





# Endogene DNA-Schädigung als Ursache genetischer Instabilität

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
„Doktor der Naturwissenschaften“

im Fachbereich Chemie und Pharmazie  
der Johannes-Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von  
Tina Heine  
geboren in Mainz

Mainz, 2005

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Juni 2001 bis Juni 2004 am Institut für Pharmazie des Fachbereichs Chemie und Pharmazie der Johannes Gutenberg Universität Mainz unter der Leitung von Prof. Dr. B. Epe.

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>EINLEITUNG UND STAND DER FORSCHUNG</b>	<b>5</b>
<b>2.1</b>	<b>ENDOGEN VERURSACHTE DNA-SCHÄDEN</b>	<b>5</b>
<b>2.2</b>	<b>ENDOGENE QUELLEN FÜR URACIL UND OXIDATIVE BASENMODIFIKATIONEN IN DER DNA</b>	<b>6</b>
2.2.1	SPONTANE HYDROLYTISCHE DESAMINIERUNG VON CYTOSIN	6
2.2.2	FEHLEINBAU VON dUMP WÄHREND DER REPLIKATION	7
2.2.3	ENDOGENE QUELLEN FÜR OXIDATIVE DNA-SCHÄDEN	8
2.2.3.1	Reaktive Sauerstoffspezies	8
2.2.3.2	Endogene Entstehung von ROS im Fremdstoffmetabolismus	10
2.2.3.3	Oxidative Basenmodifikationen	15
2.2.4	MUTAGENES POTENTIAL VON URACIL UND OXIDATIVEN MODIFIKATIONEN IN DER DNA	17
2.2.4.1	Mutagenes Potential von Uracil in der DNA	17
2.2.4.2	Mutagenes Potential oxidativer DNA-Modifikationen	19
<b>2.3</b>	<b>BASENEXZISIONSREPARATUR VON URACIL UND OXIDATIVEN SCHÄDEN IN DER DNA</b>	<b>20</b>
2.3.1	ERKENNUNG UND REPARATUR VON URACIL IN DER DNA DURCH UNG2 UND SMUG1	23
2.3.1.1	Uracil-DNA Glycosylase 2 (Ung2)	24
2.3.1.2	Single-strand selective monofunctional DNA-glycosylase (Smug1)	25
2.3.2	ERKENNUNG OXIDATIVER DNA-MODIFIKATIONEN DURCH OGG1	26
2.3.3	BASALE GLEICHGEWICHTSSPIEGEL VERSCHIEDENER DNA-MODIFIKATIONEN	28
<b>2.4</b>	<b>EXOGEN VERURSACHTE DNA-SCHÄDEN IN TUMORZELLEN ALS GRUNDLAGE DER HUMANEN KREBSTHERAPIE</b>	<b>29</b>
2.4.1	CHINONE ALS QUELLE REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES IN DER KREBSTHERAPIE	29
2.4.2	THYMYDLATSYNTHASEHEMMER ALS PROLIFERATIONSHEMMER VON TUMORZELLEN	31
<b>3</b>	<b>ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>37</b>
<b>4.1</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>37</b>
4.1.1	GERÄTE	37
4.1.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	39
4.1.3	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	39
4.1.4	ENZYME UND ENZYMPUFFER	42
4.1.5	MATERIALEN FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE ARBEITEN	43
4.1.6	VERWENDETE ZELLLINIEN UND VERSUCHSTIERE	44
4.1.7	HERGESTELLTE LÖSUNGEN UND PUFFER	46
4.1.7.1	Zellkultur	46
4.1.7.2	Schädigung der Zellen	47

4.1.7.3	Glutathion-Depletion	48
4.1.7.4	Glutathion-Gehalt	48
4.1.7.5	Alkalische Elution	48
4.1.7.6	Mikrokerntest	50
4.1.7.7	Puffer zur Isolierung von Primärzellen	50
4.1.7.8	Stimulation von primären Milzzellen	53
4.1.7.9	Comet Assay	53
<b>4.2</b>	<b>METHODEN</b>	<b>54</b>
4.2.1	ZELLKULTUR	54
4.2.1.1	Allgemeine Zellpflege	54
4.2.1.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	55
4.2.1.3	Isolierung von Hepatozyten	55
4.2.1.4	Isolierung von Spermatozyten	57
4.2.1.5	Isolierung von Milzzellen (zum Einsatz in der Alkalischen Elution)	58
4.2.1.6	Isolierung von Milzzellen (zur Kultivierung)	58
4.2.1.7	Generierung einer Cytochrom 2E1-überexprimierenden reparaturdefizienten Fibroblasten-Zelllinie	59
4.2.1.8	Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität	62
4.2.2	SCHÄDIGUNG DER ZELLEN FÜR DIE ALKALISCHE ELUTION	62
4.2.3	GENERIERUNG KONFLUENTER MEFS	63
4.2.4	DEPLETION VON GLUTATHION	64
4.2.5	ENZYMATISCHE QUANTIFIZIERUNG DES GLUTATHION-GEHALTES	64
4.2.6	PROLIFERATIONSTESTS	65
4.2.7	QUANTIFIZIERUNG VON MIKROKERNEN	67
4.2.8	COMET ASSAY (EINZELZELLGELELEKTROPHORESE)	68
4.2.9	ALKALISCHE ELUTION	71
4.2.10	ALKALISCHE SCHNELLELUTION ZUR DETEKTION HÖHERER DNA-SCHÄDEN	77
4.2.11	STATISTISCHE AUSWERTUNG	77
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>79</b>
<b>5.1</b>	<b>URSACHEN FÜR URACIL IN DER DNA VON VERSCHIEDENEN ZELLKULTURLINIEN UND MÄUSEN</b>	<b>79</b>
5.1.1	BASALE GLEICHGEWICHTSSPIEGEL UNG2-SENSITIVER MODIFIKATIONEN IN MAUSFIBROBLASTEN UND FRISCH ISOLIERTEN MÄUSEZELLEN	79
5.1.2	EINFLUSS DER ZELLPROLIFERATION AUF DIE BASALEN GLEICHGEWICHTSSPIEGEL UNG2-SENSITIVER DNA-MODIFIKATIONEN IN MAUSFIBROBLASTEN UND PRIMÄREN MAUSZELLEN	83
<b>5.2</b>	<b>EINFLUSS VON THYMIDYLATSYNTHASE-HEMMSTOFFEN AUF VERSCHIEDENE DNA MODIFIKATIONEN UND DIE PROLIFERATION VON UNG<sup>-/-</sup> UND UNG<sup>+/+</sup>-MAUSFIBROBLASTEN</b>	<b>86</b>

5.2.1	AUSWIRKUNGEN VON 5-FLUORURACIL UND 5-FLUORDESOXYURIDIN AUF DIE BASALEN GLEICHGEWICHTSSPIEGEL VERSCHIEDENER DNA-MODIFIKATIONEN UND DIE PROLIFERATION VON <i>UNG</i> <sup>-/-</sup> - UND <i>UNG</i> <sup>+/+</sup> -MAUSFIBROBLASTEN	86
5.2.1.1	Einfluss von TS-Hemmstoffen auf DNA-Modifikationen	87
5.2.1.2	Einfluss von TS-Hemmstoffen auf die Proliferation der Zellen	88
<b>5.3</b>	<b>EINFLUSS VON ENZYMEN DES OXIDATIVEN FREMDSTOFF-METABOLISMUS AUF DIE BASALEN GLEICHGEWICHTSSPIEGEL FPG-SENSITIVER DNA-MODIFIKATIONEN IN V79-HAMSTER-LUNGEN-FIBROBLASTEN UND REPARATURDEFIZIENTEN MEFs</b>	<b>91</b>
5.3.1	EINFLUSS EINER CYTOCHROM 2E1-ÜBEREXPRESSION AUF DIE BASALEN GLEICHGEWICHTSSPIEGEL FPG-SENSITIVER DNA-MODIFIKATIONEN IN V79-ZELLEN UND MEF( <i>CSB</i> <sup>-/-</sup> / <i>OGGI</i> <sup>-/-</sup> )CYP2E1-ZELLEN	91
5.3.2	EINFLUSS DES INTRAZELLULÄREN GLUTATHIONSPIEGELS AUF DIE INDUZIERBARKEIT OXIDATIVER DNA-SCHÄDEN DURCH ETHANOL	94
5.3.3	EINFLUSS EINER ÜBEREXPRESSION DER HUMANEN CYTOCHROMREDUKTASE IN V79-ZELLEN AUF DIE BASALEN GLEICHGEWICHTS-SPIEGEL FPG-SENSITIVER DNA-MODIFIKATIONEN UND AUF DIE SUSZEPTIBILITÄT GEGENÜBER EINER SCHÄDIGUNG MIT DUROCHINON	97
5.3.3.1	Einfluss einer Überexpression der humanen Cytochromreduktase in V79-Zellen auf die basalen Gleichgewichtsspiegel Fpg-sensitiver DNA Modifikationen	97
5.3.3.2	Einfluss einer Durochinon-Inkubation auf die basalen Gleichgewichtsspiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen in V79-Zellen	99
5.3.4	UNTERSUCHUNG DER PROLIFERATIONSHEMMUNG DURCH DUROCHINON BEI GLUTATHION-DEPLETIERTEN V79- UND V79-HOR-ZELLEN	102
5.3.5	SUSZEPTIBILITÄT VON V79- UND V79-HOR-ZELLEN GEGENÜBER DER INDUKTION VON MIKROKERNEN NACH GLUTATHION-DEPLETION	103
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>105</b>
<b>6.1</b>	<b>URACIL AKKUMULIERT IM GENOM VON <i>UNG</i>-KNOCKOUT-ZELLEN UND GEWEBEN</b>	<b>105</b>
<b>6.2</b>	<b>DIE HAUPTQUELLE FÜR URACIL IN DER DNA IST DER FEHLEINBAU VON dUMP WÄHREND DER REPLIKATION UND NICHT DIE CYTOSINDESAMINIERUNG</b>	<b>107</b>
<b>6.3</b>	<b>FÜR DIE ZYTOTOXIZITÄT VON FLUORPYRIMIDINEN SIND WEDER URACILEINBAU NOCH DESSEN REPARATUR NOTWENDIG</b>	<b>109</b>
<b>6.4</b>	<b>DIE ÜBEREXPRESSION VON ENZYMEN DES FREMDSTOFF-METABOLISMUS KANN IN SÄUGERZELLEN ZU GENETISCHER INSTABILITÄT FÜHREN</b>	<b>111</b>
<b>6.5</b>	<b>ENDOGENE ENZYME VERURSACHEN ÜBER REDOXCYCLING VON CHINONEN OXIDATIVE DNA-SCHÄDEN</b>	<b>114</b>
<b>6.6</b>	<b>GLUTATHION ALS SCHUTZMOLEKÜL FÜR ENDOGEN UND EXOGEN VERURSACHTE DNA-SCHÄDEN</b>	<b>115</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>119</b>





# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Krebs geht nach heutigem Verständnis auf Mutationen in somatischen Zellen zurück, für deren Entstehung sowohl endogene wie exogene Einflüsse verantwortlich gemacht werden. Zu den exogenen Einflüssen gehören Mutagene wie z.B. Benzo[*a*]pyren im Zigarettenrauch. Im Unterschied zu den exogenen Mutagenen, die der Mensch durch seinen Lebensstil beeinflussen kann, sind die endogenen Faktoren meist wenig modulierbar. Uracil in der DNA ist ein solcher endogener Risikofaktor, der als DNA-Modifikation bei einer Zellteilung zu einer Mutation manifestiert werden kann. Neben Uracil stellt die durch endogene reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) verursachte oxidative Modifizierung von DNA-Basen eine weitere mögliche Gefahr für die Integrität des Genoms dar. Oxidative Basenmodifikationen sowie Uracil in der DNA besitzen also ein prämutagenes Potential und können daher mit Krebs als auch mit verschiedenen degenerativen Krankheiten und Alterungsprozessen in Zusammenhang gebracht werden. Diese Arbeit beschreibt Untersuchungen über die zellulären Mechanismen, die zur Bildung dieser DNA-Schäden führen, sowie über die biologischen Auswirkungen dieser Schäden. Die Charakterisierung und Quantifizierung der DNA-Modifikationen wurden an Maus-Embryofibroblasten (MEFs), frisch isolierten Zellen verschiedener Mausegewebe und Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters (V79-Zellen) mit Hilfe einer modifizierten Alkalischen Elutionstechnik unter Verwendung spezifischer DNA-Reparaturglykosylasen durchgeführt.

Die Untersuchungen zu Uracil in der DNA wurden in *ung-knockout*-MEFs und -Mäusen durchgeführt, die es erlauben, die Konsequenzen eines Ausfalls der wichtigsten Reparaturglykosylase für Uracil festzustellen. Die Ergebnisse zeigen eine deutliche Akkumulation von Uracil in den *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten im Vergleich zum Wildtyp. In frisch isolierten Leber- und Milzzellen der Mäuse konnte dieser genotypspezifische Unterschied, wenn auch weniger ausgeprägt, ebenso beobachtet werden, nicht jedoch in reifen Spermien. Dieser gewebespezifische Unterschied und die quantitativ stärker ausgeprägte Akkumulation in *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten im Vergleich zu den Mäusegeweben gab Anlass zur Vermutung, dass die Proliferation der Zellen für den Haupteintrag an Uracil in die DNA verantwortlich ist. Erstmals konnte in Versuche mit konfluenten (nicht mehr proliferierenden) *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten gezeigt werden, dass nicht die spontane hydrolytische Desaminierung von Cytosin, sondern der Fehleinbau von dUMP während der DNA-Replikation die Hauptquelle für Uracil in der DNA von Säugerzellen darstellt.

Da der Uracilmetabolismus ein wichtiges Target in der Chemotherapie ist, lag es nahe, das zur Verfügung stehende *ung-knockout*-Modell der MEFs zur Untersuchung mit Fluorpyrimidinen, die als Zytostatika verwendet werden, einzusetzen. Da bisher

die Ursachen der beobachteten Apoptose der Tumorzellen und aller anderen metabolisch hochaktiven Zellen eines behandelten Organismus noch nicht vollständig verstanden ist, wurden diese Zellen mit verschiedenen Fluorpyrimidinen behandelt, die als Thymidylatsynthasehemmer die *de novo* Synthese von Thymidin unterbinden. Es konnte gezeigt werden, dass *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten, im Gegensatz zu *ung*<sup>+/+</sup>-Mausfibroblasten, verstärkt Uracil in der DNA akkumulieren. Obwohl die *ung*<sup>+/+</sup>-Mausfibroblasten keine erhöhten Uracil-Spiegel in der DNA aufwiesen, zeigten sie bei Inkubation mit einem der beiden Thymidylatsynthasehemmern, nämlich 5-Fluoruracil (5-FU), die gleiche Proliferationshemmung wie die *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten. Dies lässt darauf schließen, dass weder Reparatur noch Einbau von Uracil in die DNA für die beobachtete Toxizität dieser Zytostatika notwendig sind.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung des DNA-schädigenden Potenzials endogener ROS, die aus dem Fremdstoffmetabolismus stammen. Dazu wurden V79-Zellen verwendet, die mit dem humanen Enzym Cytochrom 2E1 (CYP2E1) transfiziert wurden (V79-CYP2E1) sowie Zellen, die ebenfalls durch Transfektion das humane Enzym Cytochromreduktase (auch Oxidoreduktase genannt) überexprimieren (V79-hOR). Beide Enzyme sind zusammen an der Hydroxylierung von Fremdstoffen beteiligt, bei der die Reduktion von molekularem Sauerstoff durch Übertragung von zwei Elektronen notwendig ist. Wird anstatt zweier Elektronen in Folge nur eines auf den Sauerstoff übertragen, so führt dieser von der Substratoxygenierung entkoppelte Vorgang zur Bildung von Superoxid. Daher galt es zu klären, ob das so erzeugte Superoxid und daraus gebildete ROS in der Lage sind, die DNA zu schädigen. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von CYP2E1 nicht zu einem erhöhten basalen Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Schäden führt und die Metabolisierung von Ethanol durch dieses Enzym ebenfalls keine DNA-Modifikationen verursacht. Die Überexpression der Cytochromreduktase hingegen führte gegenüber dem Wildtyp zu einem erhöhten basalen Gleichgewichtsspiegel oxidativer Basenmodifikationen nach Depletion von Glutathion, einem wichtigen zellulären Antioxidans. Im Mikrokerneltest, der genotoxische Ereignisse wie Chromosomenbrüche in Zellen aufzeigt, zeigte sich schon ohne Glutathion-Depletion eine doppelt so hohe Mikrokernrate im Vergleich zum Wildtyp. In weiteren Versuchen wurden die V79-hOR-Zellen mit dem chinoiden Redoxcycler Durochinon inkubiert, um zu untersuchen, ob das vermutlich durch die Reduktase vermittelte Redoxcycling über Generierung von ROS in der Lage ist, einen oxidativen DNA-Schaden und Toxizität zu verursachen. Hier zeigte sich, dass die Überexpression der Reduktase Voraussetzung für die Toxizität des Chinons und den beobachteten DNA-Schaden ist. Die Wildtyp-Zellen zeigten weder einen DNA-Schaden noch Zytotoxizität, auch eine zusätzliche Glutathion-Depletion änderte nichts an dem Befund. Die V79-hOR-Zellen hingegen reagierten auf die Inkubation mit Durochinon mit einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Einzelstrangbrü-

che und oxidativen Basenmodifikationen, wobei sich der DNA-Schaden durch vorherige Glutathion-Depletion verdoppeln ließ.

Ein interessanter Nebenbefund der Untersuchungen der oxidativen DNA-Schäden war, dass der natürliche Glutathiongehalt der Zelle in der Lage ist, die Auswirkungen endogen erzeugter ROS auf das Genom stark abzuschwächen. So zeigte sich nach GSH-Depletion eine verdoppelte basale Mikrokernrate in V79-hOR-Zellen. Die Inkubation GSH-depletierter V79hOR-Zellen mit Durochinon führte ebenfalls zu einer Verdopplung des oxidativen DNA-Schadens gegenüber V79-hOR-Zellen mit physiologischem GSH-Gehalt.



## 2 EINLEITUNG UND STAND DER FORSCHUNG

### 2.1 Endogen verursachte DNA-Schäden

Krebs ist die zweithäufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-erkrankungen. Es ist bekannt, dass Umweltfaktoren und der individuelle Lebensstil die wichtigsten Parameter der Krebsentstehung darstellen. Der Einfluss einer genetischen Prädisposition ist zwar gut belegt, insgesamt aber wohl weniger bedeutend (Lichtenstein et al., 2000; Risch, 2001). Viele der kanzerogenen Noxen aus der Umwelt sind bereits identifiziert (Zigarettenrauch, Sonnenlicht, Toxine von Mikroorganismen, Asbest...) was bei vielen Menschen zu einer Meidung dieser Stoffe im Sinne einer gesunden Lebensführung führt. Die Konzentrationen und das mutagene Potential der Karzinogene, denen wir in unserer Umwelt ausgesetzt sind, können allerdings nur schwer die hohe Inzidenz der sporadischen Krebserkrankungen, die in der Bevölkerung auftreten, erklären (Ames and Gold, 2000; Gold et al., 1992). Man muss daher annehmen, dass auch endogene Faktoren im Organismus ein Krebsrisiko darstellen. Diese endogenen Mutagene sind möglicherweise teilweise ebenfalls vom Lebensstil abhängig.

Zu den unbeeinflussbaren endogenen Ursachen von DNA-Schäden gehören Replikationsfehler und die spontane Hydrolyse von DNA. Einer dieser Prozesse ist die spontane hydrolytische Desaminierung von Cytosin, die zu Mutationen führt, wenn das entstehende Uracil nicht vor der nächsten Replikation aus der DNA entfernt wird. Des Weiteren kann ein Basenfehleinsbau während der Replikation der DNA zu einer fehlerhaften Information in der DNA der resultierenden Tochterzelle werden. Polymerasen suchen die einzubauenden Nukleotide nach deren Fähigkeit aus, mit der Matrize ein Basenpaar zu bilden. Da Uridin und Thymidin gleichermaßen mit Adenin paaren, kann Uridin anstelle von Thymidin eingebaut werden. Uracil in der DNA ist daher ein Beispiel für einen nicht beeinflussbaren endogen verursachten DNA-Schaden.

Ebenfalls endogen, aber möglicherweise dennoch durch den Lebensstil beeinflussbar, ist die DNA-Schädigung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Diese entstehen als Nebenprodukt des oxidativen Metabolismus und können die Basen der DNA an ihren elektrophilen Kohlenstoffzentren oxidieren. Oxidative Angriffe auf das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA führen zu Einzelstrangbrüchen, die ebenfalls ein, wenn auch geringes, mutagenes Potential besitzen. Zwar können ROS intrazellulär durch Antioxidantien abgefangen werden, ob eine antioxidantienreiche Ernährung aber zu einem, im Sinne einer Radikalfängertheorie verringerten

Krebsrisiko beim Menschen führt, wird kontrovers diskutiert, da verschiedene Interventionsstudien unterschiedliche Ergebnisse brachten. Dennoch sind ROS –im Unterschied zu Uracil in der DNA- als potentiell beeinflussbare endogene Ursache oxidativer DNA-Schäden zu betrachten.

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen hatten zum Ziel, die Bedeutung der beiden genannten endogenen DNA-Schädigungen für die Kanzerogenese besser zu verstehen.

Im folgenden Kapitel sollen nun die endogenen Ursachen für Uracil und oxidative Basenmodifikationen in der DNA erläutert werden.

## **2.2 Endogene Quellen für Uracil und oxidative Basenmodifikationen in der DNA**

Es gibt zwei unterschiedliche Ursachen für Uracil in der DNA. Zum einen kann Cytosin hydrolytisch desaminiert werden und zum anderen kann dUMP während der Replikation der DNA in den neu synthetisierten Tochterstrang eingebaut werden. Im Folgenden sollen beide Wege des Uracileintrags in die DNA erläutert werden.

### **2.2.1 Spontane hydrolytische Desaminierung von Cytosin**

Uracil ist als Base eigentlich nur in der RNA vorgesehen. In der DNA übernimmt Thymin dessen Platz, da die Paarungseigenschaften der beiden Basen nahezu identisch sind. Warum aber wird dieser Unterschied zwischen den beiden Trägern der Erbinformation gemacht? Der Grund dafür wurde ersichtlich, als man entdeckte, dass Cytosin sowohl spontan in der wässrigen Umgebung als auch in der Reaktion mit Nitriten sehr leicht zu Uracil desaminiert werden kann. Wäre Uracil ein normaler Bestandteil der DNA, würde die Desaminierung von Cytosin zu einer hohen Mutationsrate führen, da die Zelle keinerlei Anhaltspunkte dafür hätte, ob das resultierende falsch gepaarte G-U-Paar ursprünglich ein G-C oder ein A-U war. Da jedoch nur Thymin in der DNA vorkommt, muss es sich bei nahezu jedem Uracil um ein desaminiertes Cytosin handeln (Voet, 1994).

Abbildung 1 zeigt die Bildung von Uracil durch Desaminierung von Cytosin.



### 2.2.3 Endogene Quellen für oxidative DNA-Schäden

Oxidative DNA-Modifikationen entstehen aus der Reaktion von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) mit den verschiedenen Bestandteilen der DNA. Da die oxidativen Basenmodifikationen unter diesen Schäden über ein großes mutagenes Potenzial verfügen, wird darauf in den nächsten Kapiteln besonders eingegangen. Zunächst jedoch werden Entstehung und Eigenschaften der ROS erläutert.

#### 2.2.3.1 Reaktive Sauerstoffspezies

In jeder Zelle eines aeroben Organismus werden reaktive Sauerstoffspezies gebildet. Sie entstehen durch Reduktion von molekularem Sauerstoff, dabei kann die Reduktion in Ein- oder Zweielektronenschritten erfolgen. Einige endogene Quellen der ROS sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Endogene ROS-Quellen
Mitochondriale Atmungskette
Purinabau (Hypoxanthin→Xanthin→Harnsäure)
Autoxidation von Oxy-Hämoglobin, Thiolen und anderen reduzierten Verbindungen
Xenobiotika-Metabolismus über das Cytochrom-P-450-System
Neutrophile Granulozyten (NADPH-Oxidase und Myeloperoxidase)
Arachidonsäuremetabolismus

Tabelle 1: Quantitativ bedeutsame Quellen für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Markant et al., 1995).

Als Beispiel zur endogenen Generierung von ROS als Nebenprodukt physiologisch notwendiger Vorgänge sei die mitochondriale Atmungskette genannt, die der Gewinnung von energiereichem ATP dient. Dabei entstehen durch zwei Einelektronenübergänge in Folge auf molekularem Sauerstoff drei verschiedene ROS (Superoxidradikalanion (a), Wasserstoffperoxid (b) und das Hydroxylradikal (c)) (siehe Abbildung 3).

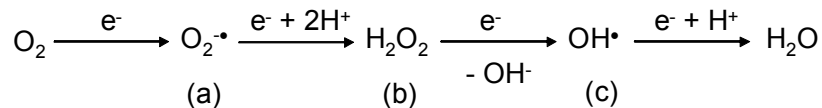


Abbildung 3: Sequentielle Reduktion von molekularem Sauerstoff.

Zu den ROS gehören verschiedene Sauerstoffspezies, radikalische sowie nicht radikalische Formen. Sauerstoffhaltige Radikale ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{OH}^{\cdot}$ ,  $\text{HO}_2^{\cdot}$ ,  $\text{NO}^{\cdot}$ ,  $\text{RO}^{\cdot}$  und



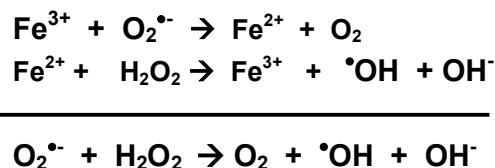
ROO<sup>•</sup>) enthalten ein oder mehrere ungepaarte Elektronen und reagieren mit ihresgleichen oder mit nicht-radikalischen Molekülen. Nicht radikalische ROS (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, Singulett-Sauerstoff und HOCl) können leicht in Radikale überführt werden.

Die ROS unterscheiden sich stark bezüglich ihrer Reaktivität und Lebensdauer; zwei Faktoren, die für ihre Gefährlichkeit in Bezug auf die Integrität des Genoms entscheidend sind. Das Superoxidradikalanion (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), gebildet in der mitochondrialen Atmungskette bei der Übertragung von nur einem Elektron auf Sauerstoff, zeigt zwar begrenzte Reaktivität, wird aber durch Superoxiddismutase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgewandelt. In Gegenwart von Übergangsmetallen wie Eisen oder Kupfer wird dieses zu Hydroxylradikalen reduziert (Fentonreaktion). Die Reaktivität des Hydroxylradikals ist so groß, dass es nur Wegstrecken vom ein- bis zweifachen des eigenen Moleküldurchmessers zurücklegt, bevor es mit zellulären Komponenten abreagiert. Um also die DNA schädigen zu können, muss es in unmittelbarer Nähe zur DNA gebildet werden, um mit dieser reagieren zu können. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kann als latenter und diffusionsfähiger Vorläufer des OH-Radikals verstanden werden, welches in der Fentonreaktion in unmittelbarer Nähe zur DNA in OH-Radikale umgewandelt werden kann, welche dann die DNA schädigen können.



Gleichung 1: *Fentonreaktion: Bildung von OH-Radikalen aus Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Eisenionen.*

Wie in Tabelle 1 aufgeführt, bilden alle Entzündungsvorgänge im Körper ebenfalls potente endogene Quellen von ROS. Neutrophile produzieren im so genannten „respiratory burst“ Superoxidradikale und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welche in der durch Übergangsmetalle katalysierten Haber-Weiß-Reaktion zum Hydroxylradikal reagieren können:



Gleichung 2: *Haber-Weiß-Reaktion: Bildung von OH-Radikalen aus Wasserstoffperoxid und Superoxid unter Katalyse von Eisenionen.*

Der Körper selbst verfügt über eine antioxidative Abwehr zum Abfangen von reaktiven Sauerstoffspezies. Zu diesem Abwehrsystem zählen auch Glutathion und Enzyme wie Superoxiddismutase, Katalase und Glutathion-Peroxidase (Sies, 1989). Die beiden letzteren sind für die Reduktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu Wasser verantwortlich. Glutathion-Peroxidase benötigt als Cofaktor Glutathion (GSH) welches im Verlauf der Reaktion oxidiert (GSSG) wird. Die Regeneration von GSSG übernimmt die

Glutathionreduktase. Glutathion stellt somit eine wichtige intrazelluläre Abwehrmaßnahme gegen ROS dar. Weitere protektiv wirkende Substanzen werden offenbar mit der Nahrung aufgenommen. Unter diesen Antioxidantien sind die Vitamine C und E, sowie die Gruppe der Carotinoide, einige Mineralstoffe (Zink, Selen, Mangan) und polyphenolische Substanzen wie Flavonoide. Nach Gabe von Vitamin C konnte ein Absinken der Anzahl oxidativer DNA-Modifikationen *in vivo* beobachtet werden (Carr, 1999; Collins, 1999; Halliwell, 2001). Die Schutzwirkung mancher zusätzlich aufgenommener Antioxidantien ist allerdings noch umstritten. Einige epidemiologische Studien zeigen sogar eine Tumor-fördernde Wirkung von  $\beta$ -Carotin bei Rauchern (Diplock, 2000). Bildung und Beseitigung der ROS bilden in gesunden Zellen ein Gleichgewicht. Erst wenn vermehrt Radikale gebildet oder deren Entfernung nicht mehr funktioniert, spricht man von oxidativem Stress (Aruoma and Halliwell, 1998; Halliwell, 1994).

In dieser Arbeit wurde der Beitrag der ROS, die durch den Fremdstoffmetabolismus gebildet werden (siehe Tabelle 1), zum oxidativen Gleichgewichtsschaden von Zellen untersucht. Daher soll im folgenden Kapitel die endogene Bildung von ROS durch zwei Enzyme des Fremdstoffmetabolismus näher beleuchtet werden.

#### 2.2.3.2 *Endogene Entstehung von ROS im Fremdstoffmetabolismus*

Das Cytochrom P450-System hat zur Aufgabe, Fremdstoffe aller Art im Organismus zu oxidieren und somit harngängig oder für weitere Reaktionen (Konjugationen mit Glukuronsäure, Sulfatierung) zugänglich zu machen. Es besteht aus den Komponenten Cytochrom P450 und NADPH-Cytochrom P450-Reduktase (Cytochromreduktase, Reduktase), die in die Membran des glatten endoplasmatischen Retikulums (ER), des Zellkerns und der Mitochondrien eingebettet sind. Die Cytochromreduktase gehört zu den Flavoproteinen und enthält als prosthetische Gruppe ein Flavin-Adenin-Dinukleotid und ein Flavin-Mononukleotid. Sie überträgt die beiden Elektronen des NADPH in zwei Einelektronenschritten auf das Cytochrom P450. Im endoplasmatischen Retikulum kann in die Elektronentransportkette von Reduktase und Cytochrom P450 noch Cytochrom  $b_5$  eingeschaltet sein. Das Cytochrom P450 überträgt die beiden Elektronen der Reduktase ebenfalls in zwei Einelektronenschritten auf den zu metabolisierenden Fremdstoff unter zur Hilfenahme zweier Protonen, wodurch der Fremdstoff monooxygeniert wird, d.h. ein Sauerstoffatom wird auf den Fremdstoff übertragen, das andere zu Wasser reduziert.

Wenn diese Einelektronenschritte ein Leck (*uncoupling*) in der Transportkette aufweisen, können durch diese beiden Enzyme ROS als Nebenprodukte des Fremdstoffmetabolismus generiert werden.

In dieser Arbeit wurde der Beitrag von Cytochromreduktase und des Isoenzym Cytochrom 2E1 zur DNA-Schädigung durch ROS untersucht. Daher sollen die

fremdstoffmetabolisierenden Reaktionen beider Enzyme im Folgenden näher dargestellt werden. Das *uncoupling* des Elektronentransfers zwischen Reduktase und Cytochrom wird am Ende dieses Kapitels erläutert.

### **Cytochrom 2E1**

Das Cytochrom P450 Monooxygenasesystem unterscheidet sich von den Enzymen des Intermediärstoffwechsels durch seine langsame Umsatzrate und seine geringe Substratspezifität. Letztere ist vorteilhaft für den Organismus, der damit fast alle Fremdstoffe metabolisieren und für die Ausscheidung vorbereiten kann. Inzwischen ist geklärt, woher diese Unspezifität kommt: In den Membranen des ER liegt nicht nur eine Form des Cytochrom P450 vor, sondern es existiert eine ganze Familie von Isoenzymen, die sich in ihrer Substratspezifität durchaus unterscheiden, zusammen aber einen breiten Bereich zur Fremdstoffmonooxygenierung abdecken. Eines dieser Isoenzyme ist das Cytochrom P450-2E1 (CYP2E1). Es metabolisiert viele Xenobiotika kleineren Molekulargewichts (Molekulargewicht <100), darunter industrielle Lösungsmittel (z.B. Chloroform), halogenierte Narkosemittel (z.B. Halothan, Isofluran), weitere Arzneistoffe (z. B. Acetaminophen) und Alkohole (z.B. Ethanol).

Ethanol kann somit über drei verschiedenen Wege metabolisiert werden: Alkohol Dehydrogenase (ADH), peroxysomale Katalase und CYP2E1 (früher *microsomal ethanol oxidising system*, MEOS). Den größten Teil der Ethanolmetabolisierung übernimmt dabei die ADH. Jedoch bei Alkoholmißbrauch über lange Zeit oder akut hohen Dosen übernimmt CYP2E1 die Metabolisierung von bis zu 10 % des Genußalkohols. Bei Alkoholikern findet sich eine Induktion dieses Enzyms um den Faktor 2-5. Aus diesem Grund sind Arzneimittelinteraktionen möglich: Arzneistoffe werden z.B. schneller metabolisiert, weil durch Ethanolkonsum eine Stabilisierung von CYP2E1 stattfindet (sog. Substratstabilisierung). Lange Zeit war unklar, wie CYP2E1 induziert wird. Bei vielen Cytochromen (CYP1A1, CYP2B6, CYP3A4) ist bekannt, dass sie über eine Rezeptor-vermittelte transkriptionale Aktivierung induziert werden. Für CYP2E1 wird dies ausgeschlossen und eine post-transkriptionale und post-translationale Regulation angenommen (Koop, 1990): So werden das Enzym und seine mRNA durch Substrate stabilisiert, d.h. Protease-vermittelte und eine durch Hitzeschockproteine eingeleitete Degradierung wird verzögert, wobei sich durch gleich bleibende Transkriptions- und Translationsraten der Gehalt an CYP2E1-mRNA und Protein in der Zelle erhöht (Goasduff and Cederbaum, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Ethanol-metabolisierendem CYP2E1 auf das Ausmaß oxidativer DNA-Schäden untersucht. Abbildung 4 zeigt die vollständige Oxidation des Ethanols durch drei verschiedene Enzymsysteme.

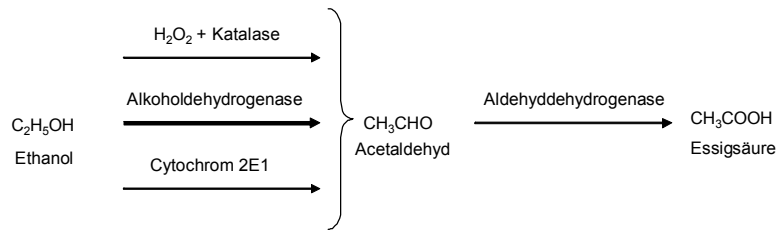


Abbildung 4: Oxidation von Ethanol zu Essigsäure.

Das aktive Zentrum aller Cytochrome enthält als prosthetische Gruppe ein Häm B mit einem komplexgebundenen Eisen-Ion, wie es auch im Hämoglobin der Erythrozyten vorliegt. Dieses Eisen-Ion überträgt den Sauerstoff auf das Substrat. Es wird angenommen, dass die eigentliche Sauerstoffübertragung über das Feroxyl-Ion  $[Fe-O]^{3+}$  verläuft. Es werden daher radikalische Zwischenstufen vermutet (siehe Abbildung 5).

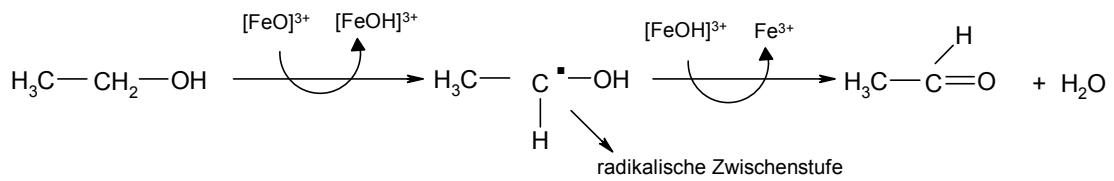
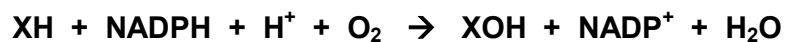


Abbildung 5: Reaktionen des Feroxyl-Ions mit Ethanol als Substrat.

Die beiden in Abbildung 5 gezeigten Einelektronenübergänge auf das zu oxidierende Substrat (hier Ethanol) können aber auch vom Substratumsatz entkoppelt werden (*uncoupling*), was zur Generierung von ROS ohne Substratoxidation führt. Diese Reaktion benötigt beide Komponenten des Cytochrom P450-Systems, weshalb zunächst die Aufgabe der Cytochromreduktase und dann das *uncoupling* erläutert werden sollen.

### Cytochromreduktase

Die Cytochromreduktase hat zur Aufgabe, Reduktionsäquivalente ( $NADPH + H^+$ ) auf oxidierte Cytochrome zu übertragen, damit diese nach Reduktion wieder für einen Oxidationsschritt zur Verfügung stehen. Daher lautet die Bruttogleichung der Oxidation eines Fremdstoffs (XH):



Gleichung 3: Bruttogleichung der Oxidation eines Fremdstoffes durch das Cytochrom P450-System

Um diesen Elektronenfluss in Form von Reduktionsäquivalenten zu gewährleisten, müssen sich Cytochrom und Reduktase in unmittelbarer Nachbarschaft befinden. Aus diesem Grund ist die Cytochromreduktase wie die Cytochrom P450-Isoenzyme auf dem glatten endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert. Dabei sind beide Bestandteile des Cytochromsystems so angeordnet, dass ein Molekül Reduktase für die Reduktion von 10 bis 20 Cytochrommolekülen zuständig ist. Die Reduktase ist dabei mit einem lipophilen Anker in der Membran des ER fest verankert, um sie herum gruppieren sich die Cytochrome. Abbildung 6 zeigt einen Querschnitt durch die Membran des ER mit den kreisförmig um die Reduktase gruppierten Cytochromen.

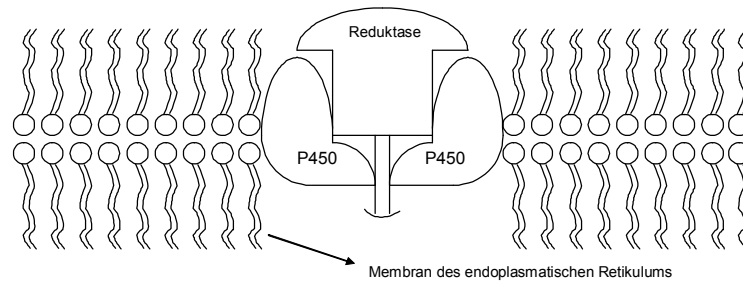


Abbildung 6: Querschnitt durch die Membran des endoplasmatischen Retikulums mit kreisförmig um ein Molekül Reduktase angeordneten Cytochromen.

Da alle Cytochrome nur Einelektronenakzeptoren sind, kann die Reduktase, die zur vollständigen Substratoxidation nötigen Elektronen nur nacheinander auf das Cytochrom übertragen. In einigen Geweben findet sich außerdem noch Cytochrom  $b_5$  als Elektronentransferprotein für das erste und/oder zweite Elektron. Für die Aktivität von Cytochrom 2E1 hat es aber keine zwingende Notwendigkeit (Schenkman and Jansson, 2003).

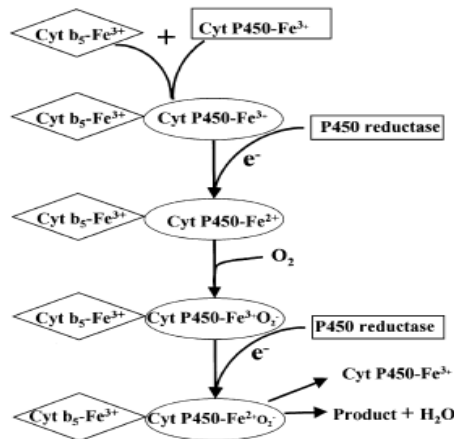
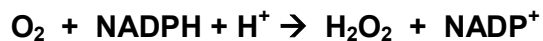


Abbildung 7: Elektronentransfer von der Cytochromreduktase auf ein beliebiges Cytochrom-P450 zur Reduktion molekularen Sauerstoffs und anschließender Substratmonooxygenierung.



Radikale gebildet werden. Die Bruttogleichung einer Bildung von Wasserstoffperoxid bei Entkopplung der Reduktase sieht also folgendermaßen aus:



*Gleichung 4: Bildung von Wasserstoffperoxid bei Entkopplung der Cytochromreduktase.*

Diese im entkoppelten Fremdstoffmetabolismus gebildeten ROS können die Zelle auf unterschiedliche Weise schädigen. Lipidperoxidation, Proteinoxidation und oxidative DNA-Modifikationen sind dabei die biologischen Konsequenzen. Bei der Proteinoxidation werden durch Angriff von ROS die Struktur und damit möglicherweise die Enzymaktivität der Proteine zerstört (Andrae, 2003; Klotz et al., 2003). Unter Lipidperoxidation versteht man die radikalische Oxidation ungesättigter Fettsäuren, die zu reaktiven Metaboliten führt (z.B. Malondialdehyd und Radikale), welche entweder die Phospholipide der Zellmembran angreifen, was zum Untergang der Zelle führen kann, oder die DNA schädigen, was zu DNA-Modifikationen führt. Der direkte Angriff der ROS an der DNA führt zu oxidativen DNA-Modifikationen, worunter die oxidativen Basenmodifikationen die bedeutsamsten sind. Deren Strukturen und Entstehung sollen im folgenden Kapitel erläutert werden.

### 2.2.3.3 Oxidative Basenmodifikationen

Die soeben vorgestellten reaktiven Sauerstoffspezies können die DNA auf unterschiedliche Art und Weise schädigen. Mehr als 100 verschiedene Modifikationen sind bisher identifiziert (von Sonntag, 1987; Dizdaroglu, 1992). Dabei können die DNA-Basen oxidiert oder das Zucker-Phosphatrückgrat geschädigt werden. Zu den verschiedenen Modifikationen der DNA gehören DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche, alkalilabile Läsionen und basenfreie Stellen (apurinische/apyrimidinische Läsionen, AP-Läsionen) und oxidierte Basen. AP-Läsionen, Einzel- und Doppelstrangbrüche entstehen durch Wasserstoffabstraktion an den Desoxyribose-Enden über die Bildung von instabilen Zuckerradikalen. Oxidierte AP-Läsionen entstehen durch einen radikalischen Angriff an Position 1,2 oder 4 des Zuckers (Epe, 1995). Abbildung 9 zeigt einige durch reaktive Sauerstoffspezies induzierte DNA-Modifikationen.

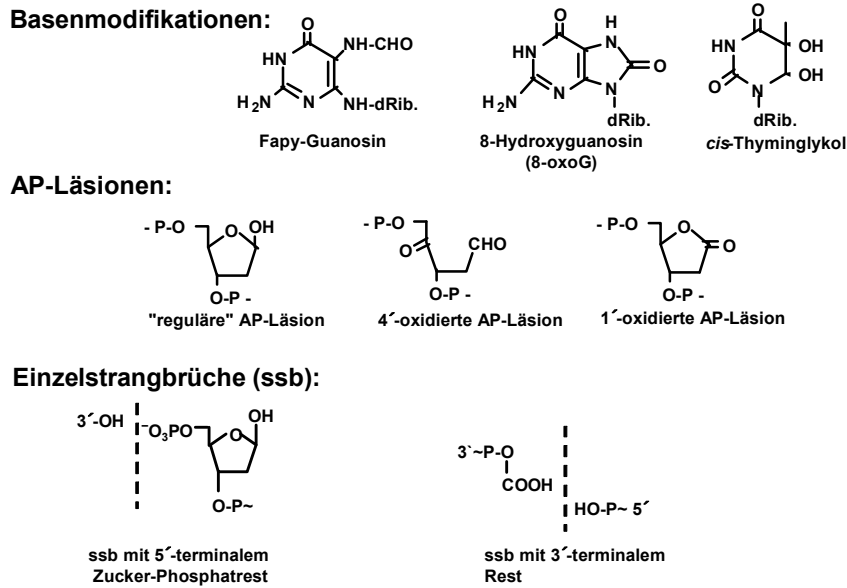


Abbildung 9: Struktur einiger DNA-Modifikationen, die durch ROS induziert werden.

Da unter den DNA-Modifikationen die oxidativen Basenmodifikationen über ein hohes mutagenes Potenzial (siehe Kapitel 2.2.4.2) verfügen, sollen diese im Folgenden ausführlicher erläutert werden.

Die am häufigsten beobachtete oxidative Basenmodifikation ist eine Veränderung des Guanins durch reaktive Sauerstoffspezies. Guanin besitzt im Vergleich zu allen anderen Basen das niedrigste Oxidationspotential (Hüttermann, 1982); es unterliegt also am leichtesten einer Oxidation. Am häufigsten findet sich das 7,8-Dihydroxy-8-oxo-guanin (8-Hydroxyguanin, 8-oxoG), welches durch Addition eines OH-Radikals an das C8-Atom des Guanins gebildet wird (Epe, 1995; Loft, 1996). Alternativ kann aus dem primär gebildeten Radikal durch Öffnung des Imidazolringes (durch Reduktion) 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FAPY-Guanin) entstehen (Asagoshi et al., 2000; Cadet et al., 2000).

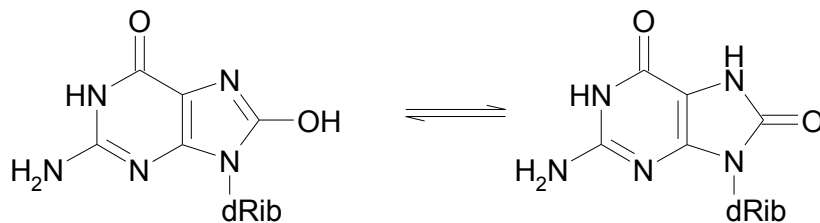


Abbildung 10: Keto- Enolgleichgewicht von 8-Hydroxyguanin.



Jede Säugerzelle besitzt einen basalen Gleichgewichtsspiegel an oxidativen DNA-Modifikationen, der variabel zu sein scheint, wobei die absoluten Werte umstritten sind, da unterschiedliche Methoden zu deren Bestimmung bisher stark abweichende Ergebnisse lieferten (Collins, 1997). Basale Gleichgewichtsspiegel von 8-oxoG, gemessen in humanen Lymphozyten schwanken je nach Analysenmethode um mehrere Größenordnungen (Epe, 2002). Eine der möglichen Analysenmethoden für 8-oxoG ist die Alkalische Elution, die in Kapitel 4.2.9 vorgestellt wird.

#### **2.2.4 Mutagenes Potential von Uracil und oxidativen Modifikationen in der DNA**

In den voran gegangenen Kapiteln wurden endogene Ursachen für den Eintrag von Uracil und oxidative Schäden in die DNA vorgestellt. Diese DNA-Veränderungen können grundsätzlich drei verschiedene Auswirkungen haben. Einerseits kann der DNA-Schaden durch DNA-Reparatur vollständig und fehlerfrei entfernt werden, was die Integrität der DNA aufrechterhält. Wird der Fehler aber nicht erkannt, kann dieser bei der nächsten Replikation der DNA zu einer Mutation führen. Eine Mutation kann unter Annahme des Mehrstufenkonzeptes der Kanzerogenese (Neumann, 1992) einen Schritt auf dem Weg zur malignen Entartung der Zelle darstellen. Weitere Möglichkeiten wie Zellen auf DNA-Schäden reagieren können, sind Apoptose und Nekrose. Dies geschieht, wenn die Zelle derart geschädigt wurde, dass die Reparaturmechanismen den Schaden nicht mehr beheben können und es zu einer Blockade von Transkription oder Replikation kommt. Apoptose ist ein programmierter Selbstmord der unter Energieverbrauch abläuft. Nekrose hingegen stellt einen unkontrollierten Vorgang dar, der mit Entzündungserscheinungen des umliegenden Gewebes einhergeht. Da DNA-Modifikationen eine Grundlage von Mutationen sind, soll in diesem Kapitel deren mutagenes Potential, also eine mögliche Relevanz für die Tumorentstehung, erläutert werden.

##### *2.2.4.1 Mutagenes Potential von Uracil in der DNA*

Bei der Bewertung der Mutagenität von Uracil in der DNA muss die gegenüberliegende Base berücksichtigt werden. Uracil in der DNA ist nicht *per se* mutagen, sondern es kommt auf den Entstehungsweg des Uracils an. Wie in Kapitel 2.2.2 bereits erläutert, führt der Fehleinbau von dUMP während der Replikation lediglich zu einem U:A-Paar. Dieses U:A-Paar ist nicht fehlcodierend, da der genetische Code auch über Uracil anstatt Thymidin korrekt abgelesen wird, wie es in der RNA ja auch der Fall ist (Krokan et al., 2002). Ein geringes mutagenes Potential resultiert aber dennoch auch aus der Reparatur eines U:A-Paars: Falls die Reparatur fehlerhaft oder unvollständig ausgeführt wird, z.B. nach Entfernen des Uracils abasische Stellen zurückbleiben, so sind diese um ein Vielfaches zytotoxischer als der vorherige Fehler (Boiteux, 2004; Krokan et al., 2001). Ebenso ist bei einem U:A-Paar

die Affinität von regulatorischen Proteinen, sequenzspezifisch an DNA-Promotorbereiche zu binden, herabgesetzt, was zelluläre Funktionen beeinträchtigen kann (Verri et al., 1990). Resultiert das Uracil aber aus einer Desaminierung von Cytosin, wie in Kapitel 2.2.1 erläutert, entsteht ein U:G-Paar, welches nach der ersten Replikation in ein U:A-Paar und nach der 2. Replikation in ein T:A-Paar überführt wird. Die Replikation führt also zu einer Mutation, da hier nicht mehr die korrekte Basenabfolge weitergegeben wurde (Kavli et al., 2002). Nach Transkription durch die RNA-Polymerase kann ein U:G-Paar zu veränderten Proteinen führen, die entweder eine falsche oder keine Funktion mehr erfüllen (Viswanathan et al., 1999).

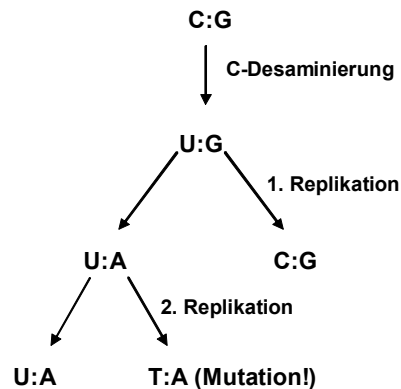


Abbildung 11: Entstehung einer Mutation nach einer Desaminierung von Cytosin.

Um die genannten Transitionen zu vermeiden, muss die DNA-Reparatur erfolgen bevor sich die Zelle teilt, ansonsten wird die fehlerhafte Information an die Tochterzelle weitergeben.

Da die Reparatur von Uracil (siehe Kapitel 2.3) zu abasischen Stellen (AP-Läsionen, apurinische/apyrimidinische Stellen) und Einzelstrangbrüchen führt, soll deren Mutagenität ebenfalls an dieser Stelle erläutert werden. AP-Läsionen können wie Uracil ebenfalls zur Mutagenese beitragen (Epe, 1995), da diese Modifikationen informationsleere Stellen der DNA darstellen, wodurch die Replikation blockiert wird. Sie können als Reparaturintermediate der Uracil-Reparatur entstehen oder durch spontane Hydrolyse der *N*-glykosidischen Bindung zwischen Base und Zucker. Es wird vermutet, dass ca. 10 000 Basen pro Tag und pro Säugerzelle verloren gehen (Lindahl and Andersson, 1972; Lindahl and Nyberg, 1972). Generell werden AP-Läsionen als zytotoxisch angesehen (Boiteux, 2004), da sie spontan oder enzymatisch hydrolysieren können, wodurch ein DNA-Strangbruch entsteht. Diese DNA-Strangbrüche werden normalerweise sehr schnell repariert, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sie auch ein mutagenes Potential besitzen (Epe, 1995). Sie können nämlich prinzipiell zu Doppelstrangbrüchen überführt werden, die

ihrerseits wiederum ein sehr großes zytotoxisches und mutagenes Potential besitzen, da sie zu Chromosomenaberrationen führen können. Durch die effektiven Reparaturmechanismen für Einzelstrangbrüche wird deren Toxizität im Vergleich zu Doppelstrangbrüchen jedoch nur gering eingestuft.

#### 2.2.4.2 *Mutagenes Potential oxidativer DNA-Modifikationen*

Oxidative DNA-Modifikationen, die nicht repariert werden, können bei einer Teilung der Zelle zu einer Basen-Fehlpaarung führen. Die Modifikationen können sich über zwei Replikationsschritte zu Mutationen manifestieren. Man weiß, dass unterschiedliche DNA-Basenmodifikationen bestimmte Mutationen hervorrufen, sodass sich aus dem Mutationsmuster auf den ursprünglichen Schaden schließen lässt. Da in dieser Arbeit die Gleichgewichtsspiegel von endogen entstandenem 8-oxoG und Formamidoguanin untersucht wurden, soll auf diese Basenmodifikationen eingegangen werden.

8oxoG besitzt ein prämutagenes Potential, welches auf der Paarung mit Adenin während der Replikation beruht (Shibutani et al., 1991; Tchou and Grollmann, 1993). So kommt es zu GC→TA Transversionen in Säugerzellen und Bakterien (Cheng et al., 1992; Klein et al., 1992; Wood et al., 1990). Quantitative Untersuchungen zur Mutationsfrequenz nach Einbringung eines einzelsträngigen Vektors mit einem 8-oxoG in Säugerzellen haben eine Mutationshäufigkeit von 2,5% bis 4,8% ergeben (Moriya, 1993). Diese Werte sind hoch im Vergleich zur Mutagenität anderer Modifikationen.

Formamidopyrimidine (FAPY-Guanin und FAPY-Adenin) (siehe Abbildung 9) besitzen kein mutagenes Potential, da sie zu einer Hemmung der Replikation durch eine Blockade von Polymerase I führen (Laval, 1996; Tudek et al., 1992). Dadurch wird die Fehlinformation nicht an die Tochterzelle weitergegeben -der Schaden kann sich nicht als Mutation manifestieren.

Wie zu Beginn des Kapitels erwähnt, kann ein DNA-Schaden mit Hilfe des spezifischen Reparaturapparates effizient behoben werden. Dadurch können für die Zelle die hier erläuterten mutagenen Wirkungen der DNA-Läsionen vermieden werden. Die Reparatur von Uracil und oxidativen Basenmodifikationen soll im folgenden Kapitel dargestellt werden.

## 2.3 Basenexzisionsreparatur von Uracil und oxidativen Schäden in der DNA

Da Uracil in der DNA genauso wie oxidative DNA-Modifikationen ein mutagenes Potential besitzen (Kapitel 2.2.4), ist eine effektive Reparatur beider Schäden notwendig. Denn wie in Kapitel 2.1 dargestellt, wird die DNA eines Organismus, auch wenn er niemals DNA-schädigenden Agenzien ausgesetzt wäre, unvermeidlich durch endogene Faktoren geschädigt. Somit übernimmt die DNA-Reparatur eine wichtige Aufgabe in der Aufrechterhaltung der Integrität des Genoms. Ein Rechenbeispiel soll die Leistungsfähigkeit der DNA-Reparatur verdeutlichen: In jeder menschlichen Körperzelle sind  $6 \times 10^9$  Basenpaare (verteilt auf 46 Chromosomen). Ein Mensch besteht aus durchschnittlich  $6 \times 10^{13}$  Zellen, das entspricht also einer Gesamtzahl von  $10^{22}$  Basenpaaren, die von der DNA-Reparatur im gesamten Mechanismus in ihrer Original-Basensequenz zu erhalten sind. Über 130 Reparaturgene, die bisher bekannt sind, übernehmen diese Aufgabe, wobei in jeder Zelle eines Organismus pro Tag viele Tausend veränderte Basen entstehen (Loeb, 2001). Um die Integrität der DNA zu bewahren, muss die DNA-Reparatur den Schaden behoben haben, bevor sich die Zelle teilt, sonst ist der DNA-Schaden in Form einer Mutation in der Tochterzelle manifestiert. Es lassen sich sechs grundsätzlich verschiedene Reparaturwege unterscheiden (Wood, 2001):

1. die Basenexzisionsreparatur (BER), die definiert veränderte DNA-Basen ausschneidet und ersetzt und auch Einzelstrangbrüche repariert,
2. die Nukleotidexzisionsreparatur (NER), die großräumige, Helix-deformierende, meist exogen induzierte Addukte repariert,
3. die postreplikative *mismatch*-Reparatur (MMR), die u.a. fehlgepaarte Basen korrigiert,
4. die Reversion von Methyl- und kleinen Alkylgruppen an Position O<sup>6</sup> des Guanins durch Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) oder ihre Entfernung aus 1-Methyladenin bzw. 3-Methylcystein durch Oxidation mittels Alk B (Aas, 2003),
5. die Beseitigung von Doppelstrangbrüchen durch Homologe Rekombination (HR) oder durch den *nonhomologous end-joining* (NHEJ)-Reparaturweg, und
6. die transkriptionsgekoppelte Reparatur, die für eine wesentlich schnellere Reparatur des transkribierten Stranges verglichen mit dem nicht-transkribierten Strang verantwortlich ist. Sie ist eine Sonderform der NER, die auch oxidative Schäden repariert.

Die Bedrohung der Integrität des Genoms kann endogener oder exogener Natur sein, in beiden Fällen ist die DNA-Reparatur notwendig. Endogen gebildete ROS, die

im Verlauf physiologisch notwendiger Reaktionen entstehen, stellen bereits eine Gefahr für die DNA dar (Halliwell, 1986; Joenje, 1989; Sies, 1986). Es wird geschätzt, dass ROS pro Tag und Zelle für die Induktion von zehn- bis zwanzigtausend DNA-schädigenden Ereignissen verantwortlich sind (Jackson, 2001; Loeb, 2001). Durch experimentellen *knockout* bestimmter Reparaturgene lässt sich die Bedeutung der DNA-Reparatur besonders gut erkennen: Defekte in der spezifischen Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen sind mit einer bis zu tausendfach erhöhten spontanen Mutationsrate in *E.coli* verbunden (Michaels, 1992). Der *knockout* des *ogg1*-Gens in Mäusen führt allerdings nur zu einer Verdopplung der Mutationsrate. Die Tumorraten sind in diesen Tieren nicht erhöht (Klungland et al., 1999). Wird hingegen zusätzlich zum *ogg1*-Gen ein weiteres Gen für die Reparatur oxidativer Basenmodifikationen ausgeschaltet, welches Adenin aus einer Fehlpaarung mit 8-oxoG beseitigt (*myh*), so zeigen 2/3 aller Tiere Lungen-, Ovar-, oder Lymphomkrebs durch Aktivierung eines Oncogens (Xie et al., 2004). In *Ung2-knockout* Mäusen finden sich aufgrund der Reparaturdefizienz etwa 2000 Uracilreste pro Genom in den unterschiedlichen Geweben der Tiere. Die Mutationsrate hingegen ist in einigen Geweben nur marginal erhöht (Nilsen et al., 2000).

Oxidative DNA-Basenmodifikationen und Uracil in der DNA werden durch die Basenexzisionsreparatur (BER) erkannt und beseitigt. Dieser Reparaturweg ist insbesondere für Schäden vorgesehen, die keine oder nur geringfügige Distorsionen verursachen, also z.B. methylierte, oxidierte, reduzierte oder fragmentierte Basen. Einzelstrangbrüche werden wie oxidative Basenmodifikationen und Uracil über die BER repariert.

Abbildung 12 zeigt eine Übersicht des Mechanismus der Basenexzisionsreparatur nach heutigem Kenntnisstand. Es lassen sich in der Abbildung zwei grundsätzlich verschiedene Wege erkennen: Der so genannte *short-patch*-Weg (Weg A und B), bei dem nur ein einziges Nukleotid ausgetauscht wird und die *long-patch*-Reparatur (Weg C), bei der zwei bis acht Nukleotide ausgetauscht werden (Bernstein, 2002; Krokan, 2000).

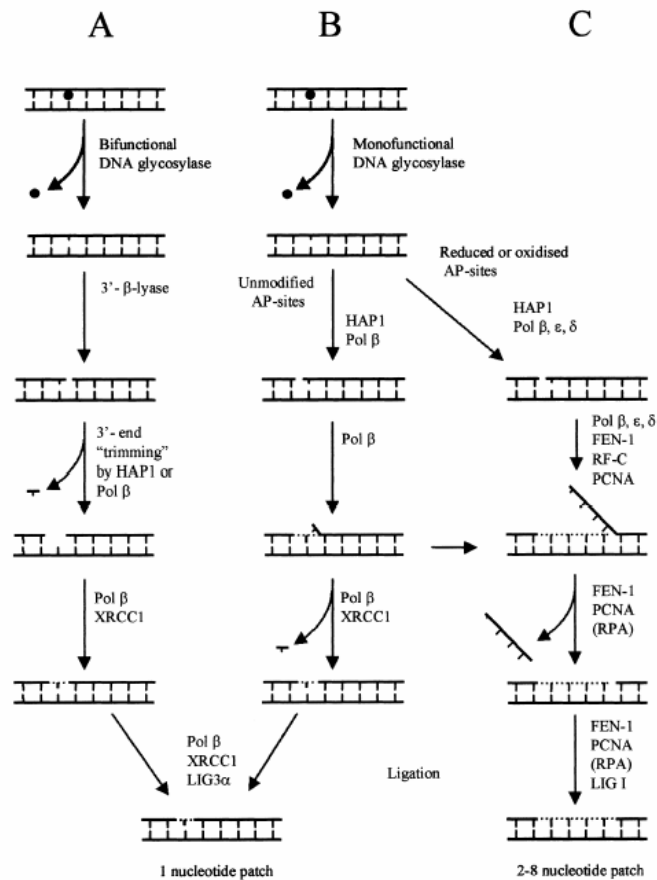


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Mechanismus der Basenexzisionsreparatur beim Säuger (Slupphaug et al., 2003).

Den ersten Schritt der BER stellt die Erkennung und anschließende Entfernung der modifizierten Base durch eine spezifische Glykosylase dar. Dabei schneidet diese die N-C1'-glykosidischen Bindung zwischen Base und Desoxyribose ein, wodurch eine apurinische bzw. apyrimidinische Stelle zurückbleibt, die auch als AP-Läsion bezeichnet wird. Diese abasische Stelle wird von dem Enzym AP-Endonuklease 1 (APE1, auch HAP1 genannt) weiter in einen Einzelstrangbruch überführt, wobei eine freie 3'-OH-Gruppe entsteht, die als Substrat für Polymerase  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) dient (Bohr, 1999; Demple, 2002; Krokan, 2000; Nilsen, 2001). Weg A in Abbildung 12 zeigt den Einsatz einer bifunktionellen Glykosylase, die zusätzlich zur Glykosylase- noch über eine Lyase-Aktivität verfügt, die die AP-Läsion am 3'-Ende zu einem Einzelstrangbruch einschneiden kann. Nach dem Schritt der Einzelstrangbruchgenerierung unterscheiden sich *short-patch*- (Weg A und B) und *long-patch*-Weg (Weg C). Unmodifizierte AP-Läsionen werden über den *short patch*-Weg repariert, wobei mit Hilfe von Polymerase  $\beta$  der Zucker entfernt und ein neues Nukleotid eingefügt wird. Reguläre oder oxidierte AP-Läsionen werden über den *long-patch*-Weg prozessiert, wobei ein zwei bis acht Nukleotide langes DNA-Fragment herausgeschnitten wird

und mit Hilfe von PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), FEN1 (*flap endonuclease 1*) und weiteren Enzymen diese Lücke wieder gefüllt und der DNA-Strangbruch versiegelt wird (Bohr, 2002; Nilsen, 2001).

### 2.3.1 Erkennung und Reparatur von Uracil in der DNA durch Ung2 und Smug1

Alle lebenden Organismen verfügen über Reparaturenzyme, die Uracil in der DNA erkennen und reparieren (Olsen et al., 1989). Diese Uracil-DNA Glykosylasen (UDGs) schützen die Zelle vor den zytotoxischen und mutagenen Effekten von Uracil in der DNA. Die erste UDG wurde 1974 in *E.coli* gefunden, wobei auch die Basenexzisionsreparatur (siehe Kapitel 2.3) entdeckt wurde (Lindahl, 1974). Säugerzellen verfügen über vier verschiedene UDGs, von denen drei (Smug1, Ung, Tdg) zur gleichen Proteinsuperfamilie gehören (Krokan et al., 2002):

- a) Smug1 (*single strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase*)
- b) Ung (*uracil-N'-DNA glycosylase*)
- c) Tdg (*thymine mismatch DNA glycosylase*)
- d) Mbd4 (*methyl CpG binding domain 1*)

Diese vier UDGs verfügen über verschiedene Substratspezifitäten, die in der unten aufgeführten Tabelle zur Übersicht zusammengetragen sind. Generell lässt sich sagen, dass Ung und Smug1 Uracil sowohl in einzelsträngiger als auch in doppelsträngiger DNA erkennen. Tdg und Mbd4 hingegen sind strikt doppelstrang-spezifisch.

Substrat	Ung	Smug1	Tdg	Mbd4
T:G	-	-	+	+
U in einzelsträngiger DNA	+	+	-	-
U in doppelsträngiger DNA	+	+	+	+
5-Hydroxymethyl-uridin in einzelsträngiger DNA	-	+	-	-
5-Hydroxymethyl-uridin in doppelsträngiger DNA	-	+	+	-
Ethenocytosin in einzelsträngiger DNA	-	+	-	-
Ethenocytosin in doppelsträngiger DNA	-	+	+	+
5-Fluoruracil in einzelsträngiger DNA	+	+	+	-
5-Fluoruracil in doppelsträngiger DNA	+	+	+	+

Tabelle 2: Erkennungsspektrum verschiedener Uracil-DNA Glykosylasen (Krokan, 2002).

Ung und Smug1 haben im Vergleich zu Tdg und Mbd4 wesentlich höhere Umsatzraten (Krokan et al., 2002; Slupphaug et al., 1995). Da sie dadurch für den Schutz der

Zelle einen größeren Beitrag leisten als Tdg und Mbd4 soll im Folgenden nur auf die Eigenschaften von Smug1 und Ung eingegangen werden.

### 2.3.1.1 *Uracil-DNA Glycosylase 2 (Ung2)*

Die Reparaturglykosylase Ung kommt in zwei Subtypen vor, wobei Ung1 die mitochondriale und Ung2 die nukleäre Form darstellt. Beide Enzyme werden vom *ung*-Gen auf Chromosom 12q24.1 codiert (Krokan et al., 2001) und verfügen über die gleiche katalytische Domäne, unterscheiden sich aber in ihrem N-Terminus (Nilsen et al., 1997). Das N-terminale-Ende von Ung1 stellt ein klassisches und starkes mitochondriales *targeting* Signal dar, welches beim Eintritt in die Mitochondrien durch mitochondriale Peptidasen entfernt wird. Für ein vollständiges nukleäres Signal sind bei Ung2 die letzten 100 Aminosäuren des N-Terminus' notwendig. 90 dieser 100 Aminosäuren aber stellten lange Zeit bei dem Versuch einer molekularbiologischen Gewinnung von Ung2 ein Hindernis dar, da durch sie zelluläre Proteasen während der Proteinaufreinigung das gesamte Protein verdauten. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit Ung2 in Form eines verkürzten Proteins verwendet. Dem hier eingesetzten Ung2 fehlen die letzten 84 Aminosäuren des N-Terminus (daher auch  $\Delta 84$  genannt). Erst durch diese verkürzte Proteinform wurde Ung2 resistent gegen den oben genannten Proteinabbau (Slupphaug et al., 1995). Das Enzym büßt damit aber keinerlei funktionelle Eigenschaften ein, der N-Terminus formt womöglich eine unabhängige Strukturdomäne oder liegt unstrukturiert vor.

Ung2 findet sich im Nukleoplasma und an den Replikationsgabeln. Womöglich wird es mit Hilfe von *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) an die Replikationsgabeln co-transportiert (Rossi et al., 1999), da es im N-Terminus ein PCNA-Bindemotiv enthält. Zusätzlich findet sich dort eine Bindestelle für Replikationsfaktor A (RPA). Die Interaktionen von Ung2 mit PCNA und RPA, beide nötig für den *long patch*-Weg der BER, lassen darauf schließen, dass Ung2 an diesem Weg der BER bei den Replikationsgabeln beteiligt ist. Durch seine hohen Umsatzraten (600-1000 Uracilreste pro Minute), die um Größenordnungen schneller sind als die anderer Glykosylasen, ist das Enzym besonders dazu geeignet, fehleringebautes Uracil an den Replikationsgabeln zu entfernen, da der Replikationsvorgang ein schnell ablaufender Prozess ist (Krokan et al., 2002).

Da sich Ung2 außerdem im Nukleoplasma findet, wird angenommen, dass es zusätzlich an der Reparatur von U:G-Paaren beteiligt ist, die aus der Desaminierung von Cytosin entstanden sind.

Ung2 ist eine monofunktionelle Glykosylase. Im Unterschied zu Ogg1 (siehe Kapitel 2.3.2) verfügt es nur über die Aktivität zur Spaltung der N-glykosidischen Bindung zwischen Base und Desoxyribose. Im nachfolgenden Schritt muss eine



AP-Endonuklease (APE1/HAP1) die aus dem ersten Schritt entstandene apyrimidinische Stelle zum Einzelstrangbruch einschneiden.

Die Bedeutung von Ung2 erschließt sich aus Experimenten mit *knockout*-Organismen (Mäuse und Zellen). Zur Untersuchung, ob ein bestimmter DNA-Schaden zu einer erhöhten Tumoranfälligkeit führt, kann entweder dieser Schaden artifiziell vermehrt generiert werden, oder die Reparatur der endogen entstandenen Schäden unterbunden werden. Wird das wichtigste DNA-Reparaturenzym zu Erkennung von Uracil (siehe Kapitel 2.3) in Mäusen ausgeschaltet (*knockout*), so entwickeln diese entgegen aller Erwartungen keine stark erhöhte Spontanmutationsrate. Lediglich eine marginale Erhöhung der Mutationsfrequenz in einem *lacI*-Transgen, eine leichte Erhöhung von Lymphomkrebs und eine um 10 Wochen verringerte Lebensspanne wurden festgestellt (Nilsen et al., 2000; Nilsen et al., 2003). Ung2-defiziente Hefen und Bakterienstämme, tolerieren einen Austausch von 20 % des genomischen Thymidins gegen Uracil. Erreicht der Grad des Austausches höhere Werte sterben die Organismen, wahrscheinlich aufgrund fehlerhafter RNA-Synthese (El-Hajj et al., 1992a; Tye et al., 1978; Warner et al., 1981).

Bei Menschen führt eine Ung2-Defizienz zu einem Hyper-IgM-Syndrom (*hyper IgM syndrome*, HIGM), wobei das Immunsystem über sehr viel IgM, aber nur wenig IgG, IgA und IgE verfügt und daher anfällig für bakterielle Infektionen und lymphoide Hyperplasien ist (Imai et al., 2003). Ung2 ist beteiligt an der somatischen Rekombination und dem sogenannten *class switch* zur Generierung der Antikörpervielfalt. Nach Desaminierung durch *activation induced deaminase* (AID) entfernt Ung2 das entstandene Uracil, gefolgt von AP-Endonuklease 1, die einen Strangbruch generiert (Bhagwat, 2004). Erfolgt dies an zwei Stellen in der DNA, kann so ein DNA-Abschnitt transloziert und an einer anderen Stelle eingefügt werden, wodurch die Vielfalt der variablen Ketten der Antikörper entsteht (Muramatsu et al., 2000).

Ebenso wie *knockout*-Experimente können Überexpressions-Modelle helfen, das mutagene Potential von Uracil in der DNA abzuschätzen. So führt die Überexpression von Ung2 in Hefe zu einem Zellzyklusarrest wobei DNA-*checkpoints* aktiviert werden und vermehrt AP-Läsionen auftreten (Elder et al., 2003).

### 2.3.1.2 *Single-strand selective monofunctional DNA-glycosylase (Smug1)*

Neben Ung2 ist Smug1 das wichtigste DNA-Reparaturenzym für Uracil in der DNA. Erst 1999 wurde es in einem *in vitro* Experiment entdeckt, als nach Enzymen gesucht wurde, die an synthetische DNA-Glykosylase-Hemmstoffe binden (Haushalter et al., 1999). Mit der Anwesenheit von Smug1 konnte der nur marginale Anstieg in der Mutationsfrequenz eines *lacI* Transgens in Ung2-defizienten Mäusen erklärt werden (Nilsen et al., 2000). In diesen Mäusen wirkt Smug1 als *back-up* Reparatur, was für die Integrität des Genoms dieser Mäuse hinreichend zu sein scheint (Nilsen et al., 2001). Daher wird angenommen, dass Ung2 überwiegend für

die Reparatur von U:A-Paaren, also fehleingebautes Uracil, verantwortlich ist und Smug1 für die Beseitigung von Uracil, welches aus desaminiertem Cytosin hervorgegangen ist (Nilsen et al., 2001).

Wie in Kapitel 2.2.4.1 erläutert, konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass U:A-Paare nur ein geringes mutagenes Potential haben, da ihre Codierungseigenschaften unverändert sind. So kann in *E.coli dut<sup>-</sup> ung<sup>-</sup>*-Mutanten (defizient in Ung2 und UTPase (siehe Kapitel 2.2.2)) und in *ung<sup>-</sup>* Hefen 20 % des genomischen Thymins gegen Uracil ersetzt sein, ohne dass die Viabilität der Bakterien oder Hefen eingeschränkt ist (El-Hajj et al., 1992b; Tye et al., 1978; Warner et al., 1981). In *Ung1*-Hefen, welche nicht über Smug1 verfügen und in Ung1 defizient sind, kann das Einfügen von Smug1 den Verlust von Ung1 kompensieren. Die Smug1 kompetenten Zellen reagieren auf eine Antifolatbehandlung mit einem S-Phasenerrest, wie auch die Wildtyp Zellen (Ung1 kompetent) (Elateri et al., 2003).

Evolutionsgeschichtlich scheint Smug1 ein junges Enzym zu sein. Es findet sich nicht in Hefen, echten Bakterien und Archaeobakterien. Daher wird geschätzt, dass es erstmals vor 550 Millionen Jahren in Organismen auftrat (Nilsen et al., 2001).

### 2.3.2 Erkennung oxidativer DNA-Modifikationen durch Ogg1

Die wichtigste oxidative DNA-Modifikation, 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG), wird in Hefen und Säugern durch die Reparaturglykosylase Ogg1 eingeleitet. Ogg1 ist eine bifunktionelle Glykosylase, die im ersten Schritt der Basenexzisionsreparatur die oxidierte Base aus dem Genom entfernt (Boiteux, 2000; Bruner, 2000; Krokan, 2000) und im Anschluss durch das Einschneiden der entstandenen AP-Läsion einen Einzelstrangbruch erzeugt. Im weiteren Verlauf der Reparatur wird meist der *short-patch*-Weg beschritten, bei Fehlen von Polymerase  $\beta$  kann die Reparatur jedoch auch über den *long-patch*-Weg stattfinden (Stucki, 1998). Im Folgenden soll das humane Ogg1-Reparaturenzym näher beschrieben und seine Bedeutung in der Reparatur endogen generierter oxidativer DNA-Schäden erläutert werden.

Etwa 100 000 Moleküle Ogg1 finden sich in einer einzigen menschlichen Fibroblastenzelle (Capelli et al., 2001). Das humane *ogg1*-Gen, auf Chromosom 3 lokalisiert (Boiteux, 2000), codiert für sieben alternative mRNA-Spleißvarianten: Die beiden Haupttypen sind das  $\alpha$ -hOgg1 (345 Aminosäuren) und das  $\beta$ -hOgg1 (424 Aminosäuren) (Radicella, 1997). Immunhistochemische Versuche konnten zeigen, dass das  $\alpha$ -Ogg1-Protein (36 kDa) im Kern verbleibt, während die  $\beta$ -Form (40 kDa) in die Mitochondrien wandert (Nishioka et al., 1999; Takao, 1998).

Das Erkennungsspektrum des Ogg1-Proteins umfasst verschiedene DNA-Modifikationen, nämlich 8-oxoG, FAPY-G und Methyl-FAPY-G. Die Erkennung kann jedoch nur stattfinden, solange diese modifizierten Basen noch mit Cytosin gepaart

sind. Findet eine Replikation der DNA und Teilung der Zelle statt, bevor Ogg1 den Schaden reparieren konnte, wird gegenüber 8-oxoG bevorzugt Adenin oder Guanin eingebaut. Diese Fehlpaarung kann dann nur von den Enzymen der so genannten *mismatch*-Reparatur behoben werden (Auffret van der Kemp, 1996).

Die Bedeutung von Ogg1 zeigt sich in Experimenten mit *knockout*-Zellen und -Mäusen. In Hefen hatte der Ausfall von Ogg1 einen starken Anstieg der spontanen Mutationsrate zur Folge, ein Mutator-Phänotyp wurde entdeckt (Thomas, 1997). In *ogg1-knockout*-Mäusen konnte eine leichte Erhöhung der Spontanmutationsrate beobachtet werden, jedoch nur in der Leber und nicht in anderen Organen (Klungland, 1999; Osterod, 2001).

Diese Daten werden unterlegt durch Beobachtungen am Menschen, wo Mutationen und Polymorphismen des *ogg1*-Gens mit einem höheren Krebsrisiko verbunden sind. So existiert in der Bevölkerung ein Ser326Cys-Polymorphismus im *hogg1*-Gen, der offenbar mit einem erhöhten Lungenkrebsrisiko einhergeht (Le Marchand et al., 2002; Sugimura, 1999). In Tumoren aus Niere und Lunge wurden Mutationen im *ogg1*-Gen gefunden, die möglicherweise ursächlich an der malignen Entartung beteiligt waren (Chevallard, 1998).

In Arbeiten, an denen unsere Arbeitsgruppe beteiligt war, konnte gezeigt werden, dass vermutlich ein *back-up*-Reparaturmechanismus für die Reparatur von 8-oxoG besteht. Für diesen *back-up*-Mechanismus wird das *Cockayne syndrome B* (Csb)-Protein verantwortlich gemacht, da die basalen Gleichgewichtsspiegel oxidativer Basenmodifikationen in *ogg1<sup>-/-</sup>/csb<sup>-/-</sup>-double-knockout*-Mäusen mit steigendem Alter wesentlich stärker ansteigen als in *ogg1<sup>-/-</sup>-knockout*-Mäusen. Ebenso sind *ogg1<sup>-/-</sup>/csb<sup>-/-</sup>-double-knockout*-Mausfibroblasten nicht bzw. kaum in der Lage, induzierte oxidative DNA-Schäden zu reparieren, während in *ogg1<sup>-/-</sup>-knockout*-Zellen noch eine im Vergleich zu Wildtyp-Zellen verzögerte Reparatur dieser Schäden messbar war (Osterod, 2002b).

8-oxoG, Uracil und AP-Läsionen werden mit unterschiedlicher Schnelligkeit in humanen Zellextrakten repariert. AP-Stellen werden am schnellsten, 8-oxoG am langsamsten repariert, Uracil nimmt eine Mittelstellung ein. Zwar wird dieses *ranking* gestützt von den absoluten Zahlen der in humanen Fibroblasten gefundenen absoluten Mengen an Reparaturproteinmolekülen (100 000 Moleküle Ogg1, 200 000 Moleküle Ung2, 300 000 Moleküle APE1/HAP1), Titrationsversuche konnten aber zeigen, dass zugesetzte Mengen an Reparaturenzym die Reparatur zwar beschleunigten, aber nicht proportional zur zugefügten Menge. Die Rate der Basenexzision hängt also nicht allein von der Menge der Glykosylasen ab (Capelli et al., 2001).

Eine Akkumulation von 8-oxoG im Alter trotz funktionierender Reparatur wird als eine Ursache des Alterns vorgeschlagen (Johnson et al., 1999). *ogg1<sup>-/-</sup>-knockout*-Mäuse

zeigen mit zunehmendem Alter erhöhte Spiegel an 8-oxoG in Hepatozyten (Osterod et al., 2001).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Ogg1 maßgeblich an der Reparatur oxidativer DNA-Schäden beteiligt ist. Seine Schlüsselrolle hierbei verdeutlicht sich beim Fehlen des Enzyms wodurch in verschiedenen Organismen unterschiedliche starke Auswirkungen auf die Integrität des Genoms beobachtet wurden.

### 2.3.3 Basale Gleichgewichtsspiegel verschiedener DNA-Modifikationen

Da in dieser Arbeit der Begriff der basalen Gleichgewichtsspiegel verschiedener DNA-Modifikationen verwendet wird, soll dieser hier näher erläutert werden.

Der Begriff der basalen Gleichgewichtsspiegel wird verwendet zur Beschreibung einer (messbaren) Momentaufnahme eines Fließgleichgewichtes aus Entstehung und Reparatur verschiedener DNA-Modifikationen. Synonyme Ausdrücke wie Steady-State-Level und Hintergrundspiegel finden sich in der Literatur.

Abbildung 11 zeigt die Entstehung der basalen Gleichgewichtsspiegel. Durch endogene Faktoren entstehen DNA-Modifikationen, die wiederum durch die DNA-Reparatur beseitigt werden können. Somit soll deutlich gemacht werden, dass die basalen Gleichgewichtsspiegel verschiedener DNA-Modifikationen kein statischer Wert sind, sondern vielmehr als Ergebnis zweier variabler Faktoren, nämlich Eintrag und Reparatur, zu verstehen sind.

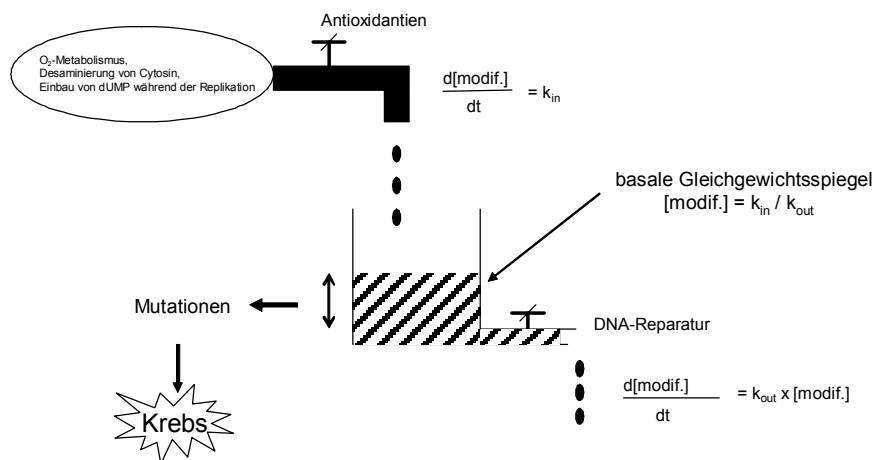


Abbildung 13: *Ursprung der basalen Gleichgewichtsspiegel verschiedener DNA-Modifikationen in Zellen. Für die basalen Gleichgewichtsspiegel von DNA-Modifikationen wird angenommen, dass sie die Balance zwischen kontinuierlicher Generierung durch endogene (und exogene) Faktoren und die Entfernung über die DNA-Reparatur widerspiegeln. Unter der Annahme einer konstanten Bildungsrate und einer Kinetik erster Ordnung für die Reparatur, ergibt sich der basale Gleichgewichtsspiegel [modif.] als Verhältnis der Generierungsrate  $d[\text{motif.}]/dt$  und der Reparaturkonstante  $k_{out}$  (Epe, 2002).*

## 2.4 Exogen verursachte DNA-Schäden in Tumorzellen als Grundlage der humanen Krebstherapie

Die in den vorangegangenen Kapiteln erläuterten endogenen DNA-Schäden können sich zu Mutationen manifestieren, wenn sie nicht repariert werden. Nach dem Mehrstufenmodell der Kanzerogenese bedarf es aber zusätzlicher Faktoren zur Entartung. So sind Promotoren und Proliferation nötig, um aus einer einzigen geschädigten Zelle eine präneoplastische Population und später einen Tumor wachsen zu lassen, der im Endstadium die Vitalfunktionen des Organismus bedroht. Hat sich im menschlichen Körper ein Tumor entwickelt, kann sein Wachstum durch Chemotherapie eingedämmt oder die Tumorzellen sogar abgetötet werden. Dies geschieht mit Hilfe so genannter Zytostatika, die das Wachstum metabolisch aktiver Zellen auf verschiedene Arten hemmen.

Im folgenden Kapitel sollen zwei unterschiedliche Grundsubstanzen der Chemotherapie vorgestellt werden, die in dieser Arbeit zur Untersuchung endogener Ursachen verschiedener DNA-Schäden verwendet wurden.

### 2.4.1 Chinone als Quelle reaktiver Sauerstoffspezies in der Krebstherapie

Einige Antibiotika, die wegen ihrer toxischen Eigenschaften nicht zur Behandlung bakterieller Infektionen verwendet werden, haben Eingang in die Krebstherapie mit Zytostatika gefunden. So werden bei der Therapie mit Anthracyclinen deren zytotoxischen Eigenschaften zum Abtöten der Tumorzellen verwendet. 1969 wurde das Antibiotikum Doxorubicin isoliert und erstmalig bei Brust-, Lungen- und Eierstockkrebs eingesetzt. Anthracycline verfügen über eine chinoide Grundstruktur und sind daher zum Redoxcycling in der Lage (siehe Abbildung 14).

Zwei Grundprinzipien werden für die Zytotoxizität von Chinonen angeführt. Zum einen die „Peptidbindungs-Theorie“ (O'Brien, 1991), wobei die Chinone zunächst GSH depletieren (z.B. Acetaminophen über Alkylierung) und damit das wichtigste intrazelluläre detoxifizierende Agens nicht mehr zur Verfügung steht. Ist GSH einmal depletiert, können Membranen und andere Proteine alkyliert werden, was schließlich zum Untergang der Zelle führt. Zum anderen wird der durch Redoxcycling verursachte oxidative Stress für die Toxizität von Chinonen verantwortlich gemacht. Die grundlegenden Mechanismen des Redoxcyclings sind in Abbildung 14 am Beispiel von Durochinon (Teramethyl-*p*-benzochinon) dargestellt. Durch zwei Einelektronentransfers wird aus dem Chinon (links) über das Semichinon (Mitte) das Hydrochinon (rechts) gebildet, welches in einer Rückreaktion über Abgabe von zwei Elektronen wieder zum Chinon wird. Die Zufuhr der Elektronen erfolgt über intrazelluläre Reduktasen, die Abgabe der Elektronen über Peroxidasen. Der toxischere Schritt des Redoxcyclings liegt in der spontanen Abgabe eines Elektrons vom radikalischen Semichinon auf molekularen Sauerstoff. Das dabei

entstehende Superoxidradikalanion ist dann Ausgangsmolekül für die Bildung weiterer ROS (siehe Kapitel 2.2.3.1). Dieser Einelektronenübertrag auf Sauerstoff kann prinzipiell beliebig oft erfolgen und dadurch zur Generierung toxischer Mengen an ROS führen.

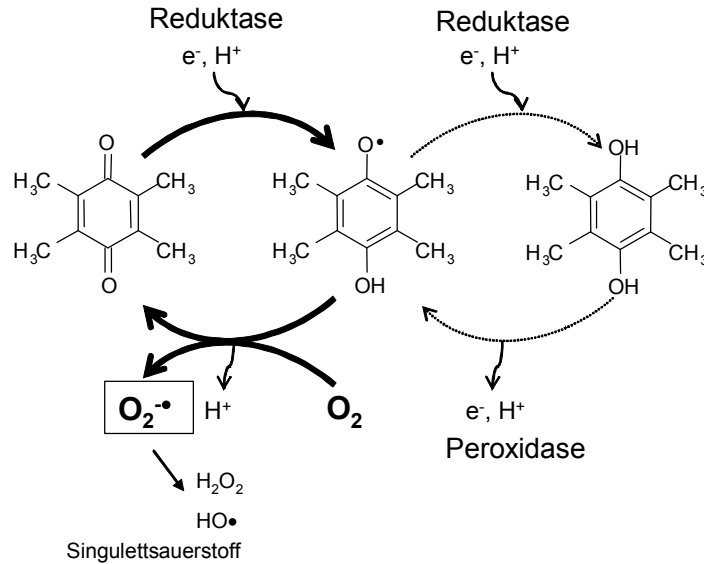


Abbildung 14: Intrazelluläres Redoxcycling der Chinone am Beispiel von Durochinon.

Die für den Krebspatienten oft Dosis-limitierende Toxizität aller Anthracycline rührt von deren Kardiotoxizität. Myocyten sind äußerst sensitiv gegenüber ROS, da sie über keine Katalase und nur wenig Superoxiddismutase (siehe Kapitel 2.2.3.1) zu deren Abbau verfügen (Doroshov and Davies, 1980). In der Krebstherapie werden aber noch weitere Eigenschaften der Anthracycline ausgenutzt, um Tumorzellen abzutöten: Sie blockieren die DNA-Synthese durch Interkalation, hemmen die Topoisomerase II und generieren so Strangbrüche. Zusätzlich binden sie an die Zellmembran und erhöhen so deren Permeabilität für weitere Zytostatika.

In der vorliegenden Arbeit wurde Durochinon als Modells substanz zur intrazellulären Generierung von ROS verwendet. Wie die Strukturformel in Abbildung 14 zeigt, sind die elektrophilen Zentren des Moleküls durch Methylgruppen blockiert, dadurch reagiert Durochinon kaum mit intrazellulären Makromolekülen. Die zytotoxische Wirkung von Durochinon wird daher ausschließlich der Bildung von ROS zugeschrieben (Moore et al., 1987; Walles, 1992).

## 2.4.2 Thymidylatsynthasehemmer als Proliferationshemmer von Tumorzellen

Neben den chinoiden Anthracyclinen werden in der Chemotherapie auch Antimetabolite eingesetzt. Antimetabolite wirken über die Hemmung von biosynthetischen Prozessen oder durch Einbau in zelluläre Makromoleküle wie DNA oder RNA, welcher den Verlust ihrer physiologischen Funktionen bewirkt. Die Fluorpyrimidine 5-Fluoruracil (5-FU) und Fluordesoxyuridin (5-FdUrd) bewirken beides. Beide Substanzen wurden in den 1950er Jahren entwickelt, da durch die Beobachtung an Rattenhepatomzellen bekannt war, dass diese die Base Uracil schneller verwerten als gesunde Gewebe. Dies gab einen Hinweis darauf, dass der Uracil-Metabolismus ein mögliches Target in der Krebstherapie darstellt (Rutmann et al., 1954). Der Mechanismus der Zytotoxizität von 5-FU beruht auf dem Einbau in DNA und RNA sowie der Hemmung der Thymidylatsynthase (TS). 5-FdUrd bewirkt ebenfalls eine TS-Hemmung und kann auch in die DNA eingebaut werden, aufgrund der reduzierten Ribose jedoch nicht in die RNA. Abbildung 15 zeigt die Strukturformeln von 5-FU und 5-FdUrd. Sie sind Analoge des Uracils mit einem Fluoratom am C5 anstelle des Wasserstoffatoms.

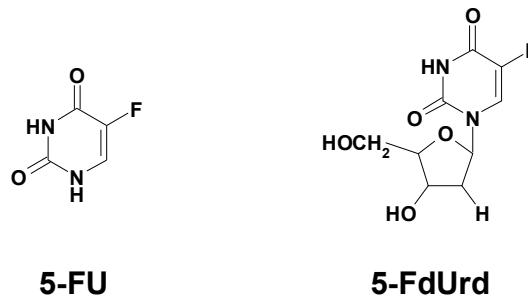


Abbildung 15: 5-Fluoruracil (5-FU) und 5-Fluordesoxyuridin (5-FdUrd).

Beide Substanzen werden über die gleichen Transportmechanismen wie Uracil in die Zelle aufgenommen (Wohlhueter et al., 1980). Abbildung 16 zeigt wie 5-FU zu verschiedenen aktiven Metaboliten verstoffwechselt wird: Fluordesoxyuridin-monophosphat (FdUMP), Fluordesoxyuridin-triphosphat (FdUTP) und Fluoruridin-triphosphat (FUTP). 5-FdUrd kann zum Mono-, Di- und Triphosphat metabolisiert werden. 5-FU und 5-FdUrd können außerdem durch das Enzym Thymidinphosphorylase ineinander überführt werden. Das limitierende Enzym im 5-FU Katabolismus ist Dihydropyrimidin Dehydrogenase (DPD), welche 5-FU in Dihydrofluoruracil (DHFU) überführt, welches keine zytostatische Wirkung mehr hat. Mehr als 80 % des verabreichten 5-FU werden primär in der Leber katabolisiert, wo DPD in großen Mengen exprimiert wird (Diasio and Harris, 1989). Da es verschiedene Polymorphis-

men dieses Enzyms in der Bevölkerung gibt, kann es nach Verabreichung von Standarddosen von 5-FU zu starken toxischen Wirkungen kommen kann.

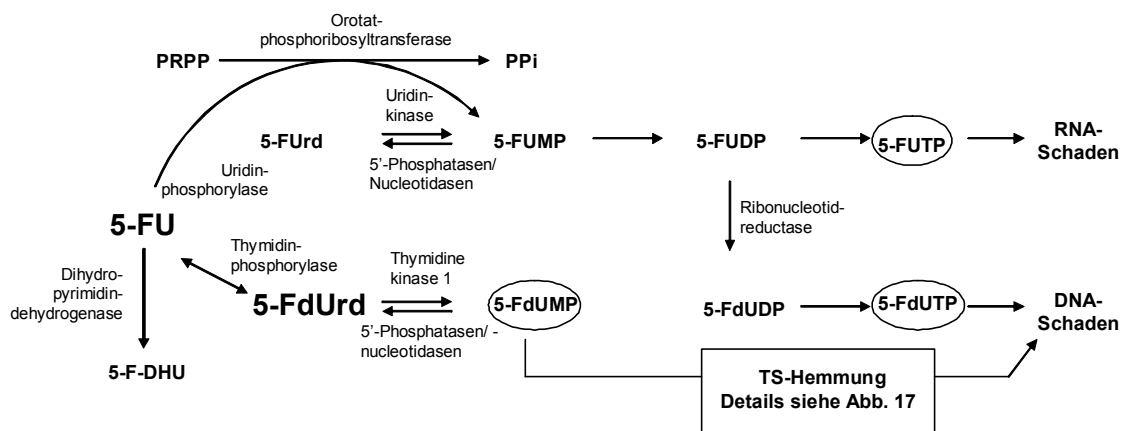


Abbildung 16: Intrazellulärer Metabolismus von 5-FU und 5-FdUrd (Longley et al., 2003).

Die Hemmung der Thymidylatsynthese ist vermutlich die zentrale Wirkung von 5-FU. Das Enzym katalysiert die reduktive Methylierung von Desoxyuridin-monophosphat (dUMP) zu Desoxythymidin-monophosphat (dTMP) unter Verwendung des reduzierten 5,10-Methylen tetrahydrofolats ( $\text{CH}_2\text{THF}$ ) als Methylgruppenspendor. Zur DNA-Synthese und Replikation der Zelle ist diese Reaktion der *de novo* Synthese von Thymidin notwendig. Das 36 kDa TS-Protein agiert dabei als Dimer wobei beide Untereinheiten eine Nucleotidbindestelle und eine weitere Bindestelle für  $\text{CH}_2\text{THF}$  besitzen. Der 5-FU-Metabolit FdUMP bindet an die Nucleotidbindestelle, wodurch ein ternärer Komplex mit  $\text{CH}_2\text{THF}$  und Enzym entsteht. Durch diese Bindung wird das Enzym kompetitiv gehemmt und die dTMP Synthese inhibiert (Santi et al., 1974; Sommer and Santi, 1974). Die genauen molekularen Mechanismen, die *downstream* der TS-Inhibierung betroffen sind, wurden noch nicht vollständig aufgeklärt. Die Depletion von dTMP führt zu einem Mangel an Desoxythymidin-triphosphat (dTTP) in der Zelle, was wiederum zu Verschiebungen der Gleichgewichte der anderen Nucleotide (dATP, dGTP, dCTP) über *Feedback*-Mechanismen führt (Jackson and Grindley, 1984). Ungleichgewichte im Nucleotidpool (insbesondere das dATP/dTTP-Gleichgewicht) stören die DNA-Synthese und -Replikation, was für die Zellen mit einem letalen DNA-Schaden enden kann (Houghton et al., 1995; Yoshioka, 1987). Zusätzlich führt die TS-Inhibierung zu einer Akkumulation von dUMP, was zu erhöhten Gehalten an dUTP führen kann, welches wie FdUTP in die DNA eingebaut werden kann (Aherne et al., 1996; Mitrovski et al., 1994). Die dem Uracileinbau nachfolgende Reparatur über Uracil-DNA Glykosylasen führt in Gegenwart eines hohen (F)dUTP/dTTP-Verhältnisses dann zu einem Teufelskreis aus Reparatur und Wiedereinbau von Uracil in die DNA ( *futile repair*). Der wiederholte Fehleinbau und die Exzision könnten daher möglicherweise über Strangbrüche und Reparaturinter-



mediate schließlich zum Zelltod führen (Longley et al., 2003). Der potentielle DNA-Schaden durch dUTP hängt von den Gehalten des Enzyms dUTPase ab, welches die intrazelluläre Akkumulation von dUTP verhindert (siehe Kapitel 2.2.2, Abbildung 2) (Ladner, 2001; Webley et al., 2000). Thymidylat kann auch aus Thymidin über das Enzym Thymidinkinase gebildet werden. Dieser sogenannte *salvage pathway* stellt einen potentiellen Resistenzmechanismus gegen 5-FU dar (Grem and Fischer, 1989).

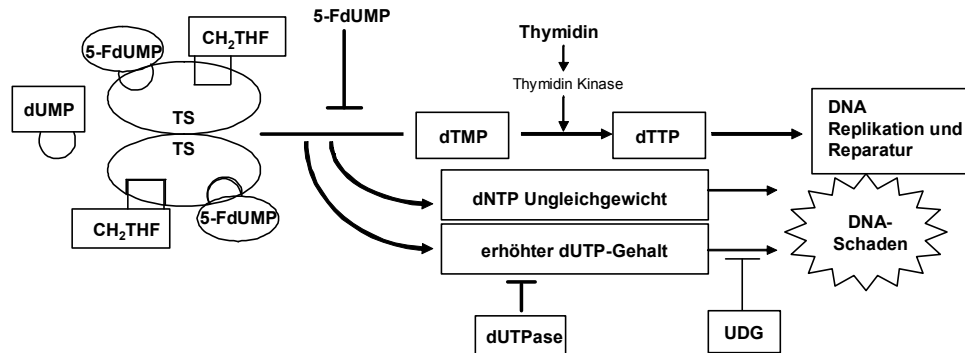


Abbildung 17: Mechanismus der Thymidylatsynthese-Inhibition durch 5-FdUMP, den reaktiven Metaboliten von 5-FU und 5-FdUrd (Longley et al., 2003).

Neben dem Fehleinbau in die DNA, stellt die RNA ein weiteres Target der 5-FU-Toxizität dar (Glazer and Lloyd, 1982; Kufe and Major, 1981). Der Metabolit FUTP wird in die RNA eingebaut und unterbindet so die normalen RNA-Funktionen und ihre Prozessierung. Prä-RNA wird nicht mehr zu reifer mRNA prozessiert (Goshal and Jacob, 1994; Kanamaru et al., 1986), ebenso werden durch FUTP posttranskriptionale Modifikationen der tRNAs unterbunden (Randrath et al., 1983; Santi and Hardy, 1987). Der Zusammenbau von snRNA-Proteinkomplexen wird inhibiert und dadurch das Spleißen der prä-mRNA unterbunden (Doong and Dolnick, 1988; Patton, 1993). Hinzu kommt, dass rRNA, tRNA, und snRNA die modifizierte Base Pseudouridin enthalten. Es konnte gezeigt werden, dass 5-FU die posttranskriptionale Umwandlung von Uridin in Pseudouridin hemmt (Samuelsson, 1991). Die Folgen dieser nicht modifizierten Uracilreste in tRNAs sind noch nicht untersucht. Desweiteren ist die Polyadenylierung, notwendig für die RNA-Stabilität und die Translation, schon durch geringe 5-FU Konzentrationen inhibiert (Carrico and Glazer, 1979).

5-FU wird in der Bekämpfung vieler Krebsarten eingesetzt, wobei Colon- und Brustkrebs die beiden größten Anwendungsgebiete darstellen (IMPACT, 1995). Im Jahr 2002 wurden weltweit 2 Millionen Patienten mit 5-FU behandelt (Scrip, 2002). Aber erst in Verbindung mit anderen chemotherapeutischen Agenzien (Kombinationspräparate) entfaltet es sein größtes Potential zum Überleben der Patienten. So liegt die *response rate* (Prozentualer Anteil der Überlebenden 5 Jahre nach der

Behandlung) von 5-FU alleine -ohne weitere Agenzien- bei Colonkrebs nur bei 10-15 % (Johnston and Kaye, 2001).

In dieser Arbeit wurden 5-FU und 5-FdUrd verwendet, um den Ursprung von Uracil in der DNA -als möglicher DNA-Schaden und damit potenzieller Ausgangspunkt einer malignen Entartung- aufzuklären. Dabei wurden die oben genannten Wirkungen beider Stoffe auf die DNA ausgenutzt.

### 3 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob bestimmte endogen verursachte DNA-Modifikationen zur genetischen Instabilität in Säugerkzellen beitragen. Dazu sollten die basalen Gleichgewichtsspiegel von einerseits oxidativen DNA-Modifikationen und andererseits Uracil in der DNA bestimmt, sowie deren Beeinflussbarkeit und Folgen analysiert werden. Bisher ist zwar bekannt, dass endogene reaktive Sauerstoffspezies DNA-Schäden verursachen können, der Beitrag bestimmter fremdstoffmetabolisierender Enzyme an ihrer Bildung wurde aber noch nicht näher untersucht. Uracil als endogen bedingte DNA-Modifikation ist erst in den letzten Jahren näher beleuchtet worden, wobei jedoch nicht eindeutig bekannt ist, in wie weit die basalen Gleichgewichtsspiegel dieser DNA-Modifikation beeinflussbar sind und welchen Ursprung sie haben.

Methodisch sollte dabei auf zwei verschiedene Zellmodelle zurückgegriffen werden. Die basalen Spiegel von Uracil und deren Veränderlichkeit unter bestimmten Bedingungen wurde mittels eines Reparaturglykosylase-*knockout*-Systems untersucht. Die oxidativen Basenmodifikationen und deren Modulierbarkeit wurden durch Überexpression verschiedener fremdstoffmetabolisierender Enzyme untersucht.

Zunächst sollte dabei an *knockout*-Mäusen untersucht werden, ob der Ausfall von Ung2, der wichtigsten Reparaturglykosylase für Uracil in der DNA, zu einer Akkumulation von Uracil in *ung-knockout*-Zellen und verschiedenen Geweben von *ung-knockout*-Mäusen führt. Es gibt verschiedene endogene Ursachen für den Eintrag von Uracil in das Genom, aber keine Untersuchungen die eindeutig belegen, welcher der Wege der bedeutsamste ist. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit geklärt werden, welcher dieser endogenen Wege für den Haupteintrag an Uracil verantwortlich ist.

Da der Uracilmetabolismus ein wichtiges Traget in der humanen Krebstherapie ist, sollte an den *ung-knockout*-Zellen ferner der Wirkmechanismus klinisch verwendeter Fluoropyrimidine untersucht werden. Auch wenn 5-Fluoruracil als Fluoranalogenes des Uracils weltweit erfolgreich eingesetzt wird, so ist zur Zeit immer noch unklar, wie der genaue Wirkmechanismus ist. Bisher wurde angenommen, dass der durch 5-FU verstärkte Uracileinbau in die DNA zu einem Teufelskreis aus Reparatur und erneutem Fehleinbau führt, was schließlich den Tod der Zelle verursacht. Diese Theorie ist noch nicht abschließend bewiesen. Daher sollte in dieser Arbeit geklärt werden, ob dieser Fehleinbau und die anschließende Reparatur für die Toxizität der Fluorpyrimidine notwendig sind.

Weiterhin sollte anhand transgener Zellen der Einfluss verschiedener Enzyme des Fremdstoffmetabolismus auf die basalen Gleichgewichtsspiegel oxidativer Basenmodifikationen untersucht werden. Mit Hilfe von Säugerzellen, die durch Transfektion das humane Enzym Cytochromreduktase und das ebenfalls humane Cytochrom 2E1 überexprimieren, sollte der mögliche Beitrag dieser Enzyme zur genetischen Instabilität des Genoms beleuchtet werden. Von beiden Enzymen ist bekannt, dass sie aufgrund einer Entkoppelung der Elektronentransportkette zur Oxygenierung des Substrats in der Lage sind, Superoxid zu generieren. Daher sollte geklärt werden, ob die so gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in der Lage sind, die DNA zu schädigen. Im Falle des Cytochroms 2E1 sollte außerdem die Bedeutung des Ethanolmetabolismus für die Integrität der DNA untersucht werden. Da Cytochromreduktase zum Redoxcycling chinoider Substanzen in der Lage ist, sollte mit Hilfe eines Chinons als Modellschubstanz die Auswirkungen der endogen generierten ROS auf die DNA und die Zellviabilität untersucht werden.

Beide experimentellen Ansätze sollen somit Einblick in die Ursachen endogener DNA-Schäden und deren Beitrag zur einer möglichen genetischen Instabilität aufzeigen.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte

Analysenwaage	AG245, max. 210 g (Mettler Toledo, Schweiz)
Autoklav	Tecnoclav 50 6.0, bzw. 2.0 (Fedegari Autoklav, SPA, Albuzzo, Italien)
Bakterienschüttler	Certomat H (Braun)
Brutschrank Zellkultur	CO <sub>2</sub> -Inkubator BB16, BB6060 O <sub>2</sub> und Hera-Cell (Heraeus Instruments, Hanau)
Brutschrank Bakterien	Kelvitron E, B6200 (Heraeus Instruments, Hanau)
Computer	Microstar, AMD Duron, 1.4 GHz, Windows XP
Coulter Counter	Modell N Industry (Coulter Electronics, Luton, Großbritannien)
Destillationsapparatur	Destamat® (Heraeus, Hanau)
Elektrophoresekammer	Biorad, Hercules, CA, USA
Fluoreszenz-Mikroskop	Eclipse E400, Nikon, Düsseldorf
Fluorimeter	TKO 100, DNA Fluorimeter (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA)
Folienschweißgerät	Typ 255 (Fa. Schott)
Fraktionssammler	Ultrorac 2070 II (Pharmacia/LKB, Uppsala, Schweden) und MM10, Neolab 4 mit Zeitnehmer SM 999 (Neolab, Heidelberg)
Gefrierschrank (-20° C)	KG 3666-23 (Liebherr)
Gefrierschrank (-70° C)	Colora UF 85-300S (Colora, Lorch)
Geldokumentationsapparatur (Geldok)	Eagle Eye II (Stratagene)
Heißluftsterilisator	WTC Binder, Tuttlingen
Kryobehälter (Zellen)	Flüssigstickstoffcontainer TW 750 RS (Taylor Wharton, Theodore, AL, USA)
Kühlschränke	KG 3666-32 (Liebherr)
Lichtmikroskop	Telaval 31 (Zeiss, Oberkochen)
Magnetrührer	Ikamag RET-G (Ika-Werk, Janke&Kunkel GmbH & Co KG, Staufen im Breisgau)
Multipette	Eppendorf GmbH, Hamburg
Orbitalschüttler	Elmi Shaker S4
PCR-Cycler	Mastercycler gradient (Eppendorf)

Peristaltik-Pumpe	ISM 759, 20 Kanäle, mit Schläuchen (Ismatec Laboratoriumstechnik, Schweiz)
pH-Meter	PHM 62 (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark)
Pipetten	Pipetman P20, P100, P 200, P 1000, P 5000, P 10000 (Gilson, Frankreich)
Pipettierhilfe	Pipetus-akku® (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)
Pumpe	Desaga, Heidelberg, Deutschland
Rotoren für Kühlzentrifuge	SS-34, GS-3 (Sorvall, New.t.on, Conn., USA)
Schüttelbäder	heizbar bis 100 °C (Köttermann GmbH & Co., Uetze-Hänigsen)
Spannungsquelle	Power PAC 3000 (BioRad, Hercules, CA, USA)
Spectralphotometer	Hitachi U-2000 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)
Sterile Werkbank	LaminAir® HB2472 und HB 2448 (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
Trockenschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Tropfentrichter (Cytospin)	Shandon Cytoclip (Shandon. Pittsburg, USA)
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 (Bandelin Electronic, Berlin)
Ultraschallstab	Sonoplus Homogenisator HD 70 mit Sonotrode MS 73 und HF-Generator GM 70, 70 W, 20 kHz (Bachofer, Reutlingen)
Ultraschall-Homogenisator	Vibracell 72408 (BioBlock Scientific)
UV/VIS Photometer	Ultraspec II, LKB-Biochrom (Biochrom, Cambridge, England)
Vortexer	Vortex Genie 2, Model G-560E (Scientific Industries, INC, Bohemia, NY, USA)
Waage	PB 3002, Delta Range, max. 3100 g (Mettler Toledo, Schweiz)
Wasserbad (heizbar bis 100 °C)	Köttermann Type 3042 (Köttermann GmbH & Co, Uetze-Hänigsen)
Wasserbad	Haake K, Haake LH mit Kältethermostat Haake F3 (Haake, Karlsruhe)
Wasserbad	Haake Fisons W19 mit Thermostat Haake D8 (Haake, Karlsruhe)
Zählkammer (Zellen)	Neubauer Kammer (Marienfeld, Deutschland)
Zellsieb	Edelstahl-Gaze, Maschenweite 100 µM (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Zentrifugen	Hettich Universal/K2S, Hettich Micro Rapid (Hettich, Tuttlingen), Biofuge 28RS und Sigma 3K-2 (Heraeus Instruments GmbH, Osterode am Harz)
Zytozentrifuge	Cytospin 3 (Shandon, Astmoor, England)

### 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Deckgläser	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Einmalspritzen (Plastik)	2 ml PRIMO (Codan Medical ApS, Roedby, Dänemark), 5 ml/10 ml Quadroject Plus (Dispomed WITT oHG, Gelnhausen-Hailer)
Filter (Alkalische Elution)	Isopore™, Polycarbonat-Membran, 2 µm, Ø 25 mm (Millipore, Irland)
Filterhalter (Alkalische Elution)	Swinnex SX 2500 (Millipore, Holstein, Frankreich)
Filterpapier und Faltenfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Fluoreszenzküvetten	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Glasgeräte	Schott Spezialglas GmbH, Mainz
Glaspipetten (Zellkultur)	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Infusionsset mit Flügelkanüle (Butterfly)	0,8 mm x 20 mm (Vivo-Med, Bad Rappenau)
Kanülen, steril	21G x 1½, Nr. 2 (Dispomed WITT oHG, Gelnhausen-Hailer)
Kryo-Röhrchen, steril	Nunc Kryo, 1,5 ml (A/S Nunc, Roskilde, Dänemark)
Kultur-Röhrchen, steril	PP (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Lochfilter	Shandon Filter Cards (Schleicher & Schuell, Würzburg)
Multipettenaufsätze	Combitips 50 ml (Eppendorf AG, Hamburg)
Objektträger	geschnitten, mit Mattrand (A.Hartenstein GmbH, Würzburg))
Pasteurpipetten	Flint Glass (Chase Instruments Corp., Glen Falls, NY, USA)
Pipettenspitzen (Einweg)	(A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Plastik-Reaktionsgefäße	500 µl, 1500 µl, 2000 µl (Eppendorf AG, Hamburg)
Software	MS Office XP Pro, Adobe Acrobat 6.0
Spritzen (Alkalische Elution)	20cc-Syringe, Luerlock (Becton Dickinson & Co., Rutherford, USA)
Sterilfilter	Porengröße 0,22 µm (Schleicher & Schuell, Dassel)
Zellkulturflaschen, steril	Greiner GmbH, Nürtingen
Zellkulturschaber, steril	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Zellsieb, steril	100µm Maschenweite, Falcon
Zentrifugenröhrchen, Plastik	15 ml, 50 ml (Greiner GmbH, Nürtingen)

### 4.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Alle Chemikalien und Reagenzien wurden in p.a.-Qualität bestellt.

DL-Buthioninsulfoxim	Sigma Aldrich, Steinheim
----------------------	--------------------------

---

Agarose, low melt (Typ I, low EEO)	Sigma Aldrich, Steinheim
Agarose, high melt, Type 1 (A6013)	Sigma Aldrich, Steinheim
Aktivkohle	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Bisbenzimid (Hoechst Nr. 33258)	Sigma Aldrich, Steinheim
Buthioninsulfoximin	Sigma Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Carbogen (95 % O <sub>2</sub> , 5 % CO <sub>2</sub> )	Linde, Höllriegelskreith
Concanavalin A (ConA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich, Steinheim
DMEM high Glucose Medium	PAA, Cölbe
DMEM-Medium, Phenolrot-frei	Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich, Steinheim
DTNB, Ellmann´s Reagenz (5,5´-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure))	Sigma Aldrich, Steinheim
Durochinon (Tetramethyl-p-benzochinon)	Sigma Aldrich, Steinheim
Eindeckmittel EDL-2	Linaris, Bettingen am Main
EDTA (Tetramethylethylendiamin)	Merck, Darmstadt
Eichlösungen Puffer (pH 5, 7, 8, 10, 11)	Sigma Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
5-Fluoruracil (F-6627)	Sigma Aldrich, Steinheim
5- Fluordesoxyuridin (F-0503) (5-Fluor-2´-desoxyuridin)	Sigma Aldrich, Steinheim
D-Glucose x 1 H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin 200 mM	PAA, Cölbe
Glutathion, reduziert (Glu-Cys-Gly)	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycerol	VWR International GmbH, Darmstadt
Glycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Ham´s F12 Kulturmedium	PAA, Cölbe
HEPES ([N-2-Hydroxyethyl]-piperazin-N´- [2-ethansulfonsäure])	Sigma Aldrich, Steinheim
Insulin (I-5500)	Sigma Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kälberserum, fetales	PAA, Cölbe
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Kaliumhydrogenphosphat x 3 H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Kohlendioxid (CO <sub>2</sub> )	Linde, Höllriegeskrauth
L-Alanin	Sigma Aldrich, Steinheim



---

L-Arginin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Asparagin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Asparaginsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Citrullin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Cystein	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Glutaminsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Histidin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Isoleucin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Leucin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Lysin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Methionin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Ornithin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Phenylalanin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Prolin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Serin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Threonin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Tryptophan	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Tyrosin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Valin	Sigma Aldrich, Steinheim
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat x 7 H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
MEM Non-essential amino acid solution	Sigma, Aldrich, Steinheim
Methanol, Roti®solv (HPLC gradient grade)	Roth, Karlsruhe
NADPH, Tetranatriumsalz	Boehringer, Mannheim
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat x 1 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAA, Cölbe
Pentobarbital (Na-Salz)	Boehringer Ingelheim, Ingelheim
RBC-Lysepuffer (red blood cell-lysis-buffer)	eBioscience, London
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim und Roth, Karlsruhe
Salzsäure 25 %, 37 %	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure 96 %	Merck, Darmstadt
Tetraethylammoniumhydroxid (TEAH)	Merck, Darmstadt

Trichloressigsäure (TCA)	Serva, Heidelberg
TRIS-Base (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Sigma Aldrich, Steinheim
Tris-HCl	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypanblau-Lösung 0,4%ig	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin /EDTA-Lösung	PAA, Cölbe

#### 4.1.4 Enzyme und Enzympuffer

Ung2	Uracil-DNA Glykosylase (UNG $\Delta$ 84), Präparation nach <i>Nilsen (Nilsen et al., 2000)</i> , hergestellt durch G. Daly (London)
Ung2-Einfrierpuffer	50 mM Tris, pH 8,0 1 mM EDTA, pH 7,3 140 mM NaCl Nach dem Autoklavieren 10 % Glycerol und 1 mM DTT zufügen. pH-Wert wird nicht eingestellt.
T4 Endonuklease V ( <i>E. coli</i> )	Präparation nach <i>Nakabeppu (Nakabeppu et al., 1982)</i> , modifiziert durch <i>Pflaum (Pflaum, 1996)</i> , hergestellt durch M. Pflaum bzw. C. Flohr-Beckhaus und I. Schulz (Mainz)
Endonuklease IV	zur Verfügung gestellt von B. Demple (Harvard University, Cambridge, USA)
Fpg	(Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase), Rohpräparation hergestellt nach <i>Boiteux (Boiteux, 1990)</i> , von M. Pflaum bzw. M. Osterod (Mainz)
Glutathionreduktase	600 U/ml (Boehringer, Mannheim)
Proteinase K	lyophilisiert, aus <i>Tritirachium albidum</i> (Roth, Karlsruhe)
Kollagenase (zur Perfusion)	Typ 1A, 824 U/mg, Sigma Aldrich, Steinheim, Best.Nr. C26-74, LOT 117H8620

### 4.1.5 Materialien für molekularbiologische Arbeiten

PCR	Thermozyme®, Invitrogen Taq-Polymerase, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Arand, eigene Herstellung																				
Taq-Puffer	200 mM Tris-HCl, pH 8,8 100 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 100 mM KCl 20 mM MgSO <sub>4</sub> 1 % Triton-X-100 1 mg/ml BSA (nucleasefrei)																				
Primer	MWG Biotech																				
Reverse Transkription	Ready-to-Go®, Amersham																				
Ligation	TOPO TA-Cloning-set®, Invitrogen																				
Gel-Extraktionen	Qiaex II, Gel extraction kit® von Quiagen																				
Midi-Präparation der Plasmid-DNA	Plasmid Midi Kit® von Quiagen																				
div. Restriktionsenzyme für Kontrollverdaue	New England Biolabs																				
Marker	pBR 322 DNA / Alu I, New England Biolabs Fragmentmuster: <table border="1"> <thead> <tr> <th>bp</th> <th>DNA-Menge [ng]</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>908</td> <td>42</td> </tr> <tr> <td>659</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>656</td> <td>60</td> </tr> <tr> <td>521</td> <td>23</td> </tr> <tr> <td>403</td> <td>18</td> </tr> <tr> <td>281</td> <td>13</td> </tr> <tr> <td>257</td> <td>12</td> </tr> <tr> <td>226</td> <td>10</td> </tr> <tr> <td>100</td> <td>4,6</td> </tr> </tbody> </table>	bp	DNA-Menge [ng]	908	42	659	60	656	60	521	23	403	18	281	13	257	12	226	10	100	4,6
bp	DNA-Menge [ng]																				
908	42																				
659	60																				
656	60																				
521	23																				
403	18																				
281	13																				
257	12																				
226	10																				
100	4,6																				
Transfektion	Polyfect®, Quiagen																				

Eukaryontischer Expressionsvektor	pMPSV E/H (Artelt et al., 1988), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Arand
Transformation	C600 <i>E. coli</i> , freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Arand
RNA-Präparation	RNeasy®, Quiagen
Selektionsantibiotikum	Puromycin, Sigma Aldrich, Steinheim 5 µg/ml ab 3. Tag nach der Transfektion

#### 4.1.6 Verwendete Zelllinien und Versuchstiere

Sämtliche Kulturmedien der verwendeten Zelllinien sind in Kapitel 4.1.7.1 beschrieben.

##### Maus-Embryofibroblasten (MEFs):

<i>ung</i> <sup>-/-</sup> :	Immortalisierte Maus-Embryofibroblasten von <i>ung</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen erhalten von D. E. Barnes (Imperial Cancer Research Fund, Clare hall Laboratories, South Mimms, Großbritannien). Generierung beschrieben in: (Nilsen et al., 2000) Zellen sind defizient in Uracil-DNA Glycosylase ( <i>knockout</i> ). Verdopplungszeit: 24-26 h
<i>ung</i> <sup>+/+</sup> :	Immortalisierte Maus-Embryofibroblasten von <i>ung</i> <sup>+/+</sup> -Mäusen erhalten von D. E. Barnes (Imperial Cancer Research Fund, Clare hall Laboratories, South Mimms, Großbritannien). Generierung beschrieben in: (Nilsen et al., 2000) Zellen sind profizient für Uracil-DNA-Glycosylase (Wildtyp, auch F11.1 genannt) Verdopplungszeit: 22 h
<i>csb</i> <sup>-/-</sup> / <i>ogg1</i> <sup>-/-</sup>	Immortalisierte Maus-Embryofibroblasten von <i>mcsb</i> <sup>-/-</sup> / <i>mogg1</i> <sup>-/-</sup> - <i>double-knockout</i> -Mäusen erhalten von A.-Klungland (Department of Molecular Biology, The National Hospital, University of Oslo, 0027 Oslo). Zellen sind defizient in Ogg1- und Csb-Protein. Verdopplungszeit: 22 h
MEF( <i>csb</i> <sup>-/-</sup> / <i>ogg1</i> <sup>-/-</sup> ) <i>CYP2E1</i>	Zelllinie aus Transfektion von <i>csb</i> <sup>-/-</sup> / <i>ogg1</i> <sup>-/-</sup> -Zellen mit Cytochrom 2E1-haltigem Expressionsvektor erhalten (siehe Kapitel 4.2.1.7). Profizient im humanen Enzym Cytochrom 2E1. Verdopplungszeit: 24 h
Vector-only Kontrollen	Zelllinie aus Transfektion von <i>csb</i> <sup>-/-</sup> / <i>ogg1</i> <sup>-/-</sup> -Zellen mit leerem (ohne Insert) Expressionsvektor erhalten. Zellen exprimieren kein Cytochrom 2E1. Verdopplungszeit: 24 h

**V79-Zelllinien:**

- V79                      Immortalisierte Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters erhalten von Prof. H.R. Glatt (Potsdam-Rehbrücke), Wildtypzellen, auch V79-MZ genannt. Generierung beschrieben in: (Hermersdörfer et al., 1997)  
Verdopplungszeit: 20-22 h
- V79-CYP2E1            Immortalisierte Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters erhalten von Prof. H.R. Glatt (Potsdam-Rehbrücke), Zellen überexprimieren humanes Cytochrom 2E1 und humane Sulfotransferase, auch V79-CYP2E1-SULT111 genannt.  
Verdopplungszeit: 24 h. Generierung beschrieben in (Liu et al., 2003).
- V79-hOR                Immortalisierte Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters erhalten von Prof. H.R. Glatt (Potsdam-Rehbrücke), Zellen überexprimieren humane **Oxidoreduktase**. Generierung beschrieben in: (Hermersdörfer et al., 1997)  
Verdopplungszeit: 24 h

**Versuchstiere:**

- ung*<sup>-/-</sup>-Mäuse:            6-7 Monate alte männliche Tiere erhalten von Sonja Andersen (Institute of Cancer Research and Molecular Medicine, Universität Trondheim, Norwegen). Generierung beschrieben in: Nilsen, 2000a
- Wildtyp-Mäuse:        C57/BL6-Mäuse, 5-6 Monate alte männliche Tiere wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und in eigener Zucht des Tierstalls der Universität Mainz vermehrt. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen am Institut für Toxikologie der Universität Mainz gehalten und mit Futter-Pellets sowie Trinkwasser versorgt. Wildtyp-Mäuse wurden unter SPF-Bedingungen gehalten.

Maus-Nr.	Versuchsnummer	Geschlecht	Typ	Alter bei Versuch [Monate]
1	27AETH	M	<i>ung</i> <sup>-/-</sup>	7
2	65AETH	M	<i>ung</i> <sup>-/-</sup>	6
3	68AETH	M	<i>ung</i> <sup>-/-</sup>	6
4	70AETH	M	<i>ung</i> <sup>-/-</sup>	6
5	71AETH	M	<i>ung</i> <sup>-/-</sup>	6
6	72AETH	M	<i>ung</i> <sup>-/-</sup>	6
7	59AETH	M	Wildtyp	5-6
8	60AETH	M	Wildtyp	5-6
9	62AETH	M	Wildtyp	5-6
10	71AETH	M	Wildtyp	5-6
11	72AETH	M	Wildtyp	5-6

Tabelle 3: Übersicht aller verwendeter Versuchstiere mit Versuchsnummer, Geschlecht, Genotyp und Alter.

## 4.1.7 Hergestellte Lösungen und Puffer

### 4.1.7.1 Zellkultur

PBSCMF (10X)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,3 mM NaHPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBSCMF (1X, autoklaviert)	100 ml PBSCMF (10 X) ad 1 l mit H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Kulturmedium für MEFs	Ham's F12 + DMEM high glucose mit Glutamin und 1 % Pyruvat (1:1 gemischt) 10 % FCS 1 % Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml) 1% MEM Non-essential amino acid solution
Kulturmedium für V79-Zellen	DMEM high Glucose mit Glutamin, ohne Pyruvat 5 % FCS 1 % Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml)

Kulturmedium für primäre Milzzellen	RPMI 1640 ohne Glutamin 10 % hitzeinaktiviertes FCS 2 mM Glutamin 1 % Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml) 50 µM Mercaptoethanol
Kulturmedium für primäre Milzzellen (mit Proliferationsstimuli)	RPMI 1640 ohne Glutamin 10 % hitzeinaktiviertes FCS 0,03 % L-Glutamin 1 % Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml) 50 µM Mercaptoethanol 5 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS) 1 µg/ml Concanavalin A (ConA)

#### 4.1.7.2 Schädigung der Zellen

##### *Thymidylatsynthasehemmer-Lösungen zur Inkubation von Mausfibroblasten:*

5-Fluoruracil-Stammlösung	1,8 mg in 13,84 ml Medium ohne Zusätze lösen (=1 mM), sterilfiltrieren
5-Fluoruracil-Versuchslösung	100 µl 5-Fluoruracil-Stammlösung verdünnen mit 900 µl Medium ohne Zusätze (=0,1 mM), aliquotieren, Lagerung bei -20 °C
5-Fluordesoxyuridin-Stammlösung	100 mg in 10 ml Medium ohne Zusätze lösen (41 mM), sterilfiltrieren
5-Fluordesoxyuridin-Vorverdünnung	24,4 µl 5-Fluordesoxyuridin-Stammlösung mit 975,6 µl PBSCMF verdünnen (1 mM)
5-Fluordesoxyuridin-Versuchslösung	100 µl 5-Fluordesoxyuridin-Vorverdünnung mischen mit 4900 µl PBSCMF, aliquotieren, Lagerung bei -20°C

##### *Durochinonlösungen zur Inkubation von V79-Zellen:*

Durochinon-Stammlösung	32,8 mg lösen in 10 ml Aceton (=2 mM)
Durochinon-Vorverdünnung	2,5 ml Durochinon-Stammlösung mischen mit 2,5 ml Aceton (=1 mM)
Durochinon-Versuchslösung	2,5 ml Durochinon-Vorverdünnung mischen mit 2,5 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> (=500 µM), sterilfiltrieren, aliquotieren, Lagerung bei -20 °C

Lösungsmittel-Kontrolle 5 ml Aceton mischen mit 5 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>, sterilfiltrieren, Lagerung bei -20 °C

#### 4.1.7.3 *Glutathion-Depletion*

Buthioninsulfoximin-Stammlösung 33,5 mg in 15 ml Vollmedium lösen, gut vortexen (=10 mM), frisch angesetzt  
Einsatz bei mittleren Zellkulturflaschen:  
9 ml Kulturmedium + 1 ml BSO-Stammlösung  
Einsatz bei kleinen Zellkulturflaschen:  
4,5 ml Kulturmedium + 0,5 ml BSO-Stammlösung

#### 4.1.7.4 *Glutathion-Gehalt*

TCA-Puffer 5 ml 20%ige Trichloressigsäure (m/v)  
40 µl EDTA, 0,5 M  
2 ml HCl, 1 N  
ad 60 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

Phosphat/EDTA-Puffer 7,98 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
0,86 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,125 M Phosphat)  
1,18 g Na<sub>2</sub>EDTA (6,3 mM EDTA)  
ad 500 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>, pH 7,5, autoklaviert

Phosphat/NADPH-Lösung 0,3 mM Na<sub>4</sub>NADPH  
bei 4 °C drei Tage lang verwendbar

DTNB-Reagenz 6 mM DTNB in Phosphat/EDTA-Puffer  
bei 4 °C sieben Tage lang verwendbar

Glutathion-Standardlösung 20 mM Glutathion (reduziert) in Phosphat/EDTA-Puffer, frisch angesetzt

#### 4.1.7.5 *Alkalische Elution*

PBSCMF (10X) 137 mM NaCl  
2,7 mM KCl  
8,3 mM NaHPO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

PBSCMF (1X) 100 ml PBSCMF (10 X)  
ad 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>, autoklaviert



---

BE <sub>1</sub> -Puffer	100 mM NaCl 20 mM Tris-HCl 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA pH 7,5; autoklaviert
BE <sub>1</sub> /BSA-Puffer	26 ml BE1-Puffer 13 mg Rinderserumalbumin (BSA) pH 7,5; frisch angesetzt
BE <sub>15</sub> -Puffer	20 mM Tris-HCl 75 mM KCl 15 mM Na <sub>2</sub> EDTA pH 7,5, autoklaviert
BE <sub>15</sub> /BSA-Puffer	20 ml BE15/BSA-Puffer 10 mg Rinderserumalbumin (BSA) pH 7,5, frisch angesetzt
Ung2-Assay-Puffer	20 mM Tris-HCL, pH 8,0 100 mM NaCl 1 mM EDTA, pH 7,3 autoklaviert, keine pH-Wert-Einstellung
Ung2-Assay-Puffer/BSA	26 ml Ung2-Assay-Puffer 13 mg Rinderserumalbumin (BSA) frisch angesetzt
Lysepuffer	100 mM Glycin 20 mM Na <sub>2</sub> EDTA 2 % SDS pH 10
Lysepuffer/Proteinase K	100 ml Lysepuffer 40 mg Proteinase K frisch angesetzt
Waschpuffer	20 mM Na <sub>2</sub> EDTA pH 10, autoklaviert
Elutionspuffer	20 mM EDTA pH 12,15, pH-Einstellung mit TEAH

---

Bisbenzimid (Hoechst No. 33258) -Stammlösung	0,15 mM in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> (Lagerung aliquotiert bei -20 °C)
Phosphatpuffer	87,7 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 12,9 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 6; autoklaviert
Phosphatpuffer	28 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 72 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> pH 7,2; autoklaviert
Phosphatpuffer (pH 7,2)/Bisbenzimid	1 % (v/v) Bisbenzimid-Stammlösung in Phosphatpuffer (pH 7,2), frisch und lichtgeschützt angesetzt

#### 4.1.7.6 Mikroerntest

Bisbenzimid (Hoechst No. 33258) -Stammlösung	0,15 mM in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> (Lagerung aliquotiert bei -20 °C)
PBSCMF (10X)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,3 mM NaHPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
PBSCMF (1X)	100 ml PBSCMF (10 X) ad 1 l mit H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> autokaviert
PBSCMF/Bisbenzimid	1 ml Bisbenzimid-Stammlösung ad 80 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> (Lagerung bei 4 °C)

#### 4.1.7.7 Puffer zur Isolierung von Primärzellen

Folgende Stamm-Lösungen werden zur Isolierung der Primärzellen benötigt:

Glucose-Lösung	50 mM D (+) Glucose x H <sub>2</sub> O
----------------	--

Krebs-Henseleit-Puffer	1000 mM NaCl 24 mM KCl 12 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,6 (NaOH)
HEPES-Puffer 8,5	250 mM HEPES (freie Säure) pH 8,5
HEPES-Puffer 7,6	250 mM HEPES (freie Säure) pH 7,6
Aminosäure-Lösung	3,0 mM L-Alanin 1,0 mM L-Asparaginsäure 3,0 mM L-Asparagin 1,5 mM L-Citrullin 0,8 mM L-Cystein 6,4 mM L-Histidin 6,8 mM L-Glutaminsäure 13,3 mM Glycin 3,0 mM L-Isoleucin 6,1 mM L-Leucin 7,1 mM L-Lysin 3,7 mM L-Methionin 3,8 mM L-Ornithin 3,3 mM L-Phenylalanin 4,8 mM L-Prolin 6,2 mM L-Serin 11,3 mM L-Threonin 3,2 mM L-Tryptophan 3,0 mM L-Tyrosin 6,8 mM L-Valin

Die Aminosäuren werden in H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> aufgenommen. Nach 20 min Rühren wird mit 5 M NaOH ein pH-Wert von 11 eingestellt und weitere 10 min gerührt. Durch Zugabe von 37%iger HCl wird der pH-Wert auf 7,6 eingestellt und die Lösung mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf das endgültige Volumen aufgefüllt. Die Lösung wird sterilfiltriert und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die Haltbarkeit beträgt 1-2 Monate.

Glutamin-Lösung	48 mM L-Glutamin pH 7,6
-----------------	----------------------------

Die Lösung wird sterilfiltriert, in Portionen zu 10 ml eingefroren und bei -20°C gelagert.



Suspensions-Puffer	620 ml	Glucose-Lösung
	100 ml	Krebs-Henseleit-Puffer
	100 ml	HEPES-Puffer 7,6
	150 ml	Aminosäure-Lösung
	10 ml	Glutamin-Lösung
	5 ml	Insulin-Lösung
	8 ml	CaCl <sub>2</sub> -Lösung
	4 ml	MgSO <sub>4</sub> -Lösung
	2 g	BSA

2 g BSA werden auf ca. 30 ml 4°C kalten Suspensionspuffer in einem separaten Greinerröhrchen gestreut und ca. 10 min auf Eis stehen gelassen. Das BSA löst sich nach starkem Schütteln im Puffer. Jetzt kann diese BSA-Suspensionspufferlösung zum verbliebenen Suspensions-Puffer gegeben werden.

Erythrozyten-Lysepuffer	155 mM NH <sub>4</sub> Cl
	10 mM KHCO <sub>3</sub>
	1 mM EDTA
	pH 7,4, autoklaviert, Lagerung bei 4° C

#### 4.1.7.8 *Stimulation von primären Milzzellen*

Lipoploysaccharid-Stammlösung	2 g lösen in 10 ml Medium ohne Zusätze Einsatz: 5 µl/well mit 200 µl Inhalt
Concanavalin A-Stammlösung	400 µg lösen in 10 ml Medium ohne Zusätze Einsatz: 5 µl/well mit 200 µl Inhalt

#### 4.1.7.9 *Comet Assay*

Lysepuffer	2,5 M NaCl 0,1 M EDTA, pH 8,0 10 mM Tris, pH 8,0 pH 10, Lagerung bei 4 °C, Kurz vor Gebrauch Zugabe von 1% Triton-X-100
low melt Agarose	500 mg lösen durch Erwärmen (Mikrowelle) in 50 ml PBSCMF, Lagerung aliquotiert in Plastikröhrchen bei 4 °C, bei Bedarf in der Mikrowelle erwärmen
high melt Agarose	1 g lösen durch Erwärmen (Mikrowelle) in 100 ml H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

Ung2-Comet-Puffer	20 mM Tris-HCL, pH 7,5 60 mM NaCl 1 mM EDTA, pH 8,0 keine pH-Wert-Einstellung
Elektrophoresepuffer	0,3 M NaOH 1 mM EDTA, pH 8,0
Neutralisierungslösung	0,4 M Tris-HCL pH 7,5
Ethidiumbromid-Färbelösung	15 µg/ ml lösen in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Zellkultur

#### 4.2.1.1 Allgemeine Zellpflege

Für alle Zellkulturarbeiten wurde in einer Laminar-Flow-Box (Sterilwerkbank) unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Die Kultivierung der Zellen erfolgt in Kulturflaschen mit Filter bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 99 % Luftfeuchtigkeit in Brutschränken (= Kulturbedingungen).

Die Verdopplungszeit der Zellen (siehe Kapitel 4.1.6) gibt den wöchentlichen Rhythmus der Zellpflege vor. Grundsätzlich wurde Konfluenz und zu dünnes Ausstreuen der Zellen vermieden. Bei Mausfibroblasten wurden für die Subkultur mindestens 500 000 Zellen und bei V79-Zellen mindestens 1 Mio Zellen pro mittlere Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) kultiviert. Zur Vermeidung von Konfluenz wurden Mausfibroblasten höchstens bis zu einer Zellmenge von 6-8 Mio pro mittlere Flasche und V79-Zellen bis höchstens 15 Mio Zellen pro mittlere Flasche kultiviert. Bei einer zu ca. 80 % voll bewachsenen Zellkulturflasche wird der Zellrasen abgelöst. Dabei wird zunächst das alte Medium abgesaugt, der Zellrasen mit 10 ml PBSCMF gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert (V79-Zellen: 1-2 min, Mausfibroblasten: 3-4 min), wobei das Trypsin die Kollagenfasern zwischen den Zellen und dem Boden der Kulturflasche verdaut. Nachdem sich die Zellen durch leichtes Abklopfen des Flaschenbodens von diesem lösen, wird der Prozeß mittels Lichtmikroskop kontrolliert. Danach werden die Zellen in 8 ml Kulturmedium resuspendiert und durch Auf- und Abpipettieren mit einer 5 ml-Pipette vereinzelt. Das im Medium enthaltene FCS inaktiviert dabei die Enzymaktivität des Trypsins. Um die

Zellzahl zu bestimmen, wird eine mit Isoton II (physiologische Kochsalzlösung) 1:50 verdünnte Zellsuspension im Coulter Counter® gezählt. Um einer Veränderung der Zellen während der Kulturphase vorzubeugen, wurden alle Zellen maximal 40 Passagen lang kultiviert, danach wurden kryokonservierte Zellen neu aufgetaut. V79-hOR Zellen wurden maximal bis Passage 15 kultiviert, da mit steigender Passagenzahl eine Abnahme der Reduktaseaktivität gezeigt werden konnte (Hermersdörfer, 1997).

#### 4.2.1.2 *Kryokonservierung und Auftauen von Zellen*

Die Langzeitlagerung der verwendeten Zelllinien erfolgt in flüssigen Stickstoff. Zur Vorbereitung dieser Lagerung löst man die Zellen wie unter 4.2.1.1 beschrieben ab und zentrifugiert die resuspendierte Zellsuspension in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge bei 1000xg für 5 min ab. Nach Abdekantieren des Überstandes wird das Zellpellet in vorgekühltem Medium, dem zuvor 10 % DMSO zugesetzt wurde, aufgenommen. Die Zelldichte sollte dabei 2-8 Mio Zellen/ml betragen. In Aliquots von 1 ml pipettiert man die Suspension in beschriftete, bei -20 °C vorgekühlte Kryoröhrchen und lagert diese sofort für zwei Stunden bei -20 °C. Anschließend werden die Röhrchen über Nacht bei -70 °C aufbewahrt, bevor sie in den Stickstofftank überführt werden.

Zum Auftauen von Zellen wird das Kryoröhrchen in der Handwärme angetaut, bis sich die Suspension vom Rand des Röhrchens löst. Sofort danach wird der Inhalt in ein steriles, mit 20 ml kaltem Medium gefülltes 50 ml-Röhrchen überführt und bei 4 °C in einer vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert (1000xg, 5 min). Der Überstand wird abdekantiert, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt. Nach einer 24stündigen Lagerung im Brutschrank wird das Medium gewechselt oder gegebenenfalls werden die Zellen wie oben beschrieben abgelöst und in eine größere Flasche überführt. Nach dem Auftauen von Zellen werden diese mindestens über zwei Passagen kultiviert, bevor sie für Experimente verwendet werden.

#### 4.2.1.3 *Isolierung von Hepatozyten*

Die Hepatozyten der Maus werden mit Hilfe einer modifizierten EGTA/Kollagenase Perfusions-Technik nach Seglen (1976) und Hengstler *et al.* (2000a) isoliert, wie in Abbildung 18 schematisch dargestellt.

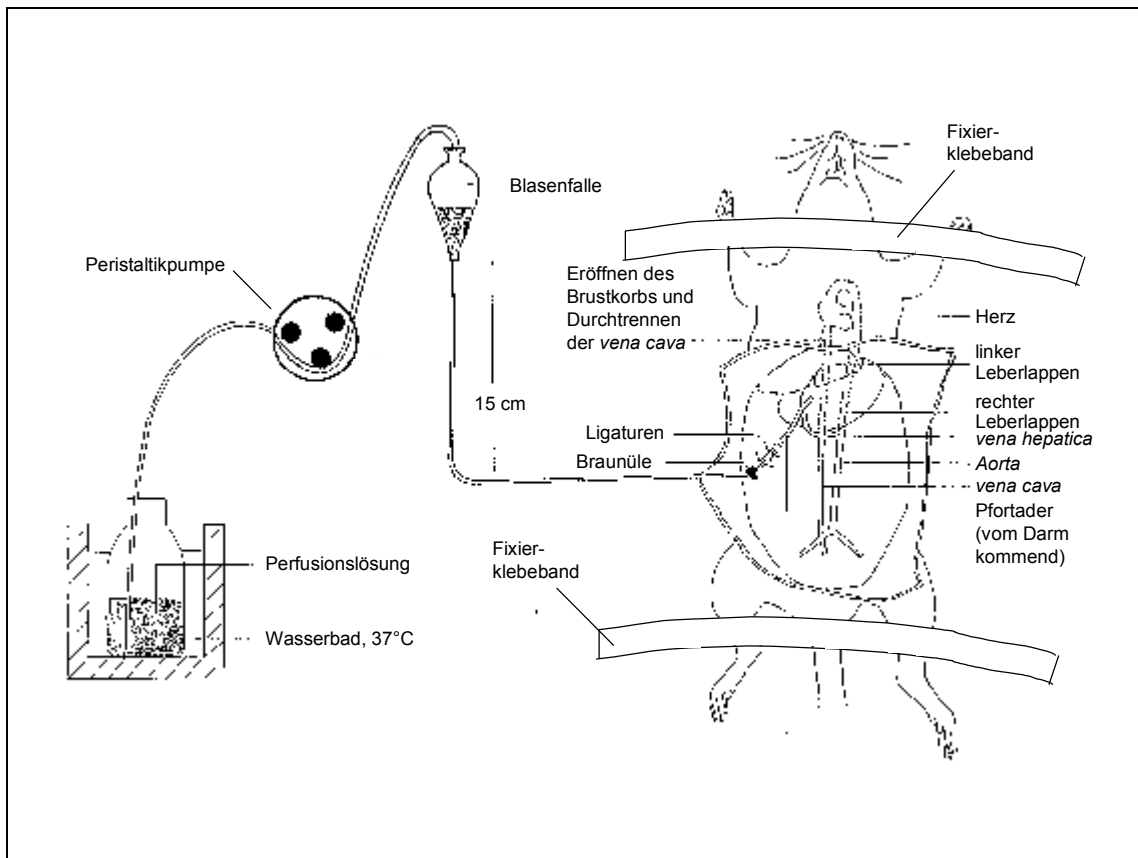


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Leberperfusion in vivo (nicht maßstabsgetreu) (Hengstler et al., 2000).

Die Betäubung der Tiere erfolgt durch Injektion von Pentobarbital (i.p.; 60 mg/kg KG). Die betäubte Maus wird rücklings mit Leukosilk®-Klebestreifen an den Gliedmaßen auf einem Drahtgestell befestigt. Nach dem Herzstillstand wird die Bauchdecke geöffnet und die Pfortader (*vena portae*) freigelegt. Ein Teil der Pfortader, nahe der Eintrittsstelle in die Leber, wird von Fett- und Geweberesten befreit und ein 50 cm langes Stück Nähgarn aus Baumwolle unter der Pfortader durch dieses Loch hindurch geschoben. Der Faden befindet sich zu beiden Seiten des Gefäßes und wird lose zu einer Schlinge zurechtgelegt. Durch einen kleinen Schnitt in der Aderwand der Pfortader mit einer chirurgischen Schere kann die Flügelkanüle eines Infusionssets, welches mit einem Pumpenschlauch (1,5 mm Durchmesser) verbunden ist, eingeführt werden. Die Schlinge wird nun von einem Helfer zugezogen, so dass ein fester Knoten entsteht, der die Kanüle im Gefäß stabilisiert und vor einem Zurückschlagen bewahrt. Zwei Klebebänder, die über das gesamte Tier geklebt werden, dienen ebenfalls zur Fixierung der Lage des Pumpenschlauchs. Die Halsschlagader wird durchtrennt und die Leber luftblasenfrei mit EGTA-Puffer für 20 min (Pumpgeschwindigkeit max. 10 ml/min) perfundiert. Anschließend wird der Puffer gewechselt und für 30 min mit Kollagenase-Puffer perfundiert (max.



10 ml/min). EGTA- und Kollagenase-Puffer werden während der gesamten Perfusion im Wasserbad auf 37 °C temperiert und sowohl 15 min vor Verwendung wie auch während der gesamten Perfusion mit Carbogen\*) über Glasfritten durchgast (30 ml/min). Nach Beendigung der Perfusion werden die Schläuche entfernt und die Gallenblase vorsichtig, ohne sie zu zerreißen, herausgeschnitten. Sollte die Gallenblase reißen und ihr Inhalt im Kadaver auslaufen wird die Leber von außen sofort mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült. Danach wird die Leber vorsichtig aus dem Tier präpariert und in eine Petrischale mit eiskaltem Suspensions-Puffer überführt. Die Leberkapsel wird mit einer Pinzette geöffnet. Durch vorsichtiges Schütteln und Zupfen werden die Hepatozyten aus dem Gewebeverband freigesetzt. Der erhaltene hepatozytenhaltige Suspensionspuffer wird durch ein Zellsieb (Edelstahl, 100 µM Maschenweite) filtriert, um größere Gewebstücke aus der Suspension zu entfernen. Dieser Vorgang wird durch erneute Zugaben von Suspensions-Puffer zur perfundierten Leber ca. fünfmal wiederholt, bis aus dem verbliebenen Restgewebe keine Hepatozyten mehr freigesetzt werden. Die so erhaltene Hepatozytensuspension wird bei 4 °C und 15×g für 10 min zentrifugiert. Diese Zentrifugationsschritte sollten mit einer sehr langsam einstellbaren Zentrifuge durchgeführt werden (ca. 50 U/min). Sollte keine solche zur Verfügung stehen, kann die Hepatozytensuspension auch für 10 min auf Eis gelagert werden, die Zellen sinken dann durch ihr Eigengewicht nach unten. Auf keinen Fall sollte durch die Zentrifugation ein Pellet erzeugt werden, welches nur mit Hilfe einer Pipette wieder vereinzelt werden kann, dann sind die Hepatozyten irreparabel geschädigt und nicht mehr für nachfolgende Versuche verwertbar. Nach Entfernen des Überstandes mit einer Pipette wird das verbliebene Zellsediment in frischem, eiskaltem Suspensions-Puffer resuspendiert und erneut bei 4 °C und 15×g für 10 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird nochmals wiederholt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wird das Zellsediment in 50 ml Suspensions-Puffer resuspendiert und auf Eis gelagert. Anschließend erfolgt mittels Trypanblaufärbung die Bestimmung der Vitalität und der Lebendzellzahl.

\*)Carbogen enthält 5 % (v/v) CO<sub>2</sub>. Bei der Durchgasung der Perfusionspuffer kommt es zu einem Absinken des pH-Wertes. Deswegen wird für die Herstellung von EGTA- und Kollagenase-Puffer HEPES-Puffer pH 8,5 verwendet. Während der Begasung mit Carbogen wird in den verwendeten Lösungen dann ein pH-Wert von 7,6 erreicht.

#### 4.2.1.4 *Isolierung von Spermatozyten*

Im Anschluss an die Entnahme der perfundierten Leber werden Hoden und Samenleiter der männlichen Maus vorsichtig aus dem Tier präpariert und in eine Petrischale mit ca. 10 ml Suspensions-Puffer überführt, der vorher auf 37° C temperiert wurde. Mit Hilfe einer kleinen chirurgischen Schere werden die Gewebe in möglichst kleine Stücke zerschnitten. Diese Gewebssuspension wird in ein Plastik-

Zentrifugenröhrchen überführt und das Volumen durch Spülen der Schale mit temperiertem Puffer auf 50 ml ergänzt. Durch vorsichtiges Schütteln in einem Schüttelinkubator bei 37 °C mit 120 U/min für 10 min werden die vitalen Spermatozyten aus dem Gewebeverband gelöst. Die erhaltene Zellsuspension wird durch ein Zellsieb (Edelstahl, Porengröße 100 µM) filtriert, um größere Gewebstücke zu entfernen. Im Anschluss wird bei RT und 15×g für 10 min zentrifugiert. Das Röhrchen wird vorsichtig aus der Zentrifuge entnommen und 60 min bei 37 °C im Wasserbad stehen gelassen. In dieser Zeit können vitale Spermatozyten in den Überstand aufschwimmen. Nach 60 min wird der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgezogen, in ein frisches Röhrchen überführt und auf Eis gelagert. Die Anzahl der vitalen Spermatozyten im Überstand wird unter dem Mikroskop bestimmt. Hierbei muss auf die Zugabe von Trypanblau verzichtet werden, um vitale (schwimmfähige) Spermatozyten von toten Zellen unterscheiden zu können, da Trypanblau alle vitalen Spermien sofort abtötet (siehe Kapitel 4.2.1.8).

#### 4.2.1.5 *Isolierung von Milzzellen (zum Einsatz in der Alkalischen Elution)*

Die Milz wird nach der Leber und den Hoden sowie Samenleiter aus dem Kadaver präpariert. Das Organ wird in eine Petrischale mit ca. 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung überführt, die vorher auf 37 °C temperiert wurde. Mit einer chirurgischen Schere wird die Milz in möglichst kleine Stücke zerschnitten und die so erhaltene Zellsuspension in ein Plastik-Zentrifugenröhrchen überführt. Das Volumen wird durch Spülen der Schale mit vorgewärmter Trypsinlösung auf 10 ml ergänzt. Durch vorsichtiges Schütteln in einem Schüttelinkubator bei 37 °C mit 120 U/min für 10 min werden die Milzzellen aus dem Gewebeverband freigesetzt. Das Trypsin wird durch Zugabe von 40 ml eiskaltem Suspensionspuffer inaktiviert. Anschließend wird die Zellsuspension durch ein Zellsieb (Edelstahl, 100 µM Maschenweite) filtriert, um größere Gewebstücke zu entfernen. Danach wird die Zellsuspension bei 4 °C und 150×g für 10 min zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes mit einer Pipette wird das Zellpellet in 5 ml eiskaltem Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 45 ml eiskaltem Suspensionspuffer abgestoppt und die Lösung erneut bei 4 °C und 150×g für 10 min zentrifugiert. Nach Abdekantieren des Überstandes wird das Zellsediment in 10 ml Suspensions-Puffer aufgenommen und mit einer Pipette vorsichtig vereinzelt. Die Suspension wird dann mit eiskaltem Suspensionspuffer auf 50 ml ergänzt und auf Eis gelagert. Anschließend erfolgt eine Bestimmung der Vitalität und der Lebendzellzahl wie unter Kapitel 4.2.1.8 beschrieben.

#### 4.2.1.6 *Isolierung von Milzzellen (zur Kultivierung)*

Die Maus wird mittels Genickbruch getötet und der Bauchraum in einer sterilen Werkbank mit einem y-Schnitt geöffnet. Die Milz wird mit einer chirurgischen Schere

aus dem Kadaver entfernt und in eine sterile Petrischale mit 3 ml 4 °C kaltem Kulturmedium für primäre Milzzellen gelegt.

Mit Hilfe von zwei Skalpellmessern wird das Organ in kleinste Stücke geschnitten, so dass letztendlich ein dickflüssiges „Organmus“ entsteht. Dieses Mus wird mit 1 ml Medium verdünnt, mit einer Pipette vorsichtig aufgesogen und auf ein Falcon-Einmalsieb (100 µm Maschenweite) über einem sterilen 50 ml-Plastik-Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Petrischale wird mit 1 ml Medium gespült und dieses Medium ebenfalls auf das Einmalsieb gegeben. Der verbleibende Tropfen auf der Unterseite des Siebes wird mit einer Pipette abgesaugt und zum Filtrat pipettiert, um die Zellausbeute zu erhöhen. Die Zellreste auf dem Sieb werden verworfen. Im Anschluss wird die Zellsuspension in einer vorgekühlten Zentrifuge (4 °C) 8 min bei 400xg zentrifugiert. Danach wird der Überstand mit einer Pipette entfernt und das kaum sichtbare Pellet mit 5 ml RBC-lysis-buffer resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Während der Inubationszeit wird das Röhrchen ab und zu leicht geschwenkt. Die Lyse der Erythrozyten wird mit Zugabe von 20 ml PBS bei RT abgestoppt und das Röhrchen erneut in einer vorgekühlten Zentrifuge (4 °C) 8 min bei 400xg zentrifugiert. Zum Schluss wird der Überstand verworfen, das Zellpellet in 10 ml Medium für primäre Milzzellen (siehe Kapitel 4.1.7.1) aufgenommen, resuspendiert, gezählt unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Neubauer Kammer (siehe Kapitel 4.2.1.8) und die gewünschte Zellmenge mittels einer Multipette in 96-well-Platten ausgestreut (z.B. 200.000 Zellen pro well einer 96-well-Platte). Danach werden die Stimulantien Lipopolysaccharid-Stammlösung (LPS) und Cancanavalin A-Stammlösung (ConA) in die Zellsuspension in den wells hinzupipettiert, so dass bei LPS eine Endkonzentration von 5 µg/ml und bei ConA eine Endkonzentration von 1 µg/ml erreicht wird (siehe Kapitel 4.1.7.8). Die 96-well-Platten werden wie Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 99 % Luftfeuchtigkeit kultiviert (siehe Kapitel 4.2.1.1).

#### 4.2.1.7 Generierung einer Cytochrom 2E1-überexprimierenden reparaturdefizienten Fibroblasten-Zelllinie

Das Ziel der molekularbiologischen Arbeiten war die stabile Transfektion der MEF-Zelllinie *csb<sup>-/-</sup>/ogg1<sup>-/-</sup>* mit dem humanen Cytochrom 2E1 (MEF(*csb<sup>-/-</sup>/ogg1<sup>-/-</sup>*)CYP2E1) (siehe Kapitel 4.1.6), sowie die Generierung entsprechender Vector-only-Kontrollen, die nur mit dem entsprechenden Leervektor, also ohne Cytochrom2E1-Insert, transfiziert wurden. Mit Hilfe herkömmlicher molekularbiologischer Methoden wurde aus einer humanen Leber-RNA-Aufreinigung ein Amplifikat der 1653 bp langen DNA des humanen Enzyms Cytochrom 2E1 gewonnen. Dazu wurde zunächst mittels Reverser Transkriptase (Ready-to-go®, Amersham) die cDNA hergestellt. Dazu wurden 5 µl RNA für 5 min auf 68 °C erhitzt, dann auf Eis abgekühlt, mit 45 µl sterilem Wasser gemischt und diese Lösung in ein Reaktionsgefäß des Ready-to-go-Kits gefüllt. Darin befindet sich die Reverse Transkriptase in Form eines Zuckerkristalls, der sich bei Zugabe von Flüssigkeiten auflöst. Nach 5 min Inkubation

bei 37 °C wird leicht gemischt und erneut bei 37 °C für 1 h inkubiert. 1 µl der so gewonnenen cDNA wird zur PCR eingesetzt.

PCR-Bedingungen:

1. 1 Zyklus: 5 min, 95 °C
2. Zugabe von Thermozymer® (Invitrogen) (0,5 µl)
3. 40 Zyklen: 1 min, 94 °C  
10 sec, 68 °C  
2,30 min, 72 °C
4. 1 Zyklus: 5 min, 72 °C
5. 1 Zyklus: 2 min, 25 °C

Verwendete Primer:

CYP2E1for: 5'-ATA TGA ATT CAG CGC ACC ATG TCT GCC CTC GG-3'

CYP2E1rev: 5'-ATA TGA ATT CAG ATC TTC CTC CAC ACA CTC ATG AGC GG-3'

Das erhaltene PCR-Amplifikat wurde in einen prokaryontischen Expressionsvektor ligiert (Topo TA-Cloning Set®, Invitrogen), danach kompetente *E.coli* (C600) damit transformiert, ausplattiert und nach 24 h von mehreren Klonen nach Ansetzen einer Übernachtskultur (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) und Minipräparation (Quiagen) ein Kontrollverdau mit einem Aliquot der gewonnenen Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym EcoRI durchgeführt. Zwei erfolgreich ligierte Plasmide wurden erneut zur Transformation von *E.coli* (C600) eingesetzt. Nach dem Ausplattieren der transformierten Bakterien, picken von Klonen, ansetzen einer Übernachtskultur und Gewinnung der Plasmid-DNA über eine Midi-Präparation wurde diese zur Sequenzierung eingeschickt. Diese Sequenzierung (MWG Biotech AG) bestätigte die korrekte Basenabfolge in dem Amplifikat. Diese DNA-Sequenz des Cytochroms 2E1 wurde daraufhin in einen eukaryotischen Expressionsvektor (pMPSV E/H) ligiert (Topo TA-Cloning Set®, Invitrogen) und in eine reparaturdefiziente Maus Embryo Fibroblasten-Zelllinie (*csb*<sup>-/-</sup>/*ogg1*<sup>-/-</sup>) stabil transfiziert (Polyfect®, Firma Quiagen). Außerdem wurde eine Vector-only-Transfektion mit dem leeren pMPSV-Vektor durchgeführt, um eine Kontrollzelllinie ohne die Expression von Cytochrom 2E1 zu erhalten. Zur Selektion der transfizierten Zellen, wurde eine Cotransfektion mit einem Vektor, der ein Puromycin-Resistenzmarkergen (*Ppur*, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Arand) enthält, durchgeführt. Die heranwachsenden Kolonien wurden unter Selektionsdruck (Puromycin, 5 µg/ml) kultiviert und nach Erreichen ausreichender Koloniegröße (12 Tage nach der Transfektion) monoklonal gepickt und in Zellkulturflaschen kultiviert. Nach Aufzucht der monoklonalen Zelllinien standen fünf Klone der Zelllinie MEF(*csb*<sup>-/-</sup>/*ogg1*<sup>-/-</sup>) CYP2E1 (Klon 1, 2, 4, 5, 6) und zwei Klone der Vector-only-Kontrolle zur Verfügung. Von allen Klonen wurde eine RNA-Präparation angefertigt (RNeasy®, Quiagen). Diese RNA-Aufreinigungen

wurde mittels Reverser Transkriptase in die korrespondierenden cDNA Produkte überführt (Ready-to-go®, Amersham). Im Anschluss wurde aus diesen cDNA-Produkten ein 340 bp großes Fragment des Cytochrom 2E1-Gens mittels PCR amplifiziert (Taq-Polymerase).

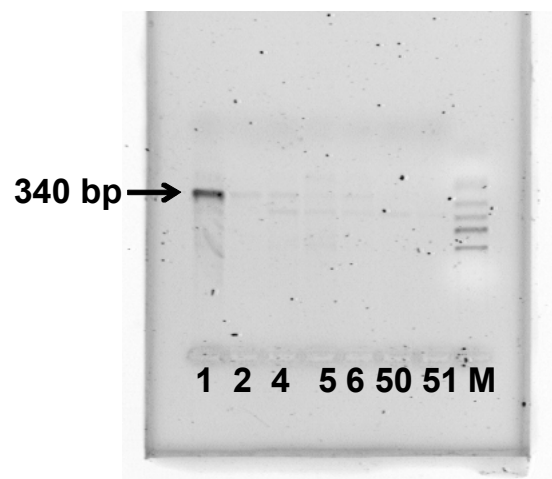
PCR-Bedingungen:

1. 1 Zyklus: 5 min, 94 °C
2. Zugabe von Taq-Polymerase (0,5 µl)
3. 35 Zyklen: 1 min, 94 °C  
30 sec, 65 °C  
30 sec, 72 °C
4. 1 Zyklus: 10 min, 72 °C

Primer: freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Michael Arand.

Das 1%ige Agarosegel, das von den Amplifikaten hergestellt wurde, zeigt, dass Klon 1 eine starke und Klon 2 und Klon 4 eine schwächere aber dennoch deutliche Cytochrom 2E1-RNA-Expression aufweisen. Die Klone 50 und 51 sind eindeutig Vector-only-Kontrollen. Sie zeigen keine RNA-Expression von Cytochrom 2E1.

Abbildung 19: 1%iges Agarosegel der PCR-Amplifikate (Taq-Polymerase) eines 340 bp-



Fragmentes des Cytochrom 2E1 der durch Transfektion gewonnenen Klone. Die Zahlen geben die Nummer der Klone an (1,2,4,5,6, = mit Cytochrom2E1-haltigem Expressionsvektor transfizierte Klone, 50, 51= mit Leervektor transfizierte Klone = Vector-only-Kontrollen). M=Marker, Fragmentmuster siehe Kapitel 4.1.5).

Für die Untersuchungen der DNA-Schäden mittels Alkalischer Elution wurden daher die Klone 1, 2 und 4 sowie die Vector-only-Kontrollen 50 und 51 verwendet.

#### 4.2.1.8 Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität

Zur Überprüfung der Vitalität der gewonnenen Primärzellen (außer Spermatozyten, siehe Kapitel 4.2.1.4) werden diese einem Trypanblautest unterworfen. Dieser Test gibt Auskunft über die Integrität der Zellmembran, welche als Maß für die Vitalität der Zellen gewertet wird. Dazu werden 50 µl einer evt. vorverdünnten Zellsuspension mit 50 µl Trypanblau-Lösung (4 mg/ml in PBS) gemischt. Zum Mischen werden bei Untersuchung von Hepatozyten 200 µl-Pipettenspitzen verwendet, deren Spitzen 5 mm abgeschnitten wurden. In einer Neubauer-Zählkammer werden im Lichtmikroskop die nichtgefärbten lebenden Zellen und blaugefärbten toten Zellen gezählt. Hieraus kann die Gesamtzellzahl, die Anzahl der toten Zellen sowie die Vitalität (prozentualer Anteil der lebenden Zellen) berechnet werden.

#### 4.2.2 Schädigung der Zellen für die Alkalische Elution

Schädigung mit TS-Hemmstoffen:

600 000 Zellen werden in eine mittlere Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) ausgestreut. Nach 24 h wird das Medium gewechselt, und genau 10 ml Medium in die Flasche pipettiert. Danach wird mittels Eppendorfpipette eine entsprechende Menge der Versuchslösungen der TS-Hemmstoffe (siehe Kapitel 4.1.7) direkt in das Medium in der Zellkulturflasche hineinpipettiert, geschwenkt und die Zellen für 72 h im Brutschrank inkubiert. Nach 72 h werden die Zellen einmal mit eiskaltem PBSCMF gewaschen, abgelöst und zum Versuch verwendet.

Schädigung mit Ethanol:

1 Mio Zellen werden in eine mittlere Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) ausgestreut. Nach 24 h wird das Medium gewechselt und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Ohne Mediumwechsel wird danach mittels Eppendorfpipette eine entsprechende Menge Ethanol (96 %) in vom Zellrasen weggeneigt gehaltene Zellkulturflasche (das Medium berührt also den Zellrasen nicht) hineinpipettiert, geschwenkt, um das Ethanol zu verteilen und die Zellen für 10-12 h im Brutschrank inkubiert. Danach wird das Medium verworfen, erneut frisches Medium mit Ethanol hinzugefügt und die Zellen für weitere 12 h inkubiert. Nach insgesamt 24stündiger Ethanolinkubation werden die Zellen einmal mit eiskaltem PBSCMF gewaschen, abgelöst und zum Versuch verwendet.

Schädigung mit Ethanol und GSH-Depletion:

1 Mio Zellen werden in eine mittlere Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) ausgestreut. Nach 24 h wird das Medium gewechselt und 9 ml Medium in die Flasche pipettiert. Im Anschluss wird 1 ml BSO-Versuchslösung (siehe Kapitel 4.1.7.3) hinzugefügt, geschwenkt und die Zellen für 24 h im Brutschrank inkubiert. Danach wird dem

BSOhaltigen Medium eine entsprechende Menge Ethanol hinzugefügt und die Zellen für 10-12 h inkubiert. Dann wird das Medium verworfen, frisches Medium unter Zusatz von BSO und Ethanol in die Zellkulturflasche pipettiert und die Zellen für 12 h im Brutschrank inkubiert. Nach insgesamt 24stündiger Ethanolinkubation werden die Zellen einmal mit eiskaltem PBSCMF gewaschen, abgelöst und zum Versuch verwendet.

Schädigung mit Durochinon:

1,5 Mio Zellen werden in eine mittlere Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) ausgestreut. Nach 24 h wird das Medium gewechselt, und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Danach werden die Zellen ohne Mediumwechsel durch Zugabe einer entsprechenden Menge Durochinonversuchslösung (siehe 4.1.7.2) 30 min im Brutschrank inkubiert. Danach werden die Zellen einmal mit eiskaltem PBSCMF gewaschen, abgelöst und zum Versuch verwendet.

Schädigung mit Durochinon und GSH-Depletion:

1,5 Mio Zellen werden in eine mittlere Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) ausgestreut. Nach 24 h wird das Medium gewechselt, 9 ml Medium und 1 ml BSO-Versuchslösung (siehe Kapitel 4.1.7.3) in die Flasche pipettiert, geschwenkt und die Zellen für 24 h im Brutschrank bei 7 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach werden die Zellen im BSO haltigen Medium durch Zugabe einer entsprechenden Menge Durochinonversuchslösung (siehe 4.1.7.2) 30 min im Brutschrank inkubiert. Danach werden die Zellen einmal mit eiskaltem PBSCMF gewaschen, abgelöst und zum Versuch verwendet.

### 4.2.3 Generierung konfluenter MEFs

#### Prinzip

Fibroblastenzelllinien lassen sich über längere Zeit im konfluenten Zustand kultivieren ohne Abzusterben. Dazu wird eine einmal ausgestreute Zellpopulation so lang in einer Zellkulturflasche kultiviert, bis die Zellen seitlich aneinanderstoßen und so einen natürlichen Wachstumsstopp erfahren. Dieser konfluente Zellrasen kann dann für über eine Woche weiterkultiviert werden, wobei jedoch auf täglichen Mediumwechsel zu achten ist.

#### Durchführung

1 Mio Zellen (*ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten bzw. *ung*<sup>+/+</sup>-Mausfibroblasten) werden in einer mittleren Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) ausgestreut (=Versuchsflasche). Für jeden Versuch werden zusätzlich vier Parallelfaschen identisch angelegt. Versuchsflaschen und Parallelfaschen werden für mindestens 8 Tage kultiviert. Mit Hilfe der Parallelfaschen kann durch Ablösen und Bestimmung der Zellmenge beobachtet

werden, ob sich die Zellen weiterhin verdoppeln. Ab dem Zeitpunkt, bei dem sich in der Parallelfasche keine Verdopplung der Zellzahl innerhalb von 48 h feststellen lässt, ist das Stadium der Konfluenz auch in der Versuchsfasche erreicht. Die Versuchsfasche wird ab diesem Zeitpunkt für 8 Tage mit täglichem Mediumwechsel kultiviert und dann zum Versuch eingesetzt.

Ein Teil der konfluenten Zellen wird am Versuchstag nicht für die Alkalische Elution verwendet, sondern erneut in eine neue Zellkulturflasche ausgestreut. Sollen die Zellen am darauffolgenden Tag untersucht werden, so sind 2 Mio Zellen in eine mittlere Zellkulturflasche auszustreuen. Im Falle einer Verwendung nach 1 Passage sind 500 000 Zellen in einer mittleren Zellkulturflasche auszustreuen und nach 2-3 Tagen zu passagieren und für den nächsten Versuch passend auszustreuen.

#### 4.2.4 Depletion von Glutathion

Zur intrazellulären Depletion von Glutathion werden die Zellen mit Buthioninsulfoximin (BSO) inkubiert. Dazu wird in einer Flasche, in der die Zellen seit mindestens 24 h wachsen, das alte Medium abgesaugt, 9 ml frisches Medium hinein pipettiert und 1 ml BSO-Stammlösung (siehe Kapitel 4.1.7.3) hinzugefügt. Die Inkubation wird im Brutschrank für 24 Stunden durchgeführt. Im Falle einer zusätzlichen Substanzinkubation (z.B. Ethanol oder Durochinon) wird nach Ablauf dieser 24stündigen BSO-Inkubation mit der Substanzinkubation begonnen.

#### 4.2.5 Enzymatische Quantifizierung des Glutathion-Gehaltes

##### Prinzip

Die zellulären Gesamtglutathion-Spiegel (GSH und GSSG) werden enzymatisch nach der Methode von Griffith (1985) bestimmt. Als Detektionsreagenz dient 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, *Ellman's Reagenz*), welches mit Thiolgruppen (z.B. GSH) unter Bildung von 5'-Thio-(2-nitrobenzoesäure) (TNB) reagiert. Abbildung 20 a) zeigt wie dabei GSH zu GSSG oxidiert wird. Im folgenden Schritt (b) wird GSSG durch das exogen dem Reaktionsansatz hinzugefügte Enzym Glutathionreduktase unter NADPH/H<sup>+</sup>-Verbrauch zu GSH reduziert. Reduziertes Glutathion (GSH) kann nun erneut mit DTNB reagieren.



Abbildung 20: Reaktionsgleichungen zur Bestimmung von Glutathion mit DTNB-Reagenz (Griffith, 1985). GR= Glutathionreduktase



Bei der enzymatischen Glutathion-Bestimmung sind die Konzentrationen von DTNB, NADPH und Glutathionreduktase so gewählt, dass die Geschwindigkeit der gesamten Reaktion c) proportional zur Konzentration des gesamten Glutathiongehaltes verläuft. Die Bildung von TNB lässt sich zeitabhängig spektralphotometrisch als Absorption bei 412 nm verfolgen.

### **Durchführung**

Zur Versuchsdurchführung werden mindestens 10 Mio Zellen benötigt. Der Zellrasen in der Zellkulturflasche wird abtrypsiniert und die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 4 °C (1200xg, 10 min) wird der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml PBSCMF aufgenommen. Danach werden die Zellen erneut zentrifugiert, das Pellet in genau 5 ml PBSCMF resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und ein letztes Mal zentrifugiert. Das Pellet wird entsprechend einer Zelldichte von 10 Mio Zellen/ml in eisgekühltem TCA-Puffer aufgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (Rundboden) überführt. Die Lyse der Zellen erfolgt mit einem Ultraschall-Homogenisator (35 W, 3x20 Impulse, 10 kHz). Im Anschluss werden die festen Zellbestandteile abzentrifugiert (4 °C, 10 min, 10000xg) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es werden 700 µl Phosphat/NADPH-Lösung, 100 µl DTNB-Reagenz und je nach erwarteter Glutathion-Konzentration 10-40 µl Probelösung (Überstand) in eine Plastikkuvette pipettiert (ad 1000 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>). Nach jedem Pipettierschritt wird die Lösung durch Rühren mit der Pipettenspitze vermischt. Abschließend werden 2 µl Glutathionreduktase-Lösung hinzugefügt und sofort sowie alle 30 s für die nächsten zwei Minuten die Absorption bei 412 nm bestimmt. Der Gehalt an Gesamtglutathion wird mit Hilfe einer Eichgerade berechnet. Zur Erstellung der Eichgerade vermisst man anstelle des Probenvolumens 5-40 µl einer 0,1 mM frisch hergestellten GSH-Standardlösung.

### **4.2.6 Proliferationstests**

#### **Prinzip**

Veränderte Proliferation von kultivierten Zellen nach oder während einer Substanzinkubation kann als Maß für die Toxizität dieser Substanz gewertet werden. Dabei wurden in dieser Arbeit adhärente Zellen mit Substanzen geschädigt und die Zellzahl des geschädigten Ansatzes am Ende des Versuchs verglichen mit der Zellzahl im ungeschädigten Ansatz. Dazu werden so viele kleine Zellkulturflaschen mit einer definierten Zellmenge ausgestreut, wie Konzentrationen der Substanz untersucht werden sollen (Versuchsflaschen) und zusätzlich eine so genannte Referenzflasche mit der gleichen Zellmenge. Diese wird vor Beginn der Schädigung der Versuchsflaschen abgelöst, gezählt und die Zellen verworfen, um den Fehler durch nicht-anwachsende Zellen nach den Ausstreuen so gering wie möglich zu halten. Zur Berechnung des Proliferationsfaktors wird die Zahl der adhären Zellen in der

jeweiligen Versuchsflasche am Ende des Versuchs dividiert durch die Anzahl der adhärennten Zellen in der Referenzflasche vor Beginn der Schädigung. Somit gibt der Proliferationsfaktor ein Maß für die Anzahl der Vervielfachungen der Zellpopulation in der Zellkulturflasche während des Versuchs.

### **Durchführung**

Es werden so viele kleine Zellkulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) mit einer definierten Anzahl Zellen (siehe Tabelle 1) ausgestreut wie unterschiedliche Konzentrationen der Substanzen untersucht werden sollen plus einer Flasche zur Lösungsmittelkontrolle ohne Substanz und einer Referenzflasche. Die Vorgänge beim Ablösen der Zellen erfolgen wie in Kapitel 4.2.1.1 beschrieben. Alle Zellzählungen während des Versuchs und das Ausstreuen der Zellen erfolgen zur größeren Genauigkeit nicht mit Glaspipetten sondern mit Eppendorfpipetten (200 µl und 1000 µl). Die ausgestreuten Zellen werden für 24 h im Brutschrank kultiviert (=Anwuchsphase).

Inkubation mit Durochinon (in Kombination mit GSH-Depletion):

In Falle der V79-Zellen wird vor Beginn der Schädigung mit Durochinon das Glutathion intrazellulär depletiert durch Inkubation mit Buthioninsulfoximin (BSO) (siehe Kapitel 4.2.4). Dazu werden die ausgestreuten Zellen nach 24 h Anwuchsphase mit frischem Medium versorgt, dem BSO zugefügt wurde. Nach 24 h Inkubation mit BSO wird zunächst die Referenzflasche trypsiniert, die Zahl der adherenten Zellen bestimmt und die Zellen danach verworfen. Im Anschluss werden die Zellen in den Versuchsflaschen mit Durochinon im BSO-haltigen Medium inkubiert. Dazu wird eine entsprechende Menge der Durochinon-Versuchslösung direkt in das BSO-haltige Medium in den Flaschen pipettiert, geschwenkt und die Flasche für 30 min im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen einmal mit PBSCMF gewaschen, um BSO und Durochinon zu entfernen. Frisches Kulturmedium wird auf die Zellen gegeben und diese dann für 48 h im Brutschrank kultiviert (=recovery-Zeit).

Inkubation mit Thymidylatsynthasehemmern

Im Falle der Inkubation mit Thymidylatsynthasehemmern wird das Medium nach der 24 h-Anwuchsphase in allen Flaschen entfernt und die Zellen mit frischem Medium versorgt. Im Anschluss wird die Referenzflasche trypsiniert, die Zahl der adherenten Zellen bestimmt und diese nach dem Zählen verworfen. Dann wird eine entsprechende Menge an 5-FU oder 5-FdUrd-Versuchslösungen direkt in das Medium in den Versuchsflaschen pipettiert und durch Schütteln gemischt. Die Inkubation erfolgt unter Kulturbedingungen für 48 h im Brutschrank. Danach wird zunächst die Zahl der im Überstand schwimmenden Zellen (nach kurzem Schwenken des Mediums) bestimmt und im Anschluss die adherenten Zellen abgelöst und gezählt.

Substanzen	Zellen	Zellmenge/ kleine Flasche	Inkubationsdauer	recovery-Zeit
5-FU, 5-FdUrd	MEFs	100 000	48 h	Keine
Durochinon	V79 V79-hOR	100 000 200 000	30 min	48 h

Tabelle 4: Übersicht der Versuchsunterschiede bei Inkubation mit Thymidylatsynthasehemmern und Durochinon.

#### 4.2.7 Quantifizierung von Mikrokernen

##### Prinzip

Mikrokern sind definiert als Abspaltungen von DNA-Material aus Zellkernen. Diese Bruchteile des Kerns können entweder ganze Chromosome oder Chromosomenfragmente enthalten. Man unterscheidet „aneugene“ und „klastogene“ Substanzen: Substanzen, die zur Abspaltung von ganzen Chromosomen führen, bezeichnet man als „aneugen“, während Stoffe, die chromosomenbrechende Wirkung zeigen, auch „klastogen“ genannt werden. Quantitative Mikrokern-Testsysteme erlauben daher eine Abschätzung des genotoxischen Potentials von Agenzien (Romagna, 1993). Voraussetzung für die Bildung eines Mikrokernes ist die Teilung der Zelle. Daher wartet man nach der Inkubation mit der zu untersuchenden Testsubstanz eine so genannte *recovery*-Phase ab, in der die Zellen eine Zellteilung durchführen und dabei Mikrokern ausbilden. Zur quantitativen Auswertung wird die Anzahl Mikrokern ausgezählt und auf die Anzahl Zellkerne bezogen. Dazu wurden mindestens 1000 Kerne pro Präparat gezählt und die dazugehörigen Mikrokern bestimmt (Romagna, 1993).

##### Durchführung

In eine mittlere Zellkulturflasche (75 cm<sup>2</sup>) werden mindestens 24 Stunden vor dem Versuch 1 Mio Zellen ausgesät. Die genaue Zahl ist abhängig von der Zellgröße, es muss noch ausreichend Platz für eine Verdopplung vorhanden sein. Nach der Schädigung der Zellen unter sterilen Bedingungen am folgenden Tag wird frisches Medium in die Kulturflasche gegeben und diese während der *Recovery*-Phase im Brutschrank aufbewahrt (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C). Die Dauer der *Recovery*-Phase richtet sich nach der Verdopplungszeit der Zellen, die zuvor bestimmt werden muss. Im Fall von V79 Zellen wurde eine *Recovery*-Zeit von 21 Stunden eingehalten, bei V79-hOR-Zellen dauerte sie 24 h. Nach der Verdopplungsphase wird eine Cytospin-Zellzentrifuge mit beschrifteten Objektträgern, Filterkärtchen und Trichtern bestückt. Zellen werden wie gewohnt mittels Trypsin abgelöst und in Medium aufgenommen. Man pipettiert etwa 5 Tropfen (je nach Zelldichte) der Zellsuspension in jeden Trichter und schleudert die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 1000 rpm, *high accel*)

auf die Objektträger. Auf diese Weise stellt man 6 Objektträger pro Ansatz her, die nach der Zentrifugation sofort in auf  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  vorgekühlte Fixierkammern mit Methanol gestellt werden. Nach mindestens einer Stunde Fixierung in Methanol können die Zellkerne angefärbt werden. Dazu inkubiert man die Objektträger für etwa 30 s in einer Färbekammer mit PBSCMF/Bisbenzimid-Lösung. Anschließend taucht man sie mit Hilfe einer Pinzette nacheinander für jeweils 1-2 min in zwei PBSCMF-Waschlösungen. Das überschüssige PBSCMF wird nach kurzem Abtropfen mittels Papiertuch entfernt, dabei ist darauf zu achten, dass die aufgeschleuderten Zellen nicht berührt werden. Nun werden  $10\text{ }\mu\text{l}$  einer Eindecklösung auf die Zellen pipettiert und ein Deckgläschen möglichst luftblasenfrei darüber gelegt. Bei der anschließenden Betrachtung im Mikroskop mit Quecksilberdampfampe unter Verwendung von Immersionsöl sind Kerne und Mikrokern durch Interkalation des Bisbenzimids in die DNA blau eingefärbt. Pro Ansatz werden drei Objektträger mit ca. 1000-2000 Zellkernen sowie die dazugehörigen Mikrokern ausgezählt. Die Ergebnisse der drei Zählungen pro Ansatz werden gemittelt. Aus den Mittelwerten von drei unabhängig durchgeführten Versuchen wird wiederum ein Mittelwert mit Standardabweichung berechnet. Abbildung 21 zeigt einen Zellkern mit Mikrokern (Pfeil).

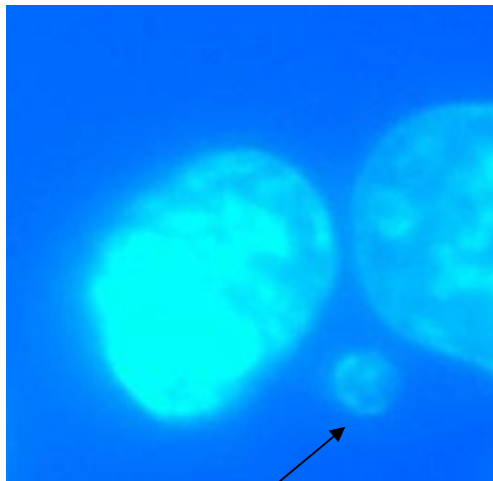


Abbildung 21:

Zellkerne mit Mikrokern in V79-Zellen. Die DNA wurden wie oben im Text beschrieben mit Bisbenzimid-Lösung (Hoechst No. 33258) angefärbt.

#### 4.2.8 Comet Assay (Einzelzellgelelektrophorese)

##### Prinzip

Die Einzelzellgelelektrophorese dient der Detektion schadstoff- und strahleninduzierter DNA-Schäden (Olive et al., 1990; Singh et al., 1988) Die Methode ermöglicht die Untersuchung von Zellen aus Zellkultur, Blut oder Gewebeproben. In diesem Genotoxizitätstest werden Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie alkalilabile Stellen der DNA detektiert. Führt man außerdem noch eine Inkubation der lysierten Zellen

mit Reparaturenzymen durch, so können Basenmodifikationen oder fehlerhafte Basen (z.B. Uracil) in Einzelstrangbrüche überführt und damit detektiert werden. Durch Vergleich mit einem Ansatz ohne Reparaturenzym kann so die relative Menge an Basenmodifikationen ermittelt werden. Im Unterschied zur Alkalischen Elution ist der Comet Assay eine nicht-quantitative Methode, die Ergebnisse werden in dimensionslosen Einheiten angegeben. Ein Vorteil insbesondere bei seltenen Proben ist aber die geringe benötigte Zellzahl pro Ansatz (20 000 Zellen pro Objektträger) im Vergleich zur Alkalischen Elution (1 Mio Zellen pro Spur).

Zur Durchführung des Comet Assays werden die vereinzelt Zellen auf einem herkömmlichen Objektträger in eine dünne Agaroseschicht eingebettet, darin lysiert und dann einer Elektrophorese unterzogen. Dabei wandern die kurzen DNA Fragmente (geschädigte DNA-Bereiche) aus der Kernregion heraus, während längere ungeschädigte DNA-Stücke in der gleichen Zeit weniger weit durch das Netzwerk der Agarose wandern. So erkennt man unter dem Mikroskop, nach dem Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid, kometenschweif-ähnliche Strukturen, wenn die DNA der Zellen geschädigt, also Einzel- oder Doppelstrangbrüche erzeugt wurden. Im Unterschied zu den Zellen mit geschädigter DNA weisen Zellen mit intakter DNA einen kreisrunden Kern auf. In Abhängigkeit vom Grad der DNA-Schädigung lassen sich verschieden große und intensive Kometenschweife der Zellkerne erkennen. Diese wurden in dieser Arbeit mit Hilfe der Klassen-Methode in 5 Kategorien eingeteilt. Dabei werden Größe und Fluoreszenzintensität des Schweifs verglichen mit den gleichen Parametern der noch zu erkennenden Reststruktur des eigentlichen Kerns.

### **Durchführung:**

Präparation der Objektträger (OT):

Herkömmliche Objektträger mit mattiertem Beschriftungsfeld werden mit fusselfreien Labortüchern staubfrei gewischt und anschließend in eine mindestens 75 °C heiße *high melt* Agaroselösung getaucht, wobei das Beschriftungsfeld nicht mit der Agarose in Berührung kommt. Eine Seite des OT wird mit Zellstofftüchern abgewischt. Auf dieser agarosefreien Seite wird der OT bis zur vollständigen Trocknung (ca. 10 min) gelagert. Die agarosehaltige Seite wird mit einem nicht spiegelbildlich lesbaren Zeichen auf dem Beschriftungsfeld markiert.

Auftragen der Zellen auf die Objektträger:

Die behandelten Zellen werden wie gewohnt mit Trypsin abgelöst, in Medium aufgenommen, resuspendiert und gezählt. Die Zellsuspensionen werden zentrifugiert (5 min, 1200 rpm, 4 °C), mit PBSCMF gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. In der kleinen über dem Pellet verbleibenden Menge an PBSCMF werden die Zellen resuspendiert, und dann mit 75 µl einer 37 °C warmen *low melt* Agarose Lösung vermischt, ohne Blasen zu erzeugen. Diese Zell-Agaroselösung wird zügig auf die vorbereiteten und beschrifteten OT aufgetropft und

mit einem Deckglas abgedeckt. Die OT werden 5-8 min bei 4 °C gelagert, um ein Aushärten der Agarose zu ermöglichen. Danach wird das Deckglas vorsichtig seitlich vom OT entfernt und der OT senkrecht in 4 °C vorgekühlte Fixierkammern mit Lysepuffer mit 1 % Triton-X-100 eingetaucht. Mindestens eine Stunde verbleiben die OT bei 4 °C in der Lyse. Ab dem Zeitpunkt der Lyse werden die OT sehr sorgfältig und ohne Schütteln weiterverarbeitet.

#### Enzyminkubation:

Im Anschluss an die Lyse werden die OT mit 4 °C kaltem Ung2-Comet-Puffer in Kristallisationschalen 2x5 min ohne zu schütteln gewaschen und in eine feuchte Kammer gelegt (Plastikkammer mit Deckel und feuchten Tüchern ausgelegt, bei 37 °C vorgewärmt). 40 µl einer frisch hergestellten Ung2-Enzymlösung in Ung2-Comet-Puffer werden auf die Stelle auf dem OT aufgetropft, auf dem sich die in Agarose eingebetteten Zellen befinden und mit einem neuen Deckglas abgedeckt. Die OT, die ohne Enzym inkubiert werden sollen, werden mit 40 µl Ung2-Comet-Puffer (ohne Enzymzusatz) versehen und ebenfalls mit einem Deckglas abgedeckt. Die verschlossene Kammer wird für 1 h in einen Bakterieninkubator bei 37 °C gestellt.

#### Elektrophorese:

Die inkubierten OT werden in eine mit Eis gekühlte Elektrophoresekammer gelegt, die mit 4 °C kaltem Elektrophoresepuffer vorher geflutet wurde. Sie sollten in einer definierten immer gleich anzuwendenden Ausrichtung zu den elektrischen Polen liegen, damit die Kometen aller OT relativ zum Beschriftungsfeld die gleiche Ausrichtung haben, was die Auswertung erheblich erleichtert. Die OT verbleiben für 40 min bei 4 °C in der Kammer unter Lichtausschluss. Erst danach wird der Strom eingeschaltet und die Elektrophorese für 25 min unter Lichtausschluss durchgeführt (300 mA, Spannung konstant halten in Vergleichsexperimenten über Zu- und Abnahme von Puffervolumen).

#### Neutralisierung und Färbung:

Im Anschluss an die Elektrophorese werden die OT in mit 4 °C kaltem Neutralisierungspuffer gefüllte Kristallisationsschalen gelegt und darin 2x5min ohne Schütteln gewaschen. Der letzte Waschschrift wird mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> durchgeführt. Die Präparate können nun getrocknet und gelagert oder gefärbt und ausgewertet werden. Die Färbung erfolgt durch Auftropfen von 20 µl einer Ethidiumbromidlösung in H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> (15 µg/ml) auf die Agarose-Zellschicht und anschließendem Abdecken dieses Bereiches mit einem Deckglas. Die OT sollten bis zur Auswertung unter Lichtausschluss gelagert werden, um ein Verblässen der Fluoreszenzfärbung zu vermeiden. Die Trocknung wird bei 50 °C ohne Deckglas im Ofen für ca. 15 min durchgeführt. Schon gefärbte Präparate können nach der Auswertung zur Langzeitlagerung getrocknet (Deckglas vorher entfernen) und bei Bedarf rehydriert werden. Dazu

werden 75 µl der *low melt* Agarose auf die Stellen mit den Zellen aufgetropft und mit einem Deckglas abgedeckt. Sollte die Färbung nach mikroskopischer Kontrolle im Laufe der Zeit zu schwach geworden sein, kann erneut gefärbt werden (siehe oben). Die Langzeitlagerung der OT kann bei RT erfolgen.

Auswertung:

Die Auswertung der OT erfolgt mit einer 100x Vergrößerung unter einem Mikroskop mit Quecksilberdampfampe und Immersionsobjektiv. Es werden 100 Kometen pro OT bewertet und in Klassen eingeteilt, wobei Randzonen des Agarose-Zellbereichs ausgespart werden. Die Einteilung der Klassen von 0 (ungeschädigt) bis 4 (stärkste Schädigung) erfolgt anhand von Vergleichsfotos (Collins et al., 1995; Collins et al., 1993).

Zur Auswertung wird die Zahl der Klasse (0-4) multipliziert mit der Anzahl der Kometen, die dieser Klasse zugeordnet wurden. Dabei sind Werte zwischen 0 und 400 möglich. Die OT, die nicht mit Enzym behandelt wurden, repräsentieren die Anzahl an Einzelstrangbrüchen und alkalilabilen Stellen, die in diesem Ansatz generiert wurden bzw. als Untergrund immer vorhanden sind. Zur Berechnung der enzymsensitiven DNA-Modifikationen wird der Wert des OT ohne Enzymbehandlung vom Wert des OT mit Enzymbehandlung abgezogen.

#### 4.2.9 Alkalische Elution

##### Prinzip

Die Alkalischen Elution erlaubt die quantitative Detektion von Einzelstrangbrüchen, DNA-DNA- und DNA-Protein-Quervernetzungen in der DNA von Zellen. Durch Einsatz von Reparaturenzymen, die als Glykosylasen bzw. Endonukleasen DNA-Modifikationen erkennen, lassen sich diese zusätzlich detektieren. Dabei erkennt die Glycosylasefunktion zunächst die Basenmodifikation und entfernt die fehlerhafte Base wodurch eine basenlose Stelle, eine AP-Stelle, entsteht. Im zweiten Schritt wird an dieser AP-Stelle das DNA-Zucker-Phosphatrückgrat mittels Endonukleaseaktivität eingeschnitten und dadurch ein Einzelstrangbruch erzeugt. Diese Endonukleaseaktivität kann entweder eine zweite Aktivität des Glykosylase-Enzyms sein, oder ein eigenständiges zweites Enzym. So können in zwei getrennten Ansätzen zum einen die Einzelstrangbrüche und zum anderen im Ansatz mit Reparaturenzym die Basenmodifikationen, die in Einzelstrangbrüche umgewandelt wurden, als zusätzliche Einzelstrangbrüche detektiert werden. Die von Kohn *et al.* (Kohn et al., 1976) entwickelte Methode der Alkalischen Elution besitzt eine Empfindlichkeit von 1 Läsion/10<sup>7</sup> bp und ist damit empfindlicher als der Nachweis von Basenmodifikationen durch eine HPLC/ECD-Analyse (Pflaum et al., 1997). Der Ablauf der Alkalischen Elution ist in Abbildung 22 schematisch dargestellt.

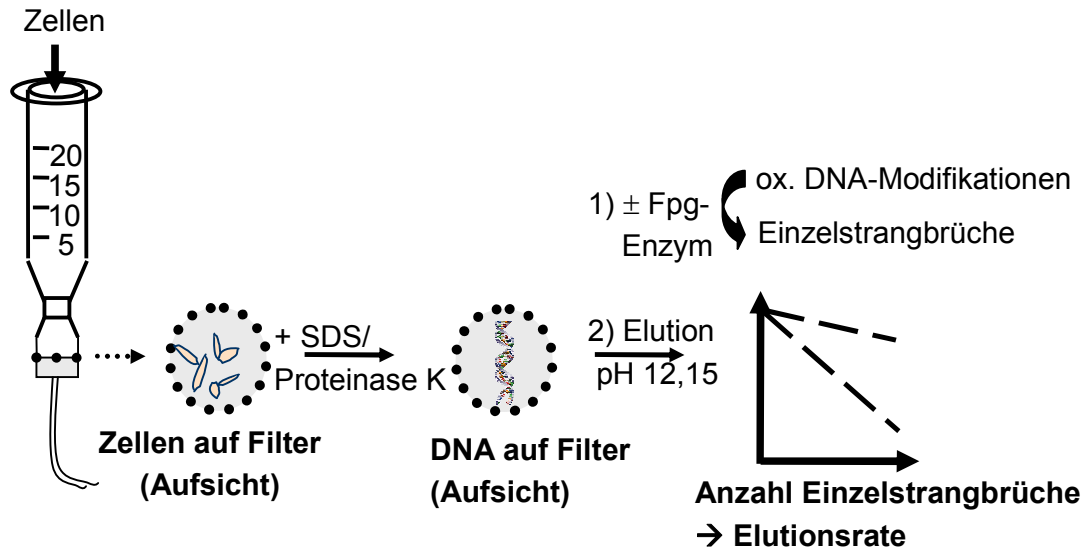


Abbildung 22: Prinzip der Alkalischen Elution (Hoffmann, 2003).

Zunächst wird die zu untersuchende Zellsuspension durch eine Spritze auf einen Polycarbonatfilter aufgetragen. Bei 25 °C wird über 90 min eine Lyse der Zellen mit SDS- und Proteinase K-haltigem Puffer durchgeführt, so dass anschließend nur noch die DNA auf dem Filter verbleibt. Im Anschluss wird der Lysepuffer weggewaschen und eine 50minütige Inkubation mit einer DNA-Reparatur-Endonuklease schließt sich an. Dabei werden spezifische DNA-Modifikationen durch spezifische Enzyme erkannt und entfernt, es entsteht zunächst eine abasische Stelle (AP-Läsion). Im nächsten Schritt schneidet die Endonuklease das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA ein, so dass sich nun ein Einzelstrangbruch an der Stelle befindet, an der ursprünglich die DNA-Modifikation war. Das bakterielle Fpg-Enzym verfügt über beide Aktivitäten: Es erkennt die modifizierte Base, scheidet diese mit der Glykosylasefunktion heraus und anschließend schneidet die intrinsische Endonukleaseaktivität des Fpg-Enzyms an der AP-Stelle die DNA zu einem Einzelstrangbruch ein. Das humane Ung2-Enzym hingegen verfügt nur über die Glykosylasefunktion, so dass in einer 50minütigen Inkubation im Anschluss an die Ung2-Inkubation mit einer Endonuklease (hier T4Endonuklease V) inkubiert werden muss, um die durch Ung2 generierten AP-Stellen in Einzelstrangbrüche zu überführen. Das Erkennungsspektrum der verwendeten Reparatur-Endonukleasen ist in Tabelle 5 gezeigt.



Reparatur-Endonuklease	Basenmodifikationen
Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg)	7,8-Dihydro-8-oxoguanin, Formamido-Pyrimidine bzw. -Purine (= FAPY), normale und 4'-oxidierte AP-Läsionen
T4 Endonuklease V	normale und 4'-oxiderte AP-Läsionen Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD),
Ung2	Uracil, 5-Fluoruracil, 5-Hydroxyuracil, Isodiallursäure, Alloxan
Endonuklease IV	Normale, 1'- und 4'-oxidierte AP-Läsionen

Tabelle 5: *Erkennungsspektrum von DNA-Modifikationen durch Reparatur-Endonukleasen.*

Abschließend wird nochmals gespült und die DNA mit einem alkalischen Elutionspuffer (pH 12,15) fraktioniert eluiert. Dabei geht die doppelsträngige DNA durch den alkalischen pH-Wert in die einzelsträngige Form über. Mit der Strömung des Elutionspuffers, der langsam durch den Filter gesaugt wird, wandern die kurzen DNA-Fragmente schneller als die langen DNA-Fragmente durch die Poren des Filters hindurch. Kurze DNA-Fragmente entstehen durch stärkere DNA-Schädigung als längere Fragmente. Die im Elutionspuffer gelöste DNA wird fraktioniert gesammelt, um ein Zeitprofil zu erstellen. Die gesammelten Fraktionen werden nach der Elution zunächst neutralisiert, wobei sich die Einzelstränge der DNA wieder zu Doppelsträngen zusammenfinden. Der anschließend dazu pipettierte Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in die DNA und wodurch sich fluorimetrisch die Menge an DNA in der Fraktion bestimmen lässt. Aus dem Anteil der DNA in den einzelnen Fraktionen errechnet sich die Elutionsrate, die proportional dem Gehalt an Einzelstrangbrüchen ist. Zur Kalibrierung der Methode wird eine Schädigung mit  $\gamma$ -Strahlung als Standard zugrunde gelegt: 6 Gy  $\gamma$ -Strahlung erzeugen dabei einen Einzelstrangbruch pro  $10^6$  Basenpaaren (Kohn et al., 1976).

### Versuchsaufbau

Für jeden Ansatz wird an eine 25 ml-Einwegspritze (ohne Kolben) mit Schraubgewinde ein Filterhalter aufgeschraubt. Im unteren Teil dieses Filterhalters wird ein Frittenboden eingelegt, auf den schließlich der Polycarbonatfilter aufgelegt wird. Die Zellsuspension und alle verwendeten Lösungen werden von oben in die Einwegspritze (=Vorratsbehälter) pipettiert. Eine Peristaltik-Mehrkanalpumpe befördert die Flüssigkeit durch Spritze, Filterhalter und Filter über einen Dialyseschlauch in ein Abfallgefäß. Im letzten Schritt, bei der Elution der DNA, wird anstelle des Abfallbehälters ein an die Pumpe angeschlossener Fraktionssammler verwendet.

### Durchführung

Zunächst werden die Frittenböden und die Polycarbonatfilter (Durchmesser der Poren: 2  $\mu\text{m}$ ) mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  gespült und wie im vorigen Absatz beschrieben in den Filterhalter eingebaut, der danach luftblasenfrei mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  befüllt wird. Ein Wasserbad wird so befestigt, dass es die Temperierung der Filterhalter erlaubt. Die Temperatur wird auf 4 °C eingestellt, um eine Reparatur der DNA-Schäden während des Auftragens der Zellen zu unterbinden. Werden primäre Milzzellen verwendet, so werden die betroffenen Vorratsbehälter mit 10 ml Suspensionspuffer vor dem Auftragen der Zellen gespült. Nun werden die Zellproben in Form von Zellsuspensionen in Kulturmedium oder Suspensionspuffer über die Vorratsbehälter auf die Filter aufgetragen (1 Mio Zellen pro Filter, in einem Volumen von 1-5 ml, Hepatozyten: 500 000 Zellen, Spermien: 2 Mio Zellen). Zum Wegspülen von Mediumresten wird zweimal mit 5 ml kaltem PBSCMF gewaschen, gegen Ende des zweiten Spülvorgangs wird die Temperatur des Wasserbades auf 25 °C erhöht. Mit der anschließenden Lyse der Zellen kann erst begonnen werden, sobald die Temperatur 15 °C erreicht hat, da das im Lysepuffer enthaltene SDS bei niedrigeren Temperaturen ausfallen würde. Nach Durchpumpen von 2 ml Lysepuffer bei maximaler Geschwindigkeit werden 5 ml Lysepuffer mit Proteinase K innerhalb von 90 min durch das System gepumpt. Nach der Lyse wird fünfmal mit  $\text{BE}_1$ -Puffer gespült, beim Auftragen dieses Puffers mit der Multipette werden gleichzeitig die Wände der Spritze gereinigt und nach jedem Waschschrift die Reste des Puffers mit einer Pasteurpipette entfernt. Weitere zweimal werden die Spritzen dann mit dem jeweiligen Enzympuffer auf dieselbe Weise gespült ( $\text{BE}_1$  für Fpg und Endo IV;  $\text{BE}_{15}$  für T4 Endo V, Ung2-Assay-Puffer für Ung2). Während des Spülvorganges wird die Temperatur für die Enzyminkubation auf 37 °C erhöht. Zur Enzyminkubation werden jeweils 2 ml der frisch hergestellten Enzymverdünnungen aufgetragen. Die Spuren, in denen die Einzelstrangbrüche ohne Enzymzugabe quantifiziert werden sollen, werden mit 2 ml des jeweiligen Enzympuffers ohne BSA befüllt. Der erste Milliliter der Lösung wird bei maximaler Geschwindigkeit durchgepumpt, der zweite innerhalb von 50 min. Tabelle 6 zeigt die eingesetzten Enzymkonzentrationen.

<b>Reparatur- Endonuklease</b>	<b>Puffer</b>	<b>Enzymkonzentration Stammlösung</b>	<b>Endkonzentration Enzym</b>
Fpg-Rohextrakt bis Versuch 35AETH	BE <sub>1</sub> /BSA	1,3 mg/ml	1 µg/ml
Fpg-Rohextrakt ab Versuch 36AETH	BE <sub>1</sub> /BSA	690 µg/ml	1 µg/ml
T4 Endo V bis Versuch 47AETH	BE <sub>15</sub> /BSA	50 µg/ml	100 ng/ml
T4 Endo V ab Versuch 48AETH	BE <sub>15</sub> /BSA	3,36 mg/ml	1,12 µg/ml
Endo IV	BE <sub>1</sub> /BSA	4 mg/ml	30 ng/ml
Ung2 (Charge1) ab Versuch 07AETH	Ung2- Assay- Puffer/BSA	2 ng/µl	30 ng/ml
Ung2 (Charge2) ab Versuch 30AETH	Ung2- Assay- Puffer/BSA	2 ng/µl	30 ng/ml
Ung (Charge3) ab Versuch 63AETH	Ung2- Assay- Puffer/BSA	0,2 µg/µl	75 ng/ml
Ung (Charge4) ab Versuch 94AETH	Ung2- Assay- Puffer/BSA	1 µg/µl	77 ng/ml

*Tabelle 6: Verwendete Konzentrationen an Fpg-, T4 Endo V-, Endo V- und Ung2-Enzym in der Alkalischen Elution.*

Im Anschluss an eine Ung2-Inkubation werden nun die Enzymreste mittels Pasteurpipette und nachfolgendes zweimaliges Spülen mit je 5 ml BE<sub>15</sub> entfernt. Dann findet eine Postinkubation mit T4 Endo V-Enzym statt. Dazu wird auf jede Spur (außer Spuren in denen Einzelstrangbrüche nachgewiesen werden sollen) T4 Endo V-Enzymlösung aufgetragen, der erste Milliliter Enzymlösung mit maximaler Pumpgeschwindigkeit und der zweite Milliliter innerhalb von 50 Minuten durchgepumpt. Wurde eine Fpg, T4 Endo V- oder Endo IV-Inkubation durchgeführt, ist keine Postinkubation notwendig. Nach Beendigung der ersten oder zweiten Enzyminkubation wird das Wasserbad auf 25 °C eingestellt und zweimal mit 5 ml BE<sub>1</sub> gespült. Frühestens nach Erreichen von 27 °C im Wasserbecken, wird mit 4 ml Waschpuffer gespült. Danach füllt man die Einwegspritzen mit 25 ml Elutionspuffer und eluiert mit einer Pumpgeschwindigkeit von 1,9 ml/h über 12 h bei 25 °C (schnelle Elution siehe Kapitel 4.2.10.) Durch den Fraktionswechsel, der alle zwei Stunden stattfindet, erhält man aus jeder Spur 6 Fraktionen mit je ca. 3,8 ml pro Reagenzglas. Der Überstand an Elutionspuffer, der sich nach der Elution noch auf den Filtern befindet, wird in die

sechste Fraktion gepumpt. Zur Auswertung werden zunächst die Filterhalter auseinander gebaut. Dabei vereinigt man Fritte und Filter mit der sechsten Fraktion der jeweiligen Spur in einem Coulter Counter®-Zählköcher und inkubiert unter Schütteln für 2 Stunden bei 60 °C, um die auf dem Filter verbliebene DNA in Lösung zu bringen. Nach der Inkubation wird eine dem Volumen der Fraktionen 1-5 entsprechende Menge (3,8 ml) der Lösung entnommen und wie diese aufgearbeitet. Jedes Reagenzglas mit DNA-Lösung wird mit einer dem Fraktionsvolumen entsprechenden Menge (3,8 ml) an Phosphatpuffer I (pH 6, Raumtemperatur) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur ist der Neutralisierungsprozess beendet, bei dem die DNA wieder doppelsträngig wird. Im Folgenden wird das gleiche Volumen an Phosphatpuffer II (pH 7,2)/Bisbenzimid (1,5 µM) zugesetzt und erneut 15 min unter Ausschluss von Licht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung eines Aliquots dieser DNA-Farbstoff-Lösung erfolgt in einer Quarzküvette im Fluorimeter bei einer Anregung von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 450 nm. Zuvor wird das Fluorimeter mit einer Blindprobe aus je 3,8 ml Elutionspuffer, Phosphatpuffer I, Phosphatpuffer II/Bisbenzimid (1,5 µM) auf Null eingestellt. Weiterhin werden die Fraktionen einer Elutionsspur ohne DNA ebenfalls vermessen und die Fluoreszenz-Intensitäten dieser einzelnen Fraktionen von den jeweiligen Spuren mit DNA subtrahiert. Die Summe der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Fraktionen und des Filterwertes einer Probe ist linear zur Gesamtmenge der DNA dieser Probe. So lässt sich der prozentuale Anteil der jeweiligen DNA-Menge, der zu den entsprechenden Zeiten noch auf dem Filter vorlag, berechnen. Wird die DNA-Menge der einzelnen Fraktionen halblogarithmisch gegen den Zeitverlauf aufgetragen, ergibt sich daraus eine Gerade, deren Steigung proportional zur Anzahl Einzelstrangbrüche zunimmt. Aus einer Kalibrierung unserer Elutionsanlage mit  $\gamma$ -bestrahlten Zellen lässt sich folgende Geradengleichung ableiten, mit der sich die absolute Anzahl Einzelstrangbrüche (SSB) errechnen lässt (Epe, 1993b):

$$SSB = m \cdot 2,24 \cdot 10^{-6}$$

Dabei ist  $m$  die Steigung der Geraden und 2,24 der für unsere Bedingungen experimentell bestimmte Faktor (Pflaum, 1996).

Die in den Graphiken in Kapitel 5 angegebenen Fpg-, T4 Endo V-, Endo IV- und Ung2-sensitiven Läsionen berechnen sich folgendermaßen:

Fpg-sensitive DNA-Modifikationen:

Von dem Wert der mit Fpg-Protein inkubierten Spur (oder Mittelwert aus zwei Fpg-Spuren) wird der korrespondierende Wert ohne Enzyminkubation (= Einzelstrangbrüche) subtrahiert.

T4 Endo V-sensitive Modifikationen:

Von dem Wert der mit T4 Endo V-Protein inkubierten Spur (oder Mittelwert aus zwei T4 Endo V-Spuren) wird der korrespondierende Wert ohne Enzyminkubation (=Einzelstrangbrüche) subtrahiert.

Endo IV-sensitive Modifikationen:

Von dem Wert der mit Endo IV-Protein inkubierten Spur (oder Mittelwert aus zwei Endo IV-Spuren) wird der korrespondierende Wert ohne Enzyminkubation (=Einzelstrangbrüche) subtrahiert.

Ung2-sensitive Modifikationen:

Von dem Wert der mit Ung2-Protein inkubierten Spur (oder Mittelwert aus zwei Spuren) wird der korrespondierende Wert der Spur mit T4 Endo V-Protein abgezogen. Damit werden die Einzelstrangbrüche (die in der mit T4 Endo V-Protein inkubierten Spur miterfasst werden) und AP-Läsionen subtrahiert.

#### **4.2.10 Alkalische Schnellelution zur Detektion höherer DNA-Schäden**

Da sich mit der oben beschriebenen Elutionstechnik nur Schäden bis zu maximal etwa 0,6 Strangbrüche pro  $10^6$  bp nachweisen lassen, kann die oben beschriebene Technik einfach abgewandelt werden, indem man die eigentliche Elution, bei einer Pumpgeschwindigkeit von 30.7 ml/h durchführt. Dadurch wird die Empfindlichkeit der Methode herabgesetzt und die Gesamtelutionszeit verringert sich von 10 h auf 54 min. Das Fraktionsvolumen und die Anzahl der Fraktionen bleiben gleich, so dass die Fraktionen alle 9 min gewechselt werden.

Zur Auswertung dient wiederum die Kalibrierung durch Schädigung mit  $\gamma$ -Strahlung (Epe, 1993a; Kohn et al., 1976). Nach den von D. Ballmaier (Ballmeier, 1997) durchgeführten  $\gamma$ -Bestrahlungsexperimenten ergibt sich für die Umrechnung der Geradensteigungen aus der Alkalischen Schnellelution in die Anzahl von Einzelstrangbrüchen pro  $10^6$  Basenpaaren ein Faktor  $F = 8,6$ .

#### **4.2.11 Statistische Auswertung**

Die statistischen Vergleiche zwischen zwei Datenreihen wurden mit dem Student'schen T-Test durchgeführt. Dabei wurde das Excel-Programm von Microsoft zu Hilfe genommen. Alle T-Tests wurden als zweiseitige Tests durchgeführt, dabei wurden jeweils zwei Stichproben ungleicher Varianz verglichen (heteroskedastischer Typ). Eine Abweichung von  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant betrachtet.



## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Ursachen für Uracil in der DNA von verschiedenen Zellkulturlinien und Mäusen

Für die Entfernung von Uracil in der DNA von Säugern ist vor allem die Basenexzisions-Reparatur von Bedeutung. Das Enzym Uracil-DNA-Glycosylase (Ung2) übernimmt hierbei die Erkennung und Exzision der fehlerhaften Base. Im Jahre 2001 gelang es T. Lindahl und Mitarbeitern, homozygote *ung*<sup>-/-</sup>-Mäuse (defizient in Ung2 durch *knockout* beider Allele von Ung2) zu generieren. Mit Hilfe solcher *knockout*-Tiere und daraus etablierter Zelllinien (*mouse embryo fibroblasts*, MEFs, Mausfibroblasten) sollte versucht werden, den Ursprung von Uracil in der DNA experimentell zu untersuchen.

Die Experimente in diesem Kapitel wurden einerseits an immortalisierten MEFs durchgeführt, andererseits an frisch isolierten primären Zellen verschiedener Organe der *knockout*-Mäuse. Parallel wurden jeweils eine *ung*<sup>+/-</sup>-Mausfibroblasten-Zelllinie und *ung*<sup>+/+</sup>-Mäuse (beide profizient in Ung2, auch Wildtyp genannt) als Kontrollen untersucht.

#### 5.1.1 Basale Gleichgewichtsspiegel Ung2-sensitiver Modifikationen in Mausfibroblasten und frisch isolierten Mäusezellen

Um in der Alkalischen Elution mit Reparaturglykosylasen die Spiegel bestimmter DNA-Modifikationen messen zu können, müssen diese Enzyme (aufgereinigt oder Rohextrakte) zunächst in einer Sättigungskurve getestet werden. Diese dient der Ermittlung der Einsatzkonzentration für die nachfolgenden Versuche. Dabei werden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des entsprechenden Enzyms für 50 min bei 37 °C inkubiert (siehe Kapitel 4.2.9), um den basalen DNA-Schaden der Zellen zu ermitteln. Dabei ergibt sich mit aufsteigender Enzymkonzentration eine erhöhte Detektion des basalen DNA-Schadens bis schließlich die Kurve auf der tatsächlichen Höhe des DNA-Schadens sättigt. Um noch Erkennungspielraum nach oben durch zusätzlich zu den basalen Gleichgewichtsspiegeln induzierte Läsionen zu haben, wird eine Konzentration größer der Sättigungskonzentration für alle nachfolgenden Versuche gewählt.

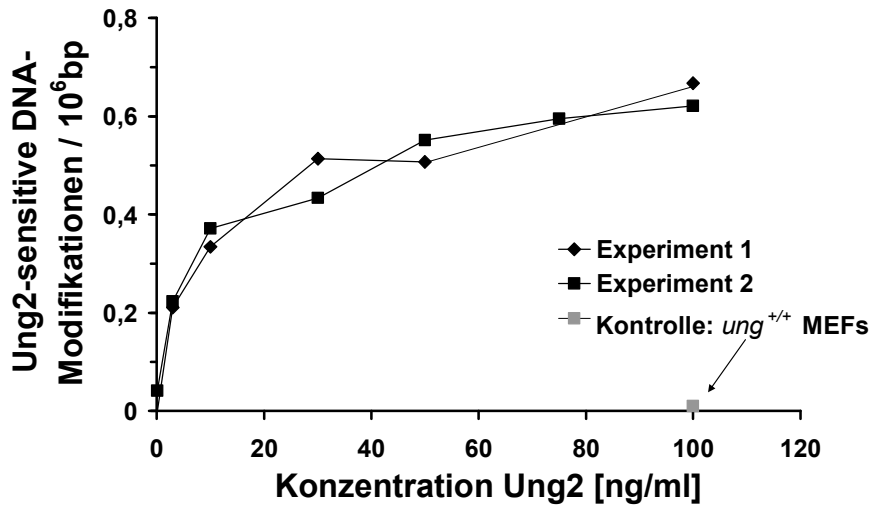


Abbildung 23: *Erkannte Anzahl Ung2-sensitiver DNA-Modifikationen in ung<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten und ung<sup>+/+</sup>-Mausfibroblasten bei ansteigender Konzentration von Uracil-DNA Glykosylase (Ung2) in der Alkalischen Elution. Durch diese Sättigungskurve wurde die notwendige Einsatzkonzentration (75 ng/ml) von Ung2 für nachfolgende Versuche ermittelt. Die zunächst miterfassten Einzelstrangbrüche und AP-Läsionen (T4 Endo V-sensitive DNA-Modifikationen) wurden bei der Berechnung der Ung2-sensitiven Modifikationen subtrahiert (siehe Kapitel 4.2.9).*

Die in Abbildung 23 dargestellten Sättigungskurven sind beispielhaft ausgewählt für insgesamt vier dieser Kurven, die im Verlauf dieser Arbeit angefertigt wurden, da unterschiedliche Chargen an Enzymlösung verbraucht wurden. Für die dargestellte Enzymcharge lässt sich der Sättigungsbereich ab ca. 60 ng/ml erkennen. Für alle weiteren Versuche mit dieser Charge wurden 75 ng/ml eingesetzt. In Tabelle 6 (S. 75) sind alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Enzymchargen und den dazugehörigen Einsatzkonzentrationen aufgeführt.

In den nachfolgenden Experimenten sollte nun die Auswirkung des Ausfalls von Ung2 auf die basalen Gleichgewichtspiegel Ung2-sensitiver DNA-Modifikationen überprüft werden. Dazu wurden zunächst die Mausfibroblasten untersucht. Zur Absicherung der Ergebnisse wurde zusätzlich zur Alkalischen Elution der Comet Assay durchgeführt. Die Alkalische Elution bietet jedoch den Vorteil, durch interne Eichung ein quantitatives Ergebnis zu liefern, wohingegen der Comet Assay nur eine qualitative Abschätzung zulässt.



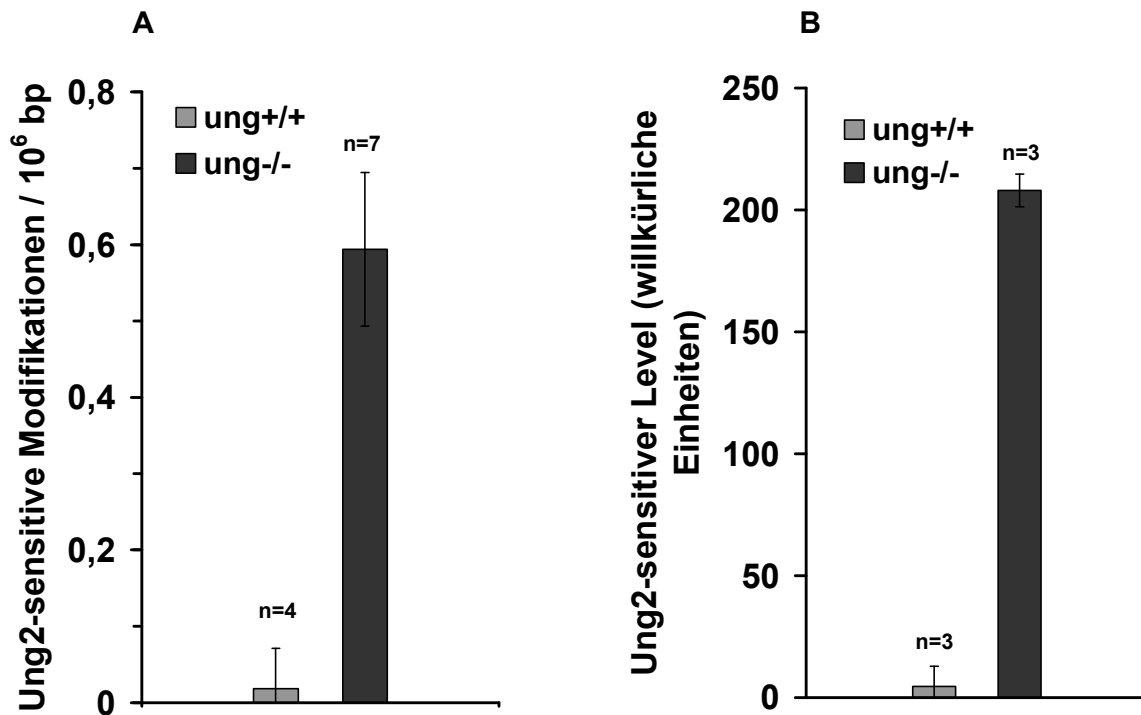


Abbildung 24 A und B: Basale Gleichgewichtsspiegel Ung2-sensitiver DNA-Modifikationen in ungeschädigten *ung*<sup>-/-</sup>- und *ung*<sup>+/+</sup>-Mausfibroblasten, detektiert mit der Alkalischen Elution (A) und dem Comet Assay (B). Beide Methoden sind in Kapitel 4.2.9 bzw. Kapitel 4.2.8 erläutert. Für A: Die zunächst miterfassten Einzelstrangbrüche und AP-Läsionen (T4 Endo V-sensitiv DNA-Modifikationen) wurden bei der Berechnung der Ung2-sensitiven Modifikationen subtrahiert (siehe Kapitel 4.2.9).

Abbildung 24 A zeigt die basalen Gleichgewichtsspiegel Ung2-sensitiver DNA-Modifikationen in ungeschädigten *ung*<sup>-/-</sup>- und *ung*<sup>+/+</sup>-Mausfibroblasten gemessen mit der Alkalischen Elution; Abbildung 24 B zeigt die gleichen Zellen gemessen mit dem Comet Assay. Mit beiden Meßmethoden lässt sich eine starke Erhöhung der Ung2-sensitiven DNA-Modifikationen in den *knockout*-Zellen erkennen. Die Uracil-Gehalte der DNA der Wildtypzellen liegen bei beiden Messmethoden an der Nachweisgrenze.

Um nun zu überprüfen, ob sich die basalen Gleichgewichtsspiegel in den untersuchten Mausfibroblastenzelllinien mit denen der korrespondierenden Mäuse decken, wurden verschiedene Gewebe von unbehandelten *knockout*- und Wildtypmäusen auf ihre Uracilgehalte hin untersucht. Dazu wurden 6-8 Monate alten Mäusen die Organe Leber, Milz und Hoden entnommen, die Zellen aus dem Gewebeverband isoliert und frisch für den Versuch verwendet. Im Fall der Leber wurde eine Perfusion zur Vereinzelung der Hepatozyten mit EDTA- und Kollagenasepuffer durchgeführt. Die genauen Präparationen der Zellsuspensionen aus dem jeweiligen Gewebeverband sind in den Kapiteln 4.2.1.3 bis 4.2.1.8 beschrieben.

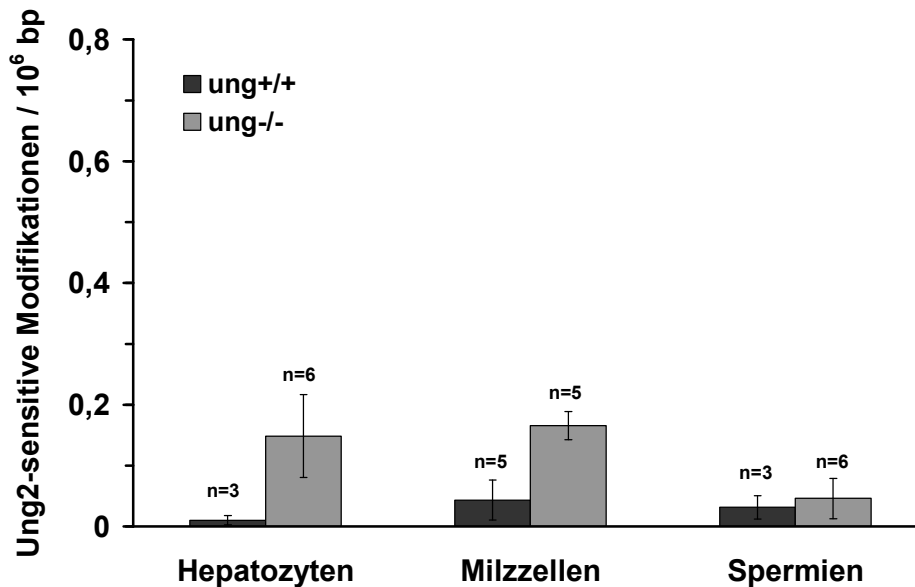


Abbildung 25: Basale Gleichgewichtsspiegel Ung2-sensitiver DNA-Modifikationen in ungeschädigten ung<sup>-/-</sup>- und ung<sup>+/+</sup>-Mausprimärzellen verschiedener Organe. Die Zellen wurden frisch isoliert und direkt zum Versuch eingesetzt. Details zur Präparation der Zellsuspensionen siehe Kapitel 4.2.1.3 bis 4.2.1.8. Die zunächst miterfassten Einzelstrangbrüche und AP-Läsionen (T4 Endo V-sensitive DNA-Modifikationen) wurden bei der Berechnung der Ung2-sensitiven Modifikationen subtrahiert (siehe Kapitel 4.2.9).

Abbildung 25 zeigt bei den Organen Leber und Milz von ung<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant erhöhte Ung2-sensitive DNA-Modifikationen im Vergleich zu ung<sup>+/+</sup>-Mäusen. Die Spermien der *knockout*-Tiere hingegen zeigten keine erhöhten Ung2-sensitiven DNA-Modifikationen. Ein Vergleich mit Abbildung 24 zeigt einen sehr großen Unterschied in der Akkumulation Ung2-sensitiver Modifikationen bei den *knockout*-Mausfibroblasten im Vergleich zu den Organen der *knockout*-Mäuse. Da es sich bei den für den Versuch verwendeten Spermien um reife schwimmfähige Spermien handelte (siehe Kapitel 4.2.1.4), liegt die Vermutung nahe, dass die -trotz gleichem Genotyp (*knockout* in Ung2)- unterschiedliche Akkumulation von Uracil in der DNA an der Proliferation liegt. Reife Spermien proliferieren nicht, im Gegensatz zu den sehr teilungsaktiven ung<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten. Leber und Milz weisen ebenfalls, wenn auch nur geringe, Proliferation auf.

Um die Vermutung zu überprüfen, dass die Proliferation für die in den ung<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten stark erhöhten Ung2-sensitiven DNA-Modifikationen verantwortlich ist, wurden die im nächsten Kapitel beschriebenen Versuche mit moduliertem Wachstum von Zellen durchgeführt.

### 5.1.2 Einfluss der Zellproliferation auf die basalen Gleichgewichtspiegel Ung2-sensitiver DNA-Modifikationen in Mausfibroblasten und primären Mauszellen

Wachstumsmodulation von Zellen kann entweder Verstärkung der Proliferation oder Hemmung der Proliferation bedeuten. Zur Untersuchung des Uracileintrags in die DNA über die Proliferation wurden beide Verfahren angewendet. Zunächst wurde bei Mausfibroblasten die Proliferation gehemmt und dann der Uracilgehalt in der DNA bestimmt.

Fibroblasten können zu einem physiologisch schonenden Proliferationsstopp gebracht werden, indem sie in einer Zellkulturflasche ohne Ablösen so lange kultiviert werden, bis sie einen geschlossenen Zellrasen bilden und somit konfluent sind. Mit diesem Experiment sollte der Ursprung von Uracil in der DNA aufgeklärt werden. Wie in Kapitel 2.2 bereits erläutert, gibt es zwei Quellen für Uracil in der DNA, eine davon ist der Fehleinbau von dUMP während der Replikation. Wenn dieser Fehleinbau die Hauptquelle wäre, sollte in konfluenten *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten -wegen der fehlenden Replikation- deutlich geringere Spiegel Ung2-sensitiver DNA-Modifikationen nachweisbar sein.

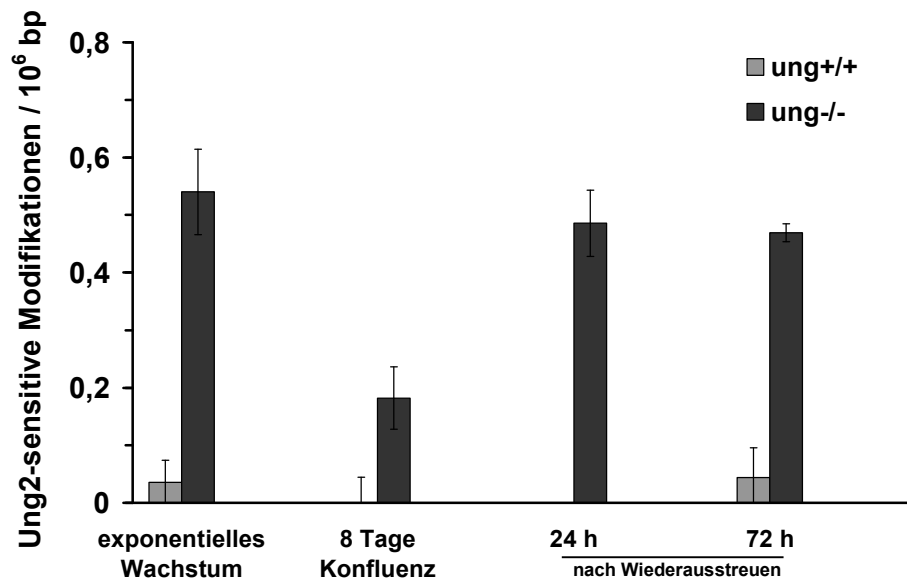


Abbildung 26:

Vergleich der basalen Gleichgewichtsspiegel Ung2-sensitiver DNA-Modifikationen von *ung*<sup>-/-</sup> und *ung*<sup>+/+</sup>-Mausfibroblasten im exponentiellen und konfluenten Wachstumsstadium sowie nach der Konfluenz wieder zum exponentiellen Wachstum ausgestreuten *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten und *ung*<sup>+/+</sup>-Mausfibroblasten. Die Konfluenz wurde durch Dauerkultur ohne Ablösen des Zellrasens erreicht. Details siehe Kapitel 4.2.3. 2 Mio der konfluenten Zellen wurden am Versuchstag erneut ausgestreut und nach 24 bzw. 72 h Wachstum vermessen (Daten für exponentiell wachsende Mausfibroblasten siehe auch Abbildung 24). Die zunächst miterfassten Einzelstrangbrüche und AP-Läsionen (T4 Endo V-sensitive DNA-Modifikationen) wurden bei der Berechnung der Ung2-sensitiven Modifikationen subtrahiert (siehe Kapitel 4.2.9). (n=3-5).

Wie vermutet, lässt sich bei den konfluenten *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten eine deutliche Verringerung der Ung2-sensitiven DNA-Modifikationen erkennen. Die *ung*<sup>+/-</sup>-Mausfibroblasten verändern ihren Uracilgehalt in der DNA aufgrund der Konfluenz nicht nachweisbar. Ein Teil der konfluenten Zellen wurde nicht zum Versuch verwendet, sondern in einer neuen Zellkulturflasche dünn ausgestreut, so dass sich die Zellen wieder teilen konnten. Nach diesem Wiederaustreuen erreichen die *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten wieder ihren ursprünglichen Gehalt an Uracil in der DNA.

In Kapitel 2.3.1 wurde das in den Mausfibroblasten ebenfalls vorhandene Reparaturenzym Smug1, welches auch Uracil in der DNA erkennt und herausschneidet, vorgestellt. Aus diesem Experiment lässt sich schließen, dass die in *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten vorhandene *back-up* Reparatur durch Smug1 entweder eine Selektivität für U:G-Paare hat -also vorwiegend Uracil, welches aus der Desaminierung von Cytosin entstanden ist- repariert, oder dass das Enzym nur eine geringe Kapazität hat.

Wie zu Beginn dieses Kapitels erwähnt, kann zur Untersuchung des Einflusses der Proliferation auf die Uracil-Spiegel in Zellen, die Proliferation gehemmt (Konfluenz) oder verstärkt (Wachstumsstimulation) werden. Letzteres ist bei primären Milzzellen aus Mäusen über einen Zeitraum von bis zu vier Tagen möglich. So kann überprüft werden, ob eine gesteigerte Proliferation -gemäß der Erwartung- zu einem erhöhten Uracil-Spiegel in der DNA über den Fehleinbau von dUMP führt. Dazu werden frisch isolierte Milzzellen für 72 h mit und ohne Proliferationsstimuli in 96-*well*-Platten inkubiert. Die Proliferationsstimuli Concanavalin A und Lipopolysaccharid regen über einen immunologischen Reiz die Proliferation der Milzzellen (Immunzellen) an. Mit dem Einbau von [<sup>3</sup>H]-Thymidin wird kontrolliert, ob durch die Stimuli vermehrt Proliferation stattfindet. Dem Kulturmedium zugesetztes [<sup>3</sup>H]-Thymidin liegt dabei im Vergleich zum physiologischen unmarkierten Thymidin im Überschuss vor, so dass das radioaktiv markierte Thymidin bevorzugt in die neu synthetisierte DNA eingebaut wird, was dann bei der Scintillationsmessung zu einem stärkeren Signal führt, als bei teilungsarmen Zellen.

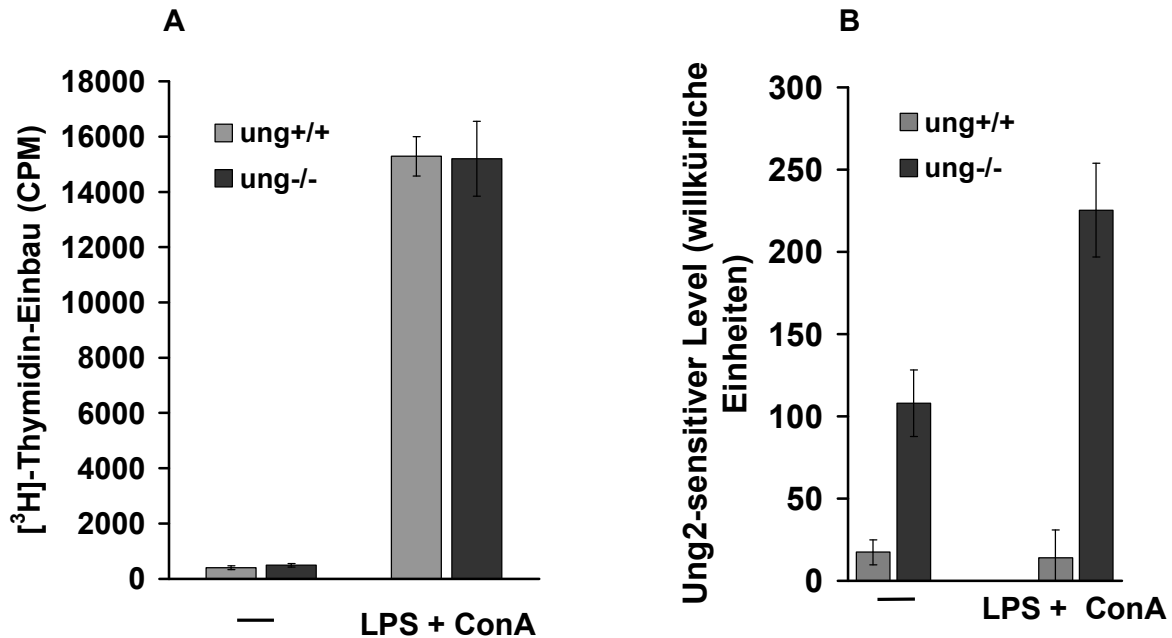


Abbildung 27 A und B: A: [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Einbau in die DNA von ung<sup>-/-</sup>- und ung<sup>+/+</sup>-Milzzellen als Maß für die Proliferation von stimulierten (LPS+ConA) und unstimulierten (-) primären Milzzellen ex vivo in counts per minute (CPM). Die Zellen wurden 72 h mit den Stimuli in 96-well Platten inkubiert. B: Ung2-sensitiver Level von stimulierten (LPS+ConA) und unstimulierten (-) ung<sup>-/-</sup> und ung<sup>+/+</sup> primären Milzzellen ermittelt mit dem Comet-Assay (Details zur Versuchsdurchführung siehe Kapitel 4.2.1.6).

Abbildung 27 A zeigt den [<sup>3</sup>H]-Thymidineinbau in die DNA von stimulierten und unstimulierten Milzzellen als Maß für die Teilungsaktivität der Zellen. Beide Genotypen zeigen ohne Stimuli fast keinen Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin, was die Einstellung der DNA-Synthese bedeutet. Die Zugabe von Stimuli bewirkt bei beiden Genotypen den gleichen deutlichen Anstieg in der DNA-Synthese, welcher mit verstärktem Einbau von [<sup>3</sup>H]-Thymidin einhergeht. Mit diesem Versuch konnte also gezeigt werden, dass die Proliferationsstimuli bei beiden Genotypen gleichermaßen eine verstärkte DNA-Synthese und damit Proliferation der Zellen auslösen.

Abbildung 27 B zeigt die Uracil-Spiegel in primären stimulierten und unstimulierten Milzzellen beider Genotypen gemessen mit dem Comet Assay. Im unstimulierten Zustand findet sich in den ung<sup>-/-</sup>-Zellen im Vergleich zum Wildtyp, schon ein signifikant erhöhter Uracil-Spiegel, der durch die Wachstumsstimulation über 72 h fast verdoppelt wird. Wildtyp-Milzzellen hingegen zeigen auch nach 72 h Wachstumsstimulation keine erhöhten Uracil-Spiegel.

Mit diesen Versuchen, bei denen die Zellproliferation moduliert wurde, konnte also gezeigt werden, dass unter der Voraussetzung einer konstanten Reparaturrate die

Zellteilung und damit die Replikation der DNA für den Haupteintrag an Uracil in die DNA verantwortlich ist.

## **5.2 Einfluss von Thymidylatsynthase- Hemmstoffen auf verschiedene DNA Modifikationen und die Proliferation von $ung^{-/-}$ und $ung^{+/+}$ -Mausfibroblasten**

Durch die vorherigen Versuche konnte gezeigt werden, dass der Fehleinbau von Uracil während der Replikation der DNA eine größere Rolle für Uracil in der DNA spielt als die Desaminierung von Cytosin. Der Fehleinbau von dUMP wird auch als Hauptmechanismus der Zytotoxizität von Krebstherapeutika wie 5-Fluoruracil (5-FU) und 5-Fluordesoxyuridin (5-FdUrd), welche die Thymidylatsynthase (TS) hemmen, angenommen (Longley et al., 2003). Die Hemmung der TS geht einher mit einem Anstieg des intrazellulären dUTP/dTTP-Gleichgewichtes und einem verstärkten Einbau von Uracil in die DNA (Ingraham et al., 1982; Ismail et al., 1998; Kubo et al., 1998). Für den Untergang der Zellen wird letztendlich die Entstehung von Doppelstrangbrüchen aus zwei gegenüberliegenden Uracilresten, die repariert werden, diskutiert (Dianov et al., 1991). Die Akkumulation von Einzel- und Doppelstrangbrüchen wurde bereits mittels Alkalischer Filterelution in mit 5-FU behandelten Zellen und Geweben gezeigt (Ismail et al., 1998; Kubo et al., 1998; Parsels et al., 1997). Außerdem lässt eine verringerte Zytotoxizität und Strangbruchbildung aufgrund erhöhter Expression von dUTPase (katalysiert die Hydrolyse von dUTP zu dUMP, siehe Kapitel 2.2.2) einen mechanistischen Zusammenhang zwischen Uracil-Einbau und Doppelstrangbruch-Bildung vermuten (Canman et al., 1994; Parsels et al., 1998). Diese Modelle zur Erklärung der zytotoxischen Wirkung von 5-FU und 5-FdUrd in der Therapie, beruhen also auf Fehleinbau und einer direkten Beteiligung von Uracil-DNA-Glykosylasen.

Im folgenden Kapitel soll daher mit Hilfe von  $ung^{-/-}$ -Mausfibroblasten untersucht werden, ob für die Zytotoxizität von 5-FU und 5-FdUrd ein funktionierendes Ung2-Enzym notwendig ist und, ob die therapeutische Wirkung der TS-Hemmstoffe auf einem gesteigerten Uracileinbau in die DNA beruht.

### **5.2.1 Auswirkungen von 5-Fluoruracil und 5-Fluordesoxyuridin auf die basalen Gleichgewichtsspiegel verschiedener DNA-Modifikationen und die Proliferation von $ung^{-/-}$ - und $ung^{+/+}$ -Mausfibroblasten**

Nachdem in Kapitel 5.1.2 gezeigt werden konnte, dass der Fehleinbau von dUMP während der Replikation eine wichtigere Rolle für erhöhte Uracilgehalte in der DNA von  $ung^{-/-}$ -Mausfibroblasten als die Cytosindesaminierung spielt, war es interessant

zu untersuchen, ob TS-Hemmstoffe ihre Zytotoxizität auch in Abwesenheit eines funktionierenden Ung2-Protein entfalten können. Außerdem sollte geklärt werden, ob sich durch Thymidinmangel der Uracilgehalt in *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten über den basalen Gleichgewichtsspiegel hinaus erhöhen lässt.

Aus diesem Grund sollte zunächst der Uracilgehalt in der DNA und anschließend die Proliferationsrate nach mehrtägiger Inkubation von *ung*<sup>-/-</sup>- bzw. *ung*<sup>+/+</sup>-Mausfibroblasten mit den TS-Hemmstoffen 5-FU bzw. 5-FdUrd untersucht werden.

### 5.2.1.1 Einfluss von TS-Hemmstoffen auf DNA-Modifikationen

Zur Untersuchung des Einflusses von 5-FU bzw. 5-FdUrd auf die basalen Gleichgewichtsspiegel verschiedener DNA-Modifikationen wurden die Mausfibroblasten 72 h mit ansteigenden Konzentrationen der beiden Stoffe unter Kulturbedingungen inkubiert und dann mit der Alkalischen Elution die DNA-Modifikationen gemessen.

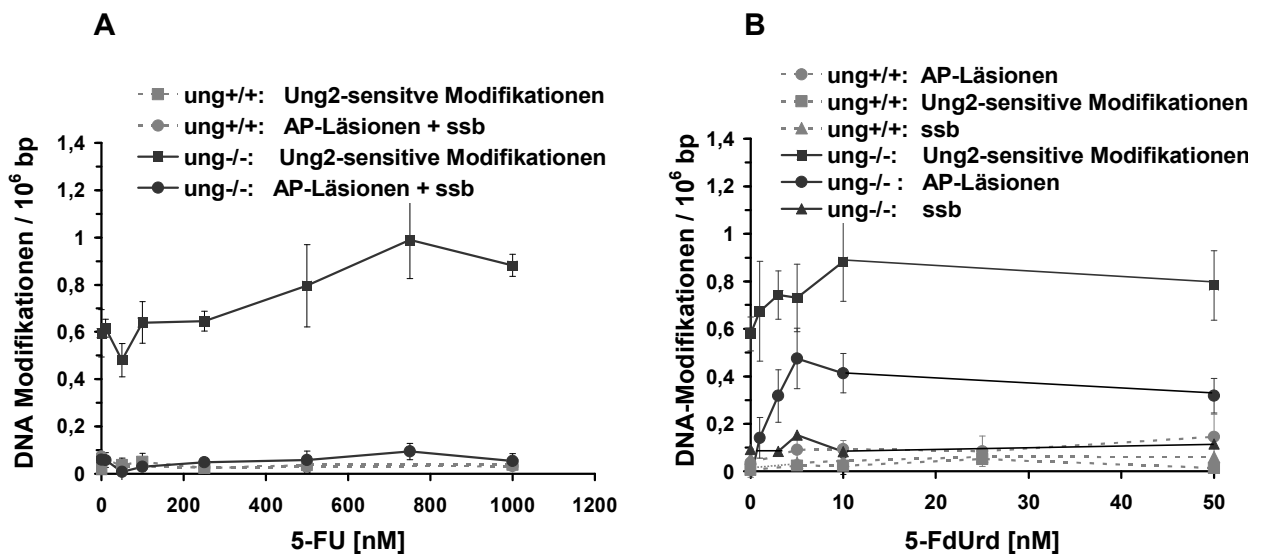


Abbildung 28 A und B: Modifikationen in der DNA von *ung*<sup>-/-</sup> und *ung*<sup>+/+</sup>-Mausfibroblasten nach 72 h Inkubation mit ansteigenden 5-FU- (A) bzw. 5-FdUrd-Konzentrationen (B). Bei der Berechnung der Ung2-sensitiven Modifikationen wurden die zunächst miterfassten Einzelstrangbrüche (ssb) und AP-Läsionen (T4 Endo V-sensitive Modifikationen) subtrahiert. Ebenso wurden bei der Berechnung der AP-Läsionen die zunächst miterfassten Einzelstrangbrüche subtrahiert (siehe Kapitel 4.2.9). Die unterschiedliche Skalierung der X-Achse von Abb. A und B ist zu berücksichtigen (n=3-7).

Abbildung 28 zeigt in den *knockout*-Zellen konzentrationsabhängig bis zu 30 % erhöhte Uracilgehalte in der DNA nach 72 h Inkubation für beide Agenzien. Eine weitere Erhöhung der Konzentrationen führte zu keinem weiteren Uracileinbau (Daten nicht gezeigt). Da für dUMP-Einbau aber DNA-Synthese notwendig ist, lässt sich dieser limitierte Uracileinbau mit der proliferationshemmenden Wirkung beider Agenzien erklären (siehe Abbildung 29). Die Wildtypzellen bauen in beiden Fällen

kein Uracil ein, auch bei hohen Konzentrationen an 5-FU und 5-FdUrd liegen ihre Ung2-sensitiven DNA-Modifikationen an der Nachweisgrenze. Erstaunlicherweise akkumulieren ausschließlich die *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten nach einer Inkubation mit 5-FdUrd zusätzlich AP-Läsionen. Die Anzahl dieser AP-Läsionen steigt konzentrationsabhängig zunächst an, dann sättigt die Kurve und verbleibt wie die Ung2-sensitiven Läsionen auf einem Plateau. Die Inkubation mit 5-FU hingegen führt bei keiner der beiden Zelllinien zur vermehrten Bildung von AP-Läsionen oder Einzelstrangbrüchen.

### 5.2.1.2 Einfluss von TS-Hemmstoffen auf die Proliferation der Zellen

Um die Frage zu klären, ob der bei den *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten beobachtete Uracileinbau Grundlage der Toxizität der beiden TS-Hemmstoffe ist, wurden beide Zelllinien für 48 h mit verschiedenen Konzentrationen beider Substanzen unter Kulturbedingungen inkubiert und deren Proliferationsverhalten untersucht. Der Proliferationsfaktor gibt die Anzahl der Vervielfachungen der Zellpopulation in der inkubierten Zellkulturflasche wieder (Details siehe Kapitel 4.2.6). Proliferationsfaktor 1 bedeutet dabei, dass sich die Zellen nicht geteilt haben, es finden sich genauso viele Zellen in der Versuchsflasche wie in einer Referenzflasche, die vor Beginn der Inkubation ausgewählt wird. Proliferationsfaktor 2 stellt genau eine Verdopplung der Zellen dar.

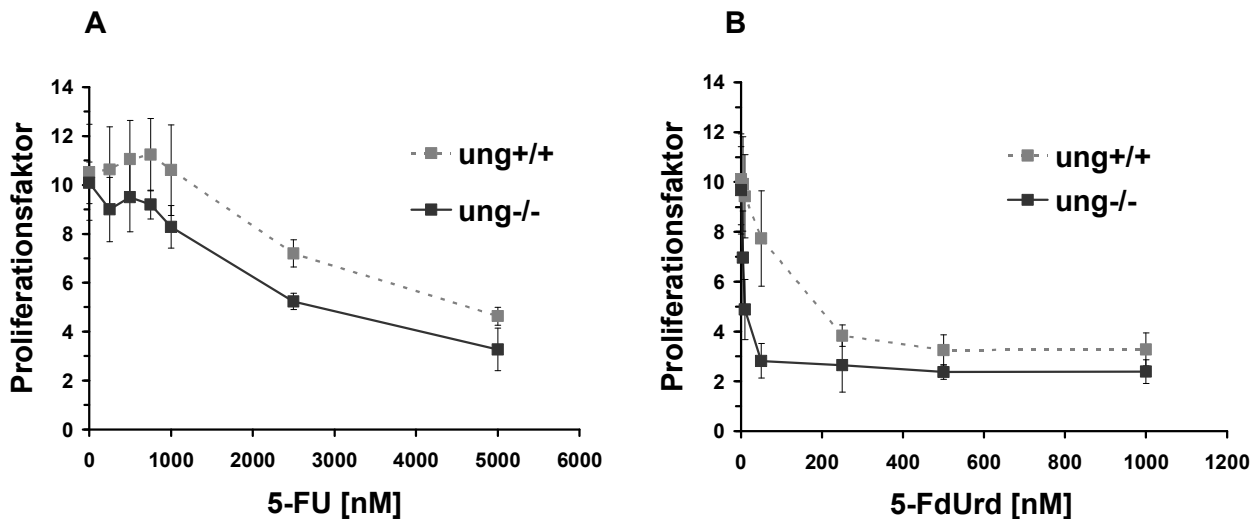


Abbildung 29 A und B: Proliferationshemmung von *ung*<sup>-/-</sup> und *ung*<sup>+/+</sup>-Mausfibroblasten nach 48stündiger Inkubation mit 5-FU (A) bzw. 5-FdUrd (B). Berechnung des Proliferationsfaktors: Anzahl der adhärenen Zellen nach Inkubation dividiert durch die Anzahl der adhärenen Zellen vor Beginn der Inkubation. Die Zellzahl vor Beginn der Inkubation wird mittels einer identisch mitgeführten Referenzflasche ermittelt, deren Zellpopulation zum Zeitpunkt des Inkubationsbeginns abgelöst und gezählt wird (n=3).



In Abbildung 29 erkennt man deutlich eine konzentrationsabhängige Proliferationshemmung beider Genotypen als Reaktion auf beide Stoffe. In Abbildung 28 wurde bereits gezeigt, dass die Wildtypzellen weder unter Einwirkung von 5-FU noch 5-FdUrd vermehrt Uracil in die DNA einbauen. Wenn –entsprechend der bisherigen Annahmen- der Uracil-Einbau für die Toxizität von Bedeutung ist, hätte man erwartet, dass die *ung*<sup>+/+</sup>-Mausfibroblasten keine Zytotoxizität nach Inkubation mit beiden Agenzien zeigen. Somit ist widerlegt, dass für die zytotoxische Wirkung der beiden TS-Hemmstoffe ein Einbau von Uracil notwendig ist.

Erstaunlicherweise erkennt man bei Inkubation mit 5-FdUrd bei beiden Genotypen eine Annäherung der Kurve an Proliferationsfaktor 2. Daraus lässt sich schließen, dass eine Verdopplung unter 5-FdUrd-Einwirkung auch im Fall der Wildtypzellen, die kein Uracil einbauen, ausreichend und notwendig ist, um die Zellen zu arretieren.

Ein deutlicher Unterschied in der Sensitivität der Genotypen zeigt sich nur bei 5-FdUrd- und nicht bei 5-FU-Inkubation: *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten zeigen schon bei relativ geringen 5-FdUrd-Konzentrationen eine stärkere Beeinträchtigung der Proliferation als die *ung*<sup>+/+</sup>-Mausfibroblasten. Anders als bei der 5-FU-Inkubation spielen also bei 5-FdUrd die DNA-Schäden für die Toxizität in *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten eine Rolle. Wahrscheinlich ist diese erhöhte Sensitivität der *knockout*-Zellen auf die beobachtete Akkumulation von AP-Läsionen nach 5-FdUrd-Inkubation zurückzuführen (siehe Abbildung 28 B), welche zytotoxisch sind (Boiteux, 2004).

Interessanterweise zeigt sich zwischen den beiden Agenzien auch ein quantitativer Unterschied: 5-FdUrd wirkt in wesentlich geringeren Konzentrationen als 5-FU proliferationshemmend. Bei *ung*<sup>+/+</sup>-Mausfibroblasten ist der IC<sub>50</sub>-Wert (*inhibitory concentration*, Konzentration ab der 50 % weniger Wachstum im Vergleich zur 0 nM-Inkubation beobachtet wird) von 5-FdUrd um mehr als Faktor 10 kleiner als bei 5-FU (vergleiche Tabelle 7). Bei den *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten zeigt sich für 5-FdUrd sogar ein um Faktor 250 geringerer IC<sub>50</sub>-Wert.

Agens/Genotyp	<i>ung</i> <sup>+/+</sup>	<i>ung</i> <sup>-/-</sup>
5-FU	> 2500 nM	2500 nM
5-FdUrd	200 nM	10 nM

Tabelle 7: Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte von 5-FU und 5-FdUrd zur Proliferationshemmung von *ung*<sup>-/-</sup>- und *ung*<sup>+/+</sup>-Mausfibroblasten. Die in der Tabelle aufgeführten Werte wurden graphisch aus Abbildung 29 ermittelt.

Zusätzlich zur Zellzahl der adhärennten Zellen wurde die Anzahl der schwimmenden - also toten-, Zellen im Überstand ermittelt. Aus diesen Daten lassen sich interessante mechanistische Unterschiede zwischen den beiden TS-Hemmstoffen erkennen.

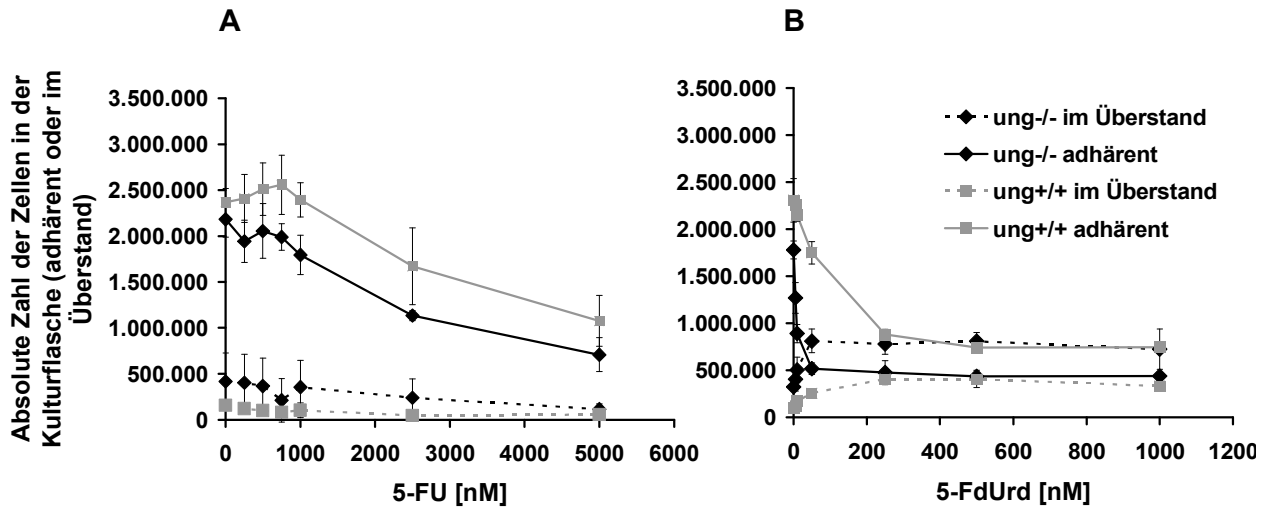


Abbildung 30 A und B: Absolute Zellzahlen von adhären

und toten (=im Überstand schwimmenden) ung<sup>-/-</sup>- und ung<sup>+/+</sup>-Mausfibroblasten nach 48stündiger Inkubation mit 5-FU (A) und 5-FdUrd (B) (n=3).

In Abbildung 30 A und B ist die Zu- bzw. Abnahme der Zellzahl in absoluten Werten der adhären

und schwimmenden Zellen angegeben. Die Anzahl der adhären

Zellen wurde bereits in Abbildung 29 zur Berechnung des Proliferationsfaktors verwendet. Da für die schwimmenden Zellen kein Proliferationsfaktor berechnet werden kann (bzw. eine inverse Bedeutung hätte), wird hier die absolute Zellzahl angegeben. Ein deutlicher Unterschied der Wirkung beider Agenzien lässt sich erkennen: 5-FU führt nicht zu einer Zunahme der schwimmenden Zellen. Das bedeutet, dass der Stoff auch in hohen Konzentrationen lediglich zu einem Wachstumsstopp, nicht aber zu einem Absterben der Zellen führt. 5-FdUrd hingegen führt konzentrationsabhängig zu einer Zunahme der Zellen im Überstand. Da das Ablösen der Zellen, was vermutlich mit einem Absterben gleichzusetzen ist, bei beiden Genotypen beobachtet wird, ist wiederum widerlegt, dass für die Zytotoxizität der TS-Hemmstoffe Uracileinbau notwendig ist.

### **5.3 Einfluß von Enzymen des oxidativen Fremdstoffmetabolismus auf die basalen Gleichgewichtsspiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen in V79-Hamster-Lungenfibroblasten und reparaturdefizienten MEFs**

Im vorherigen Kapitel wurde der Einfluss von endogenem Uracil in der DNA auf die genomische Stabilität verschiedener Zellen untersucht. Zusätzlich zum Uracil gibt es weitere endogene Faktoren, die die Integrität der DNA bedrohen. Eine davon ist der oxidative Fremdstoffmetabolismus durch das Cytochrom P450-System. Im Verlauf der physiologisch notwendigen Oxidation von Fremdstoffen entstehen in den metabolisch aktiven Zellen reaktive Sauerstoffspezies (ROS, siehe Kapitel 2.2.3.1), welche die DNA oxidativ schädigen können. Oxidative Basenmodifikationen sind dabei die am häufigsten auftretende DNA-Modifikation (siehe Kapitel 2.2.3.3.). Aus diesem Grund ist es interessant, im Vergleich zu Uracil als endogenem Faktor für DNA-Schäden, die mögliche Veränderung basaler Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Modifikationen aufgrund von Substratumsatz im Fremdstoffmetabolismus zu untersuchen. Etablierte Zellkulturzellen, die keine Enzyme des Fremdstoffmetabolismus exprimieren, wurden mit den entsprechenden Genen transfiziert, um so den schädigenden Einfluss auf die DNA mit und ohne Substratumsatz messen zu können. Als oxidative DNA-Schäden wurden 8-oxoG, AP-Läsionen und Formamidopyrimidine in ihrer Gesamtheit als Fpg-sensitive DNA-Modifikationen mit Hilfe der Alkalischen Elution (siehe Kapitel 4.2.9) bestimmt. Fpg (Formamidopyrimidin-N-Glykosylase, siehe Kapitel 4.1.7.5) ist ein bakterielles Reparaturprotein, welches die eben genannten Modifikationen erkennt. In einem Ansatz ohne Zugabe von Fpg wurden außerdem die Einzelstrangbrüche bestimmt.

#### **5.3.1 Einfluss einer Cytochrom 2E1-Überexpression auf die basalen Gleichgewichtsspiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen in V79-Zellen und MEF(*csb*<sup>-/-</sup>/*ogg1*<sup>-/-</sup>)CYP2E1-Zellen**

Da Cytochrom 2E1 im Verdacht steht, auch ohne Substratumsatz reaktive Sauerstoffspezies durch Einelektronentransfer auf molekularen Sauerstoff (mit Hilfe von Cytochromreduktase) zu generieren (siehe Kapitel 2.2.3.2), war es interessant zu untersuchen, ob die Überexpression des Enzyms erhöhte oxidative DNA-Schäden in CYP2E1-überexprimierenden MEFs und/oder V79-Zellen verursacht.

Daher wurden V79-Zellen, die durch Transfektion das humane Enzym Cytochrom 2E1 überexprimieren (V79-CYP2E1) im Vergleich zu Wildtypzellen (V79) untersucht

(siehe Kapitel 4.1.6). Zusätzlich wurden *csb*<sup>-/-</sup>/*ogg1*<sup>-/-</sup> MEFs, die ebenfalls durch Transfektion Cytochrom 2E1 überexprimieren (MEF(*csb*<sup>-/-</sup>/*ogg1*<sup>-/-</sup>)CYP2E1, siehe Kapitel 4.1.6 und 4.2.1.7) und dazugehörige Vector-only-Kontrollen untersucht. Wie in Kapitel 2.3.2 bereits erläutert, sind diese Zellen defizient in dem Reparaturprotein Ogg1, welches 8-oxoG in der DNA erkennt, herausschneidet und so die Reparatur des wichtigsten oxidativen DNA-Schadens einleitet. Zusätzlich sind diese Zellen defizient im Cockayne Syndrom B-Protein-Protein (Csb), welches für eine *backup*-Reparatur für Ogg1 verantwortlich gemacht wird, da in *ogg1*<sup>-/-</sup>-MEFs nur eine verzögerte Reparaturkapazität, in *csb*<sup>-/-</sup>/*ogg1*<sup>-/-</sup> *double-knockout*-MEFs aber keinerlei Reparaturkapazität mehr festgestellt wurde (Osterod, 2002a). Um einen vermuteten kleinen Anstieg der basalen Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Schäden sichtbar zu machen, wurden diese reparaturdefizienten *double-knockout*-Zellen als Ausgangszelllinie zur Überexpression von Cytochrom 2E1 ausgewählt. Durch die Aufzucht von mehreren Klonen standen drei überexprimierende Zelllinien (Klon 1, 2 und 4) und zwei Vector-only-Kontroll-Zelllinien (Klon 50, 51) zur Verfügung.

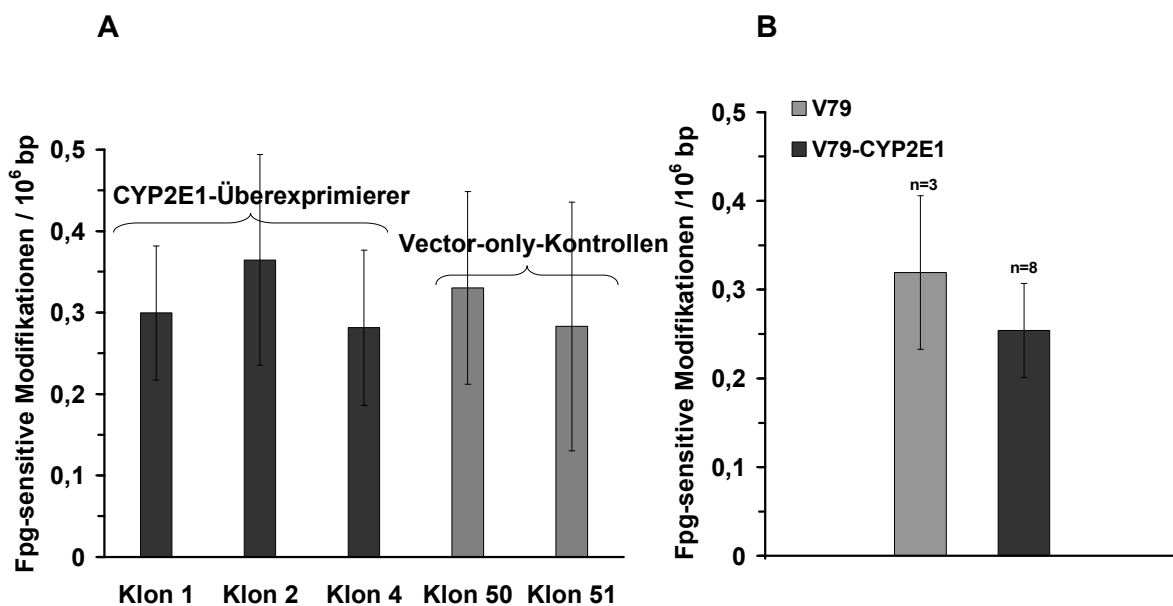


Abbildung 31 A und B: Vergleich der basalen Gleichgewichtsspiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen von A: unbehandelten MEF(*csb*<sup>-/-</sup>/*ogg1*<sup>-/-</sup>)CYP2E1-Zellen und dazugehörigen Vector-only-Kontrollen (n=2-3) und B: unbehandelten V79- und V79-CYP2E1-Zellen. Bei der Berechnung der Fpg-sensitiven Modifikationen wurden die zunächst miterfassten Einzelstrangbrüche subtrahiert (siehe Kapitel 4.2.9).

Entgegen der Erwartung zeigt sich bei beiden Zelltypen kein Unterschied der Genotypen in den Hintergrundspiegeln oxidativer DNA-Schäden. Obwohl alle diese Zellen Reduktase exprimieren, verursacht Cytochrom 2E1 in diesen Zellen ohne Substratumsatz keine Fpg-sensitiven Läsionen. Daher ist anzunehmen, dass die ROS nur in geringem Umfang produziert wurden und so im Gleichgewicht von

Entstehung und Reparatur oxidativer Schäden keinen signifikanten Beitrag leisten konnten. Eine andere Erklärung ist das Abreagieren der ROS mit anderen Makromolekülen (z.B. Membranen, Proteine), das heißt, dass deren Halbwertszeit zu kurz war, um die DNA zu erreichen.

Sodann wurde untersucht, ob die Oxidation eines physiologisch relevanten Substrats von Cytochrom 2E1 und die damit verbundene vermehrte ROS-Bildung einen zusätzlichen DNA-Schaden generiert. Ethanol (EtOH) ist ein solches Substrat mit großer pathophysiologischer Bedeutung für den Menschen (siehe Kapitel 2.2.3.2). Alkoholmissbrauch kann über die Induktion von Cytochrom 2E1 bei gleichzeitiger Einnahme von Pharmaka zu so genannten Arzneimittelinteraktionen mit schweren toxischen Wirkungen führen. Außerdem steht Ethanol in Verdacht, über die Verstoffwechslung durch Cytochrom 2E1 und der damit verbundenen ROS-Entstehung zum Leberversagen beizutragen (Cederbaum, 1991).

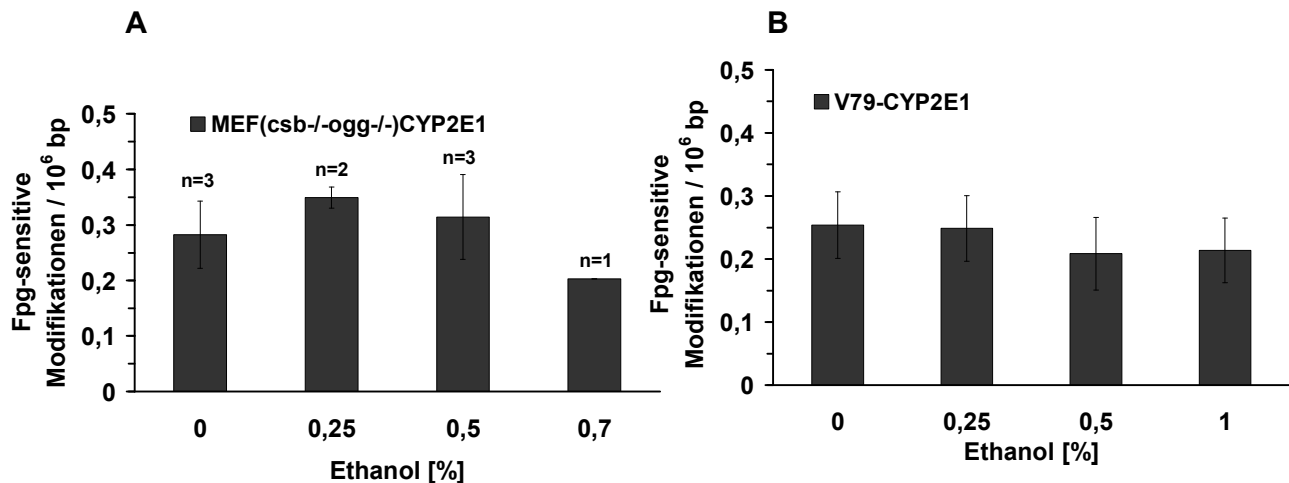


Abbildung 32 A und B: Fpg-sensitive Modifikationen nach einer 24stündigen Ethanolinkubation unter Kulturbedingungen von A: MEF(csb<sup>-/-</sup>ogg1<sup>-/-</sup>)CYP2E1-Zellen (nur Klon 1) und B: V79-CYP2E1-Zellen (n=3-8). Zum Ausgleich von verdunstetem Ethanol wurde nach 12 h das Medium verworfen und erneut ethanolhaltiges Medium auf die Zellen gegeben. Der Wert für 0 % Ethanol wurde aus Abbildung 31 A bzw. B übernommen. Bei der Berechnung der Fpg-sensitiven Modifikationen wurden die zunächst miterfassten Einzelstrangbrüche subtrahiert (siehe Kapitel 4.2.9).

Die Zellen wurden 24 h unter Kulturbedingungen mit Ethanol inkubiert, wobei das ethanolhaltige Medium nach 12 h erneuert wurde.

Bei den MEF(csb<sup>-/-</sup>ogg1<sup>-/-</sup>)CYP2E1-Zellen wurde nur Klon 1 untersucht. Trotz hoher Ethanolkonzentrationen bis zur Toxizitätsgrenze (1 % Ethanol zeigte sichtbare Wachstumshemmung, Daten nicht gezeigt) ließen sich in keiner der untersuchten Zelllinien erhöhten Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen nachweisen (Abbildung 32). Aus diesem Grund sollte anhand der V79-CYP2E1-Zellen untersucht werden, ob sich

die Zellen gegenüber einer erhöhten Anzahl von ROS mit einer vergrößerten antioxidativen Abwehr schützen.

### 5.3.2 Einfluss des intrazellulären Glutathionspiegels auf die Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden durch Ethanol

Das Tripeptid Glutathion (GSH) stellt ein wichtiges intrazelluläres Antioxidans dar. Es dient der Reduktion von  $H_2O_2$  durch Glutathionperoxidase zu Wasser, wobei GSH selbst zu GSSG oxidiert wird. Um die These der vergrößerten antioxidativen Abwehr in V79-CYP2E1-Zellen zu überprüfen, wurde aus V79-CYP2E1- und V79-Zellen ein cytosolischer Extrakt hergestellt, in dem photometrisch der Glutathiongehalt bestimmt wurde. Die Durchführung des Versuchs ist in Kapitel 4.1.7.4 beschrieben.

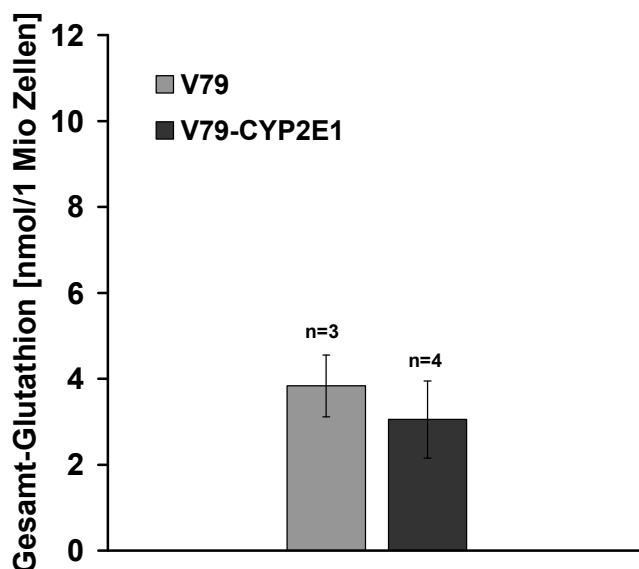


Abbildung 33: Vergleich der intrazellulären GSH-Konzentration in ungeschädigten V79- und V79-CYP2E1-Zellen. Der Versuch wurde wie in Kapitel 4.1.7.4 beschrieben durchgeführt.

Entgegen der Erwartung zeigt sich bei den V79-CYP2E1-Zellen kein erhöhter GSH-Gehalt. Die Überexpression von CYP2E1 wirkt sich also nicht auf den GSH-Gehalt der Zelle aus (Abbildung 33).

Darüber hinaus war es interessant zu untersuchen, ob nach einer Absenkung der Glutathionspiegel die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Ethanol nachweisbar sein würde. Zu diesem Zweck wurden V79-CYP2E1-Zellen durch 24stündige Behandlung mit Buthioninsulfoximin Glutathion-depletiert und anschlie-

ßend für weitere 24 h mit Ethanol unter Anwesenheit von BSO inkubiert. Buthioninsulfoximin ist ein selektiver, irreversibler Inhibitor der  $\gamma$ -Glutamylcystein-Synthetase (GCS), einem Enzym, das den ersten Schritt der Glutathion-Synthese katalysiert (Griffith, 1979). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit BSO und/oder Ethanol behandelt, abgelöst und in zwei Portionen aufgeteilt. In einer Portion wurde der Glutathion-Gehalt gemessen, um die Abwesenheit dieses Antioxidans zu verifizieren (nicht bei 1% Ethanol durchgeführt, siehe Abbildung 34A). Die andere Portion des jeweiligen Ansatzes wurde dazu verwendet, um mittels Alkalischer Elution die Anzahl oxidativer Basenmodifikationen zu bestimmen. Die Depletion von Glutathion war in allen Fällen erfolgreich (siehe Abbildung 34A).

Dennoch ist selbst bei einem Fehlen dieses Antioxidans, das die Bildung oxidativer DNA-Modifikationen durch ROS begünstigen sollte, keine Zunahme dieser DNA-Schäden nachzuweisen (Abbildung 34 B).

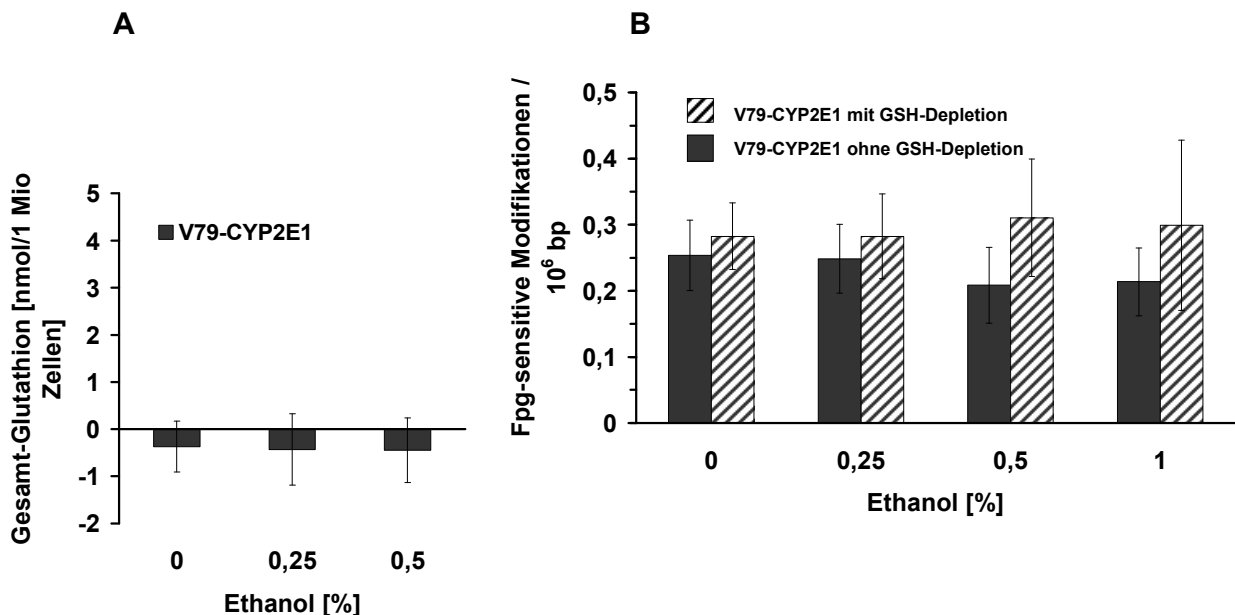


Abbildung 34 A und B: A: Gesamtglutathiongehalt in V79-CYP2E1-Zellen nach 48 h GSH-Depletion und Inkubation mit verschiedenen Ethanolkonzentrationen für weitere 24 h. Zunächst wurden die Zellen für 24 h mit 1 mM Buthioninsulfoximin (BSO) GSH-depletiert, dann erfolgte die Zugabe von Ethanol für eine 24stündige Inkubation unter weiterer Anwesenheit von BSO(siehe Kapitel 4.2.4) (n=3). B: Fpg-sensitive Modifikationen in V79-CYP2E1-Zellen nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Ethanolkonzentrationen in Kombination mit oder ohne GSH-Depletion (Durchführung wie unter A beschrieben). Die Werte ohne GSH-Depletion wurden aus Abbildung 32 übernommen. Bei der Berechnung der Fpg-sensitiven Modifikationen wurden die zunächst miterfassten Einzelstrangbrüche subtrahiert (siehe Kapitel 4.2.9) (n=3-8).

Aus diesem Ergebnis kann man schließen, dass entweder durch Ethanoloxidation keinen nennenswerten Mengen an ROS entstehen oder diese nicht bis in den Kern vordringen.

Daher sollte nun abschließend geklärt werden, ob Ethanol in beiden Zelllinien zu einem veränderten Glutathionspiegel führt. Dazu wurden beide Zelllinien erneut für 24 h mit Ethanol inkubiert und dann der Glutathiongehalt gemessen.

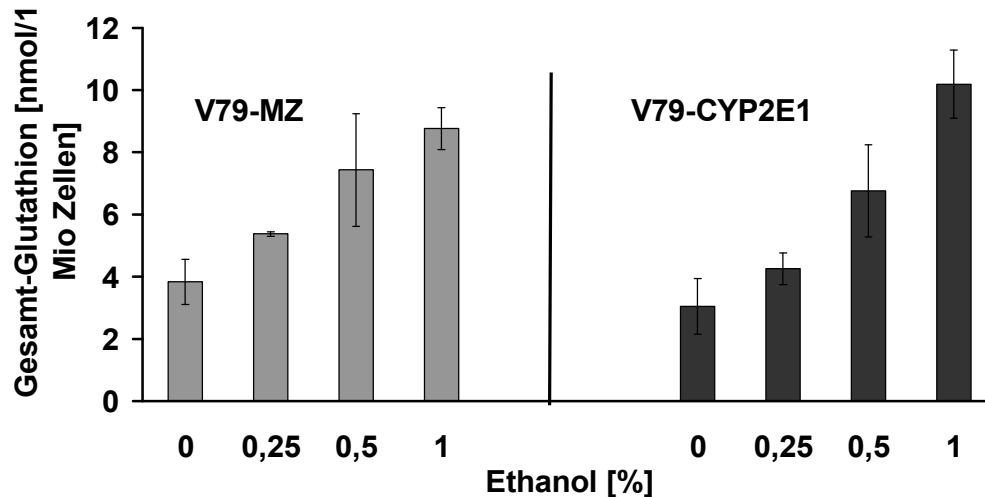


Abbildung 35: *Glutathiongehalt von V79- und V79-CYP2E1-Zellen nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Ethanolkonzentrationen (EtOH). Das genaue Protokoll ist in Kapitel 4.2.5 beschrieben (n=3).*

Überraschenderweise reagieren beide Zelllinien auf die Ethanolbehandlung konzentrationsabhängig mit einer Zunahme des Glutathiongehaltes. Daher ist diese Reaktion nicht genotypspezifisch und unabhängig von der Cytochrom 2E1-Expression.

Insgesamt lässt sich durch Ethanol weder in Wildtypzellen noch in Zellen, die Cytochrom 2E1 exprimieren, ein messbarer oxidativer DNA-Schaden induzieren. Selbst bei Depletion von Glutathion, einem wichtigen zellulären Antioxidans, lässt sich keine Erhöhung der basalen Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Schäden messen. Da auch nach vorheriger GSH-Depletion in V79-CYP2E1-Zellen durch Ethanol keine oxidativen Schäden verursacht werden können, ist diese Unempfindlichkeit gegenüber Ethanol und dessen Metabolismus glutathionunabhängig. Mögliche Mechanismen der beobachteten, von der CYP2E1-Expression unabhängigen Induktion von GSH durch Ethanol werden in Kapitel 6.4 diskutiert.



### **5.3.3 Einfluss einer Überexpression der humanen Cytochromreduktase in V79-Zellen auf die basalen Gleichgewichts-spiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen und auf die Suszeptibilität gegenüber einer Schädigung mit Durochinon**

Jedes Cytochrom in der Zelle kann nur dauerhaft oxidativen Metabolismus betreiben, wenn es durch eine dazugehörige Reduktase für den nächsten Reaktionszyklus reduziert wird. Bisher ist nur eine Reduktase in Säugern bekannt, die für alle Isoenzyme des Cytochromsystems zuständig ist. Der Vielfalt der Cytochrome steht also eine einzige, aber universell einsetzbare Cytochromreduktase (Reduktase, Oxidoreduktase) gegenüber. Wie in Kapitel 2.2.3.2 erläutert, kann die entkoppelte Reduktase zur Entstehung von ROS im Fremdstoffmetabolismus beitragen, jedoch hängt der Grad der Entkopplung, also die Menge der produzierten ROS, stark vom Isoenzym ab. Da Cytochrom 2E1 für eine starke Entkopplung bekannt ist, wurde sein Einfluss auf intrazelluläre ROS-Generierung und den daraus resultierenden oxidativen DNA-Schaden im vorangegangenen Kapitel untersucht. Nun sollte der Einfluss der Reduktase auf die basalen Gleichgewichtspiegel oxidativer DNA-Modifikationen von V79-Zellen untersucht werden. Dazu wurde in V79-Zellen, die durch Transfektion das Enzym humane Cytochromreduktase überexprimieren (V79-hOR, siehe Kapitel 4.1.6) zunächst deren Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden im Vergleich zur Ausgangszelllinie V79 (Wildtyp) bestimmt. Im Folgenden sollte dann ermittelt werden, ob sich durch die Inkubation mit einem „Redoxcycler“, der auf die Elektronenzufuhr über eine Reduktase angewiesen ist, vermehrt oxidative DNA-Schäden generieren lassen. Außerdem sollte untersucht werden, ob die Expression der Reduktase zu einer genetischen Instabilität der Zelle führt.

#### *5.3.3.1 Einfluss einer Überexpression der humanen Cytochromreduktase in V79-Zellen auf die basalen Gleichgewichtsspiegel Fpg-sensitiver DNA Modifikationen*

In Erwartung erhöhter basaler Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Modifikationen in unbehandelten V79-hOR-Zellen sollten diese im Vergleich zu den unbehandelten Wildtypzellen (V79) gemessen werden.

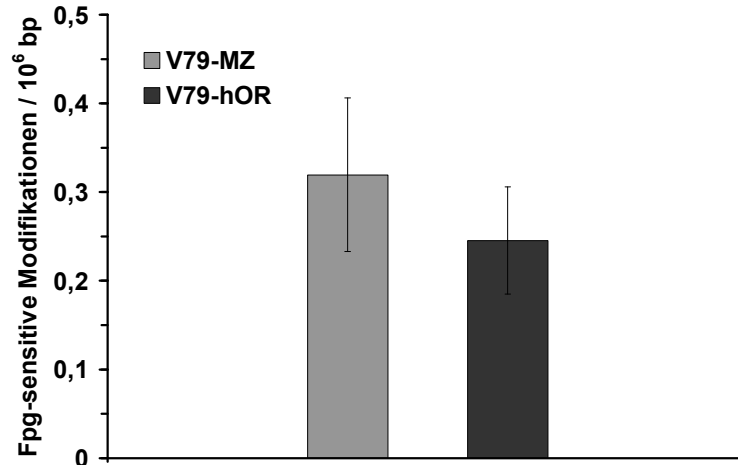


Abbildung 36: Basale Gleichgewichtsspiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen in ungeschädigten V79- und V79-hOR-Zellen. Bei der Berechnung der Fpg-sensitiven Modifikationen wurden die zunächst miterfassten Einzelstrangbrüche subtrahiert (siehe Kapitel 4.2.9) (n=3).

Entgegen der Erwartung zeigt sich bei den Überexprimierern kein erhöhter DNA-Schaden. Die Genotypen unterscheiden sich nicht in ihren basalen Gleichgewichtsspiegeln oxidativer DNA-Modifikationen. Eine Erklärung für die fehlende Wirkung der Reduktaseüberexpression könnte eine gesteigerte Antioxidative-Abwehr sein. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel beschrieben, sollte daher der Gesamtglutathiongehalt in beiden Zelllinien gemessen werden. Die Durchführung des Versuchs ist in Kapitel 4.2.5 beschrieben.

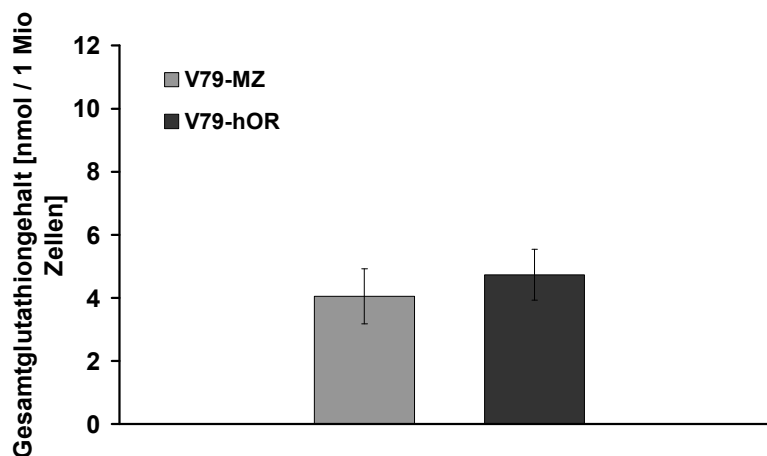


Abbildung 37: Vergleich des Gesamt-Glutathion-Gehaltes von ungeschädigten V79- und V79-hOR-Zellen. Die genaue Durchführung des photometrischen Versuchs lässt sich in Kapitel 4.2.5 nachlesen (n=3-4).

Leider zeigte sich hier wie bei den V79-CYP2E1-Zellen (siehe Abbildung 33) kein Unterschied im Glutathiongehalt zum Wildtyp. Aufgrund des ausbleibenden Effektes war es nun interessant zu untersuchen, ob sich mittels einer Glutathion-Depletion gegenüber den basalen Spiegeln messbar erhöhte oxidative DNA-Schäden zeigen.

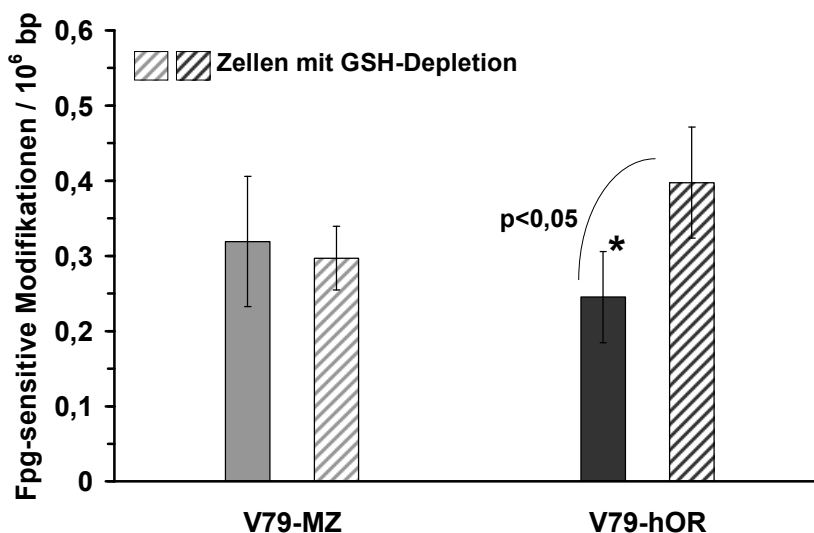


Abbildung 38: Vergleich der basalen Gleichgewichtsspiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen nach 24stündiger Glutathion-Depletion von V79- und V79-hOR-Zellen. Die Werte ohne GSH-Depletion sind aus Abbildung 36 übernommen. Der Unterschied zwischen depletierten und nicht-depletierten V79-hOR-Zellen ist signifikant nach dem Student'schen T-Test. Bei der Berechnung der Fpg-sensitiven Modifikationen wurden die zunächst miterfassten Einzelstrangbrüche subtrahiert (siehe Kapitel 4.2.9) (n=3-5).

Im Unterschied zu den CYP2E1-Zellen (siehe Abbildung 34) erhalten wurden, zeigten die V79-hOR-Zellen nach Glutathion-Depletion einen gegenüber den basalen Gleichgewichtsspiegeln erhöhten DNA-Schaden.

Mit diesem Ergebnis konnte also gezeigt werden, dass die durch die Reduktase-Überexpression gebildeten ROS in der Lage sind, nach Depletion von Glutathion einen signifikanten oxidativen DNA-Schaden zu verursachen. Damit zeigt sich auch die wichtige Rolle von Glutathion als Antioxidans zum Schutz der Integrität der DNA. Erst wenn das Glutathion depletiert ist, sind die gebildeten ROS in der Lage, die DNA zu schädigen. In Zellen mit physiologischem Glutathiongehalt tritt dieser Effekt nicht auf, da die ROS über verschiedenen Abwehrmechanismen und hauptsächlich mit Hilfe von GSH unschädlich gemacht werden.

### 5.3.3.2 Einfluss einer Durochinon-Inkubation auf die basalen Gleichgewichtsspiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen in V79-Zellen

Zusätzlich zu obigen Experimenten zum alleinigen Effekt der Reduktase-Überexpression in V79-Zellen, sollte die Wirkung eines Substratumsatzes der

Reduktase untersucht werden. Dies ist interessant, da insbesondere durch Redoxcycler und deren Metabolismus über die Cytochromreduktase ROS endogen produziert werden. Der Mensch ist in seinem täglichen Leben einer Vielzahl verschiedener Redoxcycler ausgesetzt: Pflanzenschutzmittel und einige Pharmaka sind häufig aus solchen Verbindungen aufgebaut. Häufig kann die Toxizität der Stoffe auf die Entstehung von ROS in den Zellen des betroffenen Organismus zurückgeführt werden. So wird z. B. die Kardiotoxizität der Anthracycline, einer Gruppe von Zytostatika, die die DNA-Synthese hemmen, der Bildung von ROS zugeschrieben (siehe Kapitel 2.4.1). Aber auch endogene Chinone wie Östrogen oder Noradrenalin sind zum Redoxcycling in der Lage.

Aus diesem Grund wurden in den nachfolgenden Experimenten V79- und V79-hOR-Zellen mit einem Redoxcycler inkubiert und dann die Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen mittels Alkalischer Elution bestimmt. Für diese Experimente wurde der Redoxcycler Durochinon (Tertramethyl-*p*-benzochinon) gewählt (siehe Kapitel 2.4.1). Dieser dient der Cytochromreduktase als Substrat für eine Ein-Elektronen-Reduktion und produziert so über eine Kreisreaktion (über eine Autoxidation des entstandenen Semichinons) zum Hydrochinon (siehe Abbildung 14) Superoxid.

Die Zellen wurden jeweils 30 min unter Kulturbedingungen mit Durochinon inkubiert. In den Versuchen mit GSH-Depletion wurde diese für 24 h vor der Durochinon-Inkubation durchgeführt. Die genaue Versuchsdurchführung ist in Kapitel 4.2.4 beschrieben. Zur Untersuchung des genotypspezifischen Effektes wurden zunächst die Wildtypzellen untersucht.

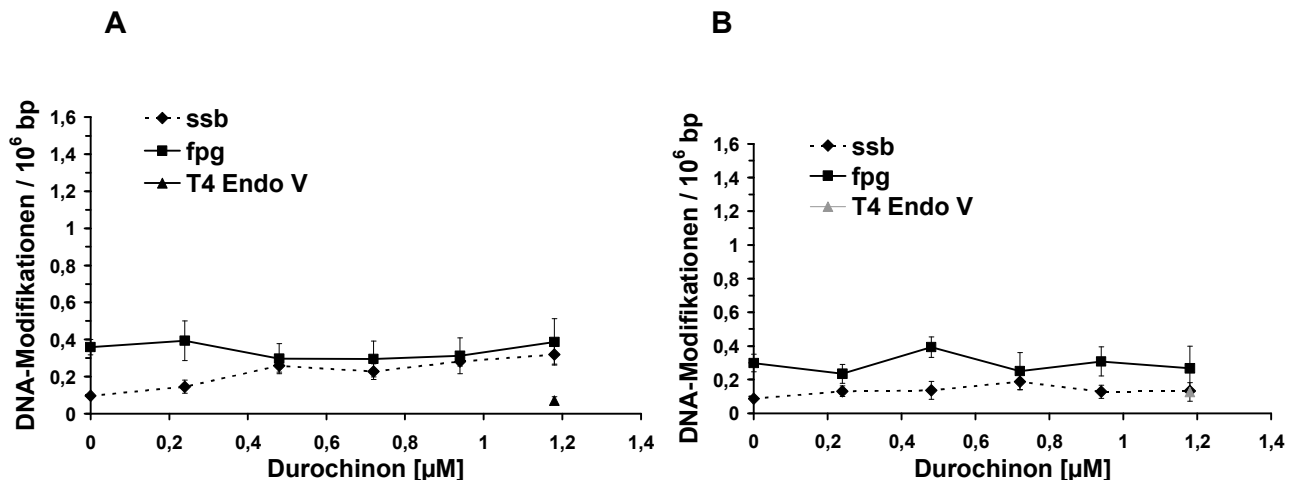


Abbildung 39 A und B: DNA-Modifikationen von V79-Zellen nach einer 30minütigen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des Redoxcyclers Durochinon ohne (A) und mit (B) vorheriger Glutathion-Depletion. Die zunächst miterfassten Einzelstrangbrüche wurden bei der Berechnung der Fpg-sensitiven und T4 Endo V-sensitiven Modifikationen subtrahiert (siehe Kapitel 4.2.9) (n=3-4).

Abbildung 39 A und B zeigt die nach 30minütiger Durochinoninkubation in Wildtyp V79-Zellen gemessenen Einzelstrangbrüche (ssb), Fpg-sensitiven und T4Endo V-

sensitive DNA-Modifikationen (AP-Läsionen) (siehe Kapitel 4.2.9). In Abbildung 39 A wurden die Zellen zunächst für 24 h Glutathion-depletiert. Die Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen und die AP-Läsionen steigen weder mit noch ohne vorherige GSH-Depletion gegenüber den basalen Hintergrundspiegeln (0  $\mu$ M Durochinon) an. Die Einzelstrangbrüche steigen in dem Experiment ohne vorherige Glutathion-Depletion (Abbildung 39 A) nur leicht an, bei Abbildung 39 B ist gar kein Anstieg zu erkennen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Gleichgewichtsspiegel verschiedener oxidativer DNA Modifikationen in V79-Wildtypzellen nicht durch eine Inkubation mit dem Redoxcycluser Durochinon beeinflussen lassen. Identische Experimenten wurden mit den V79-hOR-Zellen durchgeführt.

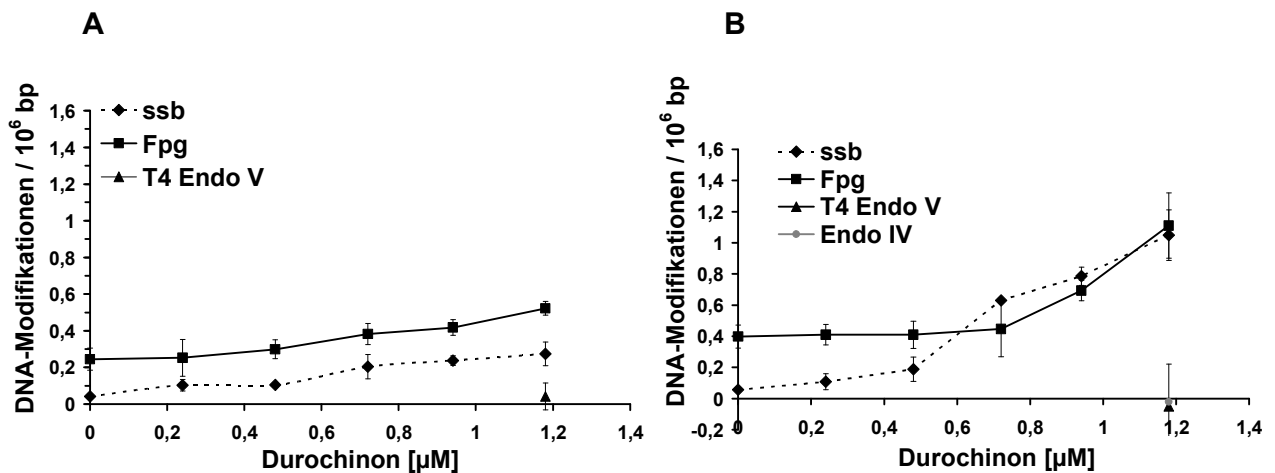


Abbildung 40 A und B: DNA-Modifikationen von V79-hOR-Zellen nach einer 30minütigen Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des Redoxcyclers Durochinon ohne (A) und mit (B) vorheriger Glutathion-Depletion. Die zunächst miterfassten Einzelstrangbrüche wurden bei der Berechnung der Fpg-sensitiven, T4 Endo V-sensitiven und den Endo IV-sensitiven Modifikationen subtrahiert (siehe Kapitel 4.2.9) (n=3-4).

Gegenüber den Wildtyp-Ergebnissen zeigen die V79-hOR-Zellen ohne vorherige Glutathion-Depletion (Abbildung 40 A) eine deutliche konzentrationsabhängige Zunahme an Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen. Durch zusätzliche Glutathion-Depletion (Abbildung 40 B) steigen sowohl die Fpg-sensitiven Läsionen als auch die Einzelstrangbrüche um ein Vielfaches im Vergleich zum nicht GSH depletierten Experiment (Abbildung 40 A) an. AP-Läsionen entstehen weder mit noch ohne zusätzliche GSH-Depletion. In der rechten Abbildung ist auffällig, dass beide Läsionen (ssb und Fpg) im Verhältnis 1:1 auftreten.

Im Unterschied zu Ergebnissen, die mit CYP2E1-Zellen erhalten wurden (siehe Kapitel 5.3.2), zeigt sich hier ein genotypspezifischer Unterschied. Durch die Expression der Reduktase werden mit Hilfe von Durochinon ROS generiert, die die DNA oxidativ schädigen. Das Ausmaß des Schadens ist glutathionabhängig, da sich

nach GSH-Depletion um ein Vielfaches höhere DNA-Schäden messen lassen als ohne GSH-Depletion. Der Vergleich mit den Wildtyp-Experimenten zeigt, dass Durochinon nur dann DNA-schädigend wirkt, wenn Cytochromreduktase vorhanden ist. Durochinon alleine verursacht keinen DNA-Schaden (siehe Abbildung 39).

Da ein genotypspezifischer Unterschied in der Suszeptibilität gegenüber oxidativen DNA-Schäden durch Durochinon gefunden wurde, war es naheliegend zu untersuchen, ob die Proliferation der Zellen durch Durochinon (genotypspezifisch) beeinflusst wird. Zu diesem Zweck sollte das Proliferationsverhalten der Zellen nach einer 30minütigen Durochinoninkubation und anschließender 48stündiger *Recovery*-Zeit überprüft werden.

### 5.3.4 Untersuchung der Proliferationshemmung durch Durochinon bei Glutathion-depletierten V79- und V79-hOR-Zellen

Für diese Versuche wurden GSH-depletierte V79- und V79hOR-Zellen für 30 min mit verschiedenen Durochinon-Konzentrationen inkubiert, danach einmal gewaschen und unter Kulturbedingungen in Routinemedium für 48 h weiterkultiviert (*Recovery*-Zeit). Der in der Graphik angegebene Proliferationsfaktor gibt die Anzahl der Vervielfachungen der ursprünglichen Zellpopulation während der zwei Tage nach der Durochinoninkubation wieder. Die genaue Versuchsdurchführung ist in Kapitel 4.2.6 beschrieben.

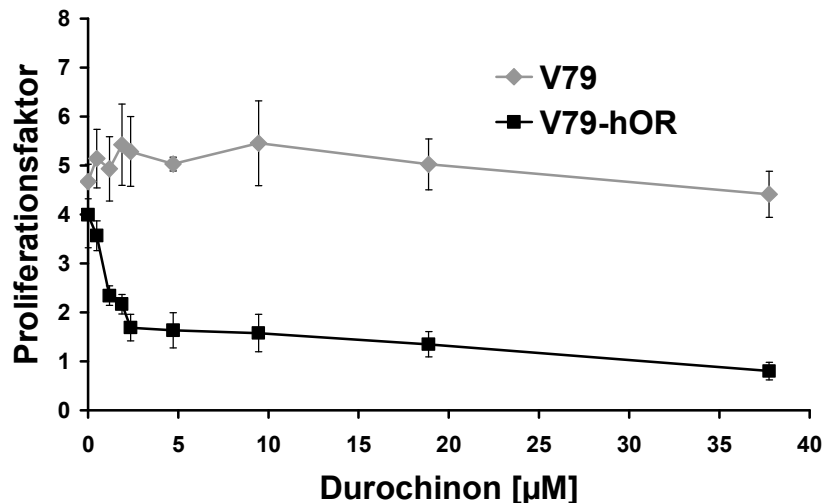


Abbildung 41:

*Proliferationshemmung von GSH-depletierten (siehe Kapitel 4.2.4) V79- und V79-hOR-Zellen nach 30minütiger Inkubation mit Durochinon und anschließender Recovery-Zeit von 48 h. Berechnung des Proliferationsfaktors: Anzahl der adhärennten Zellen nach Inkubation dividiert durch die Anzahl der adhärennten Zellen vor Beginn der Inkubation. Die Zellzahl vor Beginn der Inkubation wird mittels einer identisch mitgeführten Referenzflasche ermittelt, deren Zellpopulation zum Zeitpunkt des Inkubationsbeginns abgelöst, gezählt und anschließend verworfen wird (n=3).*

Wie zu erwarten war, lässt sich bei V79-Zellen keine Toxizität erkennen, auch nicht bei hohen Konzentrationen des Redoxcyclers. Dies spiegelt das Ergebnis der DNA-Schadensuntersuchung wider. Ohne Reduktaseexpression verursacht Durochinon auch in hohen Konzentrationen keine DNA-Schäden. Bei V79-hOR-Zellen hingegen zeigt sich eine deutliche Wachstumshemmung schon bei relativ kleinen Konzentrationen. Bei hohen Dosen findet nach der Durochinoninkubation gar keine Verdopplung mehr statt, hier nähert sich die Kurve dem Proliferationsfaktor 1 an.

Somit zeigt sich auch bei der Zytotoxizität von Durochinon ein genotypspezifischer Effekt, der mit dem DNA-Schadens-Ergebnis korreliert. Ausschließlich in V79-hOR-Zellen wirkt Durochinon zytotoxisch, was zu einem erhöhten oxidativen DNA-Schaden und zu einer Proliferationshemmung führte.

### 5.3.5 Suszeptibilität von V79- und V79-hOR-Zellen gegenüber der Induktion von Mikrokernen nach Glutathion-Depletion

Neben der Bestimmung oxidativer DNA-Modifikationen durch Fpg-Protein in der Alkalischen Elution, war es interessant, das Maß aneugener bzw. klastogener Schädigung in der DNA von V79- und V79-hOR-Zellen mit und ohne GSH-Depletion zu quantifizieren. Dazu wurde die Anzahl der Mikrokern bestimmt. Wie bereits in Kapitel 4.2.7 beschrieben, handelt es sich bei Mikrokernen um abgespaltene Chromosomen bzw. Chromosomenbruchstücke, die durch klastogene bzw. aneugene Behandlung hervorgerufen und bei der Kernteilung sichtbar werden (Romagna, 1993). Hier sollte der Mikrokerntest dazu genutzt werden, gentoxische Konsequenzen der Expression von Cytochromeduktase in V79-Zellen aufzuzeigen.

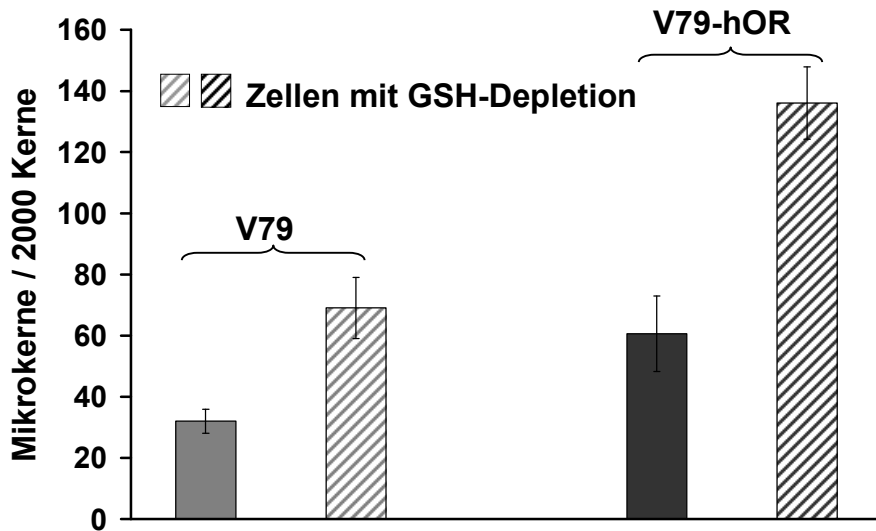


Abbildung 42:

Anzahl der Mikrokern pro 2000 Kerne in V79- und V79-hOR-Zellen mit bzw. ohne GSH-Depletion (n=3). Die Versuchsdurchführung ist in Kapitel 4.2.7 beschrieben.

Abbildung 42 zeigt bei V79-hOR-Zellen mit GSH-Depletion eine erhöhte Anzahl Mikrokerne, was eine größere genomische Instabilität bedeutet, als in den V79-hOR Zellen mit physiologischem Glutathiongehalt.

Erstaunlicherweise führt die GSH-Depletion auch in Wildtyp-Zellen zu einer erhöhten Anzahl Mikrokerne. Ebenfalls neu ist, dass hier schon ein deutlicher Unterschied zwischen den Genotypen ohne GSH-Depletion zu erkennen ist: V79-hOR-Zellen weisen höhere Mikrokernraten auf als der Wildtyp.

Insgesamt konnte also gezeigt werden, dass die Expression der Reduktase für die Toxizität des Redocyclers Durochinon notwendig ist. Desweiteren führt die Expression der Reduktase zu erhöhter genetischer Instabilität, was darauf schließen lässt, dass sie auch ohne exogene Substratzugabe an der Generierung von ROS beteiligt ist, welche die DNA schädigen können. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Enzyme des Fremdstoffmetabolismus maßgeblich an der Entstehung endogener ROS beteiligt sind und auch ohne Zusatz von Substrat die DNA schädigen können.



## 6 DISKUSSION

### 6.1 Uracil akkumuliert im Genom von *ung-knockout*-Zellen und Geweben

Zur Untersuchung der Bedeutung basaler Gleichgewichtsspiegel verschiedener DNA-Schäden, kann deren Höhe durch Hemmung oder Stimulation der Reparatur beeinflusst werden. Zur Reparatur von Uracil in der DNA ist Ung2 die wichtigste dieser Glykosylasen, die schon 1974 entdeckt wurde (Lindahl, 1974), aber erst einige Jahre später gelang es mehreren Arbeitsgruppen, das Gen zu klonieren und nach der Proteingewinnung funktionell zu untersuchen (Olsen et al., 1989; Slupphaug et al., 1995). Mit der Generierung von *ung-knockout*-Mäusen (Nilsen et al., 2000) wurde ein neues und effektives Werkzeug zur Untersuchung der basalen Gleichgewichtsspiegel von Uracil in der DNA geschaffen.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurden aus diesen *ung<sup>-/-</sup>*-Mäusen gewonnene immortalisierte Maus Embryo Fibroblasten (MEFs, Mausfibroblasten) ebenso wie verschiedenen Organe der Tiere untersucht. Zunächst wurde mit Hilfe der Alkalischen Elution (siehe Kapitel 4.2.9) erstmals quantitativ der basale Gleichgewichtsspiegel von Uracil in der DNA gemessen. Bisher waren *ung<sup>-/-</sup>*-Zellen nur semi-quantitativ im Comet Assay untersucht worden. Diese Versuche zeigten eine Akkumulation von Uracil in der DNA der *knockout*-Mausfibroblasten im Vergleich zum Wildtyp (Nilsen et al., 2000). Zur Quantifizierung und damit zum präzisen Vergleich mit anderen DNA-Schäden endogenen Ursprungs sollten nun die basalen Gleichgewichtsspiegel der Ung2-sensitiven DNA-Modifikationen sowie zusätzlich der AP-Läsionen ermittelt werden. So ergab sich für die basalen Gleichgewichtsspiegel ein Wert von  $0,59 \pm 0,1$  Ung2-sensitive DNA-Modifikationen pro  $10^6$  bp (siehe Abbildung 24) in *ung<sup>-/-</sup>*-Mausfibroblasten. Im Gegensatz dazu lagen in *ung<sup>+/+</sup>*-Mausfibroblasten die Ung2-sensitiven DNA-Modifikationen unterhalb der Nachweisgrenze ( $<0,05/10^6$  bp). Diese Ergebnisse passen zu Erkenntnissen, die mittels HPLC gewonnen wurden. So konnten Goulian und Kollegen in humanen Wildtyp-Lymphzellen kein Uracil in der DNA nachweisen (Goulian et al., 1980). Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werte der Einzelstrangbrüche (ssb) und AP-Läsionen beider Genotypen befanden sich ebenfalls unterhalb der Nachweisgrenze. Mit diesen Ergebnissen ist zum ersten Mal ein Vergleich der Höhe basaler Gleichgewichtsspiegel verschiedener DNA-Schäden möglich. So wurden in unserer Arbeitsgruppe von Marcel Osterod bereits die Fpg-sensitiven Läsionen, welche vor allem 8-oxo-Guanin repräsentieren, in den gleichen Wildtyp-Mausfibroblasten bestimmt. Diese liegen bei  $0,2 \pm 0,8$  Läsionen pro  $10^6$  bp (Osterod et al., 2001) und

sind damit um ein Vielfaches höher als die basalen Gleichgewichtsspiegel Ung2-sensitiver DNA-Modifikationen. Daher wird deutlich, dass die DNA-Reparatur in der Lage ist, das Genom weitaus freier von Uracil als von 8-oxoG zu erhalten. Dies kann zwei Ursachen haben: Unter der Annahme einer vergleichbaren Reparaturkapazität von Uracil und 8-oxoG kann der Eintrag des jeweiligen Schadens unterschiedlich sein, d.h. es müsste mehr 8-oxoG gebildet werden als Uracil durch Fehleinbau oder Desaminierung in die DNA gelangen. Die andere Erklärung wäre -unter der Annahme einer ähnlichen Bildungsgeschwindigkeit beider Läsionen- eine unterschiedlich effektive Reparatur. Die Theorie der unterschiedlich effektiven Reparatur lässt sich durch den Vergleich beider *knockout*-Modelle beleuchten: In den Untersuchungen von Marcel Osterod standen *ogg1*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten zur Verfügung, die durch den *knockout* des *ogg1*-Gens nicht mehr in der Lage sind, 8-oxoG zu reparieren. Diese *ogg1*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten zeigten gegenüber den Wildtyp-Fibroblasten nur einen sehr geringen Anstieg (Klungland et al., 1999) der Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen. Dagegen führt der Ausfall des wichtigsten Uracil-reparierenden Enzyms zu einer Erhöhung der Gleichgewichtsspiegel an Uracil in der DNA um ein Vielfaches gegenüber dem Wildtyp (siehe Abbildung 24). Dieser Unterschied verdeutlicht die unterschiedliche Effizienz der in beiden *knockout*-Mäusen vorhandenen *backup*-Reparatur. Die *backup*-Reparatur in den *ung*<sup>-/-</sup>-Mäusen scheint daher weniger gut den Ausfall des *ung*-Gens zu kompensieren als die *backup*-Reparatur in den *ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen den Ausfall des *ogg1*-Gens.

Neben den Mausfibroblasten wurden auch frisch isolierte Zellen verschiedener Organe aus *ung*<sup>-/-</sup>-Mäusen und den korrespondierenden Wildtypmäusen untersucht. Hier zeigt sich ein anderes Bild als bei den MEFs. Die Organe Leber und Milz zeigen einen -im Vergleich zum Wildtyp- erhöhten basalen Gleichgewichtsspiegel an Uracil in der DNA (

Abbildung 25). Diese Ergebnisse werden mit Daten aus dem Comet Assay, bei dem ebenfalls verschiedene Organe der *knockout*-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren untersucht wurden, bestätigt (Andersen et al., 2004). Auffällig ist der sehr viel geringere basale Gleichgewichtsspiegel Ung2-sensitiver DNA-Modifikationen in der DNA von Leber- und Milzzellen der *ung*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zum basalen Gleichgewichtsspiegel in den *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten. Die nur leichte Erhöhung der basalen Gleichgewichtsspiegel Ung2-sensitiver DNA-Modifikationen in *ung*<sup>-/-</sup>- im Vergleich zu *ung*<sup>+/+</sup>-Milzzellen werden gestützt durch Daten zur spontanen Mutationsfrequenz eines laql-Transgens in Milzzellen. Nilsen und Kollegen konnten zeigen, dass die Mutationsfrequenz in Milz (und Thymus) nur marginal (1,4fach) gegenüber dem Wildtyp erhöht ist (Nilsen et al., 2000).

## 6.2 Die Hauptquelle für Uracil in der DNA ist der Fehleinbau von dUMP während der Replikation und nicht die Cytosindesaminierung

Erste Hinweise auf die Hypothese, dass der Fehleinbau von dUMP während der Replikation und nicht die Cytosindesaminierung die Hauptquelle für Uracil in der DNA stellt, gaben die Untersuchungen an frisch isolierten Spermien sowie Milz- und Leberzellen von *ung-knockout*- und Wildtypmäusen im Vergleich zu den MEFs. Da die *knockout*-MEFs sehr viel höhere basale Gleichgewichtspiegel an Uracil in der DNA als die Zellen verschiedener Organe der *knockout*-Mäuse aufweisen, lag die Vermutung nahe, dass die Proliferation einen entscheidenden Einfluss auf die Höhe der basalen Uracil-Spiegel in der DNA zu haben scheint, da die Replikation eine bedeutende Quelle für Uracil in der DNA ist. Die Organe Leber und Milz sind im Vergleich zu den MEFs mit Verdopplungszeiten von 22-26 h nur -wenn überhaupt- langsam proliferierende Gewebe. Die reifen Spermien, die bei den Untersuchungen dieser Arbeit verwendet wurden, proliferieren sogar gar nicht mehr. Vergleicht man also reife Spermien mit Leber und Milz, so lässt sich vermuten, warum bei den Fortpflanzungszellen sogar gar kein Anstieg der Ung2-sensitiven Läsionen durch den *knockout* zu erkennen ist. Reife Spermien teilen sich nicht mehr und bauen so über diesen Weg kein Uracil mehr in die DNA ein. Die in den Zellen noch vorhandene Smug1-Reparaturglykosylase, die eine geringere Kapazität als Ung2 hat, übernimmt hier (wie natürlich auch bei Leber und Milz) die Reparatur von Uracil, welches über Cytosindesaminierung weiterhin in der DNA der reifen Spermien entsteht.

Ob nun die Replikation und damit der Fehleinbau von dUMP die Hauptquelle für Uracil in der DNA ist, wurde untersucht, indem die Proliferation der Zellen beeinflusst wurde. Zu dieser Untersuchung des Einflusses der Proliferation auf basale Gleichgewichtspiegel verschiedener DNA-Schäden, kann die Proliferation entweder gehemmt oder gesteigert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden beide Vorgehensweisen jeweils mit unterschiedlichen Zelltypen angewendet: MEFs wurden durch Konfluenz an der Zellteilung gehindert und primäre Milzzellen durch Behandlung mit Mitogenen zur Zellteilung angeregt (siehe Kapitel 4.1.7.8).

Acht Tage nach Erreichen der Konfluenz wurden die Ung2-sensitiven DNA-Modifikationen der *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten und *ung*<sup>+/+</sup>-Mausfibroblasten gemessen. Die *ung*<sup>+/+</sup>-Mausfibroblasten zeigten wie erwartet keine veränderten Uracil-Spiegel, wohingegen die *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten um 50 % weniger Uracil in der DNA aufweisen (Abbildung 26). Diese eindeutige Korrelation zwischen Proliferation und Uracilgehalt der DNA wurde anhand primärer Milzzellen, die durch Mitogene zur Zellteilung angeregt wurden, bestätigt: Diese akkumulieren mehr als doppelt so viele Ung2-sensitive DNA-Modifikationen als Milzzellen ohne Teilungsstimuli (Abbildung

27). Die verringerten Uracil-Spiegel der DNA konfluenter *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten lassen sich auf die *backup* Reparatur zurückführen, die in den Zellen noch vorhanden ist. Die Literatur erlaubt die Vermutung, dass es sich dabei um Smug1 handelt (Nilsen et al., 2001). Smug 1 wird im Unterschied zu Ung2, welches in den Replikationsgabeln der DNA teilungsaktiver Zellen akkumuliert, konstitutiv, also unabhängig von Zellzyklus exprimiert (Kavli et al., 2002). Aus diesem Grund wird angenommen, dass die *backup*-Reparaturkapazität in sich teilenden und konfluenten *knockout*-Zellen vergleichbar ist.

Eine alternative Erklärung für die verringerten Uracil-Spiegel in konfluenten *knockout*-MEFs, könnte die unterschiedlich schnelle Bildung von Uracil durch hydrolytische oder enzymatische Cytosindesaminierung in proliferierenden Zellen im Vergleich zu konfluenten sein. In den konfluenten Zellen liegt ein größerer Teil des Genoms einzelsträngig liegt, und die Desaminierung läuft in diesen Bereichen leichter ab als in doppelsträngiger DNA. Dagegen spricht jedoch, die aus der Hydrolysegeschwindigkeit der DNA-Basen berechnete Bildung von nur 100-500 Uracilresten pro Tag und Zelle (Frederico et al., 1990; Lindahl, 1993). Somit zeigen die Daten, dass der Fehleinbau von dUMP während der Replikation eine wichtigere Rolle für die basalen Gleichgewichtsspiegel Ung2-sensitiver DNA-Modifikationen spielt als die Cytosindesaminierung. Diese Ergebnisse werden gestützt durch Erkenntnisse aus Versuchen mit Teilleberentfernungen (Hepatektomie) in Mäusen. So steigt innerhalb von 24 h die Aktivität an UDGs (gemessen als freies Uracil mittels HPLC) in den Lebern der operierten Mäuse im Vergleich zu scheinoperierten Tieren um das 2-4fache an, was auf den Proliferationsreiz, der auf das verbliebene Gewebe wirkt, zurückgeführt wird (Gombar et al., 1981). Auch neue Ergebnisse an Hefen verdeutlichen den Zusammenhang zwischen Proliferation und Uracileinbau: Guillet und Kollegen zeigten, dass eine Inaktivierung des *ung*-Gens AP-Endonuklease-defiziente Mutanten überleben lässt. Die Überexpression von humanem Tdg hingegen (erkennt U nur gegenüber A, also durch Fehleinbau entstandenes Uracil) kann die Letalität des vollständigen AP-Endonuklease-Ausfalls in den Hefezellen nicht verhindern (Guillet and Boiteux, 2003).

Nach der Betrachtung der basalen Gleichgewichtsspiegel von Uracil und der Aufklärung der Hauptquelle für diese fehlerhafte Base in der DNA, war es interessant zu untersuchen, ob diese Hintergrundspiegel durch exogene Einflüsse veränderbar sind. Eine Möglichkeit mit klinischem Aspekt bot die Untersuchung der Auswirkung von Uracilanalogen auf *ung*<sup>-/-</sup>- und *ung*<sup>+/+</sup>-Mausfibroblasten, welche als Hemmstoffe der Thymidylatsynthase (TS) in der Chemotherapie eingesetzt werden.

### 6.3 Für die Zytotoxizität von Fluorpyrimidinen sind weder Uracileinbau noch dessen Reparatur notwendig

In den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts führte der Befund, dass Rattenhepatomzellen exogen zugeführtes Uracil schneller verstoffwechselten als gesunde Zellen, zu der Vermutung, dass der Uracil-Metabolismus ein mögliches Target in der Krebstherapie darstellt (Rutmann et al., 1954). Fluranaloga des Uracils (5-FU und 5-FdUrd, siehe Kapitel 2.4.2) erlauben eine selektive Abtötung teilungsaktiver Zellen im Organismus. Sie wirken über die Hemmung der Thymidylatsynthase (TS), die mit Tetrahydrofolat als Methyl donor aus Uridin Thymidin bildet. Aus dieser TS-Hemmung resultiert ein Überangebot an dUMP und ein Mangel an dTMP. Daher wird angenommen, dass es zu einem verstärkten Einbau von Uracil in die DNA kommt, was zu einer Exzision der fehlerhaften Base führt. Die AP-Läsion kann dann aber nicht erfolgreich repariert werden, da aufgrund des dTMP-Mangels nur erneut dUMP eingebaut werden kann. Dieser angenommene Teufelskreis von Fehleinbau und Reparatur führt nach dieser Hypothese schließlich zum Tod der Zellen, wobei den Strangbrüchen als Reparaturintermediate eine wichtige Rolle zukommen könnte (Dianov et al., 1991; Longley et al., 2003). Obwohl mittlerweile der Fehleinbau von Uracil als Basis der Zytotoxizität von TS-Hemmstoffen oft zitiert und beschrieben wird, ist der tatsächliche Beitrag dieses Weges zum Zelltod noch nicht vollständig belegt (Tinkelenberg et al., 2002). Experimente mit *ung*<sup>-/-</sup>- und *ung*<sup>+/-</sup>-Mausfibroblasten erlaubten daher die Untersuchung eines vermuteten kausalen Zusammenhangs zwischen Uracil-Einbau, daraus resultierender Exzision und der Zytotoxizität von TS-Hemmstoffen.

Zunächst musste untersucht werden, ob beide Zelllinien während einer Inkubation mit TS-Hemmstoffen gleichermaßen Uracil einbauen, oder ob sich genotypspezifische Unterschiede zeigen. Dazu wurden *ung*<sup>-/-</sup>- und *ung*<sup>+/-</sup>-Mausfibroblasten über 72 h mit 5-FU und 5-FdUrd inkubiert und danach die Ung2-sensitive Modifikationen in der DNA gemessen. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigten, dass beide Substanzen in *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten um bis zu 30 % erhöhte Uracil-Spiegel bewirken. In Wildtyp-MEFs ändert sich der Gleichgewichtsspiegel Ung2-sensitiver DNA-Modifikationen hingegen nicht. Die im Anschluss durchgeführten Proliferationstests, welche als ein Maß für die Zytotoxizität der TS-Hemmer interpretiert werden, zeigten aber, dass die *ung*<sup>+/-</sup>-Mausfibroblasten bei Inkubation mit 5-FU gleichermaßen sensitiv mit einer verringerten Zellproliferation auf die Uracilanaloga reagieren wie die *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten, welche Uracil in die DNA einbauen (siehe Abbildung 29). Dieses Ergebnis wird durch einen MTT-Test (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-Tetrazolium-bromid), der die Überlebensrate der Zellen nach Inkubation mit TS-Hemmstoffen misst, bestätigt (Daten nicht gezeigt). Auch eine Färbung mit Propidiumiodid und Auszählung der toten Zellen mittels Durchflusszytometrie nach Inkubation mit den TS-Hemmstoffen, ergab eine vergleichbare Toxizität

der beiden Agenzien auf beide Zelllinien (Andersen et al., 2004). Dieser Befund lässt darauf schließen, dass für die Zytotoxizität der Fluorpyrimidine eine Akkumulation von Uracil in der DNA nicht notwendig ist. In Wildtypzellen, die TS-Hemmstoffen ausgesetzt sind, verhindert Ung2 eine Anreicherung von Uracil in der DNA, aber die Zytotoxizität dieser Substanzen verhindert es nicht. Dieses Ergebnis ist in Einklang mit Erkenntnissen aus Ung2-überexprimierenden humanen Lungenkrebszellen, bei denen sich trotz erhöhter Reparaturkapazität die Toxizität von TS-Hemmstoffen nicht erhöht (Welsh et al., 2003). Dieses Ergebnis wird weiterhin gestützt durch Daten von Säugerzellen, in denen die Expression von dUTPase für die Toxizität der TS-Hemmstoffe wichtiger ist als die Uracil-Reparatur (Parsels et al., 1997; Welsh et al., 2003). In Hefen hingegen ist die Uracil-Akkumulation im Nucleotid-Pool (durch Ausschalten der dUTPase) und ein funktionierendes Ung-Gen ein zentraler Modulator der Toxizität von TS-Inhibitoren, welche sich als S-Phasen- oder G2/M-Arrest auswirkt (Tinkelenberg et al., 2002).

Es stellt sich daher die Frage, welcher Mechanismus für die in der Klinik und in dieser Arbeit beobachtete effiziente Hemmung des Wachstums metabolisch aktiver Zellen des Organismus durch 5-FU verantwortlich gemacht werden kann. Eine Erklärung für die Zytotoxizität ohne Uracileinbau ist die Wirkung der TS-Hemmer auf die RNA-Synthese. Metabolite des 5-FU können in die RNA eingebaut werden, was zu einer Hemmung der Proteinsynthese und damit möglicherweise zum Zelltod führt. Desweiteren ist ein Einfluss auf die RNA-Polymerase denkbar: 5-FUra, also 5-FU, welches direkt als Nucleotid in die DNA eingebaut wurde, könnte bei der Transkription zu einer Blockade der RNA-Polymerase führen, was die Proteinbiosynthese der Zelle beeinflussen würde. Diese Möglichkeiten zur Zytotoxizität wurden bereits in Kapitel 2.4.2 ausführlich erläutert.

Die Unabhängigkeit der Toxizität der untersuchten TS-Hemmstoffe von Einbau und Reparatur kann auch über einen möglichen Zellzykluseinfluss erklärt werden. Hinweise darauf geben die Proliferationstests mit 5-FdUrd. Durch Inkubation mit 5-FdUrd arretierten beide Zelllinien schon bei kleinen Konzentrationen bei Proliferationsfaktor 2, was genau einer Verdopplung entspricht. Die *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten reagieren weitaus sensitiver, was wahrscheinlich auf die Bildung von AP-Läsionen zurückzuführen ist. Da der Wildtyp aber gleichermaßen mit einem Proliferationsstopp nach einer Verdopplung reagiert, muss dieser Effekt unabhängig vom Uracileinbau sein, da in den Wildtypzellen kein Uracil in der DNA während der 5-FdUrd-Inkubation akkumuliert (siehe Abbildung 28 B). Ein möglicher Zellzyklus-Arrest könnte hier eine Erklärung sein. Ein Einbau von 5-FUDP in die RNA könnte ein Zellzyklussignal bewirken. So wurden durch 5-FU-Behandlung Veränderungen des Zellzyklus (S-Phasenarrest, G2/M-Block, G1/S-Arrest) in verschiedenen humanen Zelllinien gefunden (Grem et al., 1999; Marchal et al., 2004; Tokunaga et al., 2000). Aus diesem Grund wäre es sehr interessant, mittels Durchflusszytometrie zu

untersuchen, ob mit 5-FdUrd behandelte *ung*<sup>+/+</sup>-Mausfibroblasten, ebenso wie *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten, einen spezifischen Zellzyklusarrest erfahren.

In der vorliegenden Arbeit wird außerdem gezeigt, dass *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten unter Einwirkung von 5-FdUrd, nicht jedoch von 5-FU, neben Uracil auch AP-Läsionen akkumulieren. Diese Ergebnisse werden gestützt durch Untersuchungen an anderen Säugerfibroblasten, in denen nach Inkubation mit 5-FdUrd ebenfalls erhöhte Spiegel an Brüchen und Lücken in Metaphase-Chromosomen nachgewiesen wurden (Kubo et al., 1998; Kubo et al., 1988). Diese DNA-Brüche könnten aus AP-Läsionen hervorgegangen sein, da AP-Läsionen alkalilabile Stellen der DNA sind. Desweiteren ist bekannt, dass AP-Läsionen die Replikation in Hefen blockieren. Dies könnte den größeren zytostatischen Effekt des 5-FdUrd in *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten ( $IC_{50}$  = 10 nM) gegenüber *ung*<sup>+/+</sup>-Mausfibroblasten ( $IC_{50}$  = 200 nM) erklären. Die Wildtypzellen scheinen einer Akkumulation von AP-Läsionen über die Basenexzisions Reparatur (BER) entgegenwirken zu können. Die BER umfasst mehrere Schritte, die durch Protein-Protein-Interaktionen miteinander verknüpft sind (siehe Kapitel 2.3). In Abwesenheit von Ung2 könnte daher dieser koordinierte Ablauf der einzelnen Schritte gestört sein, was schließlich zu einer Akkumulation von Reparaturintermediaten, hier AP-Läsionen, führt. Grund dafür könnte die *back-up* Uracilreparatur in den *ung*<sup>-/-</sup>-Mausfibroblasten sein, die nach dem Erkennen und Einschneiden des Uracils, nicht in der Lage ist, AP-Endonuklease 1 in ausreichendem Maße zu rekrutieren. Da zumindest für Ung2 eine Interaktion mit den BER-Proteinen XRCC1, APE1, Pol $\beta$  und Pol $\delta$  (Akbari et al., 2004) sowie PCNA und RPA (siehe Kapitel 2.3) bekannt ist (Nagelhus et al., 1997; Otterlei et al., 1999), stellt sich die Frage, ob eine entsprechende Interaktion von Smug1 mit diesen Proteinen bei der Reparatur von 5-FUra in der DNA zu langsam oder zu schwach ist, so dass AP-Läsionen als Intermediate akkumulieren.

## **6.4 Die Überexpression von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus kann in Säugerzellen zu genetischer Instabilität führen**

Neben Uracil als endogenem DNA-Schaden wurden in der vorliegenden Arbeit auch zwei Enzyme des Fremdstoffmetabolismus und deren Auswirkungen auf die genetische Stabilität der DNA von Zellen untersucht. Das Ziel des Fremdstoffmetabolismus ist eigentlich ein Schutz des Organismus vor den toxischen Wirkungen verschiedener Xenobiotika. In der Phase I-Reaktion wird der Fremdstoff in der Regel mit Hilfe des Cytochrom-P450-Enzyms, welches aus dem jeweiligen Isoenzym P450, der Cytochromreduktase und in einigen Fällen außerdem aus Cytochrom *b*<sub>5</sub> besteht, monooxygeniert. Die dafür notwendige Reduktion molekularen Sauerstoffs erfolgt

dabei in zwei Eielektronenübergängen, die von der Substratoxygenierung entkoppelt sein können, so dass Superoxid entsteht. Eine Zelllinie, die das humane Isoenzym Cytochrom 2E1 (CYP2E1) aufgrund einer Transfektion überexprimiert (V79-CYP2E1) wurde ausgewählt, um einen möglichen DNA-Schaden auf Grund der für dieses Isoenzym bekannten entkoppelten Superoxidgenerierung zu untersuchen (Sapone et al., 2003). Aber auch der Substratumsatz von CYP2E1 war von Interesse, da dieses Enzym für die Metabolisierung von Ethanol zuständig ist und über die Generierung von ROS für die Entstehung ethanolbedingten Leberversagens verantwortlich gemacht wird (Cederbaum, 1991). Die Auswirkungen von humaner Cytochromreduktase (Reduktase) auf die basalen Gleichgewichtspiegel oxidativer Basenmodifikationen, sollten in einer Reduktase-überexprimierenden Zelllinie untersucht (V79-hOR, humane Oxidoreduktase) werden.

Entgegen der Erwartung ist der basale Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Modifikationen in V79-CYP2E1- und V79-hOR-Zellen gegenüber den V79-Wildtypzellen nicht erhöht. Erst nach Depletion von Glutathion (GSH), einem wichtigen intrazellulären Antioxidans, zeigt sich (nur) in V79-hOR ein gegenüber dem ebenfalls GSH-depletierten Wildtyp erhöhter basaler Level an oxidativen DNA-Modifikationen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass im Fall der Reduktase eine erhöhte genetische Instabilität der DNA schon ohne Substratumsatz zu erwarten ist, insbesondere wenn der antioxidative Schutz mangelhaft ist. Damit wird die Bedeutung von Glutathion als Schutz vor endogenen ROS unterstrichen. In der Literatur ist gut belegt, dass GSH an der antioxidativen Abwehr in unterschiedlichen Bereichen beteiligt ist. Es fängt freie Radikale ab, reduziert Peroxide und kann mit elektrophilen Komponenten konjugiert werden (Hayes and McLellan, 1999). So lässt sich ein mittels Mikrosomenpräparationen (enthält Cytochrome und Cytochromreduktase) verursachter Schaden an isolierter Plasmid-DNA durch GSH-Zusatz minimieren (Kukielka and Cederbaum, 1994). Außerdem fungiert GSH als Cofaktor für verschiedene antioxidativ wirksame Enzyme, wie bei der Glutathionperoxidase, die der Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser dient.

Die Ergebnisse der CYP2E1-Zellen werden gestützt durch Erkenntnisse an Pankreaszellen, die trotz CYP2E1-Überexpression keine vermehrten Einzelstrangbrüche aufweisen (Lees Murdock et al., 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls keine Veränderung der Menge an Einzelstrangbrüchen durch die Überexpression von CYP2E1 festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Obwohl Cytochrom 2E1 keinen zusätzlichen DNA-Schaden in V79-CYP2E1-Zellen verursacht, bleibt das Enzym weiterhin interessant für Untersuchungen zu einer möglichen genetischen Instabilität. Neuere Fall-Kontrollstudien zeigen nämlich einen eindeutigen Zusammenhang zwischen bestimmten Polymorphismen von CYP2E1 mit der Wahrscheinlichkeit für Kinder an akuter lymphoblastischer Leukämie zu erkranken (Krajinovic et al., 2002). Für eine Vielzahl adulter Krebserkrankungen



besteht ebenfalls ein Zusammenhang zwischen verschiedenen Polymorphismen des CYP2E1-Enzyms und der Erkrankung (Farker et al., 1998; Le Marchand et al., 1998; Persson et al., 1993). Die Ursache dieser mit CYP2E1 in Zusammenhang gebrachte Krebserkrankung muss aber nicht zwingend in einem DNA-Schaden liegen. Denkbar wäre ein Einfluss der ROS-Bildung durch das Cytochrom auf Proliferation und andere zelluläre Funktionen in Sinne einer Promotion. So vermitteln z.B. die aus Hepatomzellen durch CYP2E1 generierten ROS in kokultivierten Stellatzellen eine verstärkte Proliferation und Kollagenproduktion (Nieto et al., 2002a; Nieto et al., 2002b). Übermäßige Produktion von Bindegewebe kann den Beginn einer Leberfibrose und damit eines möglichen Lebertumors darstellen. Aus diesem Grund wäre es in weiterführenden Versuchen interessant zu untersuchen, in weit die V79-CYP2E1-Zellen ROS produzieren, welcher Art diese möglichen ROS sind und ob sich durch Langzeitinduktion des Enzyms das Proliferationsverhalten der Zellen beeinflussen lässt. So konnte eine Arbeitsgruppe im Tierversuch zeigen, dass die Langzeitinduktion von CYP2E1 durch ein Fungizid über ROS-Produktion zu einer promovierenden Wirkung führt (Sapone et al., 2003).

Zusätzlich zu den Ergebnissen des erhöhten basalen Gleichgewichtspiegels an oxidativen DNA-Schaden nach GSH-Depletion in V79-hOR-Zellen wurde die Mikrokernrate (MK-Rate) in unbehandelten und GSH-depletierten V79-hOR-Zellen im Vergleich zum Wildtyp gemessen. In diesen Versuchen wird, im Unterschied zur Alkalischen Elution ein genotypspezifischer Unterschied schon in unbehandelten Zellen deutlich (siehe Abbildung 42). V79-hOR Zellen zeigen gegenüber dem Wildtyp um Faktor 2 erhöhte basale MK-Raten. Durch GSH-Depletion lässt sich die MK-Rate der V79-hOR-Zellen und des Wildtyps verdoppeln. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Überexpression humaner Reduktase ein chromosomenschädigendes Potenzial besitzt. Somit kann erstmals gezeigt werden, dass Cytochromreduktase ohne Substratumsatz über die Bildung von ROS genetische Instabilität in Zellen verursachen kann.

Weiterhin war es wichtig zu untersuchen, ob Ethanol die basalen Gleichgewichtspiegel oxidativer DNA-Schäden in V79-CYP2E1-Zellen erhöht. Im Widerspruch zu den Ergebnissen einer anderen Gruppe, die die vermehrte Bildung von Einzelstrangbrüchen in Ethanol-exponierten Ratten auf die Bildung von ROS zurückführen (Navasumrit et al., 2000), werden in der vorliegenden Arbeit weder vermehrt Einzelstrangbrüche (Daten nicht gezeigt) noch oxidative DNA-Schäden aufgrund einer 24stündigen Ethanolexposition in V79-CYP2E1-Zellen gefunden (Abbildung 32).

Ein interessanter Befund ist, dass Wildtyp- und V79-CYP2E1-Zellen gleichermaßen adaptiv in ihrer oxidativen Abwehr auf eine Ethanolinkubation reagieren. In beiden Zelllinien steigt nach einer 24stündigen Ethanolinkubation konzentrationsabhängig der intrazelluläre Glutathiongehalt an. Da der Wildtyp die gleiche Reaktion wie der

Überexprimierer zeigt, ist diese Reaktion unabhängig von CYP2E1. Eine mögliche Erklärung für den offensichtlichen Versuch der Zelle, ein antioxidatives Schutzschild gegen den einwirkenden Ethanol aufzubauen, könnte die Entstehung toxischer Zwischenstufen beim Metabolismus von Ethanol über andere Enzyme sein. So entsteht beim Ethanolabbau über das Enzym Alkoholdehydrogenase Acetaldehyd, welcher ebenfalls zur intrazellulären Generierung von ROS beiträgt (Zhang et al., 2004), was in humanen Endothelzellen zu Apoptose führt (Li et al., 2004).

Von besonderem Interesse bleibt CYP2E1 auch aufgrund einer Induktion durch Betacarotin. Zwei Interventionsstudien (ATBS und CARET) konnten zeigen, dass die Supplementierung mit Betacarotin bei starken Rauchern und Arbeitern der Asbestindustrie verstärkt zu Lungenkrebs führt. Betacarotin wird als scheinbar ungefährliches antioxidatives Nahrungsergänzungsmittel gewertet, welches über das Abfangen von Singulett-Sauerstoff zur Senkung des oxidativen Stress, woraus sich möglicherweise ein verringertes Krebsrisiko ergibt, beitragen soll. Als eine mögliche Ursache des erhöhten Krebsrisikos bei schweren Rauchern, die Betacarotin als Nahrungsergänzung erhielten, konnte eine Induktion von Cytochrom 2E1 um das 2-15fache, je nach untersuchtem Gewebe, gezeigt werden (Paolini et al., 2001). Daher wird vermutet, dass Ethanol und Betacarotin synergistisch als „booster“ der Phase-I-Reaktion über CYP2E1 wirken könnten, wobei sich die Hepatotoxizität des Alkohols verstärken würde.

## **6.5 Endogene Enzyme verursachen über Redoxcycling von Chinonen oxidative DNA-Schäden**

Durch Inkubation von V79-hOR-Zellen, die Cytochromreduktase überexprimieren, mit Durochinon wird in dieser Arbeit gezeigt, dass durch diese Reduktase ein Redoxcycling (siehe Kapitel 2.4.1) von Fremdstoffen vermittelt wird, welches zu einem oxidativen DNA-Schaden führt. In der DNA von V79-hOR-Zellen werden nach 30minütiger Inkubation mit Durochinon konzentrationsabhängig vermehrt oxidative Basenmodifikationen und Einzelstrangbrüche in einem Verhältnis 1:1 nachgewiesen. In V79-Wildtypzellen hingegen, die die Reduktase nicht überexprimieren, wird der basale DNA-Schaden auch durch hohe Durochinonkonzentrationen nicht verändert (siehe Abbildung 39 und Abbildung 40). Dieser Befund wird gestützt durch Ergebnisse, bei denen in Zellen durch Anthracycline, welche ebenfalls zum Redoxcycling in der Lage sind, ein DNA-Schaden durch Cytochromreduktase über ROS generiert wird (Mizutani et al., 2003; Ravi and Das, 2004). Da sich durch Glutathion-Depletion der von Durochinon verursachte DNA-Schaden in V79-hOR-Zellen um Faktor 2 steigern lässt, muss man annehmen, dass auch hier ROS maßgeblich an der Schadensvermittlung beteiligt sind (Abbildung 40). Dieser Befund wird bestätigt durch Ergebnisse von Walles und Kollegen, die durch Durochinon

verursachte Einzelstrangbrüche in isolierten Hepatozyten ebenfalls mit Hilfe der Alkalischen Elution auf die Entstehung von ROS zurückführen (Wallis, 1992).

Von besonderem Interesse sind Daten, die belegen, dass nicht nur der Umsatz von Fremdstoffen, sondern auch von endogenen Substraten durch Cytochromreduktase zu einem DNA-Schaden führt. So sind z.B. der Neurotransmitter Noradrenalin und die Schilddrüsenhormone aufgrund ihrer phenolischen Gruppen zum Redoxcycling in der Lage, welches vermutlich über die Cytochrom-Reduktase vermittelt wird. So konnte gezeigt werden, dass es vermutlich über ROS-Bildung aus dem Stoffwechsel dieser Substanzen zu einem DNA-Schaden in isolierten menschlichen Spermien kommt, der sich durch Antioxidantien verringern lässt (Dobrzynska et al., 2004).

Zusätzlich konnte in einem Proliferationsassay gezeigt werden, dass der in GSH-depletierten V79-hOR Zellen durch Durochinon vermittelte oxidative DNA-Schaden zytotoxisch ist. In GSH-depletierten V79-Wildtypzellen hingegen, bei denen sich kein DNA-Schaden nach Durochinoninkubation feststellen lässt, zeigt Durochinon keine zytotoxische Wirkung (siehe Abbildung 41). Bei V79-hOR-Zellen hingegen ist bei hohen Konzentrationen sogar ein vollständiger Stopp der Proliferation nach der Inkubation mit dem Redoxcyclus sichtbar (Proliferationsfaktor 1). Die Zytotoxizität des Redoxcyclus wird bestätigt durch Ergebnisse von Hermersdörfer und Kollegen, die in den gleichen Zellen deren Fähigkeit, Kolonien nach Durochinoninkubation zu bilden, untersucht haben (Hermersdörfer et al., 1997). Allerdings wirkt Durochinon unter den experimentellen Bedingungen dieser Gruppe auf die V79-Zellen ebenfalls zytotoxisch, was im Rahmen des Proliferationsassays dieser Arbeit nicht bestätigt wird. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass die Inkubationsdauer -bei vergleichbarem Konzentrationsbereich- im Koloniebildungsversuch von Hermersdörfer et al. bei 24 h und im hier durchgeführten Proliferationsversuch nur bei 30 min lag (zur besseren Vergleichbarkeit mit den Ergebnissen der Alkalischen Elution).

## **6.6 Glutathion als Schutzmolekül für endogen und exogen verursachte DNA-Schäden**

Als interessanten Aspekt lassen die oben dargestellten Daten Rückschlüsse auf GSH als Schutzmolekül der Zelle zu. Daher war es interessant zu untersuchen, ob die Expression fremdstoffmetabolisierender Enzyme, die in der Zelle ROS generieren, zu einer Veränderung des intrazellulären GSH-Spiegels führen. Weder in unbehandelten V79-CYP2E1- noch in unbehandelten V79-hOR-Zellen konnte ein erhöhter Glutathiongehalt gegenüber dem Wildtyp gefunden werden (Abbildung 33 und Abbildung 37). Dies deutet daraufhin, dass die Zelle auf die Überexpression der Enzyme nicht mit einer gesteigerten GSH-Synthese reagiert. Dieses Ergebnis wird gestützt durch Untersuchungen an Hepatomzellen, die CYP2E1 überexprimieren.

Gegenüber dem Wildtyp zeigen sie keine Veränderung im Gehalt einer Reihe antioxidativ tätiger Enzyme und Moleküle (GSH, Glutathionperoxidase, Katalase, Superoxiddismutase u.a.) (Perez and Cederbaum, 2003).

Um zu untersuchen, ob eine GSH-Depletion zu einer Veränderung des basalen DNA-Schadens führt, wurden in V79- und V79-hOR-Zellen nach GSH-Depletion die oxidativen Basenmodifikationen, Einzelstrangbrüche (mittels Alkalischer Elution) und Mikrokerne gemessen. Die Ergebnisse zeigen, dass V79-hOR-Zellen auf GSH-Depletion sowohl mit erhöhten basalen Gleichgewichtsspiegeln oxidativer Basenmodifikationen als auch einer Erhöhung der spontanen Mikrokernrate reagieren. V79-Zellen hingegen zeigen nach GSH-Depletion nur eine Erhöhung der spontanen Mikrokernrate; die oxidativen Basenmodifikationen bleiben in V79-Zellen von der GSH-Depletion unbeeinflusst. Daraus lässt sich folgern, dass der Mikrokerntest auf eine endogene Schädigung durch ROS noch empfindlicher reagiert als die Alkalische Elution. Dies bedeutet also, dass eine Verdopplung der Mikrokernrate messbar ist ohne nachweisbare Zunahme der Strangbruchrate oder der Rate an oxidativen Basenmodifikationen in der Alkalischen Elution. Die Daten der Alkalischen Elution stehen im Einklang mit Untersuchungen an humanen Cervix-Karzinomzellen, die ebenfalls nach GSH-Depletion keine erhöhten Spiegel oxidativer Basenmodifikationen aufweisen (Hoffmann, 2003); Mikrokernraten wurden nicht bestimmt. Ebenfalls gestützt werden die Ergebnisse der V79-Zellen, durch Daten der humanen Cervixkarzinomzellen, die trotz Anwesenheit großer Mengen an ROS (durch Inkubation mit Entkopplern der mitochondrialen Atmungskette) nach GSH-Depletion keine erhöhten basalen Gleichgewichtsspiegel oxidativer Basenmodifikationen zeigen (Hoffmann et al., 2004). Die Ergebnisse der V79-hOR-Zellen, welche nach GSH-Depletion erhöhte Gleichgewichtsspiegel oxidativer Basenmodifikationen zeigen, werden gestützt durch Daten von Ovarienzellen des Chinesischen Hamsters, die nach GSH-Depletion ebenfalls erhöhte Spiegel oxidativer Basenmodifikationen zeigen (Mahler, 1999). Auch im Comet Assay verursacht GSH-Depletion bei Melanozyten erhöhte DNA-Schäden (Kinnaert et al., 2004).

Da sich bei beiden Zelllinien durch GSH-Depletion die Mikrokernrate gegenüber der spontanen Rate unbehandelter Zeller erhöhen lässt und eine Durochinoninkubation nach GSH-Depletion in V79-hOR einen höheren Schaden verursacht als in V79-hOR-Zellen mit physiologischem GSH-Gehalt, zeigt dies die Bedeutung von Antioxidantien, im Besonderen von GSH, für die Integrität des Genoms. In der Vergangenheit konnte in unserer Arbeitsgruppe sogar eine inverse Abhängigkeit von der Höhe des physiologischen GSH-Gehalts und der basalen oxidativen DNA-Modifikationen gezeigt werden (Will et al., 1999). Einerseits scheint GSH für die Protektion der DNA vor endogenen ROS notwendig zu sein, auf der anderen Seite aber lässt sich durch Supplementierung von Thiolen, als Vorstufen des Glutathions kein zusätzlicher Schutz erkennen – im Gegenteil, in hohen Konzentrationen wirkte

diese Supplementierung DNA-schädigend (Will et al., 1999). Vermutlich liegt es an diesem pro-oxidativen Potential vieler Antioxidantien, dass in unterschiedlichen humanen Interventionsstudien verschiedene Wirkungen der gleichen Antioxidantien nachgewiesen wurden (Eisenbrand, 2000).



## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Aas, P. A., Otterlei, M., Falnes, P.O., Vagbo, C.B., Skorpen, F., Akbari, M., Sundheim, O., Bjoras, M., Slupphaug, G., Seeberg, E., Krokan, H.E. (2003). Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature* 421, 859-863.

Aherne, G. W., Hardcastle, A., Raynaud, F., and Jackman, A. L. (1996). Immunoreactive dUMP and dTTP pools as an index of thymidylate synthase inhibition, effect of tomudex (ZD1694) and a non-polyglutamated quinazoline antifolate (CB30900) in L1210 mouse leukaemia cells. *Biochem Pharmacol* 51, 1293-1310.

Akbari, M., Otterlei, M., Diaz-Pena, J., Aas, P. A., Kavli, B., Libakk, N. B., Hagen, L., Imai, K., Durandy, A., Slupphaug, G., and Krokan, H. E. (2004). Repair of U/G and U/A in DNA by Ung2-associated repair complexes takes place predominately by short-patch repair both in proliferating and growth arrested cells. *Nucleic Acids Res* 32, 5486-5498.

Ames, B. N., and Gold, L. S. (2000). Paracelsus to parascience: the environmental cancer distraction. *Mutat Res* 447, 3-13.

Andersen, S., Heine, T., Sneve, R., König, I., Krokan, H. E., Epe, B., and Nilsen, H. (2004). Incorporation of dUMP into DNA is a major source of spontaneous DNA damage, while excision of uracil is not required for cytotoxicity of fluoropyrimidines in mouse embryonic fibroblasts. *Carcinogenesis*.

Andrae, U. (2003). Störung der Struktur und Funktion von Makromolekülen durch Chemikalien. Skript zum DGPT-Kurs Molekulare Zelltoxikologie.

Artelt, P., Morelle, C., Ausmeier, M., Fitzek, M., and Hauser, H. (1988). Vectors for efficient expression in mammalian fibroblastoid, myeloid and lymphoid cells via transfection or infection. *Gene* 68, 213-219.

Aruoma, O. I., and Halliwell, B. H. (1998). Molecular biology of free radicals in human diseases.

Asagoshi, K., Yamada, T., Terat, H., Ohjama, Y., Monden, Y., Arai, T., Nishiruma, S., Aburanti, H., Lindahl, T., and Ide, H. (2000). Distinct repair activities of human 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase and formamidopyrimidine DNA glycosylase for formamidopyrimidine and 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *J Biol Chem* 275, 4956-4964.

Auffret van der Kemp, P., Thomas, D., Barbey, R., DeOliveira, R., Boiteux, S. (1996). Cloning and expression in *E. coli* of the Ogg1 gene of *S. cerevisiae* which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 5197-5202.

Ballmeier, D. (1997). Oxidative DNA-Modifikationen durch extrazellulär und intrazellulär gebildete reaktive Sauerstoffspezies. Dissertation, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg.

- Bernstein, C., Bernstein, Harris, Payne, Claire M., Garewal, Harinder (2002). DNA repair/pro-apoptotic dual-role preteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res* 511, 145-178.
- Bhagwat, A. S. (2004). DNA-cytosine deaminases: from antibody maturation to antiviral defense. *DNA Repair* 3, 85-89.
- Bohr, V. A. (2002). Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radical Biology & Medicine* 32, 804-812.
- Bohr, V. A. a. D., Grigory L. (1999). Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie* 81, 155-160.
- Boiteux, S. (2004). Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 3, 1-12.
- 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.
- Boiteux, S., O'Connor, T.R., Lederer, F., Gouyette, A., Laval, J. (1990). Homogenous Escherichia coli Fpg protein. *J Biol Chem* 265, 3916-3922.
- 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.
- Cadet, J., Bourdat, A. G., D'Ham, C., Duarte, V., Gasparutto, D., Romieu, A., and Ravant, J. L. (2000). Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. *Mutat Res* 462, 121-128.
- Canman, C. E., Radany, E. H., Parsels, L. A., Davis, M. A., Lawrence, T. S., and Maybaum, J. (1994). Induction of resistance to fluorodeoxyuridine cytotoxicity in DNA damage in human tumor cells by expression of *E.coli* deoxyuridinetriphosphatase. *Cancer Res* 54, 2296-2298.
- Capelli, E., Hazra, T., Hill, J. W., Slupphaug, G., Bogliolo, M., and Frosina, G. (2001). Rates of excision repair are not solely dependent on levels of initiating enzymes. *Carcinogenesis* 22, 387-393.
- Carr, A., Frei, B. (1999). Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *Faseb J* 13, 1007-1024.
- Carrico, C. K., and Glazer, R. I. (1979). Effect of 5-fluorouracil on the synthesis and translation of polyadenylic acid-containing RNA from regenerating rat liver. *Cancer Res* 39, 3694-3701.
- Cederbaum, A. I. (1991). Microsomal generation of reactive oxygen species and their possible role in alcohol hepatotoxicity. *Alcohol and Alcoholism Suppl* 1, 291-296.



- Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S., and Loeb, L. A. (1992). 8-hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-->T and A-->C substitutions. *J Biol Chem* 267, 166-172.
- Chevillard, S., Radicella, J.P., Levalois, C., Lebeau, J., Poupon, M.-F., Oudard, S., Dutrillaux, B., and Boiteux, Serge (1998). Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumors. *Oncogene* 16, 3083-3086.
- Collins, A. R. (1999). Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* 21, 238-246.
- Collins, A. R., Ai-Guo, M., and Duthie, S. J. (1995). The kinetics of repair of oxidative DNA damages (strand breaks and oxidized pyrimidines) in human cells. *Mutat Res* 336, 69-77.
- Collins, A. R., Cadet, J., Epe, B., Gedik, C. (1997). Problems in the measurement of 8-oxoguanine in human DNA: Report of a workshop, DNA oxidation, held in Aberdeen, UK, 19-21 January, 1997. *Carcinogenesis* 18, 1833-1836.
- Collins, A. R., Duthie, S. J., and Dobson, V. L. (1993). Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14, 1733-1735.
- Demple, B., DeMott, Michael S. (2002). Dynamics and diversions in base excision repair of oxidized abasic lesions. *Oncogene* 21, 8926-8934.
- Dianov, G. L., Timchenko, T. V., Sinitsina, O. I., Kuzminov, A. V., Medvedev, O. A., and Salganik, R. I. (1991). Repair of uracil residues closely spaced on the opposite strands of plasmid DNA results in double-strand breaks and deletion formation. *Mol Gen Genet* 225, 448-452.
- Diasio, B., and Harris, B. E. (1989). Clinical pharmacology of 5-fluorouracil. *Clin Pharmacokinet* 16, 215-237.
- Diplock, A. D. (2000). Involvement of free radicals in carcinogenesis and modulation by antioxidants. Paper presented at: Deutsche Forschungsgemeinschaft: Carcinogenic and anticarcinogenic factors in food (Wiley VCH Verlag).
- Dobrzynska, M. M., Baumgartner, A., and Anderson, D. (2004). Antioxidants modulate thyroid hormone- and noradrenaline-induced DNA-damage in human sperms. *Mutagenesis* 19, 325-330.
- Doong, S. L., and Dolnick, B. J. (1988). 5-Fluorouracil substitution alters pre-mRNA splicing *in vitro*. *J Biol Chem* 263, 4467-4473.
- Doroshov, J. H., and Davies, K. J. A. (1980). Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxyde and hydroxyl radicyl. *J Clin Invest* 261, 128-135.
- Eisenbrand, G. (2000). Carcinogenic and anticarcinogenic factors in food. Hrsg: Eisenbrand, G; Wiley, VCH Verlag, 2000, Weinheim.

- Elateri, I., Tinkelenberg, B. A., Hansbury, M., Caradonna, S., Muller-Weeks, S., and Ladner, R. D. (2003). hSMUG1 can functionally compensate for Ung1 in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair* 2, 315-323.
- Elder, R. T., Zhu, X., Priet, S., Chen, M., Yu, M., Navarro, J.-M., Sire, S., and Zhao, Y. (2003). A fission yeast homologue of the human uracil-DNA glycosylase and their roles in causing DNA damage after overexpression. *Biochem Biophys Res Commun* 306, 693-700.
- El-Hajj, H. H., Wang, L., and Weiss, B. (1992a). Multiple mutant of *E. coli* synthesizing virtually thymineless DNA during limited growth. *J Bacteriol* 174, 4450-4456.
- El-Hajj, H.-H., Wang, L., and Weiss, B. (1992b). Multiple mutant of *E. coli* synthesizing virtually thymineless DNA during limited growth. *J Bacteriol* 174, 4450-4456.
- Epe, B. (1993a). DNA damage profiles induced by photosensitization. In: Halliwell, , Aruoma, OI, Hoorwood, E (Hrsg) *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. (2002). Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: What can we learn from repair deficient mice? *Biol Chem* 383, 467-475.
- Epe, B., Pflaum, Michael, Boiteux, Serge (1993b). DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems. *Mutation Research* 299, 135-145.
- Farker, K., Lehmann, M., and Oelschlagel, B. (1998). Impact of CYP2E1 genotype in renal cell and urothelial cancer patients. *Exp Toxicol Pathol* 50, 425-431.
- Frederico, L. A., Kunkel, T. A., and Shaw, B. R. (1990). A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy. *Biochemistry* 29, 2532-2537.
- Glazer, R. I., and Lloyd, L. S. (1982). Association of cell lethality with incorporation of 5-fluorouracil and 5-fluorouridine into nuclear RNA in human colon carcinoma cells in culture. *Mol Pharmacol* 21, 468-473.
- Goasduff, T., and Cederbaum, A. I. (2000). CYP2E1 degradation by in vitro reconstituted systems: role of molecular chaperone hsp90. *Arch Biochem Biophys* 379, 321-330.
- Gold, L. S., Slone, T. H., Stern, B. R., Manley, N. B., and Ames, B. N. (1992). Rodent carcinogens: setting priorities. *Science* 258, 261-265.
- Gombar, C. T., Katz, E. J., Magee, P. N., and Sirover, M. A. (1981). Induction of the DNA repair enzyme uracil DNA glycosylase and 3-methyladenine DNA glycosylase in regenerating rat liver. *Carcinogenesis* 2, 595-599.
- Gorsky, L. D., Koop, D. R., and Coon, M. J. (1984). On the stoichiometry of the oxidase and monooxygenase reactions catalysed by liver microsomal cytochrome P-450. *J Biological Chemistry* 259, 6812-6817.

- Goshal, K., and Jacob, S. T. (1994). Specific inhibition of preribosomal RNA processing in extracts from the lymphosarcoma cells treated with 5-fluorouracil. *Cancer Res* 54, 632-636.
- Goulian, M., Bleile, B., and Tseng, B. Y. (1980). Methotrexate-induced misincorporation of uracil into DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 1956-1960.
- Grem, J. L., and Fischer, P. H. (1989). Enhancement of 5-fluorouracil's anticancer activity by dipyridamole. *Pharmacol Ther* 40, 349-371.
- Grem, J. L., Nguyen, D., Monahan, B. P., Kao, V., and Goeffroy, F. J. (1999). Sequence-dependent antagonism between fluorouracil and paxitaxel in human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol* 58, 477-486.
- Griffith, O. W. (1985). Glutathione and glutathione disulphide. In *Methods of enzymatic analysis*, E. Bernt, Bergmeyer, H.U., ed. (Weinheim, VCH-Verlagsgesellschaft), pp. 522-529.
- Griffith, O. W., Meister, A. (1979). Potent and specific inhibition of glutathion synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem* 254, 7558-7560.
- Guillet, M., and Boiteux, S. (2003). Origin of endogenous DNA abasic sites in *saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 23, 8386-8394.
- Halliwell, B. (1994). Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence. *Lancet* 344, 721-724.
- Halliwell, B. (2001). Vitamin C and genomic stability. *Mutat Res* 475, 29-35.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine, some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys* 246, 501-514.
- Haushalter, K. A., Stukenberg, P. T., Kirschner, M. W., and Verdine, G. L. (1999). Identification of a new uracil-DNA-glycosylase family by expression cloning using synthetic inhibitors. *Curr Biol* 9, 174-185.
- Hayes, J. D., and McLellan, L. I. (1999). Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic Res* 31, 273-300.
- Hengstler, J. G., Utesch, D., Steinberg, P., Platt, K. L., Diener, B., Ringel, M., Swales, N., Fischer, T., Biefang, K., Gerl, M., *et al.* (2000). Cryopreserved hepatocytes as a constantly available *in vitro* model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug Metab Rev* 32, 81-118.
- Hermersdörfer, H., Ozierenski, B., Schmalix, W. A., Doehmer, J., and Glatt, H. R. (1997). Cell culture system for the controlled intracellular generation of reactive oxygen species. *Toxicology in vitro* 11, 569-572.

- Hoffmann, S. (2003). Bedeutung endogener und exogener Faktoren für die Entstehung des malignen Melanoms. Dissertation, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Mainz.
- Hoffmann, S., Spitkovsky, D., Radicella, P. P., Epe, B., and Wiesner, R. J. (2004). Reactive oxygen species derived from the mitochondrial respiratory chain are not responsible for the basal levels of oxidative base modifications observed in nuclear DNA of mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 36, 765-773.
- Houghton, J. A., Tillmann, D. M., and Harwood, F. G. (1995). Ratio of 2'-deoxyadenosine-5'-triphosphate/thymidine-5'-triphosphate influences the commitment of human colon carcinoma cells to thymineless death. *Clin Cancer Res* 1, 723-730.
- Hüttermann, J. (1982). Solid-state radiation chemistry of DNA and its constituents. *J Ultramicroscopy* 10, 25-40.
- Imai, K., Slupphaug, G., Lee, W.-I., Revy, P., Nonoyam, S., Catalan, N., Yel, L., Forveille, M., Kavli, B., Krokan, H. E., *et al.* (2003). Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class switch recombination. *Nature Immunol* 4, 1023-1028.
- IMPACT (1995). Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) Investigators. *Lancet* 345, 939-944.
- Ingraham, H. A., Tseng, B. Y., and Goulian, M. (1982). Nucleotide levels and incorporation of 5-fluorouracil and uracil into DNA of cells treated with 5-fluorodesoxyuridine. *Mol Pharmacol* 21, 211-216.
- Ismail, A., Van Groeningen, C. J., Hardcastle, A., Ren, Q., Aherne, G. W., Geoffroy, F., Allegra, C. J., and Grem, J. L. (1998). Modulation of 5-fluorouracil cytotoxicity by interferon alpha and -gamma. *Mol Pharmacol* 53, 252-261.
- Jackson, A. L. e. a. (2001). The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutation Research* 477, 7-21.
- Jackson, R. C., and Grindley, G. B. (1984). The biochemical basis for methotrexate cytotoxicity. Hrsg: Sirotnak, FM; Burchall, J; Ensminger, WD; Montgomery, JA, 389-315.
- Joenje, H. (1989). Genetic toxicology of oxygen. *Mutat Res* 219, 193-208.
- Johnson, F. B., Sinclair, D. A., and Guarente, L. (1999). Molecular biology of aging. *Cell* 96, 291-302.
- Johnston, P. G., and Kaye, S. (2001). Cacecitabine: a novel agent for the treatment of solid tumors. *Anticancer drugs* 12, 639-646.
- Kanamaru, R., Kakuta, H., Sato, T., Ishioka, C., and Wakui, A. (1986). The inhibitory effects of 5-fluorouracil on the metabolism of preribosomal and ribosomal RNA in L-1210 cells *in vitro*. *Cancer Chemother Pharmacol* 17, 43-46.

- Kavli, B., Sundheim, O., Akbari, M., Otterlei, M., Nilsen, H., Skorpen, F., Aas, P. A., Hagen, I., Krokan, H. E., and Slupphaug, G. (2002). hUNG2 is the major repair enzyme for removal of uracil from U:A matches, U:G mismatches in single stranded DNA, with SMUG1 as a broad specificity backup. *J Biol Chem* 277, 39926-39936.
- Kinnaert, E., Duez, P., Morandini, R., Dubois, J., Van Houtte, P., and Ghanem, G. (2004). Cysteine but not glutathione modulates the radiosensitivity of human melanoma cells by affecting both survival and DNA-damage. *Pigment Cell Res* 17, 275-280.
- Klein, J. C., Bleeker, M. J., Saris, C. P., Roelen, H. C., Brugghe, H. F., van den Elst, H., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Westra, J. G., Kriek, E., and Berns, A. J. M. (1992). Repair and replication of plasmids with site-specific 8-oxoG and 8-AAFdG residues in normal and repair deficient human cells. *Nucl Acids Res* 20, 4437-4443.
- Klotz, L. O., Kronke, K. D., and Sies, H. (2003). Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. *Photochem Photobiol Sci* 2, 88-94.
- 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, 13300-13306.
- Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T. and Barnes, D. E. (1999). Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 13300-13305.
- Kohn, K. W., Erickson, L. C., Ewig, R. A. G., and Friedmann, C. A. (1976). Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry* 1, 4629-4637.
- Krajcinovic, M., Sinnett, H., Richer, C., Labuda, D., and Sinnett, D. (2002). Role of NQO1, MPO and CYP2E1 genetic polymorphism in the susceptibility to childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Cancer* 97, 230-236.
- Krokan, H. E., Drablos, F., and Slupphaug, G. (2002). Uracil in DNA - occurrence, consequences and repair. *Oncogene* 21, 8935-8948.
- Krokan, H. E., Nilsen, Hilde, Skorpen, Frank, Otterlei, Marit, Slupphaug, Geir (2000). Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Letters* 476, 73-77.
- Krokan, H. E., Otterlei, M., Nilsen, H., Kavli, B., Skorpe, F., Andersen, S., Skjelbred, M., Akbari, M., Aas, P. A., and Slupphaug, G. (2001). Properties and functions of human uracil-DNA glycosylase from the *UNG* gene. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68, 365-386.
- Kubo, K., Shiomi, A., Asaeda, A. Y., Ohashi, F., Matsuyama, S., Ide, H., and Takamori, Y. (1998). Induction of fragile sites by fluorodeoxyuridine and caffeine accompanies with misincorporation of endogenous uridine nucleotide into DNA of feline fibroblasts. *J Vet Med Sci* 60, 1293-1297.

- Kubo, M., Matsuyama, S., Sato, K., Shiomi, A., Ono, K., Ito, Y., Ohashi, F., and Takamory, Y. (1988). Novel putative fragile sites observed in feline fibroblasts treated with aphidicolin and fluorodeoxyuridine. *J Vet Med Sci* 60, 809-813.
- Kufe, D. W., and Major, P. P. (1981). 5-fluorouracil incorporation into human breast carcinoma RNA correlates with cytotoxicity. *J Biol Chem* 256, 9802-9805.
- Kukielka, E., and Cederbaum, A. I. (1994). DNA-strand cleavage as a sensitive assay for the production of hydroxyl radicals by microsomes: role of cytochrome P4502E1 in the increased activity after ethanol treatment. *Biochem J* 302, 773-779.
- Ladner, R. D. (2001). The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy. *Curr Protein Pept Sci* 2, 361-370.
- Laval, J. (1996). Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. *Path Biol* 1, 14-24.
- Le Marchand, L., Donlon, T., Lum-Jones, A., Seifried, A., and Wilkens, R. L. (2002). Red meat intake, CYP2E1 genetic polymorphisms, and colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 11, 409-412.
- Le Marchand, L., Sivaraman, L., and Pierce, L. (1998). Associations of CYP1A1, GSTM1 and CYP2E1 polymorphisms with lung cancer suggest cell type specificities to tobacco carcinogens. *Cancer Res* 58, 4858-4863.
- Lees Murdock, D. J., Y.A., B., and Barnett, C. R. (2004). DNA-damage and cytotoxicity in pancreatic beta-cells expressing human CYP2E1. *Biochem Pharmacol* 68, 523-530.
- Li, S. Y., Gomelsky, M., Duan, J., Zhang, Z., Gomelsky, L., Zhang, X., Epstein, P. N., and Ren, J. (2004). Overexpression of aldehyde dehydrogenase-2 transgene prevents acetaldehyde-induced cell-injury in human umbilical vein endothelial cells: role of ERK and p38 mitogen-activated protein-kinase. *J Biol Chem* 279, 11244-11252.
- Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A., and Hemminki, K. (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark and Finland. *N Engl J Med* 343, 78-85.
- Lindahl, T. (1974). An N-glycosylase from *e.coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci USA* 71, 3649-3653.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709-715.
- Lindahl, T., and Andersson, A. (1972). Rate of chain breakage at apurinic sites in double stranded deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 111, 3618-3623.
- Lindahl, T., and Nyberg, B. (1972). Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 11, 3610-3618.

- Liu, Y., Muckel, E., Doehmer, J., and Glatt, H. (2003). Phenol and Hydroquinone induced gene mutations in V79-derived cells expressing human xenobiotic-metabolizing enzymes. *Nova Acta Leopoldina NF 87* 329, 231-237.
- Loeb, L. A. (2001). a mutator phenotype in cancer. *Cancer Research* 61, 3230-3239.
- Longley, D. B., Harkin, D. P., and Johnston, P. G. (2003). 5-Fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nature reviews* 3, 330-338.
- Mahler, H.-C. (1999). Einfluss endogener und exogener Faktoren auf Bildung und Reparatur oxidativer DNA-Schäden. Dissertation Universität Mainz, Institut für Pharmazie und Toxikologie.
- Marchal, J. A., Boulaiz, H., Suarez, I., Saniger, E., Campos, J., Carillo, E., Prados, J., Gallo, M. A., Espinosa, A., and Aranega, A. (2004). Growth inhibition, G<sub>1</sub>-arrest, and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells novel highly lipophilic 5-fluorouracil derivatives. *Invest New Drugs* 22, 379-389.
- Markant, A., Rimbach, G., Krämer, K., Mayer, H., and Pallauf, J. (1995). Reaktive Sauerstoffradikale: Entstehung, Wirkung, Eliminierung. *PZ* 140, 2313-2327.
- Michaels, M. L., Cruz, C., Grollman, A.P., Miller, J.H. (1992). Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidative damaged form of guanine. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 7022-7025.
- Mitrovski, B., Pressacco, J., Mandelbaum, S., and Erlichmann, C. (1994). Biochemical effects of folate-based inhibitors of thymidylate synthase in MHG-U1 cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 35, 109-114.
- Mizutani, H., Oikawa, S., Hiraku, Y., Murata, M., Kojima, M., and Kawanishi, S. (2003). Distinct mechanisms of site specific oxidative DNA damage by doxorubicin in the presence of copper (II) and NADPH-cytochrome P450 reductase. *Cancer Sci* 94, 686-691.
- Moore, G. A., Rossi, L., Nicotera, P., Orrenius, S., and O'Brien, P. J. (1987). Quinone toxicity in hepatocytes: studies on mitochondrial Ca<sup>2+</sup> release induced by benzoquinone derivatives. *Arch Biochem Biophys* 259, 283-295.
- Moriya, M. (1993). Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces GC-->TA transversions in simian kidney cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 1122-1126.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fgarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., and Honj, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553-563.
- Nagelhus, T. A., Haug, T., Singh, K. K., Keshav, K. F., Skorpen, F., Otterlei, M., Bharati, S., Lindmo, T., Benichou, S., Benarous, R., and Krokan, H. E. (1997). A sequence in the N-terminal region of human uracil-DNA glycosylase with homology to XPA interacts with the C-terminal part of the 34-kDa subunit of replication protein A. *Biol Chem* 272, 6561-6566.

Nakabeppu, Y., Yamashita, K., and Sekiguchi, M. (1982). Purification and characterization of normal and mutant forms of T4 endonuclease V. *J Biol Chem* 257, 2556-2562.

Navasumrit, P., Ward, T. H., Dodd, N. J., and O'Connor, P. J. (2000). Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented in vivo by antioxidants: effect of acute and chronic ethanol exposure. *Carcinogenesis* 21, 93-99.

Neumann, H. G. (1992). Entstehung und Behandlung von Tumoren. In: Forth, W, Henschler, D, Rummel, W, Starke, K (Hrsg) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie 6. Aufl.*, 722-723.

Nieto, N., Friedmann, S. L., and Cederbaum, A. I. (2002a). Cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species mediate paracrine stimulation of collagen I protein synthesis by hepatic stellate cells. *J Biol Chem* 277, 9853-9864.

Nieto, N., Friedmann, S. L., and Cederbaum, A. I. (2002b). Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. *Hepatology* 35, 62-73.

Nilsen, H., Haushalter, K. A., Robins, P., Barnes, D. E., Verdine, G. L., and Lindahl, T. (2001). Excision of deaminated cytosine from the vertebrate genome: role of SMUG1 uracil-DNA glycosylase. *EMBO* 20, 4278-4286.

Nilsen, H., Krokan, Hans E. (2001). Base excision repair in a network of defence and tolerance. *Carcinogenesis* 22, 987-998.

Nilsen, H., Otterlei, M., Haug, T., Solum, K., Nagekhus, T. A., Skorpen, F., and Krokan, H. E. (1997). Nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylase are generated by alternative splicing and transcription from different positions in the UNG gene. *Nucleic Acids Res* 25, 750-755.

Nilsen, H., Rosewell, I., Robins, P., Skjelbred, C. F., Andersen, S., Slupphaug, G., Daly, G., Krokan, H. E., Lindahl, T., and Barnes, D. E. (2000). Uracil-DNA glycosylase (UNG)-deficient mice reveal a primary role of the enzyme during DNA replication. *Mol Cell* 5, 1059-1065.

Nilsen, H., Stamp, G., Andersen, S., Hrivnak, G., Krokan, H. E., Lindahl, T., and Barnes, D. E. (2003). Gene-targeted mice lacking uracil-DNA glycosylase develop B-cell lymphomas. *Oncogene* 22, 5381-5386.

Nishioka, T., Hidalgo, E., Li, Z., and B, D. (1999). *Mol Biol Cell* 10, 1637-1652.

O'Brien, P. J. (1991). Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chem Biol Interact* 80, 1-41.

Olive, P. L., Banath, J., and Durand, R. E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA-damage and repair in tumor and normal cells measured using the Comet assay. *Radiat Res* 122, 86-94.



- Olsen, L. C., Aasland, R., Wittwer, C. U., Krokan, H. E., and Helland, D. E. (1989). Molecular cloning of uracil-DNA glycosylase, a highly conserved DNA repair enzyme. *EMBO* **8**, 3121-3125.
- Osterod, M. (2002a). Einfluss genetischer Defekte auf die Reparatur oxidativer DNA-Schäden in Säugerzellen. Dissertation *Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Mainz*.
- Osterod, M., Hollenbach, S., Hengstler, J. G., Barnes, D. E., Lindahl, T., and Epe, B. (2001). Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoGuanine-DNA glycosylase (Ogg1) deficient mice. *Carcinogenesis* **22**, 1459-1463.
- Osterod, M., Hollenbach, S., Hengstler, J.G., Barnes, D.E., Lindahl, T., Epe, B. (2001). Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1) deficient mice. *Carcinogenesis* **22**, 1459-1463.
- Osterod, M., Larson, E., Le Page, F., Hengstler, J.G., Van Der Horst, G.T., Boiteux, S., Klungland, A., Epe, B. (2002b). A global DNA repair mechanism involving the Cockayne syndrome B (CSB) gene product can prevent the in vivo accumulation of endogenous oxidative DNA base damage. *Oncogene* **21**, 8232-8239.
- Otterlei, M., Warbrick, E., Nagelhus, T. A., Haug, T., Slupphaug, G., Akbari, M., Aas, P. A., Steinsbekk, K., Bakk, O., and Krokan, H. E. (1999). Post-replicative base excision repair in replication foci. *EMBO* **18**, 3834-3844.
- Paolini, M., Antelli, A., Pozzetti, L., Spetlova, D., Perocco, P., Valgimigli, L., Pedulli, G. F., and Cantelli-Forti, G. (2001). Induction of cytochrome P450 enzymes and over-generation of oxygen radicals in beta-carotene supplemented rats. *Carcinogenesis* **22**, 1483-1495.
- Parsels, L. A., Parsels, J. D., Wagner, L. M., Loney, T. L., Radany, E. H., and Maybaum, J. (1998). Mechanism and pharmacological specificity of dUTPase-mediated protection from DNA damage and cytotoxicity in human tumor cells. *Cancer Chemother Pharmacol* **42**, 375-362.
- Parsels, L. A., Zellars, R. C., Loney, T. L., Parsels, J. D., Clarke, M. F., Merchant, A. K., Lawrence, T. S., and Maybaum, J. (1997). Prevention of fluorodeoxyuridine-induced cytotoxicity and DNA damage in HT29 colon carcinoma cells by conditional expression of wild-type p53 phenotype. *Mol Pharmacol* **52**, 600-605.
- Patton, J. R. (1993). Ribonucleoprotein particle assembly and modification of U2 small nuclear RNA containing 5-fluorouridine. *Biochemistry* **32**, 8939-8944.
- Perez, M. J., and Cederbaum, A. I. (2003). Metallothionein 2A induction by zinc protects HEPG2 cells against CYP2E1-dependent toxicity. *Free Radic Biol Med* **34**, 443-455.
- Perret, A., and Pompon, D. (1998). Electron shuttle between membrane-bound cytochrome P450 3A4 and *b*<sub>5</sub> rules uncoupling mechanism. *Biochemistry* **37**, 11412-11424.

- Persson, I., Johansson, I., and Bergling, H. (1993). Genetic polymorphism of cytochrome 2E1 in a Swedish population. Relationship to incidence of lung cancer. *FEBS Lett* **319**, 207-211.
- Pflaum, M. (1996) Oxidative DNA-Modifikationen durch langwelliges UV-Licht und sichtbares Licht, Universität Würzburg, Würzburg.
- Pflaum, M., Will, O., and Epe, B. (1997). Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis* **18**, 2225-2231.
- Radicella, J. P., Dhérin, C., Desmaze, C., Fox, M.S., Boiteux, S. (1997). Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 8010-8015.
- Rand Rath, K., Tseng, W. C., Harris, J. S., and Lu, L. J. (1983). Specific effects of 5-fluoropyrimidines and 5-azapyrimidines on modification of the position of pyrimidines, in particular the synthesis of 5-methyluracil and 5-methylcytosine in nucleic acids. *Recent Results Cancer Res* **84**, 283-297.
- Ravi, D., and Das, K. C. (2004). Redoxcycling of anthracyclines by thioredoxin system: increased superoxide generation and DNA damage. *Cancer Chemother Pharmacol* *epub ahead of print*.
- Risch, N. (2001). The genetic epidemiology of cancer: interpreting family and twin studies and their implications for molecular genetic approaches. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **10**, 733-741.
- Romagna, F. (1993). Mikrokerntestsysteme. In *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*, R. Fahrig, ed. (Darmstadt, Wissenschaftliche Buchgesellschaft), pp. 290-298.
- Rossi, R., Villa, A., Negri, C., Scovassi, I., G., C., Biomonti, G., and Montecuccu, A. (1999). The replication factory targeting sequence/PCNA-binding site is required in G(1) to control the phosphorylation status of DNA ligase I. *EMBO* **18**, 5745-5754.
- Rutmann, R. J., Cantarow, A., and Paschkis, K. E. (1954). Studies on 2-acetylaminofluorene carcinogenesis: III: The utilization of uracil-2-C<sup>14</sup> by pre-neoplastic rat liver. *Cancer Res* **14**, 119.
- Samuelsson, T. (1991). Interactions of transfer RNA pseudouridine synthases with RNAs substituted with fluorouracil. *Nucleic Acids Res* **19**, 6139-6144.
- Santi, D. V., and Hardy, L. W. (1987). Catalytic mechanism and inhibition of tRNA (uracil-5-)methyltransferase: evidence for covalent catalysis. *Biochemistry* **26**, 8599-8606.
- Santi, D. V., McHenry, C. S., and Sommer, H. (1974). Mechanisms of interaction of thymidylate synthase with 5-fluorodeoxyuridylate. *Biochemistry* **13**, 471-481.
- Sapone, A., Attatado, A., Canistro, D., Broccoli, M., Trespidi, S., Pozzetti, L., Biagi, G. L., Cantelli-Forti, G., and Paolini, M. (2003). Induction and suppression of

cytochrome P450 isoenzymes and generation of oxygen radicals by procymidone in liver, kidney and lung of CD1 mice. *Mutat Res* 527, 67-80.

Schenkman, J. B., and Jansson, I. (2003). The many roles of cytochrome *b<sub>5</sub>*. *Pharmacol Therap* 97, 139-152.

Scrip (2002). Scrip's cancer chemotherapy report. *Scrip World Pharmaceutical News*.

Shibutani, S., Takeshita, M., and Grollmann, A. P. (1991). Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349, 431-434.

Sies, H. (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Ed Engl* 25, 1058-1071.

Sies, H. (1989). Zur Biochemie der Thiolgruppe: Bedeutung des Glutathions. *Naturwissenschaften* 76, 57-64.

Singh, N. P., Mc Coy, M. T., Tice, R. R., and Schneider, E. L. (1988). A simple technique of quantification of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell res* 175, 184-191.

Slupphaug, G., Eftedal, I., Kavli, B., Bharati, S., Helle, N. M., Haug, T., Levine, D. W., and Krokan, H. E. (1995). Properties of a recombinant human uracil-DNA glycosylase from the *UNG* gene and evidence that *UNG* encodes the major uracil-DNA glycosylase. *Biochemistry* 34, 128-138.

Slupphaug, G., Kavli, B., and Krokan, H. E. (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 531, 231-251.

Sommer, H., and Santi, D. V. (1974). Purification and amino acid analysis of an active site peptide from thymidylate synthetase containing covalently bound 5-fluoro-2'-deoxyuridylate and methylenetetrahydrofolate. *Biochem Biophys Res Commun* 57, 689-695.

Stucki, M., Pascucci, B., Parlanti, E., Fortini, P., Wilson, S.H., Hubscher, U., Dogliotti, E. (1998). *Oncogene* 17, 835-843.

Sugimura, H., Kohno, T., Wakai, K., Nagura, K., Genka, K., Igarashi, H., Morris, B.J., Baba, S., Ohno, Y., Gao, C., Li, Z., Wang, J., Takezaki, T., Tajima, K., Varga, T., Sawaguchi, T., Lum, J.K., Martinson, J.J., Tsugane, S., Iwamasa, T., Shinmura, K., Yokota, J. (1999). hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8, 669-674.

Takao, M., Aburantani, H., Kobayashi, K., Yasui, A. (1998). Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research* 26, 2917-2922.

Tchou, J., and Grollmann, A. (1993). Repair of DNA containing oxidatively-damaged base, 8-oxoguanine. *Mutat Res* 299, 277-287.

- Thomas, D., Scott, A.D., Barbey, R., Padula, M., and Boiteux, S. (1997). Inactivation of OGG1 increases the incidence of GC->TA transversions in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for endogenous oxidative damage to DNA in eukaryotic cells. *Mol Gen Genet* 254, 171-178.
- Tinkelenberg, B. A., Hansbury, M. J., and Ladner, R. D. (2002). dUTPase and uracil-DNA glycosylase are central modulators of antifolate toxicity in *saccharomyces cerevisiae*. *Cancer res* 62, 4901-4915.
- Tokunaga, E., Oda, S., Fukushima, M., Maehara, Y., and Sugimachi, K. (2000). Differential growth inhibition by 5-fluorouracil in human colorectal carcinoma cell lines. *Eur J Cancer* 36, 1998-2006.
- Tudek, B., Laval, J., and Boiteux, S. (1992). Biological properties of imidazol ring opened N7-methylguanine in M13mp18 phage. *Nucleic Acids Res* 20, 3079-3084.
- Tye, B.-K., Chien, J., Duncan, B. K., and Warner, H. R. (1978). Uracil incorporation: a source of pulse labeled DNA fragments in the replication of the *e. coli* chromosome. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 233-237.
- Verri, A., Mazzarello, P., Biamonti, G., Spadari, S., and Focher, F. (1990). The specific binding of nuclear protein(s) to the cAMP responsive element (CRE) sequence (TGACGTCA) is reduced by misincorporation of U and increased by the deamination of C. *Nucleic Acids Res* 18, 5775-5780.
- Viswanathan, A., You, H. J., and Doetsch, P. W. (1999). Phenotypic change caused by transcriptional bypass of uracil in non-dividing cells. *Science* 284.
- Voet, D. (1994). *Biochemie*. Verlag Wiley VCH, Weinheim, 977.
- Wallis, S. A. (1992). Mechanisms of DNA damage induced in rat hepatocytes. *Cancer Lett* 63, 47-52.
- Warner, H. R., Duncan, B. K., Garrett, C., and Neuhard, J. (1981). Synthesis and metabolism of uracil-containing deoxyribonucleic acid in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 145, 687-695.
- Webley, S. D., Hardcastle, A., Ladner, R. D., Jackman, A. L., and Aherne, G. W. (2000). Deoxyuridine triphosphatase (dUTPase) expression and sensitivity to thymidylate synthase (TS) inhibitor ZD9331. *Br J Cancer* 83, 792-799.
- Welsh, S., Hobbs, S., and Aherne, G. W. (2003). Expression of uracil DNA glycosylase (UDG) does not effect cellular sensitivity to thymidylate synthase (TS) inhibition. *Eur J Cancer* 39, 378-387.
- 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.
- Wohlhueter, R. M., McIvor, R. S., and Plagemann, P. G. (1980). Facilitated transport of uracil and 5-fluorouracil, and permeation of orotic acid into cultured mammalian cells. *J Cell Physiol* 104, 309-319.

Wood, M. L., Dizdaroglu, M., Gajewski, E., and Essigmann, J. M. (1990). Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effect of a single 8-hydroxyguanine residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochemistry* 29, 7024-7032.

Wood, R. D., Mitchell, Michael, Sgouros, John, Lindahl, Thomas (2001). Human DNA repair genes. *Science* 291, 1284-1289.

Xie, Y., Yang, H., Cunanan, C., Okamoto, K., Shibata, D., Pan, J., Barnes, D. E., Lindahl, T., McIlhatton, M., Fishel, R., and Miller, J. H. (2004). Deficiencies in Mouse Myh and Ogg1 results in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors. *Cancer Research* 64, 3096-3102.

Yoshioka, A. (1987). Deoxyribonucleoside triphosphate imbalance. 5-fluorodeoxyuridine-induced DNA double strand breaks in mouse FM3A cells and the mechanism of cell death. *J Biol Chem* 262, 8235-8241.

Zhang, X., Li, S. Y., Brown, R. A., and Ren, J. (2004). Ethanol and acetaldehyde in alcoholic cardiomyopathy: from bad to ugly *en route* to oxidative stress. *Alcohol and Alcoholism* 32, 175-186.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin
AP-Läsion	Apurinische/apyrimidinische Stelle der DNA
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSO	Buthioninsulfoximin
C	Cytosin
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
ConA	Concanavalin A
CPM	<i>counts per minute</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Endo IV	Endonuklease IV
EtOH	Ethanol
FAPY	Formamidopyrimidin
FCS	Fetales Kälberserum
5-FdUrd	5-Fluordesoxyuridin
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
5-FU	5-Fluoruracil
G	Guanin
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion
k.o.	<i>knockout</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
Mbd4	<i>methyl CpG binding domain 4</i>
MK	Mikrokern
MnSOD	Mangan-abhängige Superoxiddismutase
n	Anzahl der Versuche
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NOX	NADPH-Oxidasen
8-oxoG (8-Hydroxyguanin)	7,8-Dihydro-8-oxoguanin
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Smug1	<i>single strand selective monofunctional DNA glycosylase</i>
ssb	<i>single strand break</i> (Einzelstrangbruch)

T  
T4 Endo V  
Tdg  
TEAH  
Tris  
U  
Udg  
wt

Thymin  
T4 Endonuklease V  
*thymidine-mismatch DNA glycosylase*  
Tetraethylammoniumhydroxid  
2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol  
Uracil  
Uracil DNA Glykosylase  
Wildtyp

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

S. Andersen, T. Heine, R. Sneve, I. König, H.E. Krokan, B. Epe, H. Nilsen (2005). Incorporation of dUMP into DNA is a major source of spontaneous DNA damage, while excision of uracil is not required for cytotoxicity of fluoropyrimidines in mouse embryonic fibroblasts. *Carcinogenesis*, elektronisch publiziert vor Drucklegung



## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema

„Endogene DNA-Schädigung als Ursache genetischer Instabilität“

selbstständig und ohne die Benutzung anderer als die angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die Arbeit wurde in gleicher oder abgewandelter Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift