparaturenzymen durchgeführt. Fpg-Protein wurde mit Endonuklease IV kombiniert eingesetzt, um genauere Aussagen über den Anteil an oxidierten Purinmodifikationen an den Fpg-sensitiven Modifikationen treffen zu können. Die Ergebnisse der Analyse der mit 100 µM SIN-1 geschädigten DNA sind in **Abb. 3.4** dargestellt. Man sieht, daß die Anzahl der durch die Kombination von Fpg-Protein und Endonuklease IV erkannten DNA-Modifikationen ungefähr der Summe der durch jedes Enzym einzeln erkannten Modifikationen entsprach. Berücksichtigt man hier wiederum, dass Endonuklease IV praktisch alle und ausschließlich AP-Läsionen erkennt, während Fpg-Protein neben AP-Läsionen auch oxidierte Purinmodifikationen erkennt (**Tab. 1.2**), lässt sich durch Abzug der Endonuklease IV-sensitiven Läsionen von der Zahl der durch die Enzymkombination detektierten Modifikationen die Zahl der durch SIN-1 induzierten oxidativen Purinmodifikationen berechnen. Setzt man diese Zahl mit der mit Fpg-Protein ermittelten ins Verhältnis, so ergibt, dass 90 % der durch Fpg-Protein erkannten DNA-Modifikationen oxidierte Purinmodifikationen waren.

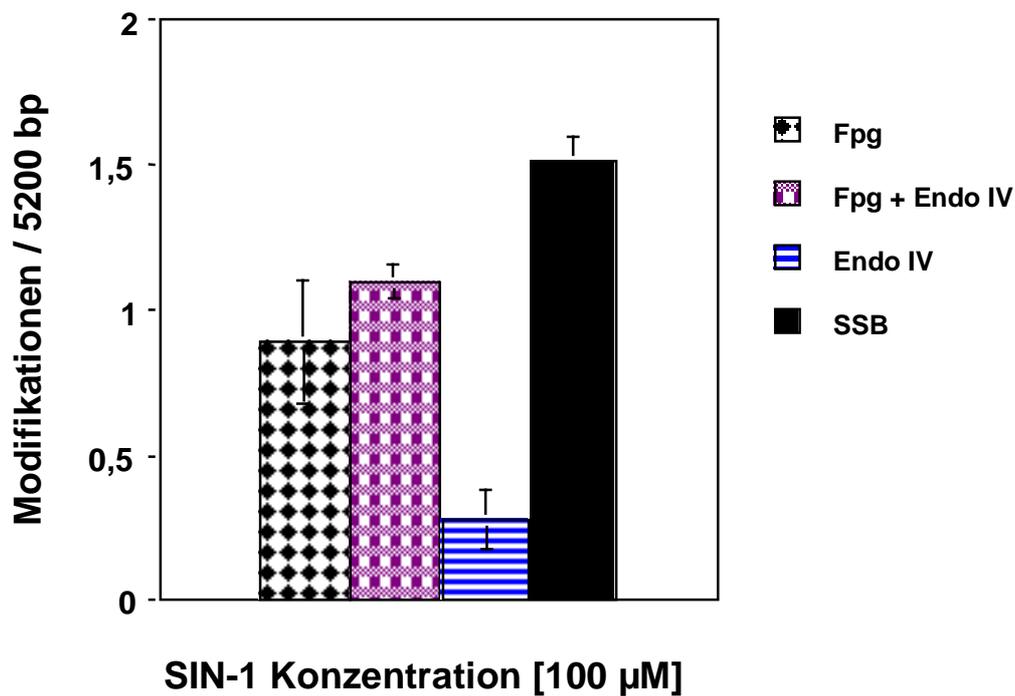


Abb. 3.4

Schädigung des Plasmids pSV2-*gpt* mit SIN-1 (100 μM, 1 h, 37°C). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus einer Doppelbestimmungen ± S.D.

3.1.1.3 Nachweis von 8-oxodG im Plasmid pSV2-*gpt* nach Schädigung mit SIN-1

Das mit SIN-1 geschädigte Plasmid (2.2.5.1.) wurde nach enzymatischer Totalhydrolyse (2.2.5.2.) HPLC-analytisch untersucht. Hierbei wurde 8-oxodG mittels elektrochemischem Detektor und die DNA-Nukleoside dT und dG mittels UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 290 nm bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch Vergleich der Flächen mit denen entsprechender externer Standards (2.2.5.4.). Die Chromatogramme sind in **Abb. 3.5** zu sehen.

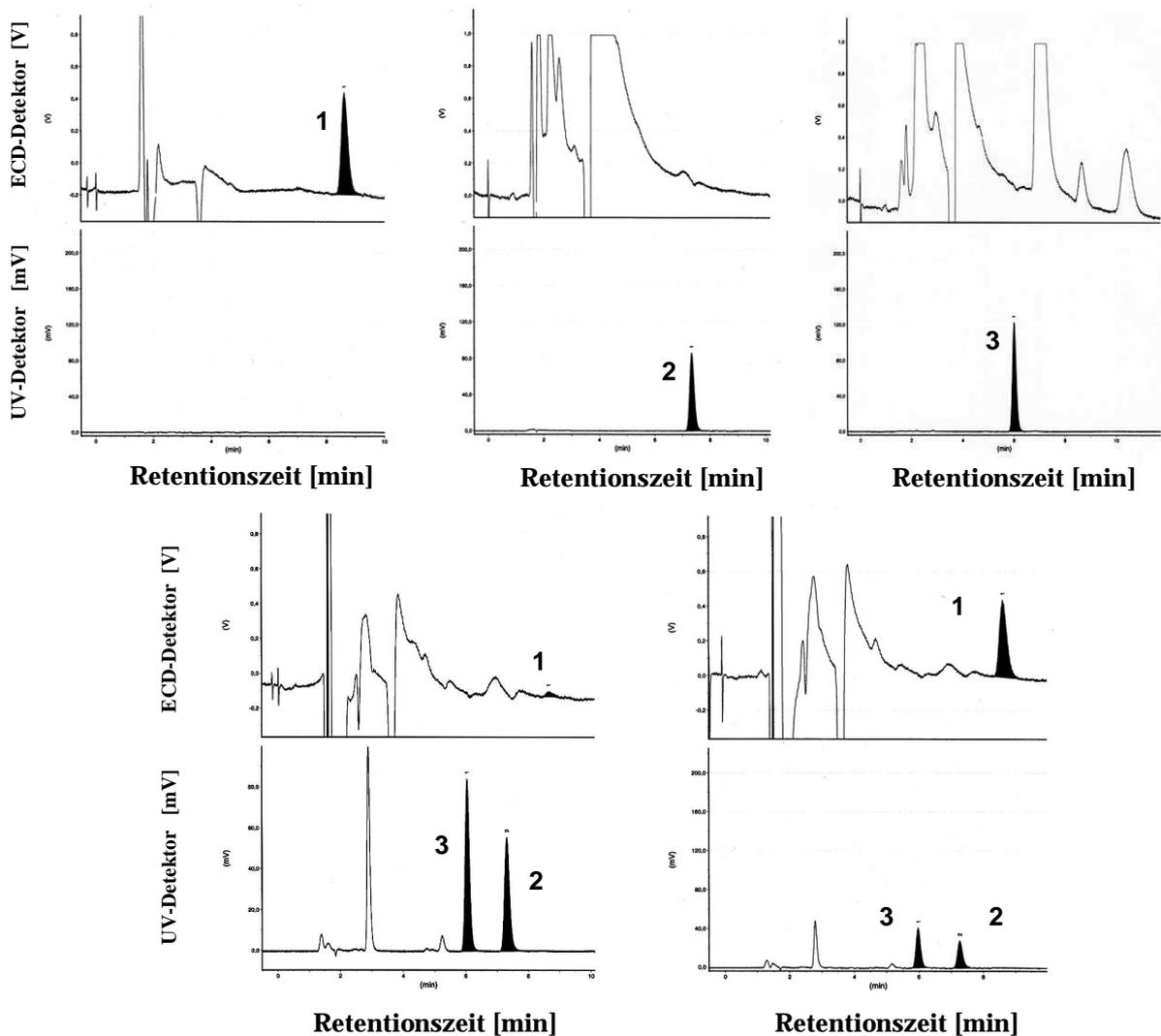


Abb. 3.5 HPLC-Chromatogramme von hydrolysiertem pSV2-*gpt*-Plasmid-DNA und den Standards. Dargestellt sind von links nach rechts:
Oben: 8-oxodG (1 pmol), dG (5 nmol), dT (5 nmol)
Unten: hydrolysierte, ungeschädigte DNA;
 hydrolysierte, mit 500 µM SIN-1 geschädigte DNA
 1 = 8-oxodG ; 2 = dT ; 3 = dG

Unter den gewählten Bedingungen der HPLC-analytischen Auftrennung betragen die Retentionszeiten 8 min. 39 s für 8-oxodG, 7 min. 20 s für dT und 6 min. für dG.

Die Menge des bestimmten 8-oxodG's ist in **Abb. 3.6** gegen die SIN-1 Konzentration aufgetragen.

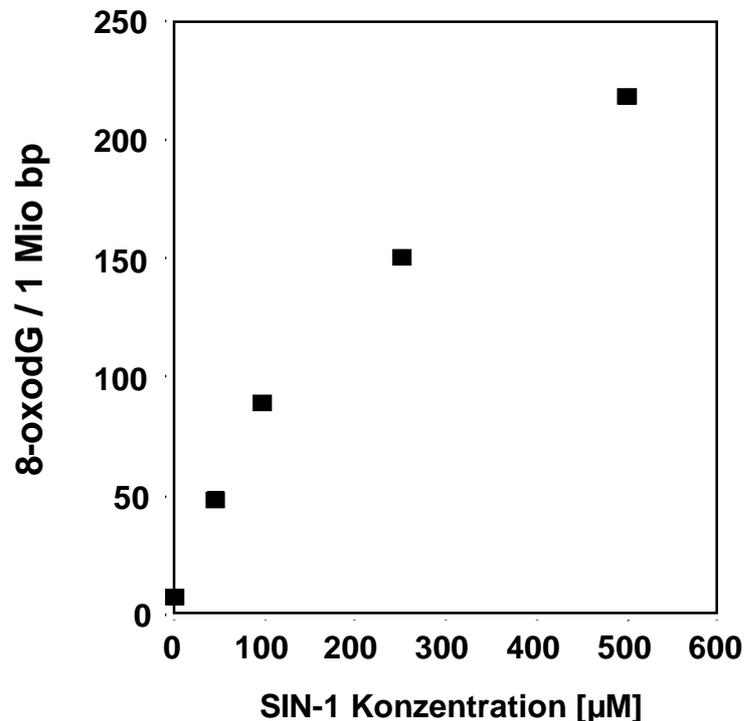


Abb. 3.6 8-oxodG-Gehalt im Plasmid pSV2-*gpt* nach Schädigung mit SIN-1 (50-500 μM , 1 h, 37°C).

Der Gehalt an 8-oxodG in der DNA stieg für die niedrigen SIN-1 Konzentrationen (bis 100 μM) linear mit der Konzentration des schädigenden Agens an. Für die höheren SIN-1 Konzentrationen flachte die Kurve dann leicht ab. Da für die hohen SIN-1 Konzentrationen (> 100 μM) die induzierten DNA-Schäden nicht mehr mit dem Relaxationsassay bestimmt werden können, weil die Detektionsgrenze des Systems erreicht ist, kann nicht überprüft werden, ob sich das Schadensprofil (also das Verhältnis der Endonuklease-sensitiven DNA-Modifikationen zueinander) bei SIN-1 Konzentrationen > 100 μM ändert. Für die SIN-1 Konzentrationen bis 100 μM kann jedoch der Gehalt von 8-oxoG an den Fpg-sensitiven Modifikationen errechnet werden, indem man den mittels HPLC-Analyse ermittelten Gehalt an 8-oxodG mit der im Relaxationsassay ermittelten Menge an Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen vergleicht. Hier ergab sich ein Anteil von $45 \pm 8\%$ 8-oxodG an den Fpg-sensitiven Modifikationen bzw. von $50 \pm 9\%$ 8-oxodG an den Fpg-sensitiven Purinmodifikationen (**siehe 3.1.1.2.**). Für den Anteil von 8-oxoG an den von OGG1-Protein erkannten DNA-Modifikationen konnte gleichermaßen ein Anteil von $47 \pm 2\%$ ermittelt werden.

3.1.1.4 Transformationsrate und Mutagenität in Bakterien

Das mit SIN-1 geschädigte Plasmid (2.2.3.2.1., 3.1.1.3.) wurde in *E. coli*-Bakterien transformiert und die Transformations- und Mutationsrate sowie die Mutationsfrequenz nach 2.2.4.8. bestimmt. Diese Versuche wurden durchgeführt, um Aussagen über die Toxizität der durch SIN-1 induzierten DNA-Schäden zu machen. Außerdem sollten versucht werden, die unter 2.1.1.2. ermittelten DNA-Modifikationen mit den durch sie verursachten Mutationen zu korrelieren.

Die Transformationsausbeuten der geschädigten Plasmide in *E. coli* Zellen sind in **Abb. 3.7** dargestellt. Hierbei wurde die Zahl der bei der Transformation mit ungeschädigtem Plasmid erhaltenen Transformanten gleich 100 % gesetzt.

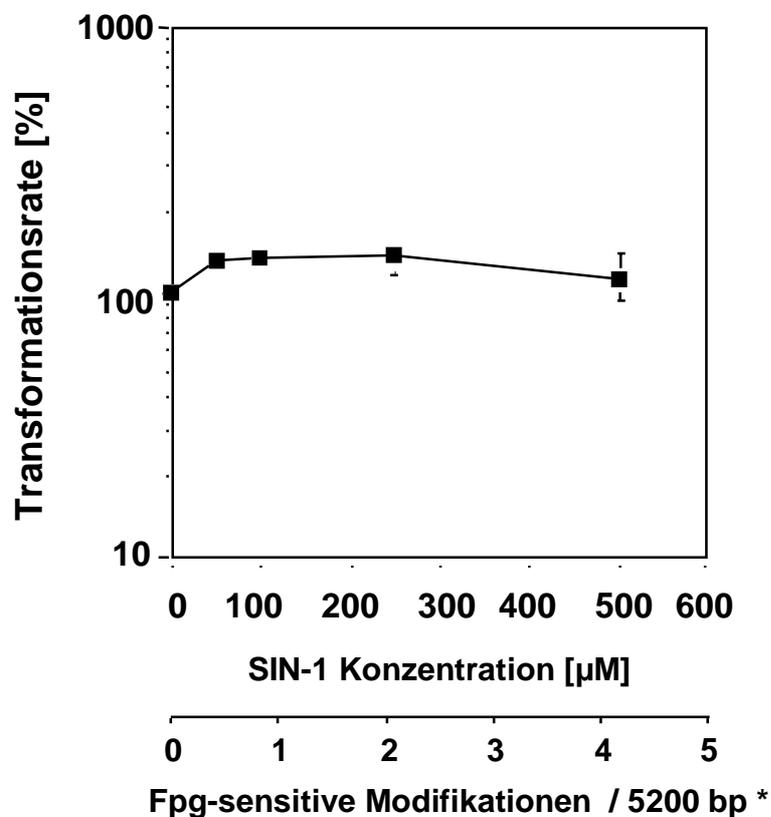


Abb. 3.7 Transformationsrate in *E. coli* nach Schädigung des Plasmids pSV2-*gpt* mit SIN-1 (50-500 µM, 1 h, 37°C; n=5).

* Fpg-Werte für SIN-1 Konzentrationen > 100 µM sind linear extrapoliert.

Die gewählten SIN-1 Konzentrationen bzw. die durch sie induzierten DNA-Schäden führten zu keiner nennenswerten Abnahme der Transformantenzahl. Die Hemmung der DNA-Replikation (Toxizität) der durch SIN-1 induzierten DNA-Schäden war also nur gering. Aus nicht geklärten Gründen wurden mit dem ungeschädigten Plasmid weniger Transformanten erhalten als mit dem mit niedrigen (< 250 µM) SIN-1 Konzentrationen geschädigten. Lediglich die Transformation mit dem mit 500 µM SIN-1 geschädigten Plasmid führte zu einem Rückgang der Transformationsrate um 20 % gegenüber der höchsten erhaltenen Transformationsrate. Dabei waren durch 500 µM SIN-1 etwa 4 Fpg-sensitive DNA-Modifikationen pro Plasmid induziert worden. (Die Zahl von 4 dürfte dabei noch leicht überschätzt sein, da für die Extrapolation der Fpg-Werte eine lineare

Schadenszunahme vorausgesetzt wurde, die nur für die Schädigungen mit bis zu 100 μM SIN-1 zutrifft, worauf die HPLC-Ergebnisse (siehe 3.1.1.3.) der Analyse von 8-oxodG hinweisen.)

In **Abb. 3.8** ist die Mutagenität der Schädigung mit SIN-1 dargestellt. Die Mutationsfrequenz ist hierzu gegen die SIN-1-Konzentration und gegen die HPLC-analytisch bestimmte Menge an 8-oxodG aufgetragen. Die Zahl der Mutanten stieg mit zunehmender Zahl an DNA-Modifikationen an. Die durch SIN-1 in die DNA eingefügten Schäden führten also nach Replikation zu Mutationen und wurden so im Genom fixiert (siehe 2.2.4.1.). Dabei führte die Induktion einer Fpg-sensitiven Modifikation /5200 bp zu etwa einem zusätzlichen *gpt*-Mutanten pro 10.000 Transformanten.

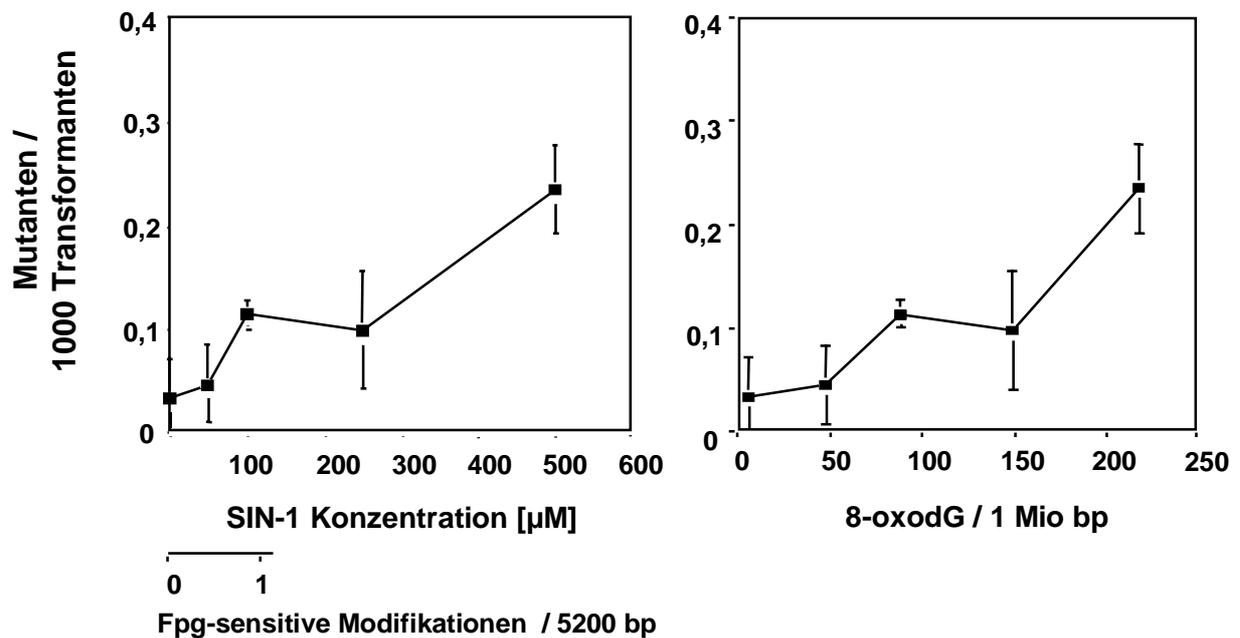


Abb. 3.8 Mutationsfrequenz im *gpt*-Gen nach Schädigung des Plasmids pSV2-*gpt* mit SIN-1 (50-500 μM , 1 h, 37°C; n=5) und Transformation in *E. coli*.

3.1.1.5 Sequenzanalyse des *gpt*-Gens der Mutanten

Um Aussagen über die Art der Mutationen machen zu können, wurden die Plasmide aus den unabhängig erhaltenen Mutanten isoliert, wenn die Mutationsfrequenz im Transformationsexperiment mindestens 5fach höher war als die der mit ungeschädigtem Plasmid transformierten Kontrolle (2.2.4.10.). Dies war nur zutreffend für die nach Schädigung mit 500 μ M SIN-1 erhaltenen Mutanten. Die isolierten Plasmide wurden sequenziert, und die erhaltenen Sequenzen mit Hilfe von Genbanken mit der Originalsequenz des *gpt*-Gens verglichen. Die Anzahl und die Art der durch SIN-1 induzierten Mutationen ist in **Tabelle 3.1** gezeigt.

Tabelle 3.1 Durch SIN-1 (1 h 37°C) induzierte Mutationen in der *gpt*-Sequenz des Plasmids pSV2-*gpt* (16 Sequenzierungen). Die Basen des codierenden (nicht transkribierten) Strangs sind unterstrichen.

Mutationsart	Anzahl
<u>GC</u> →CG	1
<u>CG</u> →GC	1
<u>GC</u> →TA	9
<u>CG</u> →AT	1
<u>GC</u> →AT	1
<u>TA</u> →AT	1
Insertion von Transposon Tn5*	1
Keine Mutation	1

* Transposone sind sogenannte „springende DNA-Elemente“, d.h. DNA-Abschnitte, die unabhängig ihren Platz innerhalb des Genoms wechseln können. Das Tn5 trägt die Information für Kanamycinresistenz.

Von den 16 untersuchten Mutanten handelte es sich bei 14 um Punktmutanten, wobei GC→TA Transversionen mit 71 % überwogen. Diese sind wahrscheinlich auf den Gehalt an 8-oxoG, der durch die SIN-1-Schädigung in der DNA induziert wurde, zurückzuführen (**siehe 1.4.2.**). In 90 % der Fälle befand sich das mutierte Guanin auf dem codierenden Strang.

Die Verteilung der Mutationen in der *gpt*-Sequenz ist in **Abb. 3.9** gezeigt.

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

Abb. 3.9 Mutationen in der *gpt*-Sequenz in *E. coli* DT-2, induziert durch SIN-1 (500 μ M, 1 h, 37°C).

Die Mutationen waren ungeordnet über den analysierten Genabschnitt verteilt. Es war nur ein Hotspot vorhanden, da 3 Mutanten an Position 304 eine Punktmutation zeigten, die zu einem Stopcodon statt eines Codons für Glutamin führte.

3.1.2 Untersuchung von 4-HPT

3.1.2.1 Schädigung mit 4-HPT

Zur Untersuchung des durch Hydroxylradikale induzierten Schadensprofils wurde das pSV2-*gpt*-Plasmid zellfrei mit 4-HPT geschädigt (Abb. 3.9, siehe auch 2.2.3.2.3.). Bekanntermaßen führen Hydroxylradikale zu oxidativen DNA-Schäden und Mutationen (siehe 1.3.1. und 1.4.2.). Hier wurde 4-HPT in Kombination mit sichtbarem Licht zur Generierung von Hydroxylradikalen verwendet (1.2.3.8., Epe et al. 1996). Nach der Behandlung wurde die Art der induzierten DNA-Schäden mit Hilfe des Plasmid-DNA-Relaxationsassays untersucht. Zur Interpretation der so ermittelten Schadensprofile wurde wiederum, wie auch unter 3.1.1. für SIN-1 Tab. 1.2, die die Erkennungsspektren der eingesetzten DNA-Reparaturenendonukleasen zeigt, zugrundegelegt. Die Anzahl der induzierten Modifikationen, die durch Inkubation mit verschiedenen DNA-Reparaturenzymen ermittelt wurde, ist in Abb. 3.10 dargestellt.

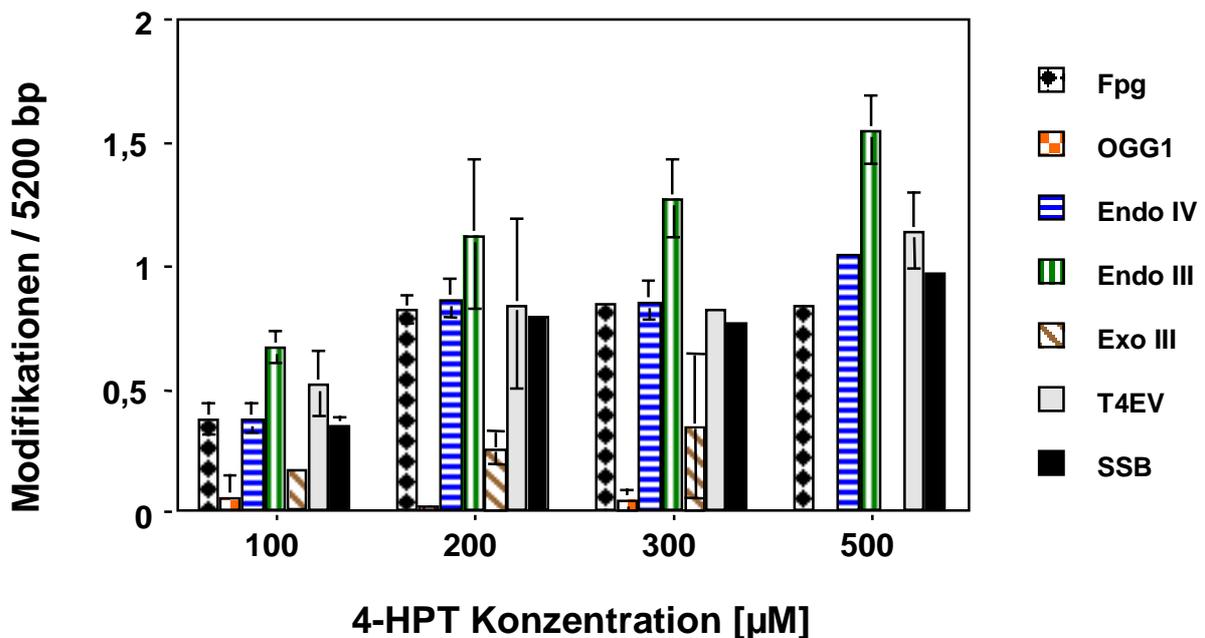


Abb. 3.10 DNA-Modifikationen im Plasmid pSV2-*gpt*, induziert durch 4-HPT (100-500 µM) + sichtbares Licht (450 kJ/m²). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2-4 Bestimmungen ± S.D.

Man sieht, dass die Anzahl der durch 4-HPT induzierten DNA-Modifikationen nur für die Schädigungen mit 100 bzw. 200 µM 4-HPT linear anstiegen. Für die höheren SIN-1 Konzentrationen (> 200 µM) kam es zu einer Sättigung. Das Schadensprofil änderte sich innerhalb des dargestellten Konzentrationsbereiches nicht. Endonuklease IV-sensitive, Fpg- und T4-Endonuklease V-sensitive DNA-Modifikationen entstanden etwa im gleichen Ausmaß wie direkte Einzelstrangbrüche. Die Zahl der Endonuklease III-sensitiven DNA-Modifikationen war dagegen höher, was auf eine Generierung von oxidierten Pyrimidinen durch die 4-HPT-Schädigung hinweist. Auffällig war weiterhin das geringe Ausmaß von oxidierten Purinmodifikationen, die durch OGG1-Protein erkannt werden. Dies ließ

vermuten, dass OGG1-sensitive oxidierte Purinmodifikationen nur zu einem ganz geringen Anteil durch 4-HPT induziert wurden. Das durch 4-HPT generierte Schadensprofil unterscheidet sich somit völlig von dem durch SIN-1 induziertem (**Abb. 3.3**) (außer dass jeweils etwa gleich viele Fpg-sensitive Modifikationen wie direkte Einzelstrangbrüche vorhanden waren), besonders in Bezug auf die OGG1-sensitiven Purinmodifikationen, die durch SIN-1 etwa im gleichen Verhältnis wie die Fpg-sensitiven induziert wurden.

Um genauere Aussagen über die Art der induzierten DNA-Modifikationen machen zu können, wurden wie auch unter **3.1.1.1.3. in Abb 3.4** Enzymkombinationen während der Enzyminkubation (**2.2.3.3.**) zur Schadensdetektion eingesetzt. Die mit den Enzymkombinationen erhaltenen DNA-Modifikationen sind in **Abb. 3.11** für die Schädigung mit 100 μM 4-HPT dargestellt.

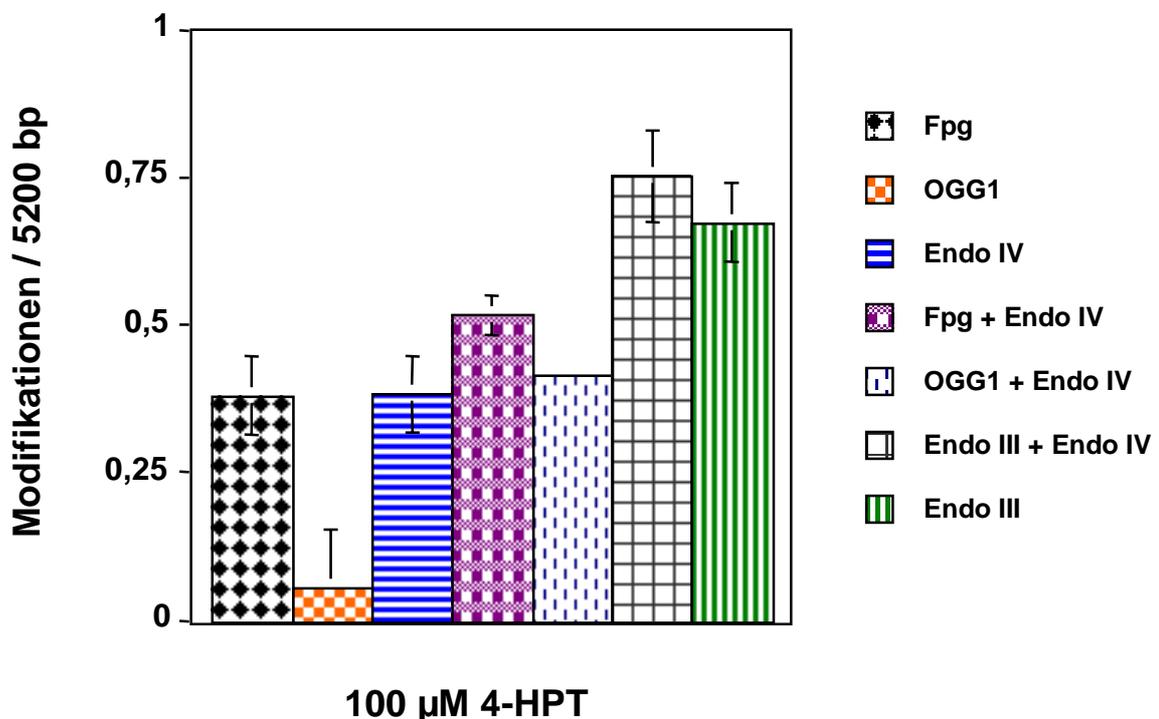


Abb. 3.11 Schädigung des Plasmids pSV2-*gpt* mit 4-HPT (100 μM , 20 min.) + sichtbares Licht (450 kJ/m^2). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus zwei Doppelbestimmungen \pm S.D.

Durch Abzug der von Endonuklease IV erkannten DNA-Modifikationen, bei denen es sich um AP-Läsionen handelt (**Tab. 1.2**), von den durch die Enzymkombinationen erhaltenen Werten lassen sich die Anteile der jeweiligen Basenmodifikationen, die von Fpg- und OGG1-Protein sowie von Endonuklease III spezifisch erkannt werden, berechnen. Das sind im Falle von Endonuklease III oxidierte Pyrimidine und im Falle von OGG1- und Fpg-Protein oxidierte Purinmodifikationen. Diese lassen sich dann getrennt nach DNA-Modifikationsarten in einem Schadensprofil zusammen den Einzelstrangbrüchen darstellen (**Abb. 3.12**).

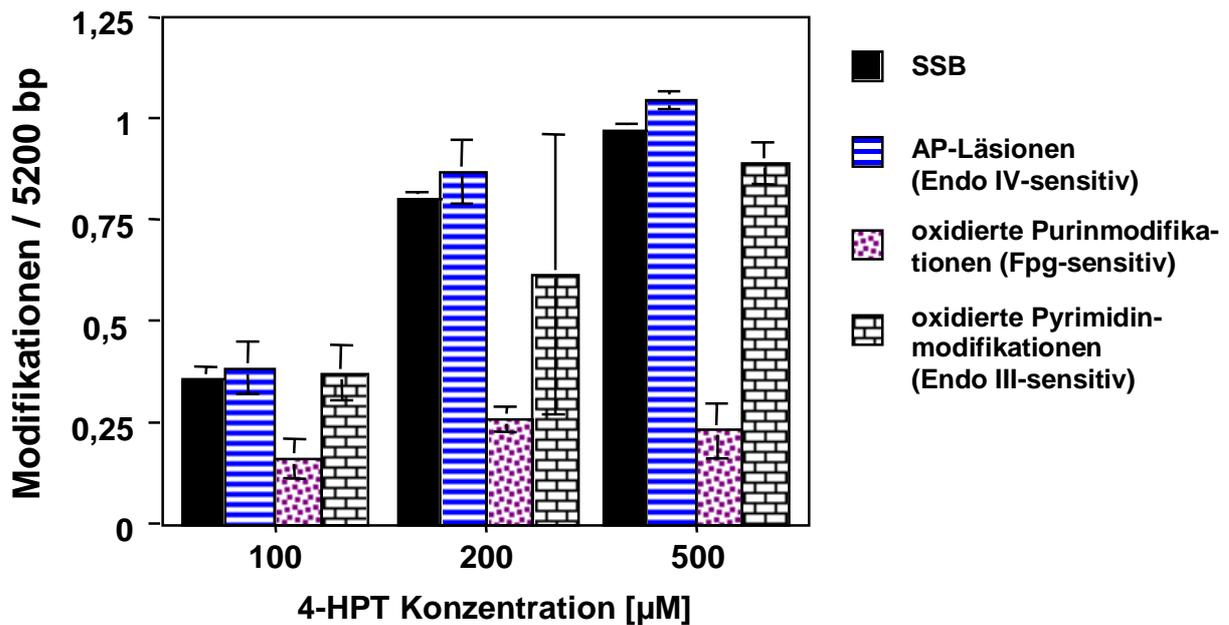


Abb. 3.12 Arten von DNA-Modifikationen im Plasmid pSV2-*gpt*, induziert durch 4-HPT (100-500 µM) + sichtbares Licht (450 kJ/m²). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2-4 Bestimmungen ± S.D.

Setzt man die Summe aller durch 4-HPT induzierten DNA-Modifikationen gleich 100 %, so ergibt sich, dass es sich bei etwa einem Drittel um direkte Einzelstrangbrüche handelte. Durch 4-HPT induzierte Endonuklease-sensitive DNA-Modifikationen machten insgesamt einen Anteil von etwa 66 % aus. Für die Anteile der einzelnen Basenmodifikationsarten ergaben sich 15 ± 3 % oxidierte Purinmodifikationen (sensitiv zu Fpg-Protein), 49 ± 6 % AP-Stellen (Endo IV-sensitiv) und 36 ± 7 % oxidierte Pyrimidine (Endo III-sensitiv). Von den Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen wurden nur 8 ± 6 % auch von OGG1-Protein erkannt entsprechend 25 ± 16 % der Fpg-sensitiven Purinmodifikationen. Alle von OGG1-Protein erkannten Basenmodifikationen waren oxidierte Purine.

Im Gegensatz dazu handelte es sich bei den durch SIN-1 induzierten DNA-Modifikationen zu 45 ± 4 % um Einzelstrangbrüche und bei den übrigen 54 % um Basenmodifikationen. Von den induzierten Basenmodifikationen waren 66 ± 2 % oxidierte Purine (sensitiv zu Fpg-Protein) und 34 ± 2 % AP-Läsionen (sensitiv zu Endonuklease IV) (siehe Abb.3.4). Das Verhältnis von induzierten AP-Läsionen zu Fpg-sensitiven Basenmodifikationen war also bei SIN-1 genau umgekehrt wie bei der Schädigung mit 4-HPT. Über die Anteile oxidierter OGG1-sensitiver Purinmodifikationen und oxidierter Endonuklease III-sensitiver Pyrimidinmodifikationen an der Gesamtzahl der induzierten DNA-Modifikationen können hier keine abschließenden Aussagen gemacht werden, da für die Schädigung mit SIN-1 keine Kombinationen der jeweiligen Enzyme mit Endonuklease IV durchgeführt wurden.

3.1.2.2 Nachweis von 8-oxodG im Plasmid pSV2-*gpt* nach Schädigung mit 4-HPT

Das mit 4-HPT geschädigte Plasmid (2.2.5.1.) wurde nach enzymatischer Totalhydrolyse (2.2.5.2.) HPLC-analytisch untersucht. Hierbei wurde 8-oxodG mittels elektrochemischem Detektor und die DNA-Nukleoside dT und dG mittels UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 290 nm bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte durch Vergleich der Flächen entsprechender externer Standards (2.2.5.4., siehe auch Abb. 3.5). Die Ergebnisse der HPLC-analytischen Untersuchung sind in Abb. 3.13 dargestellt.

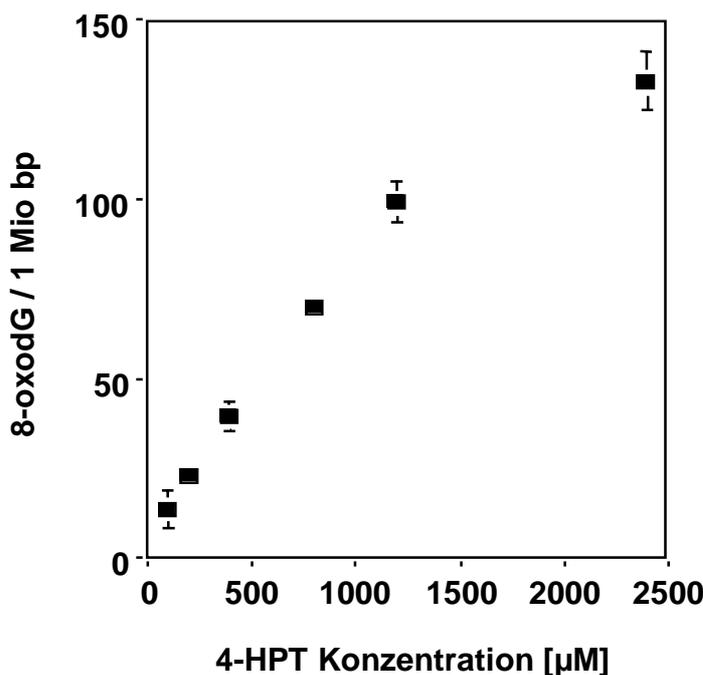


Abb. 3.13 8-oxodG-Gehalt im Plasmid pSV2-*gpt* nach Schädigung mit 4-HPT (100 μM , 1-12fach 200 μM) in Kombination mit sichtbarem Licht (450 kJ/m^2). Die angegebenen Werte resultieren aus einer Doppelbestimmung \pm S.D.

Der Gehalt an 8-oxodG stieg fast linear mit der Konzentration des schädigenden Agens 4-HPT an. Setzt man die mittels HPLC/ECD-Detektion ermittelte Menge an 8-oxodG mit der im Relaxationsassay ermittelten Anzahl Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen ins Verhältnis, so ergab sich ein Anteil von $16 \pm 2 \%$ 8-oxodG an den Fpg-sensitiven Modifikationen bzw. von $48 \pm 6 \%$ 8-oxodG an den Fpg-sensitiven Basenmodifikationen. Zur Berechnung der Fpg-sensitiven Modifikationen für die hohen 4-HPT-Konzentrationen wurde eine lineare Schadenszunahme angenommen, die bis 1200 μM 4-HPT richtig ist, wie aus **Abb. 3.13** hervorgeht. Vergleicht man den im Relaxationsassay ermittelten Anteil von OGG1-sensitiven DNA-Modifikationen (8 %) (3.1.2.1.) mit dem durch HPLC-Analyse ermittelten Anteil an 8-oxodG, so ergibt sich, dass es sich bei den durch OGG1-Protein erkannten DNA-Modifikationen wahrscheinlich um 8-oxoG. Vergleicht man den Wert für den Anteil von 8-oxoG an den Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen von 16 % (aus der HPLC-Analyse) mit dem von 8 % 8-oxoG, gemessen als OGG1-sensitive Modifikationen im Relaxationsassay, so ergibt sich eine gute Korrelation der beiden Methoden.

Im Vergleich mit SIN-1 (**Abb. 3.6**) wurden durch 4-HPT etwa 4fach niedrigere 8-oxoG-Mengen in der DNA induziert, man die Zahl der induzierten 8-oxoG pro induzierte Fpg-sensitive Basenmodifikationen betrachtet. Außerdem war auch der Anteil von 8-oxoG an den Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen im Falle der Schädigung mit SIN-1 (**3.1.1.3**) höher als bei der Schädigung mit 4-HPT.

3.1.2.3 Transformationsrate und Mutagenität in Bakterien

Das mit 4-HPT geschädigte Plasmid (**2.2.4.4**) wurde in *E. coli*-Bakterien transformiert und die Transformations- und Mutationsrate sowie die Mutationsfrequenz nach **2.2.4.8** bestimmt. Dadurch ist es möglich, Aussagen über die Toxizität der durch Behandlung mit 4-HPT induzierten DNA-Schäden zu machen und einen Bezug zwischen den im Relaxationsassay detektierten DNA-Modifikationen und den nach Transformation erhaltenen Mutationen herzustellen. Die Schädigung mit 4-HPT erfolgte hierzu mehrfach mit 200 μM Substanz in Kombination mit sichtbarem Licht, da eine höhere Konzentration von 4-HPT allein nicht zu einem linearen Anstieg der DNA-Modifikationen geführt hatte (**siehe Abb. 3.10**).

Die Hemmung der DNA-Replikation nach Transformation des geschädigten Plasmids in die *E. coli* Zellen nach Expression der transformierten DNA ist in **Abb. 3.14** dargestellt. Hierbei wurde die Zahl der bei der Transformation mit ungeschädigtem Plasmid erhaltenen Transformanten gleich 100 % gesetzt.

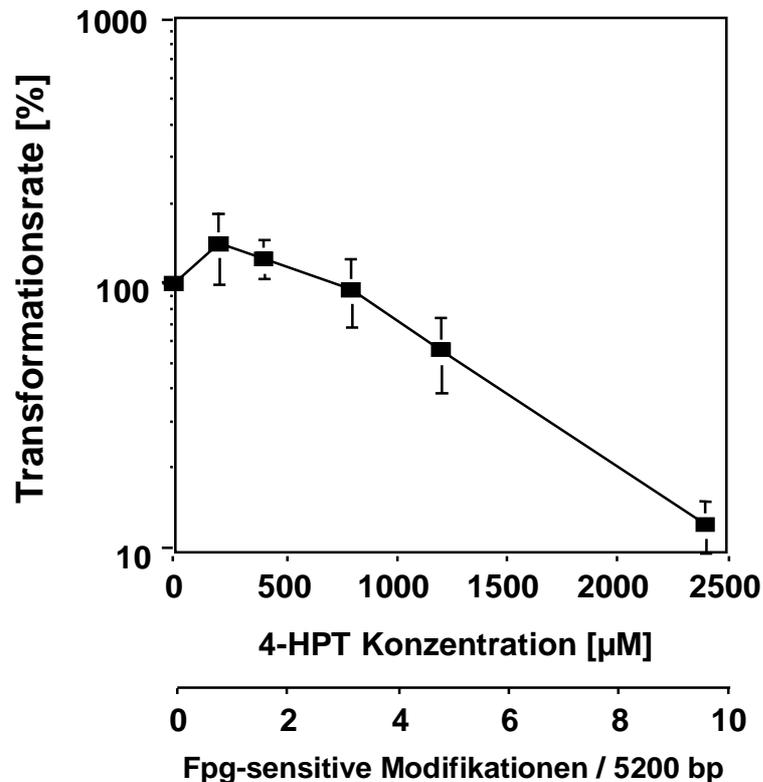


Abb. 3.14 Transformationsrate in *E. coli* DT-2 nach Schädigung des Plasmids pSV2-*gpt* mit 4-HPT (100 μM , 1-12fach 200 μM) in Kombination mit sichtbarem Licht (450 kJ/m^2); $n=6$.
* Fpg-Werte für 4-HPT Konzentrationen > 200 μM sind linear extrapoliert.

Die gewählten 4-HPT Konzentrationen bzw. die durch sie induzierten DNA-Schäden führten zu einer signifikanten Abnahme der Transformantenzahl, so dass man von einer hohen Toxizität (eigentlich: Hemmung der DNA-Replikation) durch die von 4-HPT induzierten DNA-Schäden ausgehen kann. Bei der höchsten Konzentration von 4-HPT wurden nur 10 % der Transformanten erhalten, die durch Transformation mit ungeschädigtem Plasmid erhalten wurden. Dabei waren durch 2400 μM 4-HPT etwa 10 Fpg-sensitive DNA-Modifikationen pro Plasmid induziert worden. (Die Zahl von 10 dürfte dabei leicht überschätzt sein, da für die Extrapolation der Fpg-Werte eine lineare Schadenszunahme vorausgesetzt wurde, die nur bis 1200 μM 4-HPT zutrifft, was aus den HPLC-Ergebnissen (siehe 3.1.2.2.) der Analyse von 8-oxodG hervorgeht.)

Im Vergleich zu den durch SIN-1 in der DNA-induzierten DNA-Schäden (**Abb. 3.7**) waren die durch 4-HPT induzierten sehr viel toxischer.

In **Abb. 3.15** ist die Mutagenität der 4-HPT-Schädigung dargestellt. Die Mutationsfrequenz wurde hierzu gegen die 4-HPT Konzentration gegen die 4-HPT-Konzentrationen und gegen die HPLC-analytisch bestimmte Menge an 8-oxodG aufgetragen.

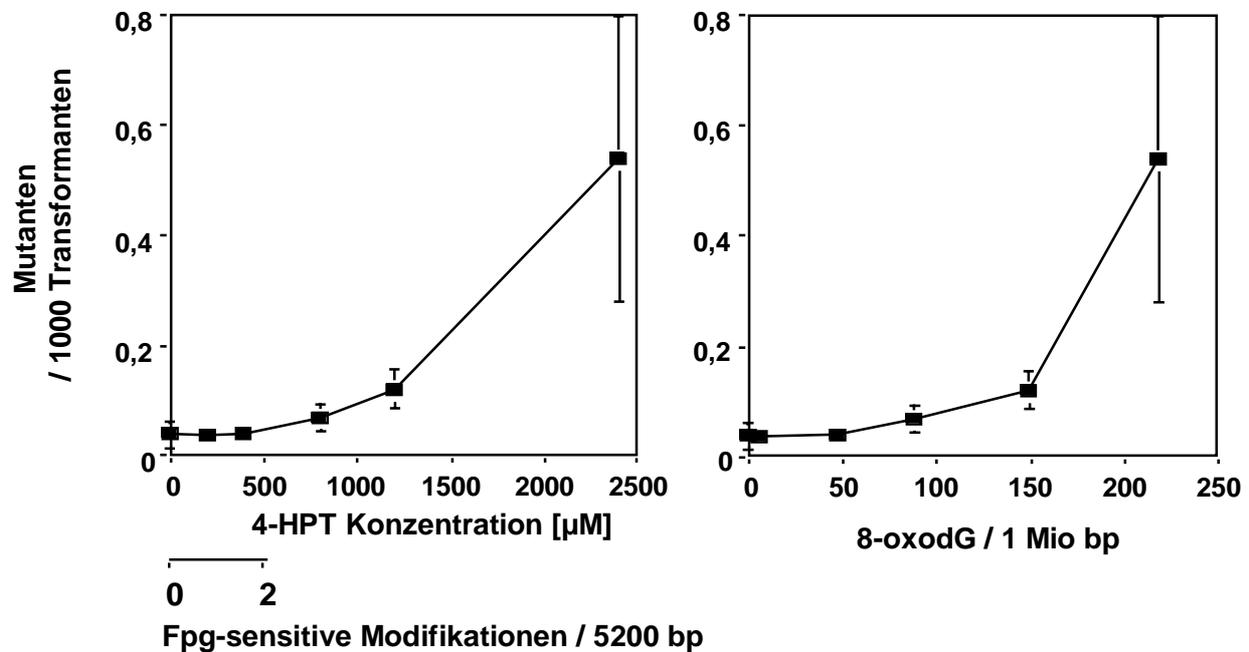


Abb. 3.15 Mutationsfrequenz im *gpt*-Gen nach Schädigung des Plasmids pSV2-*gpt* mit 4-HPT (100 µM, 1-12fach 200 µM) in Kombination mit sichtbarem Licht (450 kJ/m²); n=6 und Transformation in *E. coli*.

Die Induktion einer Fpg-sensitiven Modifikation /5200 bp führte dabei zu etwa 2 zusätzlichen *gpt*-Mutanten pro 100.000 Transformanten. Im untersuchten System war SIN-1 (**Abb. 3.8**) in Bezug auf die Fpg-sensitiven Modifikationen etwa 5fach mutagener als 4-HPT. (Der Berechnung wurde zugrundegelegt, dass 5 Fpg-sensitive Modifikationen etwa zu 0,1 *gpt*-Mutanten pro 1.000 Transformanten führten.)

3.1.2.4 Sequenzanalyse des *gpt*-Gens der Mutanten

Wie auch unter 3.1.1.4. für SIN-1 beschrieben, wurden die Plasmide der nach Transformation erhaltenen Mutanten isoliert (2.2.4.10.) und durch die Firma GENterprise™ sequenziert. Mit Hilfe von Gendatenbanken wurden die erhaltenen Sequenzen mit der Originalsequenz des *gpt*-Gens verglichen und so die Arten der Mutationen bestimmt.

Tabelle 3.2 Durch 4-HPT (2400 µM) induzierte Mutationen in der *gpt*-Sequenz des Plasmids pSV2-*gpt* (27 Sequenzierungen). Die Basen des codierenden (nicht transkribierten) Strangs sind unterstrichen.

Mutationsart	Anzahl
<u>GC</u> →CG	4
<u>GC</u> →AT	16
<u>CG</u> →TA	6
<u>TA</u> →AT	2
<u>AT</u> →GC	1
Deletion 1 Base	1
Insert	1

Von den 27 untersuchten Mutanten handelte es sich bei 24 um Punktmutanten, worunter 5 Doppelmutanten waren. Die Bezeichnung Doppelmutanten für die hier gefundenen Plasmide mit zwei Mutationen ist streng genommen nicht richtig, da die zweite Mutation jeweils außerhalb der codierenden Sequenz lag, und zwar 3mal bei Position -131, einmal bei Position -55 und einmal bei Position 509. (Die Zahl von 5 ist außerdem sehr hoch, wenn man die geringe Wahrscheinlichkeit des Eintretens von Doppelmutationen bedenkt, so dass es eigentlich aufgrund der geringen Anzahl der hier untersuchten Mutanten gar nicht möglich ist, eine Doppelmutante zu erhalten.) Bei den Punktmutationen waren GC→AT Transversionen mit 76 % vorherrschend. In 73 % der Fälle befand sich das mutierte Guanin auf dem codierenden Strang. Auffallend war, dass keine GC→TA Transversionen gefunden wurden, die auf 8-oxoG im geschädigten Plasmid zurückzuführen wären. Nur einen geringen Anteil an 8-oxodG von den durch 4-HPT induzierten DNA-Modifikationen hatte auch schon die HPLC/ECD-analytische Bestimmung **Abb. 3.13** aufgezeigt sowie die niedrigen Werte OGG1-sensitiver Purinmodifikationen des Schadensprofils (**Abb. 3.10**).

3.1.3 Untersuchung von Dipropylentriamin-NONOat

Zur Untersuchung der durch Stickstoffmonoxid (NO) induzierten DNA-Schäden wurde PM2-DNA zellfrei mit DPTA-NONOat (1.2.3.6.) geschädigt und anschließend im Relaxationsassay untersucht (Abb. 3.17, siehe auch 2.2.3.2.4.). Bekanntermaßen führt NO als in Lösung eingeleitetes Gas oder freigesetzt aus Spermin-NONOat oder DEA-(Diethylamin-) NONOat zu DNA-Schäden, die in verschiedenen Testsystemen zu Mutationen führen und so detektiert werden können (siehe 1.4.1.). Der Zusammenhang zwischen den Mutationen und den zugrundeliegenden DNA-Schäden ist jedoch noch weitgehend ungeklärt. Hier wurde DPTA-NONOat zur Schädigung verwendet, um wie auch für SIN-1 (3.1.1.) und 4-HPT (3.1.2.) in dem System pSV2-*gpt* / E. coli DT-2 Aussagen über das mutagene Potential von NO und die Art der durch NO induzierten DNA-Schäden zu erhalten.

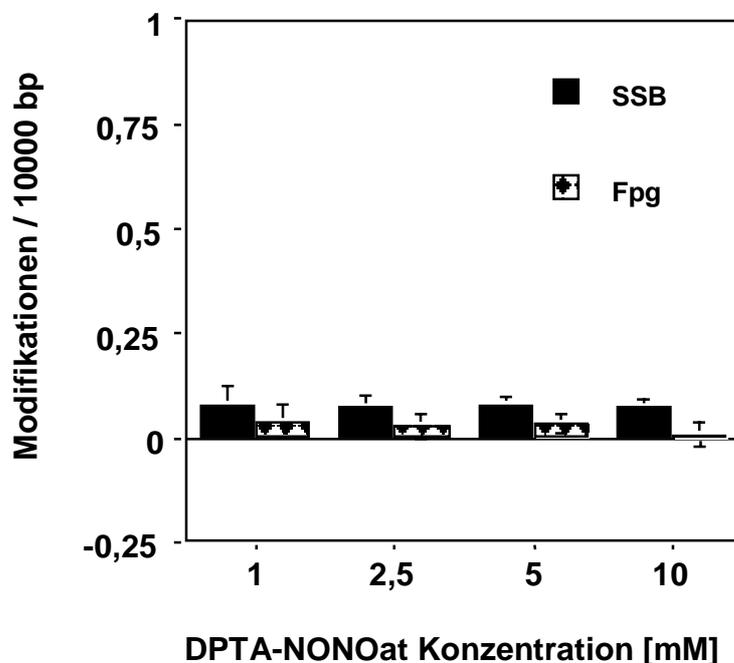


Abb. 3.17 Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Läsionen in PM2-DNA induziert durch DPTA-NONOat (1-10 mM) durch Inkubation im Wasserbad bei 37°C für 3 h. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D; n=2.

Unter den Versuchsbedingungen konnten keine signifikanten DNA-Schäden in PM2-DNA induziert werden. Da weder Fpg-sensitive Basenmodifikationen noch Einzelstrangbrüche in höherem Ausmaß erhalten wurden, wurden keine weiterführenden Untersuchungen der Toxizität und Mutagenität von DPTA-NONOat durchgeführt.

3.2 Untersuchungen in Säugerzellen

Die Versuche an zellfreier DNA hatten ergeben, dass sowohl Hydroxylradikale, generiert durch 4-HPT in Kombination mit sichtbarem Licht, als auch Peroxynitrit, freigesetzt aus SIN-1, zu DNA-Schäden und Mutationen führen (**siehe 3.1.1. und 3.1.2.**). Dagegen konnten nach Behandlung von DNA mit DPTA-NONOat, welches zeitabhängig NO freisetzt, zellfrei keine DNA-Schäden detektiert werden. Hieraus kann jedoch nicht geschlossen werden, dass NO kein DNA-schädigendes oder mutagenes Potential besitzt. Es ist nämlich möglich, dass zur „Aktivierung“ des DNA-schädigenden Potentials weitere Faktoren nötig sind, die zellfrei nicht vorhanden sind. Daher sollte im folgenden der Einfluss von DPTA-NONOat im zellulären System untersucht werden. Wie auch unter **1.2.** und in **1.4.** beschrieben kann NO z. B. nach Reaktion mit Sauerstoff zur Bildung reaktiverer Sauerstoff- bzw. Stickstoffspezies führen, die mit der DNA und auch mit anderen Zellbestandteilen, wie beispielsweise Proteinen und Membranen, reagieren können.

Im folgenden Abschnitt der vorliegenden Arbeit sollte Stickstoffmonoxid (NO) als sowohl endogen in Zellen als auch exogen in der Umwelt vorkommende Spezies daher in Bezug auf die Beeinflussung (i) der Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Schäden, (ii) der Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden, (iii) der Reparatur induzierter DNA-Schäden, (iv) des Glutathionspiegels, (v) der Bildung von Mikrokernen und (vi) der Zellproliferation untersucht werden.

3.2.1 Einfluss endogen gebildeten Stickstoffmonoxids

Zur Untersuchung des Einflusses von endogen gebildetem (endogenem) NO wurden B6 Mausfibroblasten-Zelllinien (**siehe 2.7.1.**) untersucht. Im Vordergrund standen dabei Experimente mit den mit der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und dem leeren Vector transfizierten Zelllinien B6-INOS und B6-Vector-only. Die parentale Zelllinie (B6-Wildtyp) wurde als zweite Kontrollzelllinie zu den B6-INOS-Zellen neben der B6-Vector-only-Zelllinie verwendet. Sie wird im folgenden als „Wildtyp“-Zelllinie bezeichnet. Die iNOS wurde dabei konstitutiv in den transfizierten Zellen exprimiert. Darüberhinaus konnte die NO-Synthese zusätzlich durch Zugabe von Natriumbutyrat (Nab.) ins Zellkulturmedium induziert werden, was zu einer erhöhten NO-Freisetzung der Zellen führte.

3.2.1.1 Stickstoffmonoxid-Konzentrationen in B6 Mausfibroblasten

B6-INOS-Zellen wurden, wie unter **2.2.7.3.1.** beschrieben, mit Nab. behandelt und mit gleich behandelten Wildtyp- bzw. B6-Vector-only-Zellen im Griess-Assay (**2.2.11.**). Die Nitritkonzentration im Medium wurde als Maß für die endogene NO-Produktion ermittelt (**siehe auch 1.2.2.**) und ist in **Tab. 3.3** dargestellt.

Tabelle 3.3 Generierung von NO (gemessen als Nitrit) in Wildtyp-, B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen mit und ohne Behandlung mit Nab. für 12 h bzw. 24 h. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D.

Zelllinie	Nitritkonzentration [μ M]		
	ohne iNOS-Induktion	mit iNOS-Induktion *	
		12 h	24 h
Wildtyp	0,1 \pm 0,2	0,3 \pm 0,2	0,5 \pm 0,2
B6-Vector-only	0,1 \pm 0,2	0,3 \pm 0,3	0,5 \pm 0,2
B6-INOS	2,8 \pm 1,2	5,7 \pm 2,3	8,2 \pm 3,9

* Inkubation mit 5 mM Nab. für 12 h oder 24 h am Ende der 48stündigen Kulturzeit der Zellen.

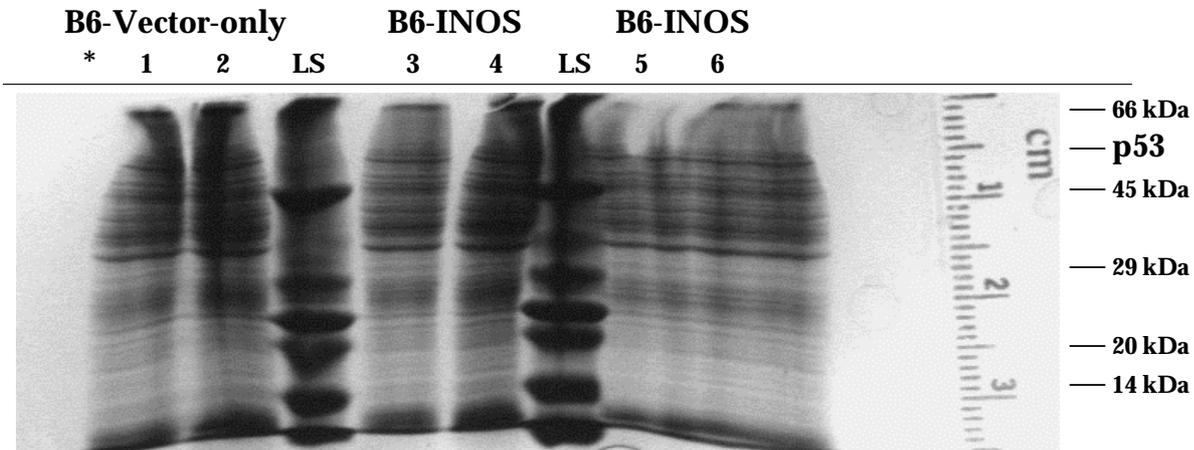
Man sieht, dass die mit der induzierbaren NO-Synthase transfizierten B6-INOS-Zellen im Gegensatz zu den Kontrollzellen eine signifikante NO-Produktion zeigten, die durch Induktion der iNOS für 12 h auf das Doppelte und für 24 h auf das Dreifache erhöht wurde. Die NO-Produktion wurde durch Zugabe von L-Arginin in das Zellkulturmedium nicht gesteigert (**Daten nicht gezeigt**), was zeigt, dass der intrazelluläre L-Arginin-Gehalt der B6-INOS-Zellen nicht limitierend für die NO-Generierung war.

3.2.1.2 Bestimmung des p53-Status der Zellen

Es ist bekannt, dass erhöhte NO-Konzentration zu einer Aktivierung des p53-Proteins führen können, was wiederum verschiedene Auswirkungen haben kann, wie z. B. das Anhalten des Zellzyklus und Einleitung der Apoptose (1.4). Die untersuchte B6-INOS-Zelllinie zeigte nach Induktion der iNOS keine Apoptose, wie sie beispielsweise in RAW-Makrophagen nach Induktion der iNOS mit γ -Interferon und Lipopolysacchariden beobachtet werden konnte (Messmer & Brüne 1996, Kim et al. 2000). Um sicherzustellen, dass die Zellen p53-profizient waren, wurde daher der p53-Status mittels Western Blot (2.2.12.4.) nach SDS-Gel Elektrophorese (2.2.12.3.) ermittelt.

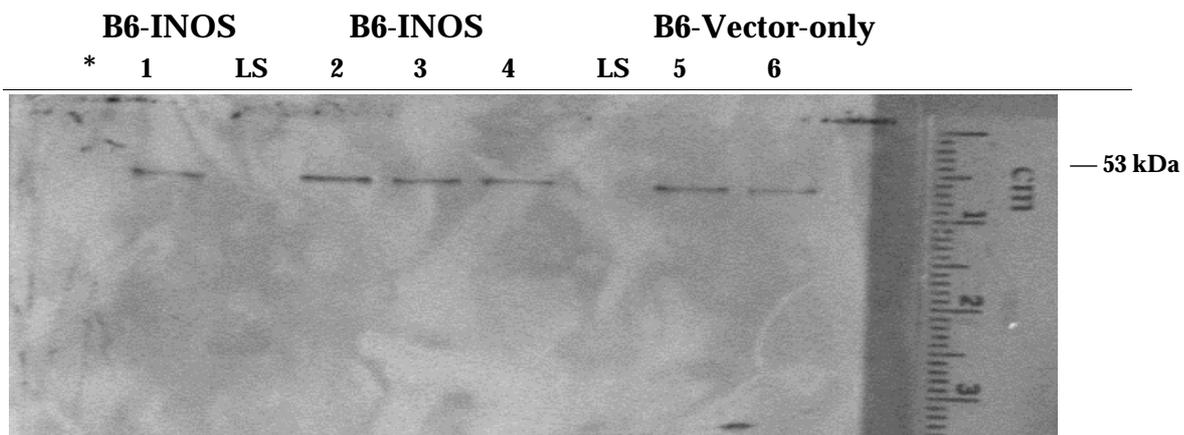
Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.18** (SDS-Gel) und **Abb. 3.19** (Western Blot) dargestellt.

Abb. 3.18 SDS-Gel von B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen mit und ohne Behandlung mit Nab. für 24 h.



- * 1 = B6-Vector-only-Zellen ohne Nab.-Behandlung; 30 µg Protein
 2 = B6-Vector-only-Zellen ohne Nab.-Behandlung; 50 µg Protein
 3 = B6-INOS-Zellen ohne Nab.-Behandlung; 30 µg Protein
 4 = B6-INOS-Zellen ohne Nab.-Behandlung; 50 µg Protein
 5 = B6-INOS-Zellen mit 24 h iNOS-Induktion; 30 µg Protein
 6 = B6-INOS-Zellen mit 24 h iNOS-Induktion; 50 µg Protein
 LS= Protein-Längenstandard

Abb. 3.19 Western Blot von B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen mit und ohne Behandlung mit Nab. für 12 h bzw. 24 h.



- * 1 = B6-INOS-Zellen mit 24 h Induktion der iNOS; 25 µg Gesamtprotein
 2 = B6-INOS-Zellen mit 12 h Induktion der iNOS; 25 µg Gesamtprotein
 3 = B6-INOS-Zellen ohne Nab.-Behandlung; 30 µg Gesamtprotein
 4 = B6-INOS-Zellen ohne Nab.-Behandlung; 20 µg Gesamtprotein
 5 = B6-VO-Zellen ohne Nab.-Behandlung; 25 µg Gesamtprotein
 6 = B6-VO-Zellen ohne Nab.-Behandlung; 20 µg Gesamtprotein
 LS= Protein-Längenstandard

Die SDS-Gel Elektrophorese führte zu einer guten Auftrennung der im Zellysat enthaltenen Proteine über die gesamte Laufstrecke. Alle Zellysate führten soweit abschätzbar qualitativ zu den gleichen Proteinbanden. Die Position im Gel, bei der sich nach Vergleich der Laufstrecken der aufgetrennten Proteine mit dem aufgetragenen Längenstandard das p53-Protein befinden müßte, ist mit „p53“ gekennzeichnet. Im Western Blot ließ sich das p53-Protein eindeutig mit Hilfe spezifischer Antikörper identifizieren. Die Transfektion und die Expression des Gens für die induzierbare NO-Synthase wie auch die zusätzliche Induktion des Gens durch die Nab.-Zugabe hatten also keinen Einfluss auf den p53-Status der Zellen. Quantitative Unterschiede ließen sich an Hand der durchgeführten Untersuchungen nicht erkennen.

3.2.1.3 Untersuchungen mittels der Alkalischen Elutionsmethode

Zur Untersuchung mittels der Alkalischen Elutionsmethode wurde, wie unter 2.2.7. beschrieben, verfahren. Es sollte herausgefunden werden, ob NO, obwohl es in den zellfreien Experimenten (3.1.3.) an PM2-DNA nicht zu DNA-Schäden geführt hatte, im zellulären Kontext in der Lage ist, DNA-Schäden zu verursachen oder deren Induzierbarkeit und Reparatur zu beeinflussen.

3.2.1.3.1 Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Schäden in B6 Mausfibroblasten

B6-INOS-Zellen wurden, wie unter 2.2.7.3.1. beschrieben, mit Nab. behandelt und mit gleich behandelten Wildtyp- bzw. B6-Vector-only-Zellen auf die Alkalische Elution aufgetragen (2.2.7.4.). Die Zahl der Einzelstrangbrüche und der Fpg-sensitiven Läsionen wurde ermittelt und ist in Abb. 3.20 dargestellt.

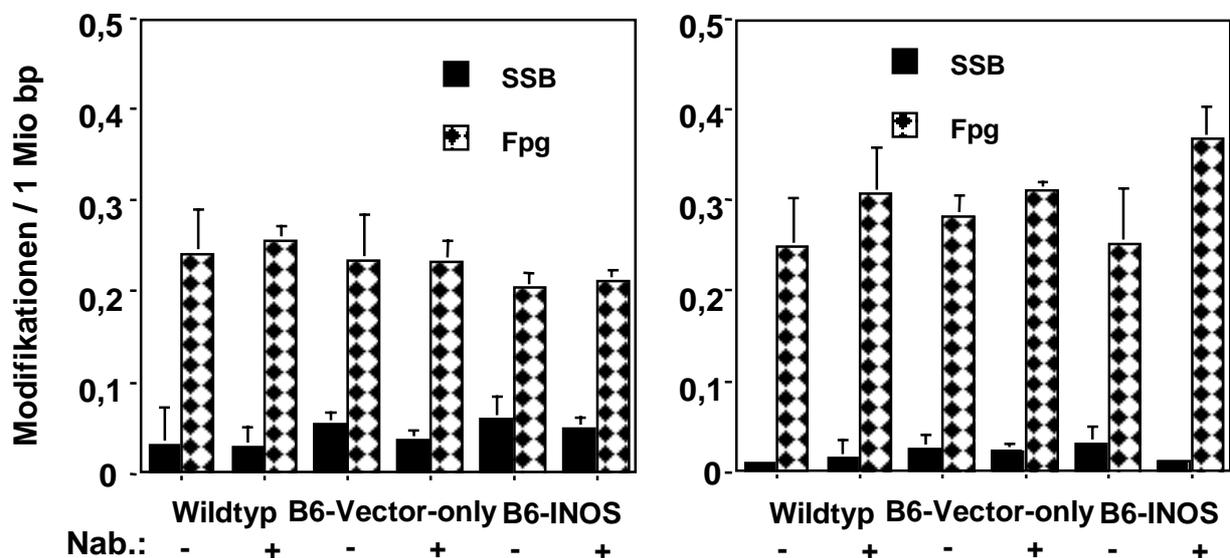


Abb. 3.20 Gleichgewichtsspiegel an Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Läsionen in Wildtyp-, B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen nach Behandlung mit Nab. für 12 h (links) bzw. 24 h (rechts). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D. (n=3)

Weder die konstitutive NO-Freisetzung der B6-INOS-Zellen noch die erhöhte NO-Produktion nach Induktion der NO-Synthase für 12 oder 24 h führten zu einer

Beeinflussung der Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Modifikationen, gemessen als Fpg-sensitive Läsionen, im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen und den Vector-only-Kontrollzellen. Die intrazelluläre NO-Produktion führte also zu keinen nachweisbaren oxidativen DNA-Schäden. Die Anzahl der Fpg-sensitiven Läsionen betrug in allen untersuchten Zelllinien etwa 0,3 Modifikationen / 1 Mio bp.

3.2.1.3.2 Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden in B6 Mausfibroblasten

Da, wie unter 3.2.1.3.1. gesehen die Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Modifikationen durch die endogene NO-Freisetzung nicht beeinflusst wurden, stellte sich als nächstes die Frage, ob die Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden beeinflusst würde. Hierzu wurden die Zelllinien mit verschiedenen DNA-schädigenden Agentien behandelt (siehe auch 1.2.3.).

3.2.1.3.2.1 Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden durch Ro 19-8022

Wildtyp-, B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen wurden mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022 behandelt (2.2.7.3.2.) und anschließend mittels der Alkalischen Elutionstechnik auf DNA-Schäden untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.21 dargestellt. Der Photosensibilisator wurde gewählt, weil er bekanntermaßen einen hohen Anteil an oxidativen DNA-Schäden, sensitiv zu Fpg-Protein, in zellulärer DNA induziert. Davon handelt es sich bei 69 % um 8-oxodG (siehe 1.2.3.2.).

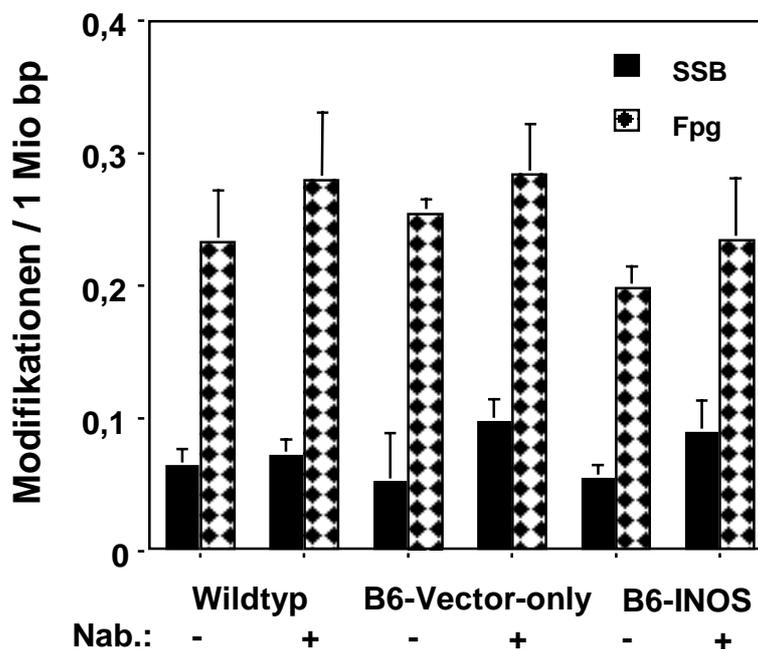


Abb. 3.21 Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Läsionen in Wildtyp-, B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen induziert durch 40 nM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m²; 400-800 nm) auf Eis. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D. (n=3-4)
 - = ohne Induktion mit Nab.
 += mit 12 h Nab.-Induktion

In den Wildtyp-Zellen und in den B6-Vector-only-Kontrollzellen wurden durch Ro 19-8022 gleich viele DNA-Schäden, und zwar 0,2-0,28 Fpg-sensitive Läsionen/1 Mio bp

und 0,05-0,08 Einzelstrangbrüche/1 Mio bp induziert, lediglich die B6-INOS-Zelllinie war geringfügig, jedoch nicht signifikant, unempfindlicher gegenüber der Ro-Behandlung. In **Abb. 3.22** wurde eine andere Art der Auswertung für die Induzierbarkeit herangezogen, und zwar wurde hier die absolute Anzahl der in den B6-Vector-only-Zellen induzierten Fpg-sensitiven Läsionen für jeden Versuch gleich 100 % (induzierter Schaden) gesetzt und mit der Anzahl der in den anderen beiden, parallel untersuchten Zelllinien induzierten Fpg-sensitiven Läsionen verglichen.

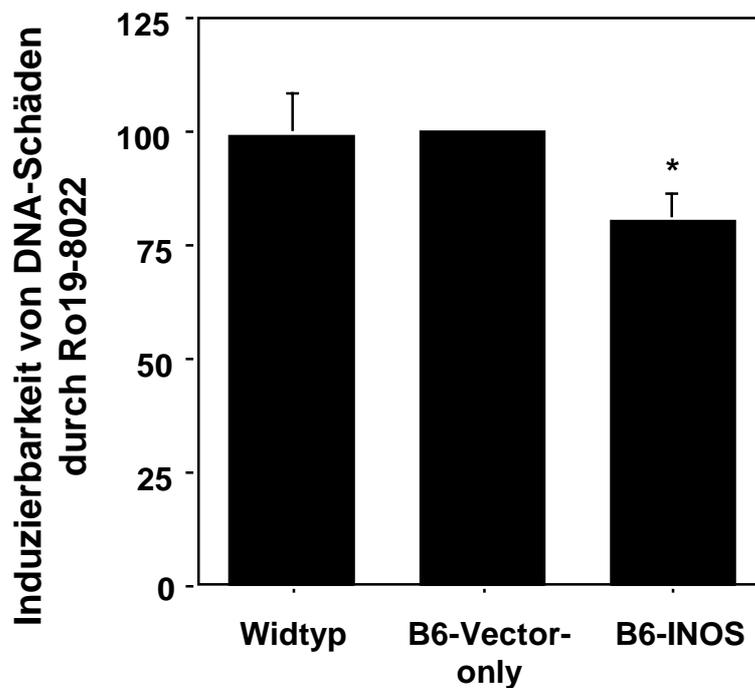


Abb. 3.22 Fpg-sensitive Läsionen in Prozent in Wildtyp-, B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen, induziert durch 40 nM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m²; 400-800 nm) auf Eis. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D; * $p < 0,006$. (n=3-4)

Hierbei zeigte sich, dass die Induzierbarkeit von oxidativen DNA-Schäden durch Ro 19-8022 in den B6-INOS-Zellen gegenüber den B6-Vector-only-Zellen signifikant herabgesetzt war. Die endogene NO-Produktion der B6-INOS-Zellen schützte also vor durch den Photosensibilisator induzierten DNA-Schäden. Die Zahl der in den Wildtyp-Zellen induzierten DNA-Schäden unterschied sich nicht von der Zahl der in den Vector-only-Zellen induzierten DNA-Schäden. Die Transfektion des leeren Vectors hatte also keinen Einfluss auf die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber Ro 19-8022.

3.2.1.3.2.2 Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden durch Wasserstoffperoxid

Um zu untersuchen, ob endogenes NO die Induzierbarkeit einer anderen Art von DNA-Schäden beeinflussen würde, wurden anderweitig unbehandelte Wildtyp-, B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen mit Wasserstoffperoxid behandelt (2.2.7.3.3.) und anschließend mittels der Alkalischen Elutionstechnik auf DNA-Schäden untersucht. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.23** dargestellt.

Die Zahl der Einzelstrangbrüche nahm für die beiden untersuchten Wasserstoffperoxidkonzentrationen von 25 μM zu 50 μM linear zu. Auch hier zeigte sich, wie bei der Schädigung durch Ro 19-8022, dass die B6-INOS-Zellen weniger empfindlich gegenüber der Induktion von DNA-Schäden waren und dass sich die Wildtyp-Zellen in ihrer Empfindlichkeit nicht von den B6-Vector-only-Zellen unterschieden. Es wurden in den B6-INOS-Zellen weniger Einzelstrangbrüche induziert, jedoch war der Unterschied gegenüber den beiden anderen Zelllinien nicht signifikant.

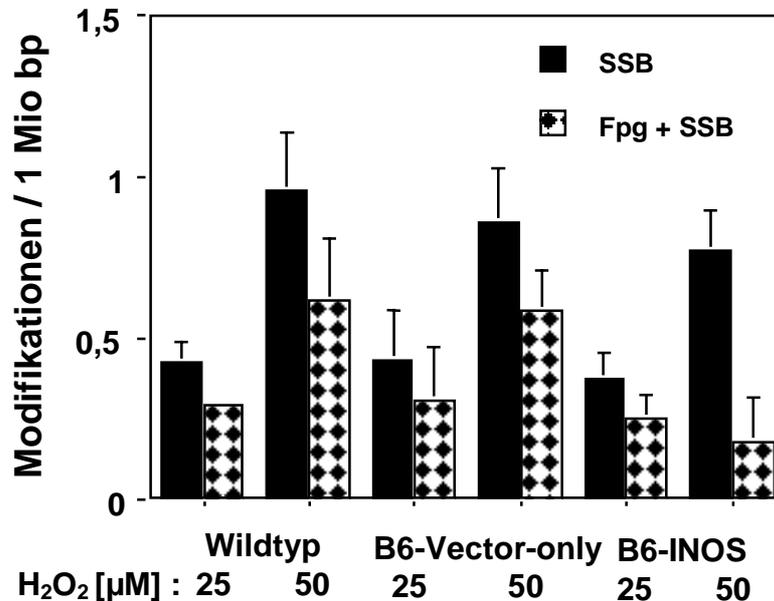


Abb. 3.23 Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Läsionen in Wildtyp-, B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen, induziert durch 25 bzw. 50 μM H_2O_2 in PBS (20 min. auf Eis). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D. (25 μM : n=2-3; 50 μM : n=3-6)

Bei der Betrachtung der induzierten Fpg-sensitiven Läsionen fällt auf, dass die Schadenserkennung nicht vollständig verlaufen sein kann, da sich die Einzelstrangbruchwerte nicht von den Fpg-Werten abziehen lassen. Dies könnte an der Verteilung bzw. der Lokalisation der induzierten Schäden liegen, oder an der Art der Schäden selbst. Zur Aufklärung dieses Sachverhaltes wurde die Schädigung mit H_2O_2 in PBSG statt in PBS (2.2.7.3.3.) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.24** gezeigt.

Die Anzahl der induzierten Einzelstrangbrüche verdoppelte sich entsprechend der verwendeten Wasserstoffperoxidkonzentration, wie auch für die Schädigung in PBS beschrieben. In den B6-INOS-Zellen wurden weniger Einzelstrangbrüche als in den B6-Vector-only-Zellen induziert, jedoch war auch hier, wie in **Abb. 3.23** gezeigt, der Unterschied nicht signifikant. Auffällig ist, dass praktisch keine messbaren Fpg-sensitiven Läsionen durch H_2O_2 unter den untersuchten Bedingungen induziert wurden. Dies ist seltsam, da fast durch jede DNA-schädigende reaktive Sauerstoffspezies oxidative Schäden an den DNA-Basen induziert werden. Die Fpg-Erkennung wird daher wieder als unvollständig angenommen. Außerdem wurde durch die Schädigung in PBSG durch die gleiche H_2O_2 -Konzentration nur die Hälfte der DNA-Schäden gegenüber der Schädigung in PBS in den Zellen induziert. Die enthaltene Glukose modifizierte also die Art der DNA-schädigenden Spezies oder fing reaktive Spezies ab, wirkte also als Scavenger.

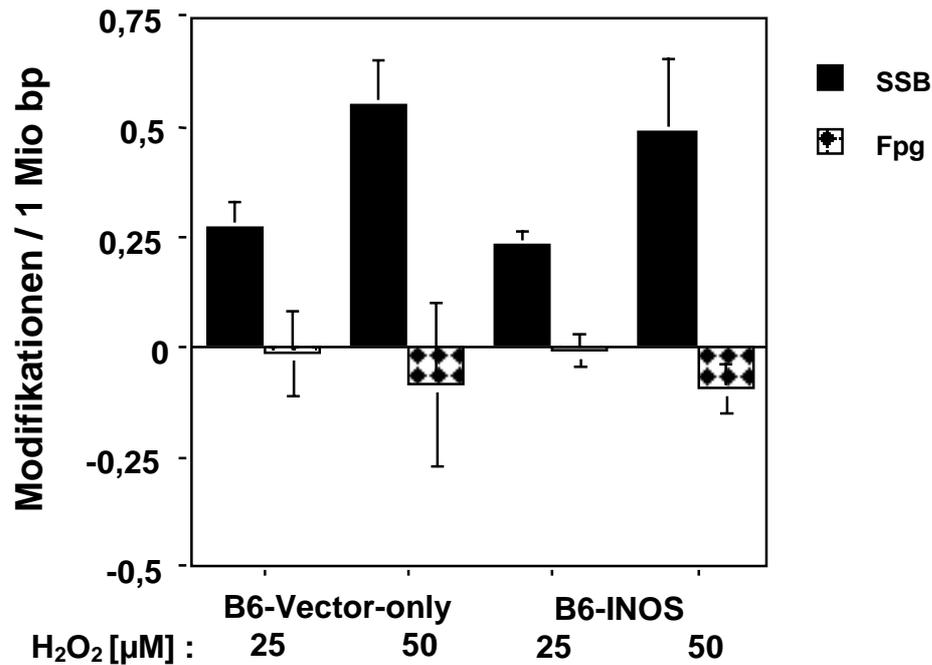


Abb. 3.24 Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Läsionen in B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen induziert durch 25 bzw. 50 µM H₂O₂ in PBSG (20 min. auf Eis). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± S.D. (n=4)

Weiterhin stellte sich die Frage, ob der Schutz der B6-INOS-Zellen gegenüber H₂O₂ verstärkt werden könnte durch vermehrte NO-Produktion. Hierzu wurde die Schädigung mit Wasserstoffperoxid nach Induktion der NO-Synthase mit Nab. durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.25** dargestellt.

Der nicht signifikante protektive Effekt der konstitutiven NO-Produktion der B6-INOS-Zellen wurde wiederum beobachtet, jedoch durch Induktion der NO-Synthase der Zellen mit Nab. nicht verstärkt (**Abb. 3.23** und **3.25**). Die Inkubation mit Natriumbutyrat hatte in den Kontrollzellen keinen Einfluss auf das Ausmaß der durch H₂O₂ induzierten DNA-Schäden. In B6-Vector-only-Zellen wurde durch 50 µM H₂O₂ etwa 1 Einzelstrangbruch/1 Mio bp und in B6-INOS-Zellen wurden etwa 0,8 Einzelstrangbrüche/1 Mio bp in der DNA induziert.

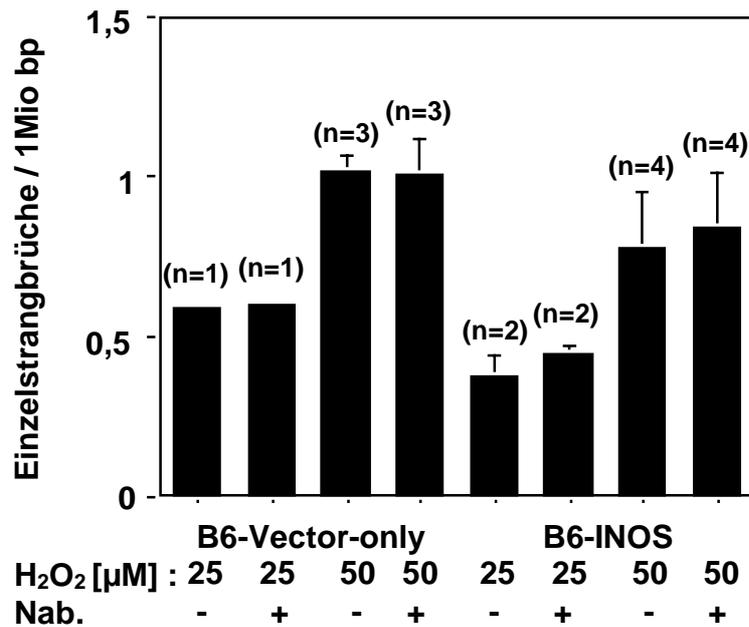


Abb. 3.25 Einzelstrangbrüche in B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen induziert durch 25 bzw. 50 µM H₂O₂ in PBS (20 min. auf Eis). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± S.D.
 - = ohne Induktion mit Nab.
 += mit 24 h Nab.-Induktion

3.2.1.3.3 Reparatur oxidativer durch Ro 19-8022 induzierter DNA-Schäden in B6 Mausfibroblasten

Die endogene NO-Produktion der B6-INOS-Zellen hatte keinen Einfluss auf die Gleichgewichtsspiegel (3.2.1.3.1.) oder die Induzierbarkeit (3.2.1.3.2.) von DNA-Schäden. Daher stellte sich als nächstes die Frage, ob die Reparatur induzierter DNA-Schäden beeinflusst würde. Hierzu wurden B6-INOS-Zellen im Vergleich mit B6-Vector-only-Zellen mit Ro 19-8022 geschädigt und nach 3stündiger Reparaturzeit mittels der Alkalischen Elution auf die Anzahl der unreparierten DNA-Schäden untersucht (2.2.7.3.2., 2.2.7.3.7). Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.26** dargestellt. Die Reparatur oxidativer DNA-Schäden wurde durch die endogene NO-Freisetzung der B6-INOS-Zellen nicht beeinflusst. Nach 3stündiger Reparaturzeit waren in den beiden untersuchten Zelllinien noch etwa 40 % der Fpg-sensitiven, durch Ro 19-8022 induzierten, DNA-Schäden unrepariert.

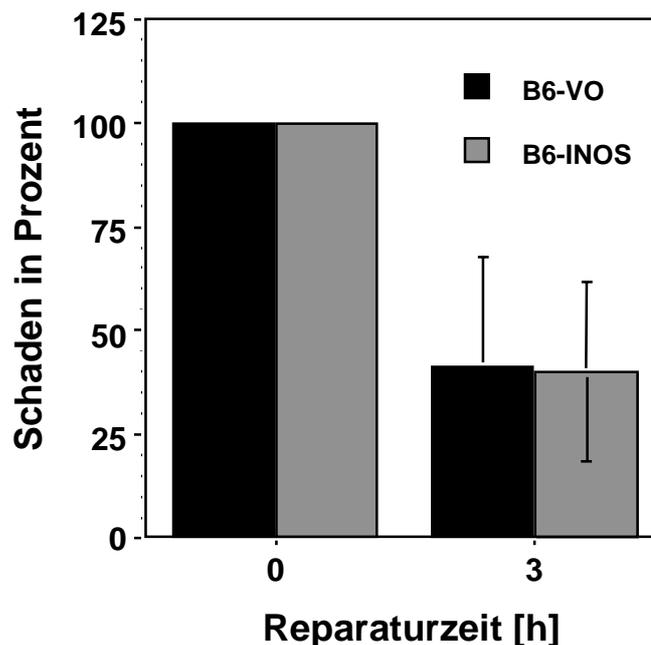


Abb. 3.26 Reparatur Fpg-sensitiver Läsionen in B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen induziert durch 40 nM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m²; 400-800 nm) auf Eis. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± S.D. (n=4)

3.2.1.4 Einfluss endogener NO-Generierung auf die Mikrokernrate in B6 Mausfibroblasten

Als weiterer genotoxischer Endpunkt wurde der Einfluss endogener NO-Produktion auf die Mikrokernrate untersucht (2.2.10.1). Hierzu wurde wie unter 2.2.10.2. beschrieben verfahren.

3.2.1.4.1 Mikrokernrate in B6 Mausfibroblasten unter dem Einfluss vermehrter endogener NO-Bildung

B6-INOS-Zellen wurden, wie unter 2.2.7.3.1. beschrieben, mit 12 bzw. 24 h mit Nab. behandelt und mit ebenso behandelten Wildtyp- bzw. B6-Vector-only-Zellen auf Mikrokerne untersucht. Abweichend von dem unter 2.2.10.2. beschriebenen Vorgehen wurden die Zellen ohne „Recoveryzeit“, d. h. ohne 24stündige Inkubation im Brutschrank, nach sofort der Behandlung auf Objektträger aufgeschleudert, um eine höhere absolute Zahl an Mikrokernen zu erhalten. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.27** dargestellt.

Man sieht, dass die Zahl der Mikrokerne durch die endogene NO-Produktion der B6-INOS-Zellen nicht beeinflusst wurde. In allen drei Zelllinien wurde allerdings durch die 12 h Inkubation mit Nab. die Zahl der Mikrokerne um den Faktor 1,35 und durch 24 h Inkubation um den Faktor 1,4 erhöht.

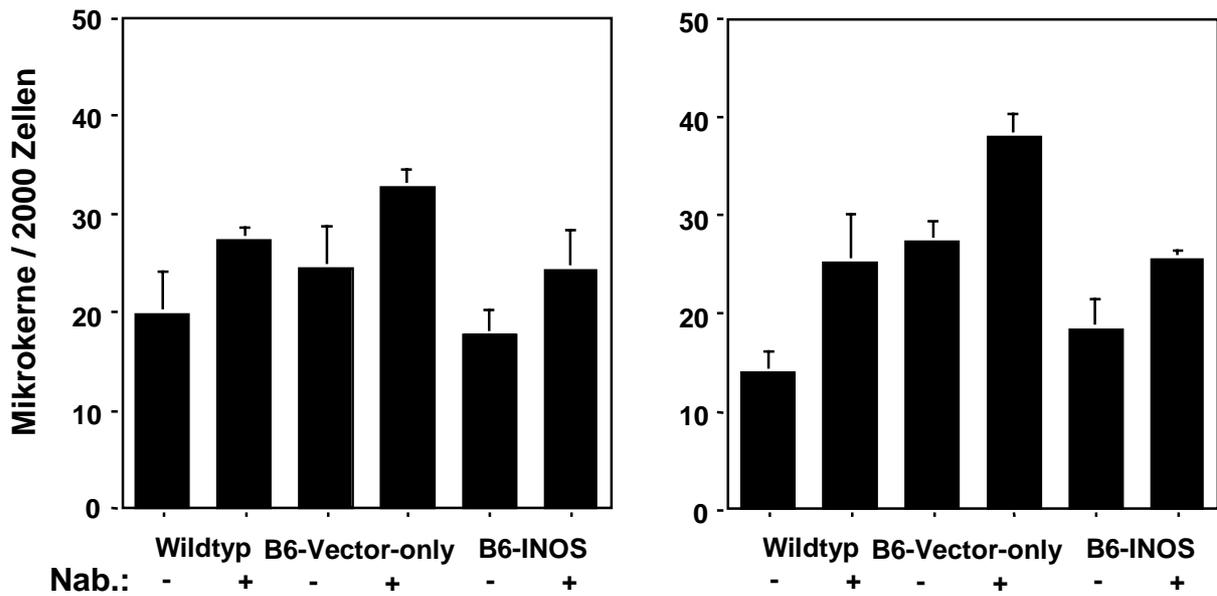


Abb. 3.27 Mikrokerne in Wildtyp-, B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen nach Behandlung mit Nab. für 12 h (links) bzw. 24 h (rechts). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D. (n=3)

3.2.1.4.2 Mikrokerninduktion in B6 Mausfibroblasten durch Ro 19-8022

Die endogene NO-Produktion der B6-INOS-Zellen hatte damit keinen Einfluss auf die Mikrokernrate (3.2.1.4.1.). Als nächstes sollte untersucht werden, ob die Anzahl induzierter Mikrokerne verändert würde. Hierzu wurden B6 Mausfibroblasten mit Ro 19-8022 geschädigt (2.2.7.3.2.) und auf Mikrokerne untersucht (2.2.10.2.). Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.28** dargestellt.

Durch Ro 19-8022 wurden zusätzlich ca. 10 Mikrokerne in den Wildtyp-, den B6-Vector-only- und den B6-INOS-Zellen induziert, gleichgültig, ob diese vorher mit Nab. behandelt worden waren oder nicht. Weder die konstitutive noch die erhöhte NO-Produktion der B6-INOS-Zellen nach Induktion der NOS hatten also einen Einfluss auf die durch Ro 19-8022 in Kombination mit sichtbarem Licht induzierte Zahl an Mikrokerne.

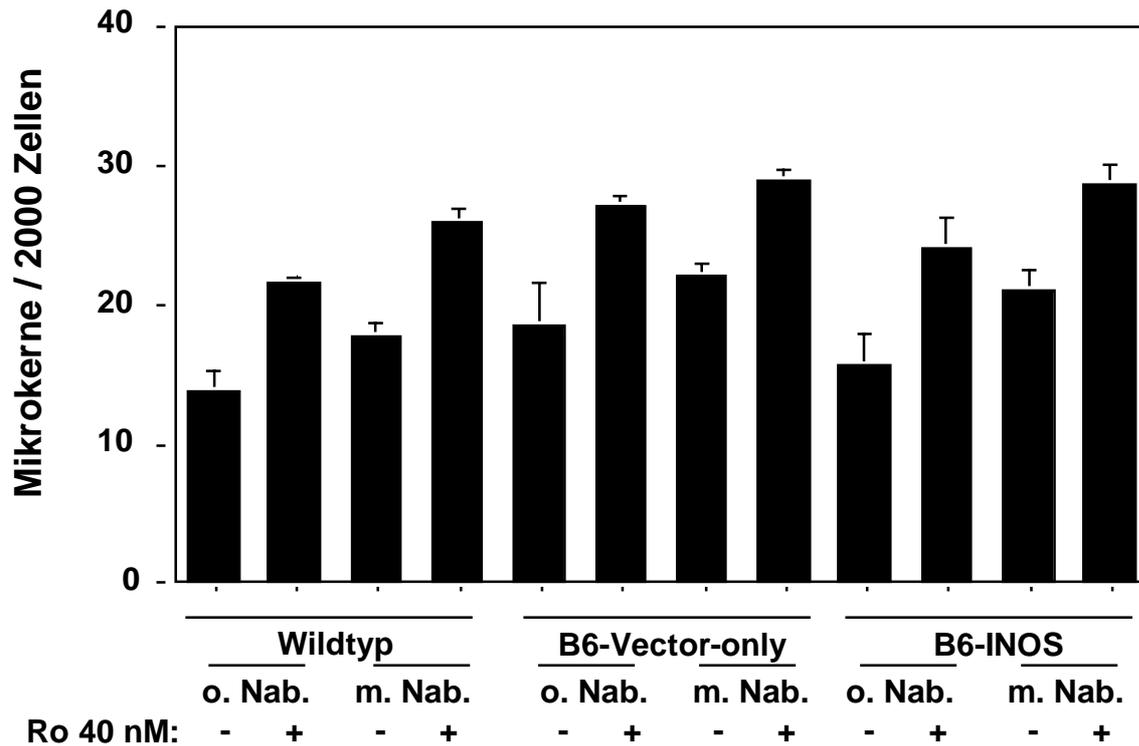


Abb. 3.28 Mikrokerne in Wildtyp-, B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen nach Behandlung mit Nab. für 12 h und Ro 19-8022 40 nM in Kombination mit sichtbarem Licht (166 kJ/m²; 400-800 nm). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D. (n=2)

3.2.1.4.3 Mikrokerninduktion in B6 Mausfibroblasten durch Wasserstoffperoxid

Um zu untersuchen, ob die endogene NO-Produktion der B6-INOS-Zellen Einfluss auf eine andere Art der Schadensinduktion hätte, wurden B6 Mausfibroblasten mit Wasserstoffperoxid (2.2.7.3.3.) behandelt und auf Mikrokerne (2.2.10.2.) untersucht. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.29** dargestellt.

In den B6-INOS-Zellen wurden signifikant weniger Mikrokerne durch H₂O₂ induziert. Die konstitutive NO-Freisetzung der Zellen schützte also vor Mikrokernen. Die Zahl der in den Wildtyp- und B6-Vector-only-Zellen induzierten Mikrokerne unterschied sich nicht. In beiden Kontrollzelllinien wurden etwa 38 Mikrokerne durch 50 μ M H₂O₂ zusätzlich zu den in unbehandelten Zellen vorhandenen Mikrokernen induziert. Dies bedeutet, dass die Transfektion mit dem leeren Vektor keinen Einfluss auf die Mikrokernrate hatte, wie auch schon für die Induktion von DNA-Schäden unter 3.2.1.3.2. gezeigt worden war. In den B6-INOS-Zellen wurden durch 50 μ M H₂O₂ nur 24 \pm 8 Mikrokerne induziert, was einer Verminderung auf 63 % entspricht.

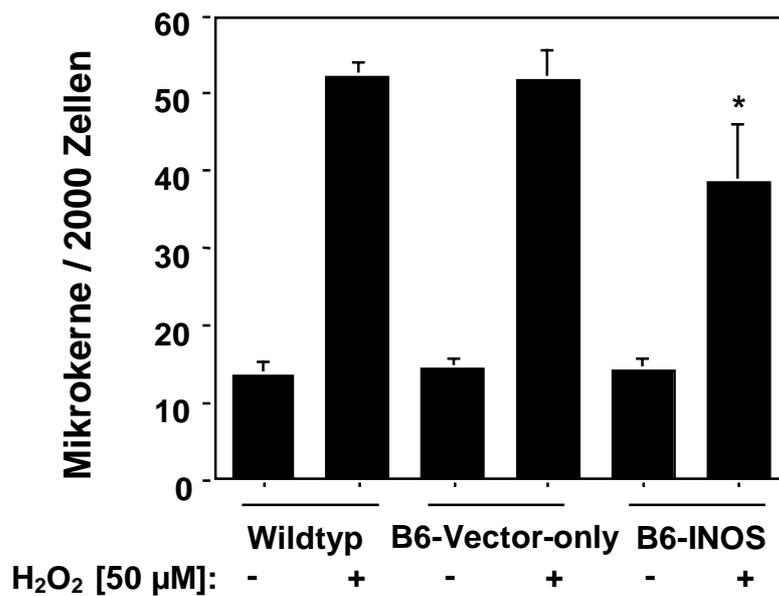


Abb. 3.29 Mikrokerne in Wildtyp-, B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen nach Behandlung mit 50 µM H₂O₂ in PBS (20 min. auf Eis). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± S.D; *p<0,05. (n=3)

Um zu untersuchen, ob eine erhöhte NO-Freisetzung durch zusätzliche Induktion der NO-Synthase mit Nab. zu einer Verstärkung des protektiven Effektes vor H₂O₂-induzierten Mikrokerneln führen würde, wurden B6-INOS-Zellen nach 24stündiger Inkubation mit Nab. (2.2.7.3.1.) im Vergleich zu B6-Vector-only-Kontrollzellen untersucht. **Abb. 3.30** zeigt die Anzahl der Mikrokerne.

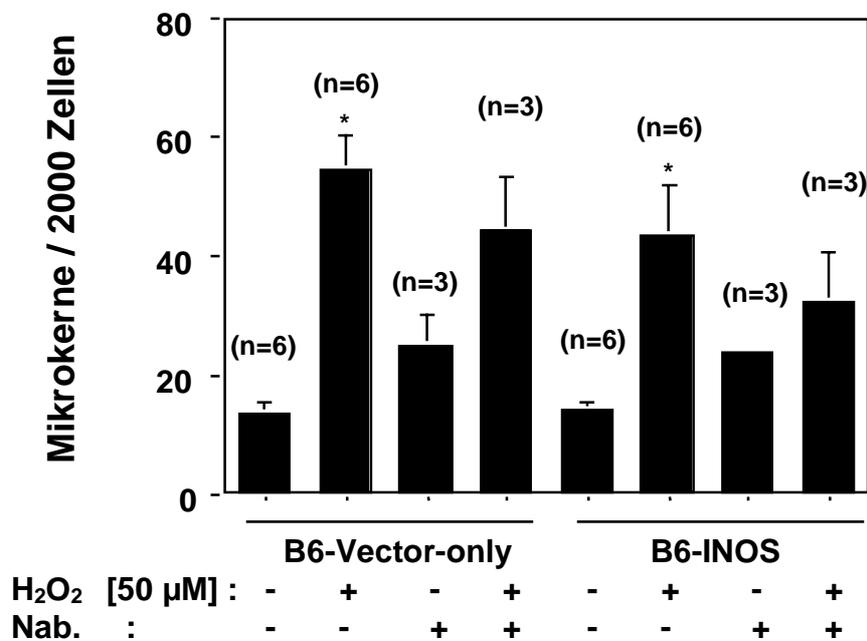


Abb. 3.30 Mikrokerne in B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen mit und ohne Nab.-Inkubation bzw. mit und ohne Behandlung mit 50 µM H₂O₂ (20 min. auf Eis). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± S.D; *p<0,01.

Die Anzahl der Mikrokerne wurde durch die Induktion der NO-Synthase in den B6-INOS-Zellen auf 75 % gegenüber der Zahl in unbehandelten Zellen gesenkt. Gleichwohl wurden auch in den B6-Vector-only-Zellen weniger Mikrokerne nach Präinkubation mit Nab. induziert. Obwohl durch die Behandlung mit Nab. selbst die Zahl der Mikrokerne in beiden Zelllinien erhöht wurde, führte eine Kombination von Nab. und Wasserstoffperoxid unerwarteterweise zu einer geringeren Zahl induzierter Mikrokerne in beiden Zelllinien.

3.2.1.5 Einfluss endogen gebildeten Stickstoffmonoxids auf die Zellproliferation (Zelltoxizitätstest)

Zur Untersuchung der Toxizität der Behandlungen, die für die Bestimmungen mittels der Alkalischen Elution und der Mikrokernrate durchgeführt wurden, wurde, wie unter 2.2.8.1. Absatz 2 beschrieben, verfahren. Für die Berechnung der Prozentangaben ist außerdem 2.2.8.1. Absatz 4 zu berücksichtigen.

3.2.1.5.1 Toxizität der erhöhten endogenen NO-Bildung

Wildtyp-, B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen wurden, wie unter 2.2.7.3.1. beschrieben, mit Nab. behandelt. Anschließend wurde der Proliferationsfaktor bestimmt (2.2.8.1.). Das Ergebnis ist in Abb. 3.31 dargestellt.

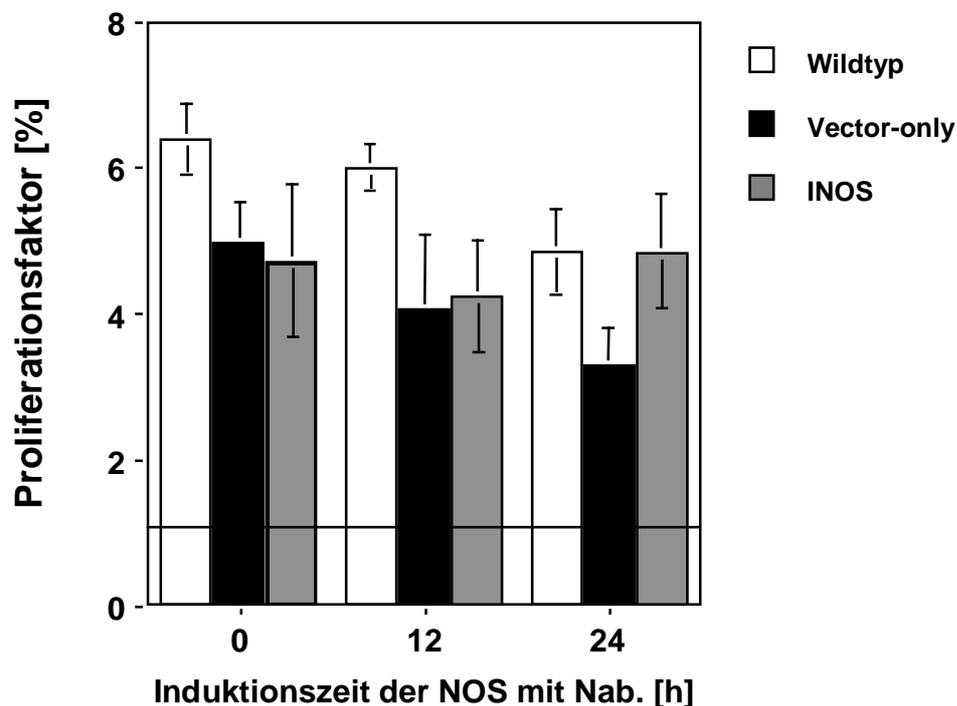


Abb. 3.31 Proliferationsfaktor nach 48 h in Wildtyp-, B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen mit und ohne Nab.-Inkubation. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D. (n=3-5)

Der Proliferationsfaktor unbehandelter Wildtyp-Zellen war höher als der unbehandelter B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen, was andeutet, dass die Transfektion die Proliferation der Zellen verlangsamte oder zu einer Selektion langsamer wachsender Zellen führte. Der Proliferationsfaktor der B6-Vector-only-Zellen unterschied sich jedoch

nicht von dem der B6-INOS-Zellen. Die konstitutive NO-Produktion der INOS-Zellen hatte also keinen Einfluss auf die Proliferation. Die 12stündige Inkubation mit Nab. führte zu einer Verlangsamung der Proliferation, was jedoch im Falle der B6-INOS-Zellen nicht auf die vermehrte NO-Produktion zurückzuführen war, da alle drei Zelllinien in gleichem Maße betroffen waren. Die Inkubation mit Nab. für 24 h führte zu einem Rückgang der Proliferation im Vergleich zu unbehandelten Zellen auf 66 ± 9 % im Falle der Wildtyp-Zellen, auf 56 ± 6 % im Falle der B6 Vector only-Zellen und auf 89 ± 8 % im Falle der B6-INOS-Zellen. Die längere Behandlung mit Nab. war also für beide Kontrollzelllinien vergleichsweise toxischer als für die iNOS-überexprimierende Zelllinie.

3.2.1.5.2 Zellproliferation nach Behandlung mit Ro 19-8022

Die Zellen wurden, wie unter 2.2.8.2. beschrieben, mit Ro 19-8022 behandelt. Der Proliferationsfaktor wurde nach 2.2.8.1. Absatz 2 bestimmt und ist in Abb. 3.32 dargestellt.

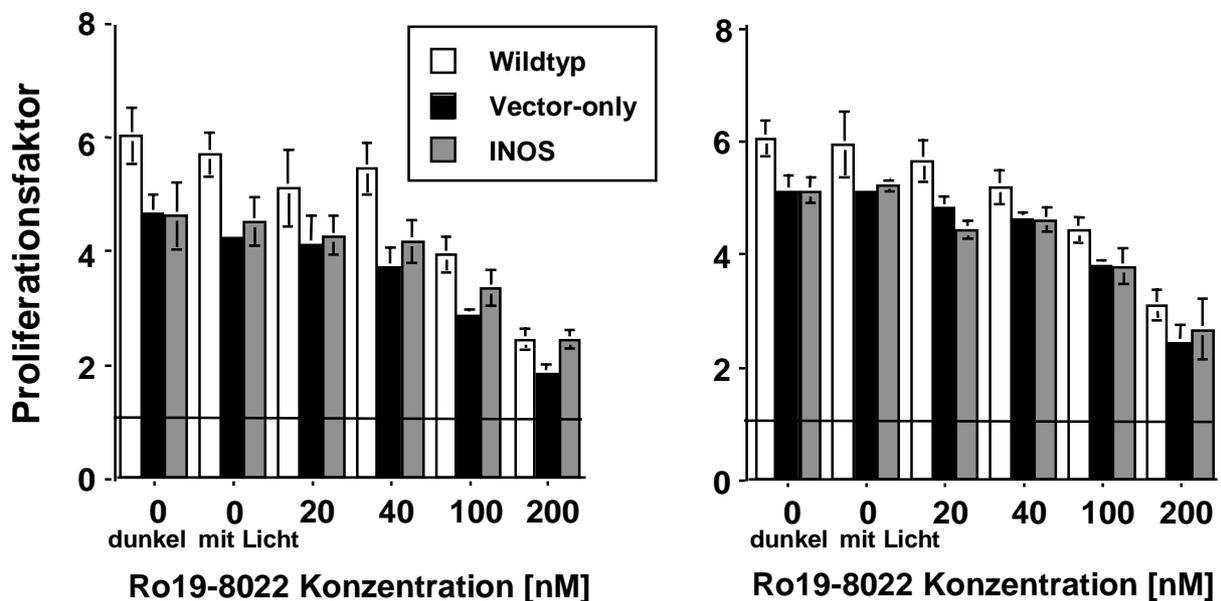


Abb. 3.32 Proliferationsfaktor nach 48 h in Wildtyp-, B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen ohne Behandlung mit Nab. (links) bzw. nach 12stündiger Inkubation mit Nab. (rechts) und Schädigung mit Ro 19-8022 in Kombination mit sichtbarem Licht (166 kJ/m^2 ; 400-800 nm). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D. (n=3-5)

Durch die Schädigung mit dem Photosensibilisator wurde die Proliferation der Zellen herabgesetzt. Das Ausmaß der Beeinflussung war in allen drei untersuchten Zelllinien gleich. Die endogene NO-Produktion hatte also keinen Einfluss auf die Toxizität der Ro-Behandlung. Überraschenderweise waren alle Zellen, die mit Nab. präinkubiert wurden, etwas unempfindlicher gegenüber der Ro-Schädigung. Beispielsweise betrug der Proliferationsfaktor in mit Nab. und 40 nM Ro 19-8022 behandelten Vector-only-Zellen $4,6 \pm 0,1$ gegenüber $3,7 \pm 0,4$, als die Zellen nicht mit Nab. behandelt worden waren.

3.2.1.5.3 Zellproliferation nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid

B6 Mausfibroblasten wurden, wie unter 2.2.8.2. beschrieben, mit Wasserstoffperoxid behandelt. Der Proliferationsfaktor wurde bestimmt (2.2.8.1.) und ist in Abb. 3.33 dargestellt.

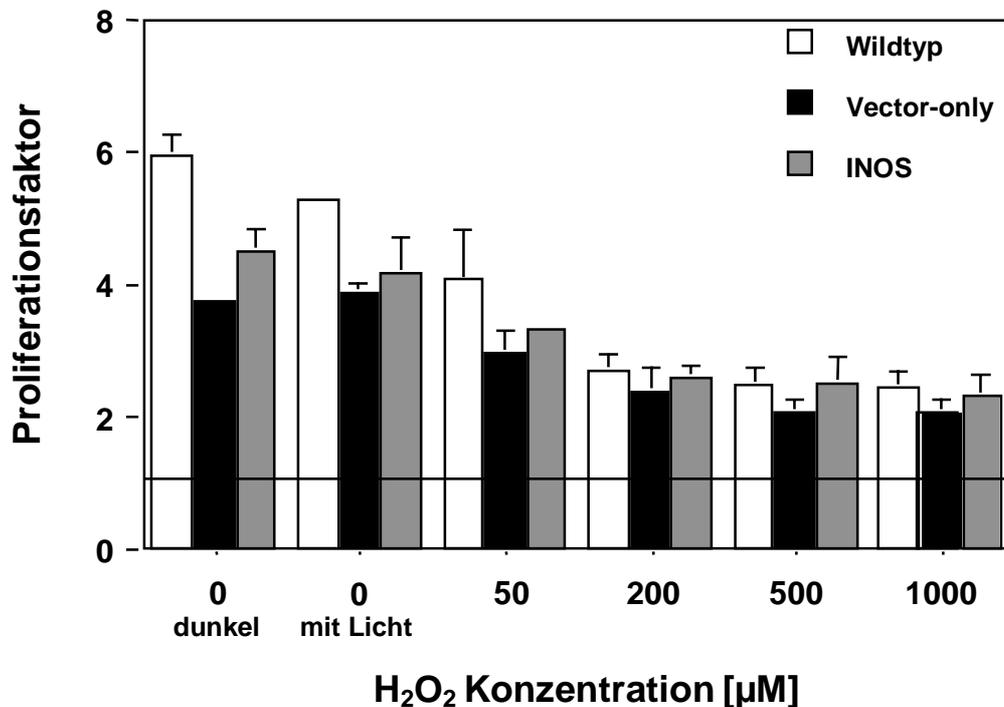


Abb. 3.33 Proliferationsfaktor nach 48 h in Wildtyp-, B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen nach Behandlung mit H₂O₂ in PBS (20 min. auf Eis). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D. (n=3-4)

Die Proliferation der B6-Vector-only-Zellen unterschied sich nicht von der der B6-INOS-Zellen. Die konstitutive NO-Freisetzung der B6-INOS-Zellen hatte keinen Einfluss auf die Proliferation nach H₂O₂-Schädigung. Die Wildtyp-Zellen waren gegenüber Wasserstoffperoxid, wie auch gegenüber dem Photosensibilisator Ro 19-8022 (Abb. 3.33), empfindlicher als die transfizierten Zelllinien. Bei Schädigung der Zellen mit der höchsten H₂O₂-Konzentration war der Proliferationsfaktor im Vergleich zu den unbehandelten Zellen von $5,9 \pm 0,3$ auf $2,5 \pm 0,2$ (auf 30 ± 4 %) im Falle der Wildtyp-Zellen, von $3,8 \pm 0,06$ auf $2,1 \pm 0,2$ (auf 38 ± 7 %) im Falle der B6-Vector-only- und von $4,5 \pm 0,3$ auf $2,3 \pm 0,3$ (auf 39 ± 11 %) im Falle der B6-INOS-Zellen herabgesetzt.

Um zu untersuchen, ob eine erhöhte NO-Produktion einen Einfluss auf die H₂O₂-Toxizität hatte, wurden B6-Vector-only-Zellen im Vergleich zu B6-INOS-Zellen nach Induktion mit Nab. für 24 h (2.2.7.3.1.) untersucht. Das Ergebnis ist in Abb 3.34 abgebildet.

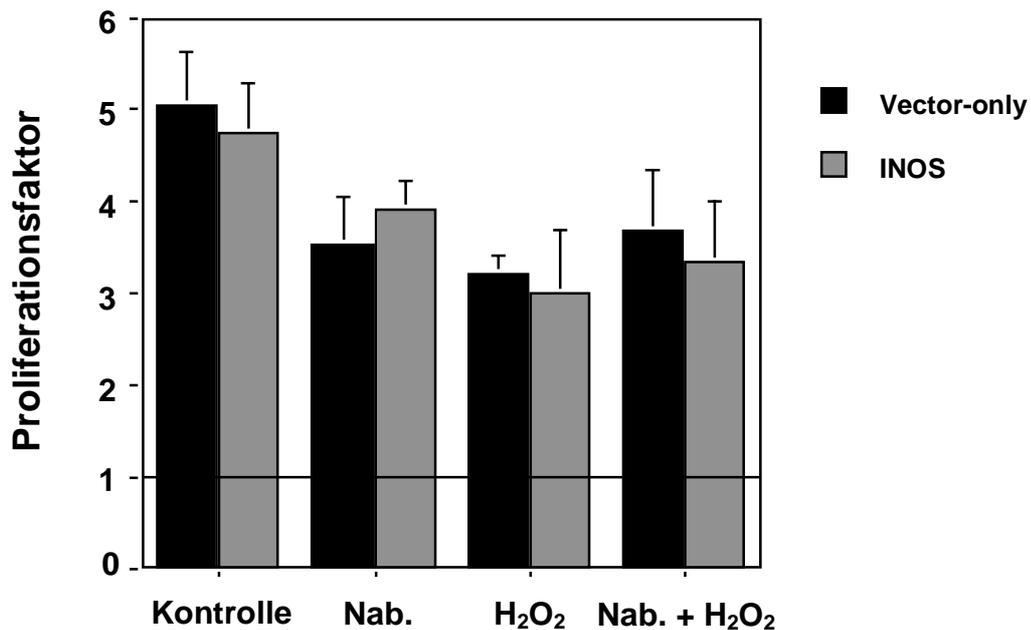


Abb. 3.34 Proliferationsfaktor nach 48 h in B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen nach Behandlung mit 50 μM H_2O_2 und Inkubation mit Nab. für 24 h. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D. (n=3)

Auch die erhöhte NO-Produktion der B6-INOS-Zellen nach Induktion der NO-Synthase für 24 h beeinflusste die Toxizität der H_2O_2 -Behandlung nicht. Die Präinkubation mit Nab. vor der Schädigung mit H_2O_2 führte zu einem höheren Proliferationsfaktor in beiden Zelllinien im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen, was andeutet, dass Nab. alleine vor Wasserstoffperoxid schützte. Diesen Befund hatte auch die Toxizität von Ro 19-8022 in den B6 Mausfibroblasten ergeben.

3.2.1.6 Glutathionspiegel in B6 Mausfibroblasten

Glutathion ist eines der wichtigsten zellulären Antioxidantien (1.2.). Der Glutathionspiegel wurde in den Zellen bestimmt, da eine Änderung auf oxidativen Stress, ausgelöst z.B. durch reaktive Spezies, hinweisen würde.

3.2.1.6.1 Glutathionspiegel in ungeschädigten Zellen

B6 Mausfibroblasten wurden unbehandelt oder nach 12stündiger Induktion mit Nab. (2.2.7.3.1.) auf den Gesamt-Glutathiongehalt untersucht (2.2.9.2.). Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.35** dargestellt.

Der Gesamt-Glutathiongehalt der Wildtyp-Zellen unterschied sich nicht von dem der B6-Vector-only-Zellen. Die Transfektion hatte also keinen Einfluss auf den Glutathiongehalt der Zellen. Auch die konstitutive NO-Produktion hatte keinen Einfluss auf den Glutathionspiegel. In allen drei Zelllinien betrug der Gesamt-Glutathiongehalt zwischen 8 und 10 nmol/1 Mio Zellen. Nach Induktion der NO-Synthase für 12 h war der Glutathionspiegel in den B6-INOS-Zellen ($6,6 \pm 1,0$ nmol/1 Mio Zellen) im Vergleich zu

den beiden Kontrollzelllinien (etwa 8 nmol/1 Mio Zellen) erniedrigt. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die Erniedrigung des Glutathionspiegels kann als Hinweis auf oxidativen Stress durch endogenes NO gewertet werden.

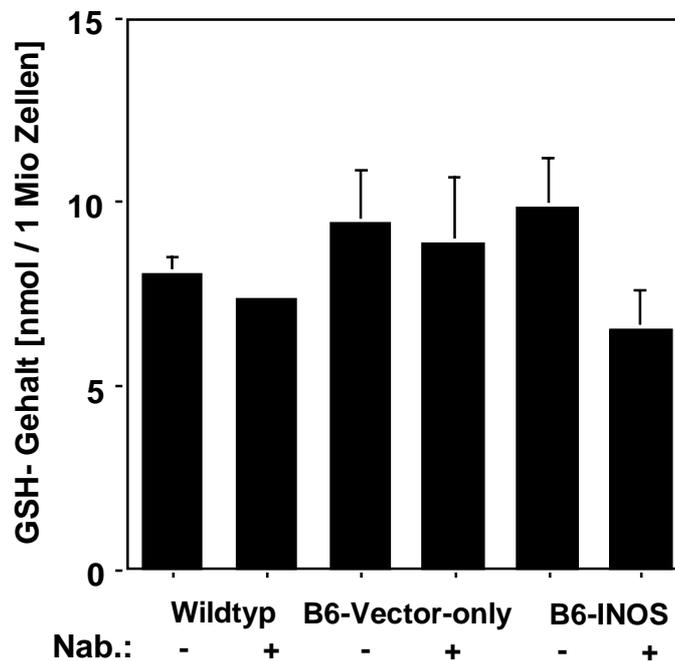


Abb. 3.35 Gesamt-Glutathiongehalt in Wildtyp-, B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen mit und ohne Behandlung mit Nab. für 12 h. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D. (n=2-3)

3.2.1.6.2 Glutathionspiegel in B6 Mausfibroblasten nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid

Da die konstitutive NO-Produktion nicht zu einer Beeinflussung des Glutathionspiegels in den INOS-Zellen führte, stellte sich die Frage, ob eine erhöhte NO-Freisetzung nach Induktion der iNOS einen Einfluss hat. Daher wurden B6-INOS-Zellen parallel zu B6-Vector-only-Zellen nach 24stündiger Induktion der NO-Synthase untersucht. Zusätzlich wurden gleiche Ansätze der Zellen mit Wasserstoffperoxid (2.2.7.3.3.) behandelt; anschließend wurde der Glutathionspiegel der Zellen bestimmt (2.2.9.2.). Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.36** dargestellt.

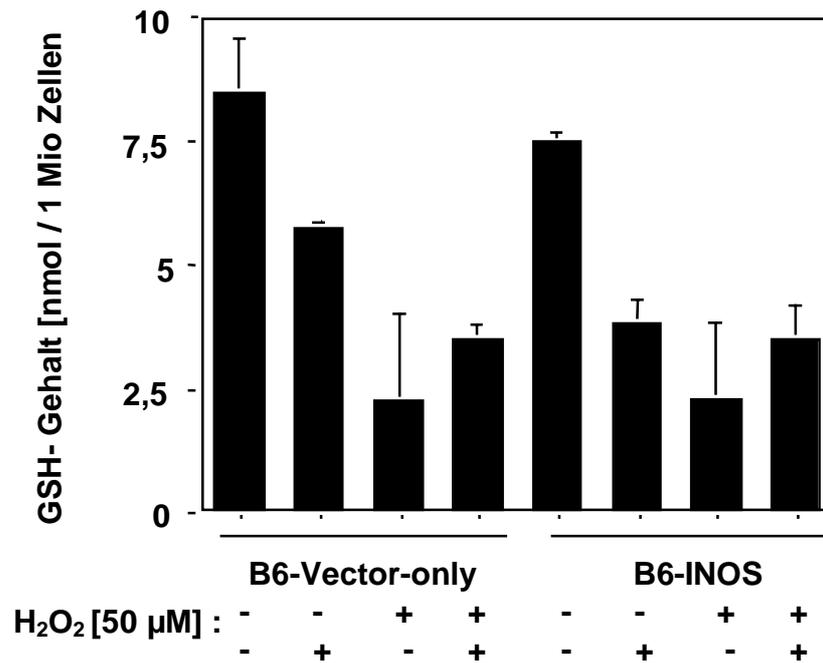


Abb. 3.36 Gesamt-Glutathiongehalt in B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen nach Behandlung mit 50 µM H₂O₂ mit und ohne Behandlung mit Nab. für 24 h. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± S.D. (n=2)

Die Behandlung mit H₂O₂ führte in beiden Zelllinien zu einer Reduktion des Glutathionspiegels auf etwa 30 % des Wertes unbehandelter Zellen. Die Präinkubation mit Nab. erniedrigte in beiden Zelllinien den Gesamt-Glutathiongehalt, jedoch wurde der Gehalt durch 24stündige Nab.-Inkubation in den B6-INOS-Zellen mehr erniedrigt als in den B6-Vector-only-Zellen, was auf eine zusätzliche Komponente neben dem unspezifischen Einfluss von Nab. auf den Glutathionspiegel hinweist. Es könnte sich hierbei um einen erhöhten oxidativen Stress in den iNOS-überexprimierenden Zellen handeln, verursacht durch die erhöhte NO-Produktion. Überraschenderweise führte eine H₂O₂-Behandlung nach Präinkubation mit Nab. nur zu einer Verringerung des Glutathionspiegels auf etwa 50 % gegenüber unbehandelten Zellen. Es war also kein additiver Effekt sondern ein gegenläufiger Effekt der beiden Behandlungen, in Kombination durchgeführt, festzustellen. Dieser unerwartete Effekt der Kombinationsbehandlung aus H₂O₂-Schädigung und Nab.-Präinkubation war auch schon für die Induktion von Mikrokernen beobachtet worden (3.2.1.4.3.; Abb. 3.30).

3.2.2 Einfluss exogen generierten Stickstoffmonoxids

Zur Untersuchung des Einflusses von exogen gebildetem (exogenem) NO wurde die mit dem leeren Vector transfizierte B6 Mausfibroblasten-Zelllinie (B6-Vector-only, B6-VO) (**siehe 2.2.7.1.**) verwendet. Zur Generierung von exogenem NO wurde DPTA-NONOat eingesetzt, das in wässrigen Lösungen spontan NO freisetzt. Pro Mol Substanz werden hierbei 2 Mol NO gebildet. Da die Halbwertszeit der Substanz bei 37 °C ca. 3 h beträgt, wurden während der Inkubationszeit von drei Stunden, die bei den Versuchen durchgeführt wurde, äquimolare Mengen an NO generiert (**1.2.3.6.**). Zur Konstanthaltung des pH-Wertes wurde HEPES-Puffer während der Inkubation mit dem NONOat dem Zellkulturmedium zugesetzt.

Auch hier wurden, wie unter **3.1.** zur Schadensdetektion und Erstellung von Schadensprofilen bifunktionelle DNA-Reparaturenukleasen eingesetzt. Diese erkennen spezifisch DNA-Modifikationen, entfernen die Base aus der DNA und führen einen Einzelstrangbruch in die DNA ein. Die Menge an Einzelstrangbrüchen, die als negative Steigung in der Alkalischen Elutionsmethode bestimmt wird, ist somit ein Maß für den vorhandenen DNA-Schaden in den Zellen (**siehe 2.2.7.1.**). Für die Interpretation wichtig sind hierbei die Erkennungsspektren der eingesetzten DNA-Glykosyklasen. Diese ist in **Tab. 1.2** dargestellt.

3.2.2.1 Untersuchungen mittels der Alkalischen Elutionsmethode

Zur Untersuchung mittels der Alkalischen Elutionsmethode wurde, wie unter **2.2.7.** beschrieben, verfahren.

3.2.2.1.1 Oxidative DNA-Schäden in B6 Mausfibroblasten unter dem Einfluss erhöhter exogener NO-Bildung

B6-Vector-only-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von DPTA-NONOat entsprechend **2.2.7.3.4.** behandelt und anschließend auf Fpg-sensitive DNA-Modifikationen und Einzelstrangbrüche untersucht. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.37** dargestellt.

Man sieht, dass im Gegensatz zu den Experimenten mit endogenem NO (**3.2.1.3.1.**) sowohl die Zahl der Einzelstrangbrüche als auch die der Fpg-sensitiven Läsionen durch exogenes NO erhöht wurde. NO ist also in der Lage, die DNA zu schädigen. Im Verhältnis zu den relativ hohen eingesetzten Konzentrationen an exogenem NO wurden jedoch relativ wenige oxidative Modifikationen in der DNA induziert. Beispielsweise wurden von 2,5 mM NO nur 0,15 Fpg-sensitive DNA-Modifikationen / 1 Mio in die DNA erzeugt.

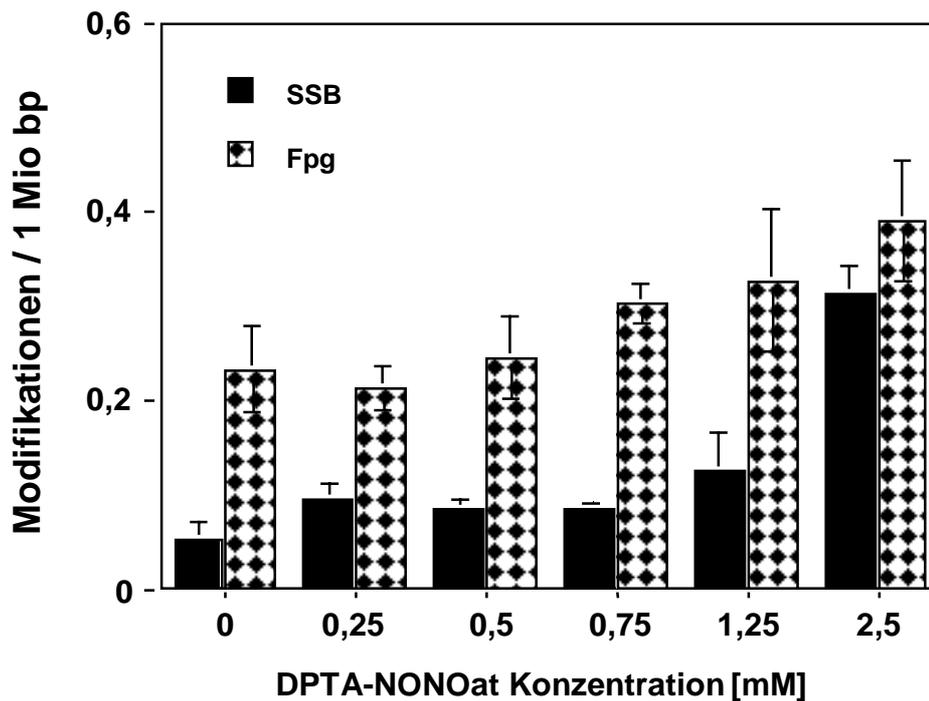


Abb. 3.37 Spiegel an Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Läsionen in B6-Vector-only-Zellen nach Behandlung mit DPTA-NONOat für 3 h bei 37°C. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D. (n=3)

Um genauere Aussagen über die Art der durch DPTA-NONOat generierten DNA-Schäden machen zu können, wurden verschiedene Reparaturoendonukleasen während der Enzyminkubation (siehe 2.2.7.4.) eingesetzt. Die Anzahl der so erhaltenen Endonuklease-sensitiven Läsionen und Einzelstrangbrüche ist in **Abb. 3.38** in einem Schadensprofil gezeigt.

Der durch DPTA-NONOat in die DNA eingefügte Schaden stieg linear mit der Konzentration des schädigenden Agens an. Es wurden überwiegend Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Läsionen (im Verhältnis 1:1) in den B6-Vector-only-Zellen induziert. Nur eine geringe Anzahl an AP-Läsionen, sensitiv zu Exonuklease III, und keine oxidativen Pyrimidinmodifikationen, zusätzlich zu AP-Läsionen erkannt von Endonuklease III, wurden von exogenem NO induziert. Durch 2,5 mM DPTA-NONOat, entsprechend 2,5 mM NO, wurden etwa 0,2 Fpg-sensitive Läsionen bzw. Einzelstrangbrüche und 0,55 Exonuklease III- bzw. Endonuklease III-sensitiven Läsionen/1Mio bp in die DNA eingebracht.

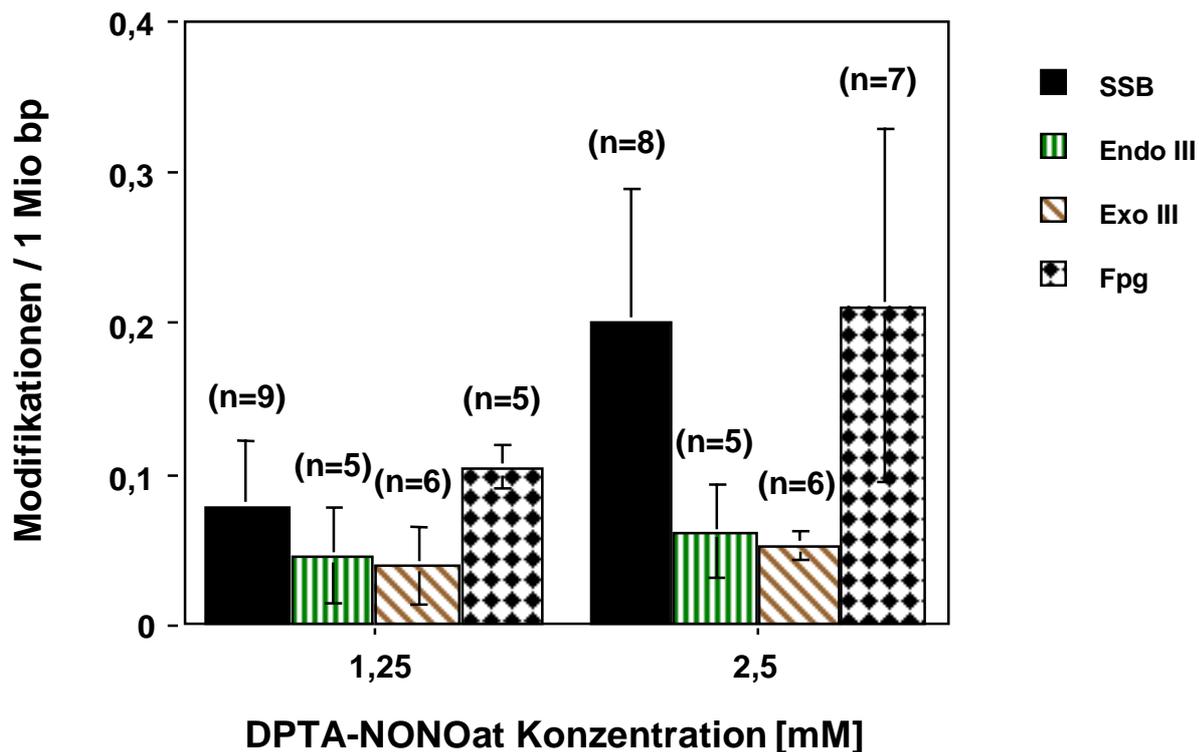


Abb. 3.38 Schadensprofil in B6-Vector-only-Zellen induziert durch 1,25 bzw. 2,5 mM DPTA-NONOat (3 h im Brutschrank bei 37°C in Vollmedium). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D.

3.2.2.1.2 Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden in B6 Mausfibroblasten

Da, wie unter 3.2.2.4.1. gesehen, die Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Modifikationen durch die exogene NO-Freisetzung erhöht wurden, stellte sich als nächstes die Frage, ob die Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden auch beeinflusst würde. Hierzu wurden die Zelllinien mit verschiedenen DNA-schädigenden Agentien behandelt (siehe auch 1.2.3.) und mit der Alkalischen Elutionsmethode untersucht (2.2.7.). Eine Änderung der Induzierbarkeit könnte direkt durch NO oder durch Beeinflussung intrazellulärer Parameter durch NO verursacht werden. In den Abbildungen sind die Gleichgewichtsspiegel von DNA-Modifikationen von parallel untersuchten, nicht behandelten Zellen (für jede Zellart getrennt analysiert) schon subtrahiert.

3.2.2.1.2.1 Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden durch Ro 19-8022

B6-Vector-only-Zellen wurden nach NONOat-Präinkubation (2.2.7.3.4.) mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022 behandelt (2.2.7.3.2.) und anschließend im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen mittels der Alkalischen Elutionstechnik auf DNA-Schäden untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.39 dargestellt. Man sieht, dass sich die Anzahl der induzierten Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitiven Läsionen in den mit dem NONOat präinkubierten Zellen nicht von der in den Kontrollzellen unterschied. In beiden Ansätzen wurden durch den Photosensibilisator etwa 0,3 Fpg-sensitive

DNA-Modifikationen/1 Mio bp induziert. Exogenes NO hatte also keinen Einfluss auf die Induzierbarkeit von DNA-Schäden durch Ro 19-8022.

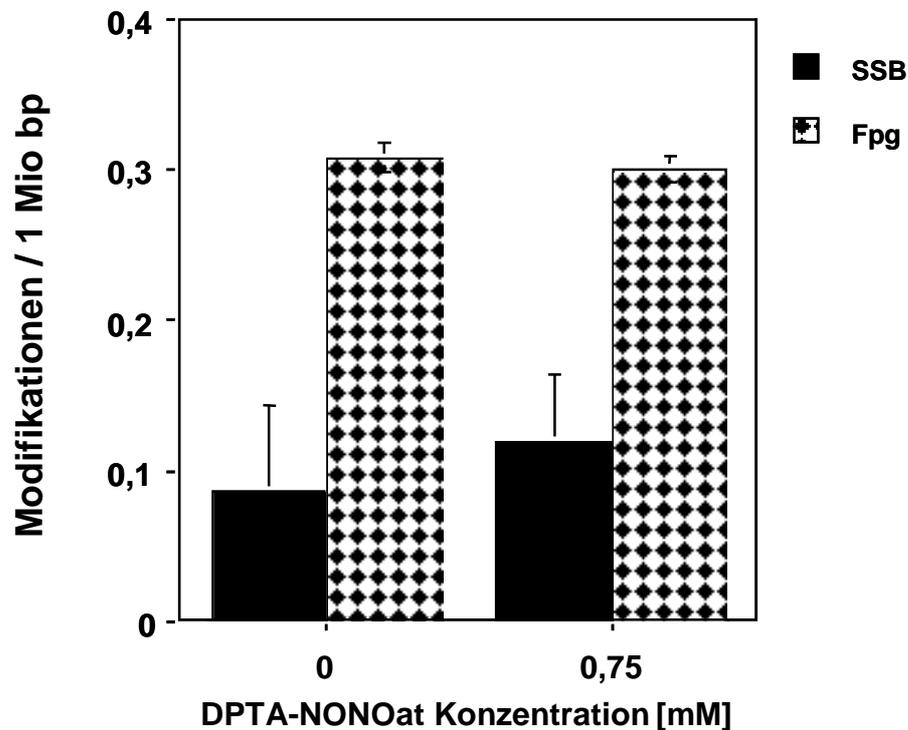


Abb. 3.39 Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Läsionen in B6-Vector-only-Zellen mit und ohne Präinkubation mit 0,75 mM DPTA-NONOat (3 h 37°C) induziert durch 40 nM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m²; 400-800 nm) auf Eis. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± S.D. (n=3)

3.2.2.1.2.2 Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden durch UVB

B6-Vector-only-Zellen wurden nach NONOat-Präinkubation (2.2.7.3.4.) mit UVB behandelt (2.2.7.3.6.) und anschließend im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen mittels der Alkalischen Elutionstechnik auf Einzelstrangbrüche und T4 Endonuklease V-sensitive DNA-Modifikationen untersucht. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.40** dargestellt. Exogenes NO hatte keinen Einfluss auf die Induzierbarkeit von Pyrimidindimeren. In mit NONOat präinkubierten wie auch in Kontrollzellen wurden durch UVB etwa 0,33 T4 Endonuklease V-sensitive Läsionen / 1 Mio bp induziert.

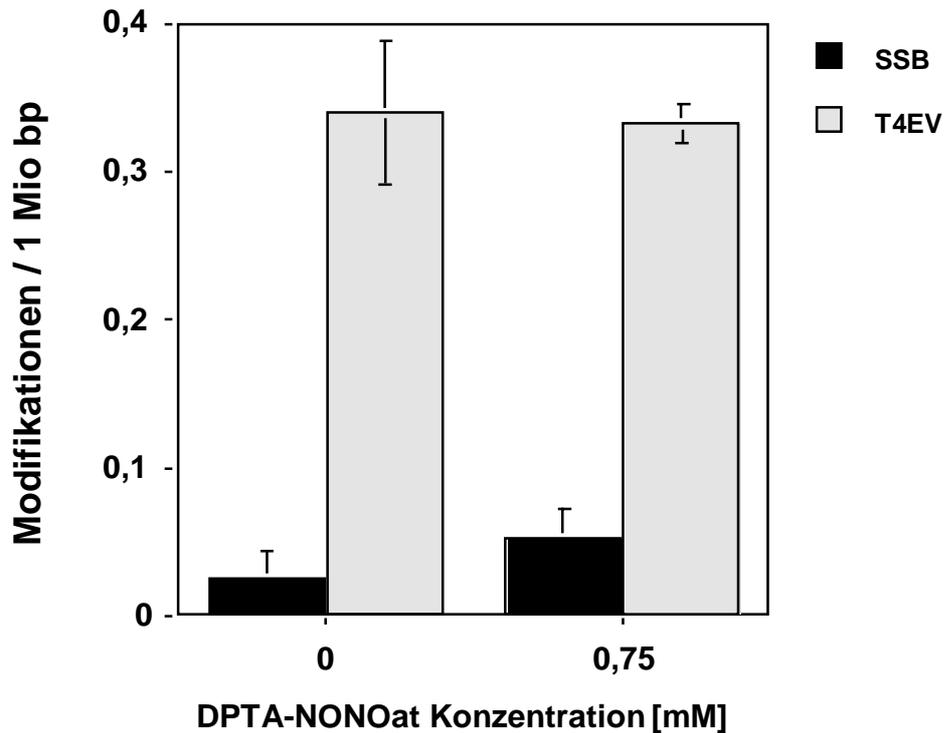


Abb. 3.40 Einzelstrangbrüche und T4EV-sensitive Läsionen in B6-Vector-only-Zellen mit und ohne Präinkubation mit 0,75 mM DPTA-NONOat (3 h 37°C) induziert durch UVB ($3,9 \pm 0,33 \text{ J/m}^2$). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D. (n=3)

3.2.2.1.2.3 Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden durch tert.-Butylhydroperoxid

B6-Vector-only-Zellen wurden nach NONOat-Präinkubation (2.2.7.3.4.) mit tBuOOH geschädigt (2.2.7.3.7.) und anschließend im Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen mittels der Alkalischen Elutionstechnik auf Einzelstrangbrüche und Exonuklease III-sensitive DNA-Modifikationen untersucht. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.41** dargestellt.

Durch die Präinkubation mit exogenem NO wurde die Induzierbarkeit von AP-Läsionen, sensitiv zu Exonuklease III, nicht verändert. Sowohl in mit NO präinkubierten als auch in Kontrollzellen wurden durch tBuOOH etwa 0,19 Exonuklease III-sensitive Läsionen/1 Mio bp induziert.

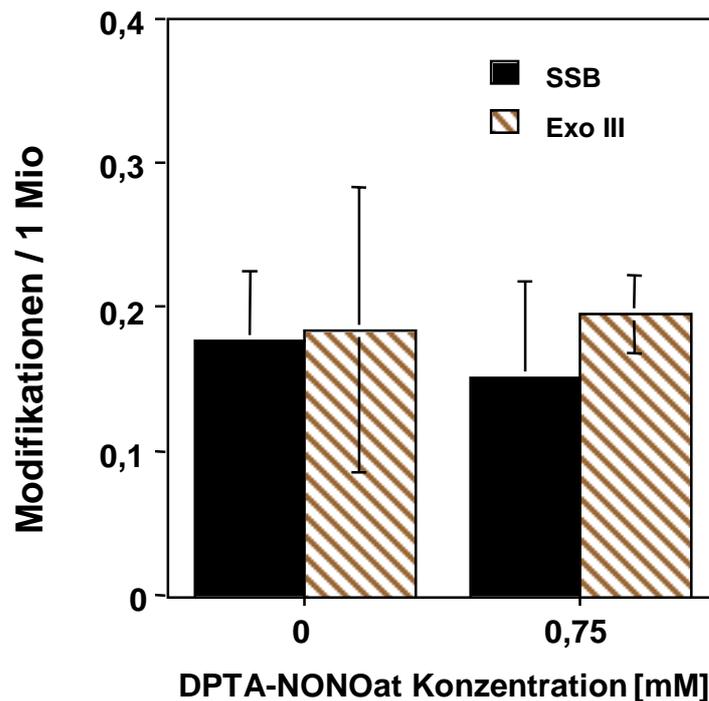


Abb. 3.41 Einzelstrangbrüche und Exo III-sensitive Läsionen in B6-Vector-only-Zellen mit und ohne Präinkubation mit 0,75 mM DPTA-NONOat (3 h 37°C) induziert durch 100 µM tBuOOH (15 min. 37 °C). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± S.D. (n=3)

3.2.2.1.3 DNA-Reparaturhemmung durch Vorbehandlung mit exogenem NO

Die Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden, eingeführt durch Behandlung der Zellen mit verschiedenen Agentien, wurde durch exogenes NO nicht verändert. Nun stellte sich die Frage, ob die Reparatur induzierter Läsionen verändert würde. Diese war durch endogenes NO (3.2.1.3.3.) nicht beeinflusst worden. Im folgenden wurden dazu vier verschiedene Reparaturarten untersucht, (i) die Basenexzisionsreparatur (BER), ermittelt durch Bestimmung Fpg-sensitiver Läsionen, (ii) die Nukleotidexzisionsreparatur (NER), ermittelt durch Bestimmung T4 Endonuklease V-sensitiver Modifikationen, (iii) die Einzelstrangbruchreparatur und (iv) die Reparatur von AP-Läsionen, ermittelt durch Bestimmung Exonuklease III-sensitiver Läsionen (siehe 1.5.). Bei Auftragung des „verbleibenden Schadens in Prozent“ als Ordinate wurde die Anzahl der durch die jeweilige Behandlung induzierten DNA-Modifikationen (siehe 3.2.2.4.2.) mit 100 %-induziertem DNA-Schaden gleich gesetzt.

3.2.2.1.3.1 Reparatur Ro 19-8022 induzierter oxidativer Basenmodifikationen

B6-Vector-only-Zellen wurden mit dem NONOat präinkubiert (2.2.7.3.4.), und zwar entweder vor Behandlung mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022 (2.2.7.3.2.) oder während der sich anschließenden 3-stündigen Reparaturzeit (2.2.7.3.8.). Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Läsionen wurden mit der Alkalischen Elution ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.42 dargestellt.

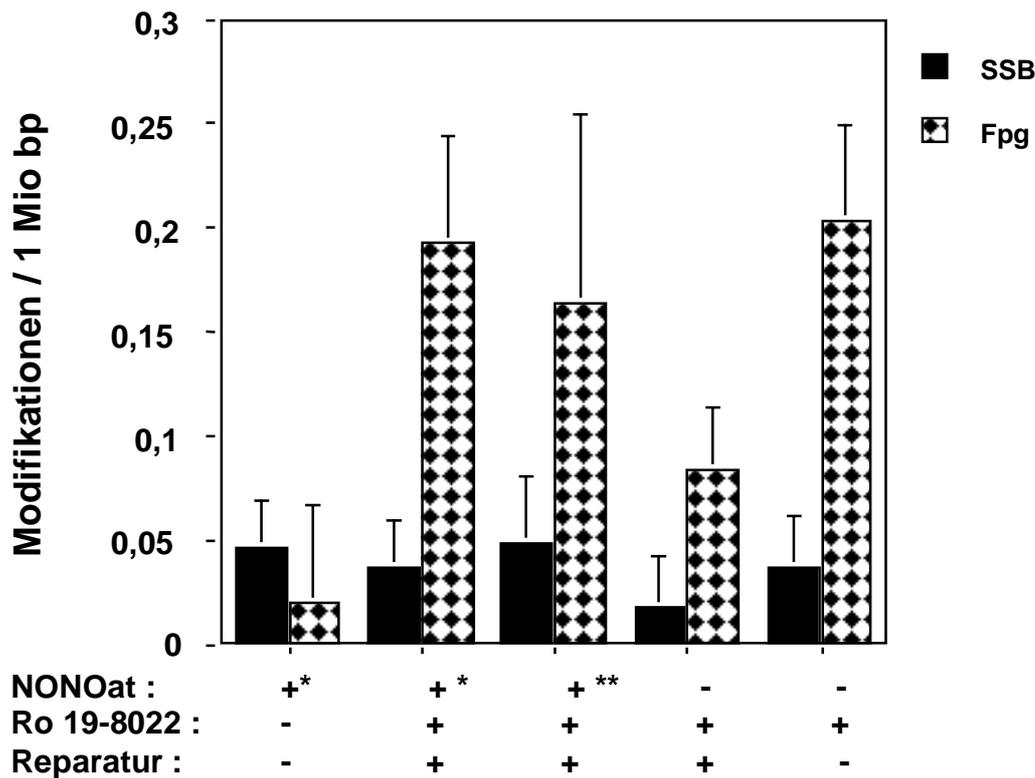


Abb. 3.42 Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Läsionen in B6-Vector-only-Zellen mit und ohne Präinkubation mit 0,75 mM DPTA-NONOat (3 h 37°C) mit und ohne Schädigung mit 40 nM Ro 19-8022 + sichtbares Licht (166 kJ/m²; 400-800 nm) und mit und ohne 3 h Reparatur. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± S.D. (n=3)
 * = NONOat Präinkubation
 ** = NONOat Inkubation während der Reparaturzeit

Man sieht, dass sowohl bei Präinkubation als auch bei Inkubation mit dem NONOat während der 3-stündigen Reparaturzeit die Reparatur Fpg-sensitiver Läsionen durch 0,75 mM NO nahezu total inhibiert wurde. Wählt man eine andere Art der Auftragung, indem man die Zahl der induzierten Läsionen gleich 100 % setzt, ergibt sich das in **Abb. 3.43** dargestellte Bild.

Die Inkubation mit 0,75 mM NO führte nicht zu einem signifikanten Anstieg an oxidativen DNA-Modifikationen (**vergleiche auch 3.2.2.4.1., Abb. 3.37**). Nach Präinkubation mit NO waren nach 3stündiger Reparaturzeit noch 94,3 ± 7,7 % und bei Anwesenheit von NO während der Reparatur noch 77,0 ± 28,7 % der induzierten Fpg-sensitiven Modifikationen vorhanden. Im Vergleich wurden von der nicht mit NO behandelten Kontrolle im gleichen Zeitraum 49,4 ± 6,1 % der induzierten oxidativen DNA-Modifikationen repariert.

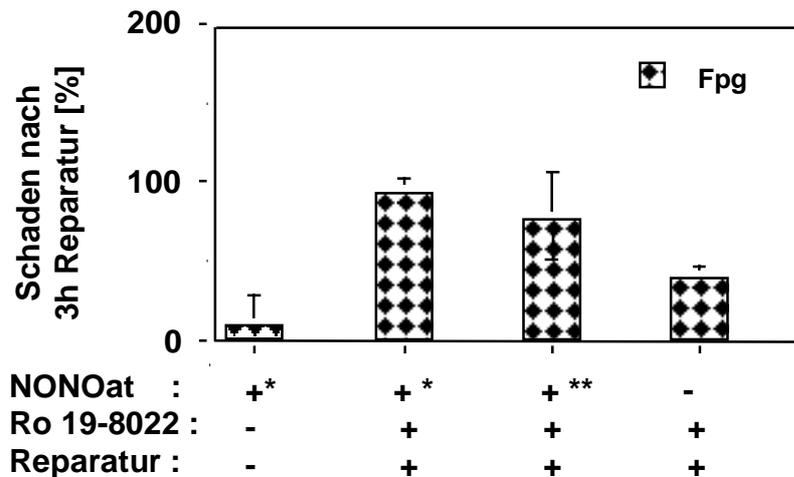


Abb. 3.43 Unreparierte Fpg-sensitive Läsionen in B6-Vector-only-Zellen mit und ohne Präinkubation mit 0,75 mM DPTA-NONOat (3 h 37°C) mit und ohne Schädigung mit 40 nM Ro 19-8022 + sichtbares Licht (166 kJ/m²; 400-800 nm) und mit und ohne 3 h Reparatur. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± S.D. (n=3)
 * = NONOat Präinkubation
 ** = NONOat Inkubation während der Reparaturzeit

Um zu untersuchen, ob auch geringere NO-Konzentrationen zu einer Reparaturhemmung Ro-induzierter Fpg-sensitiver Läsionen führten, wurden B6-Vector-only-Zellen mit verschiedenen NONOat-Konzentrationen präinkubiert (2.2.7.3.4.) und nach 3stündiger Reparaturzeit auf Fpg-sensitive Modifikationen untersucht. Außerdem wurden parallele Experimente mit den Zerfallsprodukten des NONOat's durchgeführt, um sicherzugehen, dass die beobachtete Hemmung der Reparatur oxidativer DNA-Schäden tatsächlich auf das freigesetzte NO oder nicht etwa auf die beim Zerfall des NONOat's entstehenden anderen Produkte zurückzuführen war. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.44** dargestellt.

Sowohl 0,5 als auch 0,75 mM NO, freigesetzt aus DPTA-NONOat, hemmten die Reparatur Fpg-sensitiver Modifikationen signifikant. 0,5 mM exogenes NO führten zu 57 ± 9 % und 0,75 mM zu 95 ± 6 % Restschaden bzw. unreparierten Fpg-sensitiven Läsionen nach 3 h Reparatur. Eine Präinkubation mit 0,25 mM NONOat hatte keinen Einfluss auf die untersuchte BER. Die Inkubation mit den Zerfallsprodukten des NONOat's hatte zwar in den hohen untersuchten Konzentrationen einen geringen Einfluss auf die Reparatur Fpg-sensitiver Modifikationen, jedoch unterschied sie sich signifikant mit $p < 0,05$ im Falle von 0,5 mM und mit $p < 0,005$ im Falle von 0,75 mM NONOat von der stärkeren Beeinflussung der Reparatur durch das unzerfallene NONOat.

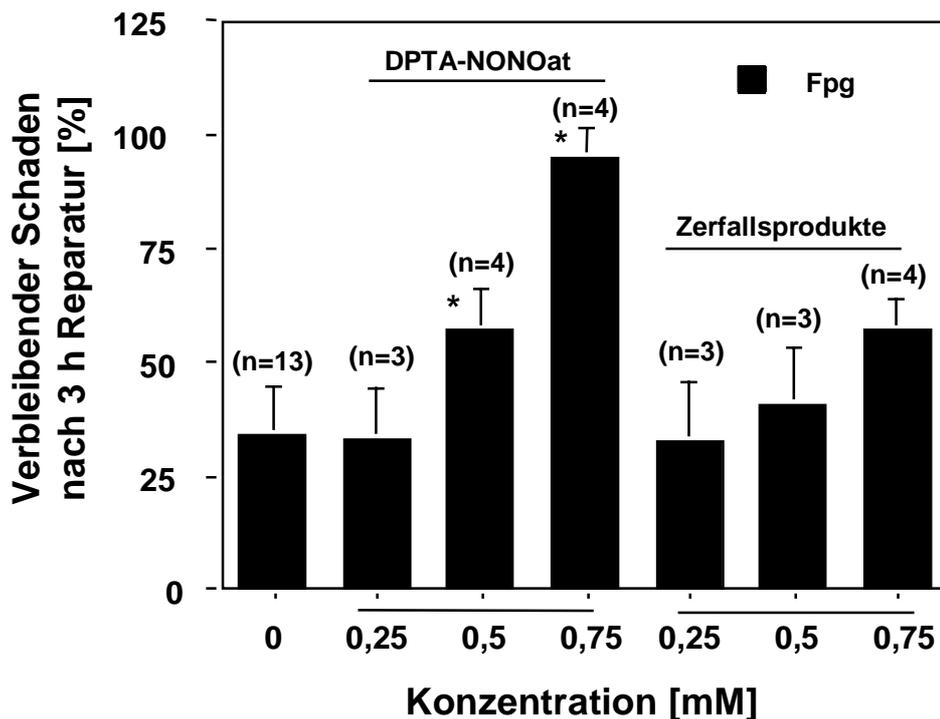


Abb. 3.44 Unreparierte Fpg-sensitive Läsionen in B6-Vector-only-Zellen mit und ohne Präinkubation mit DPTA-NONOat (3 h 37°C) induziert durch 40 nM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m²; 400-800 nm) auf Eis nach 3stündiger Reparaturzeit. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± S.D. (*p<0,005)

Die Frage, die sich stellte, war, wie lange die Reparaturinhibition anhalten würde. Daher wurden B6-Vector-only-Zellen nach NONOat Präinkubation, Behandlung mit Ro 19-8022 und 14stündiger Reparaturzeit auf verbliebene Fpg-sensitive Modifikationen untersucht. Diese Frage war außerdem interessant, da die Beeinflussung der NER (3.2.2.4.3.2.) wegen der längeren Reparaturhalbwertszeit aufgrund des zugrundeliegenden Reparaturmechanismus nach ebenfalls 14 h Reparaturzeit untersucht wurde. Das Ergebnis ist in **Abb. 3.45** zu sehen.

Nach dieser längeren Reparaturzeit war kein Einfluss von exogenem NO auf die BER, ermittelt durch Bestimmung der Fpg-sensitiven Läsionen, mehr festzustellen. Ohne Behandlung mit dem NONOat war nach 14stündiger Reparaturzeit kein Restschaden mehr vorhanden. Die Präinkubation mit 0,5 mM NONOat führte zu etwa 5 % und mit 0,75 mM zu etwa 2 % Restschaden bzw. unreparierte Fpg-sensitive Läsionen nach 14 h Reparatur. Die Werte sind für die Proliferation der Zellen innerhalb der 14 h korrigiert.

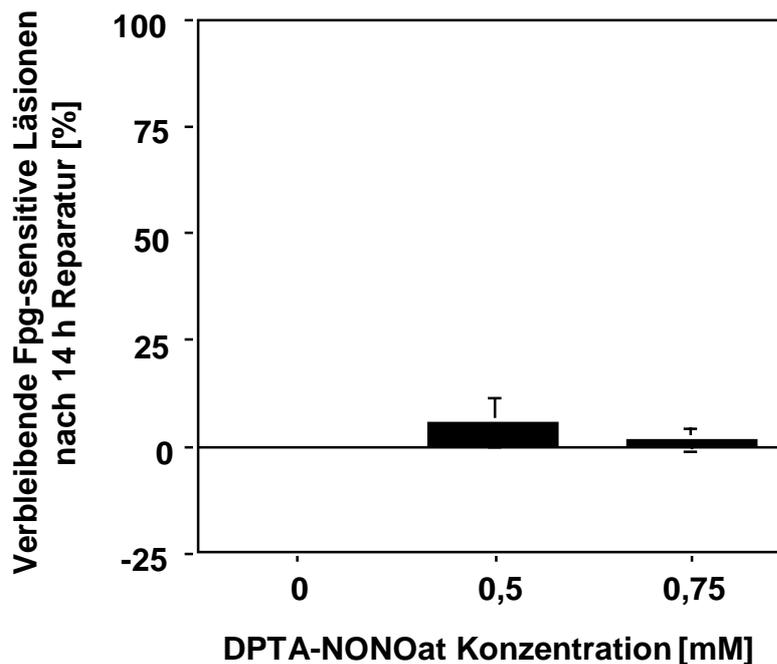


Abb. 3.45 Unreparierte Fpg-sensitive Läsionen in B6-Vector-only-Zellen mit und ohne Präinkubation mit DPTA-NONOat induziert durch 40 nM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m²; 400-800 nm) auf Eis nach 14stündiger Reparaturzeit. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± S.D. (n=3)

3.2.2.1.3.2 Reparatur UVB induzierter DNA-Schäden

Um zu untersuchen, ob exogenes NO auch einen Einfluss auf die Reparatur anderer DNA-Modifikationen hätte, wurden B6-Vector-only-Zellen nach NONOat Präinkubation (2.2.7.3.4.) mit UVB (3,9 J/m²) geschädigt (2.2.7.3.6.). Die Dosis induzierte etwa 0,33 Pyrimidindimere / 1 Mio bp (3.2.2.1.2.2.), bestimmt als T4 Endonuklease V-sensitive Läsionen. Nach einer 14stündigen Reparaturzeit wurde auf verbleibende T4 Endonuklease V-sensitive Läsionen untersucht. Parallele Versuche wurden mit den Zerfallsprodukten des NONOat's durchgeführt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.46** dargestellt.

Die NONOat-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Reparatur UVB-induzierter Pyrimidindimere. Nach 14stündiger Reparaturzeit waren in den mit NO behandelten Zellen wie auch der unbehandelten Kontrolle noch 35-40 % der induzierten, T4 Endonuklease V-sensitiven Modifikationen vorhanden. Die Werte sind für die Proliferation der Zellen innerhalb der 14 h korrigiert. Da auch bei der BER nach 14 h keine Reparaturhemmung mehr festzustellen war (**siehe Abb. 3.45**), ist unsicher, ob die NER wirklich nicht beeinflusst wurde oder es aufgrund der langen Reparaturzeit zu einer Neusynthese eines eventuell durch NO gehemmten Reparaturenzym kam.

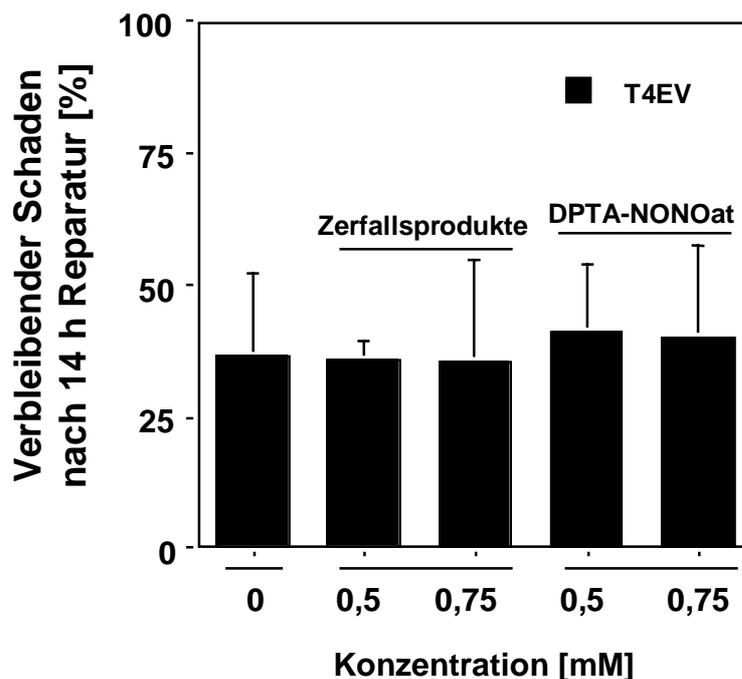


Abb. 3.46 Unreparierte T4EV-sensitive Läsionen in B6-Vector-only-Zellen mit und ohne Präinkubation mit DPTA-NONOat (3 h 37°C) oder dessen Zerfallsprodukten induziert durch UVB ($3,9 \pm 0,33 \text{ J/m}^2$) nach 14 h Reparatur. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D. (n=3)

3.2.2.1.3.3 Reparatur Wasserstoffperoxid induzierter DNA-Strangbrüche

Um zu untersuchen, ob exogenes NO einen Einfluss auf die Reparatur von Einzelstrangbrüchen hätte, wurden B6-Vector-only-Zellen nach NONOat Präinkubation (2.2.7.3.4.) mit Wasserstoffperoxid geschädigt (2.2.7.3.3.) und nach einer Reparaturzeit von 30 min. auf verbleibende Einzelstrangbrüche mittels der Alkalischen Elutionstechnik untersucht. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.47** dargestellt.

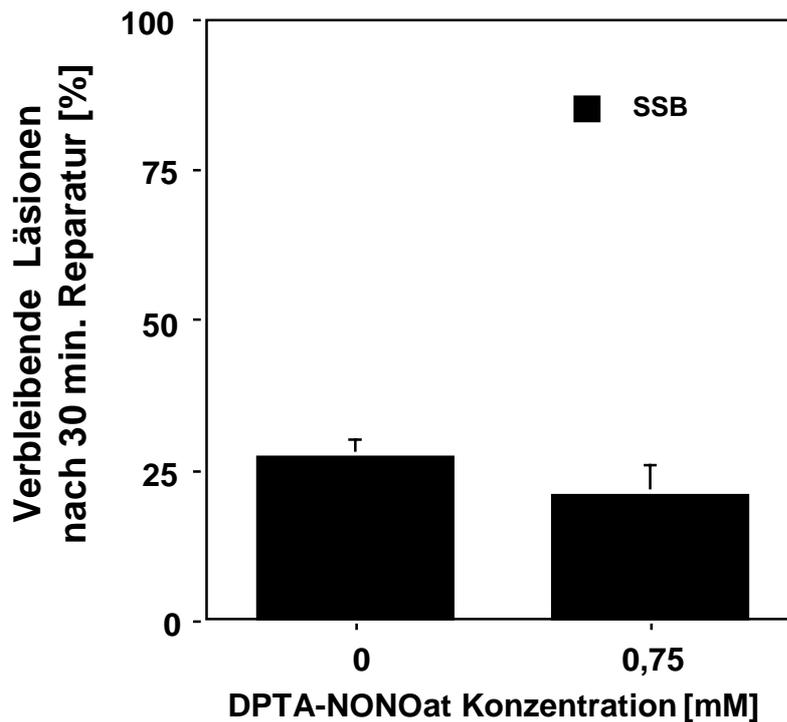


Abb. 3.47 Unreparierte Einzelstrangbrüche in B6-Vector-only-Zellen mit und ohne Präinkubation mit 0,75 mM DPTA-NONOat (3 h 37°C) induziert durch 50 μM H_2O_2 in PBS (20 min. auf Eis) nach 30 min. Reparatur. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D. (n=4)

Die Präinkubation mit exogenem NO hatte keinen Einfluss auf die Reparatur von Einzelstrangbrüchen. Nach 30 min. waren in behandelten Zellen und in Kontrollzellen noch etwa 25 % der durch Wasserstoffperoxid induzierten Einzelstrangbrüche vorhanden. Die Induzierbarkeit von Einzelstrangbrüchen wurde auch nicht durch die NONOat Präinkubation beeinflusst und betrug in beiden Ansätzen etwa 1 Läsion pro 1 Mio bp (**Daten nicht gezeigt; siehe auch 3.2.1.3.2.2. Abb. 3.23**). Dies steht im Gegensatz zu den Befunden, die durch endogenes NO ermittelt wurde, das ja vor Strangbrüchen schützte (**siehe 3.2.1.3.2.2.**). Möglicherweise könnte ein Grund dafür die in den Experimenten mit dem NONOate hohen generierten NO-Konzentrationen sein. Eine abschließende Klärung des Befunden ist jedoch mit den hier durchgeführten Untersuchungen nicht möglich.

3.2.2.1.3.4 Reparatur von basenfreien Stellen

Um zu untersuchen, ob exogenes NO einen Einfluss auf die Reparatur von basenfreien Stellen (AP-Läsionen) hat, wurden B6-Vector-only-Zellen nach NONOat Präinkubation (2.2.7.3.4.) mit tBuOOH geschädigt (2.2.7.3.7.). Durch die Behandlung wurden 0,19 AP-Läsionen/1 Mio bp, sensitive zu Exonuklease III, induziert (siehe 3.2.2.1.2.3.). Nach 3stündiger Reparaturzeit wurde auf unreparierte Exonuklease III-sensitive Läsionen mittels der Alkalischen Elutionstechnik untersucht. Die Ergebnisse ist in Abb. 3.48 dargestellt.

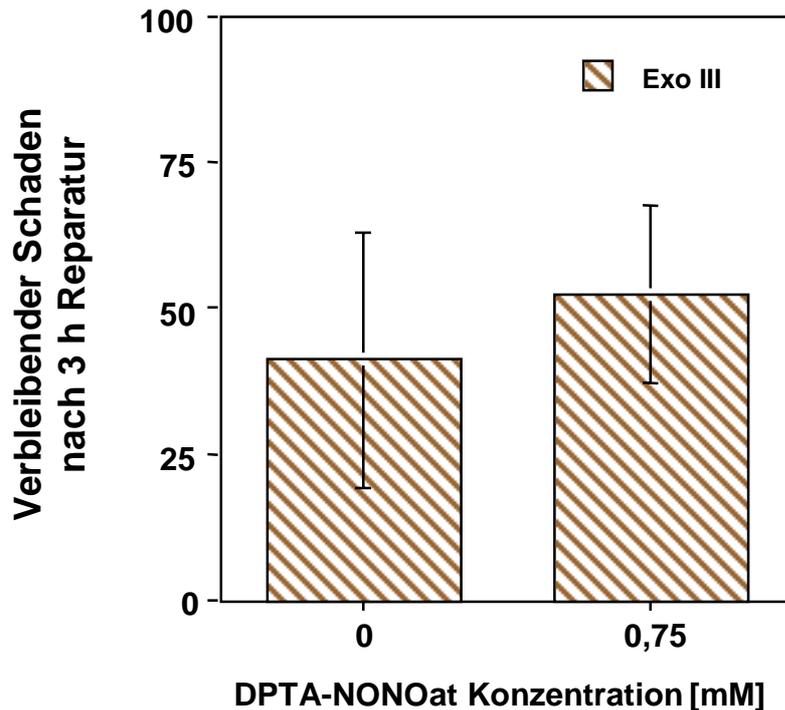


Abb. 3.48 Unreparierte Exonuklease III-sensitive Läsionen in B6-Vector-only-Zellen mit und ohne Präinkubation mit 0,75 mM DPTA-NONOat (3 h 37°C) induziert durch 100 µM tBuOOH (15 min., 37°C) nach 3stündiger Reparaturzeit. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D. (n=3)

Exogenes NO hatte keinen Einfluss auf die Reparatur von AP-Läsionen. Nach 3stündiger Reparaturzeit waren sowohl in mit NO präinkubierten Zellen als auch in Kontrollzellen noch etwa 50 % der durch tBuOOH induzierten Exonuklease III-sensitiven Läsionen vorhanden. Die Halbwertszeit von AP-Läsionen in B6 Mausfibroblasten lässt sich für die untersuchte Zelllinie mit 3 Stunden angeben.

3.2.2.2 Einfluss exogener NO-Generierung auf die Mikrokernrate in B6 Mausfibroblasten

Als weiterer genotoxischer Endpunkt wurde der Einfluss exogener NO-Produktion auf die Mikrokernrate untersucht (2.2.10.). Endogenes NO war nicht in der Lage gewesen, Mikrokerne zu induzieren. Daher war es interessant zu untersuchen, ob höhere NO-Konzentrationen in der Lage wären, Mikrokerne zu induzieren. Hierzu wurden B6-Vector-only-Zellen mit DPTA-NONOat behandelt und auf das Vorhandensein von Mikrokernen untersucht (2.2.10.2). Parallel wurden Versuche mit den Zerfallsprodukten

des NONOat's durchgeführt, um sicherzugehen, dass eventuell detektierte Mikrokerne wirklich durch exogenes NO hervorgerufen wurden. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.49** dargestellt.

Man sieht, dass durch exogenes NO in Konzentrationen ab 0,75 mM Mikrokerne in B6-Vector-only-Zellen induziert wurden. Diese können wahrscheinlich auf die in der DNA induzierten Einzelstrangbrüche zurückgeführt werden (siehe **Abb. 3.37**). Die Zerfallsprodukte des NONOat's induzierten keine Mikrokerne.

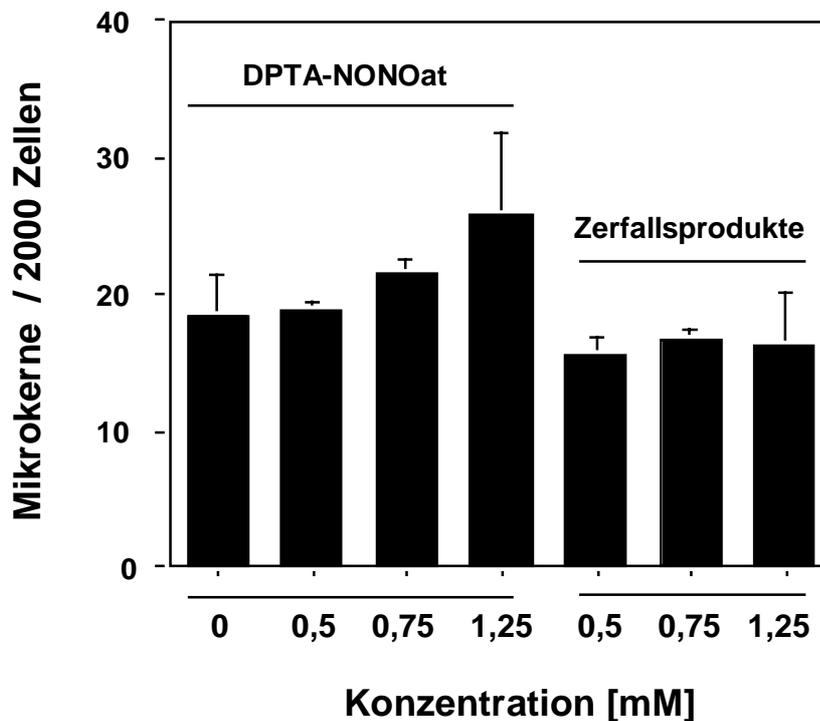


Abb. 3.49 Mikrokernrate in B6-Vector-only-Zellen nach Behandlung mit DPTA-NONOat oder dessen Zerfallsprodukten für 3 h bei 37°C. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D. (n=3-4)

3.2.2.3 Einfluss exogen generierten Stickstoffmonoxids auf die Zellproliferation (Zelltoxizitätstest)

Zur Untersuchung der Toxizität der Behandlungen, die für die Bestimmungen mittels der Alkalischen Elution und der Mikrokernrate durchgeführt wurden, wurde wie unter **2.2.8. Absatz 2** beschrieben verfahren. Der so erhaltene Proliferationsfaktor beinhaltet sowohl die „Plating efficiency“, also wieviele Zellen nach dem Aussäen angewachsen sind, als auch die „Cloning efficiency“, d. h. wieviele angewachsenen Zellen in der Lage waren sich zu vermehren (eigentlich Kolonien bilden). Um nur die „Cloning efficiency“ zu erhalten wurde daher, wenn angegeben der Proliferationsfaktor nach **2.2.8.1. Absatz 3** bestimmt. Für die Berechnung der Prozentangaben ist außerdem **2.2.8.1. Absatz 4** zu berücksichtigen.

3.2.2.3.1 Zellproliferation nach Behandlung mit Ro 19-8022 in Verbindung mit der Toxizität der exogenen NO-Generierung

Endogenes NO war nicht toxisch für die Zellen gewesen (2.1.5.1.). Daher sollte untersucht werden, ob exogenes NO die Proliferation der Zellen beeinflussen würde. Außerdem wurden die Zellen nach der Behandlung auch mit Ro 19-8022 geschädigt (2.2.8.2. Absatz 2), um erstens die Toxizität des Photosensibilisators zu ermitteln und zweitens den Einfluss des NONOat's auf die Photosensibilisator vermittelte Toxizität zu bestimmen. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.50** dargestellt.

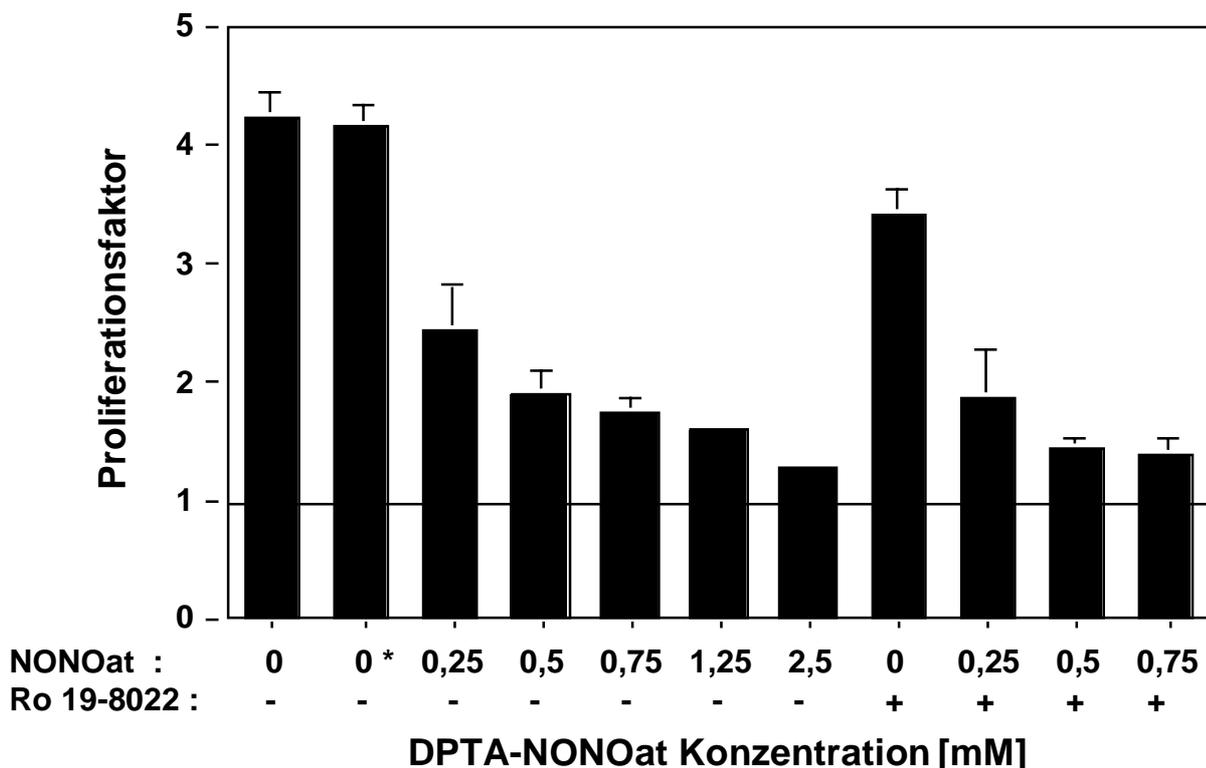


Abb. 3.50 Proliferationsfaktor nach 48 h von B6-Vector-only-Zellen mit und ohne Behandlung mit DPTA-NONOat (3 h bei 37°C) und mit und ohne Schädigung mit Ro 19-8022 in Kombination mit sichtbarem Licht (166 kJ/m²; 400-800 nm). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± S.D. (n=3-11)
* = 100 µl 10 mM NaOH

Die Proliferation der Zellen wurde durch exogenes NO sehr stark beeinträchtigt. Schon relativ geringe Konzentrationen von 0,25 mM NO, die noch zu keinen DNA-Schäden (**siehe Abb. 3.37**) oder Hemmung der DNA-Reparatur (**siehe Abb. 3.44**) geführt hatten, reduzierten den Proliferationsfaktor der Zellen auf ca. 50 % des Faktors unbehandelte Kontrollzellen. Die Inkubation mit 1,25 mM NONOat führte zu einer Reduktion des Proliferationsfaktors um 80 % und die höchste untersuchte NO-Konzentration zu einer 90 %igen Proliferationshemmung. Beide Behandlungen waren also sehr toxisch für die Zellen. Diese hohen Konzentration waren auch in der Lage gewesen, selbst Schäden in der zellulären DNA zu induzieren (3.2.2.4.1.). Im Vergleich zu der relativ niedrigen Anzahl

induzierter DNA-Schäden war die Toxizität der Behandlung sehr hoch. Sie kann daher nicht durch die DNA-Schädigung alleine erklärt werden.

Die Behandlung mit dem Photosensibilisator alleine führte zu einer Verringerung des Proliferationsfaktors von 4,2 un behandelter Kontrollzellen auf 3,4 nach Behandlung mit Ro 19-8022. Eine Präinkubation mit dem NONOat vor der Ro-Schädigung reduzierte den Proliferationsfaktor etwa in dem Maß, dass eine Addition der Effekte der beiden Behandlungen gegeben war. Exogenes NO hatte weder potenzierende Effekte auf die Photosensibilisator-vermittelte Toxizität noch gegenläufige.

Parallel wurden auch entsprechende Versuche mit den Zerfallsprodukten des DPTA-NONOat's durchgeführt, um sicherzugehen, dass die beobachtete Toxizität wirklich auf das NO selbst zurückzuführen war. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.51** dargestellt.

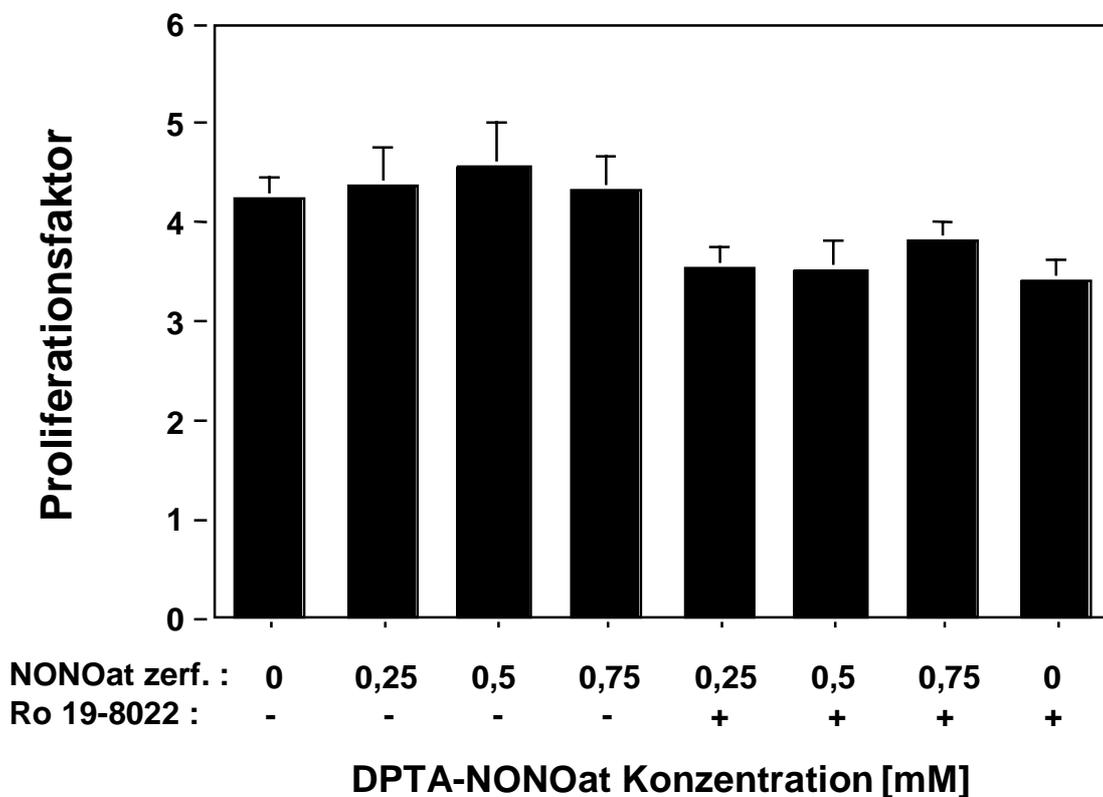


Abb. 3.51 Proliferationsfaktor nach 48 h von B6-Vector-only-Zellen mit und ohne Behandlung mit zerfallenem DPTA-NONOat (3 h bei 37°C) und mit und ohne Schädigung mit Ro 19-8022 in Kombination mit sichtbarem Licht (166 kJ/m²; 400-800 nm). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± S.D. (n=3-11)

Die Zerfallsprodukte hatten keinen Einfluss auf den Proliferationsfaktor in B6-Vector-only-Zellen. Sowohl in un behandelten Kontrollzellen als auch in mit 0,25-0,75 mM zerfallenem NONOat behandelten Zellen betrug der Proliferationsfaktor etwa 4,3. Eine Kombinationsbehandlung mit Ro 19-8022 führte zu einer Reduktion des Proliferationsfaktors auf ca. 80 %, was auf die Ro-Schädigung zurückzuführen war (**Abb. 3.50**).

Wird der Proliferationsfaktor nach **2.2.8.2. Absatz 3** bestimmt, erhält man einen Proliferationsfaktor, der nicht durch die Plating efficiency beeinflusst ist. Der so ermittelte Proliferationsfaktor unbehandelter B6-Vector-only-Zellen betrug etwa 3,6 und der mit 40 nM Ro 19-8022 behandelte Zellen etwa 3,4, was einem Anteil von 92 % entspricht. Vergleicht man diesen Wert mit dem in **Abb. 3.50** bestimmten von ca. 80 %, so kann man daraus schließen, dass die Plating efficiency nach Ro-Behandlung herabgesetzt sowie die Proliferation durch den Photosensibilisator beeinflusst ist. Der geringere Proliferationsfaktor von 80 % kann auf ein vermindertes Anwachsen der Zellen nach der Behandlung, dem Ablösen und Wiederaussäen zurückgeführt werden.

3.2.2.3.2 Zellproliferation nach Behandlung mit UVB

Um die Toxizität der UVB-Behandlung zu ermitteln und den Einfluss des NONOat's auf die UVB-vermittelte Toxizität zu bestimmen, wurde der Proliferationsfaktor nach **2.2.8.2. Absatz 2** bestimmt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.52** dargestellt.

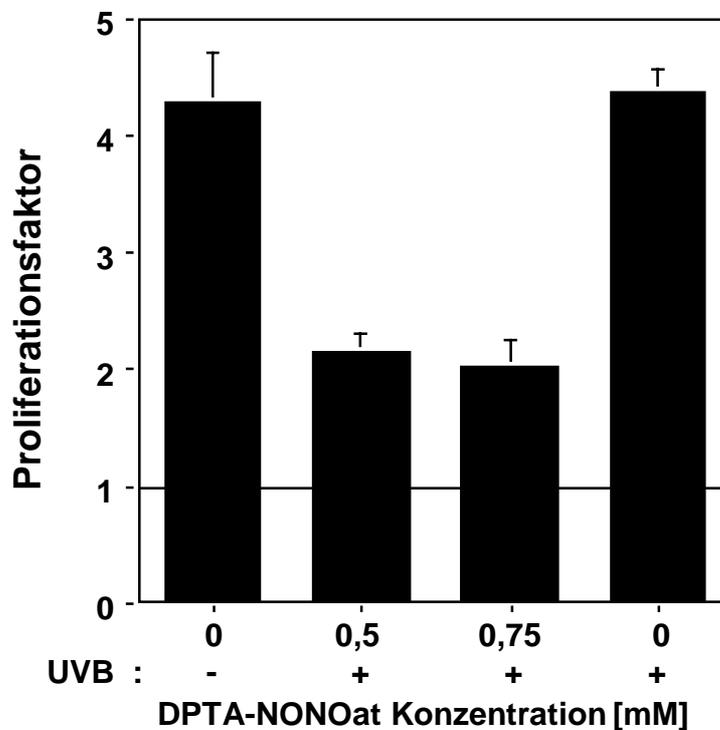


Abb. 3.52 Proliferationsfaktor nach 48 h von B6-Vector-only-Zellen mit und ohne Behandlung mit DPTA-NONOat (3 h bei 37°C) und mit und ohne Schädigung mit UVB (3,9 ± 0,33 J/m²). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± S.D. (n=4)

Die UVB-Schädigung hatte keinen Einfluss auf die Proliferation. In unbehandelten, wie auch in mit UVB behandelten B6-Vector-only-Zellen betrug der Proliferationsfaktor etwa 4,3. Die Reduktion der Proliferation nach Inkubation mit dem NONOat in Kombination mit der UVB-Schädigung ist somit allein auf die Toxizität des exogenen NO zurückzuführen. Nach Präinkubation mit 0,5 bzw. 0,75 mM DPTA-NONOat betrug der Proliferationsfaktor etwa 2. Exogenes NO hatte also keinen Einfluss auf Toxizität der UVB-Behandlung.

Außerdem wurde der Proliferationsfaktor nach **2.2.8.2. Absatz 3** bestimmt, um einen von der Plating efficiency nicht beeinflussten Proliferationsfaktor zu erhalten (**vergleiche 3.2.2.6. und 3.2.2.6.1.**). Der so ermittelte Proliferationsfaktor von B6-Vector-only-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen NONOat bzw. dessen Zerfallsprodukten mit und ohne Kombination mit UVB ist in **Abb. 3.53** dargestellt.

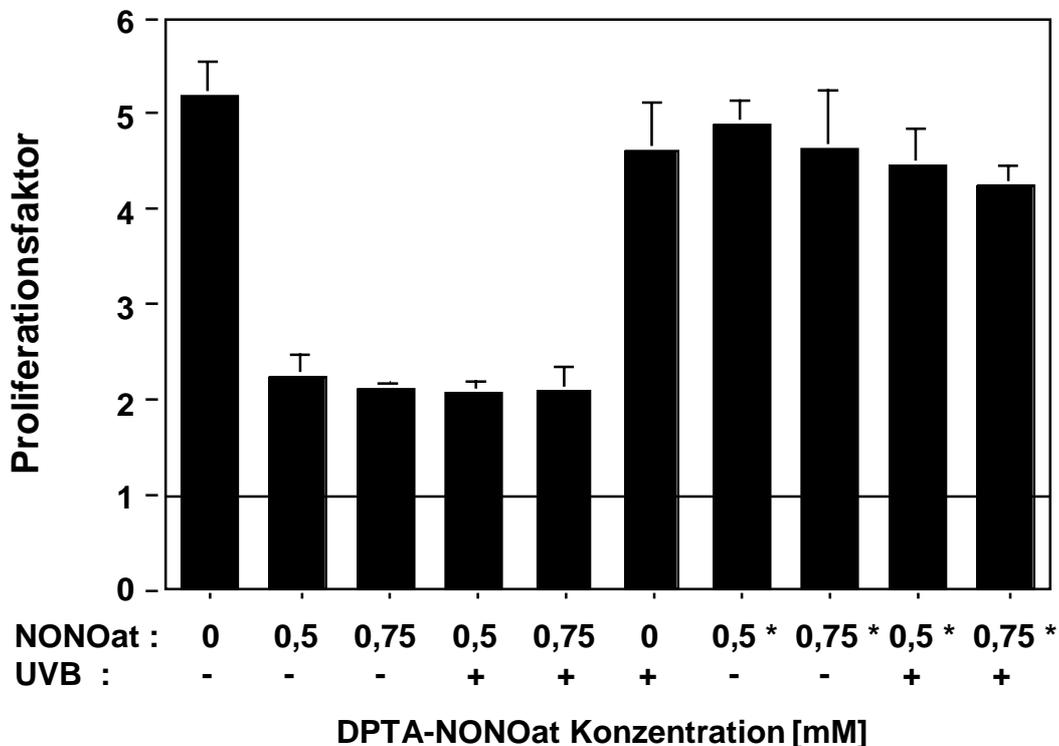


Abb. 3.53 Proliferationsfaktor von B6-Vector-only-Zellen mit und ohne Behandlung mit DPTA-NONOat oder dessen Zerfallsprodukten (3 h bei 37°C) und mit und ohne Schädigung mit UVB ($3,9 \pm 0,33 \text{ J/m}^2$). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D. (n=3-4)
* = zerfallenes DPTA-NONOat

Wie auch für die Bestimmung des Proliferationsfaktors nach **2.8.2.2.** gezeigt (**Abb. 3.52**), hatte exogenes NO keinen Einfluss auf die UVB-vermittelte Toxizität in B6-Vector-only-Zellen. Die Reduktion des Proliferationsfaktors auf ca. 50 % des Wertes durch NONOat-Behandlung in Kombination mit UVB gegenüber unbehandelten Zellen ist allein auf die Toxizität des freigesetzten NO zurückzuführen, da die Reduktion der durch alleinige Behandlung mit dem NONOat bestimmten entspricht. Die Zerfallsprodukte führten nicht zu einer Beeinflussung der Proliferation, waren also nicht toxisch für die Zellen.

3.2.3 Einfluss exogen durch SIN-1 generierten Peroxynitrits in B6 Mausfibroblasten

SIN-1 war in der Lage, zellfrei Schäden an reiner DNA zu induzieren, die nach Transformation der DNA in Bakterien zu Mutationen führten (3.1.1.). Interessant war nun zu untersuchen, ob in Zellen ein ähnliches Schadensprofil wie unter zellfreien Bedingungen induziert würde und wie toxisch die Behandlung mit SIN-1 für die Zellen war.

3.2.3.1 Oxidative DNA-Schäden durch SIN-1 ermittelt mit der Alkalischen Elutionstechnik

B6-Vector-only-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von SIN-1 behandelt (2.2.7.3.5.) und auf verschiedene Endonuklease-sensitive DNA-Modifikationen und Einzelstrangbrüche untersucht. Die Ergebnisse sind als Schadensprofil in Abb. 3.54 gezeigt.

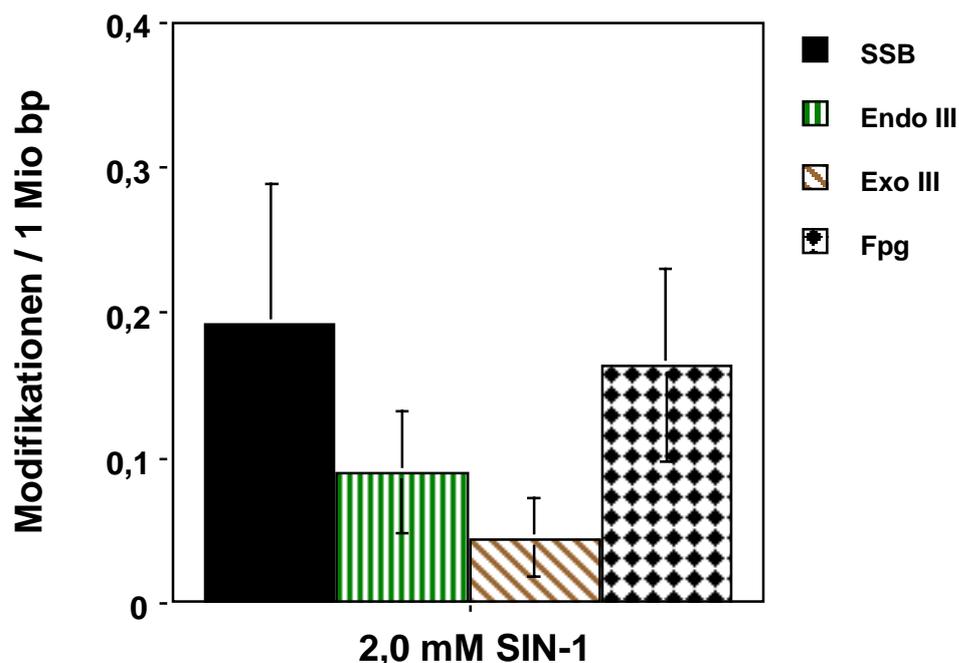


Abb. 3.54 Schadensprofil in B6-Vector-only-Zellen induziert durch 2 mM SIN-1 (1 h im Brutschrank bei 37°C in Vollmedium). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D. (n=3-6)

Man sieht, dass durch SIN-1 etwa gleich viele Einzelstrangbrüche wie Fpg-sensitive Läsionen in den Zellen induziert wurden. Nur sehr wenige AP-Läsionen, detektiert durch Exonuklease III und etwa gleich viele oxidative Pyrimidinmodifikationen, resultierend nach Abzug der AP-Läsionen von den durch Endonuklease III erkannten Läsionen, wurden durch SIN-1 induziert. Es fällt auf, dass das Schadensprofil dem von DPTA-NONOat in der DNA generierten (Abb. 3.38) sehr ähnlich ist. Man kann also auf die gleiche ultimal mit der DNA reagierende Spezies schließen. Bei dieser könnte es sich möglicherweise um Peroxynitrit handeln.

3.2.3.2 Toxizität der SIN-1 Behandlung

Zur Untersuchung der Toxizität der Behandlungen, die für die Bestimmung mittels der Alkalischen Elution durchgeführt wurden, wurde, wie unter **2.2.8.2 Absatz 2** beschrieben, verfahren. Hierzu wurden verschiedenen Konzentrationen von SIN-1 untersucht. Die Ergebnisse sind in **Abb. 3.55** gezeigt.

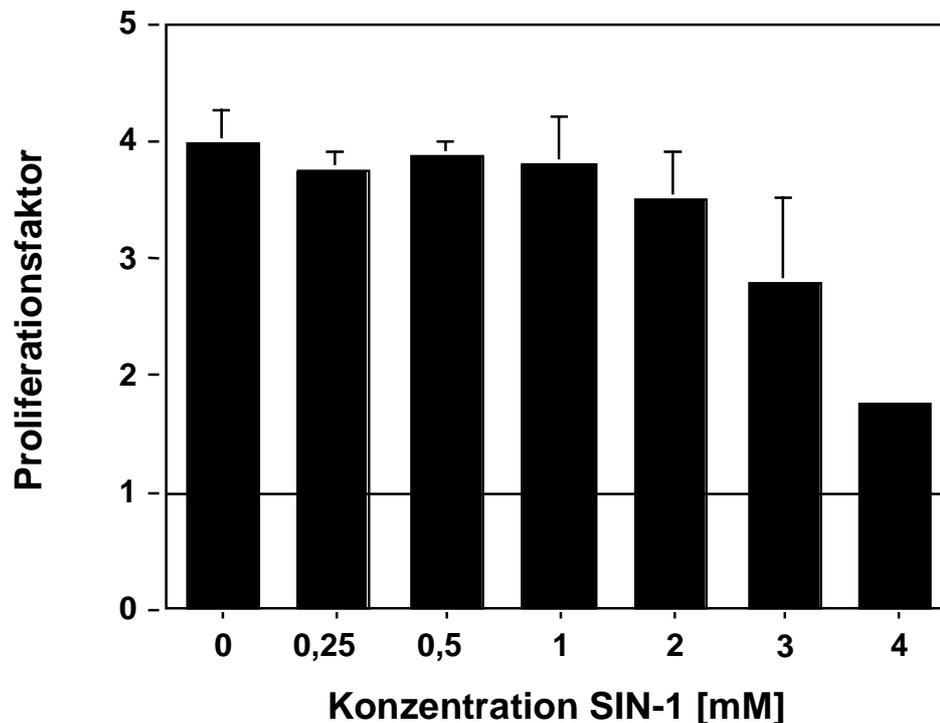


Abb. 3.55 Proliferationsfaktor nach 48 h von B6-Vector-only-Zellen nach Behandlung mit 0,25-4 mM SIN-1 (1 h bei 37°C). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D. (n=4-5; außer für 4 mM: n=1)

Überraschenderweise war die SIN-1 Behandlung für die Zellen nicht sehr toxisch. Bei der Konzentration an SIN-1, die schon zu oxidativen DNA-Schäden führte, nämlich 2,0 mM (**Abb. 3.54**), betrug der Proliferationsfaktor noch 84 % desjenigen von unbehandelten Zellen. Vergleicht man die Ergebnisse mit den durch Schädigung mit dem NONOat erhaltenen, so fällt auf, dass das NONOat bei vergleichsweise geringer DNA-schädigender Kapazität (**Abb. 3.37**) eine deutlich höhere Toxizität aufwies (**Abb. 3.50**).

4 Diskussion

4.1 Vergleich der Genotoxizität und Mutagenität von SIN-1, 4-HPT und Stickstoffmonoxid

SIN-1 wurde in dieser Arbeit zur Generierung von Peroxynitrit eingesetzt. Es lagen Untersuchungen von **Epe et al. (1996a)** vor, die durch Vergleich der Schadensprofile von SIN-1 und Peroxynitrit und anderen Experimenten gezeigt hatten, dass unter zellfreien Bedingungen die gleiche reaktive Spezies ultimal mit der DNA reagierte. In dieser Arbeit konnte das Schadensprofil an Plasmid pSV2-*gpt*-DNA für höhere SIN-1-Konzentrationen bestätigt werden (**Abb. 3.3**), so dass auch für die Transformationsexperimente davon ausgegangen wurde, dass Peroxynitrit als DNA-schädigendes Agens von SIN-1 freigesetzt wurde.

4-HPT wurde zur Generierung von Hydroxylradikalen verwendet. Auch hier lagen Erkenntnisse zum DNA-schädigenden Prinzip vor. Durch Experimente und Vergleich der DNA-Schadensprofile von 4-HPT und γ -Strahlen (**Epe et al. 1996**) wurde eine Übereinstimmung der ultimal mit der DNA reagierenden Spezies für beide Schädigungsarten festgestellt, was bedeutet, dass in beiden Fällen Hydroxylradikale für die DNA-Schäden verantwortlich waren. Das an PM2-DNA ermittelte Schadensprofil (**Epe et al. 1996**) konnte auch hier für die pSV2-*gpt*-DNA weitgehend bestätigt werden, lediglich ein erhöhter Anteil Endonuklease III-sensitiver Modifikationen war auffällig (**Abb. 3.10**). Und auch die geringe an der unteren Nachweisgrenze liegende Anzahl OGG1-sensitiver Modifikationen war unerwartet (**Abb. 3.10**), da die Bildung von 8-oxoG durch Hydroxylradikale unter bestimmten Bedingungen beschrieben ist (**Halliwell & Aruoma 1991**).

Unter den hier gewählten Versuchsbedingungen konnten durch Stickstoffmonoxid (NO), freigesetzt aus DPTA-NONOat (**1.2.3.6.**), keine DNA-Schäden (Fpg-sensitive Modifikationen und Einzelstrangbrüche) induziert werden (**3.17**). Dieser Befund war unerwartet im Hinblick auf Ergebnisse von **Routledge et al. (2000)** und **Zhuang et al. (2000)**, die durch NO-Gas Mutationen nach zellfreier Schädigung vom Plasmid pSP189 und anschließender Transformation in menschlich Ad293-Zellen sowie durch Begasung von verschiedenen *Salmonella typhimurium*-Stämmen induzieren konnten. Möglicherweise ist die den Mutationen zugrundeliegende Induktion von DNA-Schäden auf die von den genannten Autoren eingesetzten hohen NO-Konzentrationen und auf die geringen Sauerstoffmengen, die während der Schädigung durch das Einleiten des Gases in der Lösung vorlagen, zurückzuführen.

Im folgenden sollen zunächst die Toxizität der durch Hydroxylradikalen und Peroxynitrit generierten DNA-Schäden sowie die Mutagenität im untersuchten System, bestehend aus *E. coli* DT-2 und Plasmid pSV2-*gpt*, rekapituliert und diskutiert werden. Im Anschluss daran soll versucht werden, Aussagen über die Mutagenität verschiedener DNA-Schäden sowie verschiedener DNA-schädigender Agentien zu formulieren.

Die durch 4-HPT induzierten DNA-Schäden waren mit einer signifikanten Hemmung der DNA-Replikation verbunden (**Abb. 3.14**), während die durch SIN-1 generierten nur zu einer geringen Abnahme der Zahl der Transformanten führte (**Abb. 3.7**). Im untersuchten System war andererseits SIN-1 in Bezug auf die Fpg-sensitiven Modifikationen etwa 5fach mutagener als 4-HPT (**Abb. 3.8, Abb. 3.15**). Dieser Unterschied kann wahrscheinlich auf die verschiedene Art der induzierten DNA-Schäden (**Abb. 3.3, Abb. 3.10**) zurückgeführt werden. Um Aussagen über die Zusammenhänge der induzierten DNA-Schäden mit der durch sie verursachten Mutagenität machen zu können, wurden die Plasmide der nach der Transformation erhaltenen Mutanten isoliert und sequenziert (**3.1.1.4., 3.1.2.4.**). Die Mutationsdaten von SIN-1 und 4-HPT sollen hier im Vergleich mit denen anderer bekannter Mutagene, wie Ro 19-8022, NDPO₂ (3,3'-(1,4-Naphthyliden)dipropionat), BCBT ([4-(*tert*-Butyldioxy-carbonyl)benzyl]triethyl-ammoniumchlorid) und Riboflavin diskutiert werden. Zum besseren Verständnis sind in **Abb. 4.1** die Schadensprofile aller genannten Substanzen nebeneinander dargestellt.

Die durch die Agentien generierten ultimal mit der DNA reagierenden Spezies sind im Falle von BCBT Alkoxyradikale (*tert*-Butoxyradikale, *tert*-BuO[·]) (**Adam et al. 1998, Mahler 1999**), im Falle von NDPO₂ (**Di Mascio & Sies 1989, Ballmaier et al. 1997, Epe 1995**) und Ro 19-8022 (**Will et al. 1999**) Singulett-sauerstoff (¹O₂). Durch Riboflavin werden nach Bestrahlung ein-Elektronen-Oxidationen verursacht (**Ito et al. 1993**).

Auf den ersten Blick kann man hier sehen, dass die Schadensprofile der untersuchten Substanzen sich signifikant unterscheiden, wobei diejenigen, die durch die gleiche reaktive Spezies verursacht werden, sich natürlich ähnlich sind. Die Schadensprofile werden daher auch als „fingerprints“ bezeichnet, da sie für die jeweilige DNA-schädigende Spezies charakteristisch sind.

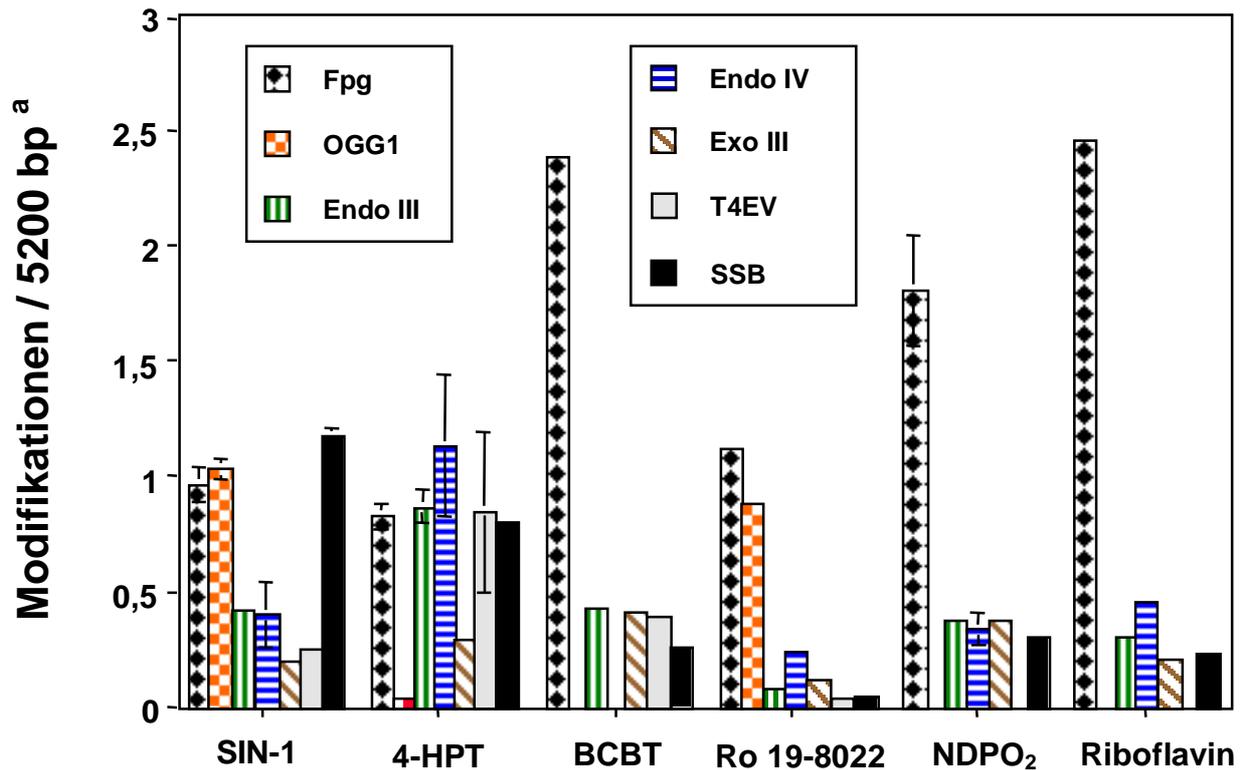


Abb. 4.1

DNA-Schadensprofile verschiedener Agentien

SIN-1 : 100 μ M, 37 $^{\circ}$ C, 1 h (n = 2-4)4-HPT : 200 μ M, sichtbares Licht (450 kJ/m²), auf Eis (n = 2-4)BCBT : 2 mM, UV³⁶⁰, 20 min., 10 cm Abstand, auf Eis (n = 1)^bRo 19-8022 : 50 μ M, sichtbares Licht (225 kJ/m²), auf Eis (n = 1)^cNDPO₂ : 2 mM, in D₂O-Puffer, 37 $^{\circ}$ C, 2 h (n = 1-4)^cRiboflavin : 100 μ M, sichtbares Licht (1000 Watt, 50 cm Abstand), 2 min., auf Eis (n = 1)^b^a für Ro 19-8022 Modifikationen / 10000 bp^b unveröffentlichte Daten von Dirk Holler^c unveröffentlichte Daten, freundliche Mitteilung von Ina Schulz

Da keine Korrelation zwischen der Anzahl der Fpg-sensitiven DNA-Schäden der genannten Agentien und der Mutationsfrequenz gegeben war (**Abb. 4.2 links**), wurde daraus abgeleitet, dass der Anteil der induzierten Fpg-sensitiven Basenmodifikationen, der für die Mutationen verantwortlich war, jeweils unterschiedlich zusammengesetzt war (**siehe 1.5.1.**). So ist bekannt, dass 8-oxoG ein relativ hohes mutagenes Potential von 2,5-4,8 % (**Moriya 1993**) besitzt, während dagegen die Mutagenität von 8-oxoA als wesentlich geringer gilt (**Wood et al. 1992**). Bei Auftragung der durch HPLC-Analyse ermittelten Mengen von 8-oxodG gegen die Anzahl der GC \rightarrow TA Transversionen, für die 8-oxoG wegen seiner Fehlpaarungsbereitschaft mit Adenin (**Shibutani et al. 1991**) verantwortlich gemacht wird, ergab sich eine gute Korrelation (**Abb. 4.2 rechts**). Hieraus lässt sich ableiten, dass sich unter den gegebenen Versuchsbedingungen alle im *gpt*-Gen induzierten 8-oxoG nach Replikation als GC \rightarrow TA Transversionen im Genom manifestierten.

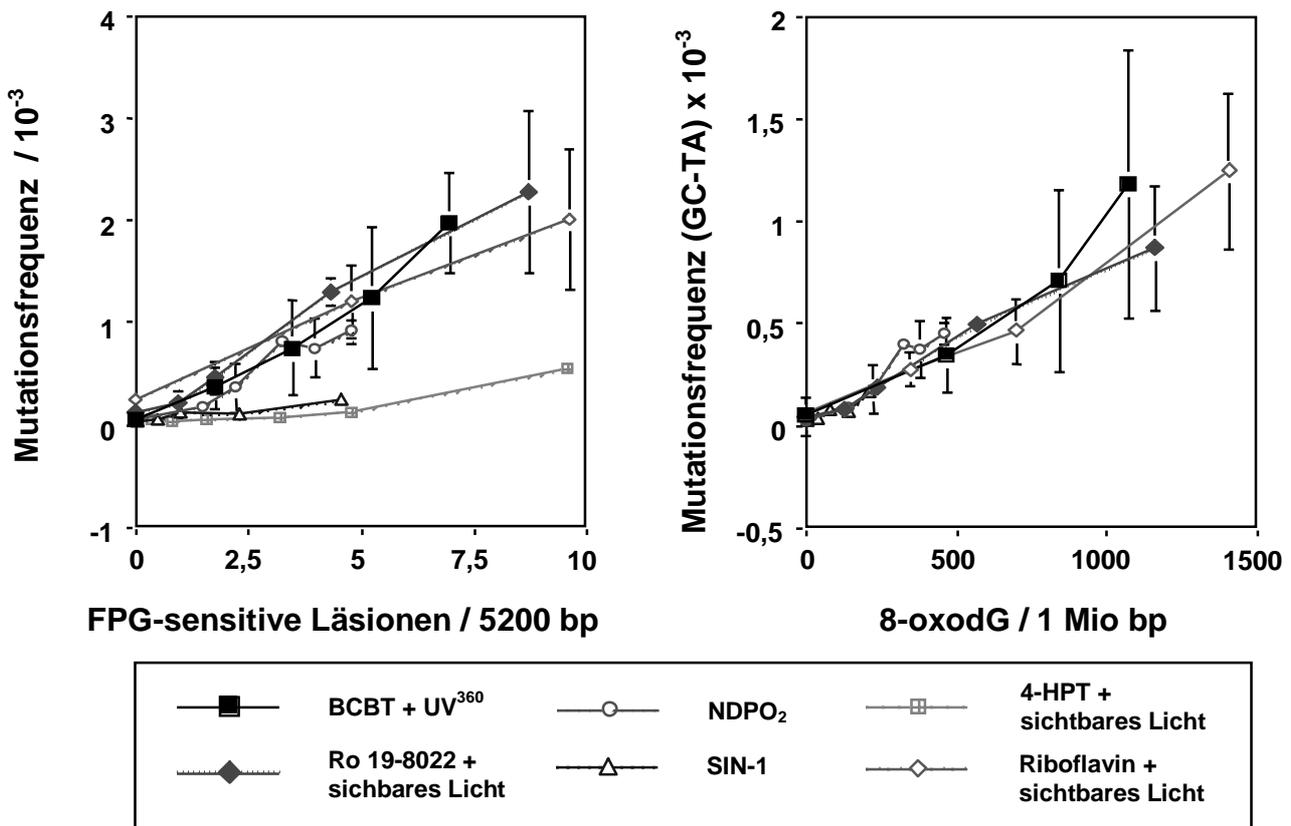


Abb. 4.2

links : Mutationsfrequenz aufgetragen gegen die Anzahl der Fpg-sensitiven Modifikationen pro Plasmid pSV2-*gpt* (5,2 kbp); (ab 2,5 Läsionen /5200 bp extrapoliert)

rechts : Mutationsfrequenz der GC nach TA-Transversionen aufgetragen gegen die Anzahl an 8-oxodG pro 1 Mio bp

SIN-1 (siehe 3.8), 4-HPT (siehe 3.15), BCBT (Mahler 1999), Ro 19-8022 (Will et al. 1999), NDPO₂ (Daten von Ina Schulz, unveröffentlicht), Riboflavin (Daten von Ina Schulz, unveröffentlicht)

Im Falle von SIN-1 betrug der Anteil der GC nach TA Transversionen 71 % der gesamten im Plasmid pSV2-*gpt* nach Replikation in Bakterien ermittelten Punktmutationen, im Falle von BCBT waren es 95 %, von Ro 19-8022 38 %, von NDPO₂ 53 % und von Riboflavin 16 %. Nur durch 4-HPT wurde keine GC nach TA Transversionen verursacht. Die Werte sind zusammen mit den anderen ermittelten Mutationsarten für die verschiedenen DNA-schädigenden Spezies in Tab. 4.1 aufgelistet.

In ähnlicher Weise wurde nun versucht weitere Korrelationen zwischen anderen Mutationsarten mit den ihnen zugrundeliegenden DNA-Modifikationen zu finden. In Abb. 4.3 wurden für die in Abb. 4.1 dargestellten Schadensprofile die Zahl der Einzelstrangbrüche mit der Gesamtmutationsfrequenz ins Verhältnis gesetzt. Hierbei ergab sich eine Punktwolke. Die beiden aufgetragenen Parameter korrelierten also nicht miteinander. Dies lässt den Schluß zu, dass Einzelstrangbrüche nicht überwiegend an der Ausbildung von Mutationen durch die Schädigung mit den verschiedenen Substanzen beteiligt sind.

Tab. 4.1 Durch verschiedene Oxidantien induzierte Mutationen im *gpt*-Gen des Plasmids pSV2-*gpt* nach Replikation in *E. coli* DT-2 (absolute Anzahl detektierter Mutationen und relative Anzahl in % der analysierten Punktmutanten)

Mutationsart	SIN-1	4-HPT + Licht	BCBT + UV ³⁶⁰	Ro 19-8022 + Licht	NDPO ₂	Riboflavin + Licht
Reaktive Spezies	ONOO ⁻	OH [·]	tert.-BuO [·]	¹ O ₂	¹ O ₂	Rib* ^b
GC → CG	2 (14 %)	4 (14 %)	1 (5 %)	11 (52 %)	8 (47 %)	20 (80 %)
GC → TA	10 (71 %)	-	20 (95 %)	8 (38 %)	9 (53 %)	4 (16 %)
GC → AT	1 (7 %)	22 (76 %)	-	2 (10 %)	-	1 (4 %)
AT → TA	-	2 (7 %)	-	-	-	-
AT → GC	1 (7 %)	1 (3 %)	-	-	-	-
Insertion	1 (Tn 5) ^a	1	1 (Tn 5)	2 (Tn 5)	1 (Tn 5)	1 (Tn 5)
Keine Mutation	1	1 (Deletion)	-	2	-	1

^a Tn 5 = Transposon 5

^b Rib* = Triplett-angeregtes Riboflavin, ein-Elektronen-Oxidationen

SIN-1 : 500 µM, 37 °C, 1 h

4-HPT : 2400 µM, sichtbares Licht (1000 Watt, 33 cm Abstand), 12mal 20 min., auf Eis

BCBT : Daten aus Schulz et al. (2000) und von Ina Schulz (persönliche Mitteilung)

Ro 19-8022 : Daten aus Will et al. (1999)

NDPO₂ : Daten aus Schulz et al. (2000)

Riboflavin : Daten aus Schulz et al. (2000)

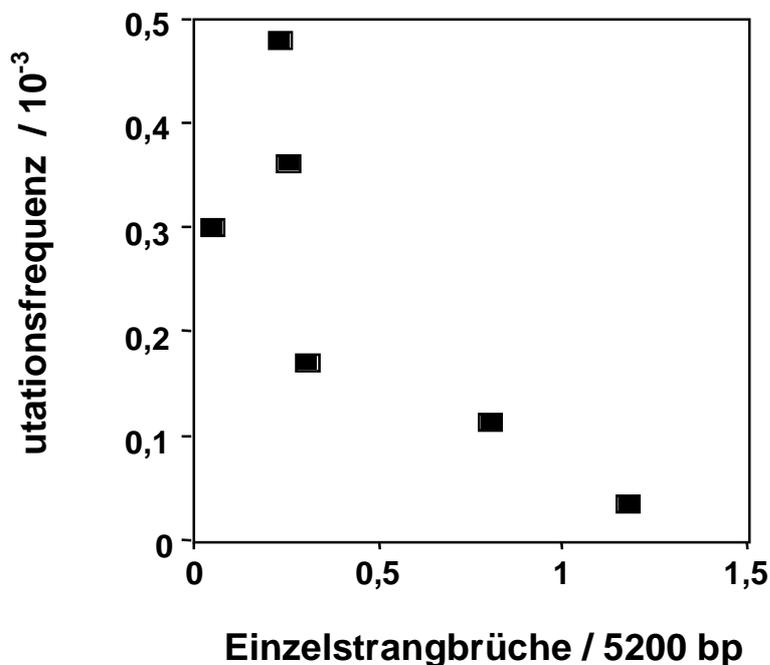


Abb. 4.3 Mutationsfrequenz aufgetragen gegen die Anzahl der Einzelstrangbrüche pro Plasmid pSV2-*gpt* (5,2 kbp); für die Angaben der zugrundeliegenden Schädigungen gilt die Legende der **Abb. 4.1**.

Außerdem wurde noch der Anteil der GC→CG Transversionen an der Gesamtmutationsfrequenz gegen die Zahl der Fpg-sensitiven Basenmodifikationen, bei denen es sich nicht um 8-oxoG handelt aufgetragen. Dieser Anteil wurde berechnet, indem für SIN-1 (3.1.1.2., 3.1.1.3.) und 4-HPT (3.1.2.1., 3.1.2.2.) der durch HPLC/ECD-Analyse ermittelte Anteil von 8-oxodG von dem im Relaxationsassay ermittelte Anteil der Fpg-sensitiven Basenmodifikationen subtrahiert wurde. Für die anderen Agentien wurde genauso verfahren, nur wurden hier, da keine Enzymkombinationen im Relaxationsassay durchgeführt worden waren, die gesamte Zahl der AP-Läsionen (sensitiv zu Endonuklease IV) von den Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen abgezogen. Weiterhin beruhen die durchgeführten Berechnungen auf den Angaben aus Schulz et al. (2000) und Will et al. (1999). In den beiden zitierten Veröffentlichungen werden die Anteile von 8-oxoG an den Fpg-sensitiven Basenmodifikationen wie folgt angegeben: 69 % für Ro 19-8022, 95 % für BCBT, 35 % für NDPO₂ und 23 % für Riboflavin. Das Ergebnis ist in Abb. 4.4 zu sehen.

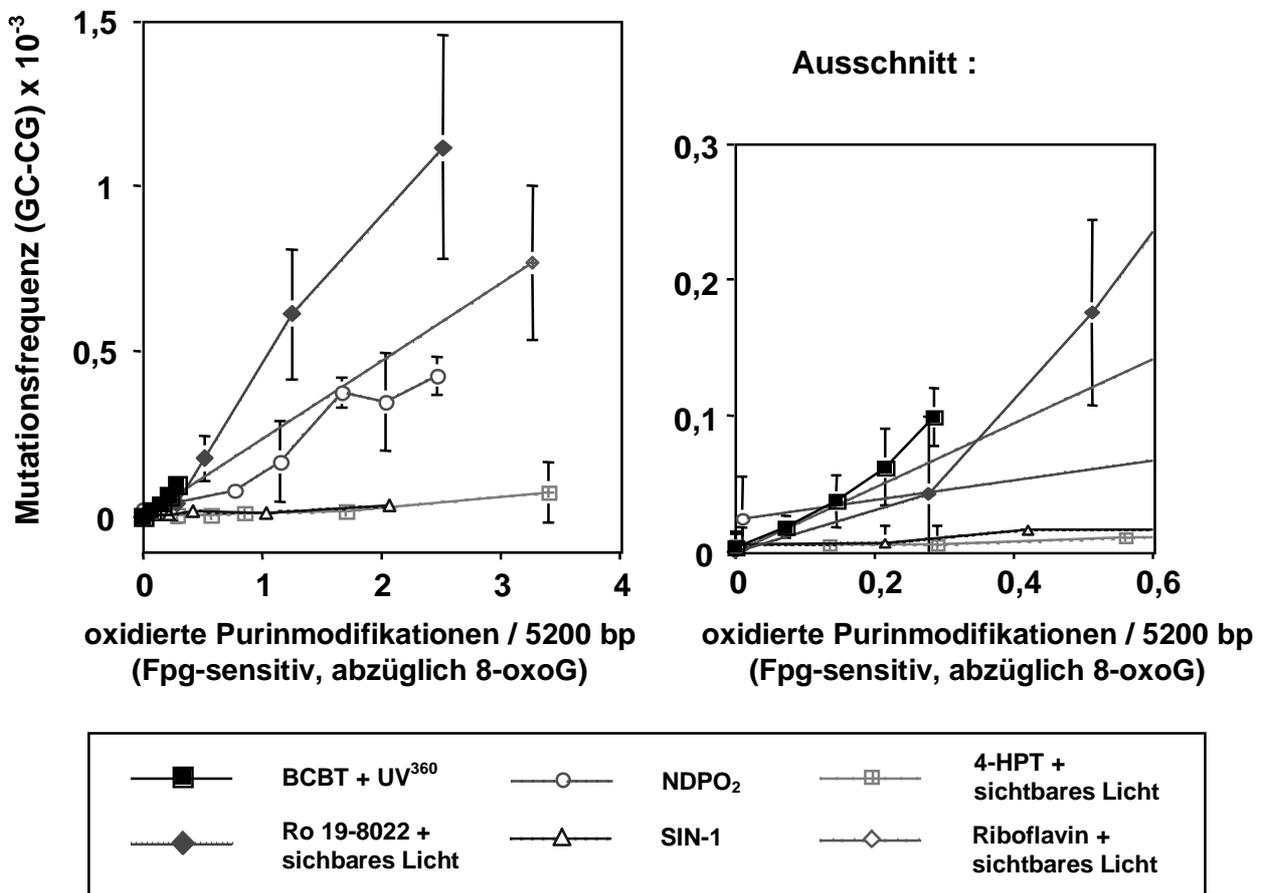


Abb. 4.4

Mutationsfrequenz der GC→CG-Transversionen aufgetragen gegen die Anzahl an Fpg-sensitiven Basenmodifikationen/5200 bp abzüglich 8-oxoG

SIN-1 (siehe 3.8), 4-HPT (siehe 3.15), BCBT (Mahler 1999, Schulz et al. 2000), Ro 19-8022 (Will et al. 1999), NDPO₂ (Daten von Ina Schulz, unveröffentlicht und Schulz et al. 2000), Riboflavin (Daten von Ina Schulz, unveröffentlicht und Schulz et al. 2000)

Man sieht, dass der Anteil der Mutationsfrequenz, der auf GC→CG Transversionen zurückgeht, nicht für alle dargestellten Agentien mit den Fpg-sensitiven Basenmodifikationen, die nicht 8-oxoG sind, korreliert. Jedoch lassen sich zwei Gruppen erkennen. Und zwar sind sich die Graphen von SIN-1 und 4-HPT sehr ähnlich, sowie die von BCBT, NDPO₂, Riboflavin und Ro 19-8022, insbesondere für die niedrigen Zahlen der Fpg-sensitiven Basenmodifikationen. Interessant ist, dass die Agentien, deren Schadensprofile sich ähnlich waren (**Abb. 4.1**), sich auch ähnlich bezüglich der in **Abb. 4.4** aufgetragenen Mutationsfrequenz verhielten. Als verantwortlich für die Mutagenität der GC→CG Transversionen wird für die Schädigung durch Ro 19-8022, BCBT, NDPO₂ und Riboflavin das in **Abb. 4.5** gezeigte Oxazol (2,2,4-Triaminoxazol) bzw. dessen Vorstufe, das Imidazol, diskutiert (**Schulz et al. 2000**). Der Anteil der durch GC→CG Transversionen verursachten Mutationsfrequenz korrelierte nämlich außerdem mit Ntg1-sensitiven Basenmodifikationen, wobei das diskutierte Oxazol bzw. dessen Imidazol-Vorstufe, ein Substrat von Ntg1 ist (**Schulz et al. 2000**). Dies ist besonders interessant vor dem Hintergrund, dass das Oxazol und dessen Vorstufe wahrscheinlich GC→CG Transversionen verursachen können. Für die DNA-Modifikation ergibt sich, wenn man die beiden **Abb. 4.2 und 4.4** vergleicht, eine ähnlich hohe Mutagenität wie für 8-oxoG. Im Gegensatz dazu scheint bei den Substanzen SIN-1 und 4-HPT eine andere DNA-Modifikation für die GC→CG Transversionen verantwortlich zu sein. Diese ist außerdem wahrscheinlich weniger mutagen als 8-oxoG (**Abb. 4.2, Abb. 4.4**).

Für SIN-1 betrug der Anteil von 8-oxoG an den Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen 45 ± 8 % (**siehe 3.1.1.2.**). Da dieser Anteil für die 71 % GC nach TA Transversionen (**Tab. 4.1**) verantwortlich gemacht wird, ergibt sich, dass die Mutagenität anderer Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen geringer ist. Eventuell sind sie für die Entstehung von GC→CG Transversionen, der zweithäufigsten Mutationsart verantwortlich. Hierfür kommen jedoch auch andere Basenmodifikationen in Frage, z. B. auch die durch Endonuklease III erkannten oxidierten Pyrimidinmodifikationen. Aufgrund der begrenzten Zahl der analysierten Mutanten können hierzu keine genaueren Aussagen getroffen werden. Es kann auch nicht ausgeschlossen, dass Depurinierungsprodukte von DNA-Basen oder 8-Nitroguanin, deren Bildung in DNA nach Behandlung mit Peroxynitrit bekannt ist (**Spencer et al. 1996, Yermilov et al. 1995**), zu dem ermittelten Mutationsspektrum beitragen. Ihre Bedeutung kann jedoch anhand der erhaltenen Mutationsdaten als sehr gering eingeschätzt werden, wie auch die der Produkte der Weiterreaktion von 8-oxoG mit Peroxynitrit (**Burney et al. 1999a, Uppu et al. 1996, Douki et al. 1996**) (**siehe auch 1.3.2. Abb 1.19**), deren Bildung bisher nur in zellfreien *in vitro*-Untersuchungen nachgewiesen wurde, in denen schon vorliegendes 8-oxodG bzw. 8-oxoG-haltige DNA mit Peroxynitrit behandelt wurden.

Die hier ermittelten Daten für SIN-1 bzw. Peroxynitrit stehen im Einklang mit den von **Juedes & Wogan (1996)** erhaltenen Mutationsspektren, die nach Peroxynitritschädigung zellfreier Plasmid-DNA, Transfektion und Replikation sowohl in menschlichen AD293-Zellen als auch in bakteriellen MBL50-Zellen (*E. coli*) einen überwiegenden Anteil von GC→TA Transversionen (63 % bzw. 65 %) im *supF*-Targetgen ermittelt hatten, neben einem geringeren Anteil GC→CG Transversionen und GC→AT Transitionen (11-25 %).

Über die durch Hydroxyradikale induzierten Mutationen ist vergleichsweise wenig bekannt, auch unterscheiden sich die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen sehr. Die

Untersuchungen beruhen meist auf Behandlung von zellfreier DNA mit γ -Strahlen (^{60}Co) und anschließender Transfektion in Bakterien, oder es wurde intrazellulär in Bakteriophagen oder Bakterien vorliegende DNA mit γ -Strahlen (^{60}Co) behandelt. Dabei werden in Anwesenheit von Sauerstoff Hydroxyradikale generiert. Bei Bestrahlung eines in wässriger Lösung vorliegenden Plasmids mit ^{60}Co γ -Strahlen betrug nach Transformation und Replikation in *E. coli* EC636 der Anteil von Punktmutationen im *lacI*-Target-Gen 87 % der gesamten detektierten Mutationen. Hiervon waren 70 % GC \rightarrow AT Transitionen, 14 % GC \rightarrow TA und 17 % GC \rightarrow CG Transversionen (**Wijker et al. 1998**). Diese Ergebnisse stimmen gut mit den hier ermittelten Daten überein, lediglich die Abwesenheit der GC \rightarrow TA Transversionen ist auffallend (**Tab. 4.1**). Auch **Braun et al. (1996)** hatten nach Schädigung intrazellulär in M13 Bakteriophagen vorliegender einzelsträngiger M13mp10 DNA mit γ -Strahlen und anschließender Infektion von *E. coli* Bakterien über einen Hauptanteil von GC \rightarrow AT Transitionen berichtet. Auffällig ist auch hier nur, dass ein nennenswerter Anteil von 25 % GC \rightarrow TA Transversionen ermittelt worden war. Im Rahmen dieser Arbeit wurden durch HPLC/ECD-analytische Bestimmung 16 ± 2 % der Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen als 8-oxoG identifiziert (**Abb. 3.13**). Und auch die Ergebnisse des Relaxationsassays hatten nur einen geringen Anteil OGG1-sensitiver Basenmodifikationen ergeben (**Abb. 3.10**). Die niedrigen Mengen an 8-oxoG, die hier durch Hydroxyradikale in der DNA induziert wurden, werden durch Untersuchungen von **Cadet et al. (1999)** bestätigt. Sie hatten durch HPLC/ECD-Analyse der durch Hydroxyradikale verursachten DNA-Schäden einen Anteil an 8-oxoG von 3 % der gesamten Guaninmodifikationen ermittelt. Interessanterweise erhöhte sich dieser Wert auf 50 %, wenn Fe^{2+} -Ionen während der Schädigung anwesend waren; im Gegenzug wurde der Anteil des „normalerweise“ hauptsächlich entstehenden Produktes nach Schädigung von Guanin mit Hydroxyradikalen, nämlich 2,2-Diamino-4-[(2-deoxy- β -D-erythropentafuranosyl)amino]-5-(2*H*)-oxazolone (**Abb. 4.5**), auf nur 30 % der Gesamtguaninmodifikationen reduziert (**Cadet et al. 1999**). Es ist möglich, dass der höhere Anteil der GC \rightarrow TA Transversionen, der von den oben zitierten Arbeitsgruppen gefunden wurde auf während der Schädigung vorhandene Verunreinigungen mit Eisenionen (Fe^{2+}) zurückzuführen ist.

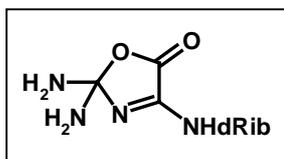


Abb. 4.5 Nach Schädigung von Guanin mit Hydroxyradikalen erhaltenes Oxazolone.

Auch eine Übereinstimmung mit dem durch HPLC/ECD-Analyse für γ -Strahlung in PM2-DNA ermittelten 8-oxodG Gehalt von 18 % der gesamten im Relaxationsassay erhaltenen Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen (**Pflaum et al. 1998**) mit den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten 16 ± 2 % ist gegeben. Die Abwesenheit von hier detektierten GC nach TA Transversionen könnte allerdings auch in der geringen Anzahl der analysierten Mutanten begründet liegen.

Es gibt Hinweise, dass für die GC nach AT Transitionen durch Hydroxyradikale 5-Hydroxy-2'-deoxycytidin verantwortlich gemacht werden kann (**Wijker et al. 1998**). Dieses wird durch Endonuklease III erkannt (**Cadet et al. 2000**). Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass ein Teil der GC \rightarrow AT Transitionen auf die Deaminierung von Cytosin oder 5-Methylcytosin zu Uracil bzw. Thymin oder von Guanin zu Xanthin und

nachfolgende Fehlpaarung zurückzuführen ist. Solche Deaminierungen sind jedoch für Hydroxylradikale wegen der starken oxidierenden Eigenschaften vermutlich eher von untergeordneter Bedeutung. Der Anteil, der im Relaxationsassay durch Endonuklease III erkannten oxidierten Pyrimidinmodifikationen, betrug 36 ± 7 % aller detektierten Endonuklease-sensitiven DNA-Modifikationen. Dies ist vergleichsweise hoch im Gegensatz zu den Werten, die durch andere DNA-schädigende Spezies erhalten wurden (**Abb. 4.1**). Legt man aber die Bildung von 5-Hydroxycytidin als Ursache der Mutationen zugrunde, so könnten diese durchaus für die gefundenen 76 % GC→AT Transitionen verantwortlich sein. Aussagen über die Herkunft der anderen anteilmäßig geringen Mutationsarten sind rein spekulativ, jedoch kann im Falle der AT→GC Transitionen 8-Hydroxyadenin (**Graziewicz et al. 1999**) und im Falle der AT→TA Transversionen 2-Hydroxyadenin (**Kamiya et al. 1995**) als zugrundeliegende DNA-Modifikation angenommen werden. Als Ursache für die GC→CG Transversionen werden das in **Abb. 4.5** gezeigte Oxazolone (**Schulz et al. 2000**) sowie oxidierte Pyrimidine diskutiert (**Graziewicz et al. 1999**).

Abschließend kann gesagt werden, dass mit den vorliegenden Daten zu Hydroxylradikalen, freigesetzt aus 4-HPT, und Peroxynitrit, freigesetzt aus SIN-1, nunmehr insgesamt Daten zu sechs verschiedenen, im gleichen System ausführlich untersuchten DNA-schädigenden Agentien vorliegen. Diese lassen sich sowohl anhand ihres DNA-Schadensprofils als auch anhand des von ihnen induzierten Mutationsspektrums gut voneinander unterscheiden, bzw. sie sind dadurch charakterisiert. Für SIN-1 konnte durch Vergleich der im Relaxationsassay und durch HPLC/ECD-Analyse ermittelten Daten für Fpg-sensitive Läsionen bzw. 8-oxodG mit dem Mutationsspektrum 8-Hydroxyguanin als für die GC→TA Mutationen verantwortliche DNA-Modifikation bestimmt werden. Für 4-HPT gelang es durch Korrelation des Schadensprofils mit den Mutationsdaten den Beitrag verschiedener DNA-Läsionen am mutagenen Potential einzuschätzen, wobei 5-Hydroxycytidin wahrscheinlich die größte Bedeutung zukommt.

4.2 Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Schäden

Zur Imitation von endogenem oxidativem Stress, verursacht durch erhöhte Bildung von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies, wurden in dieser Arbeit NO-Synthasetransfizierte Zellen (B6-*INOS*) im Vergleich mit den dazugehörigen Kontrollzellen (B6-Vector-only) und der parenteralen Zelllinie (Wildtyp) untersucht. Die NO-Synthase (NOS) der *INOS*-Zellen wurde von diesen konstitutiv exprimiert, und die NO-Produktion konnte zusätzlich induziert werden durch Zugabe von Natriumbutyrat (Nab.) ins Zellkulturmedium. Die erhöhten NO-Konzentrationen, die von der B6-*INOS*-Zelllinie gebildet wurden, hatten keinen Einfluss auf die beiden sehr empfindlichen Parameter Zellproliferation (**Abb. 3.31**) und Mikrokernbildung (**Abb. 3.27**). Dies wäre durch die bekannten Wechselwirkungen von NO mit verschiedenen Enzymen des Zellstoffwechsels, wie z. B. der Ribonukleotidreduktase (**Schmidt 1994, siehe auch 1.4.2.**), durchaus denkbar gewesen. Der intrazelluläre Gehalt an Glutathion als eines der wichtigsten zellulären Antioxidantien ist ein weiterer wichtiger hier untersuchter Parameter (**siehe 3.2.1.6.1.**), dessen Erniedrigung auf oxidativen Stress hinweist (**Ohshima & Bartsch 1994, Will et al. 1999**). Glutathion gilt nämlich als eines der wichtigsten Antioxidantien gegen RNS (reaktive Stickstoffspezies) (**Gordge 1998**). Durch die konstitutive NO-Produktion der B6-*INOS*-Zellen wurde der Glutathionspiegel nicht beeinflusst. Nach Induktion der NO-Synthase mit Nab. für 12 h war er geringfügig, jedoch nicht signifikant niedriger als der der B6-Vector-only-Zellen (**Abb. 3.35**). Dabei betrug die konstitutive NO-Freisetzung der B6-*INOS*-Zellen 116 pmol/h/10⁶ Zellen (**Tab. 3.3**). Sie konnte durch Induktion der NO-Synthase auf etwa das 5fache, entsprechend 560 pmol/h/10⁶ Zellen, gesteigert werden (jeweils gemessen als NO₂⁻ im Zellkulturmedium) (**Tab. 3.3**). Im Vergleich dazu wurden von den B6-Vector-only Kontrollzellen wie auch von den Wildtyp-Zellen vielfach (14-20fach) niedrigere NO-Konzentrationen gebildet, die in etwa den physiologischerweise auch im menschlichen Körper zur Signaltransduktion benötigten Mengen entsprechen (**siehe 1.1.**). Die erhöhten NO-Konzentrationen, die nach Stimulation der NO-Synthase von den B6-*INOS*-Zellen freigesetzt wurden, liegen aber durchaus noch im physiologischen Bereich. So wurden noch höher liegende NO-Konzentrationen nach Stimulation von Makrophagen mit Phorbol ester (6 nmol/h/10⁶ Zellen) (**Ischiropoulos et al. 1992**) und in Gefäßen von mit ATP stimulierten Hasenaortaendothel (4,8 µmol/h/10 ml) gemessen (**Beckman et al. 1990**). Aus *in vitro* Untersuchungen ist bekannt, dass in Makrophagen gebildetes NO etwa je zur Hälfte zu N₂O₃ und zu Peroxynitrit reagiert, wobei beachtet werden muss, dass gleichzeitig auch Superoxid freigesetzt wird (**Lewis et al. 1995**). Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass die hier ermittelten NO-Konzentrationen der B6-*INOS*-Zellen tatsächlich etwa das Doppelte der angegebenen Werte betragen. Das würde bedeuten, dass nach Induktion der NO-Synthase für 24 h etwa 16 µM NO von den *INOS*-Zellen freigesetzt würden (**Tab. 3.3**). Es ist jedoch nicht wahrscheinlich, dass diese Konzentrationen zu DNA-Schäden führen würden; hierauf weisen die mit exogenem NO durchgeführten Experimente hin, wo erst um ein Vielfaches höhere NO-Konzentrationen (> 1 mM) zu DNA-Schäden führten (**Abb. 3.37**). Ähnlich hoch werden die NO-Konzentrationen in chronisch virusinfiziertem Lebergewebe eingeschätzt (**Liu et al. 1991, 1992**). Die hier untersuchten exogenen NO-Konzentrationen besitzen daher durchaus pathophysiologische Relevanz.

Die Behandlung der Zellen (B6-Vector-only) mit diesen hohen exogenen NO-Konzentrationen war außerdem mit einem Anstieg der Mikrokernrate (ab 1 mM NO) (Abb. 3.49) und einer hohen Toxizität verbunden. Ersteres kann auf die Induktion von Strangbrüchen in der DNA zurückgeführt werden (Abb. 3.37). Der Proliferationsfaktor wurde schon von 0,25 mM NO auf etwa die Hälfte gesenkt, jedoch war auch bei der höchsten untersuchten NO-Konzentration von 2,5 mM noch eine signifikante Zellproliferation vorhanden (Abb. 3.50), die eine der Voraussetzungen für eine maligne Transformation der Zellen ist. Die beobachteten Effekte konnten durch Vergleich der Parameter nach Inkubation mit den Zerfallsprodukten des DPTA-NONOat eindeutig auf das freigesetzte NO zurückgeführt werden (Abb. 3.49, Abb. 3.51). Die hohe Toxizität hängt möglicherweise mit der biologischen Aktivität von NO zusammen, das in Zellen in vielfältiger Weise mit Enzymen interagieren kann (siehe 1.1., 1.4.2.).

Um genauere Aussagen über die durch die erhöhte exogene NO-Produktion generierten DNA-Schäden machen zu können, wurden zusätzliche Reparaturenendonukleasen zur Schadenserkennung bei der Alkalischen Elution eingesetzt. Das erhaltene Schadensprofil ähnelte dabei sehr dem von SIN-1, welches in Lösung spontan NO und Superoxid freisetzt, die dann diffusionskontrolliert zu Peroxynitrit reagieren können (siehe 1.2.3.7., Huie & Padmaja 1993, Inoue & Kawanishi 1995).

Zum besseren Vergleich sind die Schadensprofile von NO, freigesetzt aus DPTA-NONOat, und Peroxynitrit, freigesetzt aus SIN-1, in Abb. 4.6 nebeneinander dargestellt.

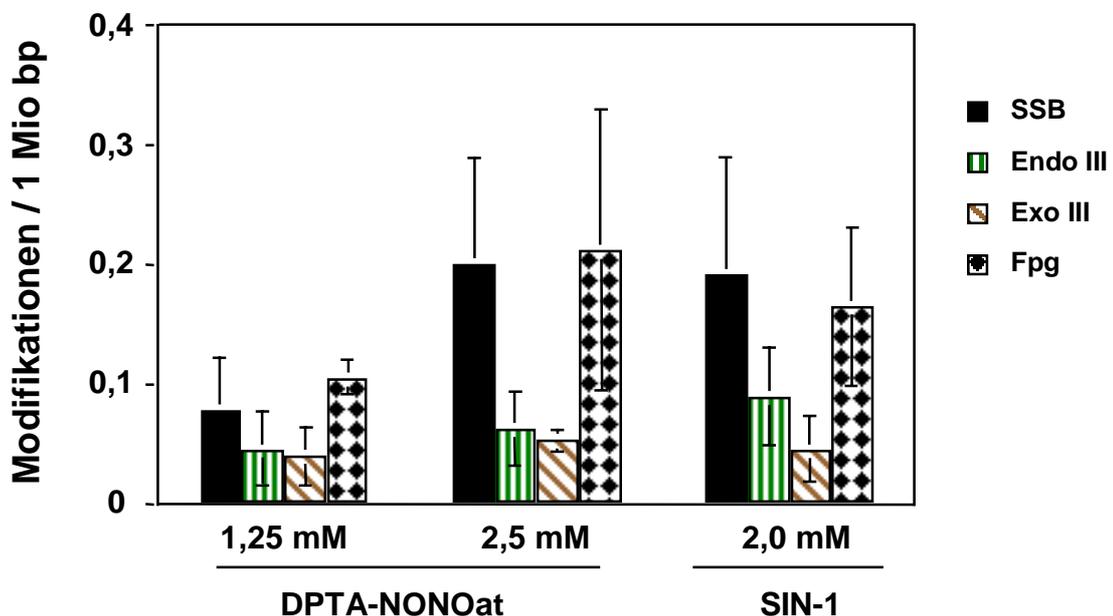


Abb. 4.6 DNA-Schadensprofil durch 1,25 bzw. 2,5 mM DPTA-NONOat (3 h, 37 °C) und SIN-1 (1 h, 37 °C) in B6-Vector-only-Zellen; nach Abb. 3.38 und 3.54.

Die Ähnlichkeit der Schadensprofile ist ein Hinweis, dass die hier beobachteten DNA-Schäden durch das NONOat auf die intrazelluläre Bildung von Peroxynitrit zurückzuführen sind. Dies ist über eine Reaktion des freigesetzten NO mit während des Zellmetabolismus gebildeten Superoxids denkbar (siehe 1.2.). Es gibt Hinweise dafür, dass die intrazelluläre Reaktion von NO und Superoxid zu Peroxynitrit im Zuge von

Infektionen, wo NO und Superoxid gleichzeitig von Immunzellen, wie Makrophagen, gebildet werden, eine Rolle spielt (Ischiropoulos et al. 1992, Beckman et al. 1990, Hippeli & Elstner 1997). Auffällig bei dem in Abb. 4.6 dargestellten Schadensprofil ist, dass das DNA-schädigende Potential von SIN-1 in Zellen sehr viel geringer ist als an zellfreier DNA (Abb. 4.1). Hier wurden nämlich durch 20mal niedrigere SIN-1 Konzentrationen (10 µM) etwa 100mal mehr Fpg-sensitive DNA-Modifikationen und Einzelstrangbrüche (0,2/10⁴ bp) induziert (Abb. 3.1). Dieser Unterschied ist durch die schnelle Reaktion der reaktiven Spezies Peroxynitrit mit anderen Zellbestandteilen, wie Proteinen oder Lipidmembranen, bevor es zum Zellkern und damit zur DNA gelangt, erklärbar (siehe 1.2., Spencer et al. 1996). Die Zelle „schützt“ sozusagen ihr Erbgut, die DNA, vor einer Schädigung von außen, was eine besondere Bedeutung bei der extrazellulären Bildung von Peroxynitrit durch z. B. Makrophagen haben könnte. Auch die vergleichsweise geringe Toxizität der Behandlung der B6-Vector-only-Zellen mit SIN-1 (Abb. 3.55) im Vergleich zu der hohen Toxizität der DPTA-NONOat Behandlung (Abb. 3.50) spiegelt die hohe Reaktivität und die damit verbundene schnelle undifferenzierte Reaktion von Peroxynitrit mit verschiedenen Zellbestandteilen, wie Membranen, im Vergleich zu der relativen Stabilität von NO wider (siehe 1.2.2.).

Neben den hier bestimmten Endonuklease-sensitiven DNA-Modifikationen und Einzelstrangbrüchen, deren mutagenes Potential bekannt ist (siehe 1.4.1.), spielen *in vivo* weitere DNA-Modifikationen und die Reaktion von Peroxynitrit oder NO mit anderen Biomolekülen und Zellbestandteilen eine Rolle (siehe 1.4.2.). Dabei ist für die Konsequenzen der erhöhten Konzentrationen reaktiver Spezies das zelluläre Umfeld von entscheidender Bedeutung. Eine Übersicht über die von anderen Arbeitsgruppen in Transformationsexperimenten ermittelten Ergebnisse zeigt Tab. 4.2. Man sieht, dass sich die Ergebnisse einerseits in Abhängigkeit des untersuchten Testsystems andererseits in Abhängigkeit von dem eingesetzten schädigenden Agens unterscheiden. So wurden z. B. von Routledge et al. (2000) nach Transformation eines zellfrei mit NO-Gas geschädigten Plasmids in menschliche Zellen eine signifikant höhere Rate von AT→GC Transitionen gegenüber anderen Mutationsarten gefunden, während von den anderen Autoren durch NO-Gas in den jeweils untersuchten Systemen außer im Falle der TK6-Zellen jeweils ein überwiegender Anteil der Mutationen an GC-Paaren gefunden wurde. Dieser Unterschied könnte darin begründet sein, dass alle anderen Autoren das Targetplasmid intrazellulär bzw. *in vivo* der Behandlung unterzogen. Das bedeutet nämlich, dass das NO-Gas nicht direkt mit dem Target-Plasmid in Kontakt kam, so dass bei dieser Schädigungsweise noch weitere zelluläre Parameter, wie z. B. intrazellulär vorhandenes Superoxid eine Rolle spielen dürften. Interessant ist hierbei weiterhin, dass z. B. im Falle der untersuchten SJL-Mäuse (Gal et Wogan 1996), das durch das NO induzierte Mutationsspektrum dem spontanen Mutationsspektrum sehr ähnlich war. Das kann als Hinweis für eine Beteiligung von NO an spontanen Mutationen in Zellen gewertet werden. Außerdem fällt auch auf, dass im Gegensatz zum NO-Gas eine extrazelluläre Schädigung des Plasmids pSP189 mit DEA-(Diethylamin-) oder Spermin-NONOat nach Transformation in menschliche Zellen zu einem ähnlichen Mutationsspektrum führte (Routledge et al. 2000), wie NO-Gas in SJL-Mäusen (Gal & Wogan 1996). Die Substanzklasse der NONOate scheint also tatsächlich ihre „Aufgabe“, nämlich die Nachahmung einer physiologischeren NO-Freisetzung als NO-Gas, zu erfüllen (Daten für DEA-NONOat nicht gezeigt).

Tab. 4.2 Mutationsspektren, verursacht von NO in verschiedenen Testsystemen.

Autor	System	Agens	GC→TA	GC→AT	GC→CG	AT→CG	AT→GC	AT→TA
1. Routledge et al. 2000	SupF-Assay, menschl. Ad293-Zellen ^a	NO-Gas	6 %	29 %	1 %	1 %	60 %	1 %
		Spermin-NONOat	15%	59 %	9 %	2 %	7 %	3 %
2. Zhuang et al. 2000	HPRT-Assay, TK6-Zellen ^b	NO-Gas	11 %	22 %	0 %	6 %	28 %	33 %
	Salmonella ^c	NO-Gas	20 %	31 %	9 %	10 %	9 %	21 %
3. Gal & Wogan 1996	SJL-Mäuse, lacZ-Assay ^d	NO-Gas	32 %	37 %	0 %	11 %	5 %	16 %

^a Das Plasmid pSP189 wurde zellfrei mit NO-Gas bzw. dem NONOat geschädigt und anschließend in menschliche Ad293-Zellen transformiert.

^b TK6-Zellen wurden in Medium mit NO begast.

^c 6 verschiedene *Salmonella typhimurium*-Stämme wurden im Kulturmedium mit NO begast.

^d Induktion der NO-Synthase *in vivo* in transgenen pUR288-Plasmid-tragenden SJL-Mäusen durch Injektion von RcsX-Zellen (Prä-B-Zell-Lymphomzellen).

Für die Entstehung der unterschiedlichen Mutationsarten werden die Deaminierungsprodukte der DNA-Basen, die durch NO über N₂O₃ gebildet werden können (siehe 1.3.2.), verantwortlich gemacht (Wink et al. 1991, Tamir et al. 1996a, deRojas-Walker 1995), wobei jedoch die Bedeutung der Deaminierung von Guanin zu Xanthin kontrovers diskutiert wird (Schmutte et al. 1994, Caulfield et al. 1998). Der postulierte Deaminierungsmechanismus kann durch das hier ermittelte DNA-Schadensprofil (Abb. 4.6) nicht ausgeschlossen werden, jedoch ist er eher unwahrscheinlich, da N₂O₃-vermittelte Nitrosierungsreaktionen in Gegenwart von Phosphat, das im Zellkulturmedium als Puffer vorhanden ist, gehemmt werden (Singh et al. 1996, Lewis et al. 1995a). Daneben ist die Möglichkeit der Bildung von Peroxynitrit aus NO mit intrazellulär vorhandenen Superoxidradikalen nicht außer Acht zu lassen, wie durch die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten DNA-Schadensprofile gezeigt werden konnte (Abb. 4.6). Aus dem relativ niedrigen Anteil von AP-Läsionen (sensitiv zu Endonuklease IV) (siehe Tab. 1.2) im Schadensprofil kann außerdem abgeleitet werden, dass es sich bei den Fpg-sensitiven Basenmodifikationen vermutlich zumindest zum Teil um 8-oxoG handelt. Darauf weisen auch die GC→TA Transversionen der in Tab. 4.2 gezeigten Ergebnisse von Transformationsexperimenten hin, welche bekanntlich auf 8-oxoG in der DNA zurückzuführen sein können, das durch oxidative Modifizierung der DNA durch Peroxynitrit gebildet werden kann (siehe 1.4.2., 4.1.). Auch bei der Schädigung mit Peroxynitrit spielen neben der DNA andere Zellbestandteile für das Ausmaß und die Art der induzierten DNA-Schäden eine entscheidende Rolle, wie im Rahmen dieser Arbeit durch den Einfluss von BSA als unspezifisches Protein auf das DNA-Schadensprofil durch Peroxynitrit gezeigt werden konnte (Abb. 3.2). Das bestätigt auch das nach zellfreier Schädigung von Plasmid-DNA und anschließender Transformation in *E. coli* erhaltene Mutationsspektrum (siehe 4.1, Tab. 4.1), das sich von denen, die nach Behandlung von Zellen mit NO-Gas erhalten wurden (Tab. 4.2),

unterscheidet. Wahrscheinlich sind daher an der Ausbildung von Mutationen durch NO *in vivo* beide Mechanismen von Bedeutung, also die Deaminierung von DNA-Basen sowie der oxidative Angriff durch intrazellulär entstandenes Peroxynitrit.

Zwei weitere Möglichkeiten, wie das mutagene Potential von NO vermittelt werden kann, sind die Bildung von 8-Nitroguanin und Nitrosaminen. 8-Nitroguanin wird neben 8-oxoG als Biomarker der Peroxynitritschädigung der DNA bezeichnet (1.3.2.). Dessen Bedeutung im Rahmen der Mutagenese ist jedoch noch weitgehend ungeklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass die 8-Nitroguaninbildung *in vivo* nur eine untergeordnete Rolle spielt und auch auf andere DNA-schädigende Spezies als NO und Peroxynitrit zurückgeführt werden kann (Patel et al. 1999, Tuo et al. 2000). Im Gegensatz dazu ist die Bildung kanzerogener Nitrosamine sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beschrieben (Liu et al. 1991, 1992, Tamir & Tannenbaum 1996) und wird als einer der Mechanismen angesehen, der für das kanzerogene Potential von NO unter bestimmten Bedingungen verantwortlich ist (Laval et al. 1997, Ohshima & Bartsch 1994). Die Bedeutung der beiden genannten Parameter in dem hier untersuchten zellulären System konnte durch die verwendeten Methoden nicht eindeutig geklärt werden, jedoch weist die Abwesenheit größerer Mengen von AP-Läsionen zumindest auf eine geringe Bedeutung im Falle von 8-Nitroguanin hin, welches bekanntermaßen schnell depuriniert (Yermilov et al. 1995).

Abschließend kann gesagt werden, dass die erhöhte hier untersuchte NO-Produktion in der Lage war, in Konzentrationen > 1 mM DNA-Schäden zu induzieren, wohingegen geringere NO-Konzentrationen in Zellen oder höhere NO-Konzentrationen in zellfreien Systemen keinen Einfluss auf die Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Schäden hatten. Für die beobachteten Modifizierungen der DNA war im untersuchten zellulären System wahrscheinlich die Bildung von Peroxynitrit verantwortlich. Neben Einzelstrangbrüchen wurden Fpg-sensitive Läsionen generiert, bei denen es sich zumindest zum Teil um 8-oxoG handelte, so dass eine Voraussetzung zur Manifestierung in Mutationen als erster Schritt der malignen Transformation gegeben wäre.

Das hier ermittelte DNA-schädigende Potential kann als ein relevanter Mechanismus angesehen werden, über den NO im Falle von Krankheiten und Infektionen, die mit einer chronisch erhöhten Bildung von NO einhergehen, zu einem erhöhten Krebsrisiko (siehe auch 1.6., 4.4.) beitragen kann.

4.3 Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden

Die konstitutive NO-Generierung der B6-*iNOS*-Zellen hatte einen protektiven Effekt gegenüber der Induktion von Einzelstrangbrüchen durch den Photosensibilisator Ro 19-8022 und H₂O₂ (Abb. 3.21, Abb. 3.23). Dieser Schutzeffekt von endogen generiertem NO zeigte sich noch deutlicher auf die Induktion von Mikrokerneln durch H₂O₂; hier wurden in den B6-*iNOS*-Zellen signifikant weniger Mikrokerne induziert als in den B6-Vector-only-Zellen (Abb. 3.29). Weder der Effekt auf die Einzelstrangbrüche noch auf die Mikrokerne konnte jedoch durch die erhöhte NO-Produktion der B6-*iNOS*-Zellen nach Induktion der NO-Synthase verstärkt werden, wofür eine Beeinflussung der Schädigung

durch H_2O_2 durch das zur Induktion verwendete Nab. oder durch die erhöhte NO-Produktion selbst verantwortlich gemacht werden könnte (**Abb. 3.21, Abb. 3.25, Abb. 3.28, Abb. 3.30**).

Der protektive Effekt der im mikromolaren Bereich liegenden konstitutiven NO-Produktion vor Wasserstoffperoxid und Singulett-Sauerstoff, freigesetzt aus Ro 19-8022, kann wahrscheinlich nicht durch eine Anpassung der Zelle gegenüber dem erhöhten oxidativen Stress der NO-Generierung erklärt werden. Darauf weisen die im Vergleich zu den B6-Vector-only-Zellen gleich hohen Glutathionspiegel hin (**Abb. 3.35**). Andererseits wurde auch früher schon über einen Schutz von niedrigen Gaben von NO-Donatoren, wie NONOaten und S-Nitrosoglutathion, vor der Toxizität von H_2O_2 berichtet (**Wink et al. 1995, 1996**). Dabei wurde eine direkte Interaktion von NO mit H_2O_2 ausgeschlossen, indem gezeigt wurde, dass die Stabilität von H_2O_2 in Gegenwart von NO erhöht wurde, statt erniedrigt (**Wink et al. 1996**). Aufgrund der Tatsache, dass NO sowohl Xanthinoxidase- als auch Peroxid-vermittelte DNA-Schäden (**Pacelli et al. 1994, Wink et al. 1995**) sowie Hydroxylierungsreaktionen (**Miles et al. 1996**) verhindert, wird eine Modulation der zugrundeliegenden Fenton-Reaktion bzw. der Haber-Weiss-Reaktion vermutet (**siehe auch Abb. 1.5**), möglicherweise durch Interaktion mit beteiligten Enzymen oder Metallionen (**Hippeli & Elstner 1997**). Diese Vermutung wird unterstützt durch die Beobachtung, dass NO in der Lage ist, mit Ferrylintermediaten zu reagieren, die als reaktive Zwischenprodukte aus der Reaktion von Peroxiden mit Metalloproteinen wie dem Myoglobin hervorgehen, die die Fentonreaktion wie auch die Lipidperoxidation erleichtern, und so deren natürlichen Oxidationszustand wieder herzustellen, was einer Protektion vor den genannten Effekten entspricht (**Kanner et al. 1991**). Außerdem ist bekannt, dass NO zelluläres nicht gebundenes Eisen komplexieren kann zu sogenannten Eisen-Nitrosyl-Komplexen (DNIC = dinitrosyl-iron-complexes) (**Kim et al. 2000**). Bei der Regulation des zellulären Eisengehaltes wird auch eine Wechselwirkung mit dem Eisen-Schwefel-Kluster-haltigen „iron-regulatory-protein“ (IRP) diskutiert (**Pantopoulos & Hentze 1995, Hentze & Kühn 1996**). NO könnte außerdem als Radikalfänger von intermediär gebildeten Hydroxyradikalen oder Superoxidradikalen fungieren und diese so detoxifizieren. Eine radikalische Interaktion mit Lipidradikalen wird für die Hemmung der Lipidperoxidation durch NO angenommen (**Hippeli & Elstner 1997**).

Exogenes NO hatte keinen Einfluss auf die Induzierbarkeit von Einzelstrangbrüchen durch H_2O_2 , AP-Läsionen durch tBuOOH, Pyrimidindimere durch UVB und Fpg-sensitive DNA-Modifikationen durch Ro 19-8022 (**Abb. 3.39, Abb. 3.40, Abb. 3.41**). Auch die Toxizität der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Behandlungen wurde durch die exogene NO-Generierung nicht beeinflusst (**Abb. 3.50, Abb. 3.52**). Mit diesen Ergebnissen stehen bisherige Erkenntnisse im Einklang, in denen Änderungen der Induzierbarkeit von DNA-Schäden nur zwischen verschiedenen Zelllinien nicht jedoch aufgrund verschiedener Präinkubationen beobachtet wurden (**Pflaum et al. 1998, Epe et al. 1993c, Hollenbach 1999, Pflaum 1996**).

4.4 Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die DNA-Reparatur

Die konstitutive NO-Produktion der B6-INOS-Zellen hatte keinen Einfluss auf die Reparatur oxidativer DNA-Schäden (**Abb. 3.26**). Dagegen führten hohe exogene NO-Konzentrationen zu einer konzentrationsabhängigen Inhibition der DNA-Reparatur, die durch parallele Behandlung der Zellen mit den Zerfallsprodukten des NONOat's eindeutig auf die NO-Freisetzung zurückgeführt werden konnte (**Abb. 3.44**). Zum direkten Vergleich des Einflusses von endogenem und exogenem NO dient **Abb. 4.7**.

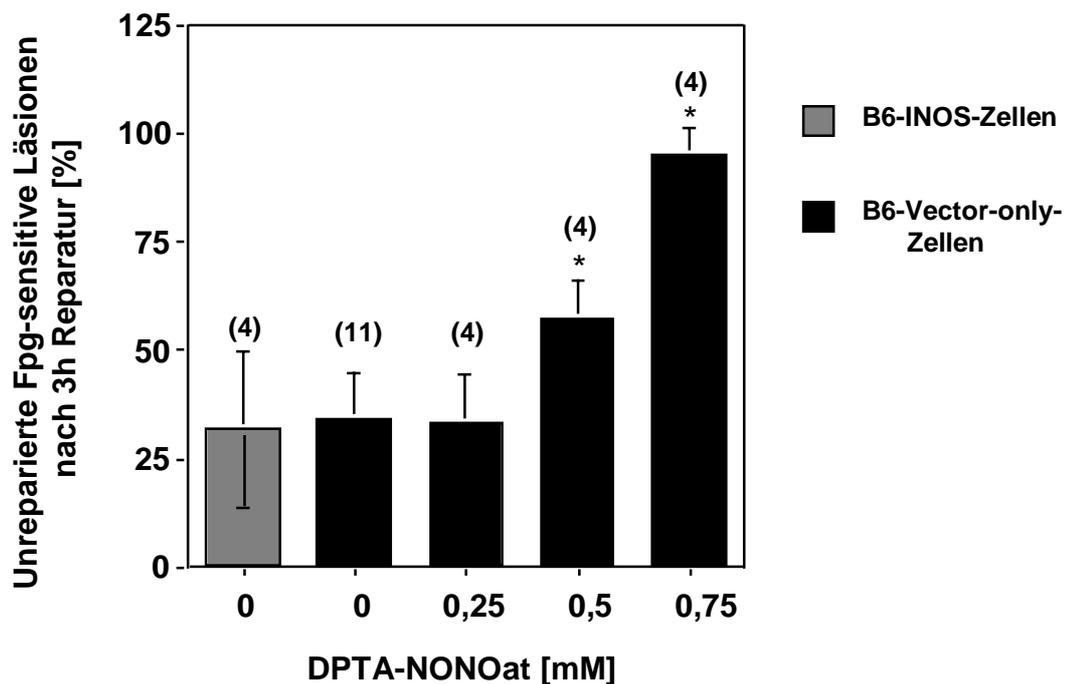


Abb. 4.7 Unreparierte Fpg-sensitive Läsionen in B6-INOS-Zellen (ganz links) und in B6-Vector-only-Zellen mit und ohne Präinkubation mit verschiedenen DPTA-NONOat-Konzentrationen, induziert durch 40 nM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m²; 400-800 nm) auf Eis, nach 3stündiger Reparaturzeit; nach **Abb. 3.26** und **3.44**.

Die zur Reparaturhemmung nötigen NO-Konzentrationen führten selbst nicht zu oxidativen DNA-Modifikationen (**Abb. 3.37**). Die Zellproliferation wurde zwar signifikant herabgesetzt, jedoch nicht vollkommen inhibiert (**Abb. 3.50**). Es ist denkbar, dass die Inhibierung der Reparatur endogen entstandener DNA-Modifikationen auf diese Weise die beobachtete Ähnlichkeit des NO-induzierten Mutationsspektrums mit dem spontanen Mutationsspektrum unbehandelter Zellen erklärt (**Zhuang et al. 2000**) (siehe auch **4.2**).

Der Einfluss von NO auf die Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen scheint dabei sehr selektiv zu sein, da weder die Reparatur von Einzelstrangbrüchen (**Abb. 3.47**), noch die von AP-Läsionen (**Abb. 3.48**) und Pyrimidindimeren (**Abb. 3.46**) beeinflusst wurde.

Im Falle der Reparatur der Pyrimidindimere kann jedoch eine Hemmung nicht ganz ausgeschlossen werden, da aufgrund der langsamen Reparatur dieser Läsionen, eine

de novo-Synthese des Reparaturproteins nicht ausgeschlossen werden kann. Darauf weist auch die fehlende Reparaturhemmung auf die Ro 19-8022 induzierten DNA-Schäden nach 14 h hin, also der selben Zeit, nach der auch der Einfluss auf die Reparatur UVB-vermittelter DNA-Schäden bestimmt wurde (**Abb. 3.45**). Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass NO nicht direkt an einer Hemmung der Reparatur von Pyrimidindimeren beteiligt ist (**Bau et al. 2001**).

Im Zuge der BER werden modifizierte DNA-Basen von einer spezifischen DNA-Glykosylase erkannt und aus dem DNA-Strang entfernt. Es entsteht eine AP-Läsion, die anschließend durch die AP-Endonuklease-Funktion einer bifunktionellen DNA-Glykosylase oder durch HAP1 (im Falle einer monofunktionellen Glykosylase) in einen Einzelstrangbruch überführt wird. Dieser wird durch Einsetzen des passenden Nukleotides durch Pol β und anschließendes Verschließen der beiden DNA-Strangenden durch DNA-Ligase III beseitigt (**siehe auch 1.5.1**). Die hier beobachtete Hemmung der BER durch NO könnte durch eine Beeinflussung eines der an der BER beteiligten Enzyme verursacht sein. Hierfür kommt das OGG1-Protein in Frage; denn bei den untersuchten Photosensibilisator-induzierten DNA-Schäden handelte es sich zu 69 % der Fpg-sensitiven Basenmodifikationen um 8-oxoG (**Will et al. 1999**), welches in eukaryotischen Zellen durch die DNA-Glykosylase OGG1 (**siehe auch 1.5**) erkannt und aus dem DNA-Strang entfernt (**Boiteux & Radicella 2000, Bruner et al. 2000**) wird. In Frage kommen aber auch HAP1, Pol β und Ligase III, die ebenso an der BER beteiligt sind.

Als Target für einen Angriff von NO bzw. aus NO entstandenen reaktiveren Spezies (**siehe 1.2.2**) kommen Lysinreste sowie Cysteinreste der Proteine besonders in Frage. Für das bakterielle funktionelle Homolog von OGG1, das Fpg-Protein, konnte am gereinigten Enzym und in Zellextrakten nämlich eine Hemmung der Aktivität durch NO bestätigt werden, die auf eine Nitrosierung der oder eines der Cysteinreste, der für die Substratbindung wichtigen Zinkfingerstruktur (**O'Connor et al. 1993**), zurückgeführt werden konnte (**Wink & Laval 1994**). Als nitrosierendes Agens wurde dabei neben N $_2$ O $_3$ auch Peroxynitrit diskutiert (**Gordge 1998, Laval et al. 1997**). Eine Modifizierung eines Lysinrestes wird dagegen für die Hemmung der bakteriellen T4 DNA Ligase durch NO verantwortlich gemacht (**Graziewicz et al. 1996**).

Die Hemmung der T4 DNA-Ligase durch Modifizierung einer kritischen Lysingruppe kann damit erklärt werden (**Lindahl und Barnes 1992**), dass diese im physiologischen Milieu teilweise deprotoniert vorliegt (**Engler und Richardson 1982**), so dass ein nukleophiler Angriff über N $_2$ O $_3$ unter Nitrosierung der Aminogruppe möglich ist. Da primäre Nitrosaminogruppen sehr instabil sind, wird eine schnelle Hydrolyse unter Entstehung einer Hydroxylgruppe am Enzym, wo vorher die Aminogruppe war, postuliert (**Laval et al. 1997**). Die Möglichkeit der Übertragbarkeit dieses Mechanismus auf die eukaryotischen DNA-Ligasen, die nach dem gleichen Mechanismus zum Verschließen der DNA-Stränge arbeiten und auch über eine kritische Lysingruppe verfügen, ist von **Graziewicz et al. (1996)** diskutiert worden. Dagegen spricht jedoch die hier ermittelte „normale“ Funktion der Strangbruchreparatur, sowie auch der Befund, dass andere Reparaturenzyme, wie Endonuklease III und IV, nicht durch NO gehemmt werden (**Wink & Laval 1994**), obwohl auch Endonuklease III über einen kritischen Lysinrest verfügt (**Krokan et al. 1997, Boiteux 1993**). Es ist also sehr unwahrscheinlich, dass der letzte Schritt

der BER, die Ligation, in den hier durch geführten Untersuchungen durch NO gehemmt wurde.

Die an der Prozessierung von Einzelstrangbrüchen außerdem beteiligte Pol β kommt, wie gesagt, als weiteres Target für einen Angriff durch exogenes NO in Frage. Sie verfügt über einen kritischen Lysinrest, der für die Ausbildung des Schiff'schen Base-Intermediates mit dem Substrat und somit für die dRP-Lyase-Aktivität verantwortlich ist (**siehe auch 1.5.1**) und der theoretisch durch RNS modifiziert werden könnte. Daneben ist eine indirekte Inaktivierung des Enzyms durch eine Herabsetzung des pH-Wertes als Folge vermehrter NO-Produktion möglich. Die Aktivität von Pol β ist nämlich pH-abhängig und sinkt im Säuren wegen Protonierung des Lysinrestes. Jedoch sprechen die hier ermittelten Befunden, dass die Einzelstrangbruchreparatur wie auch die Reparatur von AP-Läsionen durch exogenes NO nicht beeinflusst wird, eindeutig gegen Beeinflussung von Pol β durch NO.

Auch ein Angriff reaktiver Spezies an HAP1 ist eher unwahrscheinlich, vor allem weil das Enzym weder einen kritischen Cystein- noch Lysinrest besitzt. Die nun schon wiederholt angeführte fehlende Hemmung der Reparatur von AP-Läsionen läßt eigentlich fast keinen Zweifel mehr daran, dass auch dieser Schritt der BER-Hemmung durch NO nicht der ist, der gehemmt wird.

Es bleibt noch die Möglichkeit des Angriff von NO an dem Enzym zu diskutieren, das den ersten Schritt innerhalb der BER durchführt, nämlich in den hier durchgeführten Versuchen das OGG1-Protein. Dieses besitzt sowohl eine kritische Lysingruppe als auch eine Zinkfinger-ähnliches Motiv (C₂H₂), in dem zwei Cystein- und zwei Histidinreste an der Komplexierung des Zinkatoms beteiligt sind (**Tani et al. 1998**). Aus Versuchen mit 8-oxoG-haltigen Oligonukleotiden kann geschlossen werden, dass das Entfernen der veränderten Base durch OGG1 durch NO verhindert wird (**Jaiswal et al. 2001**). Neueste Untersuchungen an aus Kulturzellen isoliertem OGG1-Protein haben außerdem ergeben, dass die Nitrosierung eines Cysteinrestes zum Funktionsverlust des Proteins unter Freisetzung des Zinkions zu führen scheint (**Jaiswal et al. 2001a**). Der kritische Lysinrest, der für die Bindung des Substrates unter Ausbildung einer Schiff'schen Base-Struktur wichtig ist (**Bruner et al. 2000, siehe auch 1.5.1.**), könnte theoretisch auch durch NO bzw. RNS modifiziert werden. Um das zu untersuchen, müssten zusätzliche Versuche durchgeführt werden. Eine Möglichkeit wäre, die Inkubation der Zellen mit dem NONOat bei verschiedenen pH-Werten durchzuführen oder zu versuchen, nach erfolgter Enzymhemmung diese durch Zugabe von GSH als Nitrosogruppen-Akzeptor oder Reduktionsmittel wieder rückgängig zu machen. So kann aus den im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen eine Modifizierung dieses Lysinrestes nicht ausgeschlossen werden, jedoch sprechen die zitierten Befunde eher für eine ausschlaggebende Modifizierung des Cysteinrestes der Zinkfinger-ähnlichen Struktur durch NO. Sicher kann jedoch gesagt werden, dass eine Beeinflussung des OGG1-Proteins in den durchgeführten Versuchen für die Inhibition der BER durch NO verantwortlich zu sein scheint.

Aufgrund der Abschätzung, dass pro Tag pro Zelle ca. 20000 spontane DNA-Schäden entstehen (**Lindahl 1993**), ist eine effiziente Protektion vor möglichen Mutationen erforderlich. Man geht davon aus, dass die BER eine wichtige Rolle dabei spielt (**Lindahl 2000, Laval et al. 1998**). Dies wird durch Untersuchungen an Ogg1-defizienten Zellen und

Mäusen bestätigt. In schnell proliferierenden Ogg1-defizienten Fibroblasten fanden **Klungland et al. (1999)** einen Gleichgewichtsspiegel von 8-oxoG von 1,5 8-oxoG pro 10^7 Basenpaare (entsprechend 400 pro Genom), der leicht erhöht war gegenüber den Kontrollzellen. Auch Untersuchungen nicht proliferierenden Lebergewebes von Ogg1-knock out ^(-/-)-Mäusen ergaben erhöhte 8-oxoG-Spiegel (15000 pro Genom) (**Klungland et al. 1999**) gegenüber Kontrolltieren (**Minowa et al. 2000**). Die Bedeutung dieser experimentellen Ergebnisse wird deutlich anhand der Tatsache, dass ein nur heterozygot vorliegendes Ogg1-Gen im Menschen in 100 % der „kleinzelligen Lungenkarzinom“ Zellen und in einem Teil der Zellen von Nieren-, Blasen-, Brust- und Halskrebs gefunden wurde.

Die Verminderung der Reparatur oxidativer DNA-Schäden kann daher als ein Beitrag zur Entstehung dieser Krebsarten angesehen (**Bruner et al. 2000**) werden, da sie in Folge mit einer erhöhten Belastung des Körpers mit potentiell mutagenen DNA-Modifikationen verbunden ist (**siehe 1.4.1.**). Die beobachtete Reparaturhemmung oxidativer DNA-Schäden kann als ein weiterer Mechanismus von NO, neben dem direkten Angriff an der DNA (**siehe 4.2.**), angesehen werden, wie NO zu Mutationen führen kann. Beim Vorliegen chronisch erhöhter NO-Konzentrationen kann dies als eine Möglichkeit angesehen werden, wie NO zu einem erhöhten Krebsrisiko (**siehe auch 1.6.**) beitragen kann.

5 Zusammenfassung

Die Generierung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies im Zuge körpereigener Stoffwechselreaktionen ist lange bekannt. Sie spielt einerseits eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion und Abwehr von Mikroorganismen, andererseits besitzen die generierten Moleküle aber auch schädigende Eigenschaften. So ist die Bildung von DNA-Modifikationen möglich, was Mutationen nach sich ziehen kann und schließlich zur Krebsentstehung beiträgt. Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung der Bedeutung von Hydroxylradikalen, Peroxynitrit und Stickstoffmonoxid für DNA-Schäden und Mutationen. Hierzu wurden zellfreie DNA-Schadensprofile in einem Relaxationsassay mit Hilfe von spezifischen Reparaturoendonukleasen am Plasmid pSV2-*gpt* erstellt. Anschließend wurden Transformationsexperimente mit den geschädigten DNA-Proben durchgeführt und die so detektierten Mutationen mit den im Relaxationsassay bestimmten DNA-Modifikationen korreliert.

4-HTP wurde als Modellsubstanz zur Generierung von Hydroxylradikalen in Kombination mit sichtbarem Licht verwendet. Bei den an zellfreier DNA induzierten DNA-Modifikationen handelte es sich bei 31 % um Einzelstrangbrüche, bei 34 % um AP-Läsionen, bei 25 % um oxidierte Pyrimidinmodifikationen und bei 10 % um oxidierte Purinmodifikationen; von letztgenannten konnten 25 % als 8-Hydroxyguanin (8-oxoG) indentifiziert werden, was durch HPLC/ECD-Analyse bestätigt werden konnte. Das in Transformationsexperimenten erhaltene Mutationsspektrum ergab ein eindeutiges Überwiegen von GC→AT Transitionen (76%) gegenüber nur geringen Anteilen anderer Mutationsarten. Die GC→AT Mutationen sind hier wahrscheinlich auf die oxidierten Pyrimidinmodifikationen zurückzuführen, von denen besonders die DNA-Modifikation 5-Hydroxycytidin in Frage kommt.

Für SIN-1, das als Modellsubstanz zur Generierung von Peroxynitrit eingesetzt wurde, konnte in zellfreien DNA-Schadensprofilen gezeigt werden, dass es sich bei 45 % um Einzelstrangbrüche, bei 19 % um AP-Läsionen und bei 36 % um oxidierte Purinmodifikationen handelte. Oxidierte Pyrimidinmodifikationen wurden nicht induziert. Von den oxidierten Purinmodifikationen konnte ein relativ hoher Anteil von 50 % durch HPLC-ECD-analytische Untersuchung der DNA als 8-Hydroxyguanin (8-oxoG) identifiziert werden. Damit standen auch die nach Transformation und Replikation in *E. coli* erhaltenen Mutationsdaten im Einklang, bei denen zu einem überwiegenden Anteil GC→TA Transversionen (71 %) detektiert werden konnten, die charakteristisch für 8-oxoG sind. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Schädigung mit Peroxynitrit von dem anwesenden Proteingehalt abhängig ist, da es in Anwesenheit von BSA als unspezifischem Protein zu einer Änderung des Schadensprofils kam. Für SIN-1 und 4-HPT ergaben sich somit in dem hier untersuchten System grundsätzlich sehr verschiedene DNA-Schadens- und Mutationsspektren.

Eine Abhängigkeit des DNA-schädigenden Potentials von zellulären Faktoren zeigte sich noch deutlicher in Bezug auf die Behandlung der DNA mit Stickstoffmonoxid (NO). Diese führte in zellfreien Experimenten an PM2-DNA nicht zu einer Induktion von Einzelstrangbrüchen und DNA-Modifikationen, die von der Reparaturoendonuklease Fpg-

Protein erkannt wurden, während in Zellen Schäden in der DNA induziert werden konnten.

Um den Einfluss von NO genauer zu untersuchen, wurden Zellkulturexperimente durchgeführt. Mausfibroblasten, die mit einer induzierbaren NO-Synthase stabil transfiziert waren (iNOS-Zellen), dienten dabei als Modell für eine moderate endogene NO-Produktion. Die NO-Synthase der iNOS-Zellen konnte zusätzlich induziert werden, was zu einer Steigerung der NO-Produktion führte. Die iNOS-Zellen wurden im Vergleich mit den dazugehörigen Kontrollzellen, die nur mit dem leeren Vektor transfiziert worden waren (Vector-only-Zellen), und den parentalen Wildtyp-Zellen untersucht. Die konstitutive NO-Freisetzung der iNOS-Zellen führte nicht zu einer Induktion von DNA-Schäden, gemessen als Fpg-sensitive DNA-Modifikationen und Einzelstrangbrüche. Parallel dazu zeigte sich auch keine Toxizität, keine Induktion von Mikrokernen und kein Einfluss den Glutathionspiegel. Durch die endogene NO-Produktion kam es auch nicht zu einer Hemmung der Reparatur oxidativer DNA-Schäden, die durch den Photosensibilisator Ro 19-8022 in Kombination mit sichtbarem Licht induziert worden waren, bei denen es sich vorwiegend um 8-oxoG handelte. Dagegen war die Induktion von Strangbrüchen durch den Photosensibilisator wie auch durch H₂O₂ in den iNOS-Zellen gehemmt und die Bildung von Mikrokernen durch H₂O₂ signifikant herabgesetzt. Diese Protektion vor oxidativer Schädigung der DNA wurde auf die durch die iNOS-Zellen gebildeten mikromolaren NO-Konzentrationen zurückgeführt, da weder die Vector-only-Zellen noch die Wildtyp-Zellen einen ähnlichen Effekt zeigten.

Zur Untersuchung des Einflusses höherer NO-Konzentrationen auf oxidative DNA-Schäden, deren Induzierbarkeit und Reparatur, wurde Dipropylentriamin (DPTA) – NONOat verwendet als ein Vertreter der Substanzklasse der NONOate, die in Lösung in Abhängigkeit von der Zeit eine definierte Menge von NO freisetzen. Dieses sogenannte exogene NO führte in Konzentrationen > 1 mM selbst zu DNA-Schäden. Durch Vergleich der zellulären Schadensprofile des NONOat's und von SIN-1, die in etwa übereinstimmten, konnte Peroxynitrit als aus NO und Sauerstoff intermediär gebildete reaktive DNA-schädigende Spezies benannt werden. Da durch das NONOat oxidierte Purinmodifikationen in viel höherem Ausmaß als AP-Läsionen in der DNA induziert wurden, dürfte es sich bei diesen zumindest zum Teil um 8-oxoG handeln. Die Induktion von DNA-Schäden war begleitet von einer Bildung von Mikrokernen. Dabei waren die eingesetzten NO-Konzentrationen mit einer hohen Toxizität verbunden, jedoch fand auch bei der höchsten eingesetzten NO-Konzentration von 2,5 mM noch eine signifikante Zellproliferation statt.

NONOat-Konzentrationen, die selbst noch kein DNA-schädigendes Potential aufwiesen, waren in der Lage, die Reparatur oxidativer Photosensibilisator-induzierter DNA-Modifikationen, bei denen es sich hauptsächlich um 8-oxoG handelte, zu hemmen. Die Hemmung der Basenexzisionsreparatur (BER) war sehr spezifisch und wurde auf die Verhinderung der Substraterkennung und -prozessierung durch OGG1, die eukaryotische DNA-Glykosylase, die unter anderem 8-oxoG prozessiert, zurückgeführt, da weder die Reparatur von Pyrimidindimeren (Nukleotidexzisionsreparatur, NER) noch die von AP-Läsionen oder Einzelstrangbrüchen beeinflusst wurde. Ein kritischer Cysteinrest des OGG1-Protein wurde dabei als Target von NO diskutiert und ist sehr wahrscheinlich für

die Hemmung der BER verantwortlich. Die Induzierbarkeit von DNA-Schäden durch exogenes NO blieb dabei unverändert.

Damit zeigen die hier ermittelten Ergebnisse zwei mögliche Mechanismen auf, über welche NO zur Krebsentstehung beitragen kann. Zum einen über die direkte Schädigung der DNA durch hohe NO-Konzentrationen > 1 mM, wobei wahrscheinlich intrazellulär gebildetes Peroxynitrit an der DNA-Modifizierung beteiligt ist, und zum anderen über eine indirekte Erhöhung der Gleichgewichtsspiegel infolge der Reparaturhemmung oxidativer DNA-Modifikationen durch „mittlere“ NO-Konzentrationen (0,5-1 mM). Eine chronisch erhöhte NO-Produktion, wie sie in Folge von Krankheiten oder Infektionen auftritt, wurde schon lange mit einem erhöhten Krebsrisiko in Verbindung gebracht. Im Gegensatz dazu stehen die Folgen niedriger endogener NO-Produktion, die nämlich umgekehrt eher einen schützenden Einfluss auf die Zellen haben, wie die hier beschriebene Hemmung der Induzierbarkeit von DNA-Schäden und Mikrokernen zeigt.

6 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-Diphosphat
Amp/amp	Ampicillin
<i>amp^r</i>	Ampicillin-Resistenzgen
APE1	AP-Endonuklease, menschliches Reparaturenzym (HAP1)
AP-Läsion	Apurinische / Apyrimidinische Stelle (Basenfreie Stelle)
ATP	Adenosin-Triphosphat
B6-INOS, INOS	B6 Mausfibroblasten, transfiziert mit einer induzierbaren NO-Synthase (iNOS), B6-INOS-Zellen
B6-Vector-only, B6-VO, Vector-only	B6 Mausfibroblasten, wurden als Kontrollzellen zu den B6 INOS-Zellen untersucht, zeigen keine iNOS-Aktivität
B6-Wildtyp, Wildtyp	B6 Mausfibroblasten (<i>tk</i>), parentale Zelllinie von B6-Vector-only- und B6-INOS-Zellen
BER	Basenexzisionsreparatur
Bp	Basenpaar/e
BSA	bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CO ₂	Kohlendioxid
dG	2'-Desoxyguanosine
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dOTP	2'-Desoxyoxanosin-Triphosphat
DPTA-NONOat	Dipropylentriamin-NONOat, 3,3'-[Hydroxy-nitrosohydrazino-]bis-1-propanamin
dRP	Desoxyribosephosphat
dT	Desoxythymidin
ECD	Elektrochemischer Detektor
Endo III	Endonuklease III, bakterielles Reparaturenzym
Endo IV	Endonuklease IV, bakterielles Reparaturenzym
ERCC (1-6)	excision repair cross-complementing- Proteine (Komplementationsgruppen 1-6 sind bis dato bekannt)
Exo III	Exonuklease III, bakterielles Reparaturenzym
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAPY	Formamidopyrimidin (Purinbasen-Modifikation)
FCS	fetales Kälberserum
FEN-1	Flap-Endonuklease 1
FMN	Flavin-Adenin-Mononukleotid
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase, bakterielles Reparaturenzym
g	Gramm oder Gravitation (Zentrifugation)
G	Guanin
GC→AT Transition	Mutationsart, ein GC Basenpaar wird durch ein AT Basenpaar ersetzt (aufgrund einer vorangegangenen Modifikation)

GC→TA Transversion	Mutationsart, ein GC Basenpaar wird durch ein TA Basenpaar ersetzt (aufgrund einer vorangegangenen Modifikation)
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
h	Stunde/n
HAP1	AP-Endonuklease, menschliches Reparaturenzym (APE1)
HhH-Motiv	Helix-Haarnadel-Helix-Motiv
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HLPC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (<u>h</u> igh <u>p</u> ressure <u>l</u> iquid <u>c</u> hromatography)
4-HPT, 4-NHPT	N-Hydroxypyridin-4(1H)-thion
iNOS	induzierbare NO-Synthase
INOS, B6-INOS	B6 Mausfibroblasten, transfiziert mit einer induzierbaren NO-Synthase (iNOS), B6-INOS-Zellen
J	Joule
kDa	kilo Dalton
l	Liter
LS	Längenstandard
μ	mikro
M	Molar
min.	Minute/n
Nab.	Natriumbutyrat
NADP	Nicotinamidadenin-Dinukleotid-Phosphat
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenin-Dinukleotid-Phosphat
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
4-NHPT, 4-HPT	N-Hydroxypyridin-4(1H)-thion
nm	nanometer (Wellenlänge)
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
ns	Nanosekunde
NTH	Thyminglykol-DNA-Glykosylase, menschliches Reparaturenzym
OGG1	Hydroxyguanin-DNA-Glykosylase, (hOGG1) menschliches Reparaturenzym
8-oxodG	8-Hydroxyguanosin
8-oxoG	8-Hydroxyguanin
PARP	Poly(AD-ribose)polymerase, ADP-ribosyltransferase
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PM2-DNA	Plasmid des Bakteriophagen PM2
PNK	Polynukleotid Kinase
Polβ	Polymerase β
Pol	Polymerase
RPA	Replikationsprotein A
RFC	Replikationsfaktor-C
RNS	reaktive Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies

Ro 19-8022	[R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl)-carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol]
rpm	Umdrehungen pro Min.
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIN-1	3-Morpholinosydnonimin
SOD	Superoxiddismutase
SSB	Einzelstrangbruch/-brüche
T	Thymin
T4EV	T4 Endonuklease V, bakterielles Reparaturenzym
Tab.	Tabelle
tBuOOH	tert.-Butylhydroperoxid
tert.	tertiär
TFIIH	Transkriptionsfaktor II H
tg	Thioguanin
TH ₄	Tetrahydrobiopterin
Tn5	Transposone (Tn) sind sogenannte „springende DNA-Elemente“, d.h. DNA-Abschnitte, die unabhängig ihren Platz innerhalb des Genoms wechseln können. Das Tn5 trägt die Information für Kanamycinresistenz
TTD	Trichothiodystrophy
UNG	Uracil-DNA-Glykosylase, menschliches Reparaturenzym
UV	Ultraviolette Strahlung
UVB	Ultraviolette Strahlung im Wellenlängenbereich 280-320 nm
UZ	Ultrazentrifuge
Vector-only, B6-Vector-only, B6-VO	B6 Mausfibroblasten, wurden als Kontrollzellen zu den B6 INOS-Zellen untersucht, zeigen keine iNOS-Aktivität
Wildtyp, B6-Wildtyp	B6 Mausfibroblasten (<i>tk</i>), parentale Zelllinie von B6-INOS- und B6-Vector-only-Zellen
XP (XPA-XPG)	Xeroderma pigmentosum (Koplementationsgruppen A bis G)
XRCC (1-5)	X-ray-Reparatur Komplementationsfaktoren (1-5 sind bekannt)
z. B.	zum Beispiel
zw.	Zwischen

7 Literatur

Adam, W., Ballmaier, D., Epe, B., Grimm, G.N. and Saha-Möller, C.R. (1995) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 34, 2156-2158.

Adam, W., Grimm, G.N., Saha-Möller, C.R., Dall'Acqua, F., Miolo, G. and Vedaldi, D. (1998) DNA damage by *tert*-butoxyl radicals generated in the photolysis of a water-soluble, DNA-binding peroxyester acting as a radical source. *Chem. Res. Toxicol.*, 11, 1089-1097.

Ambs, S., Bennett, W.P., Merriam, W.G., Ogunfusika, M.O., Oser, S.M., Harrington, A.M., Shields, P.G., Felley-Bosco, E., Hussain, S.P. and Harris, C.C. (1999) Relationship between p53 mutations and inducible nitric oxide synthase expression in human colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 91, 86-88.

Aruoma, O.I., Halliwell, B., Gajewski, E. and Dizdaroglu, M. (1989) Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric iron chelators. *J. Biol. Chem.*, 264, 20509-20512.

Ashman, C.R. and Davidson, R.L. (1984) High spontaneous mutation frequency in shuttle vector sequences recovered from mammalian cellular DNA. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 2266-2272.

Atamna, H. et al. (2000) A method for detecting abasic sites in living cells: age-dependent changes in base-excision repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 686-691.

Aveline, B.M. and Redmond, R.W. (1999) Selective Photoexcitation of the Thione and Thiol Forms of N-Hydroxypyridine-4(1h)-Thione: A Tautomeric Heteroaromatic System. *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 9977-9985.

Bartsch, H. and Nair, J. (2000) New DNA-based biomarkers for oxidative stress and cancer chemoprevention studies. *Europ. Journal of Cancer*, 36, 1229-1234.

Bau, D.T., Gurr, J.R. and Jan, K.Y. (2001) Nitric oxide is involved in arsenite inhibition of pyrimidine dimer excision. *Carcinogenesis*, 22, 709-716.

Beard, W.A. and Wilson, S.H. (2000) Structural design of a eukaryotic DNA repair polymerase: DNA polymerase β . *Mutat. Res.*, 460, 231-244.

Beckman, J.S. (1996) Oxidative damage and tyrosine nitration by peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.*, 9, 836-844.

Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. and Freeman, B.A. (1990) Apparent hydroxy radical production by peroxynitrite: implications in endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 1620-1624.

Beckman, K.B. and Ames, B.N. (1997) Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.*, 272, 19633-19636.

Beehler, B.C., Przybyszewski, J., Box, H.B. and Kulesz-Martin, M.F. (1992) Formation of 8-hydroxyguanosine within DNA of mouse keratinocytes exposed in culture to UVB and H₂O₂. *Carcinogenesis*, 13, 737-742.

Benhamou, S. and Sarasin, A. (2000) Variability in nucleotide excision repair and cancer risk: a review. *Mutat. Res.*, 462, 149-158.

Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513-1522.

Bohn, H. and Schönafinger, K. (1989) Oxygen and oxidation promote the release of nitric oxide from sydnonimines. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 14 (Suppl. 11), S 6-S 12.

Boiteux, S. (1993) Properties and biological functions of NTH and FPG proteins of *Escherichia coli*: two DNA glycosylases that repair oxidative damage in DNA. *J. Photochem. Photobiol.*, 19, 87-96.

- Boiteux, S. and Radicella, J.P. (2000) The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 377, 1-8.
- Braun, J.E., Westmijze, E.J., Lafleur, M.V. and Retel, J. (1996) Mutations induced by gamma-irradiation of M13 bacteriophages containing single-stranded DNA. *Int. J. Radiat. Biol.*, 70, 459-465.
- Breimer, L.H. and Lindahl, T. (1985) Thymine lesions produced by ionizing radiation in double-stranded DNA. *Biochemistry*, 24, 4018-4022.
- Bruner, S.D., Norman, D.P.G. and Verdine, G.L. (2000) Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature*, 403, 859-866.
- 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. *Mut. Res.*, 424, 37-49.
- Burney, S., Niles, J.C., Dedon, P.C. and Tannenbaum, S.R. (1999a) DNA damage in deoxynucleosides and oligonucleotides treated with peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.*, 12, 513-520.
- 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-rayed affair. *BioEssays*, 23, 447-455.
- Caulfield, J.L., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. (1998) Nitric-oxide induced deamination of cytosine and guanine in deoxynucleosides and oligonucleotides. *J. Biol. Chem.*, 273, 12689-12695.
- Chen, G., Wang, S.H. and Warner, T.D. (2000) Regulation of iNOS mRNA levels in endothelial cells by glutathione, a double-edged sword. *Free Rad. Res.*, 32, 223-234.
- Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S. and Loeb, L.A. (1992) 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G→T and A→C substitutions. *J. Biol. Chem.*, 267, 166-172.
- Churchill, M.E., Peak, J.G. and Peak, M.J. (1991) Repair of near-visible- and blue-light-induced DNA single-strand breaks by the CHO cell lines AA8 and EM9. *Photochem. Photobiol.*, 54, 639-644.
- DeRojas-Walker, T., Tamir, S., Ji, H., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. (1995) Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. *Chem. Res. Toxicol.*, 8, 473-477.
- Di Mascio, P. and Sies, H. (1989) Quantification of singlet oxygen generated by thermolysis of 3,3'-(1,4-naphthylidene)dipropionate. Monomer and dimer photoemission and the effects of 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane. *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 2909-2914.
- Dizdaroglu, M. (1992) Oxidative DNA damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat. Res.*, 275, 331-342.
- Dizdaroglu, M., Laval, J. and Boiteux, S. (1993) Substrate specificity of the *Escherichia coli* endonuclease III: excision of thymine- and cytosine-derived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals. *Biochemistry*, 32, 12105-12111.
- Douki, T., Cadet, J. and Ames, B.N. (1996) An adduct between peroxynitrite and 2'-deoxyguanosine: 4,5-Dihydro-5-hydroxy-4-(nitrosooxy)-2'-deoxyguanosine. *Chem. Res. Toxicol.*, 9, 3-7.
- Duchstein, H.-J., Riederer, S. and Erbach, C. (1999) Aktive Stickstoffspezies. Ein neues Forschungsgebiet für die Pharmazeutische Industrie. *Pharm. Unserer Z.*, 28 (Nr. 4), 197-207.
- Engler, M.J. and Richardson, C.C. (1982) *The enzymes*, 15B, 3-29.
- Epe, B. (1991) Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem.-Biol. Interactions*, 80, 239-260.
- Epe, B. (1993) DNA damage induced by photosensitization. In: Halliwell, B., Aruoma, O.I., Hoorwood, E. (eds.) *DNA and Free Radicals*, S. 41-65.

- Epe, B. (1995) DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 127, 223-249.
- Epe, B. and Hegler, J. (1994) Oxidative DNA damage: endonuclease fingerprinting. *Methods Enzymol.*, 234, 122-131.
- Epe, B., Ballmaier, D., Adam, W., Grimm, G.N. and Saha-Möller, C.R. (1996) Photolysis of N-hydroxypyridinethiones: a new source of hydroxy radicals for the direct damage of cell-free and cellular DNA. *Nucleic Acids Res.*, 24, 1625-1631.
- Epe, B., Ballmaier, D., Roussyn, I., Briviba, K. and Sies, H. (1996a) DNA damage by peroxynitrite characterized with DNA repair enzymes. *Nucleic. Acids Res.*, 24, 4105-4110.
- Epe, B., Häring, M., Ramaiah, D., Stopper, H., Abou-Elzahab, M.M., Adam, W. and Saha-Möller, C. (1993b) DNA damage induced by furocumarin hydroperoxides plus UV (360 nm). *Carcinogenesis*, 14, 2271-2276.
- Epe, B., Henzl, H., Adam, W. and Saha-Möller, C.R. (1993a) Endonuclease-sensitive DNA modifications induced by acetone and acetophenone as photosensitizers. *Nucleic Acids Res.*, 21, 863-869.
- Epe, B., Mützel, P. and Adam, W. (1988) DNA damage by oxygen radicals and excited state species: a comparative study using enzymatic probes *in vivo*. *Chem- Biol. Interactions*, 67, 149-165.
- Epe, B., Pflaum, M. and Boiteux, S. (1993c) DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems. *Mutat. Res.*, 299, 135-145.
- Epe, B., Pflaum, M., Häring, M., Hegler, J. and Rüdiger, H. (1993d) Use of repair endonucleases to characterize DNA damage induced by reactive oxygen species in cellular and cell-free systems. *Toxicol. Lett.*, 67, 57-72.
- Evans, J., Maccabee, M., Hatahet, Z., Courcelle, J., Bockrath, R., Ide, H. and Wallace, S. (1993) Thymine ring saturation and fragmentation products: lesion bypass, misinsertion and implications for mutagenesis. *Mutat. Res.*, 299, 147-156.
- Fang, F.C. (1997) Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J. Clin. Invest.*, 12, 2818-2825.
- Feelisch, M., Ostrowski, J. and Noack, E. (1989) On the mechanism of the NO release of sydnonimines. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 14 (Suppl. 11), S 13-S 22.
- Fischer, U., Möhler, H., Schneider, F. and Widmer, U. (1990) Tricyclic pyridine derivatives with high affinity to central benzodiazepine receptor. *Helv. Chem. Acta*, 73, 763-781.
- Fuciarelli, A.F., Wegher, B.J., Blakely, W.F. and Dizdaroglu, M. (1990) Yields of radiation-induced base products in DNA: effects of DNA conformation and gassing conditions. *Int. J. Radiat. Biol.*, 58, 397-415.
- Gal, A. and Wogan, G.N. (1996) Mutagenesis associated with nitric oxide production in transgenic SJL mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 15102-15107.
- Gordge, M.P. (1998) How cytotoxic is nitric oxide? *Exp. Nephrol.*, 6, 12-16.
- Graziewicz, M., Wink, D.A. and Laval, F. (1996) Nitric oxide inhibits DNA ligase activity: potential mechanisms for NO-mediated DNA damage. *Carcinogenesis*, 17, 2501-2505.
- Graziewicz, M.-A., Zastawny, T. H., Olinski, R. and Tudek, B. (1999) SOS-dependent A→G transitions induced by hydroxyl radical generating system hypoxanthin/xanthine oxidase/Fe³⁺/EDTA are accompanied by the increase of Fapy-adenine content in M13 mp18 phage DNA. *Mutat. Res.*, 434, 41-52.
- Griess, P., (1879) *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 12, 426.
- Griffith, O.W. (1985) Glutathione and glutathione disulphide. In: Bernt, E. & Bergmeyer, H.U. (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis* 3rd Ed., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Vol VIII, pp 521-529.

- Grisham, M.B., Jourdain, D. and Wink D.A. (2000) Review article: chronic inflammation and reactive oxygen and nitrogen metabolism – implications in DNA damage and mutagenesis. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 14 (Suppl. 1), 3-9.
- Guidarelli, A., Cattabeni, F. and Cantoni, O. (1997b) Alternative mechanisms for hydroperoxide-induced DNA single strand breakage. *Free Radic. Res.*, 26(6), 537-547.
- Guidarelli, A., Clementi, E., Brambilla, L. and Cantoni, O. (1997a) Mechanism of the antimycin A-mediated enhancement of t-butylhydroperoxide-induced single-strand breakage in DNA. *Biochem. J.*, 328, 801-806.
- Halliwell, B. and Arouma, O.I. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. *FEBS Letters*, 281, 9-19.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, 219, 1-14.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1985) Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.*, 86, 1-85.
- Hentze, M.W. and Kühn, L.C. (1996) Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 8175-8182.
- Hippeli, S. and Elstner, E.F. (1997) OH-Radical-type reactive oxygen species: a short review on the mechanisms of OH-radical- and peroxyxynitrite toxicity. *Z. Naturforsch.*, 52c, 555-563.
- Hollenbach, S. (1999) Bedeutung endogener Faktoren für die Steady-State-Level und Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen in Säugerzellen. Dissertation, Universität Mainz.
- Hollenbach, S., Dhenaut, A., Eckert, I., Radicella, J.P. and Epe, B. (1999) Overexpression of Ogg1 in mammalian cells: effects on induced and spontaneous oxidative DNA damage and mutagenesis. *Carcinogenesis*, 20, 1863-1868.
- Hrabie, J.A., Klose, J.R., Wink, D.A. and Keefer, L.K. (1993) New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *J. Org. Chem.*, 58, 1472-1476.
- Huie, R.C. and Padmaja, S. (1993) The reaction of NO with superoxide. *Free Rad. Res. Commun.*, 18, 195-199.
- Hüttermann, J. (1982) Solid-state radiation chemistry of DNA and its constituents. *J. Ultramicroscopy*, 10, 25-40.
- Ide, H., Kow, Y.W. and Wallace, S.S. (1985) Thymine glycol and urea residues in M13 DNA constitute replicative blocks *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, 13, 8032-8052.
- Ilosvay, M.L., (1989) *Bull.Soc. Chim. (Paris)*, 2, 288.
- Inoue, S. and Kawanishi, S. (1995) Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. *FEBS Letters*, 371, 86-88.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L. and Beckman, J.S. (1992) Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 298, 446-451.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L. and Beckman, J.S. (1992) Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 298, 446-451.
- Ito, K., Inoue, S., Yamamoto, K. and Kawanishi, S. (1993) 8-Hydroxydeoxyguanosine formation at the 5'-site of 5'-GG-3' sequences in double stranded DNA by UV radiation with riboflavin. *J. Biol. Chem.*, 268, 13221-13227.
- Jackson, A.L. and Loeb, L.A. (2001) The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutat. Res.*, 477, 7-21.

- Jaiswal, M., LaRusso, N., Burgart, L.J. and Gores, G.J. (2000) Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. *Cancer Res.*, 60, 184-190.
- Jaiswal, M., LaRusso, N.F., Shapiro, R.A., Billiar, T.R. and Gores, G.J. (2001) Nitric oxide-mediated inhibition of DNA repair potentiates oxidative DNA damage in cholangiocytes. *Gastroenterology*, 120, 190-199.
- Jaiswal, M., LaRusso, N.F., Nishioka, N., Nakabeppu, Y. and Gores, G.J. (2001a) Human Ogg1, a protein involved in the repair of 8-oxoguanine, is inhibited by nitric oxide. *Cancer Res.*, 61, 6388-6393.
- Juedes, M.J. and Wogan, G.N. (1996) Peroxynitrite-induced mutation spectra of pSP189 following replication in bacteria and in human cells. *Mutat. Res.*, 349, 51-61.
- Kamiya, H., Ueda, T., Ohgi, T., Matsukage, A. and Kasai, H. (1995) Misincorporation of dAMP opposite 2-hydroxyadenine, an oxidative form of adenine. *Nucleic Acids Res.*, 23, 761-766.
- Kanner, J., Harel, S. and Granit, R. (1991) Nitric oxide as an antioxidant. *Arch. Biochem. Biophys.*, 289, 130-136.
- Kanofsky, J.R. (1989) Singlet oxygen production by biological systems. *Chem.-Biol. Interactions*, 70, 1-28.
- Kasai, H. and Nishimura, S. (1993) Formation of 8-hydroxyguanine by oxidative DNA damage, its repair and mutagenic effects. *Adv. Mutagen. Res.*, 4, 31-45.
- Keefer, L.K. (1995) Nitric oxide in biochemistry and drug design. In: *Molecular biology and biotechnology*. von Meyers, R.A., 1995, VCH-Verlag, Weinheim, 597-601.
- Keefer, L.K., Nims, R.W., Davies, K.M. and Wink, D.A. (1996) "NONOats" (1-substituted diazen-1-ium-1,2-diolates) as nitric oxide donors: Convenient nitric oxide dosage forms. *Methods in Enzymology*, 268, 281-293.
- Kielbassa, C., Roza, L., Epe, B. (1997) Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis*, 18(4), 811-816.
- Kim, Y.-M., Chung, H.-T., Simmons, R.L. and Billiar, T.R. (2000) Cellular non-heme iron content is a determinant of nitric oxide-mediated apoptosis, necrosis, and caspase inhibition. *J. Biol. Chem.*, 275, 10954-10961.
- Klein, J.C., Bleeker, M.J., Saris, C.P., Roelen, H.C.P.F., Brugghe, H.F. and Berns, A.J.M. (1992) Repair and replication of plasmids with site-specific 8-oxodG and 8-AAFdG residues in normal and repair deficient human cells. *Nucleic Acids Res.*, 20, 4437-4443.
- Klinedinst, D.K. and Drinkwater, N.R. (1992) Mutagenesis of apurinic sites in normal and ataxia teleangiectasia human lymphoblastoid cells. *Mol. Carcinogenesis*, 6, 32-42.
- Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T. and Barnes, D.E. (1999) Accumulation of pre-mutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 13300-13305.
- Krokan, H.E., Nilsen, H., Skorpen, F., Otterlei, M. and Slupphaug, G. (2000) Base excision repair in mammalian cells. *FEBS Letters*, 476, 73-77.
- Krokan, H.E., Standal, R. and Slupphaug, G. (1997) DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem. J.*, 325, 1-16.
- Latour, I., Demoulin, J.B. and Buc-Calderon, P. (1995) Oxidative DNA damage by t-butyl hydrogenperoxide causes DNA single strand breaks which is not linked to cell lysis. A mechanistic study in freshly isolated rat hepatocytes. *FEBS Letters*, 373, 299-302.
- Laval, F. and Wink, D.A. (1994) Inhibition by nitric oxide of the repair protein, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase. *Carcinogenesis*, 15, 443-447.

- Laval, F., Wink, D.A. and Laval, J. (1997) A discussion of mechanisms of NO genotoxicity: implication of inhibition of DNA repair proteins. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 131, 175-191.
- Laval, J., Jurado, J., Saparbaev, M. and Sidorkina, O. (1998) Antimutagenic role of base-excision repair enzymes upon free radical induced DNA damage. *Mutat. Res.*, 402, 93-102.
- Lawrence, C.W., Borde, A., Kanerjee, S.K. and LeClerk, J.R. (1990) Mutation frequency and spectrum resulting from a single abasic site in single stranded vector. *Nucleic Acids Res.*, 18, 2153-2157.
- Lewis, R.S., Tamir, S., Tannenbaum, S.R. and Deen, W.M. (1995) Kinetic analysis of the fate of nitric oxide synthesized by macrophages in vitro. *J. Biol. Chem.*, 270, 29350-29355.
- Lewis, R.S., Tannenbaum, S.R. and Deen, W.M. (1995a) *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 3933-3939.
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362, 709-715.
- Lindahl, T. (2000) Suppression of spontaneous mutagenesis in human cells by DNA base excision-repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 13300-13305.
- Lindahl, T. and Barnes, D.E. (1992) Mammalian DNA ligases. *Ann. Rev. Biochem.*, 61, 251-281.
- Lindahl, T., Karran, P. and Wood, R.D. (1997) DNA excision repair pathways. *Current opinion in Genetics and Development*, 7, 158-169.
- Lippke, J.A., Gordon, L.K., Brash, D.E., Hanawalt, W.A. (1981) Distribution of UV light-induced damage in a specified sequence of human DNA: detection of alkaline sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 78, 3388-3392.
- Liu, R.H., Baldwin, B., Tennant, B.C. and Hotchkiss, J.H. (1991) Elevated formation of nitrate and N-nitrosodimethylamine in woodchucks (*Marmota monax*) associated with chronic woodchuck hepatitis virus infection. *Cancer Res.*, 51, 3925-3929.
- Liu, R.H., Jacob, J.R., Tennant, B.C. and Hotchkiss, J.H. (1992) Nitrite and nitrosamine synthesis by hepatocytes isolated from normal woodchucks (*Marmota monax*) and woodchucks chronically infected with woodchuck hepatitis virus. *Cancer Res.*, 52, 4139-4143.
- Lloyd, R.S., Haidle, C.W. and Robertson, D.L. (1978) Bleomycin-specific fragmentation of double-stranded DNA. *Biochemistry*, 17, 1890-1896.
- Loeb, L.A. and Preston, B.D. (1986) Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. *Annual Rev. Genet.*, 20, 201-230.
- Lymar, S.V. and Hurst, J.K. (1995) Rapid reaction between peroxynitrite ion and carbon dioxide: implications for biological activity. *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 8867-8868.
- MacMicking, J., Xie, Q. and Nathan, C. (1997) Nitric oxide and macrophage function. *Annu. Rev. Immunol.*, 15, 323-350.
- Mahler, H.-C. (1999) Einfluss endogener und exogener Faktoren auf Bildung und Reparatur oxidativer DNA-Schäden. Dissertation, Universität Mainz.
- Markant, A., Rimbach, G., Krämer, K., Mayer, H. and Pallauf, J. (1995) Reaktive Sauerstoffradikale: Entstehung, Wirkung, Eliminierung. *PZ*, 140, 2313-2327.
- Marnett, L.J. (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21, 361-370.
- Marnett, L.J. and Plataras, J.P. (2001) Endogenous DNA damage and mutation. *TRENDS in Genetics*, 17, 214-221.
- Memisoglu, A. and Samson, L. (2000) Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat. Res.*, 451, 39-51.

- Messmer, U.K. and Brüne, B. (1996) Nitric oxide (NO) in apoptotic versus necrotic RAW 264.7 macrophage cell death: The role of NO-donor exposure, NAD⁺ content and p53 accumulation. *Arch. Biochem. Biophys.*, 327, 1-10.
- Miles, A.M., Bohle, D.S., Glassbrenner, P.A., Hansert, B., Wink, D.A. and Grisham, M.B. (1996) Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. *J. Biol. Chem.*, 271, 40-47.
- Minowa, O., Arai, T., Hirano, M., Monden, Y., Nakai, S., Fukuda, M., Itoh, M., Takano, H., Hippou, Y., Aburatani, H., Masumura, K., Nohmi, T., Nishimura, S. and Noda, T. (2000) Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 10, 1073-1078.
- 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.
- Mol, C.D., Hosfield, D.J. and Tainer, J.A. (2000) Abasic site recognition by two apurinic/apyrimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3'- ends justify the means. *Mutat. Res.*, 460, 211-229.
- Moochhala, S. and Rajnakova, A. (1999) Role of nitric oxide in cancer biology. *Free Rad. Res.*, 31, 671-679.
- Moriya, M. (1993) Single-stranded shuttle phage for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted GC→TA transversions in simian kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1122-1126.
- Moriya, M., Ou, C., Bodepudi, V., Johnson, F., Takeshita, M. and Grollmann, A.P. (1991) Site-specific mutagenesis using a gapped duplex vector: A study of translesion synthesis past 8-oxodeoxyguanosine in *E. coli*. *Mutation Res.*, 254, 281-288.
- Moustacchi, E. (2000) DNA damage and repair: consequences on dose-responses. *Mutat. Res.*, 464, 35-40.
- Mulligan, R.C. and Berg, P. (1980) Expression of a bacterial gene in mammalian cells. *Science*, 209, 1422-1424.
- Murphy, M.P. (1999) Nitric oxide and cell death. *Biochem. Biophys. Acta*, 1411, 401-414.
- Nackerdien, Z., Rao, G., Cacciuttolo, M.A., Gajewski, E. and Dizdaroglu, M. (1992) Chemical nature of DNA-protein-cross-links produced in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of iron or copper ions. *Biochemistry*, 30, 4873-4879.
- Nakamura, J. and Swenberg, J.A. (1998) Highly sensitive apurinic/apyrimidinic site assay can detect spontaneous and chemically induced depurination under physiological conditions. *Cancer Res.*, 58, 222-225.
- Neto, J.B., Gentil, A., Cabral, R.E. and Sarasin, A. (1992) Mutation spectrum of heat-induced abasic sites on a single-stranded shuttle vector replicated in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 267, 19718-19723.
- Nguyen, T., Brunson, D., Crespi, C.L., Penman, B.W., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. (1992) DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 3030-3034.
- Noack, E. and Feelisch, K. (1989) Molecular aspects underlying the vasodilator action of molsidomine. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 14 (Suppl. 11), S 1-S 5.
- O'Connor, T., Graves, R.V., 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'Donnell, R.E., Boorstein, R.J., Cunningham, R.P. and Teebor, G.W. (1994) Effect of pH and temperature on the stability of UV-induced repairable pyrimidine hydrates in DNA. *Biochemistry*, 33, 9875-9880.
- Ohshima, H. and Bartsch, H. (1994) Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide. *Mutat. Res.*, 305, 253-264.

- Pacelli, R., Krishna, M.C., Wink, D.A. and Mitchell, J.B. (1994) Nitric oxide protects DNA from hydrogen peroxide-induced double strand cleavage. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, 35, 540.
- Palombo, F. and Dogliotti, E. (1989) Construction of an EBV-derived shuttle vector for studying the influence of transcription on mutagenesis. *Biochem. Biophys. Acta*, 1009, 251-256.
- Pantopoulos, K. and Hentze, M.K. (1995) Nitric oxide signaling to iron-regulatory protein: Direct control of ferritin mRNA translation and transferrin receptor mRNA stability in transfected fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 1267-1271.
- Patel, R.P., McAndrew, J., Sellak, H., White, C.R., Jo, H., Freeman, B.A. and Darley-Usmar, V.M. (1999) Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochem. Biophys. Acta*, 1411, 385-400.
- Patterson, M.S., Madsen, S.J. and Wilson, B.S. (1990) Experimental tests of the feasibility of singlet oxygen luminescence monitoring *in vivo* during photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 5, 69-84.
- Pfeiffer, S., Lass, A., Schmidt, K. and Mayer, B. (2001) Protein tyrosine nitration in cytokine-activated murine macrophages. Involvement of a peroxidase/nitrite pathway rather than peroxynitrite. *J. Biol. Chem.*, in Press.
- Pflaum, M. (1996) Oxidative DNA-Modifikationen durch langwelliges UV-Licht und sichtbares Licht. Dissertation, Universität Würzburg.
- Pflaum, M., Will, O., Mahler, H.-C. and Epe, B. (1998) DNA Oxidation products determined with repair endonucleases in mammalian cells: types, basal levels and influence of cell proliferation. *Free Rad. Res.*, 29, 585-594.
- Purmal, A.A., Kow, Y.W. and Wallace, S.S. (1994) Major oxidative products of cytosine, 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil, exhibit sequence context-dependent mispairing *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, 22, 72-78.
- Richardson, K.K., Richardson, F.C., Crosby, R.M., Swenberg, J.A. and Skopek, T.R. (1987) DNA base changes and alkylation following *in vivo* exposure of *Escherichia coli* to N-methyl-N-nitrosourea or N-ethyl-N-nitrosourea. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 344-348.
- Richter, C., Park, J.W. and Ames, B.N. (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 6465-6467.
- Ronen, A. and Glickman, B. (2001) Human DNA repair genes. *Environ. Mol. Mutagenesis*, 37, 241-283.
- Routledge, M.N. (2000) Mutations induced by nitrogen species in the *supF* forward mutation assay. *Mutat. Res.*, 450, 95-105.
- Routledge, M.N., Wink, D.A., Keefer, L.K. and Dipple, A. (1993) Mutations induced by saturated aqueous nitric oxide in the pSP189 *supF* gene in human Ad293 and E. coli MBM7070 cells. *Carcinogenesis*, 14, 1251-1254.
- Routledge, M.N., Wink, D.A., Keefer, L.K. and Dipple, A. (1994) DNA sequence changes induced by two nitric oxide donor drugs in the *supF* assay. *Chem. Res. Toxicol.*, 7, 628-632.
- Salditt, M., Braunstein, S.N., Camerini-Otero, R.D. and Franklin, R.M. (1972) Structure and synthesis of a lipid containing bacteriophage. Improved techniques for the purifications of bacteriophage PM2. *Virology*, 48, 259-262.
- Salgo, M.G., Stone, K., Squadrito, G.L., Battista, J.R. and Pryor, W.A. (1995) Peroxynitrite causes DNA nicks in plasmid pBR322. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 210, 1025-1030.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Second Edition, Band 3, 6.1-6.19.
- Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989a) *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Second Edition, Band 3, 16.13 ff.

- Sarih, M., Souvannavong, V. and Adam, A. (1993) Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 191, 503-508.
- Schmidt, H.H.H.W. (1994) NO, endogener Botenstoff und Zellgift. *Med. Mo. Pharm.*, 6, 169-185.
- Schmidt, H.H.H.W. and Walter, U. (1994) NO at work. *Cell.*, 78, 919-925.
- Schmuck, G., Lieb, G., Wild, D., Schiffmann, D. and Henschler, D. (1988) Characterization of an *in vitro* micronucleus assay with Syrian hamster embryo fibroblasts. *Mutat. Res.*, 203, 397-404.
- Schmutte, C., Rideout, W.M., Shen, J.C. and Jones, P.A. (1994) Mutagenicity of nitric oxide is not caused by deamination of cytosine or 5-methylcytosine in double-stranded DNA. *Carcinogenesis*, 15, 2899-2903.
- Schulz, I., Mahler, H.-C., Boiteux, S. and Epe, B. (2000) Oxidative damage induced by singlet oxygen and photosensitization: recognition by repair endonucleases and mutagenicity. *Mutat. Res.*, 461, 145-156.
- Shibutani, S., Takeshita, M. and Grollman, A.P. (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature (London)*, 349, 431-434.
- Sies, H. (1993) Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutation Res.*, 299, 183-191.
- Singh, S.P., Wishnok, J.S., Keshive, M., Deen, W.M. and Tannenbaum, S.R. (1996) The chemistry of the S-nitrosoglutathione/glutathione system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 14428-14433.
- Southorn, P.A. and Powis, G. (1988) Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biological reactions. *Mayo. Clin. Proc.*, 63, 381-389.
- Spencer, J.P.E., Wong, J., Jenner, A., Aruoma, O.I., Cross, C.E. and Halliwell, B. (1996) Base modifications and strand breakage in isolated calf thymus DNA from human skin epidermal keratinocytes exposed to peroxynitrite or 3-Morpholinopyridone. *Chem. Res. Toxicol.*, 9, 1152-1158.
- Suzuki, T., Ide, H., Yamada, M., Endo, N., Kanaori, K., Tajima, K., Morii, T. and Makino, K. (2000) Formation of 2'-deoxyoxanosine from 2'-deoxyguanosine and nitrous acid: mechanism and intermediate. *Nucleic Acids. Res.*, 28, 544-551.
- Suzuki, T., Yoshida, M., Yamada, M., Ide, H., Kobayashi, M., Kanaori, K., Tajima, K. and Makino, K. (1998) Misincorporation of 2'-desoxyoxanosine 5'-triphosphate by DNA polymerases and its implication for mutagenesis. *Biochemistry*, 37, 11592-11598.
- Tamir, S. and Tannenbaum, S.R. (1996) The role of nitric oxide (NO) in the carcinogenic process. *Biochem. Biophys. Acta*, 1288, F31-36.
- Tamir, S., Burney, S. and Tannenbaum, S.R. (1996a) DNA damage by nitric oxide. *Chem. Res. Toxicol.*, 9, 821-827.
- Tamir, S., Rojas-Walker, T., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R. (1996) DNA damage and genotoxicity by nitric oxide. *Meth. Enzymol.*, 269, 230-242.
- Tani, M., Shinmura, K., Kohno, T., Shiroishi, T., Wakana, S., Kim, S.-R., Nohmi, T., Kasai, H., Takenoshita, S., Nagamachi, Y. and Yokota, J. (1998) Genomic structure and chromosomal localization of the mouse *Ogg1* gene that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in DNA. *Mammalian Genome*, 9, 32-37.
- Timpon, D.J., Singleton, M.R. and Wigley, D.B. (2000) DNA ligases in the repair and replication of DNA. *Mutat. Res.*, 460, 301-318.
- Tindall, K.R. and Stankowski Jr., L.F. (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 Jr., L.F., Machanoff, R. and Hsie, A.W. (1984) Detection of deletion mutations in pSV2gpt-transformed cell. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1411-1415.

- Tindall, K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff, R. and Hsie, A.W. (1986) Analyses of mutation in pSV2gpt-transformed CHO-cells. *Mutat. Res.*, 160, 121-131.
- Tomita, H., Kai, M., Kusama, T. and Aoki, Y. (1995) Strand break formation in plasmid DNA irradiated in aqueous solution: effect of medium temperature and hydroxyl radical scavenger concentration. *J. Radiat. Res.*, 36, 46-55.
- Tucker, R.W. and Barrett, J.C. (1986) Decreased number of spindle and cytoplasmic microtubules in hamster embryo cells treated with a carcinogen diethylstilbestrol. *Cancer Res.*, 46, 3814-3821.
- Tudek, B., Laval, J. and Boiteux, S. (1992) Biological properties of imidazol ring-opened N7-methylguanine in M13mp18 phage DNA. *Nucleic Acids Res.*, 20, 3079-3084.
- Tuo, J., Liu, L., Poulsen, H.E., Weimann, A., Svendsen, O. and Loft, S. (2000) Importance of guanine nitration and hydroxylation in DNA in vitro and in vivo. *Free Radic. Biol. Med.*, 15, 147-155.
- Uppu, R.M., Cueto, R., Squadrito, G.L., Salgo, M.G. and Pryor, W.A. (1996) Competitive reactions of peroxynitrite with 2'-deoxyguanosine and 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine (8oxodG): relevance to the formation of 8-oxodG in DNA exposed to peroxynitrite. *Free Rad. Biol. Med.*, 21, 407-411.
- Uppu, R.M., Squadrito, G.L. and Pryor, W.A. (1996a) Acceleration of peroxynitrite oxidations by carbon dioxide. *Arch. Biochem. Biophys.*, 327, 335-343.
- Vamvakas, S. and Schmidt, H.H.H.W. (1997) Just say NO to cancer ? *Journal of the National Cancer Institute*, 89, 406-407.
- Vidal, A.E., Hickson, I.D., Boiteux, S. and Radicella, J.P. (2001) Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: bypass of the AP lyase activity step. *Nucleic Acids Res.*, 29, 1285-1292.
- Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 615-619.
- Werner, E.R., Werner-Felmayer, G., Wachter, H. and Mayer, B. (1995) Biosynthesis of nitric oxide: Dependence on pteridine metabolism. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 127, 97-135.
- Wijker, C.A., Wientjes, N.M. and Lafleur, M.V.M. (1998) Mutation spectrum in the *lacI* gene, induced by γ -radiation in aqueous solution under oxic conditions. *Mutat. Res.*, 403, 137-147.
- Will, O. (1995) Untersuchung zellulärer DNA-Schäden induziert durch [R]-1-[(Chloro-4-oxo-3phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl-carbonyl)-2-pyrrolidinmethanol (Ro 19-8022) in Gegenwart von Licht und deren Charakterisierung mit Hilfe von Reparaturenendonukleasen. Diplomarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Will, O., Gocke, E., Eckert, I., Schulz, I., Pflaum, M., Mahler, H.C. and Epe, B. (1999) Oxidative DNA damage and mutations induced by a polar photosensitizer, Ro 19-8022. *Mutation Research*, 435 (1), 89-101.
- Will, O., Mahler, H.-C., Arrigo, A.-P. and Epe, B. (1999) Influence of glutathione levels and heat-shock on the steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 20, 333-337.
- Wilson, K.T., Fu, S., Ramanujam, K.S. and Meltzer, S.J. (1998) Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. *Cancer Res.*, 58, 2929-2934.
- Wink, D.A. and Laval, J. (1994) The Fpg protein, a DNA repair enzyme, is inhibited by the biomediator nitric oxide in vitro and in vivo. *Carcinogenesis*, 15, 2125-2129.
- Wink, D.A., Cook, J.A., Pacelli, R., DeGraff, W., Gamson, J., Liebmann, J., Krishna, M.C. and Mitchell, J.B. (1996) The effect of various nitric oxide-donor agents on hydrogen peroxide-mediated toxicity: a direct correlation between nitric oxide formation and protection. *Arch. Biochem. Biophys.*, 231, 241-248.

- Wink, D.A., Cook, J.A., Pacelli, R., Liebmann, J., Krishna, M.C. and Mitchell, J.B. (1995) Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. *Toxicol. Lett.*, 82/83, 221-226.
- Wink, D.A., Kasprzak, K.S., Maragos, C.M., Elespuru, R.K., Misra, M., Dunams, T.M., Cebula, T.A., Koch, W.H., Andrews, A.W., Allen, J.S. and Keefer, L.K. (1991) DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science*, 254, 1001-1003.
- Wiseman, H. and Halliwell, B. (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.*, 313, 17-29.
- Wiseman, H., Kaur, H. and Halliwell, B. (1995) DNA damage and cancer: measurement and mechanism. *Cancer Lett.*, 93, 113-120.
- Wood, M.L., Dizdaroglu, M., Gajewski, E. and Essigmann, J.M. (1990) Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochemistry*, 29, 7024-7032.
- Wood, R.D., Esteve, A., Morningstar, M.L., Kuziemko, G.M. and Essigmann, J.M. (1992) Genetic effects of oxidative DNA damage: comparative mutagenesis of 7,8-dihydro-8-guanine and 7,8-dihydro-8-oxoadenine in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, 20, 6023-6032.
- Yermilov, V., Rubio, J. and Ohshima, H. (1995a) Formation of 8-nitroguanine in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Letters*, 376, 207-210.
- Yermilov, V., Rubio, J., Becchi, M., Friesen, M.D., Pignatelli, B. and Ohshima, H. (1995) Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite in vitro. *Carcinogenesis*, 16, 2045-2050.
- Yu, Z., Chen, J., Ford, B.N., Brackley, M.E. and Glickman, B.W. (1999) Human DNA repair systems: An Overview. *Environ. Mol. Mutagenesis*, 33, 3-20.
- Zhuang, J.C., Lin, C., Lin, D. and Wogan, G.N. (1998) Mutagenesis associated with nitric oxide production in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 8286-8291.
- Zhuang, J.C., Wright, T.L., de Rojas-Walker, T., Tannenbaum, S.R. and Wogan, G.N. (2000) Nitric oxide-induced mutations in the HPRT gene of human lympho-blastoid TK6 cells and in *Salmonella typhimurium*. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 39-47.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht :

Phoa, N. and Epe, B. (2001) Influence of nitric oxide on the generation and repair of oxidative DNA damage in mammalian cells. *Carcinogenesis*, in press.

Erklärung

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

Nicole Phoa

Mainz, im Januar 2002