

Generierung und Prozessierung oxidativer DNA-Schäden

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN“

vorgelegt von
Marc Bercht
Mainz, 2006

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2006

„Alle Raben sind schwarz“, (Hempel and Oppenheim, 1948).

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von November 2003 bis November 2006 am Institut für Pharmazie des Fachbereichs Chemie und Pharmazie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Leitung von Prof. Dr. B. Epe.

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
2	<u>KENNTNISSTAND</u>	3
2.1	REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES UND OXIDATIVER STRESS	3
2.1.1	SUPEROXIDRADIKALE	4
2.1.2	WASSERSTOFFPEROXID	5
2.1.3	HYDROXYLRADIKALE	5
2.1.4	SINGULETT-SAUERSTOFF	6
2.1.5	DER „RESPIRATORY BURST“	6
2.1.6	ENDOGENE BILDUNG VON ROS IM FREMDSTOFFMETABOLISMUS	7
2.1.7	ANTIOXIDATIVE ABWEHRMECHANISMEN	8
2.2	BIOLOGISCHE EFFEKTE VON OXIDATIVEM STRESS	9
2.2.1	OXIDATIVE DNA-MODIFIKATIONEN	9
2.2.2	OXIDATION VON LIPIDEN UND PROTEINEN	11
2.2.3	KONSEQUENZEN OXIDATIVER DNA-MODIFIKATIONEN	11
2.3	EXPERIMENTELLE GENERIERUNG VON DNA-SCHÄDEN	13
2.3.1	TPZ	13
2.3.2	IONISIERENDE STRAHLUNG (γ -STRAHLEN)	14
2.3.3	Ro19-8022	16
2.3.4	MMS	18
2.3.5	UVB	18
2.4	DNA-REPARATURMECHANISMEN	18
2.4.1	DIREKTE REPARATUR (SCHADENSREVERSION)	19
2.4.2	BASEN-EXZISIONS-REPARATUR (BER)	20
2.4.3	NUKLEOTID-EXZISIONS-REPARATUR (NER, GGR)	25
2.4.4	TRANSKRIPTIONSGEKOPPELTE REPARATUR (TCR)	27
2.4.5	POSTREPLIKATIVE REPARATUR (MISMATCH-REPARATUR)	29
2.4.6	DNA-EINZELSTRANGBRUCH REPARATUR	29
2.4.7	DIE BEDEUTUNG DER DNA-REPARATUR FÜR DIE KANZEROGENESE	30
2.4.8	INDUKTION DER DNA-REPARATUR	33
3	<u>ZIELSETZUNG</u>	35
4	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	37

4.1	MATERIAL	37
4.1.1	GERÄTE	37
4.1.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	40
4.1.3	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	41
4.1.4	ANTIKÖRPER UND ENZYME	46
4.1.5	DNA & RNA	47
4.1.6	ZELLEN	47
4.1.7	PUFFER, LÖSUNGEN, MEDIEN	49
4.2	METHODEN	65
4.2.1	ZELLKULTUR	65
4.2.2	ALKALISCHE ELUTION	69
4.2.3	DNA-RELAXATIONSASSAY	77
4.2.4	BESTIMMUNG VON DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHEN	80
4.2.5	PRÄPARATION VON APN1	82
4.2.6	MIKROKERNTEST	86
4.2.7	HPRT-MUTATIONSTEST	88
4.2.8	BESTIMMUNG DER TOXIZITÄT IN SÄUGERZELLEN	89
4.2.9	PLASMIDISOLIERUNG	92
4.2.10	DEPLETION VON GLUTATHION	92
4.2.11	QUANTIFIZIERUNG DES GLUTATHIONGEHALTES	93
4.2.12	P53-„KNOCKDOWN“ IN PRIMÄREN ZELLEN	94
4.2.13	HERSTELLUNG VON ZELLEXTRAKTEN	95
4.2.14	BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION	96
4.2.15	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	97
4.2.16	PROTEINTRANSFER (WESTERN-BLOT), DETEKTION MIT ANTIKÖRPERN	98
4.2.17	BESTIMMUNG DER 8-OXOG-GLYKOSYLASEAKTIVITÄT	101
4.2.18	LUCIFERASE ASSAY	103
4.2.19	TEST AUF MYCOPLASMEN	104
5	ERGEBNISSE	107
5.1	INDUZIERBARKEIT DNA-REPARATURMECHANISMEN DURCH DNA-SCHÄDEN	107
5.1.1	TOXIZITÄT VON Ro19-8022 UND MMS-BEHANDLUNG	107
5.1.2	EINFLUSS VON Ro19-8022 UND MMS AUF DEN ZELLULÄREN GLUTATHIONGEHALT	110
5.1.3	INDUZIERBARKEIT DER REPARATUR FPG-SENSITIVER MODIFIKATIONEN DURCH SCHÄDIGUNG MIT Ro19-8022	112
5.1.4	INDUZIERBARKEIT DER REPARATUR FPG-SENSITIVER MODIFIKATIONEN DURCH SCHÄDIGUNG MIT MMS	117

5.1.5	EINFLUSS VON RO19-8022 UND MMS AUF DIE ENZYMEXPRESSION DER 8-OXOG-GLYKOSYLASE (OGG1)	120
5.1.6	INDUZIERBARKEIT DER PLASMIDREAKTIVIERUNG IN PRIMÄREN MENSCHLICHEN FIBROBLASTEN UND KERATINOZYTEN DURCH SCHÄDIGUNG MIT UVB-STRAHLUNG	122
5.1.7	STATUS VON P53 UND PHOSPHO-P53(SER15) NACH EINEM „KNOCKDOWN“ MIT siRNA IN PRIMÄREN MENSCHLICHEN FIBROBLASTEN UND KERATINOZYTEN	124
5.1.8	EINFLUSS VON P53 AUF DIE INDUZIERBARKEIT DER PLASMIDREAKTIVIERUNG IN PRIMÄREN MENSCHLICHEN FIBROBLASTEN UND KERATINOZYTEN DURCH SCHÄDIGUNG MIT UVB-STRAHLUNG	127
5.2	UNTERSUCHUNGEN ZU DNA-SCHÄDIGUNG, DER TOXIZITÄT, MUTAGENITÄT UND GENOTOXIZITÄT VON TIRAPAZAMIN IM VERGLEICH MIT γ-STRAHLUNG	129
5.2.1	UNTERSUCHUNGEN DER ZELLTOXIZITÄT VON TIRAPAZAMIN UND γ -STRAHLUNG	129
5.2.2	DNA-SCHADENSANALYSE MIT HILFE DER ALKALISCHEN ELUTION	132
5.2.3	UNTERSUCHUNGEN DER MUTAGENITÄT VON TIRAPAZAMIN	137
5.2.4	UNTERSUCHUNGEN DER GENOTOXIZITÄT VON TIRAPAZAMIN UND γ -STRAHLUNG MIT HILFE VON MIKROKERNTESTS	138
5.2.5	QUANTIFIZIERUNG VON TIRAPAZAMIN UND γ -STRAHLUNG INDUZIERTER DSB MIT HILFE VON γ -H2AX IMMUNFLUORESCENZ	141
6	<u>DISKUSSION</u>	143
6.1	IST DIE DNA-REPARATUR DURCH EINE PRIMING-DOSIS INDUZIERBAR?	143
6.1.1	TOXISCHE EFFEKTE VON RO19-8022 PLUS LICHT UND MMS	143
6.1.2	GIBT ES ZELLULÄR EINE ADAPTIVE ANTWORT DES GLUTATHIONGEHALTES AUF EIN PRIMING?	144
6.1.3	IST DIE BASEN-EXZISIONS-REPARATUR DURCH EINE PRIMING DOSIS INDUZIERBAR?	144
6.1.4	GIBT ES ZELLULÄRE EINE ADAPTIVE ANTWORT DES hOGG1-GEHALTES NACH EINER SCHÄDIGUNG?	147
6.1.5	IST DIE NUKLEOTID-EXZISIONS-REPARATUR DURCH EINE PRIMING-DOSIS INDUZIERBAR?	147
6.1.6	WELCHEN EINFLUSS HAT P53 AUF DIE NUKLEOTID-EXZISIONS-REPARATUR?	148
6.2	UNTERSUCHUNGEN ZU DNA-SCHADENSGENERIERUNG UND TOXIZITÄT DURCH TIRAPAZAMIN	150
6.2.1	MECHANISMEN DER DNA-SCHÄDIGUNG DURCH TIRAPAZAMIN	150
6.2.2	MECHANISMEN DER TOXIZITÄT	152
6.2.3	MECHANISMEN DER MUTAGENITÄT	154
6.2.4	WELCHE KLASTOGENEN/ANEUGENEN EFFEKTE HAT TIRAPAZAMIN IM VERGLEICH ZU γ -STRAHLUNG UND GIBT ES ZELLULÄRE UNTERSCHIEDE?	155

6.2.5	STIMMT DER VERMUTETE MECHANISMUS FÜR TIRAPAZAMIN MIT DEN GEFUNDENEN ERGEBNISSEN ÜBEREIN?	156
7	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	159
8	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	163

Abkürzungen

6TG	6-Thioguanin
8-oxoA	8-Hydroxyadenin
8-oxoG	8-Hydroxyguanin
Abb.	Abbildung
AP-Läsion	basenfreie Stelle in der DNA (apurinische/apyrimidinische)
APN1	apurinische/apyrimidinische Endonuklease
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BSO	Buthioninsulfoximin
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CHO-Zellen	Chinesische Hamster Ovarienzellen
Csa	Cockayne Syndrom Typ A
Csb	Cockayne Syndrom Typ B
CYP P450	Cytochrom P450-System
dest.	Destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch (double-strand-break)
DTNB	5,5' Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellman's Reagenz
ECD	elektrochemischer Detektor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Endo	Endonuklease
Epe	Name
ERCC1	excision repair cross complementing group 1
Exo	Exonuklease
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FaPy	Formamidopyrimidin
FCS	Fötale Kälberserum
Fp	Flavoprotein
Fpg	Formamidopyrimidinglykosylase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion (Disulfid-Dimer)
HEPES	([N-2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'- [2-Ethansulfonsäure])
hNth	humanes analoges Protein zu Endo III

hOgg1	humanes analoges Protein zu Fpg
hOR	humane Oxidoreduktase
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
HPRT	Hypoxanthin-Guanin Phosphoribosyl Transferase
IgG	Immunglobulin G
LOH	Verlust der Heterozygotie (loss of heterozygosity)
Lsg.	Lösung
MEFs	Maus-Embryofibroblasten
min	Minute(n)
MMR	Mismatch-Reparatur
MMS	Methylmethansulfonat
MN (MK)	Mikrokerne
Mpg	N-Methylpurin-DNA-Glykosylase
mRNA	(messenger-) Ribonukleinsäure
n	Anzahl der durchgeführten, voneinander unabhängigen Experimente
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
p.a.	hohe Reinheit (pro analysi)
PARP	poly-ADP-ribose-polymerase
PBSCMF	phosphatgepufferte Salzlösung (Calcium- /Magnesiumfrei)
pCMVLuc	Plasmid pCMVLuc (Photinus pyralis Luziferase) unter der Kontrolle des CMV (Cytomegalievirus)
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
Ro19-8022	[R]-1-(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl- 4Hbenzo[a]chinolizin-1-yl)carbonyl]-2-pyrrolidin- methanol
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RPA/C	replication protein A /C
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
siRNA	Small interfering RNA
SoxRS	Regulon in E. coli
SS	„steady state“
SSB	Einzelstrangbruch (single strand break)

T4EV	T4 Endonuklease V
TCR	transkriptionsgekoppelte Reparatur
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid
TPZ	Tirapazamin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
UVA	Ultraviolettes Licht der Wellenlänge 320-400 nm
UVB	Ultraviolettes Licht der Wellenlänge 280-320 nm
UVC	Ultraviolettes Licht der Wellenlänge 200-280 nm
uvrABCD	uvrABCD Endonuklease, Multienzymkomplex in E. coli
UZ	Ultrazentrifuge
VIS	sichtbares Licht der Wellenlänge 400-800 nm
WT	Wildtyp
XP	Xeroderma pigmentosum
XRCC1	X-ray repair cross complementing group 1

Abkürzungen aus dem Internationalen Einheitensystem (SI-Einheiten) sind nicht gesondert aufgeführt.

1 EINLEITUNG

Im Jahr 2004 starben in Deutschland 818271 Personen. Nach Erkrankungen des Kreislaufsystems, welche als häufigste Todesursache bei älteren Menschen gelten – 90 % der daran Verstorbenen sind über 65 Jahre alt - folgt Krebs mit 25,6 % als zweithäufigste Todesursache. An bösartigen Neubildungen, der bedeutendsten Todesursache in den mittleren Jahren, starben 2004 209329 Personen (Bundesamt, 2004). Es besteht daher ein großes Interesse, die molekularen Abläufe während der Entstehung und dem Fortschreiten dieser Krankheit (Kanzerogenese) aufzuklären, um die Möglichkeiten der Behandlung zu verbessern.

Krebs beruht nach heutigem Verständnis auf Mutationen in somatischen Zellen, die zur Aktivierung von Proto-Onkogenen (z. B. ras, c-myc) bzw. zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (z. B. p53, RB, APC, VHL) führen können. Deren Zusammenspiel verhindert in gesunden Zellen ein unkontrolliertes Wachstum (Weinberg, 1996). Als Ursache von Krebs werden des Weiteren Mutationen in Genen, welche an der DNA-Reparatur bzw. an der Replikation beteiligt sind, diskutiert (Mutatorphenotyp-Hypothese) (Loeb et al., 2003; Beckman and Loeb, 2005; Venkatesan et al., 2006). Bis heute sind noch nicht alle Gene bekannt, deren Funktionsstörungen zu einer Prädisposition für Krebs führen können. Auch über die Art der DNA-Modifikationen, die während der Kanzerogenese zu Mutationen führen, besteht in den meisten Fällen noch Unklarheit. Für die Entstehung von Mutationen werden sowohl endogene wie auch exogene Einflüsse verantwortlich gemacht. Zu den exogenen Einflüssen gehören Mutagene, wie z. B. Aflatoxine, Benzpyren im Zigarettenrauch sowie Strahlung und Ozon. Im Unterschied zu den exogenen Mutagenen, die der Mensch durch seinen Lebensstil beeinflussen kann, sind die endogenen Faktoren, z. B. spontane Fehler der DNA-Polymerasen oder Deaminierung der DNA-Base Cytosin, meist wenig modulierbar. Endogene reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) (z. B. aus der mitochondrialen Atmungskette in der Zelle) sind ein weiterer Risikofaktor. Sie weisen jedoch im Vergleich zu den anderen genannten endogenen Risikofaktoren die Besonderheit auf, dass sie durch exogene Substanzen wie Antioxidantien beeinflusst werden können. Endogene ROS verursachen oxidative Modifizierungen von DNA-Basen und können bei einer Zellteilung zu Mutationen führen. Die von ROS induzierten oxidativen Modifikationen in der DNA sind somit demnach möglicherweise wichtige Vorstufen von initiiierenden Mutationen (Wiseman et al., 1995; Beckman and Ames, 1997; Sekiguchi and Tsuzuki, 2002).

Die Entstehung von oxidativen DNA-Modifikationen hängt sowohl von der Konzentration der reaktiven Sauerstoffspezies als auch von enzymatischen und nicht-enzymatischen Abwehrstrategien der Zellen gegen reaktive Sauerstoffspezies

ab (Sies, 1993; Epe, 2003). In gesunden Zellen besteht normalerweise ein Gleichgewicht zwischen Bildung oxidativer DNA-Modifikationen und ihrer Reparatur durch spezifische DNA-Reparaturenzyme. Aus diesem Gleichgewicht resultieren ein „steady state“-Spiegel oxidativer Modifikationen in der DNA und proportional hierzu eine entsprechende Anzahl an Mutationen (Abb. 1-1). Die wegen ihres stark mutagenen Potentials und ihrer Häufigkeit wohl wichtigste oxidative DNA-Modifikation ist das 8-Hydroxyguanin (8-oxoG). Die Konzentration von 8-oxoG in der zellulären DNA wird als Biomarker für das Ausmaß an oxidativem Stress in der Zelle herangezogen (Floyd, 1990; Kasai et al., 1993).

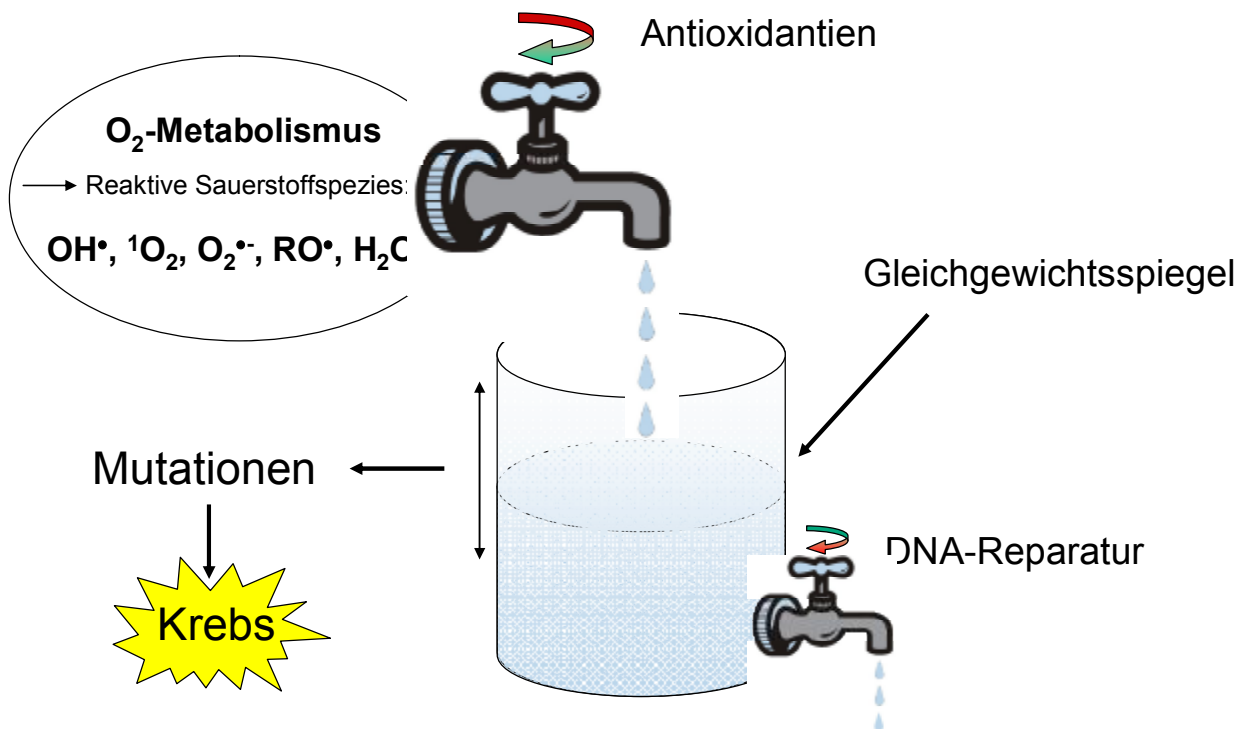


Abb. 1-1: Ursprung und Beeinflussbarkeit der basalen Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Modifikationen in Zellen modifiziert nach B. Epe (Epe, 2002).

Diese Arbeit beschreibt Untersuchungen über die zellulären Mechanismen, die zur Bildung dieser DNA-Schäden führen sowie die biologischen Auswirkungen und im Besonderen die adaptive Antwort der Zellen auf diese Schäden.

2 KENNTNISSTAND

2.1 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress

Sauerstoff (O₂) ist zu 21 % in unserer Atemluft enthalten und wird zur Energiegewinnung in aeroben Organismen benötigt, dabei entstehen endogen in der mitochondrialen Atmungskette durch Reduktion teilweise sehr reaktive Sauerstoffspezies (Abb. 2-1).

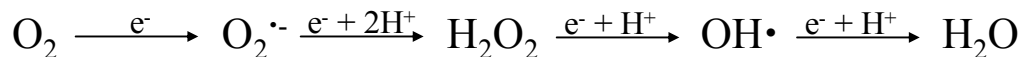


Abb. 2-1: Sequentielle Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser.

Der Begriff „reaktive Sauerstoffspezies“ (reactive oxygen species, ROS) dient als Oberbegriff für verschiedene, meist kurzlebige Sauerstoffradikale wie Hydroxylradikale, Peroxyradikale und Superoxidradikale sowie für Verbindungen mit elektronisch angeregtem Sauerstoff wie Singulett-Sauerstoff und Carbonylverbindungen im Triplett-Zustand (Tabelle 2.1.1-1). Diese sind vermutlich sowohl an Alterungsprozessen und Entzündungsreaktionen (Bauerle et al., 1996; Schulze-Osthoff et al., 1997) als auch an der Signaltransduktion (Giorgio et al., 2005) und der Krebsentstehung (Epe, 2002) beteiligt. Eine vermehrte Bildung oder vermindertes Abfangen dieser reaktiven Sauerstoffspezies wird als oxidativer Stress bezeichnet (Sies, 1986).

Tabelle 2.1.1-1: Biologisch wichtige reaktive Sauerstoffspezies und ihre geschätzte Halbwertszeit nach Sies (Sies, 1993).

Spezies	Halbwertszeit [s]
HO•, Hydroxylradikal	10 ⁻⁹
¹ O ₂ , Singulett-Sauerstoff	10 ⁻⁶
O ₂ ^{•-} , Superoxidanion-Radikal	relativ stabil, enzymatische Dismutation zu H ₂ O ₂ + O ₂
H ₂ O ₂ , Wasserstoffperoxid	stabil, enzymatischer Abbau
RO•, Alkoxyradikal	10 ⁻⁶
ROO•, Peroxylradikal	7
Q•, Semichinonradikal	Tage
NO•, Stickstoffmonoxid	1-10
ONOO ⁻ , Peroxynitrit	0,05-1

Durch die in Abb. 2-1 beschriebene Redoxreaktion wird in der mitochondrialen Atmungskette ATP generiert. Die Reaktion läuft jedoch nur zu 97-99 % vollständig ab, durch ein „Leck“ kann es bei der Elektronenübertragung durch Flavoproteine zur intrazellulären Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies kommen (Joenje, 1989; Halliwell, 1994).

Neben den endogenen Quellen tragen auch exogene Faktoren zu einer Konzentrationserhöhung von reaktivem Sauerstoff bei. Elektromagnetische Strahlung, wie zum Beispiel γ - oder UV-Strahlung, kann, neben den bereits genannten Substanzen (siehe 1), ROS generieren (Davies, 1987; Epe, 1991). Die Bildung kann aber auch gewünscht sein. So kommen in der Krebstherapie mehrfach substituierte Anthrachinone, p-Benzochinone, synthetische Chinone und Benzotriazine zum Einsatz, deren Wirkungsweise ebenfalls darauf beruht, dass sie durch ROS die Tumorzellen schädigen (O'Brien, 1991; Peters et al., 2001).

2.1.1 Superoxidradikale

In der mitochondrialen Atmungskette kommt es durch unvollständige Reduktion von molekularem Sauerstoff zur Bildung von Superoxidradikalen (Balaban et al., 2005) (Abb. 2-2).

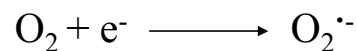


Abb. 2-2: Superoxidradikalentstehung.

Als weitere Quelle neben dem beschriebenen „Leck“ tragen der Arachidonsäuremetabolismus, der Purinabbau durch das Xanthinoxidase-System und der „Respiratory Burst“ (siehe 2.1.5) von Abwehrzellen durch NADPH-Oxidase (siehe 2.1.6) zu der endogenen Bildung von Superoxidradikalen bei. Neue Untersuchungen zeigen, dass auch in nicht phagozytierenden Zellen durch die Nox4 konstitutiv Superoxidradikale gebildet werden (Martyn et al., 2006). Superoxidradikale können unter physiologischen Bedingungen keine direkten DNA-Schäden induzieren. Als milde Oxidantien dismutieren sie spontan zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und molekularem Sauerstoff (O_2) (Abb. 2-3).

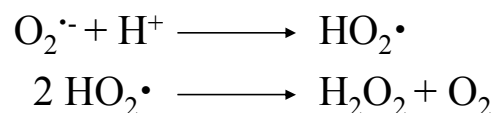


Abb. 2-3: Dismutation von Superoxidradikalen unter physiologischen Bedingungen zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff.

Der eigentlich langsame Ablauf dieser Reaktion (Fridovich, 1986) kann durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) um den Faktor 9 gesteigert werden (Fridovich, 1995; Markant, 1995).

2.1.2 Wasserstoffperoxid

Das bei der Dismutation (siehe Abb. 2-1 und Abb. 2-3) entstehende Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ist ein nicht radikalischer Vertreter der ROS. Es wird zellulär neben der Dismutation auch von spezifischen, peroxisomal lokalisierten Oxidasen, wie der D-Amino-, Harnsäure-, Glykolat- und der Acetyl-CoA-Oxidase, gebildet (Southorn and Powis, 1988a; Gutteridge, 1994). Eine weitere Quelle ist die mitochondriale Generierung von H_2O_2 durch p66^{Shc} , ein Redoxenzym (Giorgio et al., 2005). Wasserstoffperoxid selbst ist eine verhältnismäßig reaktionsträge, schwach polare Verbindung, wodurch es längere Strecken in der Zelle durch Diffusion zurücklegen und Zellmembranen durchdringen kann. In Anwesenheit von Übergangsmetallen (Eisen oder Kupfer) wird es jedoch zu hochreaktiven Hydroxylradikalen ($\text{OH}\cdot$) umgesetzt (Abb. 2-4) (Fenton-Reaktion) (Halliwell and Gutteridge, 1984; Halliwell and Gutteridge, 1990; Halliwell, 1996).

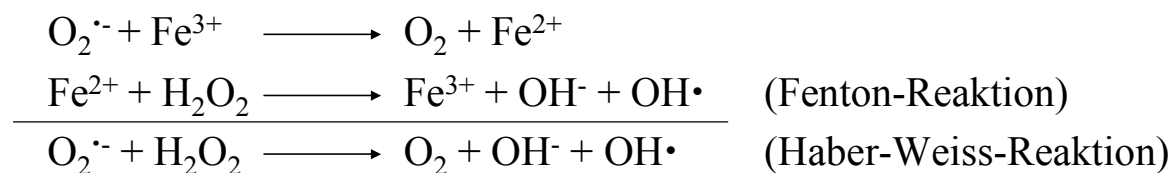


Abb. 2-4: Metallkatalysierte Bildung von Hydroxylradikalen aus Superoxid.

2.1.3 Hydroxylradikale

Das in der Haber-Weiss-Reaktion gebildete Hydroxylradikal (Miller et al., 1990) stellt das reaktionsfreudigste ROS im biologischen System dar und kann mit nahezu allen biologischen Molekülen (Kohlenhydraten, Lipiden, Nukleinsäuren und Proteinen) reagieren. Aufgrund seiner geringen Halbwertszeit unter physiologischen Bedingungen (siehe Tabelle 2.1.1-1) reagiert es jedoch nur mit Molekülen in einem Radius von ca. 2 nm in seiner unmittelbaren Nachbarschaft. Dies entspricht ungefähr der Breite der DNA-Helix (Saran and Bors, 1989). Zur Bildung von Hydroxylradikalen kann es auch durch energiereiche Strahlung kommen (siehe 2.3.2) (Dizdaroglu, 1992b; Dizdaroglu, 1992a; Riley, 1994). Dieser Prozess wird als Radiolyse bezeichnet. Die typischen DNA-Schäden, die durch Hydroxylradikale entstehen, sind Einzel- und Doppelstrangbrüche bzw. der Verlust und die Modifikationen der DNA-Basen, der DNA-Protein-Quervernetzungen sowie Fragmentierung des Zucker-Phosphat-Gerüsts (Halliwell and Aruoma, 1991).

2.1.4 Singulett-Sauerstoff

Der intrazellulär gebildete Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) ist wie H_2O_2 ebenfalls kein Radikal (Epe, 1991). Die Bildung erfolgt entweder durch Belichtung endogener Photosensibilisatoren (Protoporphyrin IX oder Riboflavin) (Epe et al., 1993b) oder in geringerem Umfang als Nebenprodukt enzymatischer Reaktionen (Peroxidasen, Cytochromen oder Lipoxygenasen) (Naqui et al., 1986; Kanofsky, 1989). Durch die Änderung seines Elektronenspins ist er wesentlich reaktiver als molekularer Sauerstoff und besitzt ein starkes oxidierendes Potential (Gutteridge, 1994). Seine Reaktivität ist zwar nicht so hoch wie die von Hydroxylradikalen (Epe, 1996), er kann jedoch aufgrund seiner größeren Halbwertszeit (Tabelle 2.1.1-1) und seiner dadurch resultierenden Reichweite von 1-2 μm (Pryor, 1986) in den Zellkern gelangen und direkt mit DNA-Basen reagieren.

2.1.5 Der „respiratory burst“

ROS besitzen neben ihrer toxischen Eigenschaften auch physiologische Funktionen. So wird durch aktivierte Phagozyten, mit dem als „respiratory burst“ bezeichneten Abwehrmechanismus, von der NADPH-Oxidase die Bildung von Superoxidradikalen aus molekularem Sauerstoff katalysiert. Diese können, wie in Abb. 2-3 und Abb. 2-4 beschrieben, zu Hydroxylradikalen ($\text{OH}\cdot$) oder mittels des Enzyms Myeloperoxidase, ebenfalls über H_2O_2 , zu Hypochloriger Säure (HOCl) umgesetzt werden. Diese drei Produkte dienen der Zelle als potente antimikrobielle Agenzien (Abb. 2-5) (Weiss, 1989; Maly, 1995).

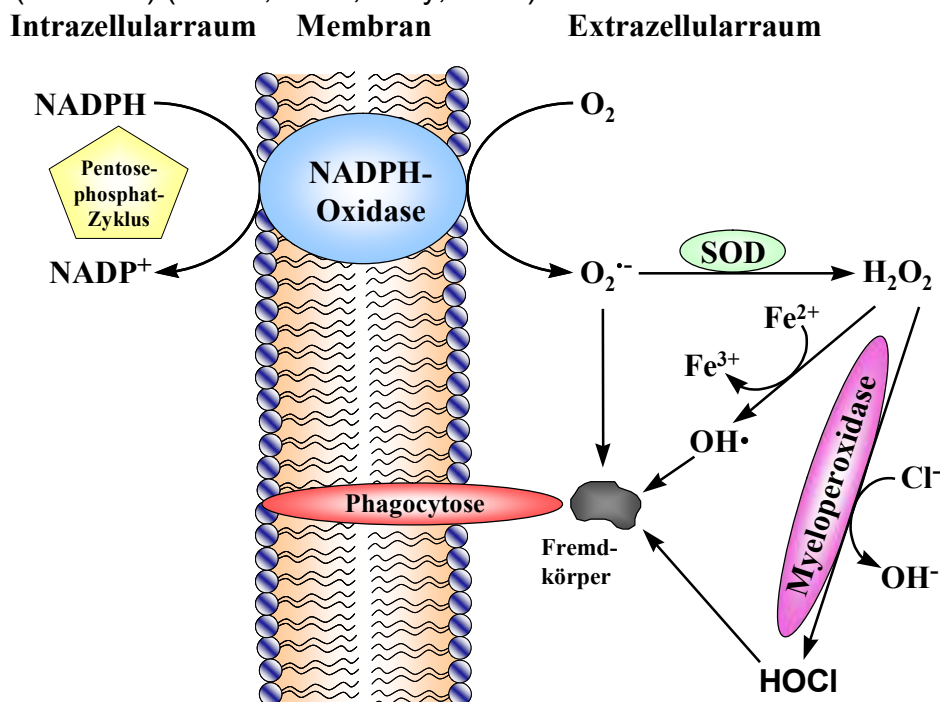


Abb. 2-5: Schematische Darstellung des „respiratory burst“ zur bakteriellen Abwehr modifiziert nach Markant (Markant, 1995).

2.1.6 Endogene Bildung von ROS im Fremdstoffmetabolismus

Eine weitere endogene Quelle für ROS ist, wie bereits erwähnt (siehe 2.1.1), das Cytochrom P450-System, welches bei der Fremdstoffmetabolisierung eine entscheidende Rolle spielt. Die Aufgabe des mit CYP 450 abgekürzten, mikrosomalen (im glatten endoplasmatischen Retikulum (ER) befindlichen) Systems besteht darin, in der Phase I Reaktion molekularen Sauerstoff in eine reaktive Form zu überführen, diesen in die Substrate einzubauen und sie dadurch für Phase II Reaktionen (Konjugationen mit Glukuronsäure oder Sulfatierung), die zur renalen Eliminierung notwendig sind, zugänglich zu machen. Das System benötigt dafür Cytochrom P450 und NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase (Reduktase, Cytochromreduktase), bestehend aus dem Coenzym NADPH und dem Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) enthaltenden Flavoprotein (Fp). Es existiert eine ganze Familie von Isoenzymen von Cytochrom P450, die sich in ihrer Substratspezifität unterscheiden, aber zusammen einen breiten Bereich zur Fremdstoffmonooxygenierung abdecken. Die Reduktase gehört zu den Flavoproteinen und überträgt in zwei Einelektronenschritten zwei Elektronen von NADPH auf das Cytochrom P450 (Abb. 2-7). Dieses monooxygeniert den Fremdstoff mit Hilfe zweier Protonen und molekularem Sauerstoff, wiederum in zwei Einelektronenschritten, unter Abspaltung von Wasser (Abb. 2-6).

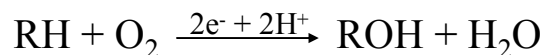


Abb. 2-6: Bruttogleichung der Phase I Reaktion durch das Cytochrom P450-System.

Wenn diese Einelektronenschritte ein Leck (uncoupling) in der Transportkette aufweisen, können durch diese beiden Enzyme jedoch auch ROS als Nebenprodukte des Fremdstoffmetabolismus generiert werden. Um den Elektronenfluss in Form von Reduktionsäquivalenten zu gewährleisten, müssen sich Cytochrom und Reduktase in unmittelbarer Nachbarschaft in der Membran des ER befinden. Die Reduktase kann, da alle Cytochrome nur Einelektronenakzeptoren sind, die zur vollständigen Substratoxidation nötigen Elektronen nur nacheinander auf das Cytochrom übertragen. Der Transfer zweier Elektronen in Folge auf molekularen Sauerstoff und die anschließende Monooxygenierung des Substrates, erfolgt wie in Abb. 2-7 dargestellt.

Von einem entkoppelten Elektronentransfer (uncoupling, „Leck“) spricht man, wenn das zweite Elektron nicht auf den Sauerstoff übertragen wird, sondern dieser, nach Übertragung von nur einem Elektron, als Superoxidradikalanion aus dem Enzymkomplex entlassen wird (Schenkman and Jansson, 2003). Das so gebildete Superoxidradikal kann dann durch die Protonen von $\text{NADPH} + \text{H}^+$ aus dem

Enzymkomplex zu Wasserstoffperoxid reduziert (siehe 2.1.2) und über die Fentonreaktion (Abb. 2-4) in Hydroxylradikale umgesetzt werden.

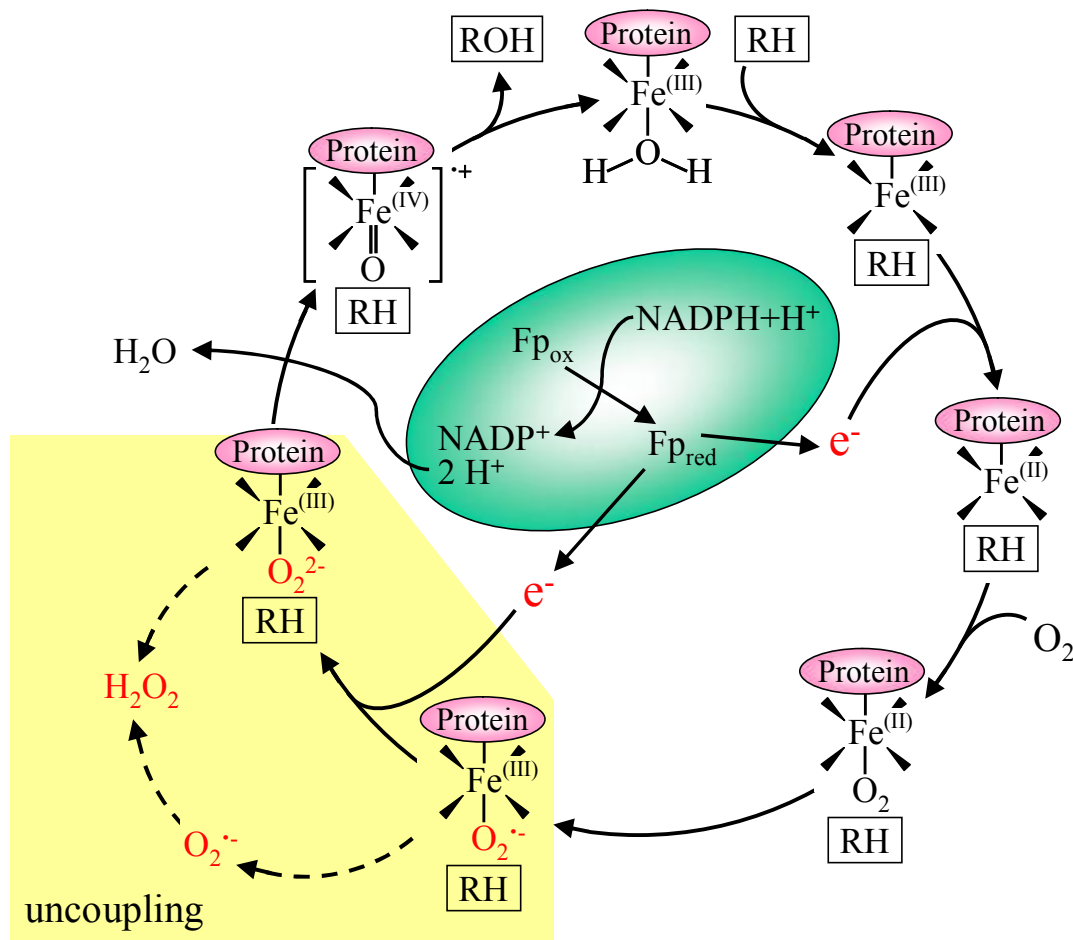


Abb. 2-7: Fremdstoffmonoxygenierung durch das Cytochrom P450-System.

Der Elektronentransfer erfolgt von der Cytochromreduktase (grün) auf ein beliebiges Cytochrom P450 (rosa) zur Reduktion molekularen Sauerstoffs und anschließender Substratmonoxygenierung. Erfolgt der Transfer des zweiten Elektrons nicht schnell genug, wird Superoxid freigesetzt (hellgelb markiert). Fe = Häm-Eisen im katalytischen Zentrum, Fp = Flavoprotein (Teil der NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase); RH = Substrat, ROH = monoxygeniertes Produkt.

2.1.7 Antioxidative Abwehrmechanismen

Neben der Reparatur der durch ROS verursachten Modifikationen (siehe 2.4) hat die Zelle die Möglichkeit, deren Entstehung durch Abwehrmechanismen zu verhindern. Zu dieser antioxidativen Abwehr gehören neben Glutathion (GSH) auch Enzyme wie Glutathion-Peroxidase, Katalase und Superoxiddismutase (Sies, 1989). Die Funktion der SOD wurde unter 2.1.1 beschrieben. Glutathion-Peroxidase kann, wie Katalase, H₂O₂ mit Hilfe von Glutathion als Cofaktor zu Wasser reduzieren. Eine weitere Quelle für antioxidativ wirkende Substanzen (Vitamin C und E, Carotinoide, Mineralstoffe (Mangan, Selen, Zink) und Flavonoide) ist die Nahrungsaufnahme.

Nach der Gabe von Vitamin C kommt es zu einem Absinken der Anzahl oxidativer DNA-Modifikationen in vivo (Collins, 1999; Halliwell, 2001; Murugesan et al., 2005). Die Schutzwirkung mancher zusätzlich aufgenommener Antioxidantien ist allerdings nicht unumstritten. So ist zum Beispiel die tumorpromovierende Wirkung von β -Carotin bei Rauchern mittlerweile in Studien belegt worden (Diplock, 2000).

2.2 Biologische Effekte von oxidativem Stress

Die intrazelluläre Oxidation von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren durch reaktive Sauerstoffspezies spielt, auch wenn die Auswirkungen bisher schwer einzuschätzen sind, ohne Zweifel eine Rolle bei degenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson (Dix and Aikens, 1993), Arteriosklerose und Krebs sowie beim Alterungsprozess (Ames et al., 1993; Halliwell, 1994). Neben den oben genannten reaktiven Sauerstoffspezies entstehen vor allem bei der Lipidperoxidation (Schieberle and Grosch, 1981; Chan, 1987) in aeroben Zellen auch organische Sauerstoffverbindungen wie Alkoxy- ($\text{RO}\cdot$), Hydroperoxyradikale ($\text{ROO}\cdot$), Hydroperoxide (ROOH) und α - β -ungesättigte Carbonylverbindungen. Diese Produkte können ebenfalls direkt die DNA angreifen oder mit ihr wie im Falle der α - β -ungesättigten Carbonylverbindungen Ethenoaddukten bilden (Bartsch and Nair, 2000).

Die durch ROS induzierten DNA-Schäden sind für die Bedeutung von oxidativem Stress bei der Kanzerogenese von besonderem Interesse, wobei modifizierte (oxidierte) DNA-Basen (siehe 2.2.1) den Hauptanteil der DNA-Schäden ausmachen (Sies, 1991). Weiterhin führen ungefähr 20 % aller Angriffe von Hydroxylradikalen an der DNA zu Schäden am Zucker-Phosphat-Gerüst (Halliwell and Aruoma, 1991), wodurch DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie alkalilabile Stellen, die zum Verlust der Base führen (AP-Läsion), resultieren. Derartige DNA-Schäden wurden sowohl für ionisierende Strahlung (von Sonntag, 1987) als auch nach Einwirkung von Wasserstoffperoxid (Demple et al., 1986) beschrieben.

2.2.1 Oxidative DNA-Modifikationen

Die in 2.1 vorgestellten ROS können direkt mit der DNA reagieren und so zu Basenmodifikationen, Einzel- und Doppelstrangbrüchen (Epe et al., 1988), basenfreien Stellen (AP-Läsionen, apurinischen oder apyrimidinischen Stellen) sowie Vernetzungen (cross-links) zwischen zwei DNA-Basen (Epe, 1996) oder DNA-Base und Protein-Molekül (Halliwell and Aruoma, 1991; Wallace, 2002) führen. Einige der inzwischen mehr als 100 identifizierten unterschiedlichen Modifikationen (von Sonntag, 1987; Dizdaroglu, 1992b) sind in Abb. 2-8 dargestellt.

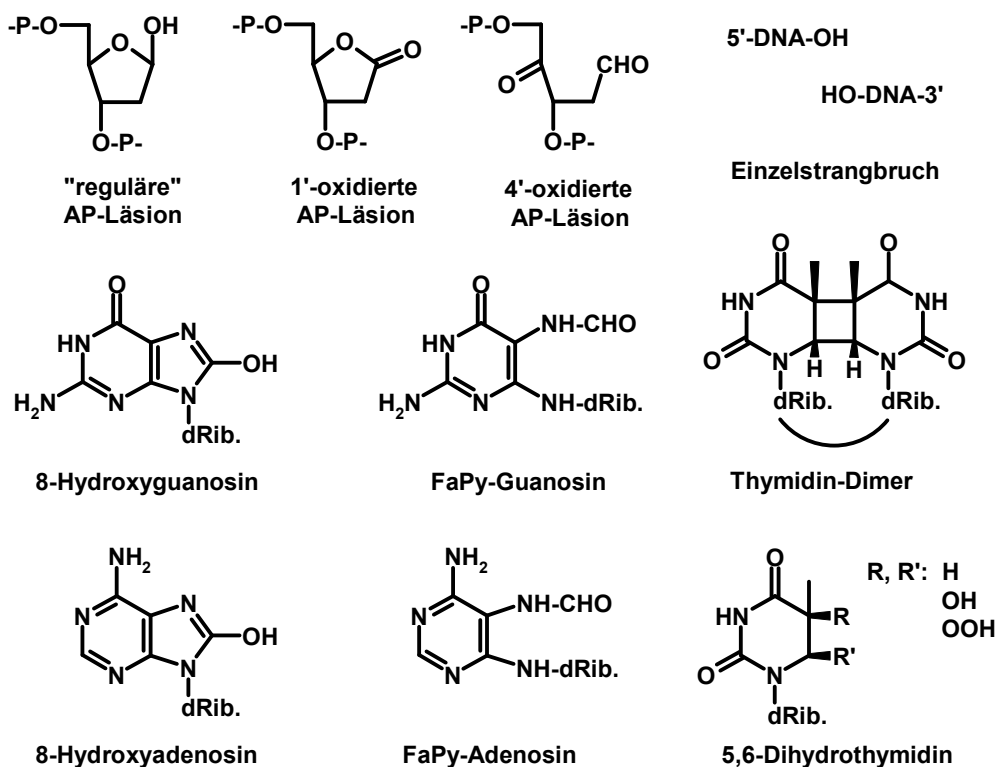


Abb. 2-8: DNA-Basenmodifikationen.

Die Keto-Formen der DNA-Basen sind jeweils das stabilere Tautomer; die Basen liegen also überwiegend in der Keto-Form in der DNA vor. Das Oxidationsprodukt der Purinbase Guanin, das 8-Hydroxyguanin (7,8-Dihydro-8-oxoguanin, 8-oxoG), wird dabei als die bedeutendste aller DNA-Modifikationen betrachtet, was zum einem an seiner relativen Häufigkeit und zum anderen in seiner vergleichsweise hohen prämutagenen Wirkung liegt. Die große Häufigkeit dieser Modifikation erklärt sich daraus, dass Guanin das niedrigste Oxidationspotential aller DNA-Basen hat und damit am leichtesten oxidiert werden kann (Huttermann, 1982). Es wird durch den Angriff von Hydroxylradikalen an Position 8 des Guanins gebildet und kann entweder durch Öffnung des Imidazolrings oder durch Reduktion zu 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FaPy-Guanin) modifiziert werden (Dizdaroglu et al., 1993; Cadet et al., 2000). Analog, jedoch mit viel geringerer Häufigkeit, verläuft die Oxidation von Adenin.

Auch die Pyrimidinbasen (Cytosin und Thymin) werden, wenn auch in noch geringerem Ausmaß, oxidativ modifiziert. Hierbei entstehen neben verschiedenen 5,6-Dihydropyrimidin-Derivaten, wie Glykole und Hydrate, deren Fragmentierungsprodukte (Halliwell and Aruoma, 1991).

Zu weiteren DNA-Modifikationen, wie AP-Läsionen oder Einzel- bzw. Doppelstrangbrüchen (von Sonntag, 1987; Halliwell and Aruoma, 1991), kommt es durch Abstraktion von Wasserstoff an den Desoxyriboseresten sowie durch

radikalischen Angriff an Position 1, 2 oder 4 des Zuckers (Epe, 1996) oder durch spontane Depurinierung (Lindahl, 1993).

DNA-Protein-Quervernetzungen können sich zwischen DNA-Basen und Aminosäuren ausbilden. So kommt es in Gegenwart von Sauerstoff oder nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid in Anwesenheit von Fe(III) oder Cu(II) zu Thymin-Tyrosin-Verbindungen (Nackerdien et al., 1991).

2.2.2 Oxidation von Lipiden und Proteinen

Neben den oben genannten Modifikationen der DNA können ROS auch mit Lipiden oder Proteinen reagieren und diese in reaktive Verbindungen überführen. Die Lipidperoxidation ist die radikalische Oxidation von ungesättigten Fettsäuren. Sie führt zu reaktiven Metaboliten, wie z. B. Malondialdehyden oder Radikalen, welche entweder im Stande sind, die Phospholipide der Zellmembran anzugreifen (Esterbauer et al., 1992; Cadet et al., 2003), was zum Untergang der Zelle führen kann, oder die DNA zu modifizieren (Marnett, 2000). Bei der Proteinoxidation wird durch den Angriff reaktiver Sauerstoffspezies die Tertiärstruktur verändert oder zerstört, was zu einem Verlust der Enzymaktivität führen (Andrae, 2003; Klotz et al., 2003) und damit die Entstehung von Tumoren begünstigen kann (Graziewicz et al., 2002).

2.2.3 Konsequenzen oxidativer DNA-Modifikationen

Der in den voran gegangenen Kapiteln 2.2.1 und 2.2.2 vorgestellte biologische Effekt der DNA-Schädigung durch ROS kann grundsätzlich drei verschiedene Auswirkungen haben. Erstens, der DNA-Schaden wird unter Aufrechterhalten der DNA Integrität durch DNA-Reparatur (siehe 2.4) vollständig und fehlerfrei entfernt. Zweitens, der DNA-Schaden ist so schwerwiegend, dass er durch die Reparaturmechanismen unzureichend oder gar nicht repariert werden kann. Es kommt zu einer Transkriptions- bzw. Replikations-Blockade und dadurch zum Absterben der Zelle durch Apoptose oder Nekrose. Apoptose ist ein programmierter Selbstmord der unter Energieverbrauch abläuft. Nekrose hingegen stellt einen unkontrollierten Vorgang dar, der mit Entzündungserscheinungen des umliegenden Gewebes einhergeht (Murphy, 1999; Jin and El-Deiry, 2005). Drittens, der Fehler bleibt unerkannt, dies kann bei der nächsten Replikation der DNA zu einer Mutation führen. Eine Mutation kann nach dem Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese (Neumann, 1992) einen Schritt auf dem Weg zur malignen Entartung der Zelle darstellen und hat damit grundsätzlich tumorinitiierendes Potential (siehe 2.4.7). Die Konsequenzen der verschiedenen durch ROS induzierten DNA-Modifikationen, insbesondere für die Tumorentstehung, werden im Folgenden erläutert.

Die am häufigsten vorkommende DNA-Modifikation ist das **8-Hydroxyguanin** (8-oxoG) (siehe 2.2.1). Es kann durch Reaktion der DNA mit Hydroxylradikalen, Singulett-Sauerstoff, angeregten Photosensibilisatoren, wie auch Ro19-8022 (siehe 2.3.3), und anderen Spezies erzeugt werden (Epe, 1996; Will et al., 1999). Sein prämutagenes Potential beruht auf der Paarung mit Adenin während der Replikation (Shibutani et al., 1991; Tchou and Grollman, 1993). So kommt es in 90 % der Fälle (Sunaga et al., 2001) zu G:C→T:A Transversionen in Bakterien und Säugerzellen (Wood et al., 1990; Klein et al., 1992; Chen et al., 1998; Kuipers et al., 1999). Quantitative Untersuchungen in Säugerzellen zur Mutationsfrequenz haben, nach Einbringung eines Vektors mit einem 8-oxoG tragenden Einzelstrang, eine Mutationshäufigkeit von 2,5 % bis 4,8 % ergeben (Moriya, 1993). Die in vivo jedoch deutlich niedrige Mutagenität kann mit der Effizienz der vorhandenen Reparaturmechanismen für 8-oxoG erklärt werden (siehe 2.4), im Vergleich zur Mutagenität anderer DNA-Modifikationen ist sie jedoch hoch (Nakabeppu et al., 2004; Kalam et al., 2006; Nakabeppu et al., 2006). Nach Oxidation von dGTP zu 8-oxo-dGTP im Nukleotidpool kann dies außerdem als Substrat für Polymerasen dienen und in die DNA gegenüber von Adenin eingebaut werden, was zu G:C→A:T Transitionen führt.

Formamidopyrimidine, wie FaPy-Guanin und FaPy-Adenin, besitzen kein mutagenes Potential, sondern führen durch eine Blockade der Polymerase I zum Stopp der Replikation (O'Connor et al., 1988; Laval, 1996). Sie sind somit zytotoxisch (Tudek et al., 1992; Tudek, 2003).

Pyrimidindimere stören als "bulky-lesions" die dreidimensionale Struktur der DNA, sie werden als nicht-codierende Modifikation angesehen und stören sowohl die Replikation als auch die Transkription (Witkin, 1976; Chan, 1987; Borden et al., 2002). Eine T→C Substitution durch Pyrimidindimere konnten mit Hilfe von Shuttle-Vektor-Experimenten in Säugerzellen nachgewiesen werden (Gentil et al., 1996; Gentil et al., 2000).

5,6-Dihydrocytosin-Derivate, wie z. B. 5-Hydroxycytosin, haben eine erhöhte Neigung zu spontanen Depurinierung (O'Donnell et al., 1994). Dies kann mitunter zu einem vermehrten Auftreten von G:C→A:T Transitionen beitragen (Burney et al., 1999), die auch als Folge der spontanen Methylierungen und Deaminierung von Cytosin zu Thymin resultieren.

Eine weitere wichtige Rolle bei der Mutagenese spielen **AP-Läsionen** (Epe, 1996; Yu et al., 2003). Diese Modifikationen können durch enzymatische oder spontane Hydrolyse in Einzelstrangbrüchen überführt werden (Burney et al., 1999). AP-Läsionen können aber auch zu einer Transkriptions- bzw. Replikations-Blockade führen (Yu et al., 2003) oder Basenfehlpaarung während der Replikation verursachen. Gegenüber einer AP-Läsion wird in Säugerzellen überwiegend Guanin

eingebaut (Klinedinst and Drinkwater, 1992; Neto et al., 1992), während in Bakterien mit induzierter SOS-Antwort überwiegend Adenin eingebaut wird (Loeb and Preston, 1986; Lawrence et al., 1990). In beiden Fällen können AP-Läsionen zu Basenaustauschmutationen führen.

Durch ROS induzierte **Einzelstrangbrüche** werden in einem zweiphasigen Prozess (siehe 2.4.6) sehr schnell repariert (Churchill et al., 1991; Flohr et al., 2003). Dabei stehen nach neueren Erkenntnissen zwei Möglichkeiten zur Verfügung (Caldecott, 2001; Caldecott, 2003). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch Einzelstrangbrüche ein mutagenes Potential besitzen (Epe, 1996).

Doppelstrangbrüche können sowohl große Deletionen als auch Chromosomenaberrationen verursachen. Sind werden als zytotoxisch und mutagen eingestuft.

2.3 Experimentelle Generierung von DNA-Schäden

2.3.1 TPZ

Tirapazamin (TPZ) (Siim et al., 2004) ist ein DNA-schädigendes Zytostatikum, welches derzeit in klinischen Studien (Phase 2 und 3) eingesetzt wird. Es wird bevorzugt in hypoxischen Geweben aktiviert und hat damit eine hohe Selektivität für solide Tumoren. Zellen dieses Gewebes sind relativ resistent gegenüber einer Strahlentherapie sowie den meisten Zytostatika. Da die Kenntnisse der Bioselektivität und des DNA-schädigende Mechanismus für die Weiter- und Neuentwicklung von Zytostatika in der Chemotherapie eine wichtige Voraussetzung ist, lag es nahe, die Ursachen der beobachteten selektiven Apoptose der Tumorzellen und anderer metabolisch hochaktiven Zellen eines mit Tirapazamin behandelten Organismus zu untersuchen. In Abb. 2-9 ist neben der Strukturformel die mit einer quantenmechanischen Methode nach dem Hartree-Fock Molecular Orbital Model in der Software Spartan'04 berechnete Ladungsverteilung von Tirapazamin dargestellt.

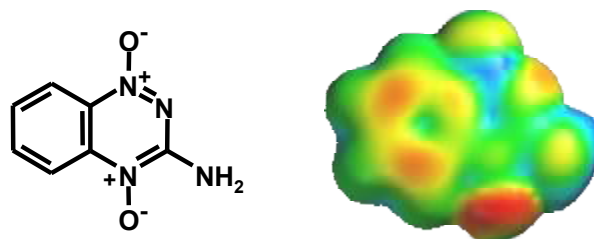


Abb. 2-9: Strukturformel und Ladungsverteilung der energieminierten Form von Tirapazamin
Die Berechnung erfolgte nach dem Hartree-Fock Molecular Orbital Model mit der Software Spartan'04.

Schwesterchromatidaustauschen (SCE) beobachtet werden (Bradley and Erickson, 1981; Chadwick and Leenhouts, 1986; van Loon et al., 1991; Rueff et al., 1993; Friedberg et al., 1995b). Durch ionisierende Strahlen werden aber auch AP-Läsionen und oxidierte DNA-Basen gebildet (Epe et al., 1993c; Pflaum, 1996).

Der direkte Effekt von ionisierenden Strahlen beruht auf der Energie der γ -Strahlen, die direkt auf DNA-Basen oder Zucker wirkt. Er führt sowohl zu Einzel- als auch zu Doppelstrang- Brüchen sowie zu Oxidation und Querverknüpfung von DNA-Basen (crosslinks) (Abb. 2-11).

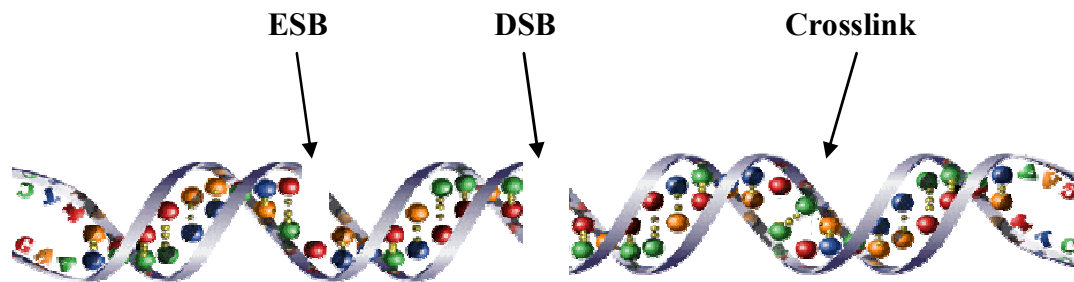


Abb. 2-11: Einzelstrangbrüche (ESB), Doppelstrangbrüche (DSB) und DNA-Crosslinks.

Der Hauptmechanismus der DNA-Schädigung verläuft jedoch indirekt über eine homolytische Spaltung bzw. Ionisation von intrazellulärem Wasser (Abb. 2-12), der so genannten Radiolyse. Als Hauptbestandteil aller biologischen Systeme kann Wasser mehr als 80 % der Energie von einfallender Strahlung absorbieren (Kiefer, 1989; Friedberg et al., 1995b).

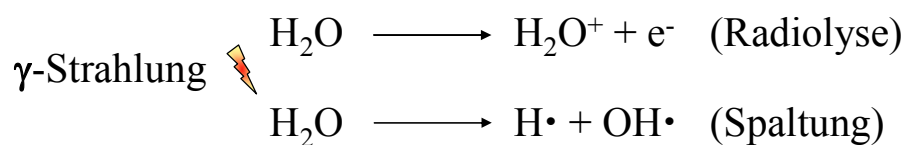


Abb. 2-12: Ionisation und Spaltung von intrazellulärem Wasser.

In Folgereaktionen (Abb. 2-13) sowie durch direkte Spaltung kann es zur Bildung der bereits beschrieben (siehe 2.1) ROS kommen.

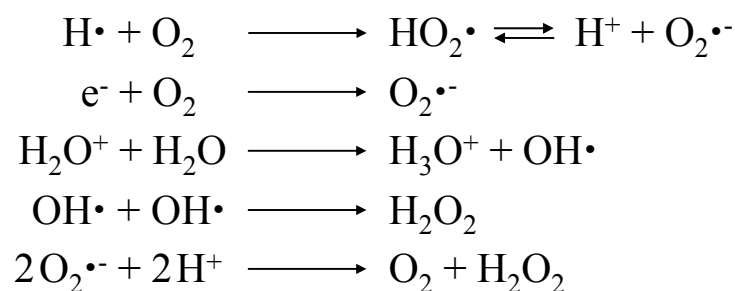


Abb. 2-13: Folgereaktionen der Radiolyse und Spaltung.

Die DNA-schädigende Wirkung beruht damit im großen Maß auf Hydroxylradikalbildung. Dies wird auch durch das Schadensprofil von γ -Strahlung deutlich (Dizdaroglu, 1992b; Dizdaroglu, 1992a). So überwiegen die vom Hydroxylradikal gebildeten oxidativen Modifikationen (Abb. 2-15) wie 8-oxoG und FaPy-Guanin (siehe 2.2.3 und Abb. 2-8).

Die große Anzahl an DBS kann jedoch nicht alleine durch die Hydroxylradikale erklärt werden. So kommt es bei anderen Hydroxylradikalquellen, wie z. B. H_2O_2 mit Eisenionen, nicht zu diesem Effekt (Ward et al., 1987). Jedoch werden durch γ -Strahlen intrazellulär auf sehr kleinen Raum eine größere Menge an Hydroxylradikalen aus Wasser gebildet, woraus dann Doppelstrangbrüche resultieren (Kiefer, 1989; Friedberg et al., 1995b). Dies hat auch zur Folge, dass nicht nur Einzel- oder Doppelstrangbrüche vermehrt entstehen, sondern es kommt auch zu einer benachbarten Häufung von DNA-Schäden, so genannten „clustered lesions“ (Sutherland et al., 2001; Terato and Ide, 2004).

Es kann weiterhin zu einer DNA-Protein-Quervernetzungen wie bei der Behandlung mit H_2O_2 kommen (siehe 2.2).

2.3.3 Ro19-8022

Die Substanz Ro19-8022 ist eine im Rahmen der Entwicklung neuer Tranquilantien von der Firma Hoffmann-La Roche synthetisierte, stark gelb fluoreszierende, polare Verbindung mit dem systematischen Namen [R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl)carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol] (Abb. 2-14).

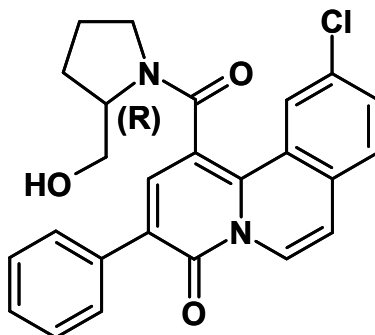
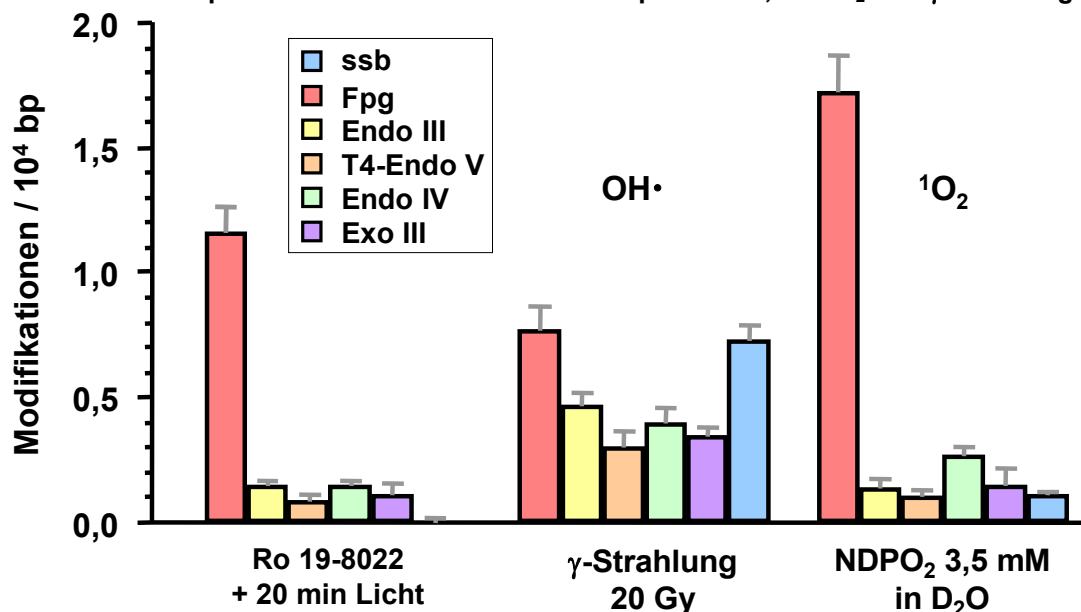


Abb. 2-14: Strukturformel von Ro19-8022.

Die Substanz erwies sich im Ames-Test in Kombination mit sichtbarem Licht als mutagen. Zellfreie Untersuchungen an Bakteriophagen-DNA (PM2-DNA) zeigten, dass die Verbindung bei Bestrahlung ein für Singulett-Sauerstoff (1O_2) typisches Schadensprofil an der eingesetzten DNA generiert (Abb. 2-15) (Epe and Hegler, 1994; Will, 1995). Die DNA-Schäden werden nur in Anwesenheit von sichtbarem Licht generiert, folglich ist Ro19-8022 eine photosensibilisierende Verbindung

(Absorptionsmaxima 425, 315 und 250 nm) (Will, 1995). Bei zellfreier Schädigung durch Ro19-8022 mit sichtbarem Licht generierte Fpg-sensitive Basenmodifikationen in Plasmid-DNA bestehen nach Untersuchungen von Will, welche dieser im Jahre 1999 durchführte, zu ca. 75 % aus 8-oxoG. Sie verursachen bei Replikation in *E. coli* Mutationen, die zu etwa 50 % auf 8-oxoG zurückgeführt werden konnten (Will, 1999). Auch das Schadensspektrum, nach Behandlung mit Ro19-8022 plus Licht in AS52 Zellen, wird von Fpg-sensitiven Modifikationen dominiert und ähnelt stark dem Spektrum bei zellfreier Schädigung (Will, 1995). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Ro19-8022 mit Bestrahlung in Säugerzellen mutagen ist und Mikrokerne induziert (Will et al., 1999).

Abb. 2-15: Schadensprofil in PM2-DNA von Ro19-8022 plus Licht, NDPO₂ und γ -Strahlung.



Die Balken der zellfreien Schadensprofile in PM2-DNA, von 50 μ M Ro19-8022 plus Licht (225 kJ/m²), NDPO₂ (Singulett-Sauerstoff-Quelle) und γ -Strahlung (Hydroxylradikalquelle), geben jeweils die Zahl der von verschiedenen Reparaturenendonukleasen erkannten DNA-Modifikationen (Tabelle 2.4.2-1) bzw. die Einzelstrangbrüche (SSB) an. Die Quantifizierung erfolgte mit einem DNA-Relaxationsassay (Will, 1995).

Untersuchungen zur Zytotoxizität mit Hilfe von Proliferationstests (siehe 4.2.8) von I. Eckert und L. Weidenfeller haben ergeben, dass Ro19-8022 in Konzentrationen bis 50 nM nicht zytotoxisch auf immortalisierte embryonale Wildtyp-Mausfibroblasten wirkt. Eine gleichzeitige Bestrahlung mit sichtbarem Licht (166 J/m²) hatte dabei keinen Einfluss auf die Überlebensrate, jedoch wurden gegenüber unbestrahlten Zellen ca. 0,4-0,5 Fpg-sensitive DNA-Modifikationen pro 10⁶ bp zusätzlich in den Zellen generiert. Da in dieser Arbeit jedoch Konzentrationen bis 200 nM verwendet wurden, wurde dies erneut sowohl für MEFs als auch für die verwendeten MCF7 und FB2-299 Zelllinien überprüft (siehe 5.1.1).

2.3.4 MMS

Methylmethansulfonat (MMS) (Abb. 2-16) ist eine bekannte, direkt DNA-alkylierende Verbindung, die als Standardreagenz zur Strangbruchbildung eingesetzt wird (Pfuhrer and Wolf, 1996; Speit et al., 1999). Als Elektrophil alkyliert MMS über einen S_N2-Mechanismus bevorzugt Guanin an Position N-7. In der DNA wird das so modifizierte Guanosin durch Hydrolyse zum 7-Methylguanin und dem Halbacetal des Zuckers gespalten. Die so entstandene AP-Läsion wird unter β-Eliminierung spontan oder enzymatisch in einen Einzelstrangbruch (SSB) überführt.

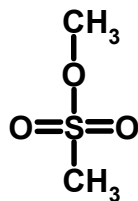


Abb. 2-16: Strukturformel von Methylmethansulfonat (MMS).

2.3.5 UVB

UV-Strahlung stellt eine weitere exogene Quelle zur Erzeugung ROS, aber auch zur direkten Schädigung der DNA, dar. Die in dieser Arbeit verwendete UVB-Strahlung (280-320 nm) führt direkt durch Anregung der DNA (Absorptionsmaximum der DNA-Basen ca. 260-265 nm) zu DNA-Modifikationen. Vorherrschende Produkte sind dabei Cyclobutanpyrimidindimere (CPD) (Mitchell et al., 1991), die durch [2+2]-Cycloaddition der photochemisch reaktiven 5,6-Doppelbindung benachbarter Pyrimidinbasen entstehen (Friedberg et al., 1995a) und Pyrimidin-(6-4)-Photoprodukte (Lippke et al., 1981; Sancar and Rupp, 1983). Nur nach hohen Dosen UVB wurden auch oxidative DNA-Modifikationen beobachtet, bei denen es sich teilweise um 8-oxoG handelte (Beehler et al., 1992; Budiyanto et al., 2002).

2.4 DNA-Reparaturmechanismen

Dass Mutationen für die Artenvielfalt auf der Erde mitverantwortlich sind, ist seit der Veröffentlichung der Evolutionslehre bekannt (Darwin, 1859). Obwohl die Mutationen die Dynamik der Evolution ausmachen, ist nur in den selteneren Fällen mit einer Veränderung im Genom ein Vorteil für das Individuum zu erwarten (nur ca. 0,001 % aller Mutationen sind positiv) (Wikipedia, 2006). In der Regel führen sie zu Funktionsverlusten, die Zelltod, aber auch maligne Entartung bewirken können. Pro- und eukaryotische Zellen haben so im Verlauf der Evolution ausgefeilte

Verteidigungsmechanismen zur Bewahrung der Integrität des Genoms entwickelt. Diese Reparaturmechanismen sind infolge der Bedeutung für die Mutagenese und Krankheitsentstehung Ziel intensiver Forschung. So wurden bereits mehr als 130 verschiedene Gene des Menschen, die an Reparaturvorgängen beteiligt sind, identifiziert (Lindahl and Wood, 1999; Wood, 1999). Um die komplexen Vorgänge zu verstehen, wird oft von einfachen Organismen wie dem Prokaryoten *E. coli* oder Hefen ausgegangen, um dann eine Homologiesuche in eukaryotischen Organismen anzuschließen. Einige wurden auch bei der Erforschung der Ursachen von Krankheiten des Menschen entdeckt (Yu et al., 1999; Ronen and Glickman, 2001). DNA-Reparaturmechanismen kann man nach heutigem Kenntnisstand (Demple and Harrison, 1994; Friedberg, 1996; Kaina, 1997) grob in die folgenden Gruppen einteilen:

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

Jedoch sind nach wie vor viele Bereiche dieser komplexen Reparaturmechanismen weitgehend unverstanden. Die genannten DNA-Reparaturmechanismen werden in den folgenden Kapiteln näher betrachtet.

2.4.1 Direkte Reparatur (Schadensreversion)

Die relativ seltene, direkte Reversion von DNA-Schäden spielt nach heutigem Kenntnisstand nur bei der Reparatur von alkylierten Basen, durch UV induzierten Pyrimidindimeren und bei der direkten Ligation von Einzelstrangbrüchen eine Rolle (Friedberg et al., 1995a). Die direkte Reparatur von alkylierten Basen erfolgt in menschlichen Zellen durch eine O⁶-Alkylguaninalkyltransferase (Vaughan et al., 1993). Dieses Enzym repariert durch Übertragung der Methylgruppe auf die enzymeigenen Cysteinreste spezifisch O⁶-Methylguanin, welches dabei jedoch irreversibel inaktiviert wird (Pegg, 2000). Die Methylgruppen aus 1-Methyladenin und 3-Methylcytosin können durch DNA-Dioxygenase (ABH2 und ABH3 (human) oder AlkB (*E. coli*)) katalysierte Reaktionen wieder entfernt werden (Duncan et al., 2002; Sedgwick et al., 2006). Ob dabei oxidierte DNA-Modifikationen entstehen, ist umstritten (Ringvoll et al., 2006). Eine weitere Möglichkeit der direkten Reversion kommt in Bakterien, Pflanzen und einigen Säugern, nicht jedoch in Menschen, vor. So können Pyrimidindimere durch photoreaktivierende Enzyme (DNA-Photolyasen) lichtabhängig wieder in zwei Pyrimidinnukleotide umwandelt werden (Sinha and Hader, 2002). Durch γ -Strahlung erzeugte Einzelstrangbrüche, die eine 3'-Hydroxylgruppe und eine freie 5'-Phosphatgruppe besitzen, können in *E. coli* und

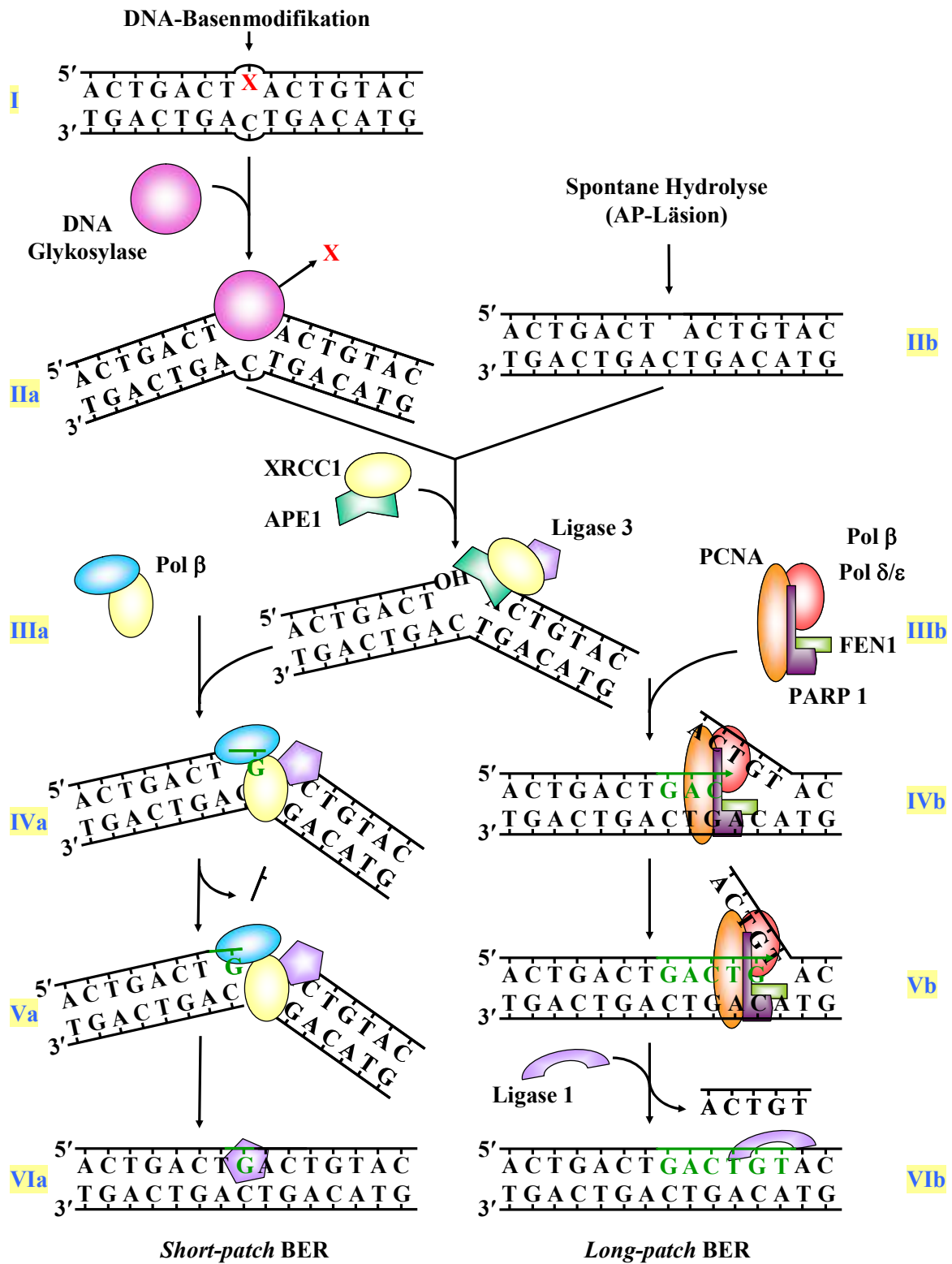
möglicherweise auch anderen Organismen direkt durch eine NAD- und Mg^{2+} -abhängige DNA-Ligase geschlossen werden (Jacobs et al., 1972).

2.4.2 Basen-Exzisions-Reparatur (BER)

Substrate der Basen-Exzisions-Reparatur (BER) sind außer alkylierten oder deaminierten Basen auch durch ROS oder ionisierende Strahlung bedingte oxidierte, reduzierte oder fragmentierte Nukleotide (Krokan et al., 2000). Alle diese Basenmodifikationen führen nicht zu einer gravierenden Veränderung (Distorsionen, siehe 2.4.3) der DNA-Helix-Struktur, was die Prozessierung durch die an der BER beteiligten Enzyme ermöglicht. Im ersten Schritt der BER (Krokan et al., 1997; Lindahl and Wood, 1999; Gros et al., 2002) bindet eine substratspezifische DNA-Glykosylase (Abb. 2-17, I und IIa) an das modifizierte Nukleotid und hydrolysiert die N-glykosidische Bindung zwischen Desoxyribose und modifizierter Base. Es gibt mono- und bifunktionelle Glykosylasen; bifunktionelle Glykosylasen können zusätzlich über eine AP-Lyasefunktion die Phosphodiesterbindung in 3'-Position des ursprünglichen DNA-Schadens spalten (Scharer and Jiricny, 2001). Bei monofunktionellen Glykosylasen resultiert nach dem Einschnitt durch die von XRCC1 aktivierte AP-Endonuklease (Ape1) (Masuda et al., 1998; Vidal et al., 2001a; Demple and Sung, 2005) ein 3'-OH- und ein 5'-Desoxyribosephosphat-Rest (dRP). Für den Fall, dass die zuvor aktive Glykosylase bifunktionell war, ist das Produkt nach dem Ape1-Einschnitt eine Leerstelle ohne Nukleotid mit einem 3'-OH und einem 5'-Phosphatrest. Durch spontane Hydrolyse entstandene AP-Läsionen (Abb. 2-17, IIb) können ebenfalls von Ape1 prozessiert werden. Die durch die Spaltung resultierende AP-Läsion wird anschließend in weiteren Schritten prozessiert, so dass die korrekte Sequenz erhalten bleibt (Lindahl and Wood, 1999; Krokan et al., 2000).

Innerhalb der BER unterscheidet man die short-patch-Reparatur, bei der nur ein Nukleotid ersetzt wird, von der long-patch-Reparatur, bei der mehrere Nukleotide entfernt werden. Bei der short-patch-BER (Abb. 2-17, IIIa) besitzt die DNA-Polymerase β (Pol β) zusätzlich zu ihrer Polymeraseaktivität eine intrinsische dRP-Lyase-Aktivität (Matsumoto and Kim, 1995; Prasad et al., 1998). Der verbliebene 5'-Phosphatrest wird durch die dRP-Lyase-Aktivität der DNA-Polymerase β entfernt (Abb. 2-17, IVa) und die entstandene Ein-Nukleotid-Lücke von Pol β aufgefüllt (Podlutzky et al., 2001). Im nächsten Schritt wird durch den XRCC1/Ligase III-Komplex der DNA-Strang wieder verschlossen (Abb. 2-17, Va). Dabei fungiert XRCC1 als Bindeglied zwischen Pol β und DNA-Ligase III, für die es getrennte Bindungsstellen aufweist (Lindahl et al., 1997; Nash et al., 1997; Krokan et al., 2000; Bhattacharyya and Banerjee, 2001; Petermann et al., 2006). Am Ende liegt wieder die korrekte Basensequenz vor (Abb. 2-17, VIa).

Abb. 2-17: Die Basen-Exzisions-Reparatur in Säugerzellen; modifiziert nach Flohr (Flohr, 2003).



Neben der short-patch-BER existiert, wie bereits erwähnt, die long-patch-BER (Abb. 2-17, IIIb). Bei diesem PCNA-abhängigen (proliferating cell nuclear antigen) Reparaturweg werden größerer DNA-Stücke (long-patch) im Bereich der

modifizierten Base ersetzt (Stucki et al., 1998). Er wird meist dann genutzt, wenn das entstandene 5'-Ende der DNA blockiert ist, so das Pol β nicht einschneiden kann (Gary et al., 1999; Nilsen and Krokan, 2001). Durch Polymerase β , δ oder ϵ werden ausgehend von der AP-Läsion, nach Ape1 Prozessierung, 2 bis 8 Nukleotide in 3' Richtung, unter Verdrängung des alten Stranges, in die DNA eingefügt (Abb. 2-17, IVb) (Krokan et al., 2000; Memisoglu and Samson, 2000). Da die long-patch-BER auch in Pol β -defizienten Zellen reibungslos abläuft, wird angenommen, dass hauptsächlich die Pol δ und ϵ an diesem Reparaturweg beteiligt sind (Southorn and Powis, 1988b; Fortini et al., 1998). Das Abschneiden des verdrängten alten Stranges (Abb. 2-17, Vb) erfolgt durch Aktivierung der flap-Endonuklease (FEN1) (Liu et al., 2004; Liu et al., 2006) durch PCNA (Klungland and Lindahl, 1997; Gary et al., 1999; Nilsen and Krokan, 2001) und PARP 1 (Prasad et al., 2000; Allinson et al., 2003; Le Page et al., 2003). Dadurch kann DNA-Ligase I, die ebenfalls mit PCNA interagiert (Levine, 1997), die Reparatur durch Verschließen des verbliebenen Strangbruchs beenden (Abb. 2-17, VIb).

Es gibt auch Hinweise, dass die long-patch-BER parallel mit der Replikation (Sattler et al., 2003; Sukhanova et al., 2004), unter der Abhängigkeit von Replikationsfaktoren wie RPA (replication protein A) und RFC (Otterlei et al., 1999; Krokan et al., 2000; Memisoglu and Samson, 2000; Caldecott, 2001), abläuft.

Die verschiedenen bakteriellen Reparaturoendonukleasen bzw. menschliche DNA-Glykosylasen und ihre unterschiedliche Substratspezifitäten sind in Tabelle 2.4.2-1 dargestellt. Diese unterschiedlichen Substratspezifitäten wurden in dieser Arbeit zu der Charakterisierung von geschädigter DNA genutzt. Die durch die Aktivität der Reparaturoendonukleasen gebildeten Einzelstrangbrüche können mit der Alkalischen Elution (siehe 4.1.7.2) und dem DNA-Relaxationsassay (siehe 4.1.7.3) quantifiziert werden (Epe et al., 1993a; Epe and Hegler, 1994). Hochreine, bakterielle Enzyme werden so als Sonden zur Charakterisierung von DNA-Schäden und deren Schadensprofilen eingesetzt (Epe, 1996).

Tabelle 2.4.2-1: Erkennungsspektren einer Auswahl menschlicher und bakterieller DNA-Glykosylasen modifiziert nach Epe, (Epe, 1996).

Bakterielles Enzym	Fpg	Endo III	Endo IV	T4EV	Exo III	APN1 ^f
Menschliches homologes Protein	hOgg1	hNth^a			Ape1/Hap1^b	
AP-Läsionen						
normal	+	+	+	+	+	+
1'-oxidiert	-	-	+	-	+	+
4'-oxidiert	+	+	+	+	(+) ^c	+
Basenmodifikationen						
8-Hydroxyguanin	+	-	-	-	-	-
FaPy-Guanin	+	(+) ^e	-	-	-	-
FaPy-Adenin	(+) ^d	(+) ^e	-	-	-	-
5,6-Dihydropyrimidin	-	+	-	-	-	-
Pyrimidindimer	-	-	-	+	-	-

^a anderer Name Thymidinglykol-DNA-glykosylase

^b (Mol et al., 2000)

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

^d nicht prozessiert von hOgg1

^e nicht oder nur teilweise prozessiert von Endo III (Asagoshi et al., 2000; Ide, 2001; Tudek, 2003)

^f Endo IV homologes Protein in Hefen

Die in dieser Arbeit verwendeten Reparaturenendonukleasen werden im Folgenden kurz beschrieben (Cunningham, 1997; Krokan et al., 1997).

Bei dem Enzym Fpg (Formamidopyrimidinglykosylase) handelt es sich um das aus *E. coli* isolierte funktionelle Homolog des humanen Enzyms hOgg1 (Boiteux et al., 1990). Es ist eine bifunktionelle Glykosylase, die mit einer AP-Lyasefunktion (Bailly et al., 1989; O'Connor and Laval, 1989) und einer 5'-dRPase (Graves et al., 1992) ausgestattet ist. Das Enzym erkennt Guanin- und Adenin-Derivate mit geöffnetem Imidazolring (Formamidopyrimidine, FaPy-Guanin/Adenin), AP-Läsionen (Jurado et al., 1998; D'Ham et al., 1999) und 8-Hydroxyguanin in der anti-Konfiguration (Boiteux et al., 1992). Es schneidet 8-oxoG aus 8-oxoG:C Paaren aus, jedoch nicht aus 8-oxoG:A Paaren. Am carboxyterminalen Ende des Proteins befindet sich ein Zink-Finger-Motiv, das für seine Bindung an die DNA und für seine katalytische Aktivität essentiell ist (O'Connor et al., 1993). Neben der Glykosylasefunktion besitzt das Fpg-Enzym eine AP-Lyasefunktion und kann somit die DNA an basenfreien Stellen einschneiden. Die Trennung der Phosphodiesterbindung wird 3' und 5' von der AP-Läsion katalysiert, so dass die

basenfreie Stelle freigesetzt und ein Einzelstrangbruch mit 3'-Hydroxylrest und 5'-Phosphatrest vorliegt (Bailly et al., 1989).

Die Thyminglykol-DNA-Glykosylase (hNth) ist das Homolog zur Endonuklease III (Endo III) aus *E. coli*, einem monomeren Enzym (Asahara et al., 1989). Das Enzym schneidet vorwiegend DNA, die durch γ -Strahlung, UV-Licht und freie Radikale geschädigt wurde (Demple and Linn, 1980; Gros et al., 2002). Dabei erkennt es gesättigte, oxidierte und fragmentierte Pyrimidine (Dizdaroglu et al., 1993; Gros et al., 2002). Diese Glykosylase besitzt eine assoziierte AP-Lyasefunktion und spaltet durch β -Elimination die Phosphodiestergruppe der Zucker-Phosphatbindungen an AP-Stellen zu 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatresten (Kim and Linn, 1988). Durch XPG, eine Endonuklease, die an der Nukleotid-Exzisions-Reparatur beteiligt ist, kann die Aktivität des Enzyms gesteigert werden (Bessho, 1999). Die Strukturen und Motive in der Endonuklease III finden sich in vielen Glykosylasen und werden zur Einordnung in Enzym-Superfamilien, beispielsweise der Endonuklease III-ähnlichen Glykosylasen, herangezogen.

Die aus *E. coli* isolierte Endonuklease IV (Endo IV) ist ein monomeres Enzym. Seine Aktivität macht lediglich 5 % der Gesamt-AP-Endonuklease-Aktivität in *E. coli* aus. Das Protein besitzt eine AP-Endonuklease mit 3'-Phosphatase und 3'-Phosphoglykolaldehyd-Diesterase Aktivität (Ljungquist, 1977; Levin et al., 1988).

Hingegen ist das homologe Enzym APN1 in Hefen (Ramotar et al., 1993) von größerer Bedeutung. Es erkennt wie Endo IV AP-Läsionen und repariert diese mit Hilfe seiner AP-Endonuklease mit 3'-Phosphatase und 3'-Phosphoglykolaldehyd-Diesterase Aktivität (Ramotar et al., 1991; Bogliolo et al., 2002). So kann APN1 mit seiner 3'-Phosphoglykolaldehyd-Diesterase- und 3'-Endonukleasefunktion 3'-blockierte Enden entfernen (Boiteux and Guillet, 2004). APN1, transfiziert in Bakterien, kann dort ebenfalls als Reparaturenzym fungieren (Ramotar et al., 1991). Die Konservierung dieser Enzyme über Prokaryoten zu Eukaryoten zeigt erneut die fundamentale Rolle bei der DNA-Reparatur (Popoff et al., 1990).

Die AP-Endonuklease Ape1 ist das Homolog zur Exonuklease III. Es wurde unabhängig voneinander als AP-Endonuklease (Demple et al., 1991; Robson and Hickson, 1991) und als Redoxregulator für Transkriptionsfaktoren (Xanthoudakis et al., 1992; Rothwell et al., 1997) identifiziert. Die wichtigste Funktion ist jedoch seine enzymatische Aktivität als AP-Endonuklease in der BER (Demple and Sung, 2005). Zusätzlich zur seiner mit XRCC1 stimulierten 5'-AP-Endonukleasefunktion (Vidal et al., 2001a) konnten für das Enzym eine 3' \rightarrow 5'-Exonuklease- (Chou and Howe, 2002), eine Phosphodiesterase-, 3'-Phosphatase- (Masuda et al., 1998), eine RNase-H- (Rothwell et al., 1997) sowie eine 3'-Mismatch-Exonukleasefunktion (Chou and Cheng, 2002) nachgewiesen werden. Diese zusätzlichen Enzymaktivitäten sind jedoch um Faktor drei schwächer ausgeprägt als die AP-Endonukleasefunktion.

Ape1 kann in der BER, unabhängig davon, welche DNA-Base der Schadsstelle gegenüberliegt, sowohl mono- als auch bifunktionelle Glykosylasen stimulieren (Hill et al., 2001; Vidal et al., 2001a). Zusätzlich interagiert Ape1 mit der Pol β (Bennett et al., 1997). Diese Interaktion ermöglicht der Pol β sich an der AP-Läsion festzusetzen und ihre dRPase-Aktivität zu erhöhen. Ape1 interagiert außerdem mit dem Plattformprotein XRCC1, das ihre Aktivität erhöht (Vidal et al., 2001b) sowie mit PCNA und FEN1 (Dianova et al., 2001).

Die T4 Endonuklease V (T4EV) stammt aus dem Bakteriophagen T4 und hat eine Molekülmasse von 16 kD. Neben AP-Läsionen erkennt sie spezifisch Cyclobutanpyrimidindimere (Yasuda and Sekiguchi, 1976). Sie besitzt eine von einander unabhängige Glykosylase- und AP-Lyasefunktion, Die Glykosylasefunktion dient zur hydrolytischen Spaltung der 5'-Glycosylbindung eines der beiden Pyrimidinreste, anschließend trennt sie mit Hilfe der AP-Lyasefunktion die Phosphodiesterbindung zwischen den Nukleotiden. Somit entstehen 3'-Hydroxyl- und 5'-Hydroxyl-Enden auf der 3'-Seite der AP-Läsion (Minton et al., 1975; Nakabeppu et al., 1982).

2.4.3 Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER, GGR)

Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) ist für die Reparatur einer Vielzahl von DNA-Schäden verantwortlich, die zu größeren Distorsionen in der Helix-Struktur der DNA führen („bulky“-DNA-Läsionen) und dadurch die Replikation und die Transkription blockieren (Abb. 2-18, I). Typische Substrate der NER sind durch UV-Strahlung induzierte Pyrimidindimere und (6-4)-Photoprodukte, chemische Addukte, aber auch modifizierte Basen (Friedberg et al., 1995a; de Laat et al., 1999; Ura and Hayes, 2002). Jedoch können auch die meisten anderen bekannten kovalenten Basenmodifikationen als Substrate für das NER-System dienen (Huang et al., 1994). Die NER, welche in nicht-aktiven Bereichen des Genoms tätig ist, wird auch global genomic repair (GGR) genannt, während die NER in den aktiven (transkribierten) Bereichen der DNA zumeist als transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR, siehe 2.4.4) stattfindet (Cline and Hanawalt, 2003). Die wesentlichen Reaktionsschritte der NER können prinzipiell in vier Schritte zusammengefasst werden: die Schadenserkennung, das Einschneiden des Stranges, der den Schaden enthält, die Reparatur-Synthese durch DNA-Polymerasen und die Ligation der DNA (Abb. 2-18) (Lindahl and Wood, 1999; Friedberg, 2001).

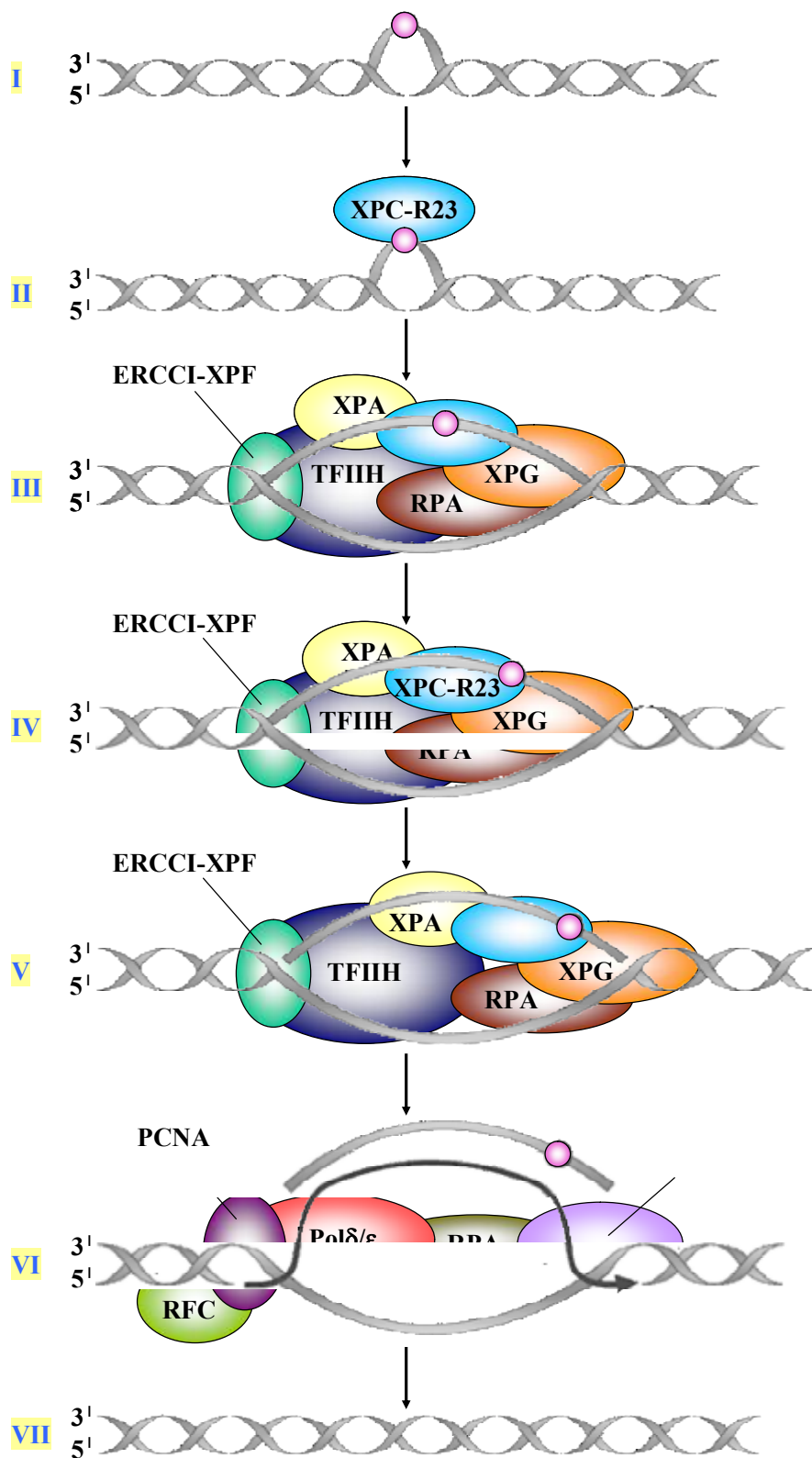


Abb. 2-18: Ablauf der Nucleotid-Exzisions-Reparatur in nicht-transkribierten Genabschnitten, modifiziert nach Friedberg (Friedberg, 2001).

Der Verlauf der NER ist in Pro- und Eukaryoten prinzipiell gleich, wobei Bakterien jedoch deutlich weniger Proteine benötigen (Kovalsky et al., 1996; Sancar, 1996; Zou and Van Houten, 1999) und zwischen den beteiligten Enzymen von *E. coli* und Menschen keinerlei Sequenz-Homologien bekannt sind. In menschlichen Zellen erkennt im ersten Schritt der XPC-hHRAD23-Komplex die modifizierte Base (Abb. 2-18, II) und es kommt zu einer Konformationsänderung (Abb. 2-18, III) der DNA (Wood, 1999; Janicijevic et al., 2003) mit anschließender Bindung von XPA und RPA (Batty and Wood, 2000). Im zweiten Schritt kommt es nach Anordnung weiterer Proteine wie TFIIH, bestehend aus sechs Untereinheiten inklusive der ATP-abhängigen DNA-Helikasen XPB und XPD, und der Endonukleasen XPG sowie ERCC1-XPF (Abb. 2-18, IV und V) zum Einschneiden der DNA (3' und 5' neben der veränderten Base). Das modifizierte Oligonukleotid (24 bis 32 Nukleotide) wird so entfernt (Winkler et al., 2001). Im dritten Schritt findet komplementär zum Gegenstrang die Reparatursynthese durch den DNA-Polymerase- δ/ϵ -RPA-RFC-Komplex (wie bei der long-patch-BER) statt (Abb. 2-18, VI). Zum Schluss wird die Lücke durch DNA-Ligase I verschlossen und die intakte DNA (Abb. 2-18, VII) ist wiederhergestellt (Friedberg, 2001).

2.4.4 Transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR)

Sowohl die direkte als auch die BER und NER beseitigen DNA-Schäden unabhängig davon, ob der geschädigte DNA-Bereich ein aktiver transkribierter Bereich ist oder nur einen ruhenden, inaktiven Bereich des Genoms darstellt. Dies bezeichnet man als „global repair“ der DNA. Die Tatsache, dass sowohl in *E. coli* als auch beim Menschen transkribierte DNA wesentlich schneller als das übrige Genom repariert werden (Bohr et al., 1985; Cooper et al., 1997), bezeichnet man als „preferential repair“. Dies beruht auf einer Kopplung von an der Transkription beteiligten Faktoren und einem Reparaturkomplex. Dieser besondere Reparaturweg der NER (Abb. 2-19) wird als transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR) bezeichnet (Svejstrup, 2002; Laine and Egly, 2006b).

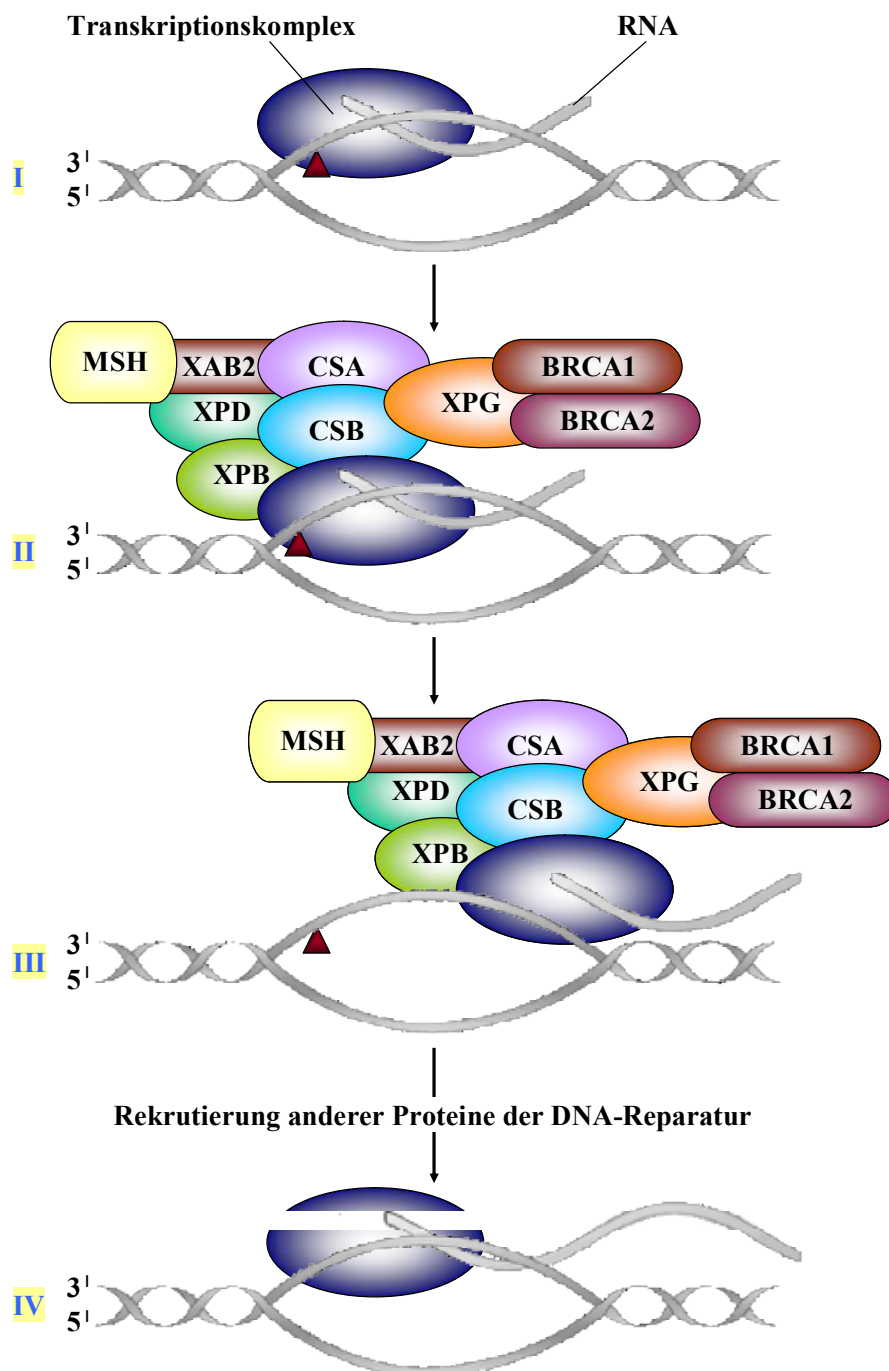


Abb. 2-19: Ablauf der transkriptionsgekoppelten Reparatur (TCR) in Säugerzellen, modifiziert nach Friedberg (Friedberg, 2001).

Die TCR benötigt prinzipiell die gleichen Proteine wie die NER (siehe 2.4.3). Die Schadenserkennung (Abb. 2-19, I) erfolgt jedoch bei der TCR nicht über XPC, sondern über die Blockade des RNA-Polymerase-II-Komplexes durch den DNA-Schaden auf dem Template-Strang (Tsutakawa and Cooper, 2000; Laine and Egly, 2006a). Für diesen Vorgang erfordert es zusätzliche Faktoren, wie die Proteine Csa und Csb (Le Page et al., 2000), welche zwischen der gestoppten

RNA-Polymerase II und den restlichen Reparaturenzymen vermitteln (Abb. 2-19, II und III). Diese Proteine entfernt die RNA-Polymerase II vom geschädigten Strang und macht damit den DNA-Schaden für Proteine der NER zugänglich (van den Boom et al., 2002). Die anschließende Prozessierung verläuft wie bei der NER bereits beschrieben. Die neu synthetisierte, nun fehlerfreie DNA-Sequenz kann im Anschluss gleich wieder von der RNA-Polymerase II als Matrize genutzt und die Transkription fortgesetzt werden (Abb. 2-19, IV).

2.4.5 Postreplikative Reparatur (Mismatch-Reparatur)

Sowohl in Pro- wie auch in Eukaryoten existiert eine postreplikative Reparatur. Die Aufgabe der Mismatch-Reparatur (MMR) besteht darin, Basenfehlpaarungen und Insertionsschleifen (loops), die durch die Replikation der DNA entstanden sind, zu erkennen und zu entfernen (Marti et al., 2002; Peltomaki, 2003; Jun et al., 2006). Die Voraussetzung dafür ist die Unterscheidbarkeit des neu synthetisierten DNA-Stranges vom Elternstrang. Dies wird in *E. coli* durch Methylierung bestimmter Adenine erreicht, die in zeitlicher Verzögerung zur Replikation stattfindet. Dadurch kann der Elternstrang an seiner Methylierung erkannt werden. Die Proteine MutS, MutH und MutL erkennen den „mismatch“ und schneiden den neuen Strang ein. Sie ermöglichen so weiteren Enzymen die vollständige Reparatur des „mismatch“-enthaltenden DNA Stranges. Im Menschen konnten Homologe der Bakterienproteine MutS (MSH) und MutL (MLH) identifiziert werden.

2.4.6 DNA-Einzelstrangbruch Reparatur

DNA-Einzelstrangbrüche (single strand breaks, SSB) können sowohl direkt induziert werden (siehe 2.3.2), durch spontane Deaminierung oder Depurinierung und nachfolgende Hydrolyse der Phosphodiesterbindung, als auch in Folge enzymatischer Aktivitäten während der BER oder der Replikation bzw. der Transkription entstehen (Caldecott, 2003). Die Reparatur von Einzelstrangbrüchen erfolgt im Gegensatz zu Doppelstrangbrüchen relativ schnell, was sie weniger toxisch für die Zelle macht (Caldecott, 2001), sie können jedoch, falls sie nicht repariert werden, in Doppelstrangbrüche konvertiert werden, die ihrerseits ein großes zytotoxisches und mutagenes Potential haben, da sie unter anderem zu Chromosomenaberrationen führen können. Die Reparatur von indirekt entstandenen SSB ist Bestandteil der BER und wurde in Kapitel 2.4.2 beschrieben. Direkt in die DNA eingefügte SSB, die meistens durch Zuckerfragmentierung und Abspaltung der Base auftreten, können über zwei Wege behoben werden, die long-patch- oder short-patch-Reparatur. In beiden Fällen dient Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP 1) als Sensor. Es bindet an den Einzelstrangbruch, wird aktiviert und

synthetisiert nun negativ geladene ADP-Ribose-Polymere (de Murcia and Menissier de Murcia, 1994; Wilson et al., 1998). Diese negativ geladenen Polymere führen zu einer Rekrutierung des XRCC1/Ligase III-Komplex an die Schadenstelle. Darauf folgend dissoziiert die PARP vom Einzelstrangbruch ab und XRCC1 kann als Plattform für weitere Reparaturproteine dienen.

Wenn ein Einzelstrangbruch ohne 3'-OH-Gruppe und 5'-Phosphatrest vorliegt, wird er zuerst, damit er weiter prozessiert werden kann, durch die Lyase-Funktion der Pol β oder durch Ape1 in einen Einzelstrangbruch mit diesen Gruppen überführt (Jilani et al., 1999; Karimi-Busheri et al., 1999). Anschließend kann die Reparatursynthese durch Pol β (short-patch und long-patch) oder die Pol δ/ϵ (long-patch) und ihre Hilfsproteine erfolgen. Die entstandenen Lücken werden durch die DNA-Ligasen I (long-patch) bzw. DNA-Ligase III (short-patch) wieder verschlossen (Caldecott, 2003).

2.4.7 Die Bedeutung der DNA-Reparatur für die Kanzerogenese

Der Mechanismus der Kanzerogenese, ausgehend von der „gesunden“, „normalen“ Zelle zu einer Tumorzelle, kann in drei Stufen gegliedert werden (Neumann, 1992). Beginnend mit der intakten genomischen DNA kommt es in der ersten Phase, der Initiation, durch chemische, physikalische oder biologische Einflüsse zu einer Modifikation der DNA. Diese veränderten Zellen können einerseits durch Apoptose eliminiert oder andererseits durch DNA-Reparatur wieder in ihren ursprünglichen Zustand (mit intakter genomischer DNA) überführt werden (Murphy, 1999). Kommt es jedoch zu einer Zellteilung, ist die Veränderung irreversibel, d. h. eine Mutation liegt vor. Diese Zellen können zunächst noch wie normale Zellen durch verschiedene Kontrollmechanismen, an denen unter anderem Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene beteiligt sind, am unkontrollierten Wachstum gehindert werden. Nur durch weitere Mutationen können diese Kontrollmechanismen ausgeschaltet werden. So treten in den initiierten Zellen Veränderungen der Genexpression und schließlich der Zellproliferation und -differenzierung auf. In dieser zweiten Phase, der Promotion, können Substanzen, welche in der Lage sind, das Wachstum initiiert Zellen zu stimulieren, auch ohne eigenes genotoxisches Potential zur Tumorbildung führen. Die dritte Phase der Tumorentstehung ist die Progression. Die prä maligne Zelle wird zu einer invasiv wachsenden Tumorzelle, die schrittweise ihre Fähigkeit zur Differenzierung verliert und sich destruktiv in die Nachbargewebe und metastasierend über den ganzen Körper ausbreitet (Riede et al., 1995).

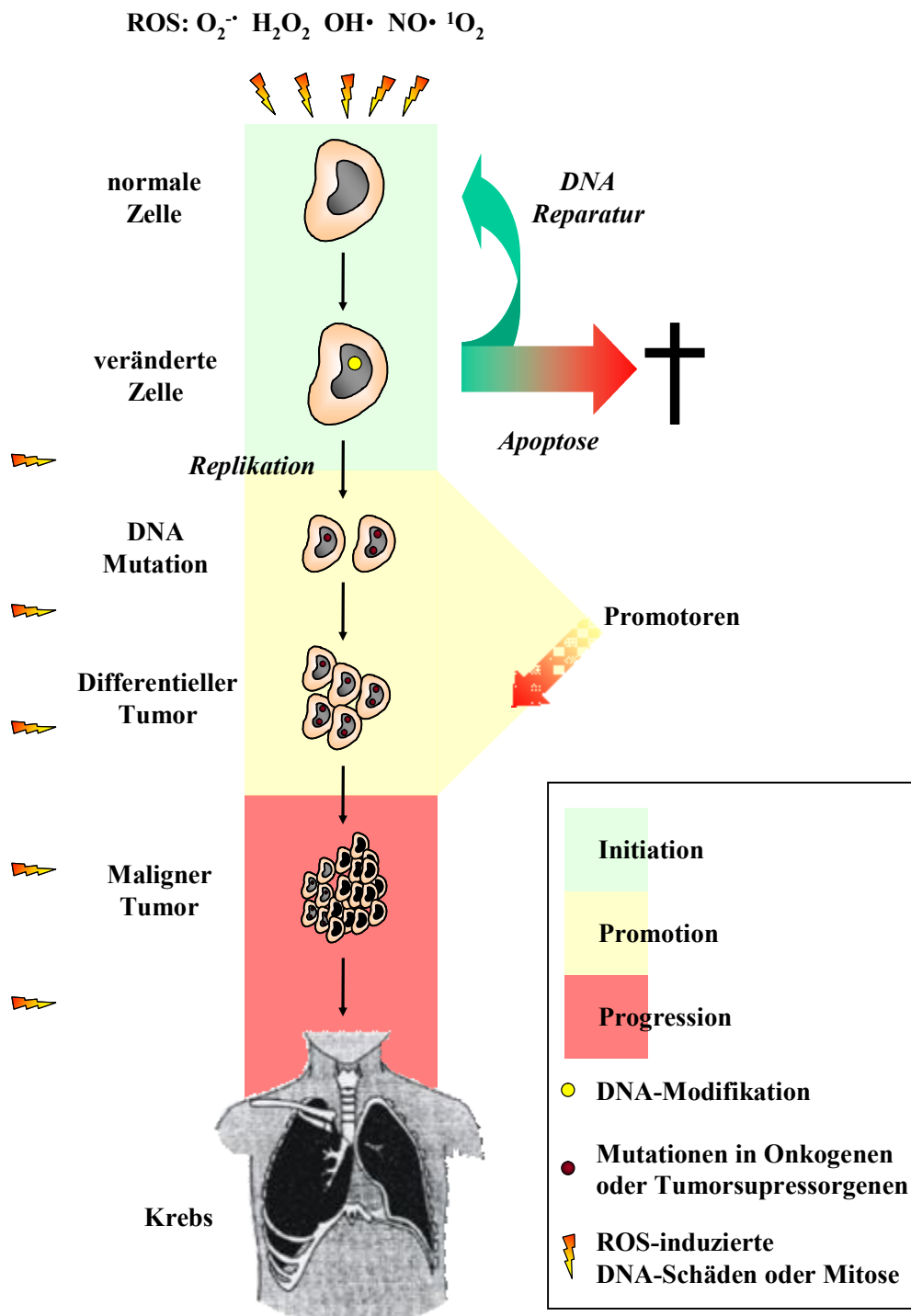


Abb. 2-20: Mögliche Rolle von ROS bei einem mehrstufigen Prozess der Kanzerogenese, modifiziert nach Neuman (Neumann, 1992; Loft and Poulsen, 1996).

Spontane Mutationen sind ein eher seltenes Ereignis, so kommt es spontan zu 10^{-10} Mutationen pro Nukleotid am Tag. Von daher kann die Bildung von endogenen Mutationen nicht alleine für die Krebsentstehung verantwortlich sein. Es wird angenommen, dass es schon sehr früh in der Tumorgenese zur Ausbildung eines sogenannten Mutatorphänotyps kommt, der die Entstehung weiterer Mutationen

begünstigt (Loeb, 2001; Loeb et al., 2003; Bielas and Loeb, 2005; Venkatesan et al., 2006). So können Mutationen in Genen der DNA-Reparatur, -Replikation oder der ROS-entgiftenden Enzyme in der Anfangsphase zu Funktionsänderung oder Funktionsverlust des entsprechenden Proteins führen. Dies hat wiederum erhöhte Mutationsraten zur Folge, da sich die Zelle nicht mehr so gut gegen reaktive Spezies verteidigen kann. Es ist bekannt, dass der Ausfall von bestimmten Genen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, ein erhöhtes Krebsrisiko nach sich zieht.

Gut belegt ist dies für den Ausfall des MSH2-Proteins, das an der Mismatch-Reparatur beteiligt ist und ein Homolog des bakteriellen MutS Gens darstellt (Modrich, 1994) (siehe 2.4.5). Der Ausfall führt zu einer erblichen Form des Dickdarmkrebses (HNPCC: hereditary non-polyposis colon cancer) (Buermeyer et al., 1999). Es ist bekannt, dass bereits eine heterozygote Mutation in diesem Gen bei Individuen ein erhöhtes Risiko für eine Folgemutation in dem intakten Allel des Gens einer Körperzelle bedingt und somit ebenfalls zu einer erhöhten Prädisposition für diese Form des Dickdarmkrebses führt (Kaina, 1997). Da der Ausfall der Reparaturgene Fpg und MutY in *E. coli* zu einem Mutatorphänotyp führt (Michaels et al., 1992; Kuipers et al., 1999), besteht der Verdacht, dass ein homologer Funktionsverlust beim Menschen des Enzyms hOgg1 ähnliche Konsequenzen wie der Ausfall des MSH-Proteins haben könnte. Der Verdacht wird durch Befunde gestützt, welche zeigen, dass bestimmte Krebsarten des Menschen, wie Lungen-, Nieren- oder Magentumoren, mit einem Verlust des Genabschnitts von hOgg1 (LOH: loss of heterozygosity) (Chevallard et al., 1998; Shinmura et al., 1998; Audebert et al., 2000; Wikman et al., 2000) oder mit inaktivierenden Mutationen in hOgg1 (Xu et al., 2002) einhergehen. In vielen Fällen konnten die inaktivierenden Mutationen eindeutig als Basenaustausch-Mutationen identifiziert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von hOgg1 die Reparaturrate zusätzlich in der DNA induzierter Schäden deutlich steigert (Smart et al., 2006), wobei die „steady state“ Level oxidativer Schäden sowie die spontane Mutationsfrequenz jedoch unbeeinflusst blieben (Hollenbach et al., 1999; Frosina, 2006). Offensichtlich ist die Konzentration von hOgg1 nicht alleine limitierend für die Entfernung der kleinen Menge an zusätzlich erzeugten DNA-Schäden. Durch die Generierung von Ogg1^{-/-}-knockout-Mäusen konnte der Einfluss einer eingeschränkten DNA-Reparatur gezeigt werden (Klungland et al., 1999; Minowa et al., 1999; Osterod, 2002). Des Weiteren kam es in Myh und Ogg1 defizienten Mäusen vermehrt zu G:C→T:A Transversionen und zu einer vermehrten Tumorbildung (Xie et al., 2004). Die Bedeutung der Reparatur von 8-oxoG und anderer oxidativer Basenmodifikationen, wird auch aus der Analyse der Mutationsmuster im Tumorsuppressorgen p53 verschiedener Tumortypen deutlich. Das p53-Gen, das sehr häufig in vielen Krebsarten mutiert ist, weist bei Betrachtung

der Mutationsarten in Lungentumoren im Gegensatz zu den meisten anderen Tumortypen eine auffällige Dominanz von G:C→T:A Transversionen auf (Hollstein et al., 1996), die auf nicht repariertes 8-oxoG zurückzuführen sind (Wiseman and Halliwell, 1996).

Diese Befunde stützen die Hypothese, dass ähnlich wie der Defekt in der Mismatch-Reparatur auch ein Ausfall der Reparatur von ROS induzierten Modifikationen, einen Beitrag zur Kanzerogenese bzw. Tumorprogression leistet (Weiss et al., 2005). So kann eine Mutation in einem Gen, das für die Reparatur oxidativer DNA-Schäden verantwortlich ist, zu einem Mutatorphänotyp führen. Daraus resultiert ein erhöhtes Risiko für weitere Mutationen in Zellzyklus-regulierenden Genen und Tumorsuppressorgenen, was die Entartung einer Zelle nach sich ziehen könnte (Boiteux and Radicella, 1998; Boiteux and Radicella, 1999). Gene, die für ein Reparaturprotein codieren, weisen demnach indirekte tumorsuppressive Eigenschaften auf.

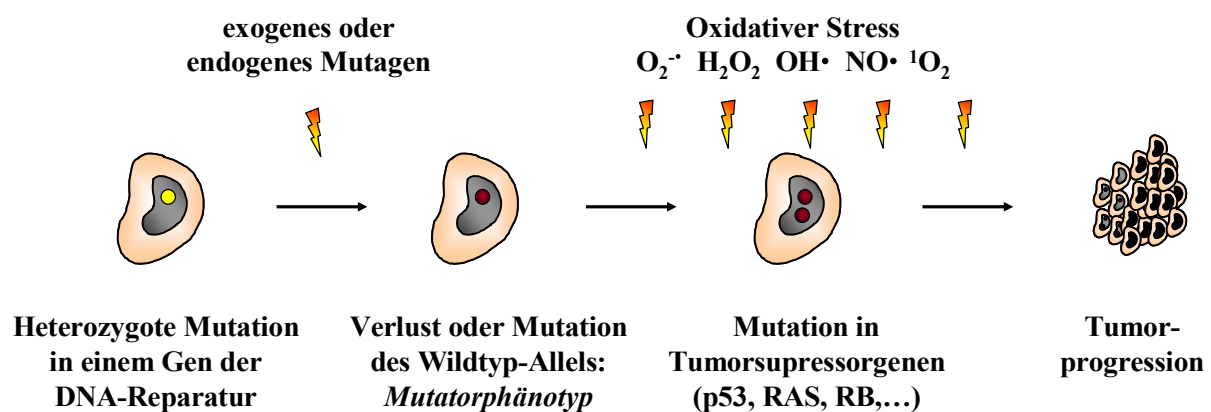


Abb. 2-21: Mögliche Bedeutung von Mutationen in Genen der DNA-Reparatur während der Kanzerogenese, modifiziert nach Boiteux (Boiteux and Radicella, 1998).

2.4.8 Induktion der DNA-Reparatur

Vor dem Hintergrund der Bedeutung der Reparatur von DNA-Schäden für die Kanzerogenese stellt sich die Frage, ob die Reparatur induziert und dadurch das Risiko der Krebsentstehung gesenkt werden kann. Es ist seit langem bekannt, dass sowohl die BER als auch die NER nach einer Schadensinduktion in Bakterien hoch reguliert wird. So wird bei der NER die Expression von *uvrA*, *uvrB*, *uvrD* und *cho* durch die so genannte SOS-Antwort erhöht (Muller and Janz, 1993; Brena-Valle and Serment-Guerrero, 1998; Salmelin and Vilpo, 2003). Bei der BER wird in bakteriellen Systemen einerseits *AlkA*, welches verschiedene alkylierte Basen entfernt (Wyatt et al., 1999), durch eine *ada* vermittelte adaptive Antwort induziert (Lindahl et al., 1988). Andererseits ist auch eine durch das SoxRS-Regulon kontrollierte Hochregulierung von Endo IV (siehe 2.4.2) durch ROS bekannt (Dempfle, 1991). Auch für Fpg wurde in

E. coli eine Regulation durch *fnr*, *fur* und *arcA* als Antwort auf ROS beschrieben (Lee et al., 1998). Durch eine Induktion der Expression von Reparaturenzymen wird nicht nur eine bei ungeschädigter DNA unnötige Proteinsynthese verhindert, sondern auch ein überflüssiges Einschneiden von unmodifizierter DNA, welches eine Quelle für genomische Instabilität bei der BER (Berdal et al., 1998) und NER (Branum et al., 2001) ist, vermieden.

In Säugetierzellen gibt es eine durch Alkylantien oder Oxidantien aktivierte und über Keap1 vermittelte (Dinkova-Kostova et al., 2005) antioxidative Abwehr durch den Transkriptionsfaktor Nrf2 (Jaiswal, 2004). Durch diesen Mechanismus (Nguyen et al., 2003) werden verschiedene zytoprotektive Proteine und der Glutathionspiegel hoch reguliert (siehe 2.1.7). Jedoch wurden bisher noch keine Gene der DNA-Reparatur als Ziel von Nrf2 identifiziert.

Ein weiterer Vermittler der zellulären Stressantwort in Säugetierzellen ist der Tumorsuppressor p53. Es wurde gezeigt, dass seine durch DNA-Schäden induzierte Aktivierung zu einer Effizienzverbesserung der NER führt (Hanawalt, 2002). Die Bedeutung von p53 für die BER ist unklar, so kann p53, unabhängig von seiner Funktion als Transkriptionsfaktor, *in vitro* die Reparatur von AP-Läsionen und Uracil Resten durch direkte Protein-Protein Interaktion mit Pol β und Ape1 stimulieren (Offer et al., 2001a; Zhou et al., 2001). Weiterhin ist die Expression von Pol β in p53-defizienten Zellen reduziert und die Reparaturpausen sind nach der Behandlung mit MMS verglichen mit Wildtypzellen verlängert (Seo et al., 2002). Jedoch kommt es nach einer Behandlung mit ionisierender Strahlung je nach Status des Zellzyklus zu einer Erhöhung oder Erniedrigung der Reparaturaktivität (Offer et al., 2001b).

Es gibt ebenfalls Hinweise für eine Erhöhung der Expression von Ape1 (Ramana et al., 1998) und hOgg1 (Kim et al., 2001) in kultivierten Zellen nach oxidativem Stress sowie für eine Induktion von Ape1, Pol β , hOgg1 und Mpg (Methylpurin-DNA Glykosylase) in Rattenlebern nach Behandlung mit Peroxisomenproliferatoren (Rusyn et al., 2000). Der Transkriptionsfaktor NF-YA wird auch als Verantwortlicher für eine Expressionserhöhung von hOgg1 nach Behandlung mit MMS, nicht aber nach H₂O₂, beschrieben (Lee et al., 2004). Auch die mRNA-Level von OGG1 blieben nach Behandlung mit H₂O₂ unverändert (Mistry and Herbert, 2003). Der einzige direkte Befund einer Induktion der BER durch vorherige Schädigung wurde bisher von Le et al. (Le et al., 1998) berichtet, welche eine beschleunigte Entfernung von Thyminglykolen nach einer Vorbehandlung mit ionisierender Strahlung beobachteten.

3 ZIELSETZUNG

In der vorliegenden Arbeit sollten die Generierung und Prozessierung von zellulären DNA-Schäden durch verschiedene exogene Quellen (Methylmethansulfonat, UVB, Ro19-8022, γ -Strahlen und Tirapazamin) untersucht werden.

Die Untersuchungen betreffend der Generierung von DNA-Schäden wurden mit γ -Strahlen, einer bekannten DNA-schädigenden exogenen Quelle, und mit dem in Phase 2/3 der klinischen Prüfung befindlichen Zytostatikum Tirapazamin durchgeführt. Von besonderem Interesse war dabei, welche Art von DNA-Modifikationen Tirapazamin induziert und ferner, ob Tirapazamin direkt DNA-Schäden verursacht oder ob zunächst eine Aktivierung/Prozessierung durch endogene Enzyme notwendig ist und erst dann direkt oder indirekt eine DNA-Schädigung erfolgt. Hierzu sollten Untersuchungen in verschiedenen Säugerzellen mit Hilfe einer modifizierten alkalischen Elutionstechnik unternommen werden. Um anschließend auch eine Charakterisierung der verursachten DNA-Schäden zu ermöglichen, wurde diese Technik durch Inkubation mit verschiedenen Kombinationen von DNA-Reparaturenzymen erweitert. Das so erhaltene Schadensprofil wurde mit dem von γ -Strahlen verglichen. Weiterhin sollten, um weitere Aufschlüsse über den Zusammenhang zwischen DNA-Schäden und Mutagenität und Toxizität zu erhalten, Experimente zur Mutagenität und Toxizität von Tirapazamin durchgeführt werden.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von alkylierten oder oxidierten DNA-Schäden auf die Reparatur von oxidativen DNA-Schäden. Im Vordergrund stand dabei die Frage, ob eine adaptive Antwort der Basen-Exzisions-Reparatur (BER) (siehe 2.4.2) auf einen DNA-Schaden existiert. Hierzu wurden neben primären menschlichen Fibroblasten und Maus-Embryofibroblasten auch p53-profiziente menschliche Fibroblasten mit Methylmethansulfonat oder Ro19-8022 plus Licht geschädigt und nach unterschiedlichen Zeitpunkten mit Hilfe der Alkalischen Elution auf ihre Fähigkeit, einen oxidativen Schaden zu reparieren, untersucht. Der Einsatz von p53-profizienten Zellen ermöglichte es, Rückschlüsse auf die Bedeutung dieses Tumorsuppressorgens für die BER zu erhalten. Neben der Reparatur wurde auch der Status der antioxidativen Abwehr (siehe 2.1.7) und des wichtigsten an der BER beteiligten Enzyms, hOgg1, bestimmt. Neben den Untersuchungen zur BER wurden auch die Einflüsse von UVB-Strahlung auf die Nukleotid-Exzisions-Reparatur in Abhängigkeit von p53 mit Hilfe eines Plasmidreaktivierungs-Assays untersucht.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Analysenwaage	AG 245, max. 210 g (Mettler Toledo, Schweiz)
Autoklav	Tecnoclav 50 6.0, bzw. 2.0 (Fedegari Autoklav SPA, Albuzzo, Italien)
Brutschrank (Bakterien)	Kelvitron E, B6200 (Heraeus Instruments, Hanau)
Brutschränke (Zellkultur)	CO ₂ -Inkubator BB16, BB6060 O ₂ und Hera-Cell (Heraeus Instruments, Hanau)
Computer	Macintosh mit Mac OS 9 und X TM sowie und PC mit Windows XP TM
Coulter Counter TM	Beckmann Coulter Z2 (Beckmann, München) und Modell N Industry (Coulter Electronics LTD, Beds., England)
Destillationsapparatur	Destamat® (Heraeus, Hanau)
DNA-Gel-Auswertung	Molecular Analyst® (V2.1, 1995, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA)
DNA-Gel-Vermessung	BioRad Gel Doc 1000 (BioRad, Hercules, CA, USA)
Filmentwickler	AllPro 100 PLUS (X-ray film processor, USA)
Fluoreszenzmikroskop	Eclipse E400, Nikon, Düsseldorf
Fluoreszenzphotometer	Kontron SFM 25 (Kontron AG, Zürich, Schweiz)
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 mM 10, Neolab 4 mit Zeitnehmer SM 999 (Neolab, Heidelberg)
Gefrierbehälter (Zellen)	Flüssigstickstoffcontainer TW 750 RS (Taylor Wharton, Theodore, AL, USA)
Gefrierschrank (-20 °C)	KG 3666-23 (Liebherr)
Gefrierschrank (-70 °C)	Colora UF 85-300S (Colora, Lorch)
Gelapparatur	(Elektrophorese von Plasmid-DNA) Mechanikwerkstatt, Institut für Toxikologie, Universität Würzburg
Gelapparatur (Western-Blot)	(BioRad, Hercules, CA, USA)
Halogenlampe (1000 W)	Osram SLG 1000-Studio (Osram, München) mit Flecta Halogen Mini-Brenner (Reflekta)

Heissluftsterilisator	WTC Binder, Tuttlingen
Heizblock	Thermoblock-Thermostat (Gebr. Liebisch, Bielefeld)
Hoefer Dry Frame	Geltrocknungsapparatur, (Hoefer, USA)
Kamera	Leica DC 200 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim), Polaroid (Polaroid Corp., Cambridge, Mass., USA)
Kamera Fluoreszenzmikroskop	ProgRes C10 (Jenoptik Jena)
Kühlzentrifuge	Sorvall Superspeed RC2-B (Sorvall, Conn., USA)
Laboratoriumshomogenisator	Potter s (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen)
Lichtintensitätsmessgerät	Luxmeter 110 (PRC Krochmann GmbH, Berlin) mit geeichtem Photoelement GaP
Lichtmikroskop	Telaval 31 (Zeiss, Oberkochen)
Lichttisch	Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg
Magnetrührer	Ikamag RET-G (Ika-Werk, Janke & Kunkel GmbH & Co KG, Staufen i. Br.)
Mikrowelle	Micromat 175 Z (AEG) und Dimension 4 (Panasonic Service, Wiesbaden)
Multipette	Eppendorf GmbH, Hamburg
Peristaltikpumpe	ISM 759 (20 Kanäle), (Ismatec Laboratoriumstechnik, mit Schläuchen, Schweiz)
pH-Meter	PHM 62 (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark)
Phosphoimager	Storm (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA)
Pipetten	Pipetman P 20, P 100, P 200, P 1000, P 5000, P 10000 (Gilson, Frankreich)
Pipettierhilfe	Pipetus-akku [®] (Hirschmann [™] Laborgeräte, Eberstadt)
Plattengießgerät	Tecnomat (Integra Biosciences AG, Wallisellen, Schweiz)
Pumpe	Desaga (Heidelberg, Deutschland)
Rotoren für Kühlzentrifuge	SS-34, GS-3 (Sorvall, New.t.on, Conn., USA)
Rotoren für UZ	Ti 60, VTi 50 (Beckman Instruments, Palo Alto, Kalifornien, USA)
Schüttelbäder	heizbar bis 100 °C (Köttermann GmbH & Co., Uetze-Hänigsen)
Schüttelinkubator (Bakterien)	TH25/SM25 Digi (Edmund Bühler, Bodelshausen)
Schüttelinkubator (Zellkultur)	Typ Certomat R+H, (B. Braun, Melsungen, Deutschland)

Software (sonstige)	MS Office 2003, Adobe Acrobat 7.0, Adobe Photoshop CS2
Spannungsquelle	Power PAC-300 (BioRad, Hercules, CA, (Western-Blot) USA)
Spannungsquelle	Power PAC- 3000 (BioRad, Hercules, (Protein-, DNA-Gele) CA, USA)
Speedvac	Konzentrationszentrifuge Univapo 100 h mit Unijet II Refrigerated Aspirator (Laborgerätebau A.N. Kraupa, Martinsried)
Spektrophotometer	WPA biowave S2100 Diode Array Spectrophotometer (Whatman Biometra)
Sterile Werkbank	LaminAir® HB 2472 und HB 2448 (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
Szintillationszähler	Beckman LS 6000 TA (Beckman Instruments, Palo Alto, Kalifornien, USA)
Thermostat für Haake W19	Haake D8 (Haake, Karlsruhe)
Tischschüttler	GFL 3015 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel)
Trockenschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 (Bandelin Electronic, Berlin)
Ultraschall-Homogenisator	SONOPULS; HD 70 mit Sonotrode MS 73 und (Sonifier) HF-Generator GM 70 (70 W, 20 kHz) (Bachofer, Reutlingen)
Ultrazentrifuge (UZ)	Optima LE-80K (Beckman Instruments, Palo Alto, Kalifornien, USA)
UV/VIS-Photometer	Ultraspec II, LKB Biochrom (Pharmacia / LKB, Uppsala, Schweden)
Vortexer	Vortex Genie 2, Model G-560E (Scientific Industries, INC, Bohemia, N.Y., 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, Deutschland)
Wasserbad	Haake K, Haake LH mit Kältethermostat Haake F3 (Haake, Karlsruhe)
Wasserbad	Haake Fisons W19 mit Kältethermostat Haake D8 (Haake, Karlsruhe)
Zählkammer	Neubauer Kammer (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)

Zentrifugen	Hettich Micro Rapid/K und Hettich Universal/K2S (Hettich, Tuttlingen), Biofuge 28RS und Sigma 3K-2 (Heraeus Instruments GmbH, Osterode am Harz, Deutschland)
Zytozentrifuge	Cytospin 3 (Shandon, Astmoor, England)

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Blottingfilm	Kodak Biomax ligt-1, ml, 13x18 cm Sigma; Z37, 039-80 50pc Lot: 108H1385 (Eastman Kodak Comp., Rochester, NY, USA)
Blottingmembran	Hybond-P PVDF membrane (Amersham Pharmacia Biotech UK Lmd., Little Chalfont, UK)
Blotting-Papier (Proteine)	(Schleicher & Schüll, Würzburg)
Cellulosenitrat-Membran	(Schleicher & Schüll, Würzburg)
Deckgläser	(A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Deckgläser (groß)	(A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Einmalpipetten, steril	(A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
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 & Schüll, Würzburg)
Fixierbad I	Kodak, X-Ray Developer LX 24 (Eastman Kodak Comp., Rochester, NY, USA)
Fixierbad II	Kodak, X-Ray Fixer A 4 (Eastman Kodak Comp., Rochester, NY, USA)
Fluoreszenzküvetten	(A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Glasgeräte	(Schott Spezialglas GmbH, Mainz)
Glaspipetten (Zellkultur)	(A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Kanülen, steril	Nr.2 (Dispomed WITT oHG, Gelnhausen-Hailer)
Kryoröhrchen	Nunc Kryo, 1,5 ml (A/S Nunc, Roskilde, Dänemark)
Kryoröhrchen, steril	(1,8 ml; Nalgene Comp., Rochester, USA)
Kulturröhrchen	PP, steril (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Lochfilter	Shandon Filter Cards (Schleicher & Schüll, Würzburg)
Multipettenaufsätze	Combitips 50 ml (Eppendorf AG, Hamburg)
Multiwell-Gewebeplatten	6-Well Platten, Falcon® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)

Objektträger	geschnitten, mit Mattrand (Knittel Gläser, Deutschland)
Objektträger	Labcraft, DFF 76×26 mM (Richardson Supply Comp. Ltd., London, England)
Pasteurpipetten	Flint Glass (Chase Instruments Corp., Glen Falls, NY, USA)
Plastikmaterialien	(Eppendorf, Hamburg)
Plastikspitzen (Einweg)	5ml, 10ml (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Protein-Längenstandard	Sigma SDS-7 Dalton Mark VII I (Sigma Chemie, Deisenhofen)
Quecksilberdampf-Lampe	(für Fluoreszenzmikroskop) HBO Quecksilberdampf Kurzbogenlampe, (Osram, München)
Spritzen (Alkalische Elution)	20cc-Syringe, Luerlock (Becton Dickinson & Co., Rutherford, USA)
Spritzen (Western-Blot)	1cc-Syringe, (Becton Dickinson & Co., Rutherford, USA)
Sterilfilter	VacuCap 0,2 µm (PALL, Ann Arbor, USA)
Sterilfilter	Porengröße 0,22 µm (Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland)
Szintillationsgefäße	Minivials A (Roth, Karlsruhe)
Whatmanpapier (Western-Blot)	(Schleicher & Schuell, Dassel)
Zählkammer, graduiert	Kora Hycor Slide 10 (Biomedical Glasstic)
Zellkulturflaschen	(Greiner GmbH, Nürtingen)
Zellkulturschaber	(Greiner GmbH, Nürtingen)
Zellkulturschalen	Falcon® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)
Zentrifugenröhrchen (Glas)	Corex-Röhrchen, 15 ml, 50 ml (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Zentrifugenröhrchen (Plastik)	15 ml, 50 ml (Greiner GmbH, Nürtingen)

4.1.3 Chemikalien und Reagenzien

1-Butanol	(Fisherscientific, USA)
6-Thioguanin	2-Amino-6-mercaptapurin (Sigma Aldrich, Steinheim)
Acrylamid/Bisacrylamid	(Roth, Karlsruhe) (Rotiphorese Gel 30®)
Agarose (Typ I, low EEO)	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Agarose (Typ I, high melt)	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Aktivkohle	(Merck, Darmstadt)
Ammonium	(BioRad, Hercules, CA, USA)
Ammoniumchlorid	(Merck, Darmstadt)

Ammoniumdihydrogenphosphat	(Merck, Darmstadt)
Ammoniumperoxodisulfat	(Roth, Karlsruhe)
Ampicillin	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Aproteine	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Bacto-Agar	Difco (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Frankreich)
Bacto-Trypton (Pepton)	Gibco BRL, (Life Technologies GmbH, Karlsruhe)
BioRad-Farbstoffkonzentrat	(BioRad, Hercules, CA, USA)
Bisbenzimid (Hoechst Nr. 33258)	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Blocker (non-fat dry milk)	(BioRad, Hercules, CA, USA)
Bromphenolblau	(Sigma Aldrich, Steinheim)
DL-Butioninsulfoxim	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Calciumchlorid x 2 H ₂ O	(Merck, Darmstadt)
Carbogen (95 % O ₂ , 5 % CO ₂)	(Linde, Höllriegelskreuth)
Chloroform	(Roth, Karlsruhe)
Coomassie Brilliant Blue R, DAPI	(Sigma Aldrich, Steinheim) (Sigma Aldrich, Steinheim)
DAPI Mounting Medium	Vectashield DAPI (Axxora, Grünberg)
Dextran-Natriumsalz	(Pharmacia Upjohn GmbH, Dänemark)
di-Kaliumhydrogenphosphat x 3 H ₂ O	(Roth, Karlsruhe)
di-Natriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O	(Merck, Darmstadt)
Dithioerythritol	(Sigma Aldrich, Steinheim)
DMEM Medium high Glucose	(PAA, Cölbe)
DMSO	Dimethylsulfoxid (Sigma Aldrich, Steinheim)
EDTA	Tetramethylethyldiamin (Merck, Darmstadt)
Eichlösungen	Puffer (pH 5, 7, 8, 10, 11), (Sigma Aldrich, Steinheim)
Essigsäure	(Roth, Karlsruhe)
Ethanol, absolut	(Roth, Karlsruhe)
Ethidiumbromid	(Roth, Karlsruhe)
Formamid 90 %	(Sigma Aldrich, Steinheim)
GFP Duplex I	(Dharmacon, Lafayette, CO, USA)
Giemsa	(Fluka 48900)
D-Glucose x 1 H ₂ O	(Roth, Karlsruhe)
Glutathion (Glu-Cys-Gly)	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Glutathione Sepharose™ 4B	(Amersham Pharmacia Biotech UK Lmd., Little Chalfont, UK)
Glycerol	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Glycin	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Guanosin (2'-Deoxyguanosine)	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Ham's F12-Medium	(PAA, Cölbe)

Harnstoff	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Hefeextrakt	Gibco BRL (Life Technologies GmbH, Karlsruhe)
HEPES	[N-2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2 ethansulfonsäure], (Sigma Aldrich, Steinheim)
HEPES- Puffer	(PAA, Cölbe)
Igepal	(Sigma Aldrich, Steinheim)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (Sigma Aldrich, Steinheim)
Isopropanol	(Roth, Karlsruhe)
Isoton-II-Lösung	(Beckman Coulter, Krefeld)
Kälberserum (fetales)	(PAA, Cölbe)
Kaliumacetat	(Merck, Darmstadt)
Kaliumchlorid	(Merck, Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	(Merck, Darmstadt)
Kaliumhydroxid	(Merck, Darmstadt)
KBM-2 Medium	(Cambrex, Walkersville, MD)
Kohlendioxid (CO ₂)	(Linde, Höllriegelskreuth)
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)
Lipofectamin™ 2000	(invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
Luciferase Assay Reagent	(Promega, Madison, WI, USA)
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	(Merck, Darmstadt)

Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	(Roth, Karlsruhe)
β-Mercaptoethanol	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Methanol	Roti® solv (HPLC, Gradient grade) (Roth, Karlsruhe)
Methanol	(Fisherscientific, USA)
Milch	siehe Blocker
MMS	Methylmethansulfonat, (Sigma Aldrich, Steinheim)
NADPH, Tetranatriumsalz	(Boehringer, Mannheim)
Natriumacetat	(Merck, Darmstadt)
Natriumazid	(Merck, Darmstadt)
Natriumcarbonat	(Merck, Darmstadt)
Natriumchlorid	(Merck, Darmstadt)
Natriumdesoxycholat (NaDoc)	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck, Darmstadt)
Natriumhydrogenphosphat x 1 H ₂ O	(Merck, Darmstadt)
Natriumhydroxid	(Merck, Darmstadt)
Natriumpyruvat	(PAA, Cölbe)
Normales Ziegenserum	Normal Goat Serum (005-000-121 / lot 70487) 60,0 mg/ml (dianova GmbH Hamburg / Jackson ImmunoResearch Lab., Inc.)
Nutrient broth	Difco (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Frankreich)
Opti-Mem® I Transfektionsmedium	(Gibco/invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
Paraformaldehyd	Paraformaldehyde 16 % cat. # 15710 (SCI science services, München / Electron Microscopy sciences)
Passive Lysis Buffer 5x	(Promega, Madison, WI, USA)
PEG 3000 (Polyethylenglycol)	(Merck, Darmstadt)
PEG 6000	(Serva, Heidelberg)
Penicillin/Streptomycin-Lösung	(PAA, Cölbe)
Phenol (Roti®-phenol)	(Roth, Karlsruhe)
Ponceau S	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Proteinlängenstandard	(SDS-7, Dalton Mark VII-L) (Sigma Aldrich, Steinheim)
Quiagen Plasmid Kit	(Quiagen, Hilden)
Rainbow-ladder	Proteinlängenstandard Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (BioRas, Hercules, CA, USA)
Rinderserumalbumin (BSA)	(Sigma Aldrich, Steinheim)
RNase-freies Wasser	(Dharmacon, Lafayette, CO, USA)

Ro19-8022	[R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl)-carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol], (Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz)
Salzsäure 25 %, 37 %	(Merck, Darmstadt)
Schwefelsäure 96 %	(Merck, Darmstadt)
Stickstoff, flüssig	(Linde, Höllriegelskreuth)
Szintillationslösung	Rotiszint 22®, (Roth, Karlsruhe)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (BioRad, Hercules, CA, USA)
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid (Merck, Darmstadt)
Tirapazamin	SR-4233, 3-amino-1,2,4-benzotriazine-1,4 dioxide, (sanofi-aventis, Frankfurt)
Trichloressigsäure	(Serva, Heidelberg)
TRIS	(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) (Sigma Aldrich, Steinheim)
Tris Base	(BioRad, Hercules, CA, USA)
Tris-HCl	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Triton X-100	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Trypanblau-Lösung 0,4 %ig	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Trypsin /EDTA-Lösung	(PAA, Cölbe)
Tween	(BioRad, Hercules, CA, USA) (BioRad, Hercules, CA, USA)
Wasserstoffperoxid	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Western Detection Kit	ECL-plus, Western blotting detection kit (Amersham Pharmacia Biotech UK Lmd., Little Chalfont, UK)
Xanthin	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Xylen/Cyanol FF	(Sigma Aldrich, Steinheim)

Herr Dr. E. Gocke von der Firma Hoffmann-La Roche AG (Basel, Schweiz) stellte freundlicherweise den Photosensibilisator Ro19-8022 zur Verfügung. Alle anderen Reagenzien stammten aus Hochschullieferungen oder von verschiedenen Herstellern und entsprachen soweit möglich p.a.-Qualität.

Die Firma sanofi-aventis stellte mir freundlicherweise die Substanz Tirapazamin zur Verfügung.

4.1.4 Antikörper und Enzyme

Actin (I-19)	anti Actin, Goat, (Santa Cruz, USA)
Anti-mouse IgG-HRP	(Amersham, USA)
Anti-p53 (Ab-6) mAb	Anti-p53 (Pantropic) Mouse mAb (DO-1), Cat. No. OP43, (Calbiochem, USA)
Anti-rabbit IgG-HRP	(Amersham, USA)
Antipain	Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert (Sigma Aldrich, Steinheim)
APN1	Herstellung in 4.2.5 beschrieben.
Aprotinin	Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert (Sigma Aldrich, Steinheim)
Collagenase Typ IA, 824 U/mg,	Kat.Nr.C-2674 (Lot Nr. 117H8620, Sigma Aldrich, Steinheim)
ECL Anti-mouse IgG	ECL Anti-rabbit IgG, peroxidase-linked Ab (Amersham)
ECL Anti-rabbit IgG	ECL Anti-rabbit IgG, peroxidase-linked Ab (Amersham)
Endonuklease III	Endonuklease III, (zur Verfügung gestellt von S. Boiteux (CEA, Département de Radiobiologie et Radiopathologie, UMR217 CNRS/CEA, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France)
Fpg-Protein (rein)	(Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase) aus Escherichia coli; zur Verfügung gestellt von S. Boiteux (CEA, Département de Radiobiologie et Radiopathologie, UMR217 CNRS/CEA, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France)
Fpg-Protein (Rohextrakt)	(Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase) aus Escherichia coli; hergestellt als Rohextrakt von M. Osterod nach (Boiteux et al., 1990)
γ -H2AX AK	Anti-phospho-Histon H2A.X (Ser139), clone JBW301 (biomol, Hamburg)
humanes Ogg1 AK	dhOgg1-Monoklonaler Kaninchen-Antikörper, hergestellt von S. Boiteux (CEA, Département de Radiobiologie et Radiopathologie, UMR217 CNRS/CEA, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France)
Leupeptin, Trifluoroacetat-Salz	Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert (Sigma Aldrich, Steinheim)
NTG 2-Protein (rein)	(DNA-Glykosylase/AP-Lyase) aus Saccharomyces cerevisiae; zur Verfügung gestellt von S. Boiteux (CEA, Département de

	Radiobiologie et Radiopathologie, UMR217 CNRS/CEA, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France)
Ogg1-Protein (rein)	(8-oxoG-DNA-Glykosylase/AP-Lyase) aus <i>Drosophila melanogaster</i> ; zur Verfügung gestellt von S. Boiteux (CEA, Département de Radiobiologie et Radiopathologie, UMR217 CNRS/CEA, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France)
Phospho-p53 (Ser15) Antikörper	p53(Ser15) Rabbit, detektiert die aktivierte an Ser15 phosphorylierte Form von p53; (Cell Signaling Technology, Danvers, USA)
Proteinase K	lyophilisiert, aus <i>Tritirachium album</i> (Roth, Karlsruhe)
Rhodamine Red-X-Anti-Maus AK	Rhodamine Red TM -X-conjugated AffiniPure Goast Anti-Mouse IgG (H+L) (115-295-003/ lot 64039) 1,5 mg/ml (dianova GmbH Hamburg / Jackson ImmunoResearch Lab., Inc.)

4.1.5 DNA & RNA

PM2-Plasmid-DNA	Größe: 10000 bp; DNA des Bakteriophagen PM2, Präparation nach (Salditt et al., 1972) von Ina Schulz, Mainz (V 806 I)
34-mer Oligonukleotid	5'- [α^{32} P]-ATP radioaktiv markiertes Oligonukleotid der Sequenz: 5'-GGCTTCATCGTTATT(8-oxoG)-ATGACCTG GTGGATACCG-3' zur Verfügung gestellt von S. Boiteux (CEA, Département de Radiobiologie et Radiopathologie, UMR217 CNRS/CEA, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France)
Kalbsthymus-DNA	(Serva, Heidelberg)
p53-siRNA	RNA Oligonukleotid (Dharmacon, Lafayette, CO, USA)

4.1.6 Zellen

AS52 (CHO-Zellen)	Ovarienzellen des Chinesischen Hamsters, erhalten von W.J. Caspary (Laboratory of Environmental Carcinogenesis and Mutagenesis, Research Triangle Park, North Carolina, USA).
-------------------	---

FB2-299	Neonatale Fibroblasten von menschlichen Vorhäuten, erhalten von T. Rünger (BUMC Department of Dermatology, Boston, USA).
F11.1	Adhärenz wachsende, immortalisierte Fibroblasten von C57/BL6-Wildtyp-Mäusen. Zur Verfügung gestellt von D. E. Barnes (Imperial Cancer Research Fund, Clare Hall Laboratories, South Mimms, Hertfordshire EN6 3LD, UK).
Hela WT	Hela-Zellen sind menschliche, adhärenz wachsende; Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs). Sie sind die ersten menschlichen Zellen, von denen eine permanente Zellkultur etabliert wurde. Im Jahr 1951 entfernte ein Chirurg bei der Patientin Henrietta Lacks (Hela), einige dieser Zellen von einem Karzinom am Muttermund, um sie auf ihre Malignität zu untersuchen. Das Karzinom stellte sich als sehr bösartig heraus und die Patientin verschied 8 Monate später. Die entfernten Zellen waren vom humanen Papillomavirus 18 (HPV18) befallen und hatten daher veränderte Eigenschaften gegenüber normalen Zervixzellen, wie Unsterblichkeit und hohe Teilungsraten.
MCF7	Adhärenz wachsende, p53-profiziente Fibroblasten aus menschlichem Brustkrebsgewebe gewonnen, erhalten von P. Radicella (CEA, Paris, France).
Primäre Keratinozyten	Adhärenz wachsende, neonatale Keratinozyten von menschlichen Vorhäuten, erhalten von T. Rünger (BUMC Department of Dermatology, Boston, USA).
V79-MZ	Immortalisierte Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters erhalten von Prof. H.R. Glatt (Potsdam-Rehbrücke), auch V79-MZ Wildtypzellen genannt (Glatt et al., 1990).
V79-hOR	Immortalisierte Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters erhalten von Prof. H.R. Glatt (Potsdam-Rebrücke), Zellen überexprimieren humane Oxidoreduktase.

4.1.7 Puffer, Lösungen, Medien

4.1.7.1 Zellkultur

PBS		8 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 0,2 g KH ₂ PO ₄ 0,134 CaCl ₂ x 2 H ₂ O 0,1 MgCl ₂ x 6 H ₂ O mit H ₂ O _{dest.} ad 1000 ml
PBSCMF (10 fach)		80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 2 g KH ₂ PO ₄ mit H ₂ O _{dest.} ad 1000 ml
PBSCMF (1 x) (autoklaviert)	pH 7,4	10 % PBSCMF (10 fach) H ₂ O _{dest.}
Natriumpyruvat		100 mM
Trypsin/EDTA		0,5 g/l Trypsin 0,2 g/l EDTA
Kulturmedium für AS52		Ham's F12 5 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg/ml)
Kulturmedium für FB2-299		DMEM (4,5 g/l Glucose) 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg/ml)
Kulturmedium für Hela WT		DMEM (4,5 g/l Glucose) 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg/ml) je 1 % Uridin

		1 % Na-Pyruvat
Kulturmedium für MCF7		DMEM (4,5 g/l Glucose) 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg/ml) 1 % Na-Pyruvat
Kulturmedium für MEF-Zelllinien		DMEM (4,5 g/l Glucose) 15 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg/ml)
Kulturmedium für V79-MZ/hOR		DMEM (4,5 g/l Glucose) 5 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg/ml)
Kulturmedium für primäre Keratinozyten (nach der Ersten Passage)		KBM-2 Medium (Serum frei) bovine pituitary extract human epidermal growth factor Insulin Hydrocortisone Amphotericin B Epinephrine Transferrin (KGM [®] -2 SingleQuots, Cambrex) Calcium Konzentration 0,15 mM CaCl ₂)
Tirapazamin-Stammlösung		5 mM in H ₂ O _{dest.}

4.1.7.2 Alkalische Elution

PBSCMF (autoklaviert)	pH 7,4	137 mM NaCl 2,70 mM KCl 8,30 mM NaH ₂ PO ₄ 1,50 mM KH ₂ PO ₄
BE1(15) (autoklaviert)	pH 7,5	100 mM NaCl 20 mM Tris-HCl

		1,0 (15,0) mM Na ₂ EDTA
BE1/BSA (autoklaviert)	pH 7,5	100 mM NaCl 20 mM Tris-HCl 1,00 (15,0) mM Na ₂ EDTA 0,10 g/l BSA
TC-Puffer (mit BSA)	pH 8,0	50 mM Tris-HCl 25 mM CaCl ₂ 0,5 g/l BSA
Lysepuffer	pH 10,0	100 mM Glycin 20 mM Na ₂ EDTA 2 % SDS pH-Wert mit 2 N NaOH eingestellt
Lysepuffer (mit Proteinase K)	pH 10,0	100 mM Glycin 20 mM Na ₂ EDTA 2 % SDS pH-Wert mit 2 N NaOH eingestellt 400 mg/l Proteinase K
Waschpuffer (autoklaviert)	pH 10,0	20 mM Na ₂ EDTA pH-Wert mit 2 N NaOH eingestellt
Elutionspuffer	pH 12,1	20 mM H ₄ EDTA pH-Wert mit TEAH eingestellt
DNA-Standard		200,0 µg/ml Kalbsthymus-DNA in BE1-Puffer
Bisbenzimid-Stammlösung		0,15 mM in H ₂ O _{dest.} (Hoechst No. 33258) die Lösung wird aliquotiert bei -20 °C gelagert
Phosphatpuffer PP I (autoklaviert)	pH 6,0	100 mM Na ₂ HPO ₄

Phosphatpuffer PP II (autoklaviert)	pH 7,2	100 mM Na ₂ HPO ₄ mit Bisbenzimid (1,0 % (v/v) Bisbenzimid-Stammlösung)
--	--------	---

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

4.1.7.3 DNA-Relaxationsassay

4.1.7.3.1 Enzyminkubation

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

4.1.7.3.2 Agarosegelelektrophorese

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

Ethidiumbromid-Stammlsg.		1 g/l in H ₂ O _{dest.}
BE1-Puffer (autoklaviert)	pH 7,5	100 mM NaCl 20 mM Tris-HCl 1,0 mM Na ₂ EDTA
Stoppuffer	pH 7,8	40 mM Tris-HCl 5 mM Na-Acetat 21 mM EDTA 0,05 % Bromphenolblau 70 % Glycerin 4 % SDS

4.1.7.4 Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen

BSA-Lösung 1 %		1 % BSA in PBS
NP-40-Lösung 0,1 %		0,1 % Igepal in PBS
Paraformaldehydlösung		4 % Paraformaldehyd in PBS
PBS	pH 7,4	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 0,2 g KH ₂ PO ₄ 0,134 CaCl ₂ x 2 H ₂ O 0,1 MgCl ₂ x 6 H ₂ O mit H ₂ O _{dest.} ad 1000 ml
Triton X-Lösung 0,5 %		0,5 % Triton [®] X-100 in PBS
Ziegenserum 10 %		10 % normales Ziegenserum in 0,1 % NP-40-Lösung

4.1.7.5 Präparation von APN1

Ampicillinlösung.		100 mg/ml Na-Ampicillin in H ₂ O _{dest.} sterilfiltrieren und bei -20 °C lagern
-------------------	--	---

Glutahionelutionspuffer (GEP)	0,462 g GSH ad 50 ml Tris-HCl (pH 8,0) pH-Wert mit NaOH einstellen
IPTG-Stammlösung	1,0 M IPTG in H ₂ O _{dest.} sterilfiltriert, aliquotiert bei -20 °C lagern
LB-Medium (autoklaviert)	10,0 g Bacto-Trypton (Pepton) pH 7,0 5,0 g Bacto-Hefeextrakt 10,0 g NaCl ad 1,0 l H ₂ O _{dest.} Autoklavieren und dem abgekühlten Medium zusetzen: 1,0 ml Ampicillinlösung (100 µg/ml)
Lysepuffer F	500 mM NaCl 20 mM Tris-HCl (pH 8,0) 2 mM EDTA 1 mM Dithioerithritol (DTT) 5 % Glycerin 1 mM Benzamidin 1 mM AEBSF 1/2500 AAL in H ₂ O _{dest.}
4.1.7.6 Mikroerntest	
Bisbenzimid-Stammlösung	0,15 mM in H ₂ O _{dest.} (Aliquots: -20 °C)
PBSCMF (10X)	80 g NaCl 2 g KCl 1,5 g NaHPO ₄ x 2 H ₂ O ad 1 l mit H ₂ O _{dest.}
PBSCMF (1X, autoklaviert)	100 ml PBSCMF (10 X) ad 1 l mit H ₂ O _{dest.}
PBSCMF/Bisbenzimid	1 ml Bisbenzimid-Stammlösung ad 80 ml mit H ₂ O _{dest.} (4 °C)

4.1.7.7 HPRT-Mutationstest

Giemsa-Lösung	100 ml Giemsa (Fluka 48900) ad 1 l mit H ₂ O _{dest.}
Glutamin-Lösung	29,22 g L-Glutamin ad 1 l mit H ₂ O _{dest.} bei -20 °C 1 Jahr aliquotiert haltbar
Thioguanin-Lösung	10 mg 6-Thioguanin ad 1ml mit H ₂ O _{dest.}
PBSCMF (10X)	80 g NaCl 2 g KCl 1,5 g NaHPO ₄ x 2 H ₂ O ad 1 l mit H ₂ O _{dest.}
PBSCMF (1X, autoklaviert)	100 ml PBSCMF (10 X) ad 1 l mit H ₂ O _{dest.}

4.1.7.8 Bestimmung der Toxizität in Säugerzellen

PBSCMF (10X)	80 g NaCl 2 g KCl 1,5 g NaHPO ₄ x 2 H ₂ O ad 1 l mit H ₂ O _{dest.}
PBSCMF (1X, autoklaviert)	100 ml PBSCMF (10 X) ad 1 l mit H ₂ O _{dest.}
Giemsa-Lösung	100 ml Giemsa (Fluka 48900) ad 1 l mit H ₂ O _{dest.}

4.1.7.9 Plasmidisolierung

LB-Medium (autoklaviert)	pH 7,5	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Bacto-Hefe-Extrakt 10 g/l NaCl Mit 1 N NaOH auf pH 7,5
Nach dem Autoklavieren:		100 µg/ml Ampicillin

Topagar (autoklaviert) Nach dem Autoklavieren:		14 g/l Agar 5 g/l NaCl 100 µg/ml Ampicillin
Puffer P1		50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A
Puffer P2		200 mM NaOH 1 % SDS
Puffer P3	pH 5,5	3,0 M Ka-Acetat
QBT-Puffer		750 mM NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % Isopropanol 0,15 % Triton® X-100
QC-Puffer		1,0 M NaCl 50 mM MOPS, pH 7,0 15 % Isopropanol
QF-Puffer		1,25 M NaCl 50 mM Tris-HCl, pH 8,5 15 % Isopropanol
TE-Puffer		10 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 mM EDTA
 <i>4.1.7.10 Depletion von Glutathion</i>		
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

4.1.7.11 Quantifizierung des Glutathiongehaltes

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 ₂ O _{dest.}
Phosphat/EDTA-Puffer (autoklaviert)	pH 7,5	7,98 g Na ₂ HPO ₄ 0,86 g NaH ₂ PO ₄ (0,125 M Phosphat) 1,18 g Na ₂ EDTA (6,3 mM EDTA) ad 500 ml mit H ₂ O _{dest.}
Phosphat/NADPH-Lösung		0,3 mM Na ₄ 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 (frisch angesetzt)		20 mM Glutathion (reduziert) in Phosphat/EDTA-Puffer
<h4>4.1.7.12 p53-“knockdown“ in primären Zellen</h4>		
p53-siRNA-Lösung (20 µM)		20 nmol p53-siRNA 1,0 ml Universal Puffer [20 mM KCl, 6 mM HEPES pH 7,5 0,2 mM MgCl ₂] (Dharmacon, Lafayette, CO, USA) die Lösung wird aliquotiert und bei -80 °C gelagert
GFP-Lösung (20 µM)		20 nmol GFP Duplex I 1,0 ml Universal Puffer [20 mM KCl, 6 mM HEPES pH 7,5 0,2 mM MgCl ₂] (Dharmacon, Lafayette, CO, USA) die Lösung wird aliquotiert und bei -80 °C gelagert
siRNA Puffer 5 X		100 mM KCl 30 mM HEPES-pH7,5 1,0 mM MgCl ₂ in RNase-freien H ₂ O _{dest.}

siRNA Puffer 1 X	1 ml siRNA Puffer 5 X ad 5 ml RNase-freies H ₂ O
------------------	--

4.1.7.13 Herstellung von Zellextrakten

Erntepuffer oP (ohne Proteaseinhibitoren)	2,5 ml Tris-HCl (1 M pH 7,5) 5,0 ml NaCl (1,5 M) 100 µl Triton X-100 2,5 ml NaDoc 10 % 1 Woche bei 4 °C haltbar
---	---

Erntepuffer mP (mit Proteaseinhibitoren)	1,0 ml Erntepuffer oP 10 µl Aprotein 25 µl MgCl ₂ (1 M) 5 µl P.M.S.F. (0,2 M) 1 Tag bei 0 °C haltbar
--	---

4.1.7.14 Bestimmung der Proteinkonzentration

BioRad DC Protein Assay Kit bestehend aus:

BioRad-Reagenz A
BioRad-Reagenz B
BioRad-Reagenz S
(BioRad, Hercules, CA, USA)

BioRad-Reagenz As	20 µl BioRad-Reagenz S 1 ml BioRad-Reagenz A
-------------------	---

BioRad-Reagenz AsB	100 µl BioRad-Reagenz As 800 µl BioRad-Reagenz B
--------------------	---

4.1.7.15 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

4x Gel Puffer	pH 8,8	84,75 g Tris Base (1,5 M) 450 ml H ₂ O _{dest.} 20,0 ml SDS 10 % (0,4 %) pH-Wert mit konz. HCl einstellen ad 500 ml mit H ₂ O _{dest.} , bei RT lagern
---------------	--------	--

2x Gel Puffer	pH 6,8	3,0 g Tris Base (0,25 M) 90 ml H ₂ O _{dest.} 2,0 ml SDS 10 % (0,2 %) pH-Wert mit konz. HCl einstellen ad 100 ml mit H ₂ O _{dest.} , bei RT lagern
Ammonium Persulfat 10 % (APS)		0,1 g Ammonium Persulfat ad 1,0 ml mit H ₂ O _{dest.} , bei 0 °C lagern
Ladepuffer		4 ml 2x Gel Puffer 4 ml SDS 10 % 1 ml Glycerol 100 % 20 mg Bromphenolblau 400 µl β-Mercaptoethanol 600 µl H ₂ O _{dest.}
5x Laufpuffer		15 g Tris Base 72 g Glycin 50 ml SDS 10 % 950 ml H ₂ O _{dest.}
1x Laufpuffer		200 ml 5x Laufpuffer Ad 1 l mit H ₂ O _{dest.}
Sammelgel 3,9 %		10,8 ml H ₂ O _{dest.} 15,0 ml 2x Gel Puffer 3,9 ml Acrylamid/Bisacrylamid Lösung wird mind. 30 Minuten entgast 1 Woche bei 4 °C haltbar
Vor Verwendung:		150 µl 10 % APS 30 µl TEMED
Trenngel 10 %		25,0 ml H ₂ O _{dest.} 15,0 ml 4x Gel Puffer 20,0 ml Acrylamid/Bisacrylamid Lösung wird mind. 30 Minuten entgast 1 Woche bei 4 °C haltbar

vor Verwendung werden 200 µl 10 % APS und 40 µl TEMED hinzugefügt.

4.1.7.16 Proteintransfer (Western-Blot), Detektion mit Antikörpern

Transfer Puffer	14,4 mg Tris Base 69,18 mg Glycin 4800 ml H ₂ O _{dest.} 1200 ml Methanol bei 4 °C lagern
Coomassieblau-Lösung	0,5 g Coomassie Brilliant Blue R (1 %) 200 ml Methanol 50 ml Essigsäure 250 ml H ₂ O _{dest.}
Gel-Wasch-Lösung	200 ml Methanol 50 ml Essigsäure 250 ml H ₂ O _{dest.}
Gel-Wasch-Lösung G	100 ml Gel-Wasch-Lösung 2 ml Glycerol
Tween 20 %	10 ml Tween 40 ml H ₂ O _{dest.}
PBS/Tween (0,05 %)	2,5 ml Tween 20 % 1 l PBS
Milch 1 %	0,1 g Blocker (non-fat dry milk) 10 ml PBS/Tween (0,05 %)
Milch 5 %	1,25 g Blocker (non-fat dry milk) 25 ml PBS/Tween (0,05 %)
BSA 1 %	1 % BSA 10 ml PBS/Tween (0,05 %)
Antikörperlösung I a frisch herstellen!	10 µl Anti-p53 (Ab-6) Maus mAb 10 ml Milch 1 %
Antikörperlösung I b frisch herstellen!	10 µl Phospho-p53 (Ser15) Antikörper 10 ml BSA 1 %

Antikörperlösung I c	10 µl Actin (I-19) Antikörper 10 ml Milch 1 % frisch herstellen, es ist kein sekundärer AK notwendig, da HRP bereits vorhanden!
Antikörperlösung II a	5 µl anti-rabbit IgG-HRP 10 ml PBS/Tween (0,05 %)
Antikörperlösung II b	5 µl anti-mouse IgG-HRP 10 ml PBS/Tween (0,05 %)

4.1.7.17 Bestimmung der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität

AEBSF	0,4 mM	
APS 10 %	100 mg APS ad 1,0 ml H ₂ O _{dest.} frisch ansetzen!	
Chloroform/Ethanol (1:1)	10 ml Ethanol 10 ml Chloroform mischen, 20 ml TE-Puffer (pH 8,0) gut schütteln, nach dem Trennen der Phasen die untere verwenden	
EDTA 0,5 M	pH 8,0	18,61 g Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O 80,0 ml H ₂ O _{dest.} lösen 2,0 g NaOH-Pellets pH-Wert mit 10 N NaOH einstellen
Lysepuffer MIT Salz (10x)	2,0 ml Tris-HCl 1 M pH 8,0 200 µl EDTA 0,5 M pH 8,0 5,0 ml NaCl 5 M ad 10,0 ml H ₂ O _{dest.}	
Lysepuffer OHNE Salz (10x)	2,0 ml Tris-HCl 1 M pH 8,0 200 µl EDTA 0,5 M pH 8,0 ad 10,0 ml H ₂ O _{dest.}	

Lysepuffer MS	1:10 Lysepuffer MIT Salz (10x) in H ₂ O _{dest.}
Lysepuffer OS	1:10 Lysepuffer OHNE Salz (10x) in H ₂ O _{dest.}
NaAcetat 1 M	2,72 g NaAcetat ad 20,0 ml H ₂ O _{dest.}
NaCl, 5 M	29,22 g NaCl ad 100 ml mit H ₂ O _{dest.}
Oligonukleotid-Lösung	0,2 µl Oligonukleotid (25 fmol) 9,8 µl Lysepuffer OHNE Salz
PNK-Puffer (10x)	0,5 ml Tris-HCl, 1 M (pH 7,6) 0,1 ml MgCl ₂ , 1 M 2 µl EDTA, 0,5 M ad 1 ml mit H ₂ O _{dest.}
Polyacrylamidlösung	10 ml TBE (10X) 42 g Harnstoff 50 ml Acrylamid-Lösung (40 %, 19/1) Herstellung: Harnstoff durch Erwärmen im Wasserbad lösen, mit H ₂ O _{dest.} auf 100 ml auffüllen, filtrieren. Bei 4 °C vier Wochen lang verwendbar.
Polyacrylamidlösung (0,25 %)	40 µl Tris-HCl 1 M pH 7,8 20 µl NaAcetat 1 M pH 7,0 2 µl EDTA 0,5 M pH 8,0 10 µl APS 10 % 1 µl TEMED 125 µl Acrylamid-Lösung (40 %, 19/1) 802,0 µl H ₂ O _{dest.}

Alles in 1,5er Cap pipettieren (ohne APS), kurz vortexen, von dieser Lösung 99 µl in 2,0er Cap und 1 µl APS 10 % hinzu pipettieren, 30 min bei RT polymerisieren lassen, 2,5 faches Volumen (250,0 µl) EtOH abs. hinzugeben, kurz vortexen, 10 min bei 12000 rpm und RT zentrifugieren, Überstand abziehen und das Pellet in 37 °C warmen H₂O_{dest.} (20 faches Volumen = 2,0 ml) lösen.

SDS 10 %	pH 7,2	10 g Sodiumdodecylsulfat in wenig H ₂ O _{dest.} lösen, dann auf 100 ml auffüllen pH-Wert mit verdünnter HCl einstellen
Stoppuffer		110 µl TBE (10X) 100 µl Xylencyanol 1 %ig 100 µl Bromphenolblau
TBE-Puffer (10x)		800 µl deionisiertes Formamid 90 % 108,0 g Tris-Base 55,0 g Borsäure 40,0 ml EDTA 0,5 M pH 8,0 pH-Wert mit verdünnter HCl einstellen ad 1,0 l mit H ₂ O _{dest.}
TBE-Puffer (1X)		100 ml TBE-Puffer (10X) ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest.}
TE-Puffer (10x)	pH 8,0	1,212 g Tris-Base 2,0 ml EDTA 0,5 M pH 8,0 ad 100 ml mit H ₂ O _{dest.} pH-Wert mit konz. HCl einstellen
TE-Puffer (1X)		10 ml TE-Puffer (10X) ad 100 ml mit H ₂ O _{dest.}
Tris-HCl	pH 8,0 12,11 g 80 ml 4,2 ml	pH 7,8 12,11 g Tris-Base 80 ml H ₂ O _{dest.} 4,4 ml HCl konz.

mit H₂O_{dest.} auf 100,0 ml auffüllen, darf nicht gelb werden (dann neue Tris-Base verwenden) abkühlen lassen auf RT, dann erst mit konz. HCl finalen pH einstellen

4.1.7.18 Luciferase Assay

Passive Lysis Buffer 1x (PLB)

eine 1:5 Verdünnung von PLB 5x in
RNase freies H₂O
die Lösung wird frisch hergestellt pro
Zellkulturschale werden 300 µl benötigt

Luciferase Assay Substrat		1 vial Luciferase Assay Substrate in 10 ml Luciferase Assay Buffer (Luciferase Assay Reagent, (Promega, Madison, WI, USA) die Lösung wird bei -80 °C gelagert
Transfektionslösung A		25 µg Plasmids 125 µl RNase freies H ₂ O 125 µl Opti-Mem® I 5 Minuten bei RT inkubieren!!
Transfektionslösung B		16 µl Lipofectamin™ 2000 244 µl Opti-Mem® I 5 Minuten bei RT inkubieren!!
Transfektionslösung AB		500 µl Transfektionslösung A 500 µl Transfektionslösung B 20 Minuten bei RT inkubieren!!
<i>4.1.7.19 Test auf Mycoplasmen</i>		
PBSCMF (autoklav.)	pH 7,4	137 mM NaCl 2,70 mM KCl 8,30 mM NaH ₂ PO ₄ 1,50 mM KH ₂ PO ₄
Bisbenzimid-Stammlösung (Hoechst No. 33258)		0,15 mM in H ₂ O _{dest.} die Lösung wird aliquotiert bei -20 °C gelagert
Färbelösung		99,5 ml PBSCMF 5,0 ml Bisbenzimid-Stammlösung

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Allgemeine Arbeitstechniken

Sämtliche Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen innerhalb einer Laminar-Flow-Box (Sterilwerkbank) durchgeführt. Die hier verwendeten Zelllinien wurden bei 37 °C, 5 % Kohlendioxid-Atmosphäre und 99 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Abhängig von der Verdopplungszeit der Zelllinie wurden die Zellen passagiert bzw. es erfolgte ein Mediumwechsel spätestens alle drei Tage.

4.2.1.1.1 Allgemeine Zellpassage

Das Passagieren der Zellen (adhärente Zellen) erfolgt, indem man das auf den Zellen befindliche und verbrauchte Medium abpipettiert, anschließend einmal mit 10 ml PBSCMF wäscht, um vorhandene Restmengen dieses Mediums zu entfernen und mit 1-2 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei RT oder 37 °C inkubiert. Die Inkubationszeit der Trypsin/EDTA-Lösung hängt von der jeweiligen Zelllinie ab, sollte jedoch acht Minuten nicht überschreiten, da sonst die Viabilität der Zellen sinkt. Es wird gewartet, bis sich die Zellen durch Klopfen vollständig ablösen. Der Ablösevorgang wird unter einem Lichtmikroskop visuell kontrolliert. Anschließend wird wie in Abschnitt 4.2.1.1.3 beschrieben verfahren.

4.2.1.1.2 Zellpassage von primären Keratinozyten

Primäre Keratinozyten müssen, da sie auf mit γ -Strahlen immortalisierten NIH3T3-Feeder-Zellen wachsen, zuerst von diesen getrennt werden. Hierzu wäscht man die Zellen nach Entfernen des Mediums zuerst einmal mit 10 ml PBSCMF und inkubiert anschließend mit 1 ml Trypsin für drei bis vier Minuten. Das Ablösen der Feeder-Zellen wird im Lichtmikroskop kontrolliert. Nun entfernt man das Trypsin/Zellgemisch durch Abpipettieren, wäscht erneut mit PBSCMF und gibt nochmals 1 ml Trypsin auf die verbleibenden Keratinozyten. Diese inkubiert man für ca. acht Minuten, bis sie sich vollständig abgelöst haben. Die Zellen werden in 10 ml frischem DMEM-Medium mit 10 % FCS resuspendiert, um die Enzymaktivität des Trypsins zu inaktivieren. Die Keratinozyten werden durch Zentrifugation (5 Minuten bei 1000 rpm) von dem Medium getrennt, welches anschließend verworfen wird. Mit dem nun vorhandenen Keratinozyten-Zellpellet wird wie in Abschnitt 4.2.1.1.3 verfahren. Ein erneutes Passagieren der Zellen ist nicht möglich.

4.2.1.1.3 Aussäen von abgelösten Zellen

Die Zellen werden in frischem Kulturmedium resuspendiert und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Das im Medium enthaltene FCS bzw. die in ihm enthaltenen Bestandteile inaktivieren zugleich die Enzymaktivität des Trypsins. Anschließend wird die Zellzahl bestimmt, indem man 200 µl der Zellsuspension 1:50 mit Isoton II (physiologische Kochsalzlösung) verdünnt und mit Hilfe eines Coulter CounterTM Zellzählgerätes die Zellkonzentration bestimmt. Darauf folgend wird die benötigte Anzahl Zellen (abhängig von der Zellkulturflaschengröße) mit frischem, vorgewärmten (37 °C) Kulturmedium versetzt und in neue Zellkulturflaschen überführt. In allen Versuchen mit Säugerzellen werden, wenn nicht anders angegeben, Zellen aus der exponentiellen Wachstumsphase bzw. aus vorkonfluenten Stadien ihres Wachstums verwendet. Um einer Veränderung der Zellen während der Kulturphase vorzubeugen, wurden die Zellen maximal bis zur Passage 25 für die Versuche verwendet.

4.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Um Zelllinien sicher über mehrere Jahre zu lagern, werden diese in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Dazu löst man die Zellen, wie im Abschnitt 4.2.1.1 beschrieben, ab und zentrifugiert die resuspendierte Zellsuspension in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge bei 1200 g für 5 min ab. Der Überstand wird dekantiert und das Zellpellet in vorgekühltem Medium mit 10 % DMSO resuspendiert. Die Zelldichte sollte dabei 10^6 - 10^7 Zellen/ml betragen. Anschließend werden Aliquots von ca. 1,5 ml in Kryoröhrchen zunächst 2 h bei -20 °C gefroren, dann über Nacht bei -70 °C aufbewahrt und am nächsten Morgen in flüssigem Stickstoff deponiert. Die Lagerzeit bei -70 °C sollte 6 Monate nicht überschreiten. In flüssigem Stickstoff können die Zellen bis zu mehreren Jahren gelagert werden.

Zur Rekultivierung der Zellen wird das Kryoröhrchen mit der Hand leicht erwärmt, bis sich die Suspension vom Rand des Röhrchens löst. Sofort danach wird, um schädigende Wirkungen des Einfriermediums zu vermeiden, der Inhalt in ein steriles, mit 10 ml warmem Kulturmedium gefülltes 50 ml Greinerröhrchen überführt und bei Raumtemperatur zentrifugiert (1000 g, 5 min). Der Überstand wird dekantiert, das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche ausgesät. Spätestens nach 24 h Inkubation im Brutschrank wird das Medium erneut gewechselt.

Untersuchungen an rekultivierten Zellen werden frühestens nach 2 Passagen vorgenommen, um Einflüsse der Kryokonservierung möglichst ausschließen und einen „normalen“ Zellstatus garantieren zu können.

4.2.1.3 Zelllinien

4.2.1.3.1 AS52

Es handelt sich um adhärent wachsende Ovarienzellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) (Hsie et al., 1975; Tindall et al., 1984; Tindall and Stankowski, 1989), zur Verfügung gestellt von W.J. Caspary (Laboratory of Environmental Carcinogenesis and Mutagenesis, Research Triangle Park, North Carolina, USA). Die Zelllinie stammt von der CHO-K1-BH4-Zelllinie ab, in der die einzige Kopie des hemizygoten Säugergens HPRT (auf dem X-Chromosom) mutiert wurde. Durch Transformation mit dem pSV2-gpt Vektor wurde eine Kopie des analogen bakteriellen gpt-Gens (Ecogpt), welches für die Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (XPRT bzw. XGPRT) kodiert, eingeführt (Mulligan and Berg, 1980). Die Trypsininkubation sollte bei 37 °C 60 s nicht überschreiten. Die Verdopplungszeit beträgt 14-16 h.

4.2.1.3.2 FB2-299

Adhärent wachsende, neonatale Fibroblasten von menschlichen Vorhäuten. Zur Verfügung gestellt von T. Rüniger (BUMC Department of Dermatology, Boston, USA). Die Generierung ist beschrieben in (Stanulis-Praeger and Gilchrest, 1989). Die Trypsininkubation erfolgt bei 37 °C für drei bis vier Minuten. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 24 h.

4.2.1.3.3 F11.1

Adhärent wachsende, immortalisierte Fibroblasten von C57/BL6-Wildtyp-Mäusen. Zur Verfügung gestellt von D. E. Barnes (Imperial Cancer Research Fund, Clare Hall Laboratories, South Mimms, Hertfordshire EN6 3LD, UK). Die Trypsininkubation erfolgt bei 37 °C für drei bis vier Minuten. Die F11.1-Zellen lassen sich nach dem Ablösen erst durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer Pipette wieder vereinzeln. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 23 h.

4.2.1.3.4 Hela WT

Hela-Zellen sind menschliche, adhärent wachsende, Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (Gebärmutterhalskrebs). Sie sind die ersten menschlichen Zellen, von denen eine permanente Zellkultur etabliert wurde. Im Jahr 1951 entfernte ein Chirurg bei der Patientin Henrietta Lacks (Hela) einige dieser Zellen von einem Karzinom am Muttermund, um sie auf ihre Malignität zu untersuchen. Das Karzinom stellte sich als sehr bösartig heraus und die Patientin verschied 8 Monate später. Die

entfernten Zellen waren vom humanen Papillomavirus 18 (HPV18) befallen und hatten daher veränderte Eigenschaften gegenüber normalen Zervixzellen, wie Unsterblichkeit und hohe Teilungsraten. Die Trypsininkubation erfolgt bei 37 °C für drei bis vier Minuten. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 17 h.

4.2.1.3.5 MCF7

Adhärenz wachsende, p53-profiziente Fibroblasten, aus menschlichem Brustkrebsgewebe gewonnen. Zur Verfügung gestellt von P. Radicella (CEA, Paris, France). Die Trypsininkubation erfolgt bei 37 °C für drei bis vier Minuten. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 24 h.

4.2.1.3.6 Primäre Keratinozyten

Adhärenz wachsende, neonatale Keratinozyten von menschlichen Vorhäuten. Zur Verfügung gestellt von T. Rüniger (BUMC Department of Dermatology, Boston, USA). Die Generierung ist beschrieben in (Rheinwald and Green, 1975). Die Trypsininkubation erfolgt bei 37 °C für fünf bis acht Minuten. Es ist nur eine Passage möglich. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 24 h.

4.2.1.3.7 V79-MZ

Immortalisierte Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters erhalten von Prof. H.R. Glatt (Potsdam-Rehbrücke), auch V79-MZ Wildtypzellen genannt (Glatt et al., 1990). Die Generierung ist beschrieben in (Schmalix et al., 1996; Hermersdorfer et al., 1997). Die Trypsininkubation erfolgt bei 37 °C für drei bis vier Minuten. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 20-22 h.

4.2.1.3.8 V79-hOR

Immortalisierte Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters erhalten von Prof. H.R. Glatt (Potsdam-Rehbrücke), die Zellen überexprimieren humane Oxidoreduktase. Die Generierung ist beschrieben in: (Schmalix et al., 1996; Hermersdorfer et al., 1997). Die Trypsininkubation erfolgt bei 37 °C für drei bis vier Minuten. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 24 h.

4.2.2 Alkalische Elution

4.2.2.1 Prinzip

Die Alkalische Elution ist eine sehr empfindliche Methode zur Quantifizierung intrazellulärer DNA-Schäden *in vitro*. Das von Kohn *et al.* (Kohn *et al.*, 1976) entwickelte Verfahren besitzt eine Empfindlichkeit von 0,5 Läsionen/ 10^7 bp, damit ist sie 200mal empfindlicher als der Relaxations-Assay mit PM2-DNA (siehe 4.2.3) und ebenfalls besser zum Nachweis modifizierter DNA-Basen geeignet als vergleichbare Methoden, wie beispielsweise die HPLC/ECD-Analyse (Pflaum *et al.*, 1997). Sie ermöglicht es, Einzelstrangbrüche, DNA-DNA- und DNA-Proteinquervernetzungen nachzuweisen. Mit Hilfe einer modifizierten Version der Alkalischen Elution ist es möglich, durch eine zusätzliche Inkubation mit Reparaturenzymen, neben DNA-Einzelstrangbrüchen auch DNA-Basen-Modifikationen nachzuweisen und zu quantifizieren. Dazu wird die isolierte DNA vor der Elution mit spezifischen Reparaturenendonukleasen inkubiert, welche die entsprechenden Basenmodifikationen erkennen und die DNA dort einschneiden. Dieser Einschnitt wird als Einzelstrangbruch detektiert, so dass ursprüngliche Basenmodifikationen nun zusätzlich als Strangbrüche sichtbar werden. Das Prinzip der Alkalischen Elution ist in Abb. 4-1 schematisch dargestellt.

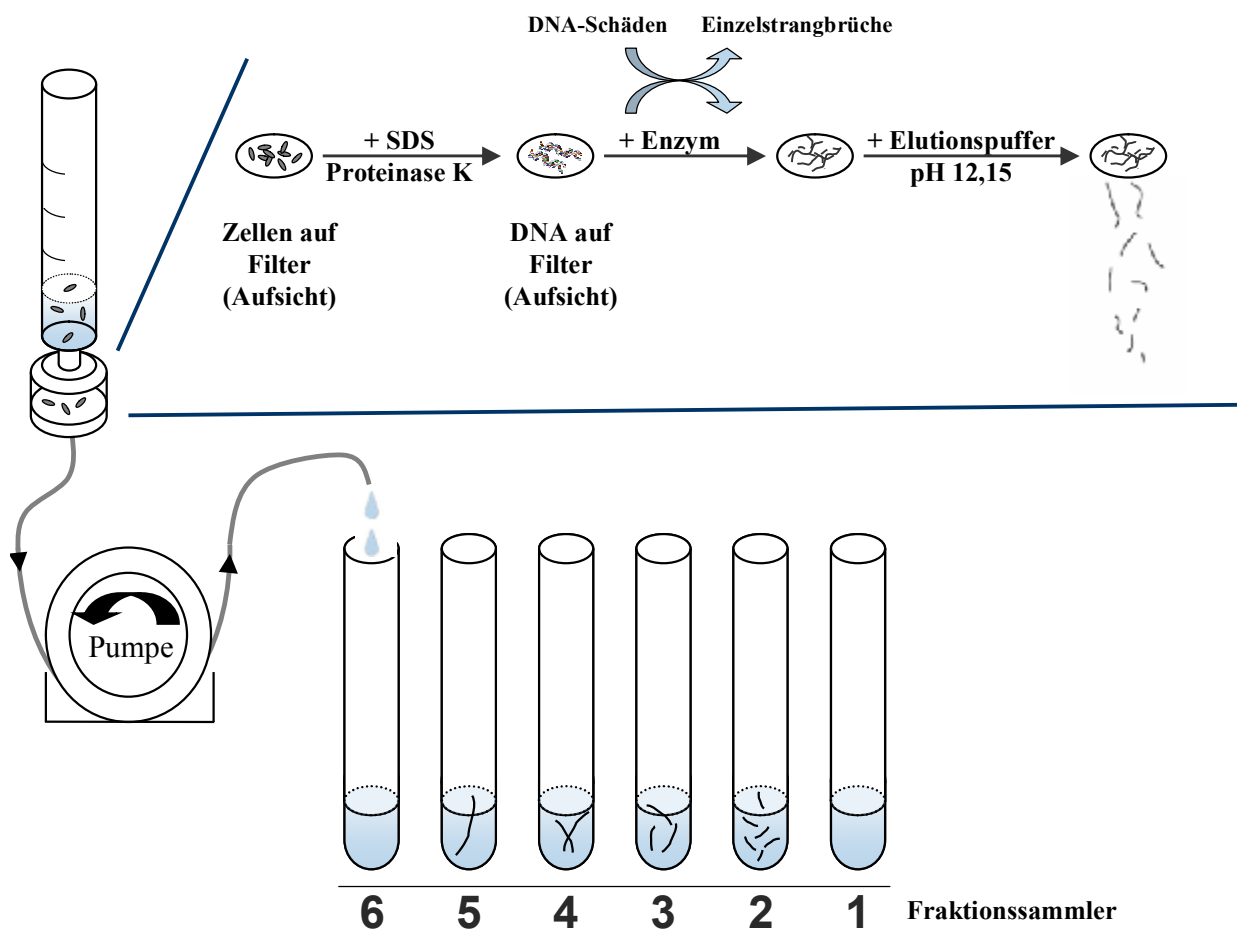


Abb. 4-1: Prinzip der Alkalischen Elution.

Bei der Durchführung der Alkalischen Elution werden in Medium resuspendierte Zellen mit Hilfe einer Spritze auf Polycarbonatfilter aufgetragen und mit PBSCMF gewaschen. Anschließend werden die Zellen durch Spülen mit einem alkalischen Lysepuffer, der SDS und Proteinase K enthält, lysiert. Dadurch werden alle Zellbestandteile, der Hauptteil des zellulären Proteins sowie die RNA vom Filter entfernt. Die doppelsträngige DNA bleibt auf dem Filter zurück. Zum Entfernen des verwendeten Lysepuffers wird mehrmals mit BE1 gewaschen und anschließend mit den Reparaturenzymen inkubiert. Abschließend wird die doppelsträngige DNA durch Zugabe eines alkalischen Puffers (Elutionspuffer pH 12.15), durch Verlust ihrer Wasserstoffbrückenbindungen, in ihre einzelsträngige Form überführt, und die fraktionierte Elution gestartet. Die Elutionsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente ist abhängig von ihrer Länge, bei stark geschädigter DNA liegen kürzere DNA-Bruchstücke und bei weniger stark geschädigter DNA längere Einzelstränge vor. Stark geschädigte DNA wird schneller eluiert und passiert die Poren des Filters schneller, als die weniger stark geschädigte mit den längeren Fragmenten. Ungeschädigte DNA bleibt auf dem Filter zurück. Nach der fraktionierten Elution werden die Eluate mit Phosphatpuffer (PP pH 6,0) neutralisiert, wobei sich die Einzelstränge der DNA wieder zu Doppelsträngen zusammenfügen. Der DNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen sowie die Menge der auf dem Filter verbliebenen DNA werden durch Fluoreszenzmessung mit Bisbenzimid in Phosphatpuffer (PP pH 7,2), welcher in die DNA interkaliert, bestimmt.

Aus dem Anteil der DNA in den einzelnen Fraktionen wird die Elutionsrate der DNA berechnet, sie ist direkt proportional zur Anzahl an Einzelstrangbrüchen und alkalilabilen Läsionen. Zur Kalibrierung der Methode wird eine Schädigung mit γ -Strahlung als Standard gewählt: 6 Gy γ -Strahlung erzeugen dabei eine Läsion pro 10^6 (Kohn et al., 1976).

4.2.2.2 Versuchsaufbau

Pro Ansatz wird eine 25 ml-Einwegspritze (ohne Kolben) mit einem Filterhalter verwendet. Dieser lässt sich aufschrauben, auf dem unteren Teil wird ein Frittenboden befestigt, auf den schließlich der Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von 2 μm und einem Durchmesser von 25 mM aufgelegt wird. Die Zellsuspension und alle verwendeten Lösungen werden von oben in die Einwegspritze pipettiert. Mit Hilfe einer peristaltischen Mehrkanalpumpe wird die Flüssigkeit durch Spritze, Filterhalter und Filter über einen Dialyseschlauch in ein Abfallgefäß gepumpt, wobei darauf zu achten ist, dass zu keiner Zeit Luft durch das Filtersystem eingesaugt wird. Ein temperierbares Wasserbad, in welches die Filterhalter eintauchen, hält die zum jeweiligen Abschnitt des Versuchs benötigte

Temperatur aufrecht. Im letzten Schritt, bei der Elution der DNA, wird anstelle des Abfallbehälters ein Fraktionssammler installiert (Abb. 4-1), der an die Pumpe angeschlossen ist.

4.2.2.3 Vorbereitung und Schädigung der Zellen

4.2.2.3.1 Vorbereitung

Die Frittenböden und die Polycarbonatfilter werden nach dem im vorigen Absatz beschriebenen Einbau in den Filterhalter mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gespült. Der Filterhalter wird danach luftblasenfrei mit 2 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ befüllt. Das Wasserbad wird so befestigt, dass die Filterhalter ganz eintauchen. Die Temperatur wird auf 4 °C eingestellt, um eine Reparatur der DNA-Schäden während des Auftragens der Zellen auszuschließen. Anschließend wird zweimal mit 5 ml kaltem PBSCMF gespült und der Überstand abpipettiert.

Die adhärent wachsenden Zellen werden kurz vor dem Auftragen auf den Filter bzw. gegebenenfalls nach der letzten Behandlung zweimal mit PBSCMF gewaschen und anschließend trypsinisiert und in Suspension gebracht (siehe 4.2.1.1). Falls die Zellen in Suspension geschädigt wurden, ist dies nicht notwendig. Um eine Reparatur der durch eine Schädigung induzierten DNA-Einzelstrangbrüche und Endonuklease-sensitiven Läsionen zu verhindern, werden nach dem Ablösen die Zellen in kaltem Medium resuspendiert, auf Eis gelagert und zügig auf die Filter aufgetragen. Unbehandelte Zellen dienen zur Bestimmung des „steady state“-Spiegels an DNA-Modifikationen.

4.2.2.3.2 Schädigung mit Ro19-8022 und sichtbarem Licht

Zur Schädigung werden die am Boden der Zellkulturflasche festwachsenden Zellen zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen. Nun inkubiert man mit einer aus der Ro19-8022-Stammlösung hergestellten Verdünnung (50 oder 200 nM) in PBSCMF und sichtbarem Licht (1000 Watt Halogenlicht im Bereich von 400-800 nm) aus einer Distanz von 38 cm für 4, 10 oder 15 min bei 0 °C auf Eis. Dies entspricht einer Energiedosis von 66.4, 166 oder 249 kJ/m^2 . Nach der Schädigung wird die Lösung unverzüglich entfernt und erneut zweimal mit kaltem PBSCMF (4 °C) gewaschen.

Wenn der Schaden direkt bestimmt werden soll, trypsiniert man die Zellen durch Zugabe von 1-2 ml warmer Trypsin/EDTA-Lösung ab. Die abgelösten Zellen werden in einem geeigneten Volumen kalten Vollmediums (4 °C) aufgenommen und resuspendiert. Nach Bestimmung der Zelldichte am Coulter CounterTM wird ein mit 1×10^6 Zellen entsprechendes Volumen der Zellsuspension auf die vorbereiteten Filter aufgetragen. Dies entspricht 10 μg DNA.

Falls die Zellen zunächst weiter kultiviert werden sollen, werden sie nicht abgelöst, sondern mit frischem Vollmedium versetzt und für die benötigte Zeit im Brutschrank aufbewahrt.

4.2.2.3.3 Schädigung mit γ -Strahlung

Die adhärennten Zellen werden zunächst zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen, dann mit serumfreien Medium versetzt und auf Eis zu der Strahlungsquelle transportiert. Die Bestrahlung erfolgt mit einem γ -Strahler (^{137}Cs , 5 Gy in 1'18) der benötigten Dosis (1 Gy = 1 J/kg = 100 rad). Anschließend wird wie unter 4.2.2.3.2 nach der Schädigung verfahren.

Zur Überprüfung der Alkalischen Elution werden die Zellen vor der Schädigung abgelöst und auf Eis in einem 15 ml Greinerröhrchen (Zelldichte $1 \times 10^6/\text{ml}$) bestrahlt.

4.2.2.3.4 Schädigung mit Methylmethansulfonat (MMS)

Die Zellen werden zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen. Dann werden 100 bzw. 200 μM MMS in vorgewärmtes, serumfreies Medium zugegeben und die Zellen für 30 min unter Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend wird wie unter 4.2.2.3.2 nach der Schädigung verfahren.

4.2.2.3.5 Schädigung mit Tirapazamin (TPZ)

Die Schädigung mit TPZ erfolgt, nachdem zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen wurde, indem man die benötigte Menge an TPZ (50 μM für die Alkalische Elution) aus der Stammlösung in Medium gibt und für 30 min bzw. 24 h unter Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend wird wie unter 4.2.2.3.2 nach der Schädigung verfahren.

4.2.2.4 Zellyse, Enzyminkubation und alkalische Elution der DNA

Die aufgetragenen Zellen werden zweimal mit je 2 ml kaltem PBSCMF bei maximaler Pumpleistung, damit keine Reste des Kulturmediums mehr vorhanden sind, gewaschen. Gegen Ende des zweiten Spülvorgangs wird die Temperatur des Wasserbades auf 25 °C erhöht. Sobald die Temperatur 15 °C erreicht hat (das im Lysepuffer enthaltene SDS würde bei niedrigeren Temperaturen ausfallen), werden die Zellen mit 2 ml Lysepuffer bei einer Pumpgeschwindigkeit von 80 ml/h lysiert. Anschließend werden 5 ml Lysepuffer mit Proteinase K (0.4 mg/ml) innerhalb von 90 min durchgepumpt (Pumpgeschwindigkeit 3 ml/h). Proteinase K verhindert das Anhaften von Proteinen an der DNA. Nach der Lyse wird sieben Mal mit 5 ml

BE1-Puffer gespült (Pumpgeschwindigkeit 80 ml/h). Beim Auftragen dieses Puffers mit der Multipipette werden gleichzeitig die Wände der Spritze gereinigt, nach jedem Waschschrift werden Reste des Lysepuffers im Vorratsbehälter entfernt. Während des Spülvorganges wird die Temperatur für die Enzyminkubation auf 37 °C erhöht. Für die folgende Enzyminkubation werden 2 ml Enzymlösung bei einer Pumpgeschwindigkeit von 2 ml/h bei 37 °C auf die Filter gegeben. Die Spuren, in denen die Einzelstrangbrüche ohne Enzymzugabe quantifiziert werden sollen, werden mit 13 ml BE1-Puffer befüllt. Die Zusammensetzungen der Puffer und die Konzentrationen der Enzyme sind in Tabelle 4.2.2-1 aufgeführt. Der erste Milliliter der Lösung wird bei maximaler Geschwindigkeit, der zweite innerhalb einer Stunde durch das Filtersystem gepumpt. Falls eine zweite Enzyminkubation durchgeführt wird, werden auf die Filter ohne zweites Enzym lediglich 2 ml BE1-Puffer gegeben, während auf diejenigen mit Enzyminkubation erneut 2 ml Enzymlösung pipettiert wird. Anschließend wird erneut der erste Milliliter der Lösung bei maximaler Geschwindigkeit und der zweite innerhalb einer Stunde durch das Filtersystem gepumpt. Im Anschluss an die Enzyminkubation wird die Temperatur des Wasserbades auf 25 °C eingestellt. Die Reste der Enzymlösung vom Filter werden abpipettiert, zweimal mit 5 ml BE1-Puffer und einmal mit 4 ml Waschpuffer bei einer Pumpgeschwindigkeit von 80 ml/h gewaschen und abschließend die Vorratsbehälter mit 25 ml Elutionspuffer befüllt. Das Auffanggefäß wird durch Ständer mit Reagenzgläsern ersetzt und die Elution gestartet. Die fraktionierte Elution der DNA (Fraktionsgröße ~3,8 ml) erfolgt über 12 h bei einer Pumpgeschwindigkeit von 1,9 ml/h. Alle zwei Stunden findet ein Fraktionswechsel statt, so dass man sechs Fraktionen erhält.

Tabelle 4.2.2-1: Arbeitspuffer und -konzentrationen der in der Alkalischen Elution verwendeten Reparaturenukleasen.

Enzym	Puffer	Arbeitskonzentration
APN1	BE1 mit 0.5 mg/ml BSA	1 µg/ml
Endonuklease III	BE1 mit 0.5 mg/ml BSA	1 ng/ml
Fpg-Rohextrakt	BE1 mit 0.5 mg/ml BSA	10 µg/ml

4.2.2.5 Auswertung der Alkalischen Elution, Quantifizierung der DNA-Menge, Berechnung der einzelnen DNA-Modifikationen

Nach dem die Elution beendet ist, wird der Rest an Elutionspuffer, der sich nach der Elution noch auf den Filtern befindet, in die sechste Fraktion gepumpt. Das Volumen der sechsten Fraktion (Filterwert) sowie das Volumen einer einzelnen Fraktion (Fraktionsvolumen) werden gemessen. Letzterer sollte zwischen 3,5 ml und 4,5 ml liegen (wird zur Überprüfung gemessen). Anschließend werden zunächst die Filterhalter auseinander gebaut und die Fritte inklusive Polycarbonatfilter mit der sechsten Fraktion der jeweiligen Spur in einem Coulter CounterTM-Zählköcher vereinigt. Diese inkubiert unter Schütteln für 2 Stunden bei 60 °C, um so die auf dem Filter zurückgebliebene DNA-Menge in Lösung zu bringen und später bestimmen zu können.

Nach dem Schütteln wird den Filterwerten ein den anderen Fraktionsgrößen entsprechendes Volumen entnommen und alle Fraktionen werden mit dem gleichem Volumen Phosphatpuffer (PP pH 6,0; Raumtemperatur) neutralisiert. Auf diese Weise bilden sich wieder DNA-Doppelstränge aus. Nach 15 min wird das entsprechende Volumen Bisbenzimid, in neutralen Phosphatpuffer (PP pH 7,2; Raumtemperatur) verdünnt (1,5 µM), hinzugegeben. Es ist wichtig bei diesen Schritten auf eine gute Durchmischung der Flüssigkeiten zu achten. Die Proben werden für weitere 15 min unter Lichtausschluss aufbewahrt und schließlich die Emissionsintensität des Bisbenzimid-DNA-Komplexes in den einzelnen Proben bei 450 nm nach Anregung bei 360 nm im Fluoreszenzphotometer ausgewertet. Das Fluorimeter wird dazu zuvor mit einer Blindprobe, bestehend aus dem Fraktionsvolumen an Elutionspuffer, Phosphatpuffer (PP pH 6,0) und Phosphatpuffer (PP pH 7,2) / Bisbenzimid (1,5 µM), auf Null eingestellt. Weiterhin werden die Fraktionen einer Elutionsspur ohne DNA mit vermessen und die Fluoreszenz-Intensitäten dieser einzelnen Fraktionen von den jeweiligen Spuren mit DNA subtrahiert. Die Ergebnisse der Messwerte der Alkalischen Elution werden in eine vorgefertigte Excel-Maske übertragen. Die Läsionen pro 10⁶ bp werden so per Computer berechnet. Die Gesamtmenge der DNA einer Probe ist proportional der Summe der Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Fraktionen und des Filterwertes der Probe. Demgemäß lässt sich der prozentuale Anteil der DNA-Menge jeder Probe, der zu einem bestimmten Zeitpunkt noch auf dem Filter vorlag, berechnen. Trägt man nun den DNA-Gehalt im halblogarithmischen Maßstab gegen die Zeit auf, erhält man eine Gerade, deren Steigung direkt proportional zur Anzahl der Einzelstrangbrüche ist. Dabei wird eine vollkommen zufällige Verteilung der Modifikationen in der DNA vorausgesetzt. Die absolute Zahl an Einzelstrangbrüchen und Endonuklease-sensitiven Modifikationen kann mit folgender Gleichung berechnet werden (Gleichung 4.2.2-1).

$$ESS + SSB = m * -2,24 * 10^{-6}$$

Gleichung 4.2.2-1: Gleichung zur Berechnung der DNA-Modifikationen in der Alkalischen Elution.

SSB (Zahl der Einzelstrangbrüche pro bp); ESS (Endonuklease-sensitive Modifikationen (endonuclease-sensitive sites) pro DNA-Molekül); m (mittlere Steigung).

Der Faktor -2,24 wurde von M. Pflaum durch eine Kalibrierung mit γ -Strahlung bestimmt (Epe et al., 1993a; Pflaum, 1996). Um nur die Endonuklease-sensitiven Modifikationen, d. h. die durch die Inkubation mit der Reparaturenuklease erzeugten Strangbrüche zu erhalten, ist es notwendig, den Anteil der direkten Einzelstrangbrüche (SSB) in Ansätzen ohne Reparaturenuklease abzuziehen.

Der absolute DNA-Gehalt in μg wird durch Messung einer Probe Elutionspuffer, die 4 μg Kalbsthymus-DNA enthält und genauso vorbereitet wird, wie die anderen Fraktionen, bestimmt.

Durch den Einsatz unterschiedlicher Reparaturenuklease und unterschiedlicher Kombinationen dieser (siehe Tabelle 4.2.2-2) können so sensitiv verschiedenste DNA-Modifikationen nachgewiesen werden.

Tabelle 4.2.2-2: I) Erkennungsspektren einer Auswahl menschlicher und bakterieller DNA-Glykosylasen modifiziert nach Epe, (Epe, 1996). II) Erkennungsspektren der unterschiedlichen Kombinationen verschiedener DNA-Glykosylasen.

I				II		
Bakterielles Enzym	Fpg	Endo III	APN1	APN1 + Fpg	APN1 + Endo III	APN1 + Fpg + Endo III
Humanes homologes Protein	hOgg1	hNth	/			
AP-Läsionen						
normal	+	+	+	+	+	+
1'-oxidiert	-	-	+	+	+	+
4'-oxidiert	+	+	+	+	+	+
Basenmodifikationen						
8-Hydroxyguanin	+	-	-	+	-	+
FaPy-Guanin	+	(+) ^b	-	+	(+) ^b	+
FaPy-Adenin	(+) ^a	(+) ^b	-	+	(+) ^b	+
5,6-Dihydropyrimidin	-	+	-	-	+	+
Pyrimidinedimer	-	-	-	-	-	-

^a nicht prozessiert von hOgg1

^b nicht prozessiert von Endo III (siehe Tabelle 2.4.2-1)

Mittels Berechnung können aus der so quantifizierten Summe verschiedener DNA-Modifikationen die einzelnen, unterschiedlichen DNA-Modifikationen bestimmt werden. So werden die oxidierten Pyrimidine nach Gleichung 4.2.2-2 I, reguläre und 4'-oxidierte AP-Läsionen nach Gleichung II, oxidierte Purine nach Gleichung III und abschließend die 1'-oxidierten AP-Läsionen nach Gleichung IV berechnet.

$$\text{I) oxidierte Pyrimidine} = (\text{APN1} + \text{Endo III}) - \text{APN1}$$

$$\text{II) reguläre} + \text{4'-oxidierte} = \text{Endo III} - \text{oxidierte Pyrimidine}$$

$$\text{III) oxidierte Purine} = \text{Fpg} - (\text{reguläre} + \text{4'-oxidierte})$$

$$\text{IV) 1'-oxidierte} = \text{APN1} - (\text{reguläre} + \text{4'-oxidierte})$$

Gleichung 4.2.2-2: I) Berechnung oxidierter Pyrimidine. II) Berechnung regulärer und 4'-oxidierter AP-Läsionen. III) Berechnung regulärer und 4'-oxidierter AP-Läsionen. IV) Berechnung 1'-oxidierter AP-Läsionen.

APN1, Endo III, Fpg und (APN1 + Endo III): Anzahl der mit Hilfe der Alkalischen Elution durch Enzym oder Enzymkombination (siehe Tabelle 4.2.2-2) detektierten DNA-Modifikationen pro 10^6 bp; oxidierte Pyrimidine: Anzahl der berechneten oxidativen Pyrimidin-Modifikationen pro 10^6 bp; reguläre + 4'-oxidierte: Anzahl der berechneten regulären und 4'-oxidierten AP-Läsionen pro 10^6 bp; oxidierte Purine: Anzahl der berechneten oxidativen Purin-Modifikationen pro 10^6 bp; 1'-oxidierte: Anzahl der berechneten 1'-oxidierten AP-Läsionen pro 10^6 bp.

4.2.2.6 Alkalische Schnellelution zur Detektion höherer DNA-Schäden

Mit der oben beschriebenen Modifikation der Alkalischen Elution lassen sich nur Schäden bis zu maximal etwa einem Strangbruch pro 10^6 bp nachweisen, durch eine Änderung der Pumpgeschwindigkeit auf 30,7 ml/h kann jedoch die oben beschriebene Technik einfach abgewandelt werden. Die Gesamtelutionszeit verringert sich von 12 h auf 45 min. Hierdurch wird zwar die Empfindlichkeit der Methode reduziert, aber es können nun Schäden bis zu zwei Strangbrüchen pro 10^6 bp detektiert werden. 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 γ -Strahlung (Kohn et al., 1976; Epe et al., 1993a). Nach den von D. Ballmaier (Ballmaier, 1997) durchgeführten γ -Bestrahlungsexperimenten ergibt sich für die Umrechnung der Geradensteigungen aus der Alkalischen Schnellelution in die Anzahl von Einzelstrangbrüchen pro 10^6 Basenpaaren ein Faktor $F = -8,6$ (siehe 4.2.2.5).

4.2.3 DNA-Relaxationsassay

4.2.3.1 Prinzip

Diese Methode ermöglicht es, Schäden in zellfreier DNA nachzuweisen und zu quantifizieren. Hierbei macht man sich zu Nutze, dass ein superhelikales DNA-Molekül (Abb. 4-2 II) durch einen einzigen Einzelstrangbruch in die offen zirkuläre (relaxierte und weniger kompakte) Form überführt wird. Wenn ein Doppelstrangbruch entsteht, liegt das Plasmid linear vor. Das Gemisch aus linearer, offen zirkulärer und superhelikaler DNA kann schließlich durch die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der Plasmidformen mit Hilfe einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden. Superhelikale DNA wandert wegen der kompakteren Form schneller im Gel als offen zirkuläre. Die Quantifizierung der jeweiligen DNA-Mengen wird anschließend mittels Fluoreszenzmessung durchgeführt und ins Verhältnis gesetzt. Aus dem relaxierten Anteil der beiden Formen lässt sich die Zahl an Einzelstrangbrüchen berechnen.

DNA-Reparaturenendonukleasen wie Fpg- oder APN1-Protein erkennen spezifische DNA-Modifikationen, entfernen mit ihrer Glykosylase-Funktion die modifizierte Base in der DNA und überführen mit ihrer AP-Endonukleasefunktion diese Modifikation in einen Einzelstrangbruch (Abb. 4-2 I). Dadurch lassen sich, durch zusätzliche Inkubation mit Reparaturenendonukleasen, alle Reparaturenendonuklease-sensitiven DNA-Modifikationen genauso empfindlich wie „direkte“ Einzelstrangbrüche nachweisen (Epe et al., 1988).

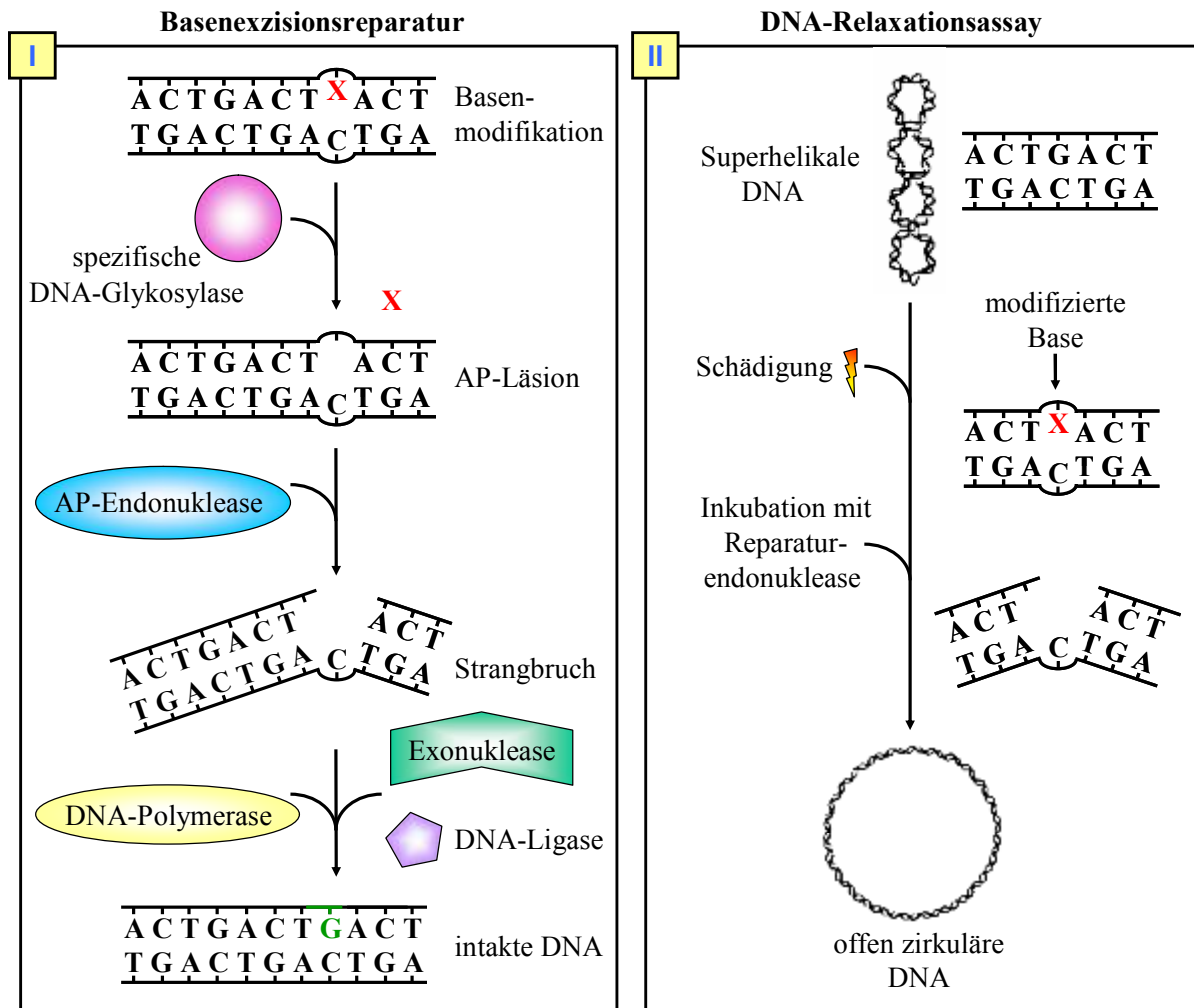


Abb. 4-2: I) Basen-Exzisions-Reparatur (siehe 2.4.2) II) Prinzip des DNA-Relaxationsassays, modifiziert nach M. Pflaum (Pflaum, 1996).

4.2.3.2 Enzyminkubation

Die PM2-DNA in BE1-Puffer (0,2 µg/20 µl) wird mit 10,0 µl des jeweiligen Reparaturenzyms (Enzymkonzentrationen entsprechend Alkalischer Elution, siehe 4.2.2.4) versetzt und für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Zur Detektion von Einzelstrangbrüchen wird die DNA mit 10 µl BE1/BSA-Puffer inkubiert. Anschließend wird die Enzymreaktion durch Hinzugabe von 10 µl Stopppuffer beendet und die Proben auf Eis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.2.3.3 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung der superhelikalen, linearen und relaxierten DNA erfolgt mit einer Horizontalgelelektrophorese. Zur Herstellung des Agarosegels werden 0,8 g Agarose in einem Gemisch aus 90 ml destilliertem Wasser und 10 ml TAE-Puffer

(10x) in einem Erlenmeyerkolben mit Hilfe einer Mikrowelle erhitzt und so gelöst. Entstehende Volumenverluste werden mit Wasser ausgeglichen. Nachdem sich die Lösung auf ca. 60 °C abgekühlt hat wird das Gel gegossen, die Kämme eingesetzt und nach dem Erstarren mit TAE-Puffer (1x) überschichtet. Die Kämme werden nun vorsichtig herausgezogen und die einzelnen Proben (40 µl) in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Die Elektrophorese läuft 90 min bei 80 V. Anschließend wird das Gel in einer Kammer mit Ethidiumbromidlösung (0.5 mg/ml H₂O_{dest.}) mindestens zwei Stunden lang auf einem Schüttelinkubator gefärbt. Alternativ kann die Färbung auch über Nacht im Kühlschrank bei 4 °C durchgeführt werden.

4.2.3.4 Auswertung des Agarose Gels

Zur Auswertung wird das gefärbte Gel kurz gewässert und dann mit Hilfe einer UV-Lampe (312 nm) mittels CCD-Kamera digital fotografiert. Anschließend bestimmt man durch Integration der Fluoreszenzintensitäten der Banden, unter Verwendung einer Software (Molecular Analyst[®]), die DNA-Menge von ungeschädigter, superhelikaler Plasmid-DNA und geschädigter, offen zirkulärer Form. Mit Hilfe der Gleichung 4.2.3-1 ist es möglich, daraus die Zahl der Einzelstrangbrüche und die Endonuklease-sensitiven DNA-Modifikationen pro 10⁴ bp (d. h. pro Molekül) zu berechnen. Die Gleichung berücksichtigt, dass es sich um eine zufällige Verteilung (Poisson-Verteilung) der Einzelstrangbrüche im Molekül handelt und nur der erste Strangbruch im Plasmid die Konformationsänderung verursacht. Weitere Brüche treten so nicht in Erscheinung. Der geringeren Interkalation des Ethidiumbromids in die superhelikale DNA und die damit verbundene geringere Fluoreszenz wird durch den Korrekturfaktor 1,42 Rechnung getragen (Lloyd et al., 1978).

$$ESS + SSB = -\ln \frac{1,42 * S}{1,42 * S + R}$$

Gleichung 4.2.3-1 Gleichung zur Berechnung der DNA-Modifikationen im DNA-Relaxationsassay.

SSB (Zahl der Einzelstrangbrüche pro DNA-Molekül); ESS (Endonuklease-sensitive Modifikationen (endonuclease-sensitive sites) pro DNA-Molekül); S Fluoreszenzintensität der superhelikalen Form der DNA; R Fluoreszenzintensität der relaxierten Form der DNA.

Um nur die Endonuklease-sensitiven Modifikationen, d. h. die durch die inkubierte Reparaturenuklease erzeugten Strangbrüche zu erhalten, muss der Anteil der direkten Einzelstrangbrüche in Ansätzen ohne Reparaturenuklease bestimmt und abgezogen werden.

4.2.4 Bestimmung von DNA-Doppelstrangbrüchen

4.2.4.1 Prinzip

Die Bestimmung von Doppelstrangbrüchen (DSB) basiert auf einem Immunfluoreszenz-Ansatz (Zhou et al., 2006). Hierbei werden auftretende DNA-Schäden mit fluoreszierenden Antikörpern nachgewiesen, wodurch einzelne DSB sichtbar gemacht werden. Erfolgt z. B. durch ionisierende Strahlung in einer Zelle ein DSB, so ist die unmittelbare Antwort darauf die Phosphorylierung des Histons H2AX (γ -H2AX) an beiden Seiten der Bruchstelle im C-Terminus (Modesti and Kanaar, 2001). Diesen DSB kann man dann in der Immunfluoreszenzmikroskopie sichtbar machen, indem man diese Histonphosphorylierungen mit γ -H2AX-spezifischen Antikörpern anfärbt. Man erhält für jeden DSB einen orangenen Punkt, so dass die Induktion von DSB über durch Zählen dieser Foci quantifiziert werden kann (McMillan et al., 2001; Leatherbarrow et al., 2006).

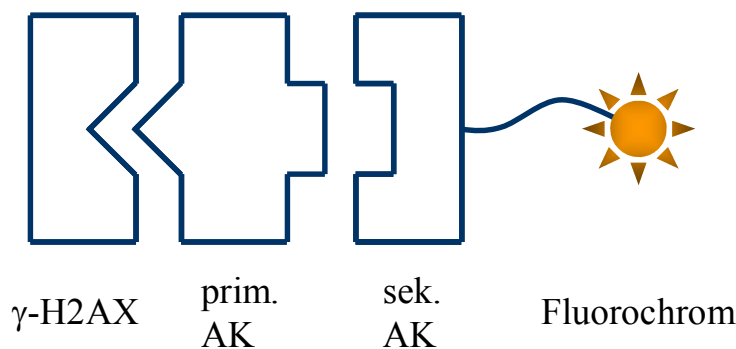


Abb. 4-3: Schematische Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von DSB.

4.2.4.2 Vorbereitung und Schädigung der Zellen

4.2.4.2.1 Vorbereitung

Zur Bestimmung von Doppelstrangbrüchen mit Hilfe von Immunfluoreszenz wird zwei Tage vor Versuchsbeginn in die benötigte Anzahl P35 Zellkulturschalen jeweils ein steriles Deckgläschen gelegt. Anschließend werden die Zellen abgelöst und in die präparierten P35 Zellkulturschalen mit 2 ml Kulturmedium gegeben. Die Zellzahl richtet sich nach der Verdopplungszeit und wird so gewählt, dass die Zellen am Tag der Schädigungen zu 30-40 % konfluent sind.

4.2.4.2.2 Schädigung der Zellen

Die vorbereiteten Zellen werden, wie in 4.2.2.3 beschrieben, geschädigt und die Deckgläschen nach Absaugen des Mediums in 6-well Platten überführt.

4.2.4.3 Immunfluoreszenzfärbung

Um die Zellen zu fixieren, wird dreimal mit PBS gewaschen und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur mit 1 ml Paraformaldehydlösung inkubiert. Der Paraformaldehyd wird durch erneutes dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die fixierten Zellen werden anschließend mit 1 ml Triton X-Lösung bei Raumtemperatur für 5-8 min inkubiert und so permeabilisiert. Die Triton X-Lösung wird entfernt und mit 0,5 ml 10 % Ziegenserum für 30 min geblockt. Nach Entfernen der Blocking-Lösung wird mit dem primären Antikörper (1:500 in 1 %BSA-Lösung) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um die Ansätze vor dem Austrocknen zu schützen, werden die 6-well Platten dafür in feuchte Küchenrollentücher eingewickelt. Am nächsten Morgen wird der Antikörper entfernt und dreimal mit NP-40-Lösung für 10 min gewaschen. Anschließend erfolgt die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (1:200 in 1 %BSA-Lösung) für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln. Der Antikörper wird entfernt und es wird erneut dreimal mit NP-40-Lösung für 10 min gewaschen. Nun werden 25 µl DAPI Mounting Medium auf ein Objektträger pipettiert und die Zellpräparate möglichst luftblasenfrei darüber gelegt. Bei der anschließenden Betrachtung im Fluoreszenzmikroskop unter Verwendung von Immersionsöl sind die Doppelstrangbrüche als orange Punkte (Abb. 4-4 II) in den Zellen erkennbar.



Abb. 4-4: Doppelstrangbrüche nach Immunfluoreszenzfärbung.

Betrachtung der Zellpräparate unter I) UV-2A Filter (EX330-380) II) B-2A Filter (EX450-490).

4.2.4.4 Auswertung

Zur Berechnung der Doppelstranganzahl pro Zelle werden pro Ansatz acht Zellen verblindet ausgezählt. Die Ergebnisse werden gemittelt und in Konzentrationsabhängigkeit dargestellt.

4.2.5 Präparation von APN1

4.2.5.1 Herstellung des Rohextraktes

Die Herstellung von APN1-Protein erfolgt durch die Anzucht des *E. coli*-Stammes Eco R1 Not1 BH-410, transformiert mit dem Plasmid pGex 4-T1. Das in die Bakterien eingebrachte Konstrukt enthält die Sequenz für APN1-GST (GST = Glutathion-S-Transferase), welches unter der Kontrolle eines Promotors steht, der mit Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG) dauerhaft induzierbar ist.

Zunächst wird hierzu am Vorabend eine Übernachtskultur aus einzelnen Klonen der Bakterienstämme hergestellt und bei 37 °C in 2 ml LB-Medium über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen werden 20 μ l der Vorkultur in 100 ml LB-Medium gegeben und für drei bis vier Stunden erneut inkubiert. Gegen Mittag wird diese Bakterien Suspension in einen 6 l Erlenmeyerkolben mit 1 l LB-Medium (200 μ g/ml Ampicillin) überführt. Die Konzentration wird über die optische Dichte OD₆₀₀ überprüft. Nach zweieinhalb Stunden sollte diese 0,75 erreicht haben. Nun wird mit Hilfe von IPTG (0,5 mM) die Synthese des APN1-Proteins induziert und die Bakterien suspension als eine Übernachtskultur bei 37 °C und 160 rpm im Schüttelinkubator inkubiert. Die so erhaltenen, mit IPTG beimpften Bakterien werden anschließend bei 20 °C (6000 rpm, 20 min) in zwei 450 ml Zentrifugenröhrchen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Bakterienpellets werden vereinigt, einmal mit PBSCMF gewaschen, bei 4 °C und 4000 rpm erneut zentrifugiert und anschließend dekantiert. Das Pellet kann nun bei -80 °C eingefroren werden.

Das Bakterienpellet wird in Lysepuffer F resuspendiert und auf eine Endkonzentration von 0,2 g/ml eingestellt. Anschließend werden durch Ultraschallbehandlung (7 x 30 s) je 5 ml der Bakterien zerstört. Danach wird das Bakterienlysat von unlöslichen Zellbestandteilen bei 15000 rpm und 4 °C für eineinhalb Stunden durch Zentrifugation von dem Überstand abgetrennt. Die Proteinmenge wird wie in 4.2.14 nach Bradford bestimmt. Da dies nicht nur APN1-Protein, sondern auch andere Proteine enthält, wird anschließend eine Aufreinigung vorgenommen.

4.2.5.2 Affinitätsreinigung von APN1-GST-Fusionsproteinen

Das APN1-GST-Fusionsprotein kann durch die Enzym-Substrat-Wechselwirkung der GST mit dem an die Sepharose gekoppelten Substrat Glutathion gereinigt werden. Dabei wird es in einem Schritt fast vollständig (>90 %) von allen anderen Proteinen abgetrennt. Bevor das Proteinpellet auf die Säule gegeben werden kann, muss diese equilibriert werden. Zur Equilibrierung wird die Glutathion Sepharose 4B als Suspension in 20 % EtOH hergestellt, pro 20 ml der benötigten Suspension werden 15 ml der aufgeschüttelten Stammlösung mit 200 ml kaltem PBSCMF

gemischt, bei 2000 rpm für 2 min pelletiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschvorgang wird mit PBSCMF noch einmal wiederholt. Zur Kopplung des APN1-GST-Fusionsproteins an die Glutathion Sepharose 4B werden pro ursprünglichen Liter Lysat 80 ml einer Glutathion Sepharose 4B Suspension hinzugegeben. Das Pellet wird in PBSCMF resuspendiert und zur Affinitätsreinigung zum Lysat zugeben. Das Gefäß zur Aufreinigung wird in liegender Position unter Schütteln bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert. Der Überstand wird abzentrifugiert (500 rpm, 5 min) und verworfen. Anschließend wird viermal mit 50 ml kaltem PBSCMF gewaschen. Danach wird dreimal mit je 3 ml Glutathion-Elutions-Puffer (GEP) fraktioniert eluiert (Fraktion 1, 2, 3 und 4). Das reduzierte Glutathion hat eine höhere Affinität zum katalytischen Zentrum der GST und verdrängt das oxidierte Glutathion und damit das Fusionsprotein von der Matrix.

4.2.5.3 Analyse der Aufreinigung des APN1-Proteins durch SDS-PAGE

Die Proteinmenge der drei Fraktionen wird, wie in 4.2.14 beschrieben, nach Bradford bestimmt. Zum Nachweis der erfolgreichen Proteinexpression und Aufreinigung werden die gesammelten Aliquots in einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, siehe 4.2.15) analysiert. Zum Nachweis der aufgetrennten Proteine wird das Gel mit Coomassieblau-Lösung gefärbt und nach ausreichender Entfärbung (evtl. über Nacht) dokumentiert (Abb. 4-5).

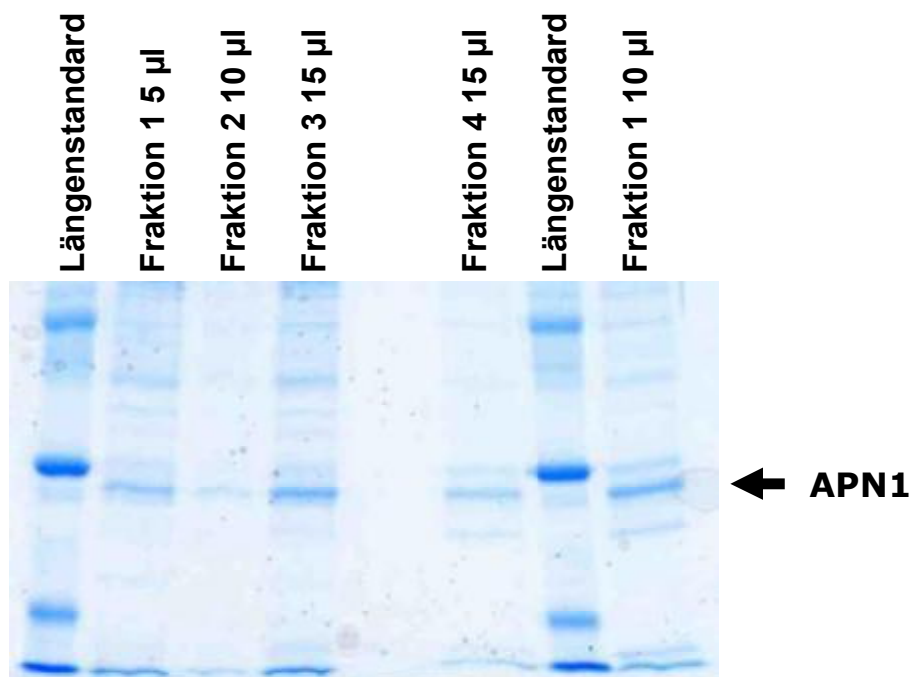


Abb. 4-5: SDS-Polyacrylamidgel der APN1-Aufreinigung nach Coomassieblaufärbung.

4.2.5.4 Test der APN1-Präparation im PM2-Relaxationsassay

Die Überprüfung der Aktivität der APN1 Protein-Präparation erfolgt mit Hilfe des DNA-Relaxationsassays (siehe 4.2.3). Eingesetzt wird mit Bleomycin (BLM) geschädigte PM2-DNA aus einer Präparation von I. Schulz (V 590). Die Schädigung der PM2-DNA erfolgt durch Bleomycin mit einer Endkonzentration von 300 nM BLM/100nM Fe. Zu der in Phosphatpuffer PP in Lösung befindlichen DNA wird eine frisch angesetzte Stammlösung von 600 nM BLM/100 nM Fe in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ bis zu einer Konzentration von 300 nM zugesetzt. Die Reaktion wird durch Hinzugabe von H_2O_2 (500 μM) gestartet und die Proben in Eppendorfgefäßen mit geöffnetem Deckel für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wird mit 315 U/ml Katalase gestoppt. Anschließend wird zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Proben bei -80 °C aufbewahrt.

Der Sättigungsbereich des APN1-Proteins wird durch den Einsatz verschiedener Konzentrationen der Präparation während der Enzyminkubation in BE1/BSA-Puffer bei 37 °C ermittelt.

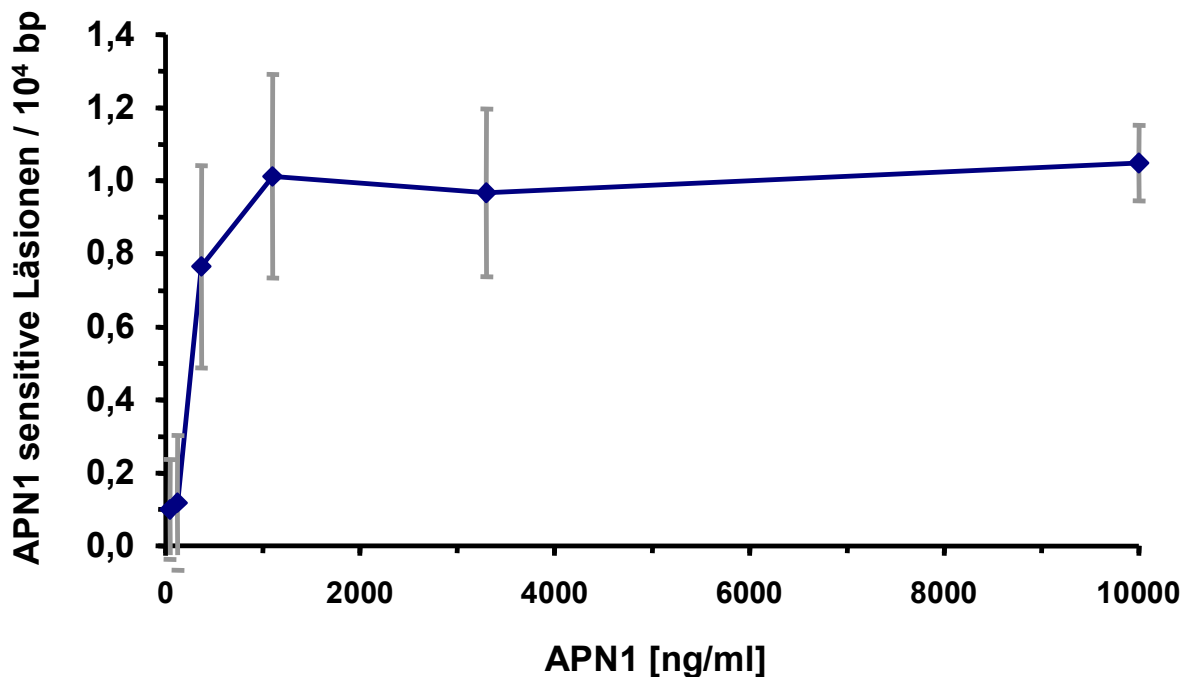


Abb. 4-6: APN1 Sättigungskurve im PM2-DNA-Relaxationsassay.

Die PM2-DNA wurde mit 300 nM BLM/100nM Fe für 30 min bei 37 °C geschädigt und anschließend mit Hilfe des DNA-Relaxationsassays (siehe 4.2.3) auf die Zahl erkannter APN1-sensitiven Läsionen pro 10^4 bp mit unterschiedlichen Enzymkonzentrationen untersucht. $n = 4$.

4.2.5.5 Test der APN1-Präparation in der Alkalischen Elution

Die Überprüfung der Aktivität des APN1-Proteins erfolgt mit Hilfe der Alkalischen Elution. Hierzu schädigt man V79 Zellen mit MMS in serumfreien Medium (siehe 4.2.2.3.4) und trägt diese auf die Filter der Alkalischen Elution auf. Durch den Einsatz verschiedener Konzentrationen der APN1-Präparation während der Enzyminkubation in BE1/BSA-Puffer bei 37 °C kann der Sättigungsbereich des APN1-Proteins ermittelt werden.

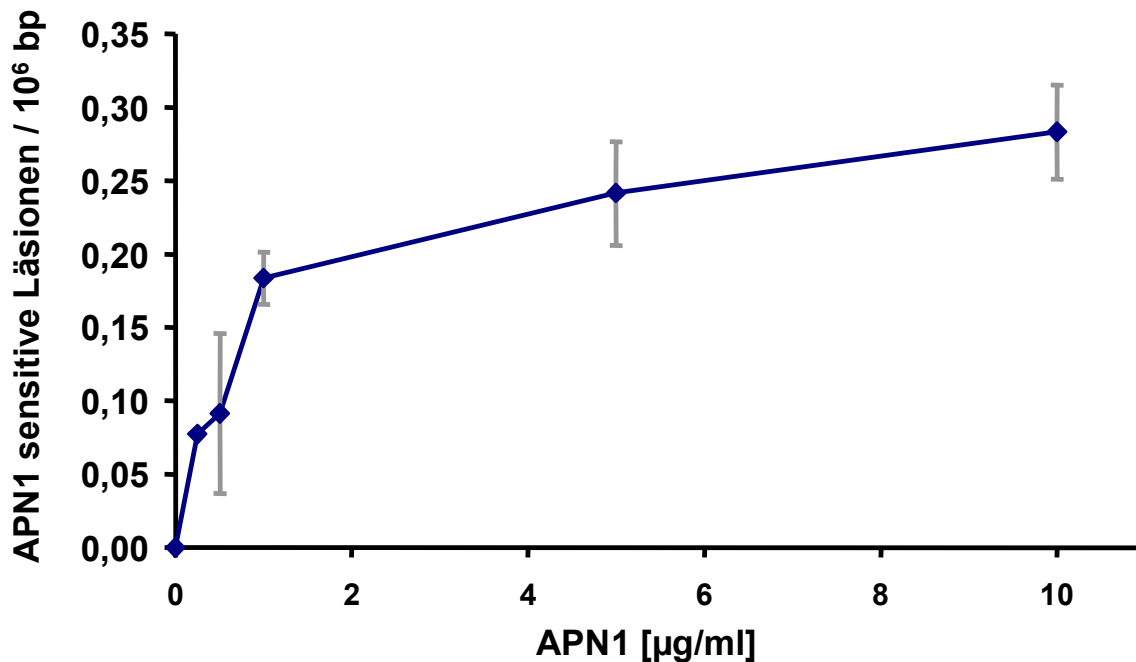


Abb. 4-7: APN1 Sättigungskurve in der Alkalische Elution.

Die V79-hOR Zellen wurden mit 100 µM MMS für 30 min bei 37 °C geschädigt und anschließend mit Hilfe der Alkalischen Elution (siehe 4.2.2) auf die Zahl erkannter APN1-sensitiven Läsionen pro 10⁶ bp mit unterschiedlichen Enzymkonzentrationen analysiert. n = 3.

Wie aus Abb. 4-6 und Abb. 4-7 deutlich wird, liegt bei einer Konzentration von 1 µg/ml APN1 bereits eine vollständige Erkennung der induzierten DNA-Modifikationen durch APN1, sowohl im DNA-Relaxationsassay als auch bei der Alkalische Elution, vor.

Für die in dieser vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wurde APN1 in BE1/BSA in der Konzentration von 1 µg/ml zur DNA-Schadenserkennung verwendet.

4.2.6 Mikrokerntest

4.2.6.1 Prinzip

Mit dem Mikrokerntest werden die Folgen einer DNA-Schädigung in Form von Mikrokernen, einer Abspaltung von DNA-Material aus Zellkernen, nachgewiesen. Diese Bruchteile des Kerns, umgeben von einer Kernmembran, können entweder chromosomale Fragmente oder vollständigen Chromosomen enthalten und entstehen durch Absonderung während der Mitose. Das genomische Material in den Mikrokernen ist aktiv, es ist aber nicht geklärt, ob die enthaltene Geninformation der Zelle zur Verfügung steht. Mikrokerne kommen in jeder Zellart in geringer Menge natürlicherweise vor. 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 Mikrokernel-Testsysteme erlauben 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 Erholungs-Phase ab, in der die Zellen eine Zellteilung durchführen und dabei Mikrokerne ausbilden können. Zur quantitativen Auswertung wird die Anzahl Mikrokerne ausgezählt und auf die Anzahl Zellkerne bezogen. Dazu wurden mindestens 1000 Kerne pro Präparat gezählt und die dazugehörigen Mikrokerne bestimmt.

4.2.6.2 Vorbereitung und Schädigung der Zellen

4.2.6.2.1 Vorbereitung

Mindestens 24 Stunden vor dem Versuch werden in kleine Zellkulturflaschen 1 Mio. Zellen ausgesät. Die genaue Zahl ist abhängig von der Zellgröße, es muss jedoch noch ausreichend Platz für eine Verdopplung vorhanden sein.

4.2.6.2.2 Schädigung der Zellen

Die Schädigung der Zellen mit γ -Strahlen oder TPZ erfolgt analog zu Abschnitt 4.2.2.3.3 oder 4.2.2.3.5. Anschließend wird das Medium unter sterilen Bedingungen abpipettiert, die Zellen mit 2 x 5 ml PBSCMF gewaschen und frisches Medium in die Kulturflasche gegeben. Diese werden während der Erholungs-Phase im Brutschrank aufbewahrt (5 % CO₂, 37 °C). Die Dauer der Erholungs-Phase richtet sich nach der Verdopplungszeit der Zellen, die zuvor bestimmt werden muss. Im Fall von

V79 Zellen wurde eine Erholungs-Zeit von 21 Stunden eingehalten, bei V79-hOR Zellen dauerte sie 24 h.

4.2.6.3 Fixierung der Zellen

Nach der Erholungs-Phase werden die Zellen wie gewohnt (siehe 4.2.1.1 oben) mittels Trypsin abgelöst und in Medium aufgenommen. Man bestückt nun eine Cytospin-Zellzentrifuge mit beschrifteten Objektträgern, Filterkärtchen und Trichtern, 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 drei Objektträger pro Ansatz her, die nach der Zentrifugation sofort für eine Stunde in eine auf -20°C vorgekühlte Fixierkammern mit Methanol gestellt werden.

4.2.6.4 Färbung der Zellen

Nach der Fixierung in Methanol werden die Zellkerne angefärbt. Dazu inkubiert man die auf dem Objektträger fixierten Zellen für etwa 30 s in einer Färbekammer mit PBSCMF/Bisbenzimid-Lösung. Danach taucht man sie 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 und versehentlich abgewischt werden. Nun werden $10\ \mu\text{l}$ einer Eindecklösung auf die Zellen pipettiert und ein Deckgläschen möglichst luftblasenfrei darüber gelegt. Bei der anschließenden Betrachtung im Mikroskop mit Quecksilberdampflampe unter Verwendung von Immersionsöl sind Kerne und Mikrokern durch Interkalation des Bisbenzimids in die DNA blau eingefärbt (Abb. 4-8 I und II zeigen Zellkerne mit Mikrokernen (Pfeile)).

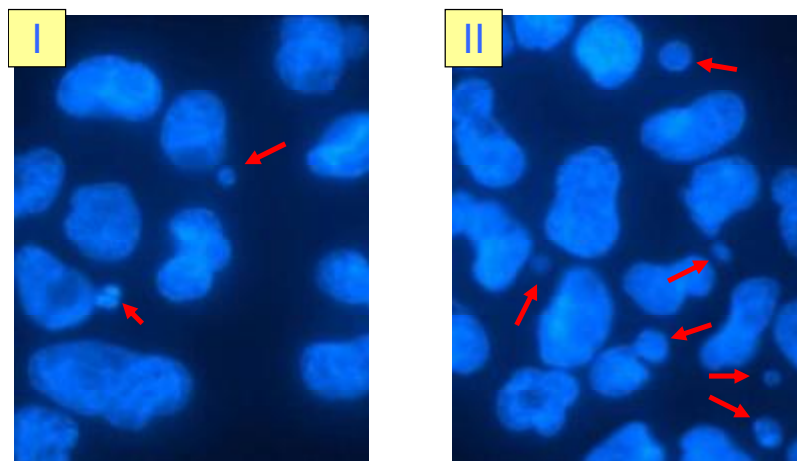


Abb. 4-8: I) Mikrokern in V79-MZ, II) Mikrokern in V79-hOR.

Die Färbung erfolgte wie beschrieben mit Bisbenzimid-Lösung (Hoechst No. 332-58).

4.2.6.5 Auszählen der Mikrokerne und Bestimmung der Toxizität

Pro Ansatz werden drei Objektträger mit ca. 1000-2000 Zellkernen sowie die dazugehörigen Mikrokerne verblindet ausgezählt. Die Mikrokerne werden dabei in 1er, 2er oder 3er Packs eingeteilt. Ein 3er Pack zählt als 3 Mikrokerne. Die Ergebnisse der drei Zählungen werden auf 2000 Zellen berechnet und pro Ansatz gemittelt. Aus den Mittelwerten von drei unabhängig durchgeführten Versuchen wird wiederum ein Mittelwert mit Standardabweichung berechnet.

4.2.7 HPRT-Mutationstest

4.2.7.1 Prinzip

Der *in vitro* Genmutationstest an Säugetierzellen kann zum Nachweis von induzierten Genmutationen herangezogen werden. In V79 Zellen des chinesischen Hamsters werden Mutationen an dem Locus für Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) nachgewiesen. Zellen, die infolge der Mutation 6-Thioguanin (TG) nicht verstoffwechseln (HPRT^{-/-}), sind gegenüber der zytotoxischen Wirkung des TG resistent (6TG^r = 6-Thioguanin-resistent). Bei Anwesenheit von HPRT sind Zellen hingegen empfindlich gegenüber TG, das die Hemmung des Zellstoffwechsels verursacht und eine weitere Zellteilung verhindert. So können die Mutanten bei Anwesenheit von TG proliferieren, während die normalen Zellen, die HPRT enthalten, nicht dazu in der Lage sind. Die Mutanten werden durch den Verlust der Aktivität des Enzyms Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) erkannt.

4.2.7.2 Durchführung

4.2.7.2.1 Vorbereitung und Schädigung der Zellen

Am Tag vor Versuchsbeginn werden 750000 Zellen in eine große Zellkulturflasche ausgestreut. Am Tag Eins werden die nun 1,5 Mio. Zellen mit TPZ (siehe 4.2.2.3.5) für 24 h inkubiert. Nach fünf Tagen werden die Zellen geerntet und (3 oder 6 Mio.) in Petrischalen ausplattiert. Nach drei weiteren Tagen werden jeweils 100 Zellen (6 cm Petrischalen) für die Bestimmung der „plating efficiency“ und 1 Mio. Zellen (15 cm Petrischalen) für die Bestimmung der Mutantenzahl in Kulturmedium mit 6-Thioguanin (7 µg/ml) ausgestreut (Doehmer et al., 1988).

4.2.7.2.2 Fixierung und Färbung der Zellen

Nach 10 bis 14 Tagen unter Zellkulturbedingungen, je nach Wachstumsverhalten der Zellen, werden die Zellen der „plating efficiency“ und der Mutantenzahl jeweils mit Methanol fixiert und mit Giemsa-Lösung gefärbt.

4.2.7.2.3 Auswertung

Zur Berechnung der Mutantenhäufigkeit (Mutantenfrequenz) werden pro Ansatz der „plating efficiency“ (PE_M) drei und der Mutantenzahl sechs Petrischalen verblindet ausgezählt. Die Ergebnisse der drei bzw. sechs Zählungen werden pro Ansatz gemittelt. Die „plating efficiency“ wird mit Hilfe folgender Formel berechnet:

$$PE_M = \frac{\text{Mittelwert Kolonienanzahl}}{\text{Anzahl ausgestreute Zellen (100)}}$$

Gleichung 4.2.7-1: „plating efficiency“ (PE_M).

Zur Berechnung der Mutantenhäufigkeit wird der Mittelwert der Mutantenzahl durch die „plating efficiency“ geteilt. Das Ergebnis ist die Mutantenhäufigkeit pro 1 Mio. Zellen. Aus den Mittelwerten von drei unabhängig durchgeführten Versuchen wird wiederum ein Mittelwert mit Standardabweichung berechnet.

4.2.8 Bestimmung der Toxizität in Säugerzellen

4.2.8.1 „cloning efficiency“

4.2.8.1.1 Prinzip

Zur Bestimmung der Toxizität einer Substanz werden 8 bis 10 Tage nach einer erfolgten Schädigung die Anzahl der von den geschädigten Zellen gebildeten Kolonien bestimmt.

4.2.8.1.2 Durchführung

4.2.8.1.2.1 Vorbereitung und Schädigung der Zellen

Am ersten Tag werden 150 Zellen in 5 ml Kulturmedium in kleine Petrischalen ausgestreut. Nach vier Stunden werden diese entweder mit γ -Strahlen (0 bis 5 Gy) oder mit TPZ (30 min oder 24 h bei 37 °C im Brutschrank) geschädigt (siehe 4.2.3.2).

4.2.8.1.2.2 Fixierung und Färbung der Zellen

Nach erfolgter Schädigung werden die Zellen für acht bis zehn Tage unter Zellkulturbedingungen inkubiert. Anschließend werden die gebildeten Zellkolonien mit Methanol fixiert und mit Giemsa-Lösung angefärbt.

4.2.8.1.2.3 Auswertung

Pro Ansatz werden drei Petrischalen ausgezählt. Die Ergebnisse der drei Zählungen werden pro Ansatz gemittelt. Aus den Mittelwerten von drei unabhängig durchgeführten Versuchen wird wiederum ein Mittelwert mit Standardabweichung berechnet. Die Absolute-„cloning efficiency“ (absolute CE) berechnet sich aus dem Mittelwert der Kolonienzahlen der Prüfsubstanz oder Kontrolle dividiert durch die Anzahl ausgestreuter Zellen.

$$\text{absolute CE} = \frac{\text{Mittelwert Kolonienanzahl}}{\text{Anzahl ausgestreute Zellen (150)}}$$

Gleichung 4.2.8-1: absolute CE.

Die Relative-„cloning efficiency“ (relative CE) berechnet sich aus dem Mittelwert der absoluten CE der Prüfsubstanz (einer Konzentration) dividiert durch den Mittelwert der absoluten CE der Trägerstoffkontrolle (Nullwert).

$$\text{relative CE} = \frac{\text{Mittelwert absolute CE (Substanz)}}{\text{Mittelwert absolute CE (Kontrolle)}}$$

Gleichung 4.2.8-2: relative CE.

4.2.8.2 „plating efficiency“ und Proliferationsfaktor

4.2.8.2.1 Prinzip

Die „plating efficiency“ (PE) und der Proliferationsfaktor (PF) sind zwei weitere Parameter, die bestimmt werden können, um die Toxizität einer Substanz zu bestimmen. Hierzu werden eine definierte Anzahl Zellen geschädigt und für 48 h kultiviert bzw. subkultiviert und anschließend gezählt. Der so erhaltene Wert wird mit dem Theoriewert verglichen.

4.2.8.2.2 Durchführung

4.2.8.2.2.1 Vorbereitung und Schädigung der Zellen

Einen Tag vor der Schädigung werden in zwei mittlere Zellkulturflaschen pro Konzentration der schädigenden Substanz je 2×10^6 Zellen in 15 ml Medium angesetzt. Am nächsten Tag werden die Zellen entweder mit Ro19-8022 (0 bis 200 nM) oder mit MMS (0 bis 400 μ M) geschädigt (siehe 4.2.2.3.2 und 4.2.2.3.4). Nach der Schädigung wird der Zellrasen zweimal mit PBSCMF gewaschen. Die Zellkulturflaschen zur Bestimmung des Proliferationsfaktors (ZKF-PF) werden mit neuem Medium versetzt und für 48 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Zellen in der zweiten analog geschädigten Zellkulturflasche werden abtrypsiniert, die Zellzahl mit Hilfe eines Coulter CounterTM bestimmt (Zellzahl t_0) und pro Konzentration werden $0,5 \times 10^6$ Zellen ad 5 ml Medium in kleine Flaschen (ZKF-PE) zur Bestimmung der „plating efficiency“ ausgestreut. Diese werden nun ebenfalls für 48 Stunden inkubiert.

4.2.8.2.2.2 Auswertung

Zwei Tage nach der Schädigung, dies entspricht ca. zwei theoretischen Verdopplungszeiten (n), werden alle Zellen (ZKF-PF und ZKF-PE) abgelöst und die Zellzahl mit Hilfe eines Coulter CounterTM bestimmt (Zellzahl t_1). Der Proliferationsfaktor (PF) ist der Quotient der Zellzahl t_1 aus den ZKF-PF und t_0 . Er ist ein Maß, für die Anzahl der Zellteilung der überlebenden Zellen und wird mit Gleichung 4.2.8-3 berechnet.

$$PF = \frac{\text{Zellzahl } t_1}{\text{Zellzahl } t_0}$$

Gleichung 4.2.8-3: Proliferationsfaktor.

Mit Hilfe von Zellzahl t_1 aus den ZKF-PE und der theoretischen Zellzahl t_t (bei $0,5 \times 10^6$ ausgestreuten Zellen und zwei Verdopplungen ist dies 2×10^6 Zellen) errechnet man die „plating efficiency“ (PE) mit folgender Gleichung:

$$PE = \frac{\text{Zellzahl } t_1}{\text{Zellzahl } t_t}$$

Gleichung 4.2.8-4: „plating efficiency“.

4.2.9 Plasmidisolierung

Die Plasmidisolierung erfolgt mit Hilfe eines handelsüblichen Isolierungssystems (Quiagen Plasmid Kit). Hierzu werden zunächst die benötigten Bakterienstämme auf 2 Tage alte Topagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wird ein einzelner Klon gepickt, in 200 ml LB-Medium gegeben und für acht Stunden erneut inkubiert. Diese Bakteriensuspension wird nun in 1,5 l LB-Medium überführt und als einer Übernachtskultur inkubiert. Die so erhaltene Bakteriensuspension wird zentrifugiert (10 min bei 2000 g und 4 °C) und der Überstand dekantiert. Das Bakteriensediment wird in 50 ml Puffer-P1 resuspendiert und in einen 500 ml Erlenmeyerkolben überführt. Hierzu werden 50 ml Puffer-P2 (alkalischer Lysepuffer) gegeben und vorsichtig für 3-5 Minuten bei RT gedreht. Nach einem Neutralisationsschritt mit 50 ml kaltem Puffer-P3 wird das Protein gefällt (ca. 15 Minuten). Anschließend wird das Protein durch Filtration abgetrennt und die Lösung auf eine, mit QBT-Puffer geladene, Ionenaustauscher-Säule gegeben. Die an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA wird zweimal mit QC-Puffer gewaschen und schließlich mit 35 ml QF-Puffer eluiert. Das Plasmid wird mit 25 ml Isopropanol (RT) gefällt und bei 12000 g für 35 Minuten durch Zentrifugation isoliert. Der Überstand wird verworfen und hinterher zweimal mit 14 ml (eiskaltem) 70 % EtOH gewaschen. Anschließend wird das Plasmid in TE-Puffer resuspendiert und seine Konzentration photometrisch (Spektrophotometer biowave S2100, WPA) bestimmt. Das so erhaltene Plasmid kann nun, durch Agarosegelelektrophorese (4.2.3.3) analysiert oder für einen Luciferase Assay (4.2.18) verwendet werden.

4.2.10 Depletion von Glutathion

Zur intrazellulären Depletion von Glutathion in Zellen werden die Zellen mit Buthioninsulfoximin (BSO) inkubiert (Griffith and Meister, 1979). Zunächst verdünnt man die BSO-Stammlösung mit Kulturmedium zu einer 1 mM-Lösung (siehe 4.1.7.10). Das alte Kulturmedium wird entfernt und die Verdünnung wird zu den Zellen in die Kulturflasche gegeben. Die Inkubation wird im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂, 99 % Luftfeuchtigkeit für 24 Stunden durchgeführt. Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBSCMF gewaschen, um das vorhandene BSO vollständig zu entfernen. Im Falle einer zusätzlichen Substanzinkubation (z. B. MMS oder Tirapazamin) wird nach Ablauf dieser 24stündigen BSO-Inkubation mit der Substanzinkubation begonnen.

4.2.11 Quantifizierung des Glutathiongehaltes

4.2.11.1 Prinzip

Der zelluläre Gesamtglutathion-Spiegel besteht aus GSH und GSSG. Diese werden enzymatisch nach der Methode von Griffith (Griffith, 1985) bestimmt. Zur Quantifizierung dient 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellman's Reagenz) als Detektionsreagenz, dieses reagiert mit Thiolgruppen, wie z. B. GSH unter Bildung von 5'-Thio-(2-nitrobenzoesäure) (TNB). GSH wird dabei zu GSSG oxidiert (Abb. 4-9 I). Im darauf folgenden Schritt II wird GSSG durch das exogen dem Reaktionsansatz hinzugefügte Enzym Glutathionreduktase unter NADPH/H⁺-Verbrauch zu GSH reduziert. Reduziertes Glutathion (GSH) kann nun erneut mit DTNB reagieren.

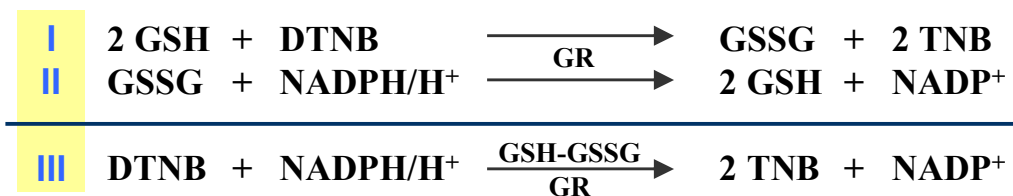


Abb. 4-9: Reaktionsgleichungen zur Bestimmung von Glutathion mit DTNB-Reagenz (Griffith, 1985).

GR = Glutathionreduktase, DTNB = 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure (Ellman's Reagenz).

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

4.2.11.2 Durchführung

Zur Versuchsdurchführung benötigt man mindestens 10 Mio. Zellen. Die Zellen in der Zellkulturflasche werden abtrypsiniert und die Zellen in 10 ml Medium resuspendiert (siehe 4.2.1.1). Anschließend wird bei 4 °C mit 1200 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird 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 wird 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, 10000 g) 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 H₂Odest). Nach jedem Pipettiervorgang wird die Lösung durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Abschließend werden 2 µl Glutathionreduktase-Lösung hinzugefügt und automatisch 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.

4.2.12 p53-„knockdown“ in primären Zellen

4.2.12.1 Prinzip

siRNAs sind 21-28 Nukleotide lange synthetisch hergestellte RNAs, diese kleinen RNAs werden in einen Proteinkomplex RISC (RNA-induced silencing complex) eingebaut. Mithilfe der inkorporierten RNA-Fragmente bindet RISC komplementär an DNA (z. B. Genbereiche, oder mRNA) und kann diese dadurch "abschalten". Dies wird genutzt, um durch RNA Interferenz (RNAi) die Expression von spezifischen Zielgenen zu verringern. RNAi führt zur Spaltung, zur Translationsblockade der Ziel-mRNA oder zum Methylieren und Abschalten des entsprechenden Gens. Somit wird die Produktion bestimmter Proteine gestoppt. Die siRNA werden in isolierte Zellen eingebracht (transfiziert) und die mRNA des Zielgens wird abgebaut. Die resultierende Verringerung der Genprodukte („gene knockdown“) ermöglicht es, Hinweise auf die physiologische Bedeutung des betreffenden Gens zu erhalten (Tuschl, 2001; Tuschl and Borkhardt, 2002).

4.2.12.2 Durchführung

Um den Einfluss von p53 auf die DNA-Reparatur zu überprüfen, wird p53 mit Hilfe von p53-siRNA herunterreguliert. Hierfür säht man an Tag 1 125000 Fibroblasten (250000 Keratinozyten) in eine P60 Zellkulturschale mit 3 ml Kulturmedium. Die Zellzahl sollte so gewählt werden, dass die Zellkulturschale nach 5 Tagen konfluent ist. An Tag 3 wird das vorhandene Medium abpipettiert und anschließend 2,5 ml der p53-siRNA-Lösung (Transfektionslösung) in die Zellkulturschale gegeben. Die Zellen werden für 24 Stunden unter normalen Zellkulturbedingungen inkubiert. An Tag 4 wird die Transfektionslösung durch Waschen mit PBS entfernt. Die so ausgestreuten Zellen werden entweder unbehandelt weiter verwendet oder um den Einfluss von UVB zu untersuchen, mit 20 mJ/cm² UVB auf Eis 24 h nach dem „knockdown“ geschädigt. Dazu werden die

Zellen in Zellkulturschalen unter einem Solar Simulator auf Eis bestrahlt. Für die Bestimmung der Dosis wurde ein IL-1700 Research Radiometer (International Light, Newburyport, MA) mit einem UVB-Sensor (SED 240, in Kombination mit einem 280 nm cut-off Filter) verwendet. Da Zellkulturschale nur Licht mit einer Wellenlänge über 280 nm durchlassen, wurde der Schaden hauptsächlich durch UVB verursacht. Der p53-Level bzw. die aktivierte an Ser15 phosphorylierte Form von p53 kann nun mit Hilfe eines Western-Blot (Abschnitt 4.2.16 unten) nach unterschiedlichen Zeitpunkten bestimmt werden. Er ist jedoch, abhängig von der Zellart, für mindestens 48 Stunden erniedrigt. Die so behandelten Zellen werden nun entweder mit frischem Zellkulturmedium weiter kultiviert oder nach dem entsprechenden Versuchsschema behandelt (siehe 4.2.18).

4.2.13 Herstellung von Zellextrakten

4.2.13.1 Trypsin-Methode

4.2.13.1.1 Herstellung von Zellpellets

Zur Herstellung von Zellextrakten mit einer geeigneten Proteinkonzentration sind zwischen 5 und 10×10^6 Zellen erforderlich. Um diese zu erhalten, trypsiniert man mehrere dicht bewachsene Zellkulturflaschen ab, zählt die Zellen mittels Coulter CounterTM und zentrifugiert mit 1200 g bei 4 °C für 10 min. Die so gewonnenen Zellpellets werden zweimal mit je 15 ml kaltem PBSCMF gewaschen, um das eventuell vorhandene Trypsin zu entfernen und nach jedem Waschschrift wieder pelletiert. Der Überstand des letzten Waschschriftes wird vorsichtig mit einer 1 ml Eppendorf-Pipette entfernt und die Pellets eingefroren (falls sie nicht sofort weiterverarbeitet werden sollen) oder auf Eis gelagert. Das trockene Pellet kann bei -70 bis -80 °C über mehrere Monate aufbewahrt werden.

4.2.13.1.2 Herstellung von Zellextrakten

Aus mindestens 10 Mio. Zellen wird ein Pellet hergestellt (siehe 4.2.13.1.1). Aus diesem wird ein zellulärer Extrakt gewonnen, indem man das Pellet zunächst in 200 µl Lysepuffer MS resuspendiert, dem frisch 10 µl/ml AAL 100x zugesetzt wurden (Endkonzentration 0,8 µg/ml), und auf Eis lagert. Die Zellkonzentration beträgt ca. 100 Mio. Zellen/ml. Eine Ultrazentrifuge (UZ) wird mit Adaptern bestückt und auf 4 °C gekühlt. Danach zerstört man die Zellen auf Eis mit Hilfe von Ultraschall (Zeit: 0:00:08, Puls in: 1:00, Puls off: 9:00, Amplitude: 20 %). Das Zell-Lysat wird nun in vorgekühlte Ultrazentrifugenröhrchen überführt und mit einer Analysenwaage das Gewicht auf 1 mg genau mit Lysepuffer austariert. Die Lysate werden in der UZ bei

85000 g 45 min bei 4 °C pelletiert, um Zellwand- und Organellenbestandteile abzutrennen. Der Überstand wird in ein neues 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und stets gekühlt bzw. sofort bei -70 °C eingefroren. Zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes wird zuvor noch ein Bradford-Test mit 1-5 µl des Extraktes durchgeführt, dabei wird gleichzeitig eine Kalibriergerade mit Lösungen von Rinderserumalbumin (0 bis 18 µg/ml) erstellt (siehe 4.2.14).

4.2.13.2 Zellschaber-Methode

Der Vorteil dieser Methode ist, dass gänzlich ohne eventuell Protein zerstörendes Trypsin gearbeitet wird. Zudem benötigt man nur 1 bis 2 x 10⁶ Zellen, da kein Verlust durch Zentrifugation zu befürchten ist. Die benötigte Menge adhärent wachsender Zellen wird zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen. Anschließend gibt man je nach berechneter Zelldichte 60-120 µl (für eine mittlere Zellkulturschale, p60) bzw. 250-500 µl (für eine große Zellkulturschale, p100) Erntepuffer mP hinzu und löst die Zellen auf Eis mit Hilfe eines Zellschabers ab. Die Zellkulturschale sollte dabei mehrmals gedreht werden, so dass alle Zellen auf der Schale erfasst werden. Die nun vorhandene Suspension wird mit einer 1cc Spritze mit Nadel aufgesogen und unter mehrmaligen Auf- und Abpipettieren in ein 2 ml Eppendorf Gefäß überführt. Danach zerstört man die Zellen auf Eis mittels eines Ultraschall-Sonifikators. Man sonifiziert für 3-5 Sekunden mit einem konstanten Puls bei maximaler Amplitude. Das Zell-Lysat wird nun bei 15000 rpm für 15 min zentrifugiert, um Zellwand- und Organellenbestandteile abzutrennen. Der Überstand wird in ein neues 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und wie bei 4.2.13.1.2 weiterbehandelt.

4.2.14 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration pipettiert man 2-5 µl der zu bestimmenden Probe und füllt ad 100 µl H₂O_{dest.} auf. Zu der Probenlösung gibt man 100 µl Biorad-Reagenz As und 800 µl Biorad-Reagenz B. Nach Durchmischung der Lösungen inkubiert man 20 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttelinkubator. Analog dazu erstellt man eine Eichgerade mit BSA (Stammkonzentration 1 µg/µl) für den Bereich 0-18 µg (z. B. 5 µg: 5 µl ad 100 µl H₂O_{dest.}). Die Messung erfolgt bei 750 nm mit Hilfe eines Spektrophotometers gegen eine Referenz aus 100 µl H₂O_{dest.} Und 900 µl Biorad-Reagenz AsB (siehe oben). Man ermittelt die Proteinkonzentration der Probe aus der erstellten Eichgeraden.

4.2.15 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

4.2.15.1 Prinzip

SDS-PAGE (Abkürzung für engl. sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) wird in der Analytik von Proteinen verwendet (Laemmli, 1970). Als Trennmedium bei dieser Art der Elektrophorese dient ein Gel auf Polyacrylamidbasis. Zusätzlich kommt SDS zum Einsatz. Dieses anionische Detergens überdeckt die Eigenladungen von Proteinen, so dass die Proteine eine konstante Ladungsverteilung aufweisen. Diese Proteine werden, nach Hinzugabe von β -Mercaptoethanol, auf 95 °C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Unterbrechen von Wasserstoffbrücken und das Strecken der Moleküle aufzubrechen. Durch das β -Mercaptoethanol werden zusätzlich vorhandene Disulfidbrücken reduziert. Die denaturierten Proteine können nun durch anlegen elektrischer Spannung nach Durchlaufen des Sammelgels im Trenngel ihrer Größe (molekularen Masse) nach getrennt werden. Zusätzlich zu den Proben lädt man einen Größenmarker auf das Gel. Dieser besteht aus Proteinen mit bekannter Größe und ermöglicht dadurch die Abschätzung der Größe von Proteinen in den eigentlichen Proben. Die Proteine können anschließend durch weitere Analysen (Färbung, wie z. B. Coomassieblau-Lösung, Immunologische Nachweise, wie z. B. Western-Blot) bestimmt werden.

4.2.15.2 Durchführung

Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wird zunächst ein Trenngel (4.1.7.15) gemischt und in den vorbereiteten Gel-Gießstand gegossen. Dieses überschichtet man nun mit einem 1-Butanol/ $H_2O_{\text{dest.}}$ -Gemisch, um es vor dem Austrocknen zu schützen. Sobald das Gel ausgehärtet ist, wird das Gemisch durch Ausspülen mit $H_2O_{\text{dest.}}$ entfernt und die vermengten Zutaten für das Sammelgel (4.1.7.15) auf das ausgehärtete Trenngel gegeben. In dieses bringt man vor dem Aushärten noch den Kamm an. Während das Gel aushärtet, werden die Proben vorbereitet. Je nach Kamm- und Gel-Größe kann bis zu 50 μl des zu untersuchenden Proteinextrakts aufgetragen werden. Dazu wird so viel Ladepuffer (4 X) hinzu pipettiert, dass er 1 zu 4 verdünnt vorliegt und gegebenenfalls wird mit destilliertem Wasser zu dem benötigten Gesamtvolumen aufgefüllt. Zusätzlich wird ein Ansatz mit Proteinlängenstandard (16 μl bzw. 25 μl , (Rainbow-ladder)) vorbereitet. Alle Proben werden für 5 min bei 95 °C denaturiert und danach auf Eis gelagert. Nach dem Auftragen der Proben auf das Gel legt man für 1 h (bzw. 18 h 50 V über Nacht) eine Spannung von 80 V an.

4.2.16 Proteintransfer (Western-Blot), Detektion mit Antikörpern

4.2.16.1 Prinzip

Mittels Western-Blot kann man überprüfen, ob ein Zellextrakt ein bestimmtes Protein enthält. Dazu werden die Proteine des Extrakts (siehe 4.2.13) zunächst mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt (4.2.15). Anschließend werden sie durch Anlegen einer Spannung auf eine Membran transferiert („geblottet“). Das ursprüngliche Trennmuster der verschiedenen Proteinmoleküle bleibt dabei erhalten. Auf dieser Membran lassen sich die Proteine über eine immunologische Reaktion mit den entsprechenden Antikörpern nachweisen (Towbin et al., 1979).

4.2.16.2 Durchführung

4.2.16.2.1 Protein-Blotting

Zunächst werden wie in Kapitel 4.2.13.2 Zellextrakte hergestellt und wie in Kapitel 4.2.15 beschrieben mit Hilfe von einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend werden eine auf die genaue Größe des Trenngels zugeschnittene Nitrocellulosemembran, deren rechte obere Ecke abgeschnitten wurde, und jeweils zwei Pads und Whatman-Filter pro Gel durch Einweichen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ und anschließend in Transferpuffer befeuchtet. Dabei sind Luftblasen auf der Membran unbedingt zu vermeiden. Selbstverständlich werden bei allen Arbeitsschritten Handschuhe getragen, um Verunreinigungen des Gels und der Membranen zu vermeiden. Das SDS-Gel (4.2.15) wird nach Entnahme aus der Elektrophoresekammer vorsichtig mit entionisiertem Wasser abgespült, das Sammelgel sowie die rechte obere Ecke abgetrennt und in Transferpuffer unter leichtem Schwenken gereinigt. Nun stapelt man vorsichtig unter Vermeidung von Luftblasen der Reihe nach (siehe Abb. 4-10) ein Pad, einen Whatman-Filter, die äquilibrierte Membran, das befeuchtete Trenngel und schließlich nochmals eine Lagen Whatman-Filter und Pad auf die der Anode zugewandten Seite der Transferkammer. Jetzt wird die Kammer vorsichtig verschlossen und in die Transferapparatur eingeschoben. Es ergibt sich daher die in Abb. 4-10 dargestellte Anordnung.

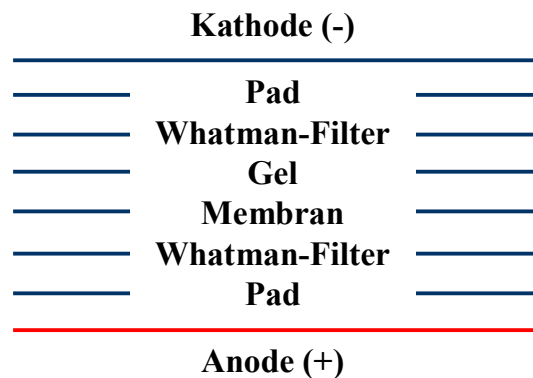


Abb. 4-10: Anordnung der Bestandteile der Blottingapparatur.

Die Blotting-Kammer wird mit kaltem Transfer-Puffer befüllt und in einen Kälteraum gestellt. Der Transfer erfolgt nun unter Anlegen einer Spannung von 20 V für 1 h. Danach wird die Blotmembran wieder entnommen. Das Sammelgel kann nun zur unspezifischen Anfärbung aller Proteine mit Coomassieblau-Lösung behandelt werden (siehe 4.2.16.2.2).

4.2.16.2.2 Färbung des Gels

Zur Färbung wird das geblottete Gel mit Coomassieblau-Lösung für 30-40 min auf einem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgt eine Inkubation unter gleichen Bedingungen für 1-2 h mit Gel-Wasch-Lösung und anschließend eine Inkubation für 1 h mit Gel-Wasch-Lösung G. Das so gefärbte Gel wird nun mit einem Heoffer Dry Frame über Nacht getrocknet und kann am nächsten Tag dokumentiert werden.

4.2.16.2.3 Inkubation mit Antikörpern

Um die Proteine auf der Membran zu fixieren, wird sie mit Milch 5 % (Blockierungslösung 5 % Milch in PBS/Tween (0,05 %)) behandelt (entweder zwei Stunden bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C). Zur Behandlung mit dem Antikörper wird zunächst die Antikörperlösung I a, b oder c hergestellt und die Membran darin zwei Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert (es kann auch über Nacht bei 4 °C inkubiert werden). Danach wird die Membran gewaschen, indem sie viermal mit ca. 10 ml PBS/Tween (0,05 %) unter leichtem Schwenken für 10, 15, 15 und 10 min bei Raumtemperatur aufbewahrt wird. Anschließend wird die Antikörperlösung II a oder b je nach primärem Antikörper angesetzt und zur Membran gegeben, die darin 45 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken aufbewahrt wird. Für die Antikörperlösung I c (Aktin-Antikörper)

ist keine Inkubation mit einem sekundären Antikörper notwendig, da der primäre Antikörper bereits die für die Detektion notwendige HRP trägt. Danach wird unter den gleichen Bedingungen dreimal für 15 min und zweimal für 10 min mit PBS/Tween (0,05 %) gewaschen.

4.2.16.2.4 Detektion mit ECL

Nach Durchführung der Waschschriffe können jetzt diejenigen Proteinbanden detektiert werden, an die zunächst die spezifischen Antikörper (p53 oder Phospho-p53(Ser15)) und anschließend die mit horse-raddish-peroxidase-gelabelten (HRP) Antirabbit-(IgG)- oder Antimouse-(IgG)- Sekundärantikörper gebunden haben. Zum Sichtbarmachen der Immunreaktion wird das Western Detection Kit mittels Chemilumineszenz (ECL+Plus™), gemäß den Angaben des Herstellers, verwendet. In ein 50 ml Greinerröhrchen werden pro Membran 4 ml der Lösung A und 4 ml der Lösung B pipettiert. Die Waschlösung wird nun von der Membran entfernt und die Detektionslösung hinzugegeben. Nach genau einer Minute wird das Reagenz entfernt und die Membran mit einem Papiertuch getrocknet. Die Membran wird in eine Autoradiographiekassette gelegt und blasenfrei mit Zellophanfolie bedeckt. Nun muss die Kassette, um Lichteinfall zu vermeiden, sofort geschlossen werden. In einer Dunkelkammer wird ein Kodak-Blottingfilm zur Belichtung in die Kassette auf die Membran gelegt und nach 10 s - 30 min (die Belichtungszeit ist abhängig von der Bindung des sekundären Antikörpers und muss experimentell ermittelt werden) wieder entnommen. Es können auch mehrere Filme hintereinander mit unterschiedlichen Expositionszeiten belichtet werden. Der belichtete Film wird mit Hilfe eines automatischen Filmentwicklers entwickelt und schließlich dokumentiert.

Nachdem der Film entwickelt wurde, wird die Membran dreimal für 15 min und zweimal für 10 min mit PBS/Tween (0,05 %) gewaschen. Sie kann nun entweder in PBS/Tween (0,05 %) bei 4 °C für sieben Tage aufbewahrt werden (vor Austrocknung schützen!) oder mit einem weiteren Antikörper inkubiert werden. Dazu wird sie, wie in 4.2.16.2.3 beschrieben, behandelt. Wichtig ist, dass ein erneutes Blockieren mit Milch 5 % erfolgt.

4.2.17 Bestimmung der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität

4.2.17.1 Prinzip

Ob und in welchem Ausmaß eine Zelle dazu in der Lage ist, oxidative Basenmodifikationen wie 8-oxoG in der DNA zu erkennen und zu reparieren, kann mit Hilfe eines Cleavage Assays überprüft werden. Bei diesem inkubiert man aus Zellen gewonnene Proteinextrakte (siehe Kapitel 4.2.13.1) mit einem 34mer-Oligonukleotid, das als Substrat ein einzelnes 8-oxoG in Position 16 (5'-GGCTTCATCGTTATT(8-oxoG)ATGACCTGGTGGATACCG-3') aufweist. Die Synthese erfolgt wie bei Girard et al. (Girard and Boiteux, 1997) beschrieben.

Besitzen diese Extrakte nun eine funktionierende 8-oxoG-Glykosylase, wird 8-oxoG aus dem Oligo entfernt und man erhält nach Alkali-Behandlung ein kürzeres Oligonukleotid. Im vertikalen, 20 %igen Acrylamid-Gel lassen sich die beide Oligonukleotid-Formen (geschnitten und nicht geschnitten) durch unterschiedliches Wanderungsverhalten im elektrischen Feld voneinander auftrennen. Zur Detektion und Quantifizierung wird das Oligonukleotid vor dem Versuch mit ^{32}P -Labelling markiert.

4.2.17.2 Durchführung

Der Cleavage Assay wird durchgeführt, wie bei Vidal et al. beschrieben (Vidal et al., 2001b). Zunächst wird das 34mer-Oligonukleotid mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase und $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ am 5'-Ende radioaktiv markiert.

4.2.17.2.1 Markierung des Oligonukleotids

Hierzu werden 10 μl des 34mer Oligonukleotids (2 pmol/ μl) in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 2 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$, 5 μl ^{32}P -ATP (500 μCi), 22 μl PNK-Puffer (10 X), 15 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ und 1 μl T4-PNK-Kinase (9 U/ μl) für eine Stunde im 37 °C Wasserbad inkubiert. Um überschüssiges ^{32}P -ATP zu entfernen wird das markierte Oligonukleotid anschließend gereinigt. Hierzu fügt man 180 μl TE-Puffer, 55 μl NaCl (5 M), 20 μl SDS (10 %) und 300 μl Chloroform/Ethanol (1:1) hinzu und mischt die Lösung eine Minute auf einem Vortex-Gerät. Nun stellt man die Mischung 2 min auf Eis, zentrifugiert für 2 min bei 4 °C und 12000 rpm. Der wässrige Überstand wird in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 5 μl Polyacrylamidlösung (0,25 %) und 1 ml Ethanol versetzt, kurz gevortext und für weitere 30 min unter den gleichen Bedingungen, um die DNA auszufällen, zentrifugiert. Der Überstand wird nun vorsichtig abpipettiert und das Oligonukleotid, indem man das Reaktionsgefäß mit offenem Deckel unter dem Abzug eines

Radioaktiv-Labors für 1 Stunde stehen lässt, getrocknet. Das trockene Pellet wird in 40 µl TE-Puffer aufgenommen und gut gevortext.

4.2.17.2.2 Hybridisierung und PAGE

Zur Hybridisierung mit einem komplementären Oligonukleotid (an Position 16 trägt dies ein Cytosin) werden 20 µl des markierten, 8-oxoG-haltigen Stranges (Konzentration 500 fmol/µl) mit 20 µl eines Komplementärstranges (1 pmol/µl) und 40 µl TE-Puffer für 5 min im Heizblock (95 °C) inkubiert, so dass man einen Doppelstrang mit 8-oxoG:C erhält. Danach wird die Lösung langsam, zunächst auf Zimmertemperatur, dann auf Eis und schließlich auf -20 °C abgekühlt. Der so erhaltene Oligomastermix hat eine Endkonzentration von 125 fmol/µl, er kann bei -20 °C aufbewahrt und für 4-6 Wochen (Halbwertszeit 14 d) verwendet werden.

Die Herstellung der Zellpellets bzw. der daraus gewonnenen Zellextrakte ist in den Kapiteln 4.2.13.1.1 und 4.2.13.1.2 beschrieben. Zur Messung der 8-oxoG-Cleavage-Aktivität der gewonnenen Zellextrakte wird bis zu 4 µl des Extraktes in Lysepuffer MS/AAL (Proteingehalt: 2-20 µg) mit 12 µl Oligonukleotid-Lösung gemischt. Als Negativkontrolle werden nur 4 µl Lysepuffer MS/AAL mit dem Oligonukleotid inkubiert, bei der Positivkontrolle werden 1,45 µl Fpg-Rohextrakt (6,9 mg/ml) in 4,0 ml BE1 gegeben und davon 4 µl mit (10 ng/4 µl) eingesetzt. Die Ansätze werden für 60 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Während der Inkubation wird das Polyacrylamid-Trenngel vorbereitet. Hierzu pipettiert man zu 6 ml der Polyacrylamidlösung 60 µl APS (10 %) und 6 µl TEMED. Nach kurzem Schwenken wird die Lösung in die vorbereitete Gelkammer gegossen und der Kamm angebracht. Das Aushärten des Gels dauert ca. 20 min. Nach der Inkubation der Oligonukleotide mit den Zellextrakten wird in jeden Ansatz jeweils 1,6 µl 1 M NaOH gegeben und erneut für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird durch Zugabe von 4 µl Stopppuffer die Reaktion beendet, kurz gevortext, herunter zentrifugiert und die Reaktionsgefäße, um die DNA zu denaturieren, 5 min lang bei 95 °C im Heizblock erhitzt. Die so erhaltenen Ansätze können einige Minuten auf Eis aufbewahrt werden. Sobald das Gel ausgehärtet ist, werden die Gelträger in die Kammer eingespannt und diese wird mit TBE-Puffer (1X) aufgefüllt. Die Käme werden entfernt und die Geltaschen mit TBE-Puffer (1X), um eventuell vorhandenen Harnstoff zu entfernen, ausgespült. Nach Aufbringen der Proben legt man für 40 min eine Spannung von 400 V (gegebenenfalls bei 4 °C) an.

4.2.17.2.3 Intensitätsbestimmung

Das Gel wird vorsichtig aus der Halterung entfernt und in Haushaltsgefrierbeutel eingeschweißt. Danach wird es in einer Kassette fixiert und für eine Stunde (oder über Nacht) ein Radio-Detektionsfilm aufgelegt. Dieser wird im Anschluss mit Hilfe eines STORM[®] Phosphoimagers analysiert. Aus dem Verhältnis der Intensitäten von eingeschnittenen (16mer) und nicht eingeschnittenen (34mer) Oligonukleotiden lässt sich die 8-oxoG-Glykosylaseaktivität der Extrakte berechnen.

4.2.18 Luciferase Assay

4.2.18.1 Prinzip

Zur Bestimmung der DNA-Reparaturkapazität durch die Luciferaseaktivität in einem Host-Zellen Reaktivierungsassay (Runger et al., 1995; Emmert et al., 2002), werden die zu untersuchenden Zellen mit einem, vor der Transfektion mit unterschiedlichen Dosen UVB geschädigten Plasmid transfiziert. In diesem Plasmid (siehe 4.2.9) (von M. Hedayati, Johns Hopkins University, Baltimore, MD) wurde der ursprüngliche SV40 Promotor des Luciferase-Gen enthaltenden Plasmids pGL3 (Promega, Madison, WI, USA) durch einen CMV Promotor ersetzt. Je nach Effizienz der Nukleotid-Exzisions-Reparatur in den Zellen, wird nun das Plasmid wieder reaktiviert. Diese Reaktivierung ist durch eine Bestimmung der Fluoreszenzintensität bestimmbar.

4.2.18.2 Vorbereitung und Schädigung des Plasmids

Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität in einem Host-Zellen Reaktivierungsassay werden 125000 Fibroblasten (250000 Keratinozyten) in eine P35 Zellkulturschale mit 2 ml Kulturmedium gegeben. Diese Zellen werden für zwei Tage inkubiert. Anschließend kann eine Behandlung wie in 4.2.12 beschrieben mit p53-siRNA und/oder UVB erfolgen.

Das, wie in Abschnitt 4.2.9 beschrieben, gewonnene Plasmid wird in Tris-EDTA Puffer (Konzentration 30 µg/ml) mit UVB (0-0,5 mJ/cm²) geschädigt. Dazu wird das Plasmid unter einem Solar Simulator (Kratos Analytical, Ramsey, NJ) mit einem Emissions Spektrum, wie in Werninghaus et al. (Werninghaus et al., 1991) beschrieben, inkubiert. Für die Bestimmung der Dosis wurde ein IL-1700 Research Radiometer (International Light, Newburyport, MA) mit einem UVB-Sensor (SED 240, in Kombination mit einem 280 nm cut-off Filter) verwendet. Der Schaden wurde demzufolge hauptsächlich durch UVB verursacht. Anschließend wird das Plasmid bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

4.2.18.3 Plasmidtransfektion

Die Zellen werden zwei Tage nach dem Aussäen oder bei erfolgter Behandlung nach zusätzlichen 18 h (Expressions-Periode) mit dem vorbehandelten Plasmid transfiziert. Hierzu stellt man zunächst steril eine Transfektionslösung A bestehend aus 25 µg des Plasmids in 125 µl RNase freies H₂O und 125 µl Opti-Mem[®] I Transfektionsmedium sowie eine Transfektionslösung B, bestehend aus 16 µl Lipofectamin[™] 2000 und 244 µl Opti-Mem[®] I Transfektionsmedium, her. Beide Lösungen werden für fünf Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Transfektionslösung A und B werden nun vereinigt und für weitere 20 Minuten bei RT inkubiert. Während dieser Inkubation wird das Kulturmedium von den zu transfizierenden Zellen entfernt. Nach Beendigung der Inkubation wird in jede p35 Zellkulturschale 2 ml (in p60 2,5 ml) der Transfektionslösung AB gegeben. Nach 24 Stunden bei normalen Zellkulturbedingungen entfernt man die Transfektionslösung und pipettiert 2,5 ml Kulturmedium (3 ml in p60) hinzu.

4.2.18.4 Bestimmung der Luciferaseaktivität

Nach 48 Stunden wird das Kulturmedium von den transfizierten Zellen abpipettiert und zweimal mit PBS gewaschen. Man gibt nun 300 µl PBL hinzu und inkubiert für 40 Minuten (nach 20 Minuten dreht man die Schalen um 90°) im Dunkeln bei RT auf einem Schüttler. Die PBL-Lösung wird anschließend in 2 ml Eppendorfgefäße überführt und im Dunkeln auf Eis gelagert. Zur eigentlichen Bestimmung der Luciferaseaktivität werden zu 20 µl der PBL-Lösung, 100 µl Luciferase Assay Substrat hinzu gegeben und mit Hilfe des Luminometers (Delay 3 s, Integration Time 15 s) bestimmt. Der Blank sollte so eingestellt werden, dass der höchste Wert zwischen 4000 und 10000 ist. Die erhaltenen Daten werden mit Hilfe von MS-Excel, auf die Luciferaseaktivität in dem ungeschädigten Plasmid bezogen, berechnet und grafisch dargestellt.

4.2.19 Test auf Mycoplasmen

Zellen, die mit Mycoplasmen infiziert sind, haben unter Umständen nicht die gewünschten oder andere Eigenschaften. Mit diesem Test soll erfasst werden, ob eine Zellkultur mit Mycoplasmen infiziert ist oder nicht.

Zur Detektion von Mycoplasmen werden suspendierte Zellen mit einer Zytocentrifuge auf Objektträger aufgeschleudert. Anschließend werden die Präparate mindestens eine Stunde in Methanol bei -20 °C fixiert. Danach werden die Präparate mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Bisbenzimid Nr. 33258) für 30 s gefärbt und zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen. Mittels Eindecklösung wird dann ein Deckgläschen

aufgebracht. Durch die Färbung mit Bisbenzimid wird lediglich die DNA blassblau gefärbt, das Zytoplasma ist nicht sichtbar. Bei der visuellen mikroskopischen Auswertung wird geprüft, ob um die gut sichtbaren und klar abgegrenzten Zellkerne herum ein hell angefärbter Schleier zu sehen ist, der auf eine Kontamination mit Mycoplasmen hindeutet. In (Abb. 4-11) ist ein Ausschnitt aus einem unkontaminierten Präparat gezeigt.

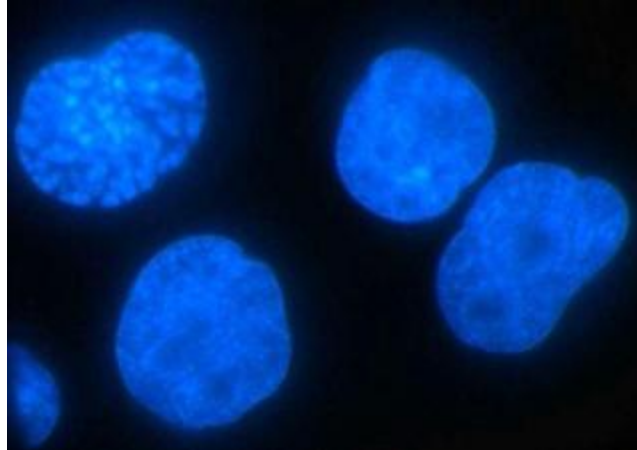


Abb. 4-11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Zellkernen unbehauelter V79-MZ Zellen
Die Färbung erfolgte mit Bisbenzimid Nr. 33258.

5 ERGEBNISSE

5.1 *Induzierbarkeit DNA-Reparaturmechanismen durch DNA-Schäden*

Ob vorhergehende DNA-Schäden zu einer Induktion der zellulären Reparatur von oxidativen Schäden durch die BER oder anderer DNA-Reparaturmechanismen in vivo führen, konnte bis heute nicht eindeutig geklärt werden. Daher war es von großem Interesse, herauszufinden, wie die Reparaturkapazität in Säugerzellen durch unterschiedliche DNA-schädigende Agenzien beeinflusst wird. Zur DNA-Schädigung wurden einerseits Agenzien wie Ro19-8022, welches primär oxidative DNA-Schäden verursacht, oder MMS, welches DNA alkyliert, und andererseits UVB-Strahlung, welche zu Cyclobutanpyrimidindimeren und in hohen Dosen auch zu oxidativen DNA-Modifikationen führt, verwendet. Die Untersuchungen erfolgten an proliferierenden immortalisierten Maus-Embryofibroblasten (F11.1, MEFs), primären menschlichen Zellen (FB2-299), welche eine unveränderte Enzymausstattung aufweisen, primären Keratinozyten und p53-profizienten Fibroblasten aus menschlichem Brustkrebsgewebe (MCF7). Diese unterschiedlich ausgestatteten Zelllinien ermöglichten es, den Einfluss einer Priming-Dosis und/oder des p53-Tumorsuppressorgens auf die DNA-Reparatur in vivo zu untersuchen.

5.1.1 **Toxizität von Ro19-8022 und MMS-Behandlung**

Zur Sicherstellung, dass es unter Einwirkung der Substanzen nicht zu einem hohen Absterben der Zellen und damit verbunden zu einer Verfälschung der Messwerte oxidativer DNA-Schäden bei der Alkalischen Elution kommt, wurde mit Hilfe von Toxizitätstests die Zytotoxizität bei der Inkubation mit Ro19-8022 und Methylmethansulfonat (MMS) getestet. Dazu wurden der Proliferationsfaktor und die „plating efficiency“ (siehe 4.2.2.3 und 4.2.8) in Maus-Embryofibroblasten (F11.1) und primären menschlichen Zellen (FB2-299), für Ro19-8022 in den Konzentrationen 0 (nur Bestrahlung), 50 und 200 nM plus Licht und für MMS mit den Konzentrationen 50, 200 und 400 μ M, bestimmt. Die Kontrollen wurden bis auf die Schädigung gleich behandelt.

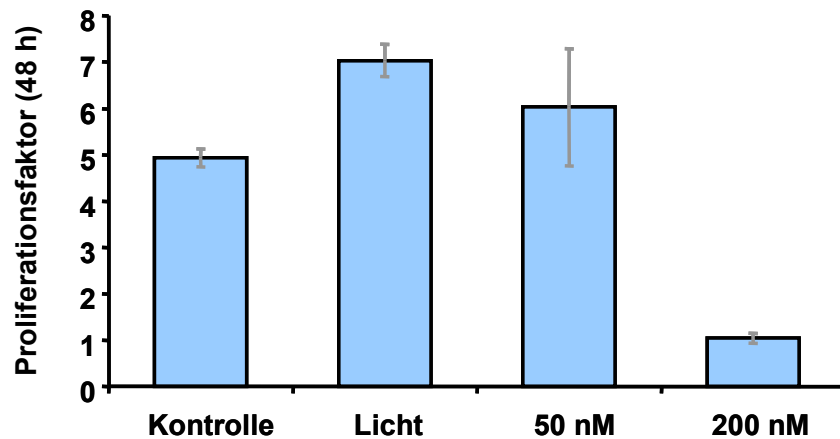


Abb. 5-1: Proliferationsfaktor nach Inkubation mit Licht oder Ro19-8022 plus Licht.

Die Bestrahlung erfolgte für 15 min in PBSCMF mit sichtbarem Licht, 1000 W und den angegebenen Konzentrationen Ro19-8022 in 38 cm Abstand [249 kJ/m²], bei 0 °C in F11.1 Zellen. n = 3.

Die Proliferationsfaktoren zeigen, dass es bei einer Konzentration von 200 nM Ro19-8022 plus Licht zu einer Inhibition der Zellteilung kommt, wohingegen eine Behandlung nur mit sichtbarem Licht oder 50 nM Ro19-8022 plus Licht keinen Einfluss hat (Abb. 5-1). Ein ähnliches Ergebnis bezüglich der Toxizität von Ro19-8022 erhält man bei der „plating efficiency“, wie in Abb. 5-2 gezeigt ist.

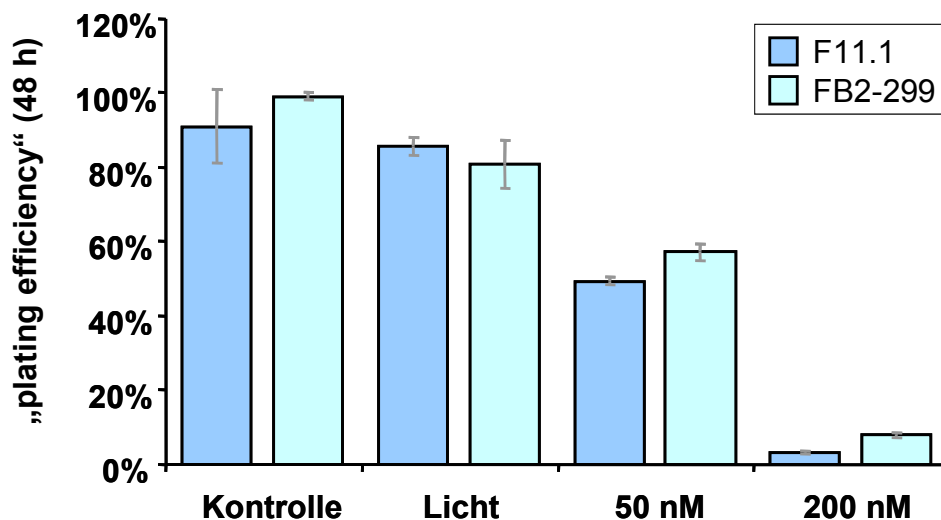


Abb. 5-2: „plating efficiency“ nach Inkubation mit Licht oder Ro19-8022 plus Licht.

Die Bestrahlung erfolgte für 15 min in PBSCMF mit sichtbarem Licht, 1000 W und den angegebenen Konzentrationen Ro19-8022 in 38 cm Abstand [249 kJ/m²], bei 0 °C in F11.1 und FB2-299 Zellen. n = 3.

Bei der „plating efficiency“ hat sichtbares Licht alleine oder 50 nM Ro19-8022 plus Licht ebenfalls nur einen geringen Einfluss, 200 nM Ro19-8022 plus Licht führen dagegen zu einer Reduzierung der „plating efficiency“. Primäre und immortalisierte

Zellen zeigen hierbei keinen Unterschied. Bei einer Konzentration von 200 nM Ro19-8022 wachsen die Zellen zwar komplett an, aber es findet keine Zellteilung innerhalb von 48 h statt.

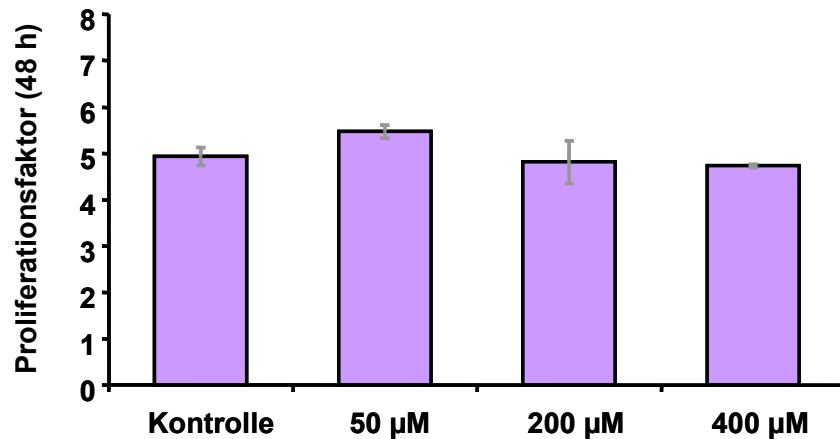


Abb. 5-3: Proliferationsfaktor nach Inkubation mit MMS.

Die Schädigung erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen MMS für 30 min in serumfreien Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ in F11.1 Zellen (n = 3).

Die Ergebnisse bei der Behandlung mit MMS zeigen, dass MMS bis zu einer Konzentration von 400 µM keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsfaktoren hat (Abb. 5-3). Die Proliferationsfaktoren von behandelten Zellen entsprechen denen der Kontrolle. Folglich ist die Zellteilung bei den verwendeten Konzentrationen MMS im Vergleich zu unbehandelten Zellen nicht verändert.

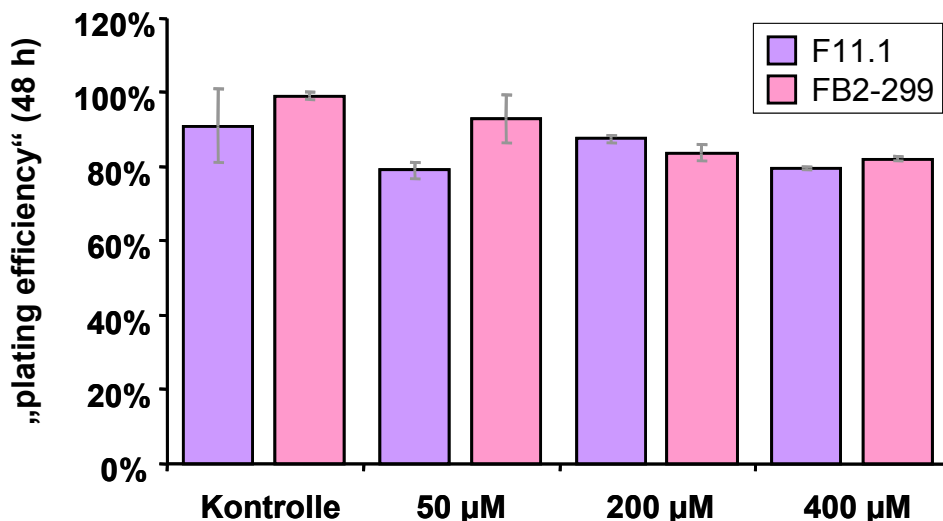


Abb. 5-4: „plating efficiency“ nach Inkubation mit MMS.

Die Schädigung erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen MMS für 30 min in serumfreien Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ in F11.1 und FB2-299 Zellen. n = 3.

Die „plating efficiency“ ist ebenfalls sowohl in primäre als auch immortalisierte Zellen bis zu einer Konzentration von 400 μM MMS unbeeinflusst. So sind auch hier keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle vorhanden (Abb. 5-4).

Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen sind demzufolge für weitere Untersuchungen bezüglich der BER mit Hilfe der Alkalischen Elution geeignet.

5.1.2 Einfluss von Ro19-8022 und MMS auf den zellulären Glutathiongehalt

Um zu überprüfen, ob und nach welcher Zeit Zellen mit einer adaptiven Antwort auf DNA-Schäden reagieren, wurde zunächst der Gehalt an Glutathion, einem wichtigen zellulären Antioxidans, nach Schädigung mit 200 nM Ro19-8022 plus sichtbarem Licht (249 kJ/m^2) oder 200 μM MMS (37°C , 30 min), sowohl in immortalisierten Maus-Embryofibroblasten (F11.1, Abb. 5-5) als auch in primären menschlichen Zellen (FB2-299, Abb. 5-6), analysiert. Die Bestimmung erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten bis zu 48 Stunden nach der Schädigung. Die Zellen wurden nach der Schadensinduktion in Kulturmedium bei 37°C und 5 % CO_2 kultiviert.

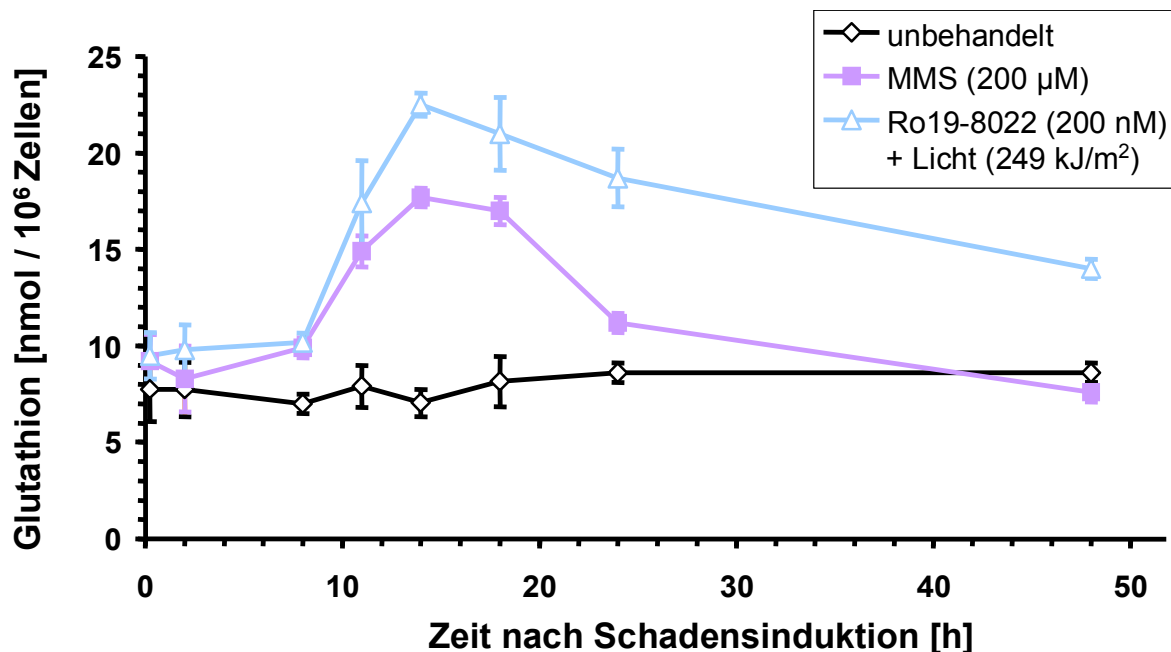


Abb. 5-5: Glutathiongehalt in F11.1 Zellen nach Schädigung mit MMS (Quadrate) und mit Ro19-8022 plus Licht(Dreiecke).

Die Schädigung erfolgte mit 200 μM MMS für 30 min in serumfreien Medium bei 37°C und 5 % CO_2 . Die Schädigung mit 200 nM Ro19-8022 plus Licht 1000 W erfolgte in 38 cm Abstand [249 kJ/m^2], für 15 min in PBSCMF bei 0°C . $n = 3$.

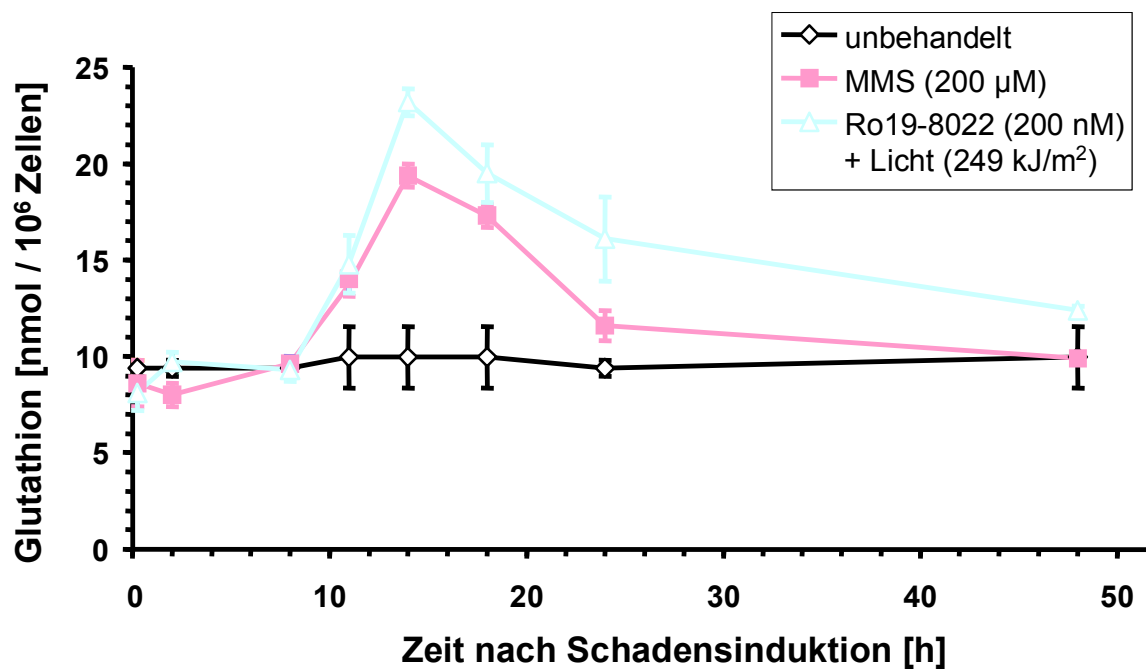


Abb. 5-6: Glutathiongehalt in FB2-299 Zellen nach Schädigung mit MMS (Quadrate) und mit Ro19-8022 plus Licht (Dreiecke).

Die Schädigung erfolgte mit 200 µM MMS für 30 min in serumfreien Medium bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Schädigung mit 200 nM Ro19-8022 plus Licht 1000 W erfolgte in 38 cm Abstand [249 kJ/m²], für 15 min in PBSCMF bei 0 °C. n = 3.

Die Ergebnisse für F11.1 (Abb. 5-5) und FB2-299 (Abb. 5-6) zeigen, dass unabhängig vom Zelltyp der intrazelluläre Glutathiongehalt nach 11 bis 18 h auf etwa das Doppelte ansteigt und danach wieder auf das Ausgangsniveau zurückgeht. Die durch einen oxidativen Schaden verursachte Glutathionerhöhung ist dabei geringfügig höher als die durch das Alkylanz verursachte, obwohl ein ungefähr gleiches Ausmaß an DNA-Schäden verursacht wurde. Weiterhin sinkt der Glutathiongehalt nach oxidativer Schädigung langsamer ab. Für Ro19-8022 zeigt dies außerdem, dass die Synthese von Glutathion und damit die Genexpression trotz gehemmter Zellteilung bei 200 nM nicht verringert sind.

Die erhöhte Expression von Glutathion kann einerseits direkt durch den oxidativen Stress verursacht werden. So wird Glutathion als Cofaktor der Glutathion-Peroxidase und damit zur Reduktion von H₂O₂ zu Wasser benötigt. Andererseits kommt Glutathion auch als Reduktionsmittel für die an der DNA-Reparatur beteiligten Enzyme wie z. B. Fpg, welche zur Reparatur des durch den Stress verursachten DNA-Schäden benötigt werden, in Frage, ob einer oder beide Mechanismen den zellulären Anstieg von Glutathion bedingen, bleibt zu klären. Die Zellen zeigen jedoch, wie bereits beschrieben, eine deutliche Antwort auf den induzierten Schaden.

5.1.3 Induzierbarkeit der Reparatur Fpg-sensitiver Modifikationen durch Schädigung mit Ro19-8022

Zunächst wurde in immortalisierten Maus-Embryofibroblasten überprüft, welche Wirkung eine Vorbehandlung (Priming) mit einem Photosensibilisator (Ro19-8022) plus Licht auf die Reparatur Fpg-sensitiver oxidativer DNA-Modifikationen nach einer kurzen Expressions-Periode (6 h) hat. Zu diesem Zeitpunkt ist noch keine Erhöhung der Proteinexpression von Glutathion vorhanden. Wie in 2.3.3 beschrieben, induziert Ro19-8022 hauptsächlich die Bildung von 8-oxoG und nur in geringem Maße andere DNA-Modifikationen, wie SSBs, AP-Läsionen und oxidative Pyrimidin-Modifikationen.

Die Zellen wurden zum Priming und zur Schädigung jeweils mit einer identischen Konzentration des Photosensibilisators Ro19-8022 (50 nM) inkubiert, jedoch unterschiedlich langen Belichtungszeiten ausgesetzt. 4 min Bestrahlung mit sichtbarem Licht (67 kJ/m^2) sollten eine zelluläre Antwort anregen (Induktion der Reparatur, Priming), während die eigentliche Messung der Reparatur nach 15 min Bestrahlung (249 kJ/m^2) erfolgte (Schädigung). In Abb. 5-7 ist das Schema für die Überprüfung der Induzierbarkeit dargestellt. Dem Priming folgte eine Expressions-Periode von 6 h unter Kulturbedingungen, in der Induktionsmechanismen der DNA-Reparatur ablaufen sollten. Nach der Schädigung wurde den Zellen 2 h Zeit gegeben, die neu induzierten oxidativen Schäden zu reparieren. In insgesamt sieben Ansätzen wurden die Zahl Fpg-sensitiver Modifikationen nach verschiedenen Kombinationen von Schädigungen und Reparaturzeiten mit Hilfe der Alkalischen Elution gemessen.

In den Ansätzen wurde bestimmt:

Ansatz	Puffer	Abkürzung
1	durch Priming induzierte Modifikationen zum Zeitpunkt 0 h, ohne Reparatur	P
2	durch Schädigung induzierte Modifikationen zum Zeitpunkt 0 h, ohne Reparatur	S
3	durch Priming induzierte Anteil der Modifikationen nach der Expressions-Periode	P + EP
4	durch Schädigung induzierte Modifikationen nach vorangegangenem Priming und Expressions-Periode, ohne Reparatur	P + EP + S
5	durch Schädigung induzierte Modifikationen nach der Reparatur	S + RP
6	der Anteil, der durch Schädigung induzierten Modifikationen nach der Reparatur und nach vorangegangenem Priming und Induktionsphase	P + EP + S + RP

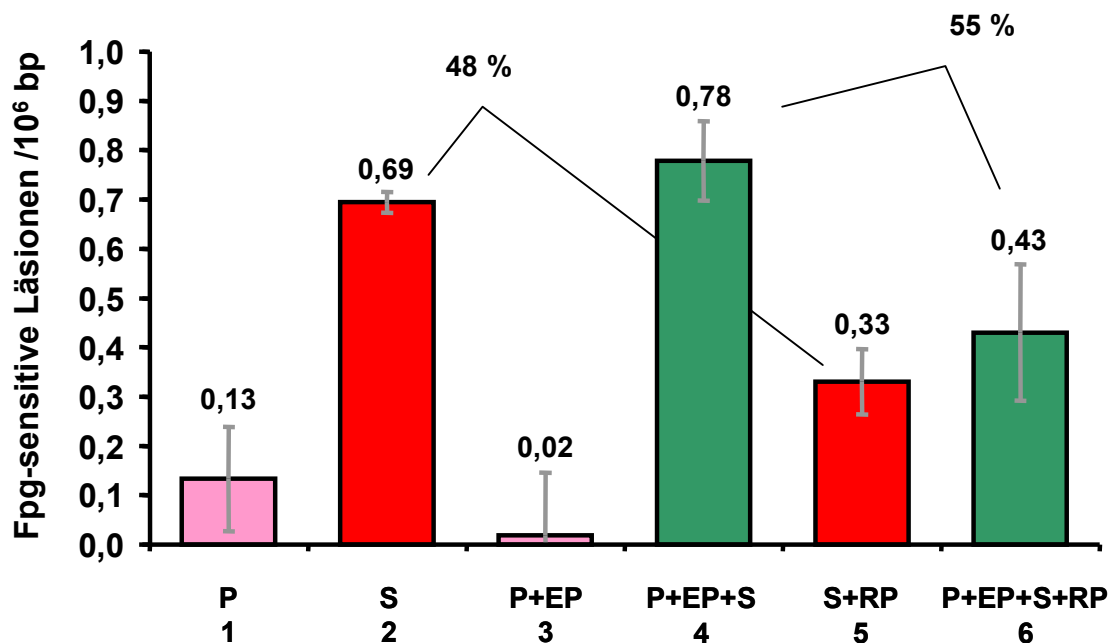


Abb. 5-8: Induktion der Reparatur von Fpg-sensitiver Basenmodifikationen in proliferierenden F11.1 Maus-Embryofibroblasten durch Ro19-8022 Vorbehandlung.

Die Schadensinduktion erfolgte wie in Abb. 5-7 beschrieben. Die „steady state“ Level der unbehandelten Kontrolle sind in den Ansätzen 1-6 abgezogen. $n = 4$.

Die Abb. 5-8 zeigt die Ergebnisse für eine niedrige Priming-Dosis (25 % der Schädigungsdosis), gefolgt von einer kurzen Expressions-Periode (6 h). Die von der Priming-Dosis induzierten Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen (Abb. 5-8, Balken 1) sind nach der Expressions-Periode (Abb. 5-8, Balken 3) vollständig repariert. Die von einer nachfolgenden Schädigungs-Dosis induzierten Schäden (Abb. 5-8, Balken 4) sind vergleichbar hoch wie jene ohne ein vorhergehendes Priming (Abb. 5-8, Balken 2). Nach 2 h Reparatur sind noch 55 % der Fpg-sensitiven Modifikationen vorhanden (Abb. 5-8, Vergleich Balken 6 und 4). Das Ausmaß der Reparatur ist nicht signifikant unterschiedlich zu den beobachteten Ergebnissen ohne eine vorhergehende Priming-Dosis (48 % Restschaden, Abb. 5-8 Vergleich Balken 5 und 2) und ist im Einklang mit bisherigen Untersuchungen der Reparaturkinetik von Ro19-8022 plus Licht induzierten Fpg-sensitiven Modifikationen in MEFs. Dies bedeutet, dass eine der Schädigung vorausgegangene Vorbehandlung mit einer niedrigen Priming-Dosis auf die Reparaturgeschwindigkeit keine deutliche Auswirkung hat. Im Durchschnitt wurden zwar nach erfolgter Vorbehandlung mit einer Priming-Dosis eine um ca. 7 % geringere Reparaturgeschwindigkeiten gemessen, jedoch ist dieser Unterschied aufgrund der Standardabweichungen nicht signifikant.

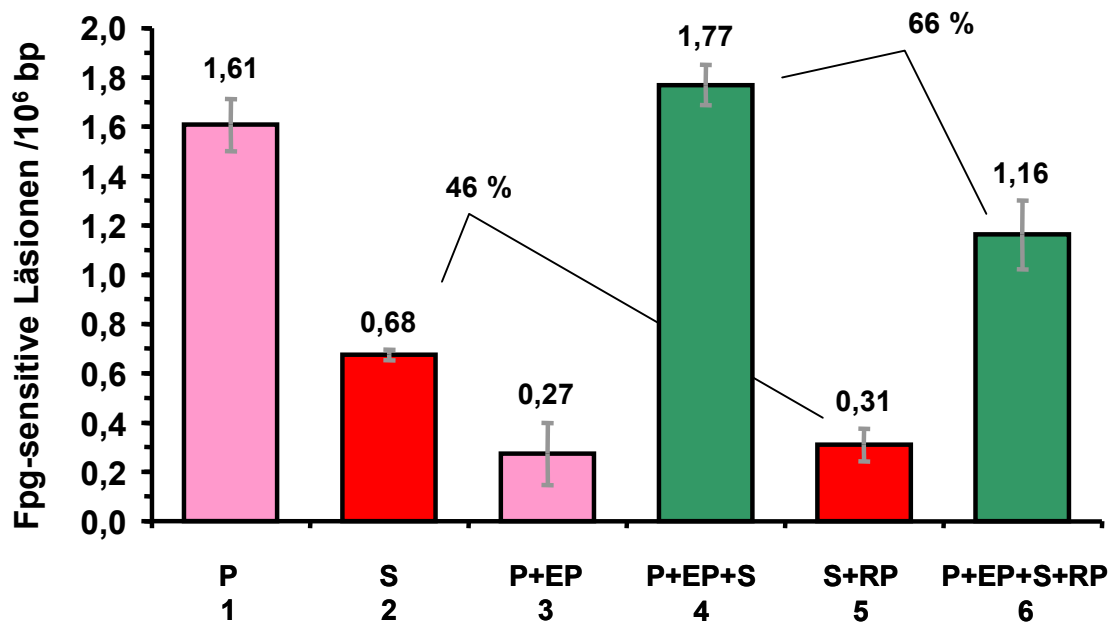


Abb. 5-10: Induktion der Reparatur von Fpg-sensitiver Basenmodifikationen in proliferierenden F11.1 Maus-Embryofibroblasten durch Ro19-8022 Vorbehandlung nach einer verlängerten Expressions-Periode.

Die Schadensinduktion erfolgte wie in Abb. 5-9 beschrieben. $n = 3$.

Obleich die Priming-Dosis auf 400 % der Schädigungs-Dosis erhöht und die Expressions-Periode auf 18 h verlängert wurde, zeigen MEFs hier ein ähnliches Ergebnis bezüglich der DNA-Reparatur. In diesem Fall sind die durch die Priming-Dosis verursachten Schäden (Abb. 5-10, Balken 1) zwar nicht gänzlich nach der Expressions-Periode repariert (Abb. 5-10, Balken 3) und die Schädigungs-Dosis von Ro19-8022 mit Licht verursacht einen wesentlich größeren Schaden nach einem vorhergehenden Priming als ohne (Abb. 5-10, Vergleiche Balken 4 und 2), da aber von einer Kinetik erster Ordnung bei der DNA-Reparatur ausgegangen werden kann, ist ein Vergleich der prozentualen Restschäden zulässig. Obwohl eine adaptive Erhöhung von Glutathion zu diesem Zeitpunkt beobachtet wurde (Abb. 5-5), ist der Prozentsatz der unreparierten DNA-Modifikationen nach 2 h in Zellen die mit einer Priming-Dosis vorbehandelt wurden, höher (66 % Restschaden, Abb. 5-10 Vergleiche Balken 6 und 4), als in Zellen ohne eine Vorbehandlung (46 % Restschaden, Abb. 5-10 Vergleiche Balken 4 und 2).

Die dargestellten Ergebnisse erlauben die Schlussfolgerung, dass sowohl nach einer kurzen, als auch nach einer langen Expressions-Periode ein der Schädigung vorausgegangenes Priming nicht zu einer Verbesserung der Reparatur oxidativer DNA-Schäden führt, obwohl unter gleichen Bedingungen eine Adaptation des Glutathiongehaltes vorliegt.

5.1.4 Induzierbarkeit der Reparatur Fpg-sensitiver Modifikationen durch Schädigung mit MMS

Um eine Induzierbarkeit des Reparatursystems für oxidative DNA-Schäden durch eine andere Vorbehandlung zu überprüfen, wurde diese modifiziert und erfolgte mit Methylmethansulfonat (MMS), welches hauptsächlich alkylierte DNA-Basen und AP-Läsionen induziert. Letztere DNA-Modifikationen werden ebenfalls von dem Reparatorenzym Fpg erkannt, was zu einer Induktion dieses Enzyms oder anderer an der Reparatur beteiligten Enzyme führen könnte.

Als Vorbehandlung wurde anstatt mit dem Photosensibilisators Ro19-8022 plus Licht, mit MMS der Konzentration 200 μM für 30 min bei 37 °C inkubiert (Priming). Die Zahl Fpg-sensitiver DNA-Schäden nach dieser Behandlung entspricht der durch die Priming-Dosis des Photosensibilisators verursachten Zahl im vorhergehenden Experiment. Die eigentliche Schädigung erfolgte wie bisher mit 50 nM und einer Belichtungszeit von 15 min (249 kJ/m^2) (Schädigung). Das Schema für die Überprüfung der Induzierbarkeit wie in Abb. 5-9 dargestellt, wurde unverändert angewandt. Um die DNA-Reparatur zu induzieren, folgte dem Priming erneut eine lange Expressions-Periode von 18 h unter Kulturbedingungen. Nach der Schädigung wurde den Zellen nochmals 2 h Zeit gegeben, die neu induzierten Schäden zu reparieren.

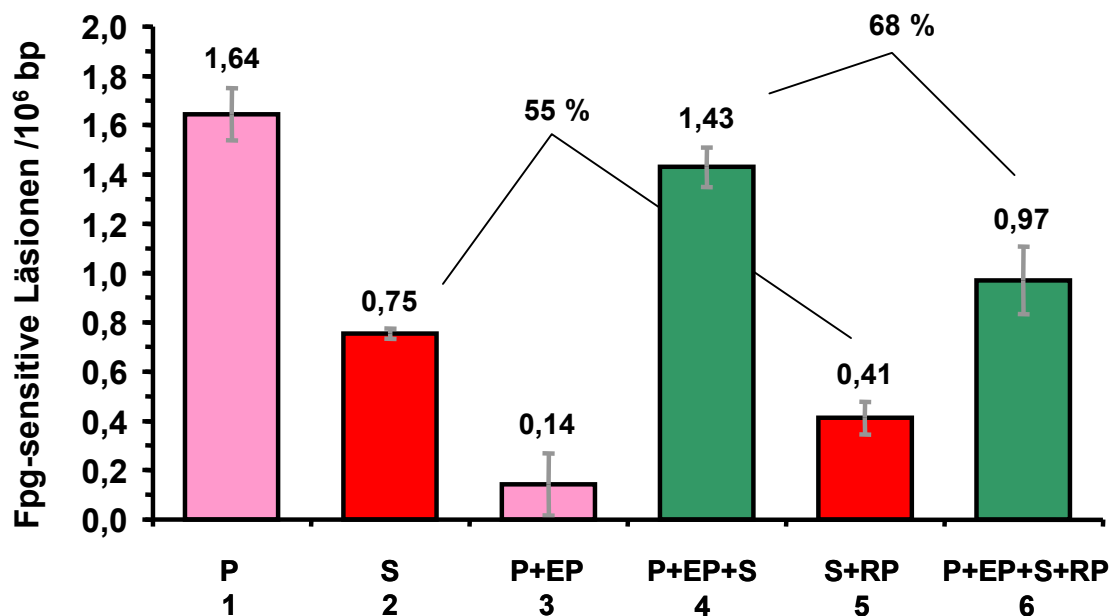


Abb. 5-11: Induktion der Reparatur von Fpg-sensitiver Basenmodifikationen in proliferierenden F11.1 Maus-Embryofibroblasten durch MMS Vorbehandlung.

Die Vorbehandlung erfolgte mit 200 μM MMS bei 37 °C für 30 min in serumfreien Medium. Die Schadensinduktion erfolgte durch Inkubation mit 0,05 μM Ro19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (249 kJ/m^2) bei 0 °C in PBSCMF. $n = 3$.

Die Quantifizierung Fpg-sensitiver Modifikationen erfolgte wie bereits beschrieben nach Kombinationen von verschiedenen Schädigungen und Reparaturzeiten. Die Ergebnisse der Experimente der DNA-Schadensanalyse, dargestellt in Abb. 5-11, zeigen erneut keine signifikante adaptive Beschleunigung der DNA-Reparatur für oxidative Schäden in MEFs nach 2 h durch vorhergehendes Priming (Abb. 5-11, Balken 6 und 4), verglichen mit der Reparatur ohne vorhergehende Schädigung (Abb. 5-11, Balken 5 und 2), obwohl auch nach Behandlung mit MMS eine adaptive Antwort des Glutathiongehaltes vorliegt. Der durch die Priming-Dosis induzierte Schaden (Abb. 5-11, Balken 1) entspricht quantitativ dem mit Ro19-8022-Priming verursachten (Abb. 5-10, Balken 1) und wird ebenfalls fast vollständig repariert (Abb. 5-11, Balken 3). Gleichfalls kann, wie bei den Ro19-8022 vorbehandelten MEFs, eine erhöhte Sensitivität für die Generierung oxidativer Modifikationen nach Vorbehandlung beobachtet werden (Abb. 5-11, Vergleiche Summe Balken 2 und 3 mit Balken 4)

Da in immortalisierten Zellen wie MEFs gewisse, für die Regulation der DNA-Reparatur wichtigen Proteine nicht vorhanden sein könnten und um Speziesunterschiede ausschließen zu können, wurde die Induzierbarkeit nun in primären menschlichen Zellen (FB2-299) untersucht. Die Bedingungen sowie das Schema (Abb. 5-9 und Abb. 5-11) wurden unverändert übernommen.

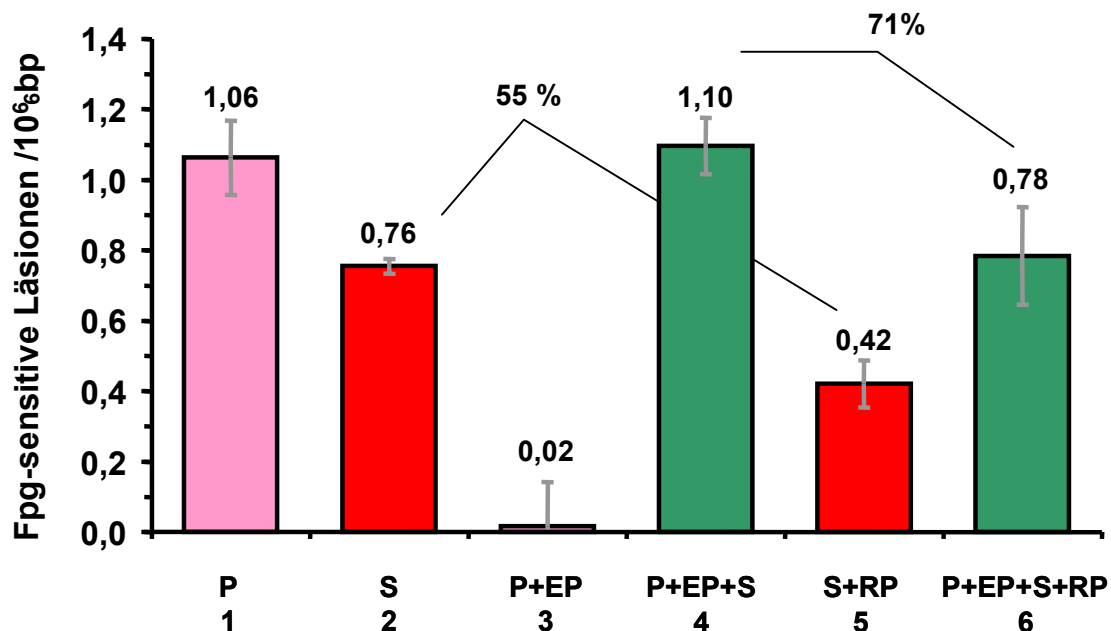


Abb. 5-12: Induktion der Reparatur von Fpg-sensitiver Basenmodifikationen in primären menschlichen Fibroblasten (FB2-299) durch MMS Vorbehandlung.

Die Schadensinduktion erfolgte wie in Abb. 5-11 beschrieben. $n = 3$.

Auch in primären menschlichen Fibroblasten, welche ebenfalls eine adaptive Erhöhung des Glutathiongehaltes zeigten, ist die DNA-Reparatur oxidativer Schäden durch ein Priming nicht induzierbar (Abb. 5-12, Vergleiche Balken 6 und 4 (71 % Restschaden) mit Balken 5 und 2 (55 % Restschaden)). Deutlich wird in Abb. 5-12 auch, dass primäre menschliche Fibroblasten eine geringere Sensitivität gegenüber dem Alkylanz MMS als immortalisierte MEFs haben (Vergleiche Abb. 5-12, Balken 1 mit Abb. 5-11, Balken 1), wohingegen die Empfindlichkeit gegenüber dem hauptsächlich oxidative Schäden verursachenden Photosensibilisator Ro19-8022 plus Licht gleich ist (Vergleiche Abb. 5-12, Balken 2 mit Abb. 5-11, Balken 2). Die erhöhte Sensitivität nach einem vorhergehenden Priming ist zwar auch weniger ausgeprägt, aber nach wie vor vorhanden (Abb. 5-12, Vergleiche Summe Balken 2 und 3 mit Balken 4).

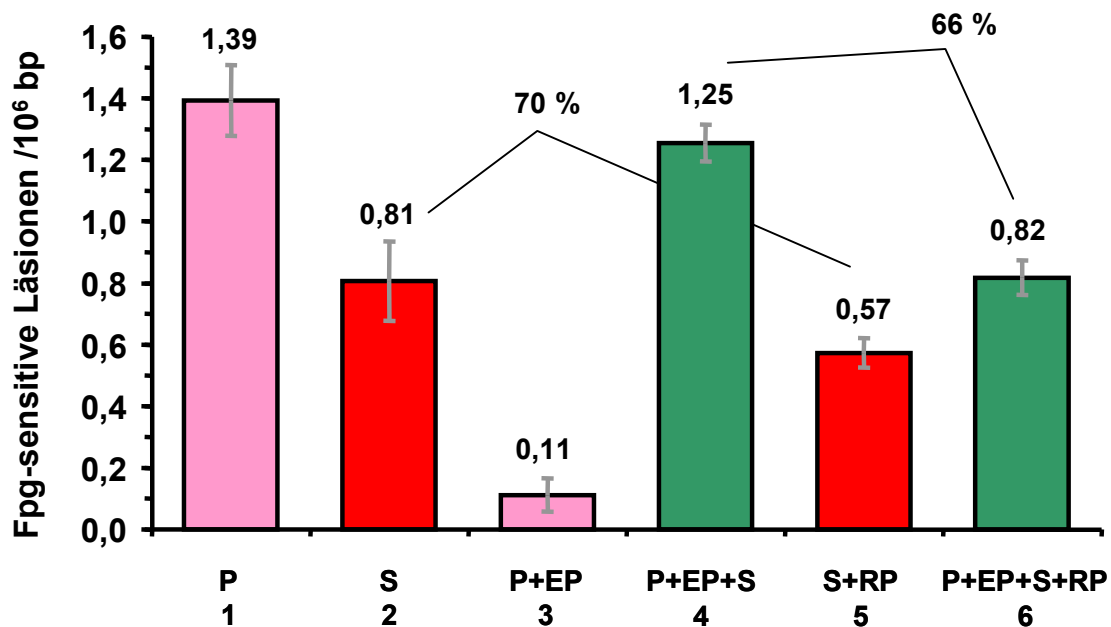


Abb. 5-13: Induktion der Reparatur von Fpg-sensitiver Basenmodifikationen in p53-profizienten Zellen (MCF7) durch MMS Vorbehandlung.

Die Schadensinduktion erfolgte wie in Abb. 5-11 beschrieben. n = 3.

Um ausschließen zu können, dass eine verminderte Expression von p53 in den verwendeten Zellen für das Ausbleiben der Induktion verantwortlich ist, wurden die oben beschriebenen Versuche in MCF7 (Fibroblasten aus menschlichem Brustkrebsgewebe), welche p53-profizient sind, durchgeführt. Auch bei dieser Zelllinie ist der Restschaden nach einer Schädigung ohne Priming (70 %, Abb. 5-13, Vergleiche Balken 5 und 2) nicht signifikant höher als der Restschaden in mit einer Priming-Dosis vorbehandelten (66 %, Abb. 5-13, Vergleiche Balken 6 und 4). Eine Induktion der Reparatur von oxidativen DNA-Schäden nach einer Vorbehandlung durch MMS findet also auch in Zellen mit funktionsfähigem p53 nicht statt.

Dahingegen konnte eine Erhöhung der Sensitivität und des Glutathiongehaltes auch hier gefunden werden.

5.1.5 Einfluss von Ro19-8022 und MMS auf die Enzymexpression der 8-oxoG-Glykosylase (Ogg1)

Da auf DNA-Reparaturebene keine Induzierbarkeit festgestellt werden konnte, wurde abschließend überprüft, ob es auf der Ebene der beteiligten Reparaturenzyme, insbesondere Ogg1, zu einer Induktion kommt. Hierzu wurden analog zur Priming-Dosis im vorhergehenden Experiment mit 0,2 μM Ro19-8022 plus Licht (249 kJ/m^2) DNA-Modifikationen in F11.1 induziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten über 18 h Zellextrakte der MEFs hergestellt (siehe 4.2.13). Während dieser Expressions-Periode wurden die Zellen unter Kulturbedingungen (37 °C und 5 % CO_2) gehalten. Ebenso wurden auch von unbehandelten Kontrollzellen Proteinextrakte gewonnen. In diesen Extrakten wurden nach Bestimmung der Proteinkonzentration die 8-oxoG-Glykosylaseaktivität bestimmt (siehe 4.2.17).

Abb. 5-14 zeigt die Aktivität von mOgg1 in den Maus-Embryofibroblasten nach Schädigung und unterschiedlichen Zeiten.

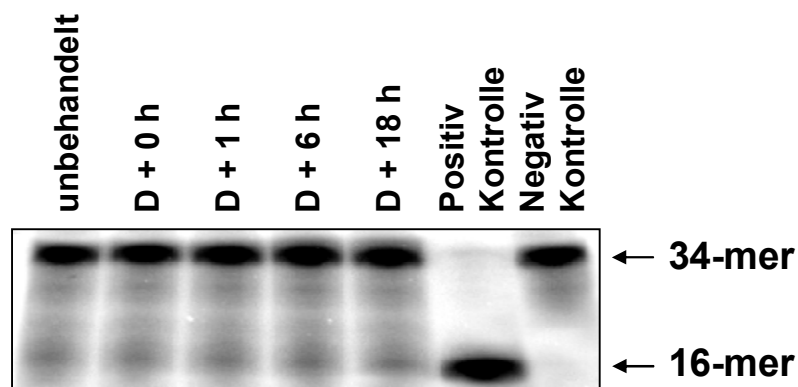


Abb. 5-14: Aktivität von mOgg1 in F11.1 Maus-Embryofibroblasten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Schädigung mit Ro19-8022 plus Licht.

Die Schadensinduktion erfolgte durch Inkubation mit 0,2 μM Ro19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht bei 0 °C mit 249 kJ/m^2 . Die Extrakte der geschädigten Zellen wurden mit ^{32}P -markierten 34-mer Oligonukleotiden, die an Position 16 einen 8-oxoG-Rest enthielten, inkubiert, die DNA in einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem STORM[®] Phosphoimager analysiert.

Die quantitative Auswertung der Aufnahmen mit der Software Molecular Analyst[®] lieferte keine signifikanten Anhaltspunkte dafür, dass die 8-oxoG-Glykosylaseaktivität in den Extrakten der Zellen mit zunehmender Zeit nach Behandlung mit Ro19-8022 plus Licht ansteigt. Der Anteil der geschnittenen DNA ist zu allen Zeitpunkten gleich.

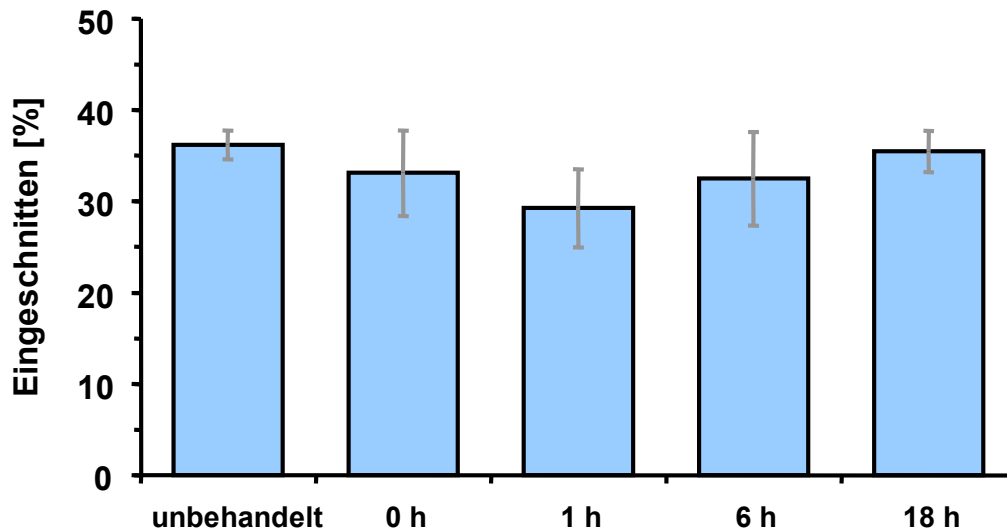


Abb. 5-15: Quantitative Auswertung der 8-oxoG-Glykosylaseaktivitäten in F11.1 Maus-Embryofibroblasten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Schädigung mit Ro19-8022 plus Licht.

Schadensinduktion und Gel siehe Abb. 5-14. $n = 4$.

Auch für die Schadensinduktion mit 200 μM MMS für 30 min bei 37 °C konnte zu keinem Zeitpunkt eine Induktion der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität in den Extrakten der Zellen gefunden werden.

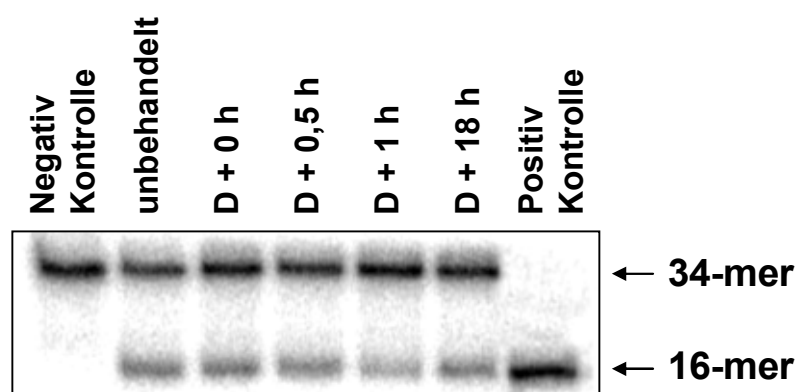


Abb. 5-16: Aktivität von mOgg1 in F11.1 Maus-Embryofibroblasten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Schädigung mit MMS.

Die Schadensinduktion erfolgte durch Inkubation mit 200 μM MMS bei 37 °C für 30 min in serumfreien Medium. Die Extrakte der geschädigten Zellen wurden mit ³²P-markierten 34-mer Oligonukleotiden, die an Position 16 einen 8-oxoG-Rest enthielten, inkubiert, die DNA in einem Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem STORM[®] Phosphorimager analysiert.

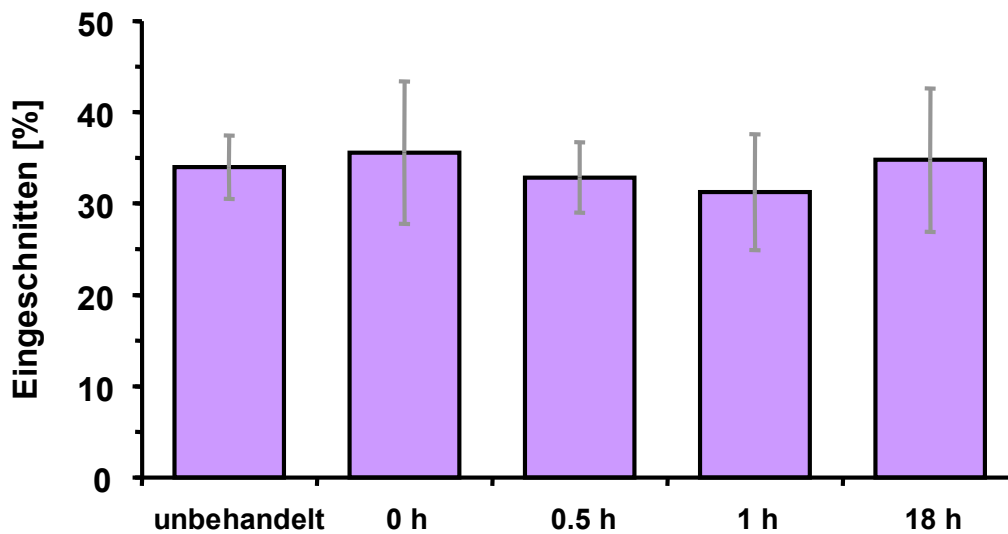


Abb. 5-17: Quantitative Auswertung der 8-oxoG-Glykosylaseaktivitäten in F11.1 Maus-Embryofibroblasten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Schädigung mit MMS.

Schadensinduktion und Gel siehe Abb. 5-16. $n = 3$.

Diese Ergebnisse bestätigen frühere Proteinbestimmungen mittels Western-Blot von Ogg1 in Extrakten aus geschädigten Zellen (unveröffentlichte Daten, Flohr-Beckhaus).

5.1.6 Induzierbarkeit der Plasmidreaktivierung in primären menschlichen Fibroblasten und Keratinozyten durch Schädigung mit UVB-Strahlung

Eine weitere Möglichkeit, die DNA-Reparaturkapazität von Zellen zu bestimmen bietet der Host-Zell Reaktivierungsassay (siehe 4.2.18). In diesem wird die Luciferaseaktivität der zu untersuchenden Zellen, die mit einem zuvor mit unterschiedlichen Dosen UVB geschädigten und Luciferase-Gen enthaltenden Plasmid (pCMVLuc Isolation beschrieben in 4.2.9) transfiziert wurden, gemessen. Je nach Effizienz der Nukleotid-Exzisions-Reparatur in den Zellen wird das geschädigte Plasmid reaktiviert. Diese Reaktivierung ist durch eine Bestimmung der Fluoreszenzintensität bestimmbar und entspricht der DNA-Reparaturkapazität. Durch die Schädigung der Zelllinien vor der Transfektion kann zusätzlich überprüft werden, ob die DNA-Reparatur in Folge einer Vorbehandlung mit einer Priming-Dosis induziert werden kann.

Wie in Abb. 5-18 gezeigt, hat eine 18 h vor der Transfektion des Plasmids verabreicht Priming-Dosis UVB (20 mJ/cm^2) nach der Expressions-Periode keinen signifikanten Einfluss auf die Reaktivierung des mit UVB ($0\text{-}0,5 \text{ mJ/cm}^2$) geschädigten Plasmids. Die Reaktivierung, welche mit der Reparatur des

DNA-Schadens gleich zu setzen ist, erfolgt mit und ohne Vorbehandlung mit einer Priming-Dosis UVB im gleichen Ausmaß.

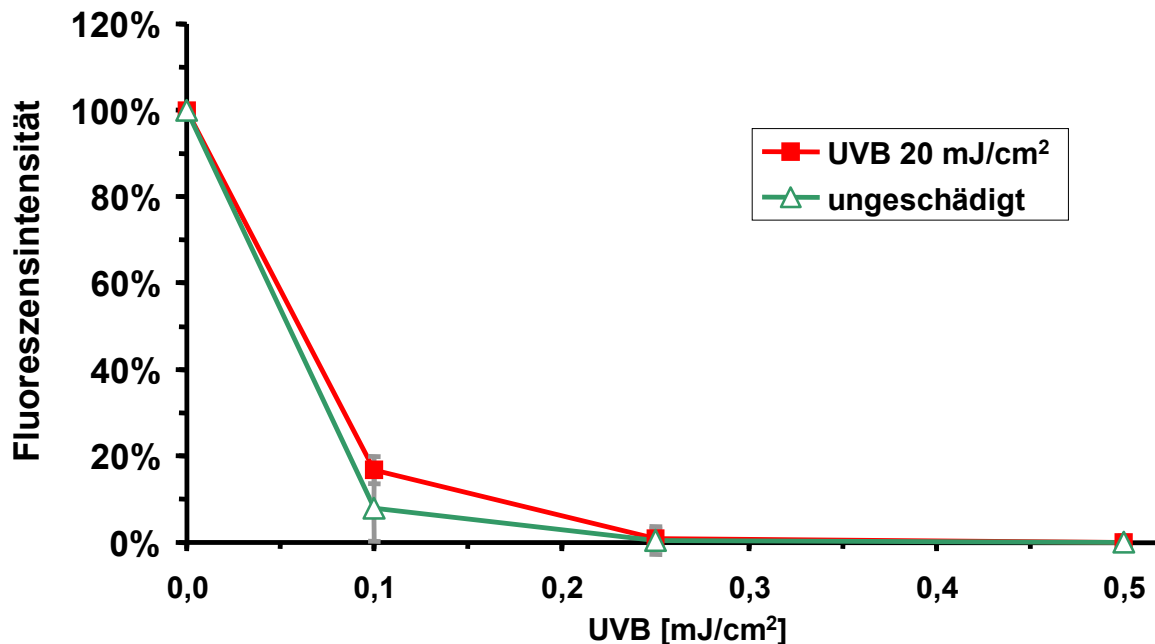


Abb. 5-18: Plasmidreaktivierung in ungeschädigten und mit UVB vorbehandelten primären menschlichen Fibroblasten nach einer 18 h Expressions-Periode.

Die Vorbehandlung erfolgte mit 20 kJ/cm² UVB darauf folgte nach einer Expressions-Periode von 18 h die Transfektion mit einem von 0 bis 0,5 mJ/cm² UVB geschädigten Plasmid (siehe 4.2.18). n = 3.

Um mögliche Unterschiede der Proteinausstattung verschiedener Zellarten zu überprüfen, wurden anschließend primäre menschliche Keratinozyten untersucht. Diese Zellart hat unter anderem einen erhöhten p53-Gehalt.

Wie in Abb. 5-19 deutlich wird, reaktivieren Keratinozyten das mit UVB geschädigte und anschließend transfizierte Plasmid signifikant besser als die Fibroblasten. Die Fluoreszenzintensität der mit 0,1 mJ/cm² UVB geschädigten reaktivierten Plasmide ist mit 55 %, um mehr als das 3,5 fache intensiver als die der gleich geschädigten Plasmide in Fibroblasten (Abb. 5-18). Jedoch erfolgt die Reaktivierung in Zellen nach einer Vorbehandlung mit einer Priming-Dosis und 18 h Expressionszeit im gleichen Ausmaß wie in nicht vorbehandelten Zellen. Es wurde also auch in Keratinozyten, obwohl eine adaptive Antwort in Form einer Erhöhung des p53 und Phospho-p53(Ser15) (siehe 5.1.7) vorlag, keine signifikante Induktion der DNA-Reparatur durch eine Priming-Dosis gefunden.

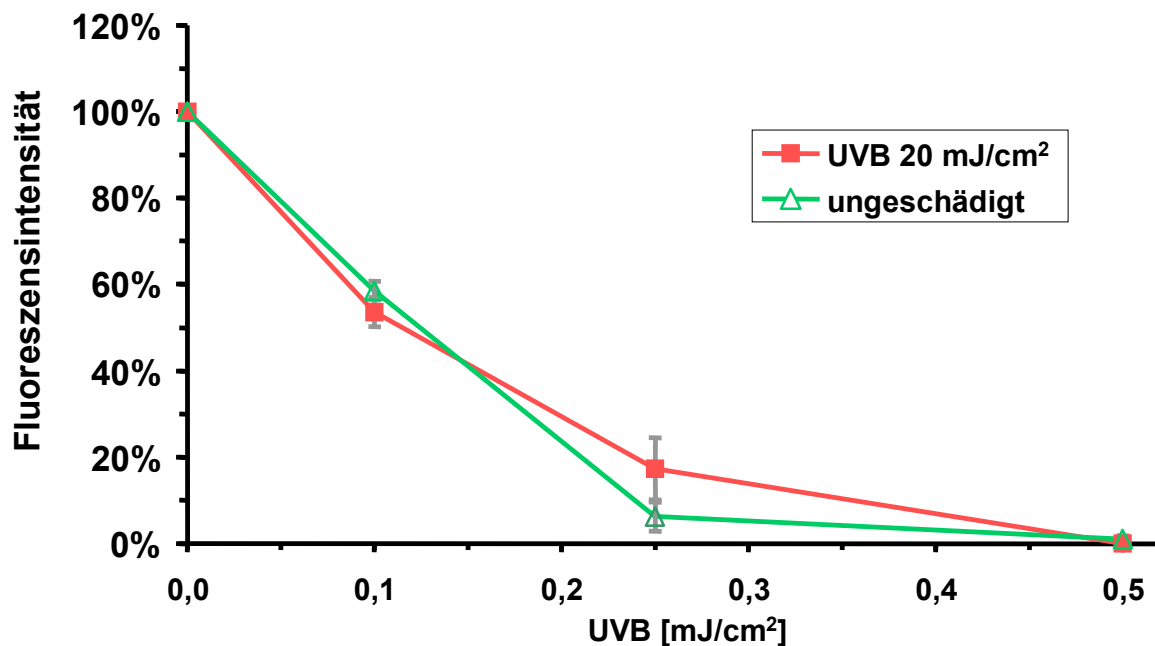


Abb. 5-19: Plasmidreaktivierung in ungeschädigten und mit UVB vorbehandelten primären menschlichen Keratinozyten nach einer 18 h Expressions-Periode.

Die Vorbehandlung erfolgte mit 20 kJ/cm^2 UVB darauf folgte nach einer Expressions-Periode von 18 h die Transfektion mit einem von 0 bis $0,5 \text{ mJ/cm}^2$ UVB geschädigten Plasmid (siehe 4.2.18). $n = 3$.

5.1.7 Status von p53 und Phospho-p53(Ser15) nach einem „knockdown“ mit siRNA in primären menschlichen Fibroblasten und Keratinozyten

Da es zum Zeitpunkt der Experimente keine primären humanen Fibroblasten und Keratinozyten mit herabregulierten p53 gab, wurden die Zellen, mit p53-siRNA behandelt (siehe 4.2.12), um so durch einen „gen knockdown“ („knockdown“) eine verminderte Proteinexpression zu erhalten. Dies ermöglicht, auch in diesen Zellen den Einfluss von p53 auf die Induzierbarkeit der DNA-Reparatur zu überprüfen (siehe 5.1.8).

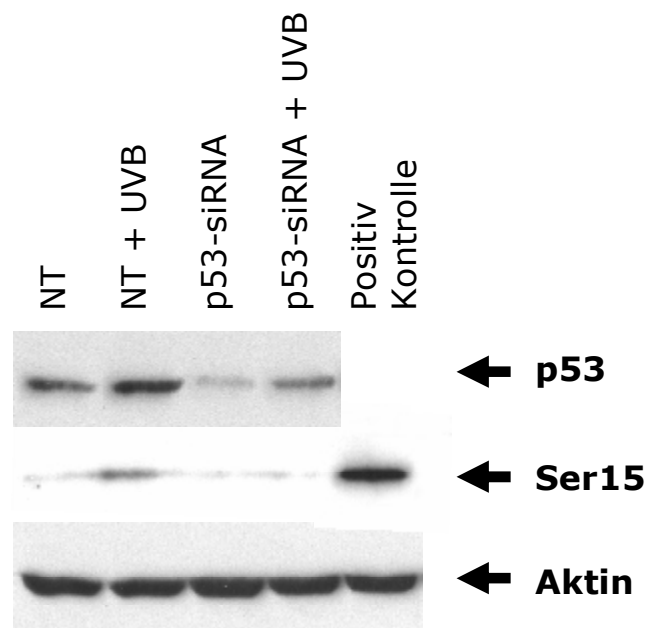


Abb. 5-20: Expression von p53, phospho-p53 (Ser15) und Aktin in primären menschlichen Fibroblasten, 24 h nach UVB und 48 h nach p53-siRNA-Transfektion.

Die Schädigung erfolgte 24 h nach p53-siRNA-Transfektion mit 20 kJ/cm^2 UVB. Darauf folgte eine Expressions-Periode von 24 h. Anschließend wurde ein Western-Blot wie in 4.2.16 beschrieben mit den Zellextrakten durchgeführt. NT: nicht transfiziert; p53-siRNA: mit p53-siRNA transfiziert; UVB: mit UVB bestrahlt.

Wie in Abb. 5-20 gezeigt, ist der „knockdown“ in primären menschliche Fibroblasten für mindestens 48 h stabil. Wie ersichtlich, wird mit Hilfe von p53-siRNA die Gesamt-p53-Menge herunterreguliert (Abb. 5-20, Vergleiche NT mit p53-siRNA bei p53). Da in normalen primären menschlichen Fibroblasten fast keine aktivierte Form von p53 (Phospho-p53Ser15) vorliegt, wurden die Zellen, nach der Transfektion mit siRNA, mit UVB-Strahlung (20 mJ/cm^2) behandelt. Dies führt zu einer Expression von p53(Ser15) und dem Gesamt-p53-Gehalt (Abb. 5-20, Vergleiche NT mit NT + UVB bei p53 und Ser15). Nun wird der „knockdown“ auch für die, bei der DNA-Reparatur vermutlich besonders wichtige, phosphorylierte (aktivierte) Form Phospho-p53(Ser15) sichtbar (Abb. 5-20, Vergleiche NT + UVB mit p53-siRNA + UVB bei Ser15). Dies bedeutet, dass nach einer Schädigung in p53-siRNA behandelten Fibroblasten keine Aktivierung von p53 mehr stattfindet.

Da sich der p53-Status in primären menschlichen Keratinozyten von primären menschlichen Fibroblasten unterscheidet, wurde auch in dieser Zelllinie der „knockdown“ überprüft.

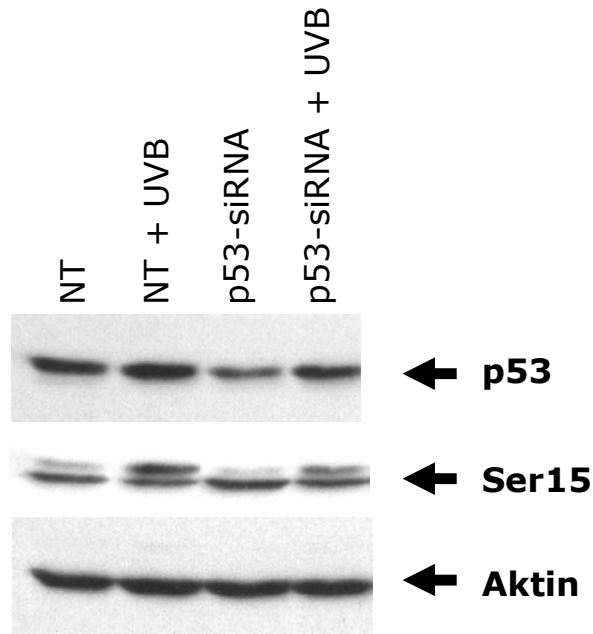


Abb. 5-21: Expression von p53, phospho-p53 (Ser15) und Aktin in primären menschlichen Keratinozyten, 24 h nach UVB und 48 h nach p53-siRNA-Transfektion.

Die Schädigung erfolgte 24 h nach p53-siRNA-Transfektion mit 20 kJ/cm² UVB. Darauf folgte eine Expressions-Periode von 24 h. Anschließend wurde ein Western-Blot wie in 4.2.16 beschrieben mit den Zellextrakten durchgeführt. NT: nicht transfiziert; p53-siRNA: mit p53-siRNA transfiziert; UVB: mit UVB bestrahlt.

In Keratinozyten ist sowohl der Gesamt-p53-Gehalt als auch der Gehalt der aktivierten Form höher als in Fibroblasten (Abb. 5-20, Vergleiche NT mit Abb. 5-21, NT bei p53 und Ser15). Auch in dieser Zelllinie führt der „knockdown“ mit p53-siRNA zu einer Herabregulierung von p53 und seiner aktivierten Form (Abb. 5-21, Vergleiche NT mit p53-siRNA bei p53 und NT + UVB mit p53-siRNA + UVB bei Ser15). In Keratinozyten findet demzufolge wie in primären menschliche Fibroblasten ebenfalls keine Aktivierung von p53 mehr statt.

Die so behandelten Fibroblasten und Keratinozyten sind infolgedessen für weitere Untersuchungen bezüglich des Einflusses von p53 auf die Plasmidreaktivierung und damit verbundenen DNA-Reparatur geeignet.

5.1.8 Einfluss von p53 auf die Induzierbarkeit der Plasmidreaktivierung in primären menschlichen Fibroblasten und Keratinozyten durch Schädigung mit UVB-Strahlung

Um zu überprüfen, in wie weit die Expressierung von p53 einen Einfluss auf die Reaktivierung von geschädigten Plasmiden oder die Induzierbarkeit der DNA-Reparatur in primären Fibroblasten und Keratinozyten durch Schädigung mit UVB-Strahlung hat, wurde die Fluoreszenzintensität nach Plasmidtransfektion in p53-siRNA behandelten Zellen analysiert.

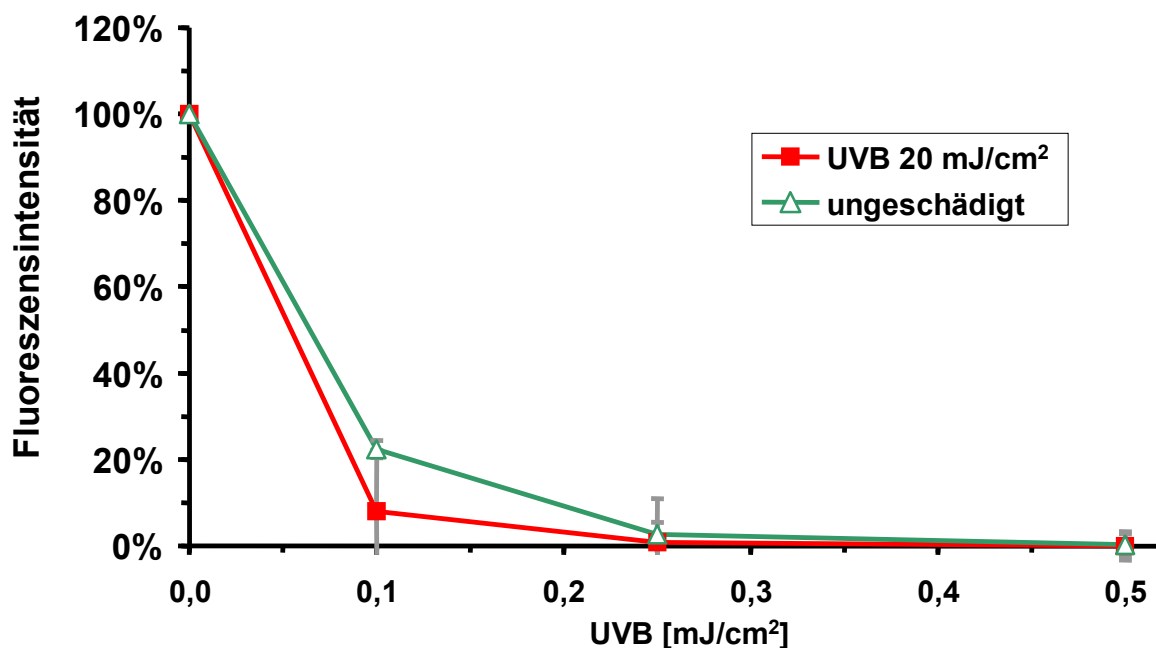


Abb. 5-22: Plasmidreaktivierung nach p53-„knockdown“ mit siRNA in ungeschädigten und mit UVB vorbehandelten primären menschlichen Fibroblasten nach einer 18 h Expressions-Periode.

Die Vorbehandlung erfolgte mit 20 kJ/cm² UVB darauf folgte nach einer Expressions-Periode von 18 h die Transfektion mit einem von 0 bis 0,5 mJ/cm² UVB geschädigten Plasmid (siehe 4.2.18). n = 3.

Abb. 5-22 zeigt, dass auch in Zellen ohne p53-Expressierung (siehe 5.1.7) kein signifikanter Effekt in Form einer Induktion der Plasmidreaktivierung nach einer Vorbehandlung mit einer Priming-Dosis nachweisbar ist. Die Reparatur des Plasmids ist folglich durch die Vorbehandlung nicht beschleunigt.

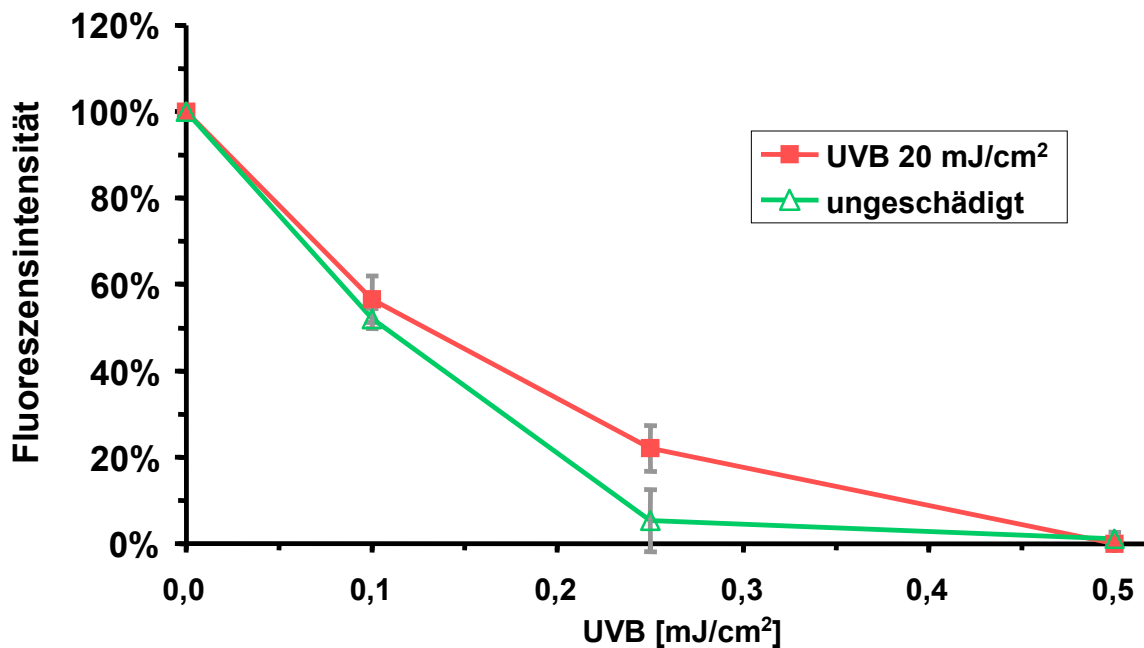


Abb. 5-23: Plasmidreaktivierung nach p53-„knockdown“ mit siRNA in ungeschädigten und mit UVB vorbehandelten primären menschlichen Keratinozyten nach einer 18 h Expressions-Periode.

Die Vorbehandlung erfolgte mit 20 kJ/cm² UVB darauf folgte nach einer Expressions-Periode von 18 h die Transfektion mit einem von 0 bis 0,5 mJ/cm² UVB geschädigten Plasmid (siehe 4.2.18). n = 3.

Auch nach einem erfolgten „knockdown“ von p53 reaktivieren Keratinozyten gleich geschädigte Plasmide deutlich besser als Fibroblasten. Die erhöhte Reaktivierungskapazität ist demnach nicht auf den erhöhten p53-Gehalt in den Keratinozyten zurück zu führen. So zeigen mit p53-siRNA und der Priming-Dosis (20 mJ/cm² UVB) vorbehandelte Keratinozyten ebenfalls keine verbesserte Plasmidreaktivierung. Ein p53-„knockdown“ führt überdies nicht zu einer verminderten Reaktivierung des Plasmids in Fibroblasten (Vergleiche Abb. 5-18 mit Abb. 5-22) oder in Keratinozyten (Vergleiche Abb. 5-19 mit Abb. 5-23).

5.2 Untersuchungen zu DNA-Schädigung, der Toxizität, Mutagenität und Genotoxizität von Tirapazamin im Vergleich mit γ -Strahlung

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, sind für die Krebsentstehung neben Mechanismen der Reparatur von DNA-Schäden auch Fragen zur Entstehung dieser Schäden für das Verständnis der Mutagenese und damit neuen Therapiemöglichkeiten essentiell.

Ziel der Untersuchungen in diesem Kapitel war es, unter zellulären Bedingungen so genannte DNA-Schadensprofile aufzustellen, die charakteristisch für die jeweiligen DNA-schädigenden Wirkung der Substanzen sind sowie die Folgen der DNA-Schäden, nämlich Toxizität und Mutagenität zu analysieren. Die Experimente wurden an immortalisierte Wildtyp-Lungenfibroblasten (V79-MZ Zellen) und in Zellen mit einer Überexprimierung der humane Oxidoreduktase (siehe 2.1.6) des chinesischen Hamsters (V79-hOR Zellen) durchgeführt.

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Schadenscharakterisierung, Toxizität und Mutagenität von Tirapazamin (TPZ) einem Zytostatikum in der klinischen Phase 2/3 gezeigt und mit anderen bekannten DNA-schädigenden Agenzien wie γ -Strahlung verglichen.

5.2.1 Untersuchungen der Zelltoxizität von Tirapazamin und γ -Strahlung

Um sicherzustellen, dass es unter Einwirkung der Substanz und von γ -Strahlung nicht zu einem erhöhten Absterben der Zellen und damit verbunden zu einer Verfälschung der Messwerte bei der Schadenscharakterisierung, Mutagenität oder Genotoxizität kommt, wurde mit Hilfe von Toxizitätstests die Zytotoxizität bei der Inkubation mit Tirapazamin und γ -Strahlung getestet.

Dazu wurde zunächst die „cloning efficiency“ (siehe 4.2.8) in V79-MZ und V79-hOR Zellen, für Tirapazamin akut (Inkubation für 30 min) oder langfristig (Inkubation für 24 h) unter Zellkulturbedingungen bestimmt. Anschließend wurde die „cloning efficiency“ von γ -Strahlung in den genannten Zellen im Bereich 0 bis 7,5 Gy im Vergleich ebenfalls untersucht. Die Kontrollen wurden jeweils bis auf die Schädigung gleich behandelt.

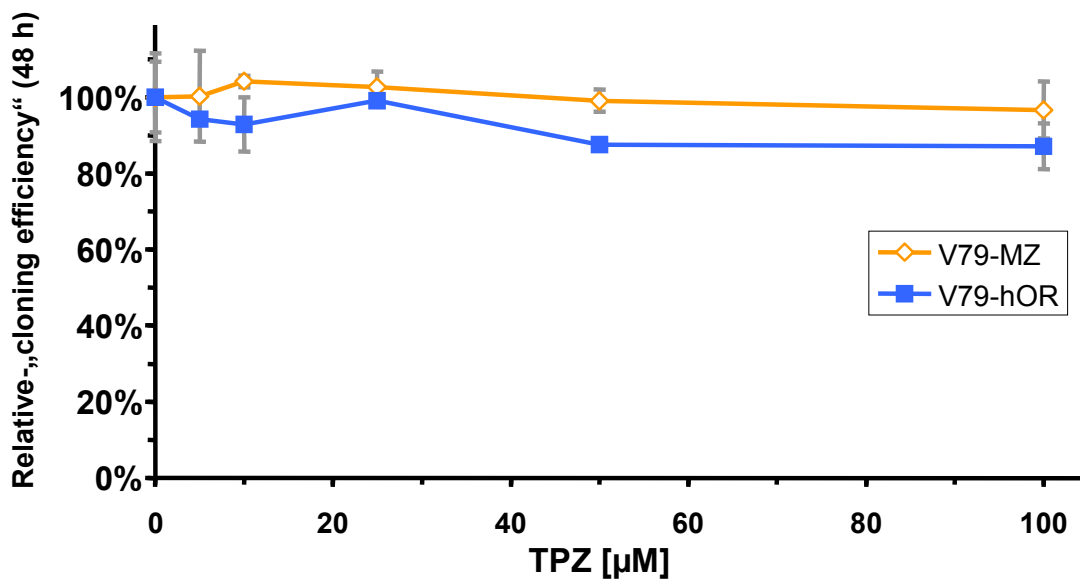


Abb. 5-24: Akute Relative-„cloning efficiency“ nach Inkubation mit Tirapazamin (TPZ).

Die Schädigung erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen TPZ in serumfreien Medium bei 37 °C für 30 min, in V79-MZ und V79-hOR. Die „cloning efficiency“ ungeschädigter Zellen ist 100 %. $n = 3$.

Wie in Abb. 5-24 gezeigt, hat Tirapazamin, nach einer kurzen Behandlung weder auf V79-MZ noch auf V79-hOR Zellen einen toxischen Effekt, noch gibt es signifikante Zellunterschiede.

Um zu überprüfen, in wie weit die Inkubationsdauer einen Einfluss auf die Toxizität von Tirapazamin in V79-MZ oder V79-hOR Zellen hat, wurde im Folgenden die Toxizität nach einer verlängerten (24 h) Inkubation mit Tirapazamin untersucht.

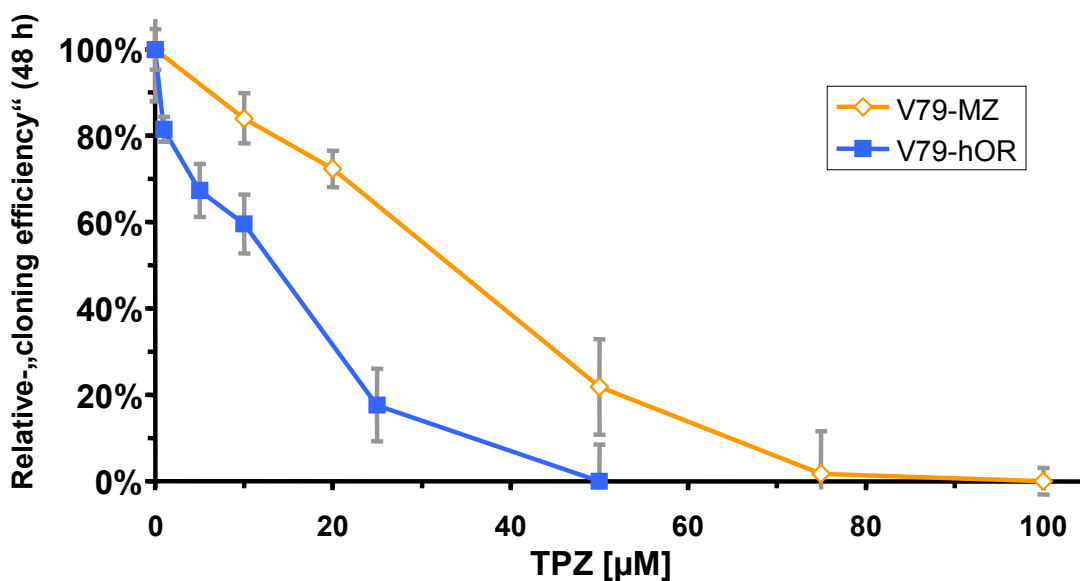


Abb. 5-25: Langfristige Relative-„cloning efficiency“ nach Inkubation mit Tirapazamin (TPZ).

Die Schädigung erfolgte mit unterschiedlichen Konzentrationen TPZ in serumfreien Medium bei 37 °C für 24 h, in V79-MZ und V79-hOR. Die „cloning efficiency“ ungeschädigter Zellen ist 100 %. $n = 3$.

Unter diesen Bedingungen (Abb. 5-25) zeigt Tirapazamin für beide Zelllinien eine konzentrationsabhängige Toxizität. Weiterhin wird ein signifikanter Unterschied der Toxizität zwischen V79-MZ und V79-hOR erkennbar. So sind nach einer Behandlung von V79-hOR Zellen mit Tirapazamin bei der Konzentration von 50 μM keine Überlebenden mehr vorhanden, während bei der Behandlung von V79-MZ Zellen mit der gleichen Konzentration noch 25 % der Zellen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle überlebt haben.

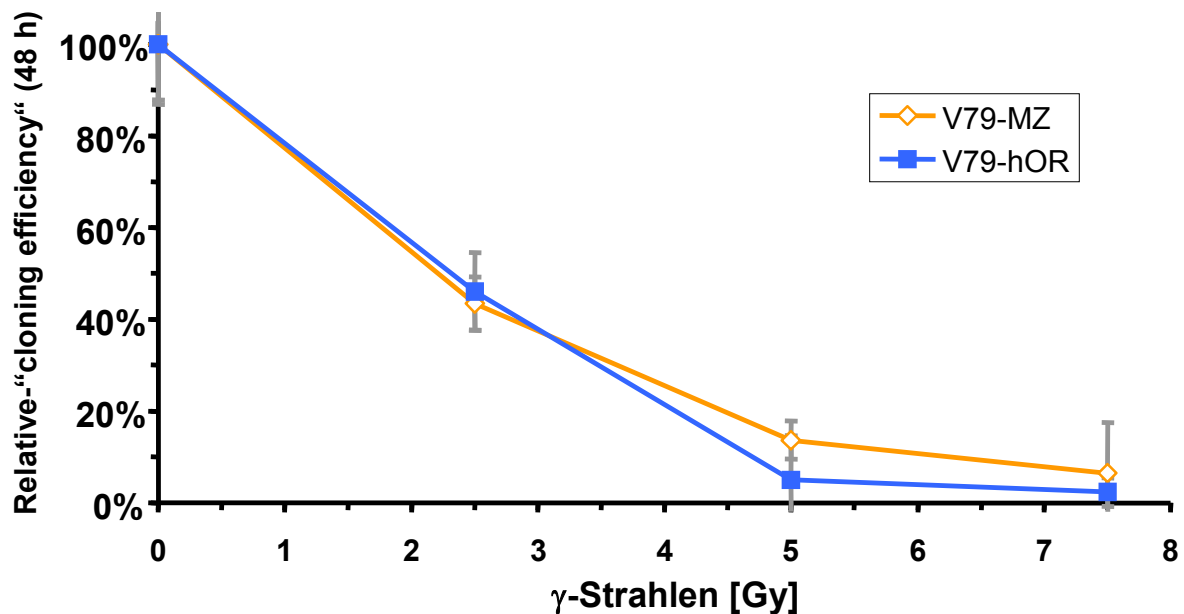


Abb. 5-26: Relative-„cloning efficiency“ nach Bestrahlung mit γ -Strahlen.

Die Schädigung erfolgte durch Bestrahlung mit γ -Strahlung in unterschiedlichen Dosen (0 bis 7,5 Gy), in serumfreien Medium bei 0 °C, in V79-MZ und V79-hOR. Die „cloning efficiency“ ungeschädigter Zellen ist 100 %. $n = 3$.

In Abb. 5-26 ist die Toxizität durch Bestrahlung mit γ -Strahlen (0 bis 7,5 Gy) in V79-MZ und V79-hOR Zellen dargestellt. Auch hier liegt eine annähernd linear dosisabhängige Toxizität vor, wobei hier jedoch V79-MZ und V79-hOR Zellen keine signifikant unterschiedliche Sensitivität für γ -Strahlen zeigen.

5.2.2 DNA-Schadensanalyse mit Hilfe der Alkalischen Elution

5.2.2.1 Konzentrationsabhängigkeit des DNA-Schadens

Zur Untersuchung der Abhängigkeit des verursachten DNA-Schadens von der Konzentration wurden V79-MZ und V79-hOR Zellen mit Konzentrationen von 0 bis 100 μM Tirapazamin in serumfreien Medium bei 37 °C für 30 min inkubiert und anschließend mit der Alkalischen Elution auf die direkt induzierten Einzelstrangbrüche analysiert (siehe 4.2.2).

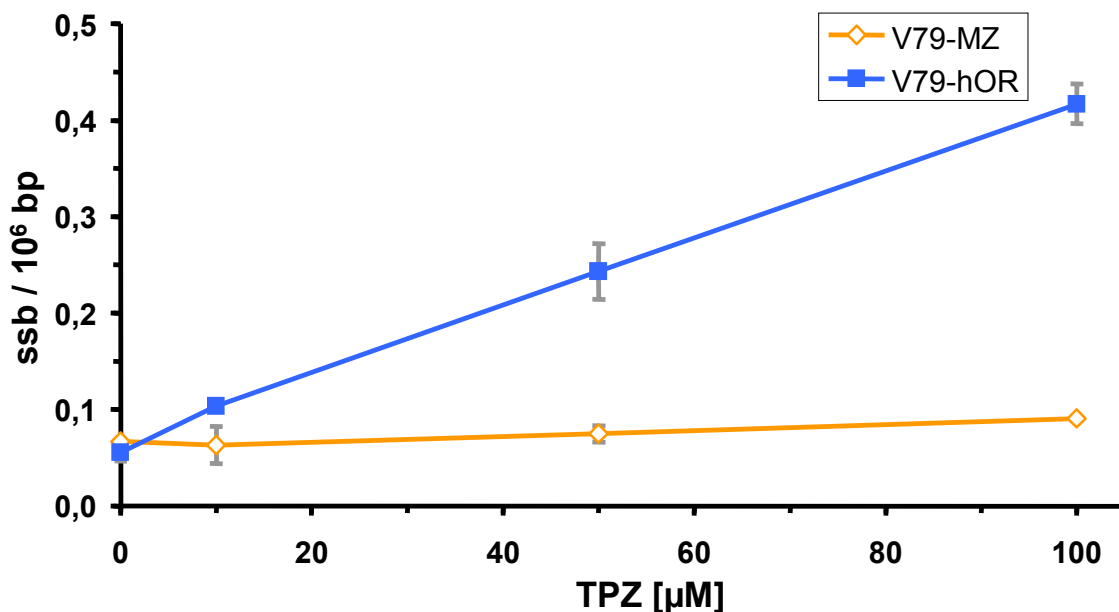


Abb. 5-27: Zellulär induzierten Einzelstrangbrüche (SSB) durch TPZ pro 10^6 bp.

Die Dosisabhängigkeit der direkt induzierten Einzelstrangbrüche pro 10^6 bp im Konzentrationsbereich von 0 bis 100 μM Tirapazamin (TPZ) in serumfreien Medium bei 37 °C für 30 min wurde mit Hilfe der Alkalischen Elution (siehe 4.2.2) bestimmt. $n = 3$.

Wie aus Abb. 5-27 deutlich wird, steigt die Anzahl der direkt induzierten Einzelstrangbrüche in V79-hOR Zellen proportional zur verwendeten Dosis von Tirapazamin über den gesamten Bereich linear an, während in V79-MZ Zellen in diesem Dosisbereich keine Einzelstrangbrüche detektiert werden können. Die in den V79-hOR Zellen exprimierte humane Oxidoreduktase ist folglich zellulär für die Verursachung von Einzelstrangbrüchen durch Tirapazamin notwendig.

Aus den Ergebnissen der Toxizitätsversuche und der Dosisabhängigkeit scheint, da mit der Alkalische Elution maximal bis zu 0,8 SSBs / 10^6 bp bestimmt werden können, zur weiteren DNA-Schadenscharakterisierung eine Konzentration von 50 μM Tirapazamin als geeignet.

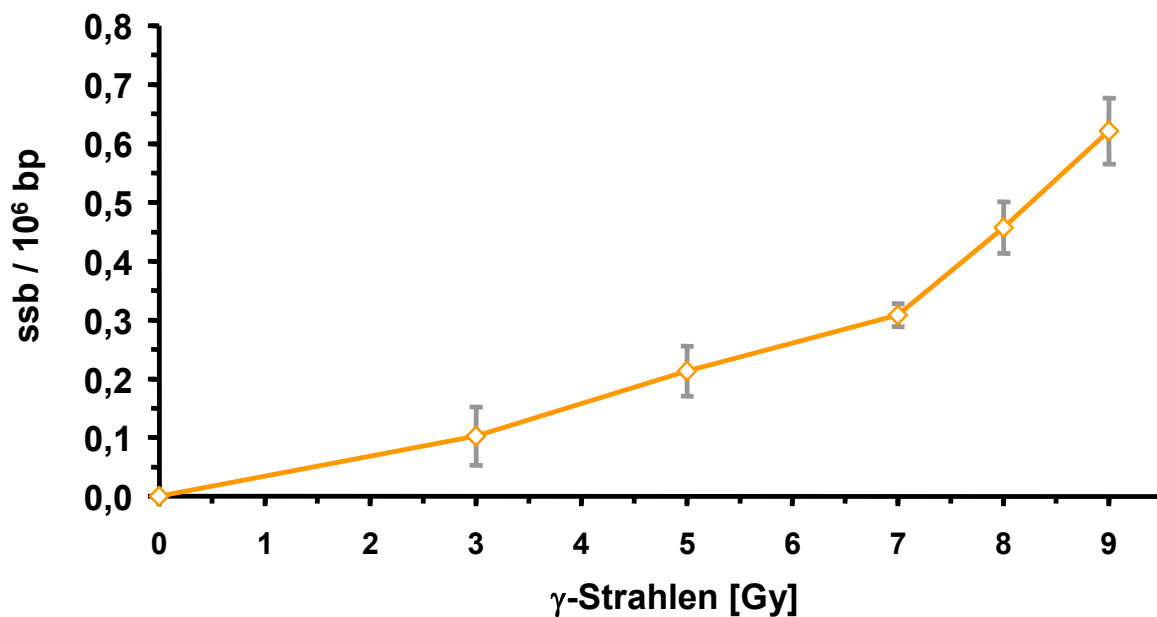


Abb. 5-28: Zellulär induzierten Einzelstrangbrüche (SSB) durch γ -Strahlung pro 10^6 bp.

Die Dosisabhängigkeit der direkt induzierten Einzelstrangbrüche pro 10^6 bp nach Bestrahlung mit γ -Strahlen von 0 bis 9 Gy, in PBSCMF bei 0 °C wurde mit Hilfe der Alkalischen Elution (siehe 4.2.2) bestimmt. $n = 3$.

Für die Generierung von Einzelstrangbrüchen durch γ -Strahlung liegt ebenfalls eine annähernd lineare Dosisabhängigkeit für den gewählten Bereich vor (Abb. 5-28).

5.2.2.2 Charakterisierung des DNA-Schadens mit Hilfe verschiedener Reparaturoendonukleasen

Im Folgenden wurde nun mit Hilfe verschiedener Reparaturoendonukleasen (Fpg, APN1 und Endo III) und durch unterschiedliche Kombination dieser Enzyme (siehe 4.2.2.5 und Tabelle 4.2.2-2) untersucht, welche DNA-Modifikationen in V79-hOR Zellen durch Tirapazamin oder γ -Strahlung induziert werden.

Die Zellen wurden hierzu, wie in 4.2.2.3 beschrieben, geschädigt, dabei betrug die Dosis 50 μ M Tirapazamin (37 °C, 30 min) oder 5 Gy γ -Strahlung (auf Eis). Anschließend wurden mit Hilfe der Alkalischen Elution die induzierten DNA-Modifikationen quantifiziert. Der Schadensuntergrund von ungeschädigten Zellen wurde jeweils abgezogen. Für Tirapazamin ergibt sich so das in Abb. 5-29 dargestellte Schadensspektrum.

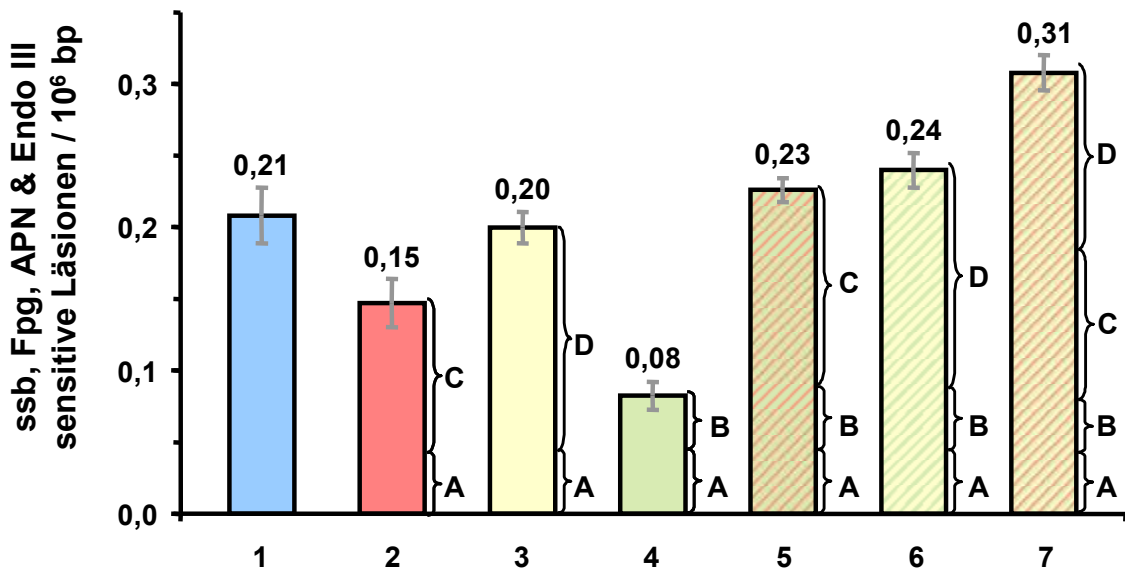
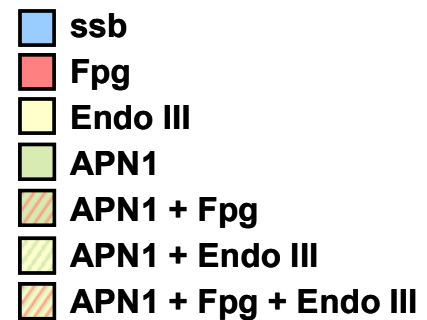


Abb. 5-29: Zelluläres Schadensprofil von Tirapazamin.

Die Schädigung der V79-hOR Zellen erfolgte mit 50 μ M Tirapazamin bei 37 °C für 30 min in serumfreien Medium. Anschließend wurde der verursachte DNA-Schäden mit Hilfe der Alkalischen Elution analysiert. Die Balken 2 bis 7 wurden durch Behandlung der neben stehenden Enzyme bzw. Enzymkombinationen erhalten (siehe 4.2.2.5). $n = 4$.



Auf der Grundlage der unterschiedlichen Erkennungsspektren der DNA-Glykosylasen lassen sich die Anzahl einzelner Arten von DNA-Modifikationen berechnen (siehe 4.2.2.5, Gleichung 4.2.2-2 bis 5). Man erhält so für Tirapazamin folgendes aufgeschlüsseltes DNA-Schadensprofil (siehe Abb. 5-30).

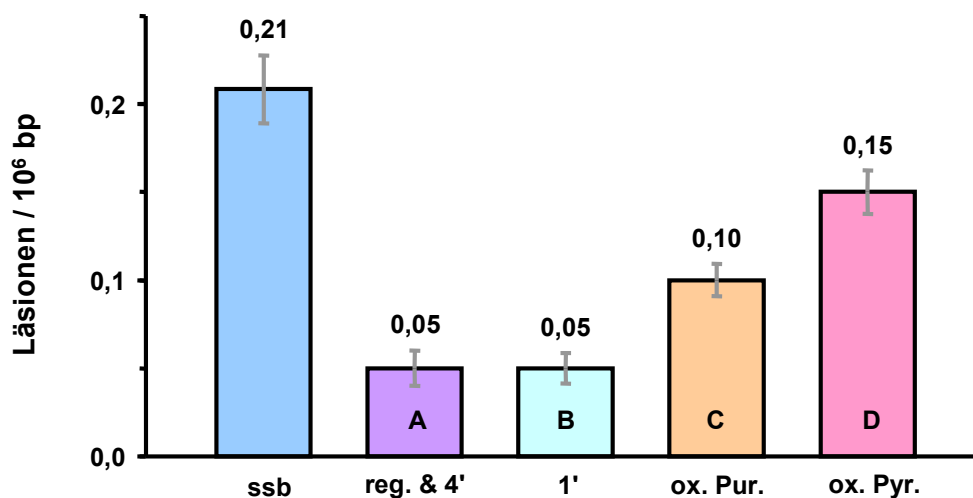


Abb. 5-30: Aufgeschlüsseltes DNA-Schadensprofil von Tirapazamin aus Abb. 5-29.

Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der Gleichung 4.2.2-2 bis 5 aus den in Abb. 5-29 dargestellten Ergebnissen. $n = 4$.

Wie aus Abb. 5-30 ersichtlich, verursacht Tirapazamin bei einer Konzentration von 50 μM neben direkten Einzelstrangbrüchen (SSB) hauptsächlich oxidierte Pyrimidin-Modifikationen (ox. Pyr.). Das Verhältnis der DNA-Modifikationen (2:1:1:1,5) von SSBs zu AP-Läsionen (reg. & 4', 1') zu oxidierten Purinen (ox. Pur.) und zu oxidierten Pyrimidinen ist als charakteristisch für den DNA-Schädigungsmechanismus von Tirapazamin anzusehen.

Um aus dem erhaltenem DNA-Schadensprofil Aussagen bezüglich der mechanistischen Entstehung dieses Schadens (siehe Abb. 2-10) ableiten zu können, sind Vergleiche mit Schadensprofilen nötig, bei denen der Schädigungsmechanismus schon bekannt ist. Da dies ist für γ -Strahlung der Fall ist, wurde als nächstes ein Schadensprofile von γ -Strahlung (5 Gy) in V79-hOR erstellt. Die DNA-schädigende Wirkung von γ -Strahlung beruht, wie bereits beschrieben (siehe 2.3.2), hauptsächlich auf der intrazellulären Generierung von Hydroxylradikalen. So überwiegen die vom Hydroxylradikal gebildeten oxidativen Modifikationen.

Das bereits teilweise bekannte Schadensprofil (Ballmaier, 1997) wurde durch das in V79-hOR Zellen bestätigt und vervollständigt (siehe Abb. 5-31).

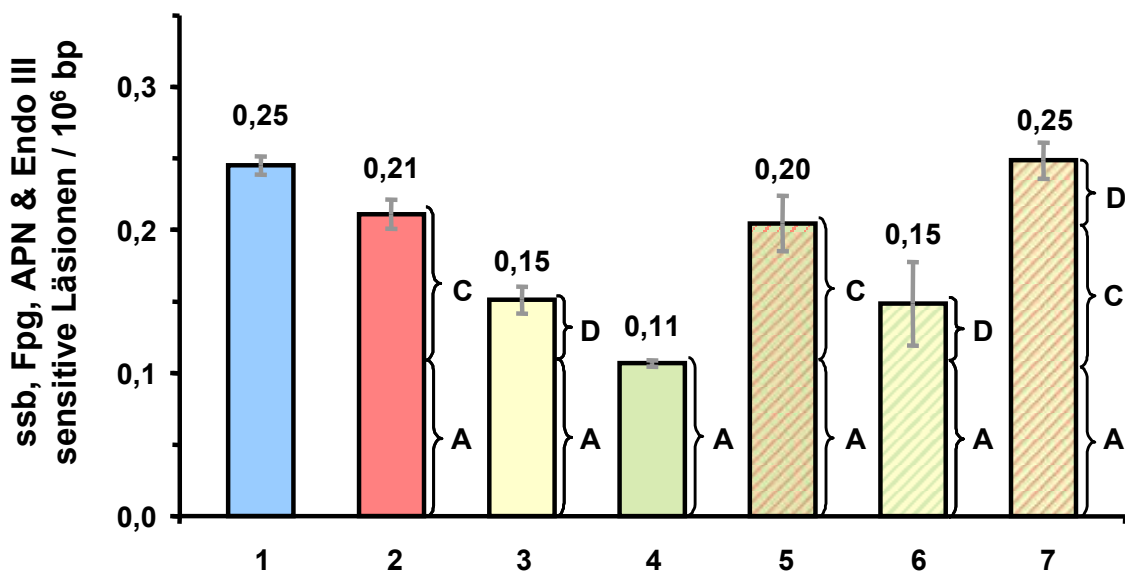
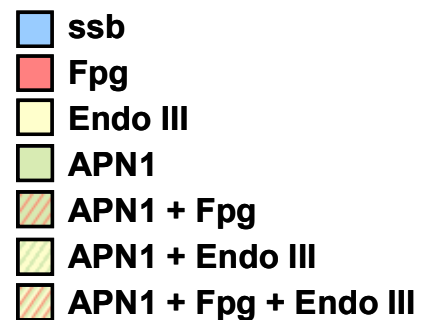


Abb. 5-31: Zelluläres Schadensprofil von γ -Strahlung.

Die Schädigung der V79-hOR Zellen erfolgte mit 5 Gy γ -Strahlung bei 0 °C in serumfreien Medium. Anschließend wurde der verursachte DNA-Schäden mit Hilfe der Alkalischen Elution analysiert. Die Balken 2 bis 7 wurden durch Behandlung der neben stehenden Enzyme bzw. Enzymkombinationen erhalten (siehe 4.2.2.5). $n = 3$.



Auf der Grundlage der unterschiedlichen Erkennungsspektren der DNA-Glykosylasen lassen sich so auch für γ -Strahlung die einzelnen DNA-Modifikationen aus den Ergebnissen von Abb. 5-31 berechnen (siehe 4.2.2.5, Gleichung 4.2.2-2 bis 5). Man erhält daraus folgendes aufgeschlüsseltes DNA-Schadensprofil (siehe Abb. 5-32).

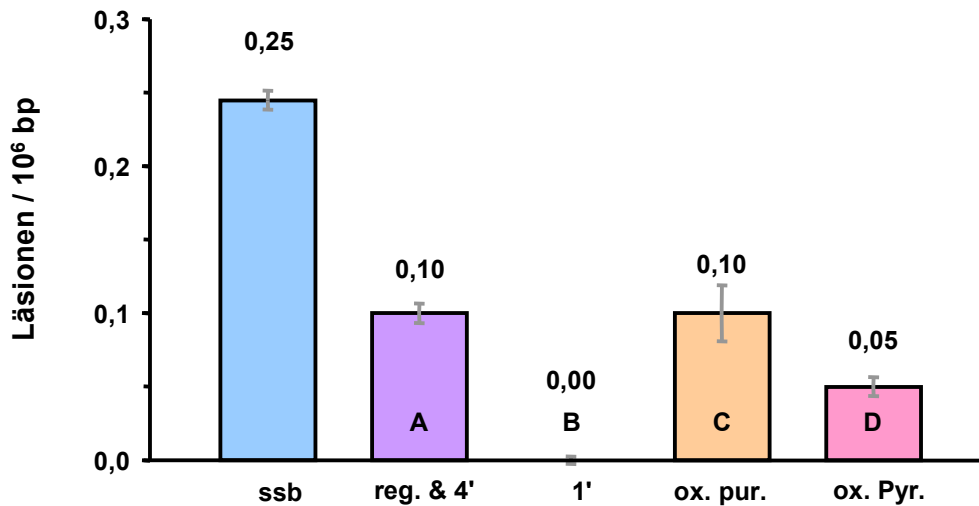


Abb. 5-32: Aufgeschlüsseltes DNA-Schadensprofil von γ -Strahlung aus Abb. 5-31.

Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der Gleichung 4.2.2-2 bis 5 aus den in Abb. 5-31 dargestellten Ergebnissen. $n = 3$.

Das Verhältnis der DNA-Modifikationen (2,5:1:1:0,5) von SSBs zu AP-Läsionen zu oxidierten Purinen sowie zu oxidierten Pyrimidinen durch γ -Strahlung spiegelt, wie bereits ausgeführt nach heutigem Kenntnisstand das DNA-Schadensprofil von intrazellulär gebildeten Hydroxylradikalen wieder. So wurden zelluläre neben direkten Einzelstrangbrüchen hauptsächlich oxidierte Purine wie 8-oxoG gebildet. Man sieht, dass das DNA-Schadensprofil der γ -Strahlung dem Schadensprofil von Tirapazamin sehr ähnlich ist. Dieser Befund legt nahe, dass auch Tirapazamin durch die Generierung von Hydroxylradikalen zur DNA-Schädigung führt.

Auffällig an dem Schadensprofil ist, dass obwohl die AP-Läsionen insgesamt durch γ -Strahlung im gleichen Ausmaß wie bei Tirapazamin gebildet wurden, der Anteil von 1'-oxidierten bei Tirapazamin viel höher ist. Auch die Bildung von oxidierten Pyrimidinen ist bei Tirapazamin erhöht. Dies lässt vermuten, dass neben Hydroxylradikalen noch andere DNA-schädigende Mechanismen bei Tirapazamin vorliegen (siehe Abb. 2-10).

5.2.2.3 Einfluss von *t*-Butanol auf die Schadensgenerierung mit Tirapazamin

Um weiter experimentell zu überprüfen, welchen Anteil Hydroxylradikale an der DNA-Schädigung durch Tirapazamin haben, wurde mit Tirapazamin in Gegenwart des Hydroxylradikalfänger *t*-Butanol inkubiert (Epe et al., 1996; Ballmaier et al., 1999).

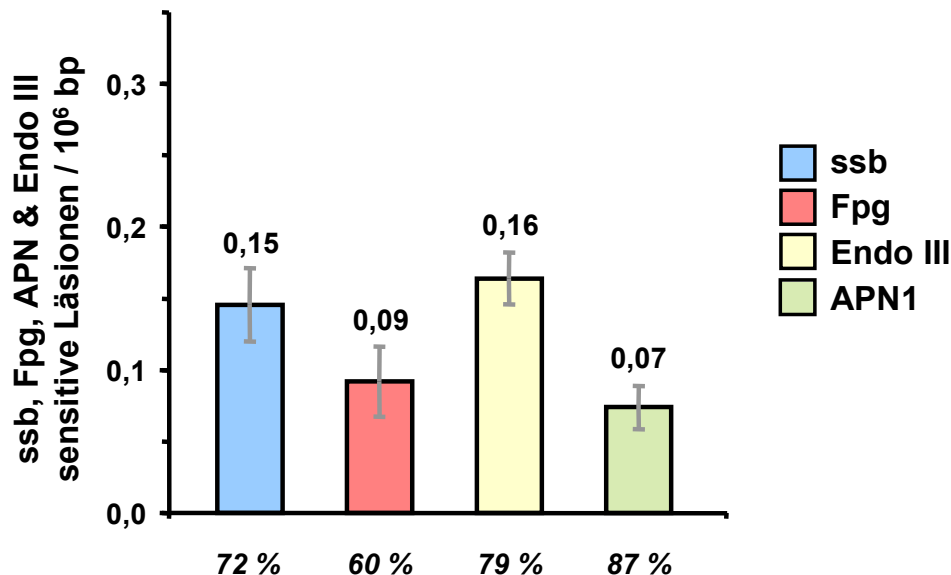


Abb. 5-33: Hemmung der durch Tirapazamin erzeugten DNA-Modifikationen durch *t*-Butanol.

DNA-Schäden in V79-hOR Zellen nach Inkubation mit 50 μ M Tirapazamin bei 37 °C für 30 min in serumfreien Medium mit 2 % *t*-Butanol. Die Anzahl der Modifikationen durch Tirapazamin ohne *t*-Butanol wird als 100 % angenommen. $n = 3$.

Wie aus Abb. 5-33 ersichtlich wird, vermindert *t*-Butanol die Anzahl der durch Tirapazamin induzierten DNA-Modifikationen, was ebenfalls darauf hin deutet, dass Tirapazamin zum Teil durch die Generierung von Hydroxylradikalen zur DNA-Schädigung führt.

5.2.3 Untersuchungen der Mutagenität von Tirapazamin

Nach Analyse der Toxizität und der Charakterisierung der DNA-Modifikationen von Tirapazamin soll im Folgenden geklärt werden, in wie weit die zellulären Unterschiede zwischen V79-hOR und V79-MZ Zellen und demnach die erhöhte Generierung von DNA-Schäden einen Einfluss auf die Mutagenität haben.

Hierfür wurde in V79-MZ und V79-hOR Zellen ein Mutagenitätstest mit Tirapazamin (0-50 μ M) durchgeführt (siehe 4.2.7).

In Abb. 5-34 ist der Verlauf der Mutationshäufigkeit in Abhängigkeit von der Konzentration gezeigt. Man sieht, dass die Zahl der 6TG^r-Mutanten

(6TG^r = 6-Thioguanin-resistent) mit zunehmender Konzentration von Tirapazamin ansteigt. Aus der Grafik ist zu entnehmen, dass Tirapazamin in V79-hOR Zellen schon in geringen Konzentrationen mutagen wirkt, jedoch kommt es in sehr hohen Konzentrationen zu einem Abflachen der Kurve. In V79-MZ Zellen liegt nur in sehr hohen Konzentrationen eine geringe Mutagenität vor. So werden von 50 μM Tirapazamin in einer Millionen V79-hOR Zellen 138 6TG^r-Mutanten erzeugt, was $13,8 \times 10^{-5}$ Mutationen pro Zelle innerhalb des Locus entspricht, während in V79-MZ Zellen bei gleicher Konzentration weniger als ein Viertel (3×10^{-5} Mutationen pro Zelle innerhalb des Locus) entstehen. Demnach scheint die Metabolisierung von Tirapazamin durch die Oxidoreduktase, neben der toxischen und DNA-schädigenden Wirkung, auch für die mutagenen Effekte von TPZ notwendig zu sein.

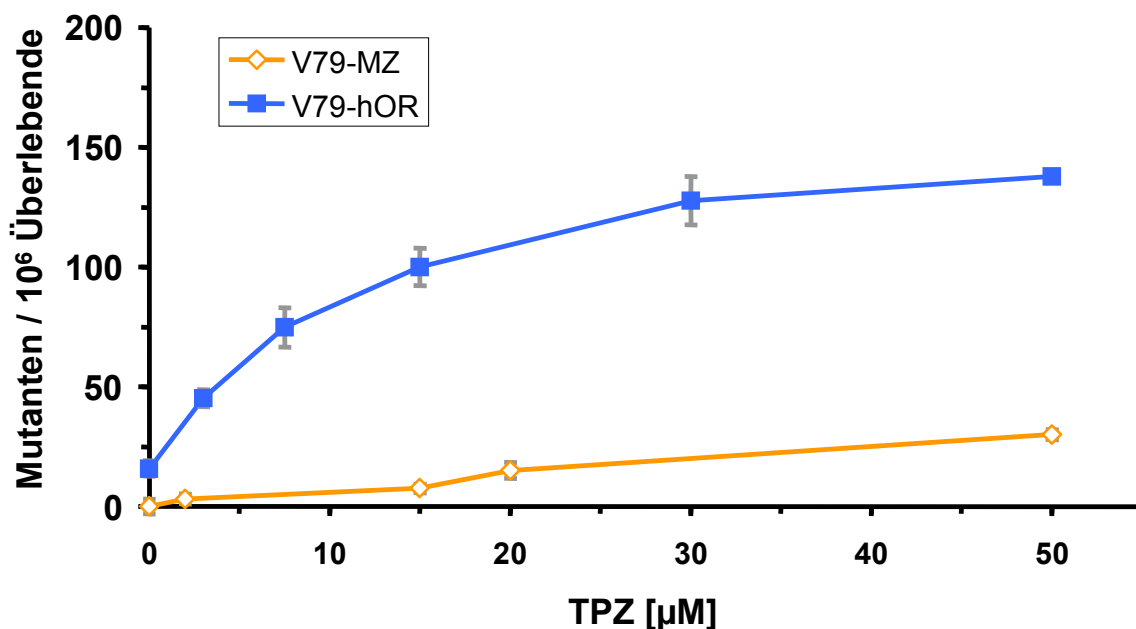


Abb. 5-34: 6TG^r-Mutanten pro 10⁶ überlebende Zellen nach Schädigung mit Tirapazamin (TPZ). Die Schädigung erfolgte mit Tirapazamin (TPZ) im Konzentrationsbereich von 0 bis 50 μM , in serumfreien Medium bei 37 °C für 24 h, in V79-MZ und V79-hOR Zellen. $n = 3$.

5.2.4 Untersuchungen der Genotoxizität von Tirapazamin und γ -Strahlung mit Hilfe von Mikrokerntests

Neben der Anzahl der unterschiedlichen DNA-Modifikationen, die in dieser Arbeit mit der Alkalischen Elution detektiert wurden, war es interessant, das Maß aneugener bzw. klastogener Wirkung nach Inkubation mit Tirapazamin oder Bestrahlung mit γ -Strahlen zu quantifizieren. Dazu wurde die Anzahl Mikrokerne bestimmt. Wie bereits beschrieben (siehe 4.2.6), handelt es sich bei Mikrokerne um abgespaltene Chromosomen bzw. Chromosomenbruchstücke, die durch klastogene bzw. aneugene Behandlung hervorgerufen und bei der Kernteilung sichtbar werden.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte der Mikrokerntest dazu genutzt werden, um genotoxische Konsequenzen der Schädigung aufzuzeigen.

Die Anzahl induzierter Mikrokerne wurde in V79-MZ und V79-hOR Zellen gemessen. Dazu wurde die Anzahl der zellulär induzierten Mikrokerne nach Anfärbung der DNA mit Bisbenzimid unter dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgezählt (siehe Abb. 5-35).

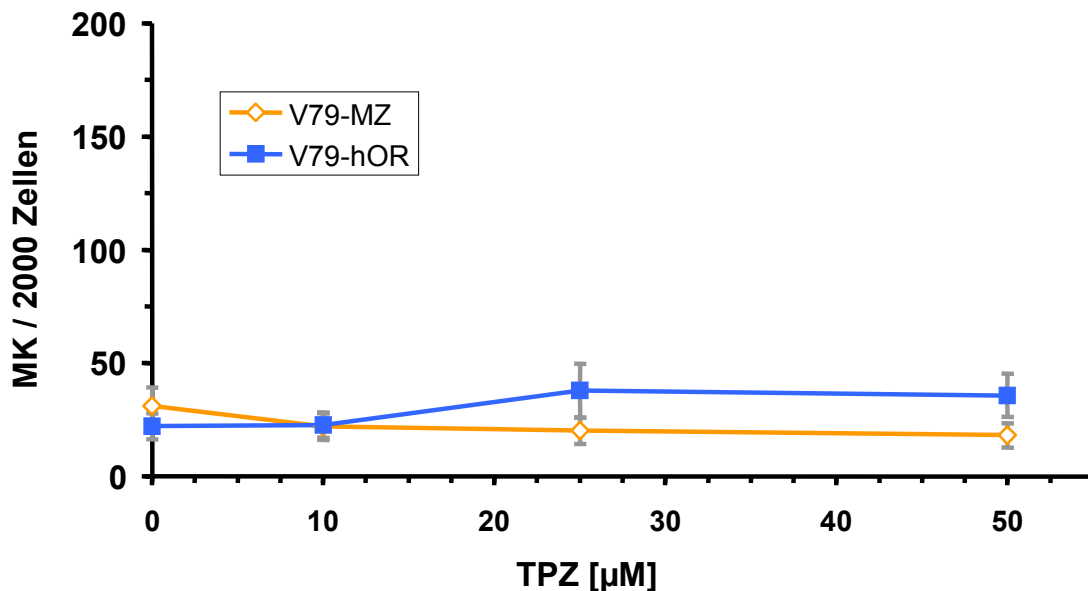


Abb. 5-35: Mikrokerne pro 2000 Zellen nach kurzer Schädigung mit Tirapazamin (TPZ).

Die Schädigung erfolgte mit Tirapazamin (TPZ) im Konzentrationsbereich von 0 bis 50 μM , in serumfreien Medium bei 37 °C für 30 min, in V79-MZ und V79-hOR. $n = 3$.

Wie aus Abb. 5-35 ersichtlich wird, werden nach kurzer Schädigung mit Tirapazamin weder in V79-MZ noch in V79-hOR Zellen Mikrokerne gebildet, noch gibt es, wie schon bei der Toxizität (siehe 5.2.1), signifikante Zellunterschiede.

Um zu überprüfen, ob eine verlängerte Inkubationsdauer wie schon bei der Toxizität ebenfalls einen Einfluss auf die Mikrokernbildungsrate von Tirapazamin hat, wurde im Folgenden die Anzahl der generierten Mikrokerne nach einer verlängerten (24 h) Inkubation mit Tirapazamin untersucht (siehe Abb. 5-36).

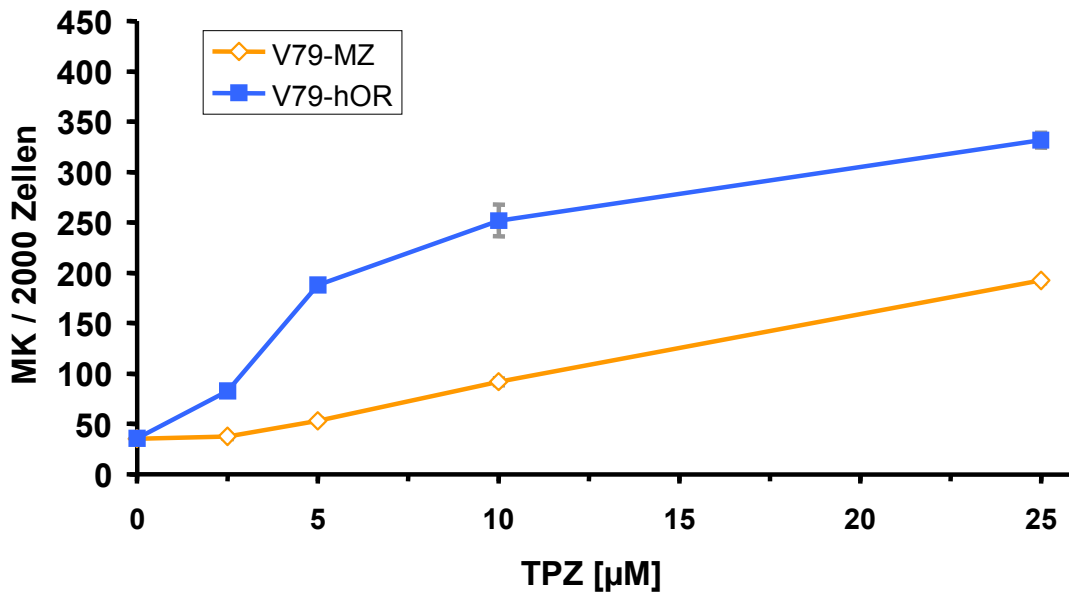


Abb. 5-36: Mikrokerne pro 2000 Zellen nach verlängerter Schädigung mit Tirapazamin (TPZ).

Die Schädigung erfolgte mit Tirapazamin (TPZ) im Konzentrationsbereich von 0 bis 25 µM Tirapazamin (TPZ), in serumfreien Medium bei 37 °C für 24 h, in V79-MZ und V79-hOR. $n = 3$.

Nach der verlängerten Inkubationszeit (Abb. 5-36) sind deutliche klastogene/aneugene Effekte von Tirapazamin in beiden Zelllinien vorhanden, wobei in V79-hOR Zellen bei gleicher Konzentration mehr als die 2 fache Menge an Mikrokerneln gebildet wird.

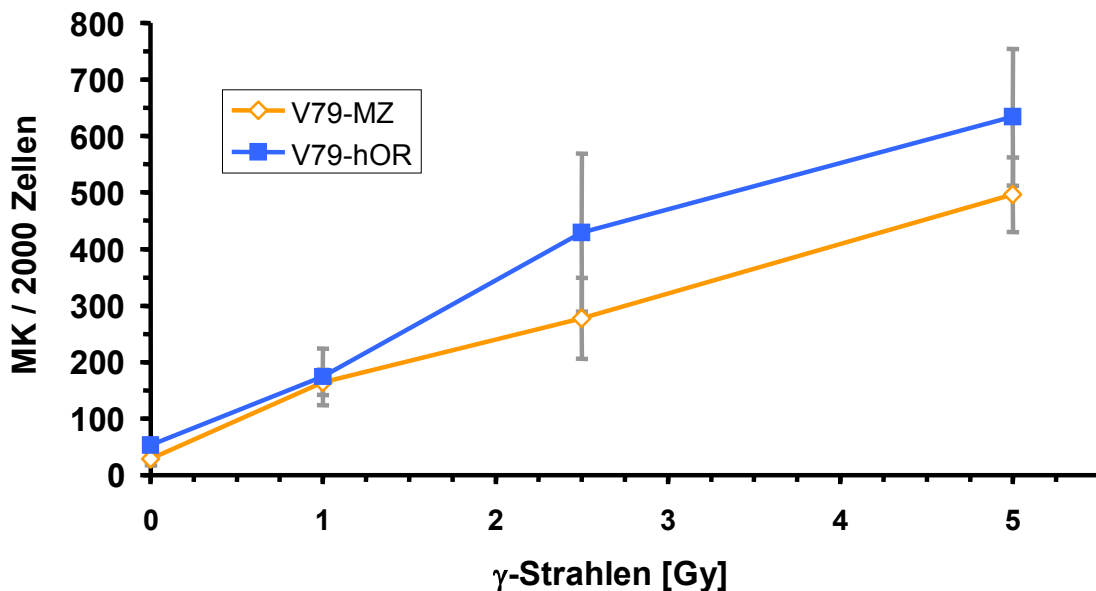


Abb. 5-37: Mikrokerne pro 2000 Zellen nach Schädigung mit γ -Strahlen.

Die Schädigung erfolgte mit γ -Strahlen von 0 bis 5 Gy, in serumfreien Medium bei 0 °C, in V79-MZ und V79-hOR. $n = 3$.

Auch nach Bestrahlung mit γ -Strahlen (Abb. 5-37) sind klastogene/aneugene Effekte nachweisbar, wobei hier, wie bei den vorhergehenden Untersuchungen, keine Zellunterschiede vorhanden sind. Besonders auffällig ist, dass obwohl in einem ungefähr gleichen Ausmaß DNA-Schäden verursacht werden, deutlich mehr Mikrokerne entstehen. Dies deutet auf eine erhöhte klastogene Wirkung von γ -Strahlung, trotz ähnlicher DNA-Schädigung, gegenüber Tirapazamin hin.

5.2.5 Quantifizierung von Tirapazamin und γ -Strahlung induzierter DSB mit Hilfe von γ -H2AX Immunfluoreszenz

Der spezifische Antikörper γ -H2AX ermöglicht es (siehe 4.2.4), mit Hilfe des Verfahrens nach Zhou (Zhou et al., 2006), Doppelstrangbrüche (DSB) quantitativ nachzuweisen.

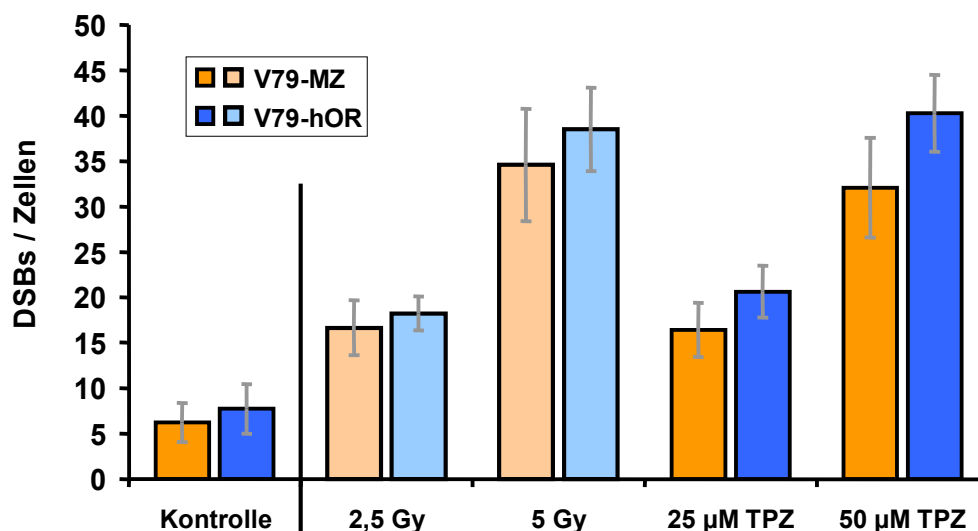


Abb. 5-38: Zelluläre Doppelstrangbrüche nach Schädigung mit γ -Strahlung oder Tirapazamin.

Die Schädigung der V79-MZ und V79-hOR Zellen erfolgte mit γ -Strahlen von 0 bis 5 Gy bei 0 °C oder mit 0 bis 50 μ M Tirapazamin bei in bei 37 °C für 30 min (siehe 4.2.2), in serumfreien Medium. Die Detektion erfolgte unmittelbar nach beendeter Schadensinduktion mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung (siehe 4.2.4.3). $n = 3$.

Das überraschende Ergebnis war, wie aus Abb. 5-38 ersichtlich wird, dass für die Generierung von DSB, im Gegensatz zu den bisherigen Untersuchungen, kein signifikanter Unterschied der Wirkung von Tirapazamin auf V79-MZ und V79-hOR Zellen besteht. Weiterhin werden von γ -Strahlung mit einer Dosis, die gleich viele Einzelstrangbrüche wie Tirapazamin induziert, auch ungefähr gleich viele DSB erzeugt. Die DSB scheinen demnach nicht für die erhöhte klastogene Wirkung von γ -Strahlen gegenüber Tirapazamin verantwortlich zu sein.

6 DISKUSSION

6.1 Ist die DNA-Reparatur durch eine Priming-Dosis induzierbar?

Für die Krebsentstehung (siehe Abb. 2-20) spielen vermutlich DNA-Modifikationen, die durch ROS als ultimale DNA-schädigende Agenzien verursacht werden, eine wichtige Rolle. In gesunden Zellen liegt ein Gleichgewicht zwischen der Bildung oxidativer DNA-Modifikationen und der Reparatur durch spezifische DNA-Reparaturenzyme vor. Dieses führt in Zellen zu „steady state“-Spiegeln oxidativer Modifikationen in der DNA (siehe Abb. 1-1), die bei der Zellteilung eine entsprechende Anzahl an Mutationen auslösen. Inhibition und Induktion der DNA-Reparatur sind zwei bedeutende Möglichkeiten, die Höhe der Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Schäden in Zellen zu modifizieren und so ihren Einfluss auf die Krebsentstehung negativ oder positiv, im Sinne einer verhinderten Krebsentstehung, zu beeinflussen. Die meisten oxidativen DNA-Modifikationen werden sowohl in Bakterien als auch in Eukaryoten durch spezifische DNA-Glykosylasen erkannt, was zu einer Reparatur über den Mechanismus der Basen-Exzisions-Reparatur (BER) führt. Die im Falle der UVB-Schädigung hauptsächlich induzierten Pyrimidindimere werden dagegen größtenteils durch die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) behoben. Es ist seit langem bekannt, dass sowohl die BER als auch die NER nach einer Schadensinduktion in Bakterien hoch reguliert wird. Für Säugetierzellen wird dies jedoch sehr widersprüchlich diskutiert. In dieser Arbeit wurde daher die DNA-Reparatur nach einer Vorschädigung mit einer Priming-Dosis in Maus-Embryofibroblasten, primären menschlichen Fibroblasten, p53-profizienten menschlichen Fibroblasten und menschlichen Keratinozyten untersucht.

6.1.1 Toxische Effekte von Ro19-8022 plus Licht und MMS

Die Untersuchungen zur Toxizität der für die folgenden Experimente verwendeten Priming-Dosis zeigten, dass in diesen Dosen MMS nicht toxisch ist. So zeigte sich weder eine Beeinflussung des Proliferationsfaktors (Abb. 5-3) noch der „plating efficiency“ (Abb. 5-4) für die unterschiedlichen Konzentrationen MMS. Die Toxizität von Ro19-8022 plus Licht in der hohen Dosis (Abb. 5-2) hatte, da es nicht zu einem Absterben sondern lediglich zu einer verminderten Zellteilung kam (Abb. 5-1), keine experimentelle Relevanz. Diese Ergebnisse bestätigten bisher unveröffentlichte Untersuchungen zur Toxizität von MMS und Ro19-8022 von L. Weidenfeller und I. Eckert.

6.1.2 Gibt es zellulär eine adaptive Antwort des Glutathiongehaltes auf ein Priming?

Die Ergebnisse nach einer Schädigung mit einer Priming-Dosis in Maus-Embryofibroblasten (Abb. 5-5) zeigten sowohl nach Behandlung mit MMS als auch nach Behandlung mit Ro19-8022 plus Licht, dass der Glutathiongehalt anstieg, ein Maximum nach 16 h erreichte und in den darauf folgenden 24 -48 h wieder auf das Ausgangsniveau zurückging. Die Ergebnisse der Schädigung mit der Priming-Dosis in primären menschlichen Fibroblasten (Abb. 5-6) zeigten ein vergleichbares Ergebnis. Auch hier kam es, sowohl für die Inkubation mit dem Alkylanz wie auch für die mit dem Oxidanz, zu einer zeitlich ähnlich verlaufenden adaptiven Antwort des zellulären Glutathiongehaltes. Diese erstmalig gezeigten Ergebnisse der adaptiven Antwort des Glutathiongehaltes in murinen und menschlichen Fibroblasten passen zu bisherigen Beobachtungen in Bakterien, in denen die Abwehr von ROS und der daraus resultierenden DNA-Modifikationen durch eine Vorschädigung und daraus resultierender Induktion zellulärer Enzyme wie der SOD verhindert wurde (Muller and Janz, 1993; Kim et al., 1996). Weiterhin ist in Säugerzellen auch eine zeitlich ähnlich verlaufende, von p53 vermittelte, adaptive Antwort des XPC Proteins nach Schadensinduktion mit UVB beschrieben (Adimoolam and Ford, 2002). Eine mögliche mechanistische Erklärung wäre die durch die Aktivierung via elektrophiler oder oxidativer Modifikation von Cystein-Resten an dem zugehörigen Protein KEAP1 vermittelte und über den Transkriptionsfaktor Nrf2 kontrollierte Hoch-Regulierung der Glutathionsynthese und anderer zytoprotektiven Proteine (Chan and Kwong, 2000; Wakabayashi et al., 2004).

6.1.3 Ist die Basen-Exzisions-Reparatur durch eine Priming Dosis induzierbar?

Die experimentellen Befunde der Induzierbarkeit der Basen-Exzisions-Reparatur (BER) zeigten in F11.1 Maus-Embryofibroblasten nach Vorbehandlung mit einer Priming-Dosis Ro19-8022 plus Licht nach einer kurzen Expressions-Periode (6 h, Abb. 5-8) keinen positiven Effekt im Sinne einer beschleunigten Reparatur der durch eine erneute Schädigung verursachten oxidativen DNA-Modifikationen. Da selbst nach einer verlängerten Expressions-Periode (18 h, Abb. 5-10), zu dem Zeitpunkt der maximalen Enzymexpression zytoprotektiver Proteine (18 h nach Verabreichung der Priming-Dosis), keine Induktion der BER festgestellt wurde, kann eine Induktion der BER für diesen Zeitraum und diese Art der Vorschädigung ausgeschlossen werden.

Die Bestimmungen der Reparaturkinetiken nach Vorbehandlung mit einer Priming-Dosis MMS in Maus-Embryofibroblasten führten zum gleichen Resultat wie

nach einer Vorbehandlung mit einer Priming-Dosis des Oxidanz (Abb. 5-11). Offensichtlich kommt es auch hier innerhalb des untersuchten Zeitraumes zu keiner verbesserten Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen.

Da in immortalisierten Zellen wie Maus-Embryofibroblasten gewisse an der DNA-Reparatur beteiligte Enzyme möglicherweise nicht vorhanden sind, und um Speziesunterschiede ausschließen zu können, wurde die Induzierbarkeit auch in primären menschlichen Zellen (FB2-299) untersucht. Die Ergebnisse zeigten jedoch auch in dieser Zelllinie (Abb. 5-12) keine Verbesserung der Reparatur oxidativer Modifikationen durch einer Vorbehandlung mit einer Priming-Dosis Ro19-8022 plus Licht und anschließender Expressions-Periode. Durch den Einsatz von eindeutig p53-profizienten Zellen (MCF7) wurde es ermöglicht, Rückschlüsse auf die Bedeutung dieses Tumorsuppressorgens auf die Induzierbarkeit der BER unter diesen Bedingungen zu erhalten. Wie jedoch die Ergebnisse in (Abb. 5-13) zeigen, war auch in p53-profizienten Zellen die Reparatur oxidativer Schäden nach einer Priming-Dosis folgenden Expressions-Periode nicht verbessert.

Ein weiteres interessantes Ergebnis dieser Experimente war die erhöhte Empfindlichkeit der Zellen gegenüber einer oxidativen Schädigung, sogar 18 h nach der erfolgten Priming-Dosis, unabhängig, ob diese mit MMS oder Ro19-8022 plus Licht erfolgte (siehe 5.1.4 und 5.1.5). Dies zeigte, dass, obwohl zu diesem Zeitpunkt der durch die Priming-Dosis induzierte Schaden vollständig repariert und der zelluläre Glutathiongehalt erhöht war, dieser erhöhte Glutathiongehalt keinerlei Schutz gegenüber einer erneuten oxidativen Schädigung bietet. Vielmehr lässt dies einen noch unbekanntem Mechanismus vermuten, wie zum Beispiel eine Öffnung der Chromatinstruktur während der DNA-Reparatur, welche die DNA-Schädigung erleichtert und dadurch die Empfindlichkeit erhöht.

Weder in Maus-Embryofibroblasten, primären menschlichen Zellen, noch in p53-profizienten menschlichen Tumor-Zellen konnte somit eine Steigerung der Reparaturkapazität oxidativer DNA-Modifikationen beobachtet werden, unabhängig davon, ob als Priming-Dosis das Alkylanz MMS oder der Photosensibilisator Ro19-8022 plus Licht (Oxidanz) verwendet wurde.

Diese in Säugerzellen gefundenen Ergebnisse stehen in klarem Widerspruch zu den bisherigen Befunden bei der Basen-Exzisions-Reparatur in bakteriellen Systemen, welche eine durch *ada* vermittelte, adaptive Antwort für AlkA, welches verschiedene alkylierte Basen entfernt (Lindahl et al., 1988; Wyatt et al., 1999) sowie eine durch das SoxRS-Regulon kontrollierte Hochregulierung von Endo IV durch ROS belegen (Demple, 1991). Die homologen Proteine beider Enzyme in Säugerzellen sind jedoch für die hier verursachten oxidativen DNA-Modifikationen nicht oder nur von untergeordneter Bedeutung und haben teilweise unterschiedliche Substrate. Auch die an der Regulation selbst beteiligten Proteine kommen in dieser

Form nur in prokaryotischen und folglich nicht in den hier verwendeten eukaryotischen Systemen vor. Auch die Befunde von Lee und Kim in bakteriellen Systemen (Kim et al., 1996; Lee et al., 1998), welche gezeigt haben, dass verschiedene Parameter die Aktivität der DNA-Reparatur und der daran beteiligten Enzyme wie die bakteriellen Reparaturoendonuklease Fpg steigern oder die Abwehr von ROS und der daraus resultierenden DNA-Modifikationen durch SOD verhindern können, sind aufgrund der Speziesunterschiede nicht auf Säugerzellen übertragbar. So erscheint es plausibel, dass elementare und früh entwickelte einfache Schutzmechanismen, wie die antioxidative Abwehr durch Glutathion oder SOD, evolutiv konserviert wurden (siehe Ergebnisse des Glutathiongehaltes), während die komplexeren DNA-Reparaturmechanismen sich im Laufe der Evolution weiter entwickelt haben. Eine Induktion der BER scheint für einen mehrzelligen Organismus demnach keinen Vorteil zu haben.

Auch die in der Literatur beschriebenen Befunde an Säugerzellen stehen in keinem Widerspruch zu den hier dargestellten Ergebnissen. So wurde zwar gezeigt, dass eine durch DNA-Schäden induzierte Aktivierung von dem Tumorsuppressor p53 in Zellen mit einer verminderten p53 Expression zu einer Effizienzverbesserung der NER führt (Hanawalt, 2002), jedoch wurde die Bedeutung von p53 für die BER bisher nicht untersucht. Des Weiteren gibt es Befunde, in denen p53 unter zellfreien Bedingungen die Reparatur von AP-Läsionen und Uracil Resten durch direkte Protein-Protein-Interaktion mit Pol β und Ape1 stimulieren kann (Offer et al., 2001a; Zhou et al., 2001). Auch ist in p53-defizienten Zellen die Expression von Pol β (siehe Abb. 2-17) reduziert und somit die Reparaturdauer nach der Behandlung mit MMS verglichen mit Wildtypzellen verlängert (Seo et al., 2002), jedoch kommt es nach einer Behandlung mit ionisierender Strahlung je nach Status des Zellzyklus zu einer Erhöhung oder Erniedrigung der Reparaturaktivität (Offer et al., 2001b). Die in dieser Arbeit gefundenen Reparaturkinetiken verdeutlichen, dass ein positiver p53-Status in Säugern nicht zu einer signifikant verbesserten oder induzierbaren BER führt.

Es gibt auch Hinweise für eine Erhöhung der Expression von Ape1 (Ramana et al., 1998) und hOgg1 (Kim et al., 2001) in kultivierten Zellen nach oxidativem Stress sowie eine Induktion von Ape1, Pol β , hOgg1 und Mpg (Methylpurin-DNA Glykosylase) in Rattenlebern nach Behandlung mit Peroxisomenproliferatoren (Rusyn et al., 2000). Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wurde auch als Verantwortlicher für eine Expressionserhöhung von hOgg1 nach Behandlung mit MMS, nicht aber nach H₂O₂, beschrieben (Lee et al., 2004) (Diskussion siehe 6.1.4). Die mRNA-Level von OGG1 blieben nach Behandlung mit H₂O₂ unverändert (Mistry and Herbert, 2003). Die Auswirkungen der Expressionsänderung auf die Reparatur selbst wurden in keiner dieser Untersuchungen bestimmt. Der einzige bisher direkte Befund einer Induktion der BER durch vorherige Schädigung wurde bisher von Le et al. (Le et al.,

1998) beschrieben, die eine beschleunigte Entfernung von Thyminglykolen nach einer Vorbehandlung mit ionisierender Strahlung beobachteten.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche keinen Hinweis auf eine Induzierbarkeit der Basen-Exzisions-Reparatur innerhalb der untersuchten Zeitspanne trotz einer adaptiven Antwort des zellulären Glutathiongehaltes für 8-oxoG und verwandte oxidative DNA-Modifikationen ergeben haben. So scheint weder eine Protein-de-novo-Synthese noch eine posttranslationale Proteinmodifikation oder induzierbare Translokation aus dem Cytosol zum Zellkern zu erfolgen. Dies stimmt mit bisherigen Beobachtungen bei einer Sequenzanalyse der Promotorregion von Ogg1 überein, welche für die Transkription von dieser Reparaturglykosylase eine Regulierung wie für viele andere House-Keeping Gene postuliert (Dhenaut et al., 2000). Natürlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass es in anderen Zelllinien nicht doch eine adaptive Antwort der DNA-Reparatur gibt. So scheint es sinnvoll, diese Ergebnisse in weiteren experimentellen Ansätzen, wie zum Beispiel auch Tiermodellen, zu überprüfen, um so ein besseres Verständnis für die Beeinflussung der BER durch endo- und exogene Faktoren zu erhalten.

6.1.4 Gibt es zelluläre eine adaptive Antwort des hOgg1-Gehaltes nach einer Schädigung?

Da die bereits erwähnten Ergebnisse von Lee (Lee et al., 2004) eine Induktion der Expression des wichtigsten, an der BER beteiligten Enzyms, nämlich hOgg1, anzeigten, wurde der Status von hOgg1 nach der in dieser Arbeit verwendeten Priming-Dosis in Maus-Embryofibroblasten überprüft. Es zeigte sich über den gesamten Zeitraum der Expressions-Periode von 18 h weder für die Priming-Dosis MMS (Abb. 5-16) noch für die Priming-Dosis Ro19-8022 plus Licht (Abb. 5-14) eine erhöhte Enzymexpression von hOgg1. Diese Ergebnisse stimmen mit den bisherigen Befunden von M. Osterod (Osterod, 2002) zu der Induzierbarkeit von hOgg1 und der im Western-Blot von C. Flohr-Beckhaus unter diesen Bedingungen detektierten Menge OGG1 überein. Als Folge davon erscheinen die Ergebnisse von Lee, dass hOgg1 nach Behandlung mit MMS nicht aber mit H₂O₂ vermehrt vorliegt, fraglich bzw. auf andere Zellen nicht übertragbar.

6.1.5 Ist die Nukleotid-Exzisions-Reparatur durch eine Priming-Dosis induzierbar?

Im Anschluss an die Untersuchungen zur Basen-Exzisions-Reparatur wurden Experimente in primären menschlichen Fibroblasten und Keratinozyten durchgeführt. Die Untersuchungen sollten zeigen, ob eine Priming-Dosis mit UVB, welche

hauptsächlich Pyrimidindimere, die Substrat der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) sind, induziert, zu einer Beschleunigung der NER führt. Um dies zu überprüfen, wurde in die durch Bestrahlung mit UVB geschädigten Zellen (Priming-Dosis) nach einer Expressionsphase von 18 h, die eine mögliche Aktivierung der zellulären Reparaturmechanismen der NER bewirken sollte, ein zuvor mit unterschiedlichen Dosen UVB geschädigtes Plasmid transfiziert. Durch Messung der Luciferaseaktivität in mit einer Priming-Dosis oder unbehandelten transfizierten Zellen, sollte überprüft werden, welchen Einfluss die vorausgegangene Vorbehandlung mit einer Priming-Dosis auf die Reaktivierung des Plasmids und damit die Reparatursysteme hat. Die Ergebnisse zur Untersuchung der NER-Kapazität zeigten sowohl für primäre menschliche Fibroblasten (Abb. 5-18) als auch in Keratinozyten (Abb. 5-19) keine Induzierbarkeit der Reaktivierung und folglich keine Beschleunigung der Reparatur des Plasmids. Es zeigte sich jedoch, dass Keratinozyten deutlich besser reparieren als gleich behandelte Fibroblasten.

6.1.6 Welchen Einfluss hat p53 auf die Nukleotid-Exzisions-Reparatur?

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten im Einklang mit der Arbeit von H.C. Mahler (Mahler, 1999) ebenfalls keinen Einfluss von p53 auf die NER nach UVB-Bestrahlung. Es bleibt jedoch festzustellen, dass die Induktion der NER über eine Erhöhung von p53 nicht unumstritten ist. So gibt es, wie bereits beschrieben, Befunde, dass eine durch DNA-Schäden induzierte Aktivierung von dem Tumorsuppressor p53 in Zellen mit einer verminderten p53-Expression zu einer Effizienzverbesserung der NER führt (Hanawalt, 2002). Der Befund in dieser Arbeit, dass Keratinozyten mit UVB geschädigte Plasmide schneller reaktivieren, könnte folglich mit dem erhöhten basalen Gehalt an p53 in Keratinozyten erklärt werden. Jedoch zeigten die Ergebnisse der Plasmidreaktivierung in mit p53-siRNA behandelten menschlichen Fibroblasten und Keratinozyten keine Verlangsamung der Reparatur im Vergleich zu den Zellen ohne p53-„knockdown“ (Vergleiche Abb. 5-18 mit Abb. 5-22 (Fibroblasten) bzw. Abb. 5-19 mit Abb. 5-23 (Keratinozyten)). Weiterhin war auch trotz erhöhtem p53-Gehalt nach einer Vorbehandlung die Reaktivierung in menschlichen Fibroblasten (Abb. 5-18) und Keratinozyten (Abb. 5-19) nicht beschleunigt. Dies bedeutet, dass der p53-Gehalt weder für die Reparatur noch für die Induktion der Reparatur eine Rolle spielt. Da in diesen Experimenten zu verschiedenen Zeitpunkten der p53-Status in den Zellen bestimmt wurde (siehe Abb. 5-20 und Abb. 5-21), kann ein fehlender „knockdown“ als Grund für die nicht vorhandene Verlangsamung der Reaktivierung ausgeschlossen werden. Jedoch wäre es wünschenswert, die Experimente in „echten“ Knockout Zellen

durchzuführen, da ein solcher „knockdown“ nur zu einer transienten und nicht zu einer vollständig verminderten Genexpression führt. Da solche Zellen zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht zur Verfügung standen, bleibt dies somit eine Aufgabe zukünftiger Untersuchungen.

Die gut belegte Induzierbarkeit der NER in bakteriellen Systemen, in welchen durch die so genannte SOS-Antwort die Expression von *uvrA*, *uvrB*, *uvrD* und *cho* erhöht wird (Muller and Janz, 1993; Brena-Valle and Serment-Guerrero, 1998; Salmelin and Vilpo, 2003), lässt sich also wie schon bei der BER nicht auf Säugerzellen übertragen. So konnte auch Hanawalt aufgrund der p53-Defizienz in Nagerzellen keine der induzierten SOS-Antwort analoge Induktion der p53-abhängigen GGR bei der NER finden (Hanawalt, 2002).

6.2 Untersuchungen zu DNA-Schadensgenerierung und Toxizität durch Tirapazamin

Der DNA-schädigende Mechanismus und die daraus resultierende Zytotoxizität ist für die Weiter- und Neuentwicklung von Zytostatika zur Chemotherapie eine wichtige Grundlage. Es ist von daher besonders wichtig, die Ursachen der beobachteten selektiven Apoptose der Tumorzellen und aller anderen metabolisch hochaktiven Zellen eines mit einem Zytostatikum behandelten Organismus zu verstehen. Aus diesem Grund wurde Tirapazamin ein in Phase 2/3 befindliches Zytostatikum, welches selektiv hypoxische Zellen tötet, ausgewählt. Von besonderem Interesse war in dieser Arbeit dabei einerseits, ob Tirapazamin direkt DNA-Schäden verursacht oder ob zuvor eine Aktivierung/Prozessierung durch endogene Enzyme, wie Cytochrom P450 Reduktase, notwendig ist und es erst dann direkt oder indirekt zu einer DNA-Schädigung kommt. Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Experimente zur Mutagenität und Toxizität von Tirapazamin durchgeführt, um weitere Aufschlüsse über den Zusammenhang zwischen DNA-Schäden und Mutagenität und Toxizität zu erhalten.

6.2.1 Mechanismen der DNA-Schädigung durch Tirapazamin

Die durch Tirapazamin in V79-hOR verursachten und mit Hilfe verschiedener DNA-Glykosylasen quantifizierten DNA-Modifikationen (Abb. 5-29) und das daraus erhaltene Schadensprofil (Abb. 5-30) gleicht in der Summe weitgehend dem von γ -Strahlen verursachten Schadensprofil (Abb. 5-32). Jedoch verursachte Tirapazamin relative mehr oxidierte Pyrimidin-Modifikationen. So ist das Verhältnis der DNA-Modifikationen 2:1:1:1,5 (SSBs zu AP-Läsionen zu oxidierten Purinen zu oxidierten Pyrimidinen) deutlich anders als nach γ -Strahlung, bei der ein Verhältnis von 2,5:1:1:0,5 gefunden wurde. Außerdem auffällig an dem Schadensprofil im Vergleich zu dem von γ -Strahlung ist ferner, dass obwohl die AP-Läsionen insgesamt durch γ -Strahlung im gleichen Ausmaß wie bei Tirapazamin gebildet wurden, der Anteil an 1'-oxidierten AP-Läsionen bei Tirapazamin viel höher ist. Dessen ungeachtet bestätigten die Ergebnisse bisherige Befunde zur γ -Strahlung (Ballmaier, 1997). Da die DNA-schädigende Wirkung von γ -Strahlung hauptsächlich auf der intrazellulären Generierung von Hydroxylradikalen beruht (siehe 2.3.2), spiegelt das von γ -Strahlung verursachte DNA-Schadensprofil die von intrazellulär gebildeten Hydroxylradikalen verursachten DNA-Modifikationen wider.

Die Ergebnisse der Schadenscharakterisierung *in vivo* stimmen mit bisherigen Befunden in zellfreien Experimenten überein (Kotandeniya et al., 2002). So verursacht Tirapazamin, in Anwesenheit von Xanthinoxidase oder NADPH-Cytochrom-P450-Oxidoreduktase, zellfrei ebenfalls DNA-Modifikationen, die

mit dem Schadensprofil von γ -Strahlung vergleichbar sind (Kotandeniya et al., 2002; Birincioglu et al., 2003).

Der Befund *in vivo*, dass das DNA-Schadensprofil von Tirapazamin dem Schadensprofil der γ -Strahlung sehr ähnlich ist, legt nahe, dass auch Tirapazamin unter anderem durch die Generierung von Hydroxylradikalen zur DNA-Schädigung führt. Die relative Anzahl induzierter Doppelstrangbrüche (DSB) in V79-hOR Zellen im Vergleich zur γ -Strahlung spricht gleichfalls für einen ähnlichen DNA-schädigenden Mechanismus von Tirapazamin (Abb. 5-38). Durch die Versuche mit dem Hydroxylradikalfänger t-Butanol konnte gezeigt werden, dass der DNA-Schaden teilweise durch Hydroxylradikale verursacht wird. So ist die DNA-schädigende Wirkung von Tirapazamin nach Behandlung mit t-Butanol verringert (Abb. 5-33).

Diese Ergebnisse bestärken die Hypothese, dass Tirapazamin über reaktive Sauerstoffspezies (ROS) DNA-schädigend wirkt. Die oben beschriebenen Unterschiede in den Schadensprofilen und der Befund, dass nach Behandlung mit t-Butanol noch ca. 75 % des ursprünglichen Schadens durch Tirapazamin verursacht wird, lässt vermuten, dass neben Hydroxylradikalen noch andere DNA-schädigende Mechanismen bei Tirapazamin *in vivo* vorliegen (siehe Abb. 2-10). Ähnliches beobachtete auch Brown in zellfreien Systemen (Brown and Wilson, 2004), wobei er neben dem gebildeten Hydroxylradikal auch das gebildete Benzotriazinylradikal (BTZ \cdot) als DNA-schädigendes Radikal diskutiert.

Die intrazelluläre Generierung der vermuteten, DNA-schädigenden Radikale (BTZ \cdot , TPZ \cdot und Hydroxylradikal) aus Tirapazamin, kann durch die Metabolisierung von Tirapazamin durch eine Oxidoreduktase erklärt werden. Diese Theorie wird mit den Befunden der Experimente zur Dosisabhängigkeit bei der Alkalischen Elution bestätigt. In diesen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen V79-MZ und V79-hOR Zellen (Abb. 5-27). So waren in V79-MZ Zellen bis zu einer Dosis von 100 μ M Tirapazamin keine induzierten Einzelstrangbrüche feststellbar, wohingegen in V79-hOR Zellen eine proportionale, lineare Dosisabhängigkeit im gleichen Konzentrationsbereich von Tirapazamin vorlag. Eine Aktivierung von Tirapazamin durch eine Oxidoreduktase ist demnach essentiell für das durch Tirapazamin verursachte Schadensprofil.

Ein überraschendes Ergebnis in diesem Zusammenhang ist, dass für die Generierung von DSB, im Gegensatz zu den anderen Arten von DNA-Schäden, kein signifikanter Unterschied der Wirkung von Tirapazamin auf V79-MZ und V79-hOR Zellen besteht (Abb. 5-38). So werden durch Tirapazamin, obwohl in V79-MZ Zellen keine DNA-Basen schädigende Wirkung gefunden wurde, in beiden Zelllinien in gleichem Maße Doppelstrangbrüche erzeugt. Das in dieser Arbeit bei γ -Strahlung gebildete Ausmaß an Doppelstrangbrüche stimmte dabei mit bisherigen Befunden

zur Doppelstrangbruchinduktion durch γ -Strahlung überein (Leatherbarrow et al., 2006). Für diese Form der DNA-Schädigung muss demnach bei Tirapazamin ein anderer Mechanismus als der bisher vermutete vorliegen. In Betracht käme eine direkte Interaktion mit der Topoisomerase II, wobei aufgrund der fehlenden Zellunterschiede die humane Oxidoreduktase und damit eine metabolische Aktivierung von Tirapazamin sowie die damit verbundene Generierung von Hydroxylradikalen wohl keine Relevanz für diesen Mechanismus hat. Klarheit würden auch hier Untersuchungen zum Einfluss von t-Butanol auf die Bildung von Doppelstrangbrüchen geben, welche jedoch, da die Technik zur DSB-Detektion erst kurz vor Beendigung des experimentellen Teils dieser Arbeit zur Verfügung stand, eine Aufgabe für zukünftige Experimente bleibt.

6.2.2 Mechanismen der Toxizität

Die für die Untersuchungen zu der DNA-Schädigung durch Tirapazamin (TPZ) verwendeten Schädigungsbedingungen waren weder in V79-MZ Zellen noch in den humane Oxidoreduktase (hOR) überexprimieren V79-hOR Zellen mit einer nachweisbaren Toxizität verbunden, wie Messungen der „cloning efficiency“ zeigten (Abb. 5-24). Diese Ergebnisse stimmen mit bisherigen Befunden von J.M. Brown (Brown, 1993), welcher ebenfalls eine nur geringe Toxizität unter aeroben Bedingungen für Tirapazamin feststellen konnte, überein.

Die Ergebnisse der Experimente zur Toxizität von γ -Strahlung zeigten eine klare dosisabhängige Reduktion der „cloning efficiency“, wobei für V79-MZ und V79-hOR Zellen keine signifikant unterschiedliche Sensitivität für γ -Strahlen vorlag (Abb. 5-26). Da für γ -Strahlung keine enzymatische Aktivierung notwendig ist, sind diese Ergebnisse nicht überraschend und stimmen ebenfalls mit bisherigen Befunden zur Toxizität von γ -Strahlung überein (Friedberg et al., 1995b; Ballmaier, 1997).

Demnach ist, obwohl sich die Schadensprofile von Tirapazamin und γ -Strahlung sehr ähnlich sind (siehe 5.2.2), die Zytotoxizität von Tirapazamin und γ -Strahlung bei gleichem Schadensausmaß sehr unterschiedlich, wie aus Abb. 6-1 ersichtlich wird. Dies ist besonders erstaunlich, weil die DNA-Schädigung zumindest bei der γ -Strahlung direkt für die Toxizität verantwortlich ist.

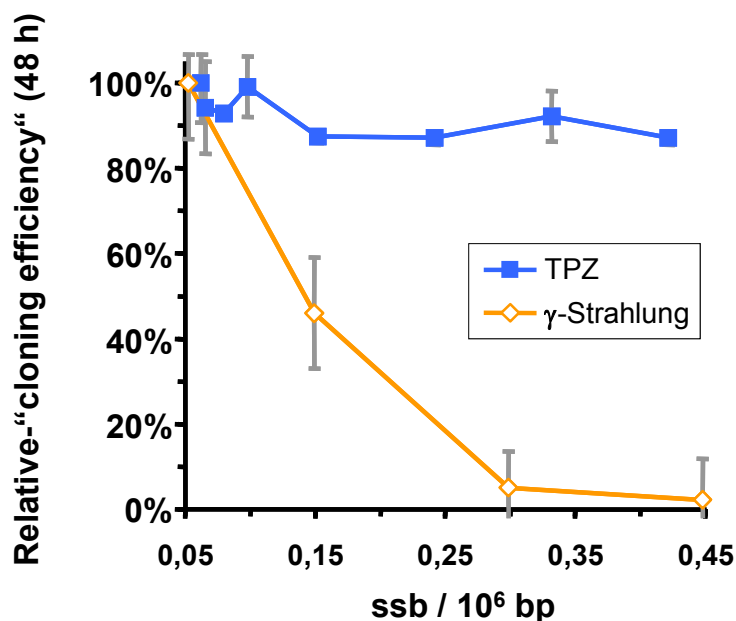


Abb. 6-1: Relative-„cloning efficiency“ im Verhältnis zu den induzierten DNA-Schäden.

Die „cloning efficiency“ ungeschädigter Zellen ist 100 %. Aufgetragen sind die experimentell ermittelten, induzierten Einzelstrangbrüche nach Behandlung mit TPZ oder γ -Strahlung gegen die in gleicher Dosis vorhandene Relative-„cloning efficiency“. Daten aus Abb. 5-24, Abb. 5-26, Abb. 5-27 und Abb. 5-28. $n = 3$.

Ein Grund für die nicht vorhandene Toxizität durch Tirapazamin verursachter DNA-Schäden kann die verhältnismäßig rasche Reparatur dieser sein. Eine mögliche Erklärung, weshalb dies im Falle der γ -Strahlung nicht erfolgt, liefert die nachweislich vorhandene erhöhte Induktion von Clustered-DNA-Schäden durch γ -Strahlung (Blaisdell et al., 2001). Als „Clustered“ bezeichnet man DNA-Schäden, wenn innerhalb von 15 bp zwei oder mehr DNA-Modifikationen verursacht werden. Diese von γ -Strahlung, nicht aber von Tirapazamin induzierten Clustered-DNA-Schäden werden erst nach der Bestrahlung zeitlich verzögert in Doppelstrangbrüche, durch Reparaturversuche der Zellen bzw. der nachfolgenden Replikation, umgewandelt (Gulston et al., 2004; Yang et al., 2006). Dies erklärt, weswegen direkt nach der Schädigung trotz gleichem Ausmaß an Doppelstrangbrüchen (siehe 6.2.1) eine erhöhte Toxizität im Falle der γ -Strahlung gefunden wurde. Eine weitere mögliche Erklärung, weshalb die von γ -Strahlen verursachten DNA-Schäden toxischer sind, liegt ebenfalls in der Eigenschaft der Clustered-DNA-Schäden. So gibt es Hinweise, dass diese die Aktivität des an der Reparatur beteiligten XRCC1/Ligase III-Komplex verringern (Lomax et al., 2004). Zudem werden Clustered-DNA-Schäden im Verhältnis zu „normalen“ (nicht als Cluster vorliegenden) DNA-Schäden generell langsamer repariert (Georgakilas et al., 2004; Dizdaroglu, 2005).

Die Ergebnisse mit einer verlängerten Inkubationszeit zeigten, dass es auch hinsichtlich der Toxizität zwischen V79-MZ und V79-hOR Zellen Unterschiede gibt (Abb. 5-25). So war die Toxizität in den hOR überexprimierenden Zellen um ein 4 faches stärker ausgeprägt, was erneut für eine Aktivierung von Tirapazamin durch eine Oxidoreduktase (wie z.B. Cytochrom P450) spricht. Allerdings ist Tirapazamin unter diesen Bedingungen auch in V79-MZ Zellen toxisch. Dies und der Befund, dass eine kurze Behandlung mit Tirapazamin nicht toxisch ist, bedeutet, dass die aus Tirapazamin generierten, DNA-schädigenden Radikale zur Toxizität von Tirapazamin beitragen, aber nicht ausschließlich dafür verantwortlich sind.

6.2.3 Mechanismen der Mutagenität

Die Ergebnisse des HPRT-Mutationstest zeigten, dass Tirapazamin in V79-hOR schon in geringen Konzentrationen mutagen ist, während bei V79-MZ nur in sehr hohen Konzentrationen eine geringe Mutagenität auftrat (Abb. 5-34). Demnach scheint die Metabolisierung von Tirapazamin durch die humane Oxidoreduktase neben der DNA-schädigenden Wirkung und Verstärkung der Toxizität (lange Inkubationszeit) auch für die mutagenen Effekte von TPZ verantwortlich zu sein. Dass der induzierte DNA-Schaden mit der Mutagenität korreliert (Abb. 6-2), wurde bereits für anderer Substanzen, wie zum Beispiel der γ -Strahlung von D. Ballmaier gezeigt (Ballmaier, 1997).

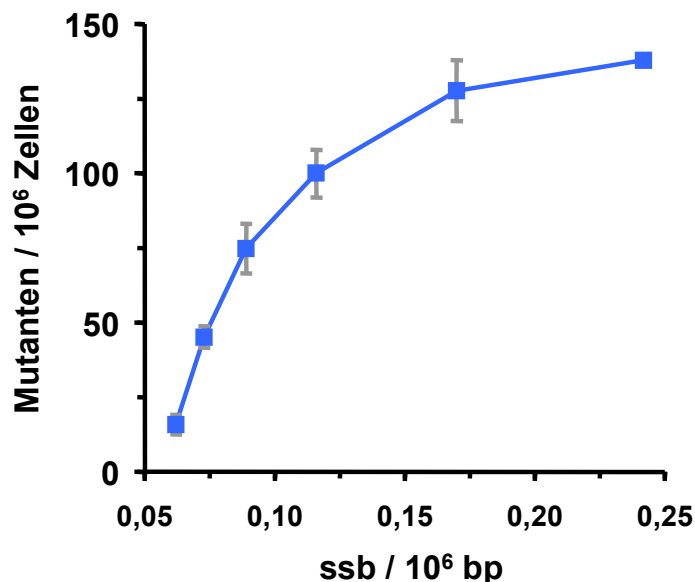


Abb. 6-2: Anzahl der Mutanten pro 10^6 überlebende Zellen im Verhältnis zu den induzierten DNA-Schäden.

Aufgetragen sind die experimentell ermittelten, induzierten Einzelstrangbrüche nach Behandlung mit TPZ gegen die in gleicher Dosis vorhandenen Mutanten pro 10^6 überlebende Zellen. Daten aus Abb. 5-27 und Abb. 5-34. $n = 3$.

Dieses Ergebnis stimmt weiterhin mit dem Mechanismus der Kanzerogenese überein (Abb. 2-20), in welchem als initiales Ereignis die DNA-Schädigung als Ursache einer Mutation bei der Krebsentstehung steht.

6.2.4 Welche klastogenen/aneugenen Effekte hat Tirapazamin im Vergleich zu γ -Strahlung und gibt es zelluläre Unterschiede?

Wie schon bei den Untersuchungen zur Toxizität von Tirapazamin, zeigten sich nach einer kurzen Behandlung der beiden Zelllinien mit Tirapazamin keine klastogenen/aneugenen Effekte (Abb. 5-35). Nach Bestrahlung mit γ -Strahlen waren jedoch die klastogene/aneugene Effekte in Form von Mikrokernen nachweisbar (Abb. 5-37), wobei hier, wie bei den vorhergehenden Untersuchungen, keine Zellunterschiede vorhanden waren. Auffällig war, dass bei gleichem Ausmaß der DNA-Schäden (dargestellt als SSB) Tirapazamin in V79-hOR Zellen weit weniger Mikrokern verursacht, als γ -Strahlung (Abb. 6-3).

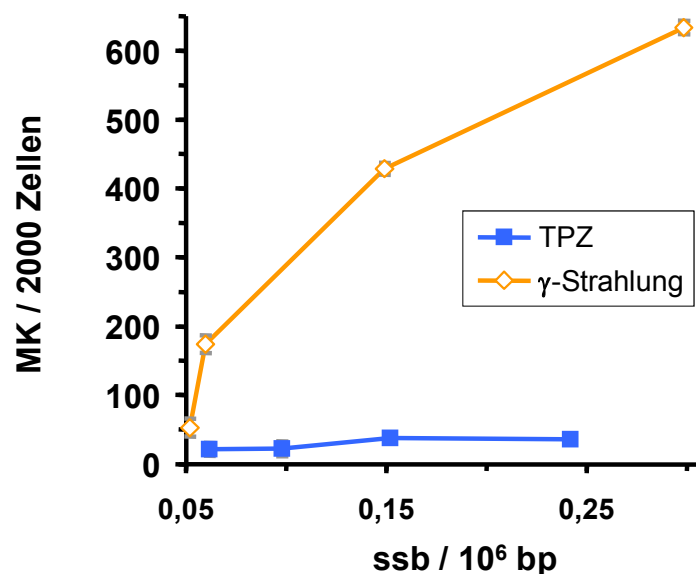


Abb. 6-3: Anzahl der Mikrokern (MK) pro 2000 Zellen im Verhältnis zu den induzierten DNA-Schäden.

Aufgetragen sind die experimentell ermittelten, induzierten Einzelstrangbrüche nach Behandlung mit TPZ oder γ -Strahlung gegen die in gleicher Dosis vorhandenen Mikrokern pro 2000 Zellen. Daten aus Abb. 5-27, Abb. 5-28, Abb. 5-35 und Abb. 5-37. $n = 3$.

So kommt es mit steigender Anzahl der durch γ -Strahlung induzierten Einzelstrangbrüche in V79-hOR Zellen zu einer vermehrten Bildung von Mikrokernen. Dies deutet auf einen erhöhten klastogenen Effekt von γ -Strahlung, bei gleichem DNA-Schaden gegenüber Tirapazamin, hin. Eine mögliche Ursache für diesen erhöhten klastogenen Effekt ist die bereits beschriebene Eigenschaft der von γ -Strahlen verursachten Clustered-DNA-Schäden (siehe 6.2.2), welche erst verzögert

Tirapazaminradikalen und Benzotriazinylradikalen nicht abschließend geklärt werden konnten. Der so generierte DNA-Schaden ist allerdings vermutlich nur zum Teil für die Toxizität und die klastogenen/aneugenen Effekte von Tirapazamin verantwortlich. Da das Hauptziel dieses Teils der Arbeit jedoch die Schadensanalyse von Tirapazamin war, obliegt die endgültige Aufklärung des Mechanismus weiterführenden Untersuchungen.

7 ZUSAMMENFASSUNG

In allen lebenden Zellen werden „Gleichgewichtsspiegel“ oxidativer DNA-Modifikationen wie 8-Hydroxyguanin (8-oxoG) gefunden. Dieser Spiegel resultiert aus der permanenten Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), welche zu DNA-Modifikationen führen, und einer gleichzeitigen Entfernung der Modifikationen durch die Mechanismen der DNA-Reparatur. Vermutlich tragen endogen gebildete oxidative Basenmodifikationen, so fern sie nicht repariert werden, zu spontanen Mutationsraten in Zellen bei und spielen so eine entscheidende Rolle bei der Initiierung der Kanzerogenese. Eine Möglichkeit die Krebsentstehung zu verhindern, wäre demzufolge, die Effizienz dieser DNA-Schadensreparatur zu erhöhen. Es stellt sich die Frage, ob eine adaptive Antwort der DNA-Reparatur auf einen DNA-Schaden existiert.

Zur Klärung dieser Frage wurden Untersuchungen vorgenommen, ob die Reparatur oxidierter Basen, die Substrate der Basen-Exzisions-Reparatur darstellen, oder von Pyrimidindimeren, die durch die Nukleotid-Exzisions-Reparatur entfernt werden, durch eine Vorbehandlung mit einer Priming-Dosis DNA-schädigender Agenzien induzierbar ist. Die Bestimmung der DNA-Reparatur in Säugerzellen wurde mit einer modifizierten alkalischen Elution unter Verwendung der bakteriellen Reparaturoendonuklease Fpg (Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase), die sehr spezifisch oxidative Schädigungen der DNA (wie 8-oxoG) erkennt, zu unterschiedlichen Zeitpunkten quantifiziert.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl eine Vorbehandlung mit einer alkylierenden als auch mit einer oxidierenden Substanz zu einer adaptiven Erhöhung des zellulären Glutathionspiegels führte, die 16 h nach der Schädigung ihr Maximum erreichte. Dieser Effekt war unabhängig davon, ob Maus-Embryofibroblasten, primäre menschliche Zellen oder p53-profiziente menschliche Zellen verwendet wurden. Dessen ungeachtet waren die 8-oxoG-Glykosylaseaktivitäten jedoch über einen Zeitraum von 18 h konstant, unabhängig von der verwendeten Zelllinie und der Art der Schädigung. Die Schadensreparatur war ebenfalls weder für Maus-Embryofibroblasten, primäre menschliche Zellen noch für p53-profiziente menschliche Zellen signifikant verbessert. Die adaptive Antwort bezüglich der Glutathionspiegel war also nicht mit einer entsprechenden Veränderung bei der DNA-Reparatur verbunden. Danach ist die Reparatur von oxidativen DNA-Modifikationen durch eine vorausgehende Schädigung nicht induzierbar.

Der zweite Teil der Untersuchungen zu der DNA-Schadensreparatur beschäftigte sich mit der Nukleotid-Exzisions-Reparatur. Hier wurde mit Hilfe eines Luciferase-Plasmid-Reaktivierungs-Assay die Reaktivierung eines mit UVB-Strahlung geschädigten Plasmids untersucht. Als Wirtszellen wurden dabei primäre

menschliche Fibroblasten und Keratinozyten, die entweder vorbehandelt oder ungeschädigt waren, verwendet. Auch für die NER konnte bei diesen Untersuchungen keine signifikante Beschleunigung der Reparatur von Pyrimidindimeren durch eine vorausgehende Vorbehandlung mit einer Priming-Dosis festgestellt werden. Die Reaktivierung erfolgte ferner unabhängig vom p53-Status der Zellen, wie durch Versuche mit siRNA gegen p53 festgestellt wurde. In primären menschlichen Fibroblasten war das Ausmaß der Reaktivierung nur 30 % von derjenigen in den Keratinozyten, jedoch ebenfalls unbeeinflusst von einer Priming-Dosis.

Neben der DNA-Reparatur ist im Falle einer Krebserkrankung die Behandlung mit Zytostatika von großer Bedeutung. Ziel der Forschung ist es dabei, möglichst selektive Substanzen zu entwickeln, die das Tumorwachstum und die Metastasierung reduzieren oder gar vollständig inhibieren ohne andere Körperzellen stark zu beeinträchtigen. Um dies erreichen zu können, ist ein Verständnis der beteiligten Mechanismen dieser Substanzen essentiell.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war daher die Charakterisierung der von dem Zytostatikum Tirapazamin verursachten DNA-Modifikationen sowie Untersuchungen zur Toxizität und Genotoxizität dieser Substanz in verschiedenen Zelllinien. Tirapazamin ist ein für hypoxische Zellen selektives, neues Zytostatikum und befindet sich momentan in Phase 2 und 3 der klinischen Prüfung im Rahmen seiner Zulassung. Da es Hinweise auf eine Aktivierung von Tirapazamin über eine Oxidoreduktase gab, wurden die Experimente in hOR überexprimierenden und in Wildtyp Zellen durchgeführt. Die Quantifizierung der verursachten DNA-Modifikationen zeigte, dass der von Tirapazamin verursachte Schaden in Zellen mit hOR deutlich gegenüber dem Wildtyp erhöht war. Das erhaltene Schadensprofil der durch Tirapazamin verursachten DNA-Modifikationen war dem Schadensprofil durch γ -Strahlen intrazellulär verursachten Hydroxylradikalen sehr ähnlich. Da es nach der Aktivierung von Tirapazamin durch eine Oxidoreduktase zu einer Abspaltung von Hydroxylradikalen kommt, bestätigte dies den vermuteten Mechanismus. Weitere Untersuchungen mit t-Butanol, einem Hydroxylradikalfänger, ergaben eine verminderte DNA-Schädigung, was ebenfalls für eine DNA-Schädigung durch Hydroxylradikale spricht.

Um zu überprüfen, ob die durch Tirapazamin erzeugten DNA-Modifikationen eine mutagene Wirkung haben, wurde die durch Tirapazamin verursachte Mutantenhäufigkeit in beiden Zelllinien verglichen. Hier zeigten sich klare Unterschiede mit und ohne Oxidoreduktase, so war die Mutationsrate in Zellen mit hOR um das 4 fache erhöht.

Erstaunlich war jedoch, dass der im gleichen Ausmaß von γ -Strahlung verursachte DNA-Schaden für die beobachtete Toxizität dieser verantwortlich war, während bei Tirapazamin unter den gleichen Bedingungen keine Toxizität vorlag. Erklärt werden könnte die erhöhte Toxizität und Mutagenität von sogenannte Clustered-DNA-Schäden, die von γ -Strahlen, nicht jedoch von Tirapazamin gebildet werden. Nach einer verlängerten Inkubation wurde, sowohl für die Toxizität als auch für die Genotoxizität erneut ein verstärkender Effekt durch die Oxidoreduktase bestätigt. So waren die Toxizität und Genotoxizität in hOR Zellen um ein vielfaches stärker ausgeprägt als in Wildtypzellen.

Ein unerwartetes Ergebnis der Untersuchungen zur DNA-Schädigung war allerdings die von der Oxidoreduktase unabhängige Generierung von Doppelstrangbrüchen, für die demnach ein grundsätzlich anderer Mechanismus, wie zum Beispiel eine direkte Interaktion mit der Topoisomerase II, angenommen werden muss.

Abschließend bleibt festzustellen, dass die Aktivierung von Tirapazamin durch eine Reduktase für viele, aber nicht alle beobachteten zellulären Effekte erforderlich ist. Insgesamt führt sie jedoch zu einer deutlichen Verstärkung der verursachten DNA-Modifikationen, Toxizität, Genotoxizität und Mutagenität.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Adimoolam, S. and Ford, J.M.: p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 12985-90.
- Allinson, S.L., Dianova, I. and Dianov, G.L.: Poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair: always engaged, but not essential for DNA damage processing. *Acta Biochim Pol* 50 (2003) 169-79.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Hagen, T.M.: Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 7915-22.
- Andrae, U.: Störung der Struktur und Funktion von Makromolekülen durch Chemikalien., Skript zum DGPT-Kurs Molekulare Zelltoxikologie, 2003.
- Asagoshi, K., Yamada, T., Okada, Y., Terato, H., Ohyama, Y., Seki, S. and Ide, H.: Recognition of formamidopyrimidine by *Escherichia coli* and mammalian thymine glycol glycosylases. Distinctive paired base effects and biological and mechanistic implications. *J Biol Chem* 275 (2000) 24781-6.
- Asahara, H., Wistort, P.M., Bank, J.F., Bakerian, R.H. and Cunningham, R.P.: Purification and characterization of *Escherichia coli* endonuclease III from the cloned *nth* gene. *Biochemistry* 28 (1989) 4444-9.
- Audebert, M., Chevillard, S., Levalois, C., Gyapay, G., Vieillefond, A., Klijanienko, J., Vielh, P., El Naggat, A.K., Oudard, S., Boiteux, S. and Radicella, J.P.: Alterations of the DNA repair gene OGG1 in human clear cell carcinomas of the kidney. *Cancer Res* 60 (2000) 4740-4.
- Baeuerle, P.A., Rupec, R.A. and Pahl, H.L.: Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. *Pathol Biol (Paris)* 44 (1996) 29-35.
- Bailly, V., Verly, W.G., O'Connor, T. and Laval, J.: Mechanism of DNA strand nicking at apurinic/apyrimidinic sites by *Escherichia coli* [formamidopyrimidine]DNA glycosylase. *Biochem J* 262 (1989) 581-9.
- Balaban, R.S., Nemoto, S. and Finkel, T.: Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120 (2005) 483-95.
- Ballmaier, D.: Oxidative DNA-Modifikationen durch extrazellulär und intrazellulär gebildete reaktive Sauerstoffspezies., Institut für Pharmakologie und Toxikologie. Universität Würzburg, Würzburg, 1997.
- Ballmaier, D., Briviba, K., Sies, H. and Epe, B.: Use of repair endonucleases to assess DNA damage by peroxynitrite. *Methods Enzymol* 301 (1999) 311-8.
- Bartsch, H. and Nair, J.: New DNA-based biomarkers for oxidative stress and cancer chemoprevention studies. *Eur J Cancer* 36 (2000) 1229-34.
- Batty, D.P. and Wood, R.D.: Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene* 241 (2000) 193-204.
- Beckman, K.B. and Ames, B.N.: Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 272 (1997) 19633-6.
- Beckman, R.A. and Loeb, L.A.: Genetic instability in cancer: theory and experiment. *Semin Cancer Biol* 15 (2005) 423-35.
- Beehler, B.C., Przybyszewski, J., Box, H.B. and Kulesz-Martin, M.F.: Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine within DNA of mouse keratinocytes exposed in culture to UVB and H₂O₂. *Carcinogenesis* 13 (1992) 2003-7.
- Bennett, R.A., Wilson, D.M., 3rd, Wong, D. and Demple, B.: Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase beta in the base excision repair pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 7166-9.

- Berdal, K.G., Johansen, R.F. and Seeberg, E.: Release of normal bases from intact DNA by a native DNA repair enzyme. *Embo J* 17 (1998) 363-7.
- Bessho, T.: Nucleotide excision repair 3' endonuclease XPG stimulates the activity of base excision repair enzyme thymine glycol DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res* 27 (1999) 979-83.
- Bhattacharyya, N. and Banerjee, S.: A novel role of XRCC1 in the functions of a DNA polymerase beta variant. *Biochemistry* 40 (2001) 9005-13.
- Bielas, J.H. and Loeb, L.A.: Mutator phenotype in cancer: timing and perspectives. *Environ Mol Mutagen* 45 (2005) 206-13.
- Birincioglu, M., Jaruga, P., Chowdhury, G., Rodriguez, H., Dizdaroglu, M. and Gates, K.S.: DNA base damage by the antitumor agent 3-amino-1,2,4-benzotriazine 1,4-dioxide (tirapazamine). *J Am Chem Soc* 125 (2003) 11607-15.
- Blaisdell, J.O., Harrison, L. and Wallace, S.S.: Base excision repair processing of radiation-induced clustered DNA lesions. *Radiat Prot Dosimetry* 97 (2001) 25-31.
- Bogliolo, M., Cappelli, E., D'Ostualdo, A., Rossi, O., Barbieri, O., Kelley, M.R. and Frosina, G.: Effect of *S. cerevisiae* APN1 protein on mammalian DNA base excision repair. *Anticancer Res* 22 (2002) 2797-804.
- Bohr, V.A., Smith, C.A., Okumoto, D.S. and Hanawalt, P.C.: DNA repair in an active gene: removal of pyrimidine dimers from the DHFR gene of CHO cells is much more efficient than in the genome overall. *Cell* 40 (1985) 359-69.
- Boiteux, S., Gajewski, E., Laval, J. and Dizdaroglu, M.: Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry* 31 (1992) 106-10.
- Boiteux, S. and Guillet, M.: Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* 3 (2004) 1-12.
- Boiteux, S., O'Connor, T.R., Lederer, F., Gouyette, A. and Laval, J.: Homogeneous *Escherichia coli* FPG protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/aprimidinic sites. *J Biol Chem* 265 (1990) 3916-22.
- Boiteux, S. and Radicella, J.P.: Réparation de l'ADN et cancer: Les gènes de réparation des bases oxydées dans l'ADN sont-ils des gènes suppresseurs de tumeurs? *Médecines/sciences* 14 (1998) 310-313.
- Boiteux, S. and Radicella, J.P.: Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie* 81 (1999) 59-67.
- Borden, A., O'Grady, P.I., Vandewiele, D., Fernandez de Henestrosa, A.R., Lawrence, C.W. and Woodgate, R.: *Escherichia coli* DNA polymerase III can replicate efficiently past a T-T cis-syn cyclobutane dimer if DNA polymerase V and the 3' to 5' exonuclease proofreading function encoded by *dnaQ* are inactivated. *J Bacteriol* 184 (2002) 2674-81.
- Botchway, S.W., Stevens, D.L., Hill, M.A., Jenner, T.J. and O'Neill, P.: Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in Chinese hamster V79-4 cells irradiated with characteristic aluminum K and copper L ultrasoft X rays. *Radiat Res* 148 (1997) 317-24.
- Bradley, M.O. and Erickson, L.C.: Comparison of the effects of hydrogen peroxide and x-ray irradiation on toxicity, mutation, and DNA damage/repair in mammalian cells (V-79). *Biochim Biophys Acta* 654 (1981) 135-41.
- Branum, M.E., Reardon, J.T. and Sancar, A.: DNA repair excision nuclease attacks undamaged DNA. A potential source of spontaneous mutations. *J Biol Chem* 276 (2001) 25421-6.

- Brena-Valle, M. and Serment-Guerrero, J.: SOS induction by gamma-radiation in *Escherichia coli* strains defective in repair and/or recombination mechanisms. *Mutagenesis* 13 (1998) 637-41.
- Brown, J.M.: SR 4233 (tirapazamine): a new anticancer drug exploiting hypoxia in solid tumours. *Br J Cancer* 67 (1993) 1163-70.
- Brown, J.M. and Wilson, W.R.: Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer* 4 (2004) 437-47.
- Budiyanto, A., Ueda, M., Ueda, T. and Ichihashi, M.: Formation of cyclobutane pyrimidine dimers and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in mouse and organ-cultured human skin by irradiation with broadband or with narrowband UVB. *Photochem Photobiol* 76 (2002) 397-400.
- Buermeyer, A.B., Deschenes, S.M., Baker, S.M. and Liskay, R.M.: Mammalian DNA mismatch repair. *Annu Rev Genet* 33 (1999) 533-64.
- Bundesamt, S.: Todesursachen in Deutschland. Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2004, pp. 61.
- Burney, S., Caulfield, J.L., Niles, J.C., Wishnok, J.S. and Tannenbaum, S.R.: The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxyxynitrite. *Mutat Res* 424 (1999) 37-49.
- Cadet, J., Bourdat, A.G., D'Ham, C., Duarte, V., Gasparutto, D., Romieu, A. and Ravanat, J.L.: Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. *Mutat Res* 462 (2000) 121-8.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D. and Ravanat, J.L.: Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res* 531 (2003) 5-23.
- Caldecott, K.W.: Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. *Bioessays* 23 (2001) 447-55.
- Caldecott, K.W.: Protein-protein interactions during mammalian DNA single-strand break repair. *Biochem Soc Trans* 31 (2003) 247-51.
- Chadwick, K.H. and Leenhouts, H.P.: DNA damage and chromosome aberrations. In: Burns, F.J., Upton, A.C. and Silini, G. (Eds.), *Radiation carcinogenesis and DNA alterations*. NATO ASI Series, 1986, pp. 245-264.
- Chan, H.W.-S.: *Autoxidation of Unsaturated Lipids (Food, Science and Technology : a Series of Monographs)*. Academic Press Inc., London, 1987.
- Chan, J.Y. and Kwong, M.: Impaired expression of glutathione synthetic enzyme genes in mice with targeted deletion of the Nrf2 basic-leucine zipper protein. *Biochim Biophys Acta* 1517 (2000) 19-26.
- Chen, K.H., Yakes, F.M., Srivastava, D.K., Singhal, R.K., Sobol, R.W., Horton, J.K., Van Houten, B. and Wilson, S.H.: Up-regulation of base excision repair correlates with enhanced protection against a DNA damaging agent in mouse cell lines. *Nucleic Acids Res* 26 (1998) 2001-7.
- Chevillard, S., Radicella, J.P., Levalois, C., Lebeau, J., Poupon, M.F., Oudard, S., Dutrillaux, B. and Boiteux, S.: Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours. *Oncogene* 16 (1998) 3083-6.
- Chou, K.C. and Howe, W.J.: Prediction of the tertiary structure of the beta-secretase zymogen. *Biochem Biophys Res Commun* 292 (2002) 702-8.
- Chou, K.M. and Cheng, Y.C.: An exonucleolytic activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease on 3' mispaired DNA. *Nature* 415 (2002) 655-9.

- Churchill, M.E., Peak, J.G. and Peak, M.J.: Repair of near-visible- and blue-light-induced DNA single-strand breaks by the CHO cell lines AA8 and EM9. *Photochem Photobiol* 54 (1991) 639-44.
- Cline, S.D. and Hanawalt, P.C.: Who's on first in the cellular response to DNA damage? *Nat Rev Mol Cell Biol* 4 (2003) 361-72.
- Collins, A.R.: Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* 21 (1999) 238-46.
- Cooper, P.K., Nospikel, T., Clarkson, S.G. and Leadon, S.A.: Defective transcription-coupled repair of oxidative base damage in Cockayne syndrome patients from XP group G. *Science* 275 (1997) 990-3.
- Cunningham, R.P.: DNA glycosylases. *Mutat Res* 383 (1997) 189-96.
- D'Ham, C., Romieu, A., Jaquinod, M., Gasparutto, D. and Cadet, J.: Excision of 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine, 5,6-dihydrothymine, and 5-hydroxycytosine from defined sequence oligonucleotides by *Escherichia coli* endonuclease III and Fpg proteins: kinetic and mechanistic aspects. *Biochemistry* 38 (1999) 3335-44.
- Darwin, C.: *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life.*, John Murray, Albemarle Street. JOHN MURRAY, ALBEMARLE STREET, London, 1859.
- Davies, K.J.: Protein damage and degradation by oxygen radicals. *J Biol Chem* 262 (1987) 9895-9920.
- de Laat, W.L., Jaspers, N.G. and Hoeijmakers, J.H.: Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* 13 (1999) 768-85.
- de Murcia, G. and Menissier de Murcia, J.: Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci* 19 (1994) 172-6.
- Demple, B.: Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annu Rev Genet* 25 (1991) 315-37.
- Demple, B. and Harrison, L.: Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem* 63 (1994) 915-48.
- Demple, B., Herman, T. and Chen, D.S.: Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 11450-4.
- Demple, B., Johnson, A. and Fung, D.: Exonuclease III and endonuclease IV remove 3' blocks from DNA synthesis primers in H₂O₂-damaged *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (1986) 7731-5.
- Demple, B. and Linn, S.: DNA N-glycosylases and UV repair. *Nature* 287 (1980) 203-8.
- Demple, B. and Sung, J.S.: Molecular and biological roles of Ape1 protein in mammalian base excision repair. *DNA Repair (Amst)* 4 (2005) 1442-9.
- Dhenaut, A., Boiteux, S. and Radicella, J.P.: Characterization of the hOGG1 promoter and its expression during the cell cycle. *Mutat Res* 461 (2000) 109-18.
- Dianova, II, Bohr, V.A. and Dianov, G.L.: Interaction of human AP endonuclease 1 with flap endonuclease 1 and proliferating cell nuclear antigen involved in long-patch base excision repair. *Biochemistry* 40 (2001) 12639-44.
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D. and Kensler, T.W.: The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chem Res Toxicol* 18 (2005) 1779-91.
- Diplock, A.T.: *Involvement of free radicals in carcinogenesis and modulation by antioxidants.* Wiley VCH Verlag, 2000.
- Dix, T.A. and Aikens, J.: Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation initiation. *Chem Res Toxicol* 6 (1993) 2-18.

- Dizdaroglu, M.: Measurement of radiation-induced damage to DNA at the molecular level. *Int J Radiat Biol* 61 (1992a) 175-83.
- Dizdaroglu, M.: Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res* 275 (1992b) 331-42.
- Dizdaroglu, M.: Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutat Res* 591 (2005) 45-59.
- Dizdaroglu, M., Laval, J. and Boiteux, S.: Substrate specificity of the Escherichia coli endonuclease III: excision of thymine- and cytosine-derived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals. *Biochemistry* 32 (1993) 12105-11.
- Doehmer, J., Dogra, S., Friedberg, T., Monier, S., Adesnik, M., Glatt, H. and Oesch, F.: Stable expression of rat cytochrome P-450IIB1 cDNA in Chinese hamster cells (V79) and metabolic activation of aflatoxin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1988) 5769-73.
- Duncan, T., Trewick, S.C., Koivisto, P., Bates, P.A., Lindahl, T. and Sedgwick, B.: Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 16660-5.
- Emmert, S., Slor, H., Busch, D.B., Batko, S., Albert, R.B., Coleman, D., Khan, S.G., Abu-Libdeh, B., DiGiovanna, J.J., Cunningham, B.B., Lee, M.M., Crollick, J., Inui, H., Ueda, T., Hedayati, M., Grossman, L., Shahlavi, T., Cleaver, J.E. and Kraemer, K.H.: Relationship of neurologic degeneration to genotype in three xeroderma pigmentosum group G patients. *J Invest Dermatol* 118 (2002) 972-82.
- Epe, B.: Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem Biol Interact* 80 (1991) 239-60.
- Epe, B.: DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 127 (1996) 223-49.
- Epe, B.: Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice? *Biol Chem* 383 (2002) 467-75.
- Epe, B.: Wie wichtig sind oxidative DNA-Schäden bei der Krebsentstehung?, *BIOforum*, 2003, pp. 218-219.
- Epe, B., Ballmaier, D., Roussyn, I., Briviba, K. and Sies, H.: DNA damage by peroxynitrite characterized with DNA repair enzymes. *Nucleic Acids Res* 24 (1996) 4105-10.
- Epe, B., Haring, M., Ramaiah, D., Stopper, H., Abou-Elzahab, M.M., Adam, W. and Saha-Moller, C.R.: DNA damage induced by furocoumarin hydroperoxides plus UV (360 nm). *Carcinogenesis* 14 (1993a) 2271-6.
- Epe, B. and Hegler, J.: Oxidative DNA damage: endonuclease fingerprinting. *Methods Enzymol* 234 (1994) 122-31.
- Epe, B., Mutzel, P. and Adam, W.: DNA damage by oxygen radicals and excited state species: a comparative study using enzymatic probes in vitro. *Chem Biol Interact* 67 (1988) 149-65.
- Epe, B., Pflaum, M. and Boiteux, S.: DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems. *Mutat Res* 299 (1993b) 135-45.
- Epe, B., Pflaum, M., Haring, M., Hegler, J. and Rudiger, H.: Use of repair endonucleases to characterize DNA damage induced by reactive oxygen species in cellular and cell-free systems. *Toxicol Lett* 67 (1993c) 57-72.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H. and Jurgens, G.: The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 13 (1992) 341-90.
- Flohr, C.: Untersuchungen zur Beeinflussung der Reparatur oxidativer DNA-Schäden durch Poly(ADP-Ribose)-Polymerase, AP-Endonuklease 1 und das

- Xeroderma pigmentosum A Protein, *Pharmakologie*. Johannes Gutenberg, Mainz, 2003.
- Flohr, C., Burkle, A., Radicella, J.P. and Epe, B.: Poly(ADP-ribosyl)ation accelerates DNA repair in a pathway dependent on Cockayne syndrome B protein. *Nucleic Acids Res* 31 (2003) 5332-7.
- Floyd, R.A.: The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11 (1990) 1447-50.
- Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., Sobol, R.W., Wilson, S.H. and Dogliotti, E.: Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry* 37 (1998) 3575-80.
- Fridovich, I.: Biological effects of the superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* 247 (1986) 1-11.
- Fridovich, I.: Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64 (1995) 97-112.
- Friedberg, E.C.: Relationships between DNA repair and transcription. *Annu Rev Biochem* 65 (1996) 15-42.
- Friedberg, E.C.: How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* 1 (2001) 22-33.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C. and Siede, W.: *DNA Repair and Mutagenesis*. ASM Press, 1995a.
- Friedberg, E.C., Walker, G.C. and Siede, W.: *DNA Repair and Mutagenesis: Ionizing Radiation*. ASM Press, 1995b.
- Frosina, G.: Prophylaxis of oxidative DNA damage by formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *Int J Cancer* 119 (2006) 1-7.
- Gary, R., Kim, K., Cornelius, H.L., Park, M.S. and Matsumoto, Y.: Proliferating cell nuclear antigen facilitates excision in long-patch base excision repair. *J Biol Chem* 274 (1999) 4354-63.
- Gentil, A., Le Page, F., Cadet, J. and Sarasin, A.: Mutation spectra induced by replication of two vicinal oxidative DNA lesions in mammalian cells. *Mutat Res* 452 (2000) 51-6.
- Gentil, A., Le Page, F., Margot, A., Lawrence, C.W., Borden, A. and Sarasin, A.: Mutagenicity of a unique thymine-thymine dimer or thymine-thymine pyrimidine pyrimidone (6-4) photoproduct in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 24 (1996) 1837-40.
- Georgakilas, A.G., Bennett, P.V., Wilson, D.M., 3rd and Sutherland, B.M.: Processing of bistranded abasic DNA clusters in gamma-irradiated human hematopoietic cells. *Nucleic Acids Res* 32 (2004) 5609-20.
- Giorgio, M., Migliaccio, E., Orsini, F., Paolucci, D., Moroni, M., Contursi, C., Pelliccia, G., Luzi, L., Minucci, S., Marcaccio, M., Pinton, P., Rizzuto, R., Bernardi, P., Paolucci, F. and Pelicci, P.G.: Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell* 122 (2005) 221-33.
- Girard, P.M. and Boiteux, S.: Repair of oxidized DNA bases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimie* 79 (1997) 559-66.
- Glatt, H., Gemperlein, I., Setiabudi, F., Platt, K.L. and Oesch, F.: Expression of xenobiotic-metabolizing enzymes in propagatable cell cultures and induction of micronuclei by 13 compounds. *Mutagenesis* 5 (1990) 241-9.
- Graves, R.J., Felzenszwalb, I., Laval, J. and O'Connor, T.R.: Excision of 5'-terminal deoxyribose phosphate from damaged DNA is catalyzed by the Fpg protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 267 (1992) 14429-35.

- Graziewicz, M.A., Day, B.J. and Copeland, W.C.: The mitochondrial DNA polymerase as a target of oxidative damage. *Nucleic Acids Res* 30 (2002) 2817-24.
- Griffith, O.W.: Glutathione and glutathione disulphide, In *Methods of enzymatic analysis*. E. Bernt, Bergmeyer, H.U., ed. (Weinheim: VCH-Verlagsgesellschaft) (1985) 522-529.
- Griffith, O.W. and Meister, A.: Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem* 254 (1979) 7558-60.
- Gros, L., Saparbaev, M.K. and Laval, J.: Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. *Oncogene* 21 (2002) 8905-25.
- Gulston, M., de Lara, C., Jenner, T., Davis, E. and O'Neill, P.: Processing of clustered DNA damage generates additional double-strand breaks in mammalian cells post-irradiation. *Nucleic Acids Res* 32 (2004) 1602-9.
- Gutteridge, J.M.: Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 91 (1994) 133-40.
- Halliwell, B.: Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 344 (1994) 721-4.
- Halliwell, B.: Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathol Biol (Paris)* 44 (1996) 6-13.
- Halliwell, B.: Vitamin C and genomic stability. *Mutat Res* 475 (2001) 29-35.
- Halliwell, B. and Aruoma, O.I.: DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281 (1991) 9-19.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.: Role of iron in oxygen radical reactions. *Methods Enzymol* 105 (1984) 47-56.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.: The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280 (1990) 1-8.
- Hanawalt, P.C.: Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* 21 (2002) 8949-56.
- Hempel, C.G. and Oppenheim, P.: Studies in the Logic of Explanation. *Philosophy of Science* 15 (1948) 135-75.
- Hermersdorfer, H., Ozierenski, B., Schmalix, W.A., Doehmer, J. and Glatt, H.R.: Cell culture system for the controlled intracellular generation of reactive oxygen species. *Toxicology in Vitro* 11 (1997) 569-572.
- Hill, J.W., Hazra, T.K., Izumi, T. and Mitra, S.: Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair. *Nucleic Acids Res* 29 (2001) 430-8.
- Hollenbach, S., Dhenaut, A., Eckert, I., Radicella, J.P. and Epe, B.: Overexpression of Ogg1 in mammalian cells: effects on induced and spontaneous oxidative DNA damage and mutagenesis. *Carcinogenesis* 20 (1999) 1863-8.
- Hollstein, M., Shomer, B., Greenblatt, M., Soussi, T., Hovig, E., Montesano, R. and Harris, C.C.: Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. *Nucleic Acids Res* 24 (1996) 141-6.
- Hsie, A.W., Brimer, P.A., Mitchell, T.J. and Gosslee, D.G.: The dose-response relationship for ethyl methanesulfonate-induced mutations at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus in Chinese hamster ovary cells. *Somatic Cell Genet* 1 (1975) 247-61.
- Huang, J.C., Hsu, D.S., Kazantsev, A. and Sancar, A.: Substrate spectrum of human excinuclease: repair of abasic sites, methylated bases, mismatches, and bulky adducts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 12213-7.

- Huttermann, J.: Solid-state radiation chemistry of DNA and its constituents. *Ultramicroscopy* 10 (1982) 25-40.
- Ide, H.: DNA substrates containing defined oxidative base lesions and their application to study substrate specificities of base excision repair enzymes. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68 (2001) 207-21.
- Jacobs, A., Bopp, A. and Hagen, U.: In vitro repair of single-strand breaks in - irradiated DNA by polynucleotide ligase. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 22 (1972) 431-5.
- Jaiswal, A.K.: Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* 36 (2004) 1199-207.
- Janicijevic, A., Sugasawa, K., Shimizu, Y., Hanaoka, F., Wijgers, N., Djurica, M., Hoeijmakers, J.H. and Wyman, C.: DNA bending by the human damage recognition complex XPC-HR23B. *DNA Repair (Amst)* 2 (2003) 325-36.
- Jilani, A., Ramotar, D., Slack, C., Ong, C., Yang, X.M., Scherer, S.W. and Lasko, D.D.: Molecular cloning of the human gene, PNKP, encoding a polynucleotide kinase 3'-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage. *J Biol Chem* 274 (1999) 24176-86.
- Jin, Z. and El-Deiry, W.S.: Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 4 (2005) 139-63.
- Joenje, H.: Genetic toxicology of oxygen. *Mutat Res* 219 (1989) 193-208.
- Jun, S.H., Kim, T.G. and Ban, C.: DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles. *Febs J* 273 (2006) 1609-19.
- Jurado, J., Saparbaev, M., Matray, T.J., Greenberg, M.M. and Laval, J.: The ring fragmentation product of thymidine C5-hydrate when present in DNA is repaired by the Escherichia coli Fpg and Nth proteins. *Biochemistry* 37 (1998) 7757-63.
- Kaina, B.: DNA-Reparatur, induzierbare zelluläre Schutzmechanismen und Salutogenese. Bartsch, H.H. Bengel, J., Basel, 1997.
- Kalam, M.A., Haraguchi, K., Chandani, S., Loechler, E.L., Moriya, M., Greenberg, M.M. and Basu, A.K.: Genetic effects of oxidative DNA damages: comparative mutagenesis of the imidazole ring-opened formamidopyrimidines (Fapy lesions) and 8-oxo-purines in simian kidney cells. *Nucleic Acids Res* 34 (2006) 2305-15.
- Kanofsky, J.R.: Singlet oxygen production by biological systems. *Chem Biol Interact* 70 (1989) 1-28.
- Karimi-Busheri, F., Daly, G., Robins, P., Canas, B., Pappin, D.J., Sgouros, J., Miller, G.G., Fakhrai, H., Davis, E.M., Le Beau, M.M. and Weinfeld, M.: Molecular characterization of a human DNA kinase. *J Biol Chem* 274 (1999) 24187-94.
- Kasai, H., Chung, M.H., Yamamoto, F., Ohtsuka, E., Laval, J., Grollman, A.P. and Nishimura, S.: Formation, inhibition of formation, and repair of oxidative 8-hydroxyguanine DNA damage. *Basic Life Sci* 61 (1993) 257-62.
- Kiefer, J.: Biologische Strahlenwirkung: eine Einführung in die Grundlagen von Strahlenschutz und Strahlenanwendung, 2 ed. Birkhäuser, Basel 1989.
- Kim, H.N., Morimoto, Y., Tsuda, T., Ootsuyama, Y., Hirohashi, M., Hirano, T., Tanaka, I., Lim, Y., Yun, I.G. and Kasai, H.: Changes in DNA 8-hydroxyguanine levels, 8-hydroxyguanine repair activity, and hOGG1 and hMTH1 mRNA expression in human lung alveolar epithelial cells induced by crocidolite asbestos. *Carcinogenesis* 22 (2001) 265-9.

- Kim, H.S., Park, Y.W., Kasai, H., Nishimura, S., Park, C.W., Choi, K.H. and Chung, M.H.: Induction of *E. coli* oh8Gua endonuclease by oxidative stress: its significance in aerobic life. *Mutat Res* 363 (1996) 115-23.
- Kim, J. and Linn, S.: The mechanisms of action of *E. coli* endonuclease III and T4 UV endonuclease (endonuclease V) at AP sites. *Nucleic Acids Res* 16 (1988) 1135-41.
- 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 et al.: Repair and replication of plasmids with site-specific 8-oxodG and 8-AAFdG residues in normal and repair-deficient human cells. *Nucleic Acids Res* 20 (1992) 4437-43.
- Klinedinst, D.K. and Drinkwater, N.R.: Mutagenesis by apurinic sites in normal and ataxia telangiectasia human lymphoblastoid cells. *Mol Carcinog* 6 (1992) 32-42.
- Klotz, L.O., Kroncke, K.D. and Sies, H.: Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. *Photochem Photobiol Sci* 2 (2003) 88-94.
- Klungland, A. and Lindahl, T.: Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *Embo J* 16 (1997) 3341-8.
- Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T. and Barnes, D.E.: Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 13300-5.
- Kohn, K.W., Erickson, L.C., Ewig, R.A. and Friedman, C.A.: Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry* 15 (1976) 4629-37.
- Kotandeniya, D., Ganley, B. and Gates, K.S.: Oxidative DNA base damage by the antitumor agent 3-amino-1,2,4-benzotriazine 1,4-dioxide (tirapazamine). *Bioorg Med Chem Lett* 12 (2002) 2325-9.
- Kovalsky, O.I., Grossman, L. and Ahn, B.: The topodynamics of incision of UV-irradiated covalently closed DNA by the *Escherichia coli* Uvr(A)BC endonuclease. *J Biol Chem* 271 (1996) 33236-41.
- Krokan, H.E., Nilsen, H., Skorpen, F., Otterlei, M. and Slupphaug, G.: Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett* 476 (2000) 73-7.
- Krokan, H.E., Standal, R. and Slupphaug, G.: DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J* 325 (Pt 1) (1997) 1-16.
- Kuipers, G.K., Poldervaart, H.A., Slotman, B.J. and Lafleur, M.V.: The influence of formamidopyrimidine-DNA glycosylase on the spontaneous and gamma-radiation-induced mutation spectrum of the lacZ alpha gene. *Mutat Res* 435 (1999) 141-50.
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (1970) 680-5.
- Laine, J.P. and Egly, J.M.: Initiation of DNA repair mediated by a stalled RNA polymerase IIO. *Embo J* 25 (2006a) 387-97.
- Laine, J.P. and Egly, J.M.: When transcription and repair meet: a complex system. *Trends Genet* 22 (2006b) 430-6.
- Laval, J.: Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. *Pathol Biol (Paris)* 44 (1996) 14-24.
- Lawrence, C.W., Borden, A., Banerjee, S.K. and LeClerc, J.E.: Mutation frequency and spectrum resulting from a single abasic site in a single-stranded vector. *Nucleic Acids Res* 18 (1990) 2153-7.

- Le Page, F., Randrianarison, V., Marot, D., Cabannes, J., Perricaudet, M., Feunteun, J. and Sarasin, A.: BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells. *Cancer Res* 60 (2000) 5548-52.
- Le Page, F., Schreiber, V., Dherin, C., De Murcia, G. and Boiteux, S.: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) is required in murine cell lines for base excision repair of oxidative DNA damage in the absence of DNA polymerase beta. *J Biol Chem* 278 (2003) 18471-7.
- Le, X.C., Xing, J.Z., Lee, J., Leadon, S.A. and Weinfeld, M.: Inducible repair of thymine glycol detected by an ultrasensitive assay for DNA damage. *Science* 280 (1998) 1066-9.
- Leatherbarrow, E.L., Harper, J.V., Cucinotta, F.A. and O'Neill, P.: Induction and quantification of gamma-H2AX foci following low and high LET-irradiation. *Int J Radiat Biol* 82 (2006) 111-8.
- Lee, H.S., Lee, Y.S., Kim, H.S., Choi, J.Y., Hassan, H.M. and Chung, M.H.: Mechanism of regulation of 8-hydroxyguanine endonuclease by oxidative stress: roles of FNR, ArcA, and Fur. *Free Radic Biol Med* 24 (1998) 1193-201.
- Lee, M.R., Kim, S.H., Cho, H.J., Lee, K.Y., Moon, A.R., Jeong, H.G., Lee, J.S., Hyun, J.W., Chung, M.H. and You, H.J.: Transcription factors NF-YA regulate the induction of human OGG1 following DNA-alkylating agent methylmethane sulfonate (MMS) treatment. *J Biol Chem* 279 (2004) 9857-66.
- Levin, J.D., Johnson, A.W. and Demple, B.: Homogeneous Escherichia coli endonuclease IV. Characterization of an enzyme that recognizes oxidative damage in DNA. *J Biol Chem* 263 (1988) 8066-71.
- Levine, A.J.: p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88 (1997) 323-31.
- Lindahl, T.: Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362 (1993) 709-15.
- Lindahl, T., Karran, P. and Wood, R.D.: DNA excision repair pathways. *Curr Opin Genet Dev* 7 (1997) 158-69.
- Lindahl, T., Sedgwick, B., Sekiguchi, M. and Nakabeppu, Y.: Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents. *Annu Rev Biochem* 57 (1988) 133-57.
- Lindahl, T. and Wood, R.D.: Quality control by DNA repair. *Science* 286 (1999) 1897-905.
- Lippke, J.A., Gordon, L.K., Brash, D.E. and Haseltine, W.A.: Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78 (1981) 3388-92.
- Liu, R., Qiu, J., Finger, L.D., Zheng, L. and Shen, B.: The DNA-protein interaction modes of FEN-1 with gap substrates and their implication in preventing duplication mutations. *Nucleic Acids Res* 34 (2006) 1772-84.
- Liu, Y., Kao, H.I. and Bambara, R.A.: Flap endonuclease 1: a central component of DNA metabolism. *Annu Rev Biochem* 73 (2004) 589-615.
- Ljungquist, S.: A new endonuclease from Escherichia coli acting at apurinic sites in DNA. *J Biol Chem* 252 (1977) 2808-14.
- Lloyd, R.S., Haidle, C.W. and Robberson, D.L.: Bleomycin-specific fragmentation of double-stranded DNA. *Biochemistry* 17 (1978) 1890-6.
- Loeb, L.A.: A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 61 (2001) 3230-9.
- Loeb, L.A., Loeb, K.R. and Anderson, J.P.: Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 776-81.

- Loeb, L.A. and Preston, B.D.: Mutagenesis by apurinic/apyrimidinic sites. *Annu Rev Genet* 20 (1986) 201-30.
- Loft, S. and Poulsen, H.E.: Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med* 74 (1996) 297-312.
- Lomax, M.E., Cunniffe, S. and O'Neill, P.: 8-OxoG retards the activity of the ligase III/XRCC1 complex during the repair of a single-strand break, when present within a clustered DNA damage site. *DNA Repair (Amst)* 3 (2004) 289-99.
- Mahler, H.C.: Einfluss endogener und exogener Faktoren auf Bildung und Reparatur oxidativer DNA-Schäden., *Pharmakologie und Toxikologie*. Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz, 1999.
- Maly, F.E.a.S.-M.: How and why cells make superoxide: The „phagocytic“ NADPH oxidase. *NIPS* 10 (1995) 233-238.
- Markant, A., Rimbach, G., Krämer, K., Mayer, H. und Pallauf, J.: Reaktive Sauerstoffradikale: Entstehung, Wirkung, Eliminierung. *PZ* 140 (1995) 2313-2327.
- Marnett, L.J.: Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21 (2000) 361-70.
- Marti, T.M., Kunz, C. and Fleck, O.: DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J Cell Physiol* 191 (2002) 28-41.
- Martyn, K.D., Frederick, L.M., von Loehneysen, K., Dinauer, M.C. and Knaus, U.G.: Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases. *Cell Signal* 18 (2006) 69-82.
- Masuda, Y., Bennett, R.A. and Demple, B.: Dynamics of the interaction of human apurinic endonuclease (Ape1) with its substrate and product. *J Biol Chem* 273 (1998) 30352-9.
- Matsumoto, Y. and Kim, K.: Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science* 269 (1995) 699-702.
- McMillan, T.J., Tobi, S., Mateos, S. and Lemon, C.: The use of DNA double-strand break quantification in radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 49 (2001) 373-7.
- Memisoglu, A. and Samson, L.: Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat Res* 451 (2000) 39-51.
- Michaels, M.L., Cruz, C., Grollman, A.P. and Miller, J.H.: Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 7022-5.
- Miller, D.M., Buettner, G.R. and Aust, S.D.: Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med* 8 (1990) 95-108.
- Minowa, O., Ikeda, K., Sugitani, Y., Oshima, T., Nakai, S., Katori, Y., Suzuki, M., Furukawa, M., Kawase, T., Zheng, Y., Ogura, M., Asada, Y., Watanabe, K., Yamanaka, H., Gotoh, S., Nishi-Takeshima, M., Sugimoto, T., Kikuchi, T., Takasaka, T. and Noda, T.: Altered cochlear fibrocytes in a mouse model of DFN3 nonsyndromic deafness. *Science* 285 (1999) 1408-11.
- Minton, K., Durphy, M., Taylor, R. and Friedberg, E.C.: The ultraviolet endonuclease of bacteriophage T4. Further characterization. *J Biol Chem* 250 (1975) 2823-9.
- Mistry, P. and Herbert, K.E.: Modulation of hOGG1 DNA repair enzyme in human cultured cells in response to pro-oxidant and antioxidant challenge. *Free Radic Biol Med* 35 (2003) 397-405.
- Mitchell, D.L., Jen, J. and Cleaver, J.E.: Relative induction of cyclobutane dimers and cytosine photohydrates in DNA irradiated in vitro and in vivo with ultraviolet-C and ultraviolet-B light. *Photochem Photobiol* 54 (1991) 741-6.
- Modesti, M. and Kanaar, R.: DNA repair: spot(light)s on chromatin. *Curr Biol* 11 (2001) R229-32.

- Modrich, P.: Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science* 266 (1994) 1959-60.
- Mol, C.D., Hosfield, D.J. and Tainer, J.A.: Abasic site recognition by two apurinic/apyrimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3' ends justify the means. *Mutat Res* 460 (2000) 211-29.
- Moriya, M.: Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C-->T.A transversions in simian kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 1122-6.
- Muller, J. and Janz, S.: Modulation of the H₂O₂-induced SOS response in *Escherichia coli* PQ300 by amino acids, metal chelators, antioxidants, and scavengers of reactive oxygen species. *Environ Mol Mutagen* 22 (1993) 157-63.
- Mulligan, R.C. and Berg, P.: Expression of a bacterial gene in mammalian cells. *Science* 209 (1980) 1422-7.
- Murphy, M.P.: Nitric oxide and cell death. *Biochim Biophys Acta* 1411 (1999) 401-14.
- Murugesan, P., Muthusamy, T., Balasubramanian, K. and Arunakaran, J.: Studies on the protective role of vitamin C and E against polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254)--induced oxidative damage in Leydig cells. *Free Radic Res* 39 (2005) 1259-72.
- Nackerdien, Z., Rao, G., Cacciuttolo, M.A., Gajewski, E. and Dizdaroglu, M.: Chemical nature of DNA-protein cross-links produced in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of iron or copper ions. *Biochemistry* 30 (1991) 4873-9.
- Nakabeppu, Y., Sakumi, K., Sakamoto, K., Tsuchimoto, D., Tsuzuki, T. and Nakatsu, Y.: Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. *Biol Chem* 387 (2006) 373-9.
- Nakabeppu, Y., Tsuchimoto, D., Furuichi, M. and Sakumi, K.: The defense mechanisms in mammalian cells against oxidative damage in nucleic acids and their involvement in the suppression of mutagenesis and cell death. *Free Radic Res* 38 (2004) 423-9.
- Nakabeppu, Y., Yamashita, K. and Sekiguchi, M.: Purification and characterization of normal and mutant forms of T4 endonuclease V. *J Biol Chem* 257 (1982) 2556-62.
- Naqui, A., Chance, B. and Cadenas, E.: Reactive oxygen intermediates in biochemistry. *Annu Rev Biochem* 55 (1986) 137-66.
- Nash, H.M., Lu, R., Lane, W.S. and Verdine, G.L.: The critical active-site amine of the human 8-oxoguanine DNA glycosylase, hOgg1: direct identification, ablation and chemical reconstitution. *Chem Biol* 4 (1997) 693-702.
- Neto, J.B., Gentil, A., Cabral, R.E. and Sarasin, A.: Mutation spectrum of heat-induced abasic sites on a single-stranded shuttle vector replicated in mammalian cells. *J Biol Chem* 267 (1992) 19718-23.
- Neumann, H.G.: Entstehung und Behandlung von Tumoren. BI-Wiss.-Verlag, Mannheim, Leipzig, Wien, 1992.
- Nguyen, T., Sherratt, P.J. and Pickett, C.B.: Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43 (2003) 233-60.
- Nilsen, H. and Krokan, H.E.: Base excision repair in a network of defence and tolerance. *Carcinogenesis* 22 (2001) 987-98.
- O'Brien, P.J.: Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chem Biol Interact* 80 (1991) 1-41.

- O'Connor, T.R., Boiteux, S. and Laval, J.: Ring-opened 7-methylguanine residues in DNA are a block to in vitro DNA synthesis. *Nucleic Acids Res* 16 (1988) 5879-94.
- O'Connor, T.R., Graves, R.J., de Murcia, G., Castaing, B. and Laval, J.: Fpg protein of *Escherichia coli* is a zinc finger protein whose cysteine residues have a structural and/or functional role. *J Biol Chem* 268 (1993) 9063-70.
- O'Connor, T.R. and Laval, J.: Physical association of the 2,6-diamino-4-hydroxy-5N-formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli* and an activity nicking DNA at apurinic/apyrimidinic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 5222-6.
- O'Donnell, R.E., Boorstein, R.J., Cunningham, R.P. and Teebor, G.W.: Effect of pH and temperature on the stability of UV-induced repairable pyrimidine hydrates in DNA. *Biochemistry* 33 (1994) 9875-80.
- Offer, H., Milyavsky, M., Erez, N., Matas, D., Zurer, I., Harris, C.C. and Rotter, V.: Structural and functional involvement of p53 in BER in vitro and in vivo. *Oncogene* 20 (2001a) 581-9.
- Offer, H., Zurer, I., Banfalvi, G., Reha'k, M., Falcovitz, A., Milyavsky, M., Goldfinger, N. and Rotter, V.: p53 modulates base excision repair activity in a cell cycle-specific manner after genotoxic stress. *Cancer Res* 61 (2001b) 88-96.
- Osterod, M.: Einfluss genetischer Defekte auf die Reparatur oxidativer DNA-Schäden in Säugerzellen, *Pharmakologie. Johannes Gutenberg, Mainz, 2002.*
- Otterlei, M., Warbrick, E., Nagelhus, T.A., Haug, T., Slupphaug, G., Akbari, M., Aas, P.A., Steinsbekk, K., Bakke, O. and Krokan, H.E.: Post-replicative base excision repair in replication foci. *Embo J* 18 (1999) 3834-44.
- Pegg, A.E.: Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res* 462 (2000) 83-100.
- Peltomaki, P.: Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 21 (2003) 1174-9.
- Petermann, E., Keil, C. and Oei, S.L.: Roles of DNA ligase III and XRCC1 in regulating the switch between short patch and long patch BER. *DNA Repair (Amst)* 5 (2006) 544-55.
- Peters, K.B., Wang, H., Brown, J.M. and Iliakis, G.: Inhibition of DNA replication by tirapazamine. *Cancer Res* 61 (2001) 5425-31.
- Pflaum, M.: Oxidative DNA-Modifikationen durch langwelliges UV-Licht und sichtbares Licht., *Pharmakologie und Toxikologie. Universität Würzburg, Würzburg, 1996.*
- Pflaum, M., Will, O. and Epe, B.: Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis* 18 (1997) 2225-31.
- Pfuhler, S. and Wolf, H.U.: Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. *Environ Mol Mutagen* 27 (1996) 196-201.
- Podlutzky, A.J., Dianova, I., Wilson, S.H., Bohr, V.A. and Dianov, G.L.: DNA synthesis and dRPase activities of polymerase beta are both essential for single-nucleotide patch base excision repair in mammalian cell extracts. *Biochemistry* 40 (2001) 809-13.
- Popoff, S.C., Spira, A.I., Johnson, A.W. and Demple, B.: Yeast structural gene (APN1) for the major apurinic endonuclease: homology to *Escherichia coli* endonuclease IV. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 4193-7.
- Prasad, R., Beard, W.A., Chyan, J.Y., Maciejewski, M.W., Mullen, G.P. and Wilson, S.H.: Functional analysis of the amino-terminal 8-kDa domain of DNA

- polymerase beta as revealed by site-directed mutagenesis. DNA binding and 5'-deoxyribose phosphate lyase activities. *J Biol Chem* 273 (1998) 11121-6.
- Prasad, R., Dianov, G.L., Bohr, V.A. and Wilson, S.H.: FEN1 stimulation of DNA polymerase beta mediates an excision step in mammalian long patch base excision repair. *J Biol Chem* 275 (2000) 4460-6.
- Pryor, W.A.: Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol* 48 (1986) 657-67.
- Ramana, C.V., Boldogh, I., Izumi, T. and Mitra, S.: Activation of apurinic/aprimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 5061-6.
- Ramotar, D., Kim, C., Lillis, R. and Demple, B.: Intracellular localization of the Apn1 DNA repair enzyme of *Saccharomyces cerevisiae*. Nuclear transport signals and biological role. *J Biol Chem* 268 (1993) 20533-9.
- Ramotar, D., Popoff, S.C. and Demple, B.: Complementation of DNA repair-deficient *Escherichia coli* by the yeast Apn1 apurinic/aprimidinic endonuclease gene. *Mol Microbiol* 5 (1991) 149-55.
- Rheinwald, J.G. and Green, H.: Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6 (1975) 331-43.
- Riede, U.-N., Wiestler, O.D. and Müller, H.J.: *Autonomes Tumorwachstum (Tumorpathologie)*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1995.
- Riley, P.A.: Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 65 (1994) 27-33.
- Ringvoll, J., Nordstrand, L.M., Vagbo, C.B., Talstad, V., Reite, K., Aas, P.A., Lauritzen, K.H., Liabakk, N.B., Bjork, A., Doughty, R.W., Falnes, P.O., Krokan, H.E. and Klungland, A.: Repair deficient mice reveal mABH2 as the primary oxidative demethylase for repairing 1meA and 3meC lesions in DNA. *Embo J* 25 (2006) 2189-98.
- Robson, C.N. and Hickson, I.D.: Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/aprimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in *E. coli* xth (exonuclease III) mutants. *Nucleic Acids Res* 19 (1991) 5519-23.
- Romagna, F.: Mikrokerntestsysteme. In *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*. R. Fahrig, ed. (Darmstadt, Wissenschaftliche Buchgesellschaft) (1993) 290-298.
- Ronen, A. and Glickman, B.W.: Human DNA repair genes. *Environ Mol Mutagen* 37 (2001) 241-83.
- Rothwell, D.G., Barzilay, G., Gorman, M., Morera, S., Freemont, P. and Hickson, I.D.: The structure and functions of the HAP1/Ref-1 protein. *Oncol Res* 9 (1997) 275-80.
- Rueff, J., Bras, A., Cristovao, L., Mexia, J., Sa da Costa, M. and Pires, V.: DNA strand breaks and chromosomal aberrations induced by H₂O₂ and ⁶⁰Co gamma-radiation. *Mutat Res* 289 (1993) 197-204.
- Runger, T.M., Epe, B. and Moller, K.: Repair of ultraviolet B and singlet oxygen-induced DNA damage in xeroderma pigmentosum cells. *J Invest Dermatol* 104 (1995) 68-73.
- Rusyn, I., Denissenko, M.F., Wong, V.A., Butterworth, B.E., Cunningham, M.L., Upton, P.B., Thurman, R.G. and Swenberg, J.A.: Expression of base excision repair enzymes in rat and mouse liver is induced by peroxisome proliferators

- and is dependent upon carcinogenic potency. *Carcinogenesis* 21 (2000) 2141-5.
- Salditt, M., Braunstein, S.N., Camerini-Otero, R.D. and Franklin, R.M.: Structure and synthesis of a lipid-containing bacteriophage. X. Improved techniques for the purification of bacteriophage PM2. *Virology* 48 (1972) 259-62.
- Salmelin, C. and Vilpo, J.: Induction of SOS response, cellular efflux and oxidative stress response genes by chlorambucil in DNA repair-deficient *Escherichia coli* cells (ada, ogt and mutS). *Mutat Res* 522 (2003) 33-44.
- Sancar, A.: DNA excision repair. *Annu Rev Biochem* 65 (1996) 43-81.
- Sancar, A. and Rupp, W.D.: A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region. *Cell* 33 (1983) 249-60.
- Saran, M. and Bors, W.: Oxygen radicals acting as chemical messengers: a hypothesis. *Free Radic Res Commun* 7 (1989) 213-20.
- Sattler, U., Frit, P., Salles, B. and Calsou, P.: Long-patch DNA repair synthesis during base excision repair in mammalian cells. *EMBO Rep* 4 (2003) 363-7.
- Scharer, O.D. and Jiricny, J.: Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *Bioessays* 23 (2001) 270-81.
- Schenkman, J.B. and Jansson, I.: The many roles of cytochrome b5. *Pharmacol Ther* 97 (2003) 139-52.
- Schieberle, P. and Grosch, W.Z.: Decomposition of linoleic acid hydroperoxides. *Lebensm. Unters. Forsch.* 173 (1981) 192-198.
- Schmalix, W.A., Lang, D., Schneider, A., Bocker, R., Greim, H. and Doehmer, J.: Stable expression and coexpression of human cytochrome P450 oxidoreductase and cytochrome P450 1A2 in V79 Chinese hamster cells: sensitivity to quinones and biotransformation of 7-alkoxyresorufins and triazines. *Drug Metab Dispos* 24 (1996) 1314-9.
- Schulze-Osthoff, K., Bauer, M.K., Vogt, M. and Wesselborg, S.: Oxidative stress and signal transduction. *Int J Vitam Nutr Res* 67 (1997) 336-42.
- Sedgwick, B., Robins, P. and Lindahl, T.: Direct removal of alkylation damage from DNA by AlkB and related DNA dioxygenases. *Methods Enzymol* 408 (2006) 108-20.
- Sekiguchi, M. and Tsuzuki, T.: Oxidative nucleotide damage: consequences and prevention. *Oncogene* 21 (2002) 8895-904.
- Seo, Y.R., Fishel, M.L., Amundson, S., Kelley, M.R. and Smith, M.L.: Implication of p53 in base excision DNA repair: in vivo evidence. *Oncogene* 21 (2002) 731-7.
- Shibutani, S., Takeshita, M. and Grollman, A.P.: Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349 (1991) 431-4.
- Shikazono, N., Pearson, C., O'Neill, P. and Thacker, J.: The roles of specific glycosylases in determining the mutagenic consequences of clustered DNA base damage. *Nucleic Acids Res* 34 (2006) 3730-8.
- Shinmura, K., Kohno, T., Kasai, H., Koda, K., Sugimura, H. and Yokota, J.: Infrequent mutations of the hOGG1 gene, that is involved in the excision of 8-hydroxyguanine in damaged DNA, in human gastric cancer. *Jpn J Cancer Res* 89 (1998) 825-8.
- Sies, H.: *Biochemie des oxidativen Stress*. *Angew. Chem.* 98 (1986) 1061-1075.
- Sies, H.: [Biochemistry of thiol groups: the role of glutathione]. *Naturwissenschaften* 76 (1989) 57-64.
- Sies, H.: *Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants*. Academic Press Inc., London, 1991.

- Sies, H.: Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215 (1993) 213-9.
- Siim, B.G., Pruijn, F.B., Sturman, J.R., Hogg, A., Hay, M.P., Brown, J.M. and Wilson, W.R.: Selective potentiation of the hypoxic cytotoxicity of tirapazamine by its 1-N-oxide metabolite SR 4317. *Cancer Res* 64 (2004) 736-42.
- Sinha, R.P. and Hader, D.P.: UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci* 1 (2002) 225-36.
- Smart, D.J., Chipman, J.K. and Hodges, N.J.: Activity of OGG1 variants in the repair of pro-oxidant-induced 8-oxo-2'-deoxyguanosine. *DNA Repair (Amst)* (2006).
- Southorn, P.A. and Powis, G.: Free radicals in medicine. *Mayo Clin Proc* 63 (1988a) 381-408.
- Southorn, P.A. and Powis, G.: Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biologic reactions. *Mayo Clin Proc* 63 (1988b) 381-9.
- Speit, G., Trenz, K., Schutz, P., Rothfuss, A. and Merk, O.: The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay. *Toxicol Lett* 110 (1999) 73-8.
- Stanulis-Praeger, B.M. and Gilchrest, B.A.: Effect of donor age and prior sun exposure on growth inhibition of cultured human dermal fibroblasts by all trans-retinoic acid. *J Cell Physiol* 139 (1989) 116-24.
- Stucki, M., Pascucci, B., Parlanti, E., Fortini, P., Wilson, S.H., Hubscher, U. and Dogliotti, E.: Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene* 17 (1998) 835-43.
- Sukhanova, M.V., Khodyreva, S.N. and Lavrik, O.I.: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibits strand-displacement synthesis of DNA catalyzed by DNA polymerase beta. *Biochemistry (Mosc)* 69 (2004) 558-68.
- Sunaga, N., Kohno, T., Shinmura, K., Saitoh, T., Matsuda, T., Saito, R. and Yokota, J.: OGG1 protein suppresses G:C-->T:A mutation in a shuttle vector containing 8-hydroxyguanine in human cells. *Carcinogenesis* 22 (2001) 1355-62.
- Sutherland, B.M., Bennett, P.V., Sapparbaev, M., Sutherland, J.C. and Laval, J.: Clustered DNA damages as dosimeters for ionising radiation exposure and biological responses. *Radiat Prot Dosimetry* 97 (2001) 33-8.
- Svejstrup, J.Q.: Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (2002) 21-9.
- Tchou, J. and Grollman, A.P.: Repair of DNA containing the oxidatively-damaged base, 8-oxoguanine. *Mutat Res* 299 (1993) 277-87.
- Terato, H. and Ide, H.: Clustered DNA damage induced by heavy ion particles. *Biol Sci Space* 18 (2004) 206-15.
- Tindall, K.R. and Stankowski, L.F., Jr.: Molecular analysis of spontaneous mutations at the gpt locus in Chinese hamster ovary (AS52) cells. *Mutat Res* 220 (1989) 241-53.
- Tindall, K.R., Stankowski, L.F., Jr., Machanoff, R. and Hsie, A.W.: Detection of deletion mutations in pSV2gpt-transformed cells. *Mol Cell Biol* 4 (1984) 1411-5.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (1979) 4350-4.
- Tsutakawa, S.E. and Cooper, P.K.: Transcription-coupled repair of oxidative DNA damage in human cells: mechanisms and consequences. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65 (2000) 201-15.
- Tudek, B.: Imidazole ring-opened DNA purines and their biological significance. *J Biochem Mol Biol* 36 (2003) 12-9.

- Tudek, B., Boiteux, S. and Laval, J.: Biological properties of imidazole ring-opened N7-methylguanine in M13mp18 phage DNA. *Nucleic Acids Res* 20 (1992) 3079-84.
- Tuschl, T.: RNA interference and small interfering RNAs. *Chembiochem* 2 (2001) 239-45.
- Tuschl, T. and Borkhardt, A.: Small interfering RNAs: a revolutionary tool for the analysis of gene function and gene therapy. *Mol Interv* 2 (2002) 158-67.
- Ura, K. and Hayes, J.J.: Nucleotide excision repair and chromatin remodeling. *Eur J Biochem* 269 (2002) 2288-93.
- van den Boom, V., Jaspers, N.G. and Vermeulen, W.: When machines get stuck--obstructed RNA polymerase II: displacement, degradation or suicide. *Bioessays* 24 (2002) 780-4.
- van Loon, A.A., Groenendijk, R.H., van der Schans, G.P., Lohman, P.H. and Baan, R.A.: Detection of base damage in DNA in human blood exposed to ionizing radiation at biologically relevant doses. *Int J Radiat Biol* 59 (1991) 651-60.
- Vaughan, P., Lindahl, T. and Sedgwick, B.: Induction of the adaptive response of *Escherichia coli* to alkylation damage by the environmental mutagen, methyl chloride. *Mutat Res* 293 (1993) 249-57.
- Venkatesan, R.N., Bielas, J.H. and Loeb, L.A.: Generation of mutator mutants during carcinogenesis. *DNA Repair (Amst)* 5 (2006) 294-302.
- Vidal, A.E., Boiteux, S., Hickson, I.D. and Radicella, J.P.: XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *Embo J* 20 (2001a) 6530-9.
- Vidal, A.E., Hickson, I.D., Boiteux, S. and Radicella, J.P.: Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: bypass of the AP lyase activity step. *Nucleic Acids Res* 29 (2001b) 1285-92.
- von Sonntag, C.: The chemical basis of radiation biology. Taylor & Francis, London, 1987.
- Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Kang, M.I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T.W. and Talalay, P.: Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 2040-5.
- Wallace, S.S.: Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med* 33 (2002) 1-14.
- Ward, J.F., Evans, J.W., Limoli, C.L. and Calabro-Jones, P.M.: Radiation and hydrogen peroxide induced free radical damage to DNA. *Br J Cancer Suppl* 8 (1987) 105-12.
- Weinberg, R.A.: The molecular basis of carcinogenesis: understanding the cell cycle clock. *Cytokines Mol Ther* 2 (1996) 105-10.
- Weiss, J.M., Goode, E.L., Ladiges, W.C. and Ulrich, C.M.: Polymorphic variation in hOGG1 and risk of cancer: a review of the functional and epidemiologic literature. *Mol Carcinog* 42 (2005) 127-41.
- Weiss, S.J.: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320 (1989) 365-76.
- Werninghaus, K., Handjani, R.M. and Gilchrest, B.A.: Protective effect of alpha-tocopherol in carrier liposomes on ultraviolet-mediated human epidermal cell damage in vitro. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 8 (1991) 236-42.
- Wikipedia: Mutation, 2006.
- Wikman, H., Risch, A., Klimek, F., Schmezer, P., Spiegelhalder, B., Dienemann, H., Kayser, K., Schulz, V., Drings, P. and Bartsch, H.: hOGG1 polymorphism and

- loss of heterozygosity (LOH): significance for lung cancer susceptibility in a caucasian population. *Int J Cancer* 88 (2000) 932-7.
- Will, O.: Untersuchung zellulärer DNA-Schäden induziert durch Ro19-8022 in Gegenwart von Licht und deren Charakterisierung mit Hilfe von Reparaturenukleasen. Julius-Maximilians-Universität, Würzburg, 1995.
- Will, O.: Steady-state Level oxidativer DNA-Modifikationen in Säugerzellen und ihre Beeinflussbarkeit., Institut für Pharmazie. Universität Mainz, Mainz, 1999.
- Will, O., Gocke, E., Eckert, I., Schulz, I., Pflaum, M., Mahler, H.C. and Epe, B.: Oxidative DNA damage and mutations induced by a polar photosensitizer, Ro19-8022. *Mutat Res* 435 (1999) 89-101.
- Wilson, I., D. M., Engelward, B.P. and Samson, L.: DNA repair in prokaryotes and eukaryotes. Human Press, Totowa, NJ, 1998.
- Winkler, G.S., Sugawara, K., Eker, A.P., de Laat, W.L. and Hoeijmakers, J.H.: Novel functional interactions between nucleotide excision DNA repair proteins influencing the enzymatic activities of TFIIH, XPG, and ERCC1-XPF. *Biochemistry* 40 (2001) 160-5.
- Wiseman, H. and Halliwell, B.: Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 313 (Pt 1) (1996) 17-29.
- Wiseman, H., Kaur, H. and Halliwell, B.: DNA damage and cancer: measurement and mechanism. *Cancer Lett* 93 (1995) 113-20.
- Witkin, E.M.: Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* 40 (1976) 869-907.
- Wood, M.L., Dizdaroglu, M., Gajewski, E. and Essigmann, J.M.: Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochemistry* 29 (1990) 7024-32.
- Wood, R.D.: DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. *Biochimie* 81 (1999) 39-44.
- Wyatt, M.D., Allan, J.M., Lau, A.Y., Ellenberger, T.E. and Samson, L.D.: 3-methyladenine DNA glycosylases: structure, function, and biological importance. *Bioessays* 21 (1999) 668-76.
- Xanthoudakis, S., Miao, G., Wang, F., Pan, Y.C. and Curran, T.: Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *Embo J* 11 (1992) 3323-35.
- 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.: Deficiencies in mouse Myh and Ogg1 result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors. *Cancer Res* 64 (2004) 3096-102.
- Xu, J., Zheng, S.L., Turner, A., Isaacs, S.D., Wiley, K.E., Hawkins, G.A., Chang, B.L., Bleecker, E.R., Walsh, P.C., Meyers, D.A. and Isaacs, W.B.: Associations between hOGG1 sequence variants and prostate cancer susceptibility. *Cancer Res* 62 (2002) 2253-7.
- Yang, N., Chaudhry, M.A. and Wallace, S.S.: Base excision repair by hNTH1 and hOGG1: a two edged sword in the processing of DNA damage in gamma-irradiated human cells. *DNA Repair (Amst)* 5 (2006) 43-51.
- Yasuda, S. and Sekiguchi, M.: Further purification and characterization of T4 endonuclease V. *Biochim Biophys Acta* 442 (1976) 197-207.
- Yu, S.L., Lee, S.K., Johnson, R.E., Prakash, L. and Prakash, S.: The stalling of transcription at abasic sites is highly mutagenic. *Mol Cell Biol* 23 (2003) 382-8.

- Yu, Z., Chen, J., Ford, B.N., Brackley, M.E. and Glickman, B.W.: Human DNA repair systems: an overview. *Environ Mol Mutagen* 33 (1999) 3-20.
- Zhou, C., Li, Z., Diao, H., Yu, Y., Zhu, W., Dai, Y., Chen, F.F. and Yang, J.: DNA damage evaluated by gammaH2AX foci formation by a selective group of chemical/physical stressors. *Mutat Res* 604 (2006) 8-18.
- Zhou, J., Ahn, J., Wilson, S.H. and Prives, C.: A role for p53 in base excision repair. *Embo J* 20 (2001) 914-23.
- Zou, Y. and Van Houten, B.: Strand opening by the UvrA(2)B complex allows dynamic recognition of DNA damage. *Embo J* 18 (1999) 4889-901.