

**Untersuchungen zur Beeinflussung der
Reparatur oxidativer DNA-Schäden durch
Poly(ADP-Ribose)-Polymerase,
AP-Endonuklease 1 und das Xeroderma
pigmentosum A Protein**

DISSERTATION

zum Erlangen des Grades

"DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN"

am Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Johannes Gutenberg Universität Mainz

vorgelegt von

Claudia Flohr

geboren in Karlsruhe

Mainz 2003

Tag der mündlichen Prüfung: 19. September 2003

Sapere aude.

– *Aristoteles* –

meinen Eltern und Tobias

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress	2
1.1.1	Endogene Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies	2
1.1.2	Experimentelle Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies	4
1.1.2.1	Reaktive Sauerstoffspezies durch den Photosensibilisator Ro 19-8022 in Kombination mit sichtbarem Licht	5
1.1.2.2	Reaktive Sauerstoffspezies durch UVB	7
1.1.2.3	Reaktive Sauerstoffspezies durch <i>tert.</i> -Butylhydroperoxid	7
1.1.2.4	Reaktive Sauerstoffspezies durch Wasserstoffperoxid	7
1.2	Biologische Konsequenzen der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies	8
1.2.1	Lipidperoxidation	8
1.2.2	Proteinoxidation	8
1.2.3	Oxidative DNA-Modifikationen	8
1.3	Konsequenzen oxidativer DNA-Veränderungen	10
1.4	DNA-Reparaturmechanismen	12
1.4.1	Direkte Reparatur (Schadensreversion)	12
1.4.2	Basenexcisionsreparatur	13
1.4.2.1	Reparaturenzyme für 8-Hydroxyguanin	18
1.4.3	Nukleotidexcisionsreparatur (<i>global genome repair</i>)	20
1.4.4	Transkriptionsgekoppelte Reparatur	22
1.4.5	Postreplikative Reparatur (<i>mismatch</i> -Reparatur)	24
1.4.6	Einzelstrangbruchreparatur	25
1.4.7	Die Rolle ausgewählter Hilfsproteine bei der DNA-Reparatur	27
1.4.7.1	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase	27

1.4.7.2	Csb-Protein	28
1.4.7.3	XRCC1-Protein	28
1.4.8	Die Bedeutung der DNA-Reparatur für die Kanzerogenese	29
1.5	Ziel der Arbeit	31
2.	Material und Methoden	32
2.1	Chemikalien und Reagenzien	32
2.2	Radiochemikalien	33
2.3	Enzyme, DNA und Primer	33
2.4	Bakterienstämme und Vektoren	35
2.5	Antikörper	35
2.6	Hilfsmaterialien	35
2.7	Geräte	36
2.8	Zellkultur	37
2.8.1	Zelllinien	37
2.8.2	Medien, Puffer und Lösungen	41
2.9	Standard-Puffer und Lösungen	42
2.10	Techniken zur Arbeit mit Bakterien	43
2.10.1	Transformation kompetenter Bakterien	43
2.10.1.1	Herstellung kompetenter Bakterien	43
2.10.1.2	Elektroporation	43
2.10.1.3	Transformation durch Hitzeschock	44
2.10.1.4	Minipräparation von Plasmid-DNA	44
2.11	Techniken zur Arbeit mit Zellkulturen	44
2.11.1	Zellkultivierung	44
2.11.2	Kulturmedien	45

2.11.3	Einfrieren und Auftauen von Zelllinien	46
2.12	Alkalische Elution	46
2.12.1	Behandlung der Zellen	48
2.12.1.1	Schädigung mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022 und sichtbarem Licht	48
2.12.1.2	Schädigung mit UVB	49
2.12.1.3	Schädigung mit <i>tert.</i> -Butylhydroperoxid (tBuOOH)	49
2.12.1.4	Schädigung mit Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	49
2.12.1.5	Schädigung mit Methylmethansulfonat (MMS)	49
2.12.1.6	Bestimmung der Reparaturgeschwindigkeit von DNA-Modifikationen	49
2.12.2	Vorbereitung, Auftragen der Zellen, Zelllyse, Enzyminkubation und alkalische Elution der DNA	50
2.12.3	Auswertung	51
2.13	PM2-DNA-Relaxations-Assay	52
2.13.1	Schädigung der PM2-DNA mit UVB	52
2.13.2	Enzyminkubation mit T4 Endonuklease V	52
2.13.3	Agarose-Gelelektrophorese der PM2-Plasmid DNA	52
2.13.4	Auswertung	53
2.14	Techniken zur Arbeit mit RNA bzw. DNA	54
2.14.1	Isolierung von RNA aus eukaryoten Zellen	54
2.14.2	Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion	54
2.14.3	Agarose-Gelelektrophorese	55
2.14.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	55
2.14.5	Restriktionsanalysen	56
2.14.6	Ligation von DNA-Fragmenten	56
2.14.7	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	57
2.14.8	DNA-Sequenzanalyse	57

2.15	Techniken zur Arbeit mit Proteinen	57
2.15.1	Proteinbestimmung	57
2.15.2	Isolierung der T4 Endonuklease V	58
2.15.2.1	Anzucht der Bakterien	58
2.15.2.2	Präparation des Rohextraktes	58
2.15.2.3	Chromatographische Reinigung	59
2.15.2.4	Nachweis der Enzymaktivität an UVB-geschädigter PM2-DNA	59
2.15.2.5	Test der T4 Endonuklease V in der alkalischen Elution	59
2.15.3	Präparation von Zellextrakten	60
2.15.3.1	Kernextrakte	60
2.15.3.2	Gesamtzellextrakte	61
2.15.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	61
2.15.5	Western-Blot	62
2.15.6	Nachweis der Enzymaktivität	63
2.15.6.1	Nachweis der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität	63
2.15.6.2	Nachweis der AP-Endonukleaseaktivität	63
2.15.7	Bestimmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-Aktivität mittels Immunohistochemie	64
3.	Ergebnisse	66
3.1	Auswirkungen der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-Aktivität auf die Reparatur verschiedener DNA-Modifikationen	66
3.1.1	<i>Trans</i> -dominante PARP-Hemmung	66
3.1.1.1	Auswirkungen der <i>trans</i> -dominanten PARP-Hemmung auf die Proliferation der Zellen	66
3.1.1.2	Auswirkungen der <i>trans</i> -dominanten PARP-Hemmung auf die Reparaturgeschwindigkeit Fpg-sensitiver Basenmodifikationen	67

3.1.1.3	Aktivität der 8-oxoG-Glykosylase in PARP-gehemmten Zellen	70
3.1.1.4	Aktivität der AP-Endonuklease in PARP-gehemmten Zellen	72
3.1.1.5	Auswirkungen der <i>trans</i> -dominanten PARP-Hemmung auf die Reparatur und die Induzierbarkeit von Pyrimidindimeren durch UVB	73
3.1.1.6	Auswirkungen der <i>trans</i> -dominanten PARP-Hemmung auf die Reparatur und Induzierbarkeit von Einzelstrangbrüchen durch tBuOOH	75
3.1.2	PARP-Hemmung durch den Hemmstoff DPQ	77
3.1.2.1	Überprüfung der Hemmung der katalytischen Aktivität der PARP durch DPQ in COM3-Zellen	78
3.1.2.2	Auswirkungen der PARP-Hemmung durch DPQ auf die Reparatur und Induzierbarkeit oxidativer Basenmodifikationen in reparaturdefizienten Mausembryofibroblasten	79
3.1.2.3	Auswirkungen der PARP-Hemmung durch DPQ auf die Reparatur und Induzierbarkeit von Pyrimidindimeren in Mausembryofibroblasten	82
3.1.2.4	Auswirkungen der PARP-Hemmung durch DPQ auf die Reparatur und Induzierbarkeit von Einzelstrangbrüchen in Mausembryofibroblasten	84
3.1.2.5	Auswirkungen der PARP-Hemmung durch DPQ auf die Reparatur und Induzierbarkeit oxidativer Basenmodifikationen in XRCC1-defizienten Zellen	87
3.1.2.6	Auswirkungen der PARP-Hemmung durch DPQ auf die Reparatur und Induzierbarkeit von Einzelstrangbrüchen in XRCC1-defizienten Zellen	89
3.1.3	Nachweis der Poly(ADP-Ribosyl)ierung	92
3.2	Auswirkungen eines XPA-Ausfalls sowie eines kombinierten XPA/hOgg1-Ausfalls in menschlichen Fibroblasten	94
3.2.1	Auswirkungen eines XPA-Ausfalls sowie eines kombinierten XPA/hOgg1-Ausfalls auf die Steady-state-Spiegel oxidativer Basenmodifikationen	95
3.2.2	Auswirkungen eines XPA-Ausfalls sowie eines kombinierten XPA/hOgg1-Ausfalls auf die Induzierbarkeit oxidativer Basenmodifikationen durch Ro 19-8022	96

3.2.3	Auswirkungen eines XPA-Ausfalls sowie eines kombinierten XPA/hOgg1-Ausfalls auf die Reparaturgeschwindigkeit oxidativer Basenmodifikationen	97
3.3	Auswirkungen einer AP-Endonuklease 1-Überexpression bei XRCC1-Defizienz	98
3.3.1	Auswirkungen einer Ape1-Überexpression bei XRCC1-Defizienz auf die Steady-State-Spiegel von Einzelstrangbrüchen	98
3.3.2	Auswirkungen einer Ape1-Überexpression bei XRCC1-Defizienz auf die Induzierbarkeit von Einzelstrangbrüchen	99
3.3.3	Auswirkungen einer Ape1-Überexpression bei XRCC1-Defizienz auf die Reparaturgeschwindigkeit von Einzelstrangbrüchen	100
4.	Diskussion	103
4.1	Einfluss der Hemmung der katalytischen Aktivität der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 auf die DNA-Reparatur	103
4.2	Einfluss des XPA- und des hOgg1-Proteins auf die Induktion und Reparatur oxidativer Basenmodifikationen	107
4.3	Einfluss einer AP-Endonuklease 1-Überexpression auf die Reparatur von Einzelstrangbrüchen in XRCC1-defizienten Zellen	109
5.	Zusammenfassung	111
6.	Literaturverzeichnis	113

Abkürzungen

AP-Läsion	apurinische/apyrimidinische Stelle in der DNA
Ape	AP-Endonuklease
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	Rinderserumalbumin
CS	Cockayne Syndrom
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPQ	3,4-Dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)butoxyl]-1(2H)-isoquinolinon
DTE	Dithioerythriol
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECD	elektrochemischer Detektor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Endo IV	Endonuklease IV
ERCC1	<i>excision repair cross-complementing 1</i>
Exo III	Exonuklease III
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Fpg	Formaminopyrimidinglykosylase
8-oxoG	8-Hydroxyguanin
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethan-sulfonsäure
HPLC	hochauflösende Flüssigkeitschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LB	Luria-Bertani
NDPO ₂	Dinatriumsalz der 1,4-Etheno-2,3-benzodioxin-1,4-dipropionsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase

PMSF	Phenylmethanolsulfonylfluorid
MMS	Methylmethansulfonat
RFC	Replikationsfaktor C
Ro 19-8022	[R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H benzo[a]chinolizin-1-yl)carbonyl]-2- pyrrolidin-methanol]
RPA	Replikationsprotein A
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SV-40	Simian Virus 40
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFIIH	Transkriptionsfaktor IIH
tBuOOH	<i>tert.</i> -Butylhydroperoxid
T4 Endo V	T4 Endonuklease V
Tris	2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
UVB	Ultraviolettes Licht der Wellenlänge 320 bis 290 nm
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
VHL	Von-Hippel-Lindau
vo	Vektorkontrolle
XP	Xeroderma Pigmentosum
XRCC1	<i>X-ray repair cross complementing group 1</i>

Symbole

<i>g</i>	Normal-Fallbeschleunigung (9.81 m/s ²)
Gy	Energiedosis ionisierender Strahlung (J/kg)

Weiterhin werden übliche Abkürzungen des „Système International“ und dessen Vorsätze zur Bezeichnung von dezimalen Teilen und Vielfachen verwendet.

1. Einleitung

Krebs ist in den westlichen Industrieländern nach den Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Daher besteht großes Interesse, die molekularen Prozesse während der Entstehung und dem Fortschreiten dieser Erkrankung (Kanzerogenese) aufzuklären.

Nach heutigem Wissen wird die maligne Transformation vor allem durch Mutationen in den Proto-Onkogenen (zum Beispiel *ras*, *c-myc*) und Tumorsuppressorgenen (zum Beispiel *p53*, *RB*, *APC*, *VHL*), deren Zusammenspiel in normalen Zellen ein unkontrolliertes Wachstum verhindert, ausgelöst (**Weinberg 1996**). Aber auch Mutationen in Genen, die an der DNA-Reparatur bzw. an der Replikation beteiligt sind, werden als Ursache von Krebs angesehen (Mutatorhypothese) (**Loeb et al. 2003; Loeb 2001; Loeb 1998; Cheng und Loeb 1997**). Bis heute sind noch nicht alle Gene bekannt, deren Funktionsstörung zu einer Prädisposition für Krebs führen kann. Auch über die Art der DNA-Modifikationen, die während der Kanzerogenese zu Mutationen führen, besteht in den meisten Fällen Unklarheit. Es gibt aber vermehrt Hinweise dafür, dass oxidative Modifikationen in der DNA wichtige Vorstufen von initiiierenden Mutationen darstellen (**Sekiguchi und Tsuzuki 2002; Beckman und Ames 1997; Wiseman et al. 1995**). Oxidative DNA-Modifikationen entstehen in allen Zellen durch reaktive Sauerstoffspezies, die aus endogenen Quellen (wie der mitochondrialen Atmungskette) oder aus exogenen Quellen (wie Strahlung, Ozon und verschiedenen chemischen (Umwelt-)Verbindungen) stammen. Die häufigste und wegen ihres mutagenen Potentials wohl bedeutendste oxidative DNA-Modifikation ist das 8-Hydroxyguanin (8-oxoG). Die Menge an 8-oxoG in der DNA einer Zelle wird daher auch als Biomarker für das Ausmaß an oxidativem Stress in der Zelle herangezogen (**Kasai und Nishimura 1993; Floyd 1990**).

In jeder gesunden Zelle gibt es ein Gleichgewicht zwischen der stetigen Bildung oxidativer DNA-Modifikationen und ihrer Reparatur durch spezifische DNA-Reparaturenzyme. Die Entstehung der oxidativen DNA-Modifikationen hängt dabei sowohl von der Menge der reaktiven Sauerstoffspezies als auch vom Vorhandensein verschiedener enzymatischer und nicht-enzymatischer Abwehrstrategien der Zellen gegen reaktive Sauerstoffspezies ab (**Epe 2003; Sies 1993**). Aus diesem Gleichgewicht ergeben sich "steady-state"-Spiegel oxidativer Modifikationen in der DNA und proportional hierzu eine entsprechende Anzahl an Mutationen.

1.1 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress

In allen aeroben Organismen wird Sauerstoff in großen Mengen zur Energiegewinnung benötigt. Dabei entstehen bei der sequentiellen Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser verschiedene, sehr reaktive Sauerstoffspezies (siehe Tabelle 1.1), die sowohl an der Krebsentstehung, an Alterungsprozessen, an Entzündungsreaktionen, aber auch an verschiedenen zellulären Prozessen, wie der Signaltransduktion, beteiligt sind (**Baeuerle et al. 1996**). Obwohl diese reaktiven Sauerstoffspezies meist nur eine kurze Lebensdauer besitzen, sind sie in der Lage mit biologischen Makromolekülen, das heißt mit Lipiden, Proteinen und mit Nukleinsäuren, zu reagieren. Eine vermehrte Bildung dieser reaktiven Sauerstoffspezies wird als oxidativer Stress bezeichnet (**Sies 1986**).

Tabelle 1.1: Reaktive Sauerstoffspezies und ihre geschätzte Lebensdauer; **nach Sies 1993**.

Reaktive Sauerstoffspezies	Halbwertszeit [s]
HO \cdot , Hydroxylradikal	10 ⁻⁹
¹ O ₂ , Singulett-Sauerstoff	10 ⁻⁶
O ₂ \cdot^- , Superoxidanion-Radikal	Dismutation
H ₂ O ₂ , Wasserstoffperoxid	enzymatischer Abbau
RO \cdot , Alkoxyradikal	10 ⁻⁶
ROO \cdot , Peroxylradikal	7
Q \cdot^- , Semichinonradikal	Tage
NO \cdot , Stickstoffmonoxid	1-10
ONOO \cdot^- , Peroxynitrit	0.05-1

Im folgenden Abschnitt soll die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies näher betrachtet werden.

1.1.1 Endogene Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies

Bei endogen gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies handelt es sich hauptsächlich um Superoxidanion-Radikale (O₂ \cdot^-). Dies beruht vorwiegend auf der Tatsache, dass in der mitochondrialen Atmungskette etwa 1 bis 3 % des gesamten Sauerstoffs unvollständig, nur

bis zum Superoxidanion-Radikal, reduziert wird. Die sequentielle Reduktion von Sauerstoff ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

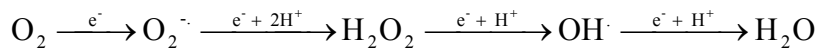


Abbildung 1.1: Die sequentielle Reduktion von molekularem Sauerstoff über Superoxidanion-Radikal, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikal zu Wasser.

Weitere bedeutsame endogene Quellen von Superoxidanion-Radikalen sind unter anderen:

- Arachidonsäuremetabolismus
- *Respiratory Burst* von Abwehrzellen durch NADPH-Oxidase
- Purinabbau durch das Xanthinoxidase-System

Das Superoxidanion-Radikal kann aufgrund seiner Ladung biologische Membranen nicht durchdringen. In wässrigem Milieu unterliegt es einer spontanen Dismutation zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und molekularem Sauerstoff (O_2) (Abbildung 1.2). Außerdem kann in Zellen auch eine enzymkatalysierte Dismutation durch Superoxiddismutasen stattfinden, die etwa 10^6 -mal schneller abläuft als die Spontanreaktion (**Klotz 2002; Markant et al. 1995; Elstner 1990**).

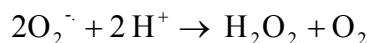


Abbildung 1.2: Spontane Dismutation von Superoxidanion-Radikalen.

Wasserstoffperoxid kann außer durch die bivalente Reduktion von Sauerstoff und die spontane Dismutation von Superoxidanion-Radikalen auch durch spezifische, vor allem in der Leber lokalisierte Oxidasen gebildet werden (**Southborn und Powis 1988**). H_2O_2 ist aufgrund seiner geringen Polarität in der Lage, Membranen zu durchdringen. H_2O_2 selbst ist eine verhältnismäßig reaktionsträge Verbindung, kann aber in Anwesenheit von Übergangsmetallen zu hochreaktiven Hydroxylradikalen (OH^{\cdot}) umgesetzt werden (Abbildung 1.3) (Fenton-Reaktion) (**Halliwell 1996; Halliwell und Gutteridge 1990 und 1984**).

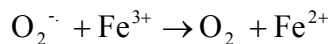


Abbildung 1.3: Metallkatalysierte Bildung von Hydroxyradikalen.

Das hauptsächlich bei der Haber-Weiss-Reaktion entstehende Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) kann aufgrund seiner hohen Reaktivität mit nahezu allen zellulären Molekülen (Kohlenhydraten, Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren) reagieren (**Halliwell und Gutteridge 1989**) und ist daher äußerst toxisch. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit (siehe Tabelle 1.1) und der radikalischen Eigenschaften liegen Bildungs- und Reaktionsort sehr nahe beieinander.

Die typischen DNA-Schäden, die durch Hydroxylradikale entstehen, sind Einzel- bzw. Doppelstrangbrüche, Modifikationen bzw. Verlust von DNA-Basen, DNA-Protein-Quervernetzungen sowie Fragmentierung des Zucker-Phosphat-Gerüsts (**Halliwell and Aruoma 1991**).

Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) kann ebenfalls in Zellen gebildet werden (**Epe 1991**). Die Bildung erfolgt entweder durch Belichtung endogener Photosensibilisatoren, wie Protoporphyrin IX oder Riboflavin durch Energieübertragung (**Epe 1993**) oder in geringerem Umfang als Nebenprodukt enzymatischer Reaktionen. Singulett-Sauerstoff ist viel weniger reaktiv als Hydroxylradikale, kann aber aufgrund seiner vergleichsweise langen Halbwertszeit diffundieren und so im Zellkern mit der DNA reagieren und 8-oxoG generieren (**Epe 1991**).

Die Sauerstoffaktivierung in aeroben Zellen führt nicht nur zur Entstehung oben genannter Spezies. Es entstehen außerdem organische Sauerstoffverbindungen wie Alkoxyl- (RO^{\cdot}) und Hydroperoxylradikale (ROO^{\cdot}), Hydroperoxide (ROOH) und andere. Diese Reaktionsprodukte können ebenfalls direkt die DNA angreifen. Bestimmte Folgeprodukte der Lipidperoxidation führen ferner zu Ethenoaddukten an DNA-Basen (**Marnett und Plastaras 2001; Marnett 2000; Bartsch und Nair 2000**).

1.1.2 Experimentelle Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies

In den folgenden Abschnitten sollen die Substanzen, die in Zellen zur Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies eingesetzt wurden, näher erläutert werden. Zusätzlich sollen die durch die reaktiven Sauerstoffspezies verursachten Schäden an der DNA charakterisiert werden.

1.1.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies durch den Photosensibilisator Ro 19-8022 in Kombination mit sichtbarem Licht

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Photosensibilisator Ro 19-8022 (**Fischer et al. 1990**) in Kombination mit sichtbarem Licht (400-800 nm) eingesetzt, um oxidative DNA-Modifikationen zu erzeugen.

Ro 19-8022 bezeichnet eine stark gelb fluoreszierende, polare Verbindung mit dem systematischen Namen [R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl)carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol] (Abbildung 1.4), die von der Firma Hoffmann-La Roche im Rahmen der Entwicklung neuer Tranquilantien synthetisiert wurde.

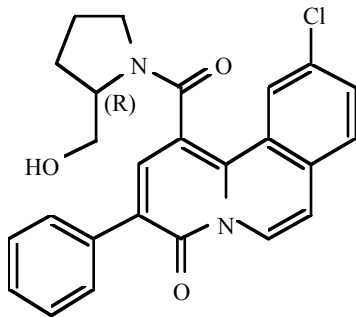


Abbildung 1.4: Strukturformel von Ro 19-8022.

In Kombination mit Licht erwies sich die Substanz im Ames-Test als mutagen. Zellfreie Untersuchungen an Bakteriophagen-DNA (PM2-DNA) zeigten, dass die Substanz bei Bestrahlung mit sichtbarem Licht ein für Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) charakteristisches DNA-Schadensprofil generiert (Abbildung 1.5).

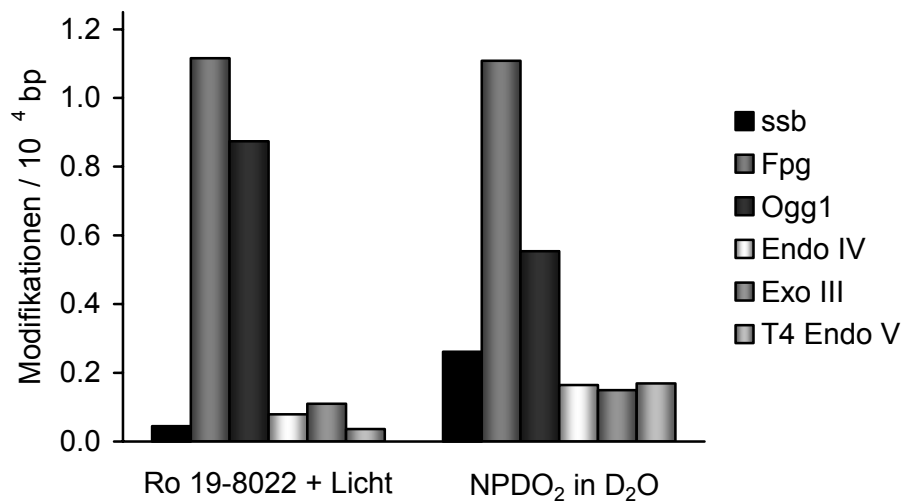


Abbildung 1.5: Schadensprofil in PM2-DNA (zellfrei) nach Behandlung mit Ro 19-8022 (50 μM) und sichtbarem Licht (225 kJ/m^2) bzw. mit NDPO_2 (1 mM in D_2O), einer chemischen $^1\text{O}_2$ -Quelle. Die Balken geben jeweils die Zahl der von verschiedenen Reparaturenukleasen erkannten DNA-Modifikationen (1.4.2) bzw. die Einzelstrangbrüche (ssb) an. Die Bestimmung erfolgte mit dem PM2-DNA-Relaxationsassay mit Enzymkonzentrationen von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sättigungsbereich). Die Daten wurden freundlicherweise von Ina Schulz zur Verfügung gestellt.

Bei Ro 19-8022 handelt es sich um eine photosensibilisierende Verbindung, deren Absorptionsmaxima bei 425, 315 und 250 nm liegen (**Will 1995**).

Die bei zellfreier Schädigung mit Ro 19-8022 in Kombination mit sichtbarem Licht generierten Modifikationen, die vom Fpg-Protein (1.4.2.1) erkannt werden, werden zu etwa 80 % auch von der 8-oxoG-Glykosylase Ogg1 erkannt. Diese Daten bestätigen somit frühere Untersuchungen mit HPLC/ECD von **Will (1999)**, die zeigten, dass etwa 75 % der durch Ro 19-8022 und sichtbarem Licht erzeugten Modifikationen, die vom Fpg-Protein erkannt werden, 8-oxoG darstellen. Nach Behandlung mit Ro 19-8022 plus Licht konnte in AS-52-Zellen ein ähnliches Schadensprofil wie in den zellfreien Versuchen ermittelt werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Ro 19-8022 mit Bestrahlung in Säugerzellen mutagen ist und Mikrokerne induziert (**Will et al. 1999**).

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen an Ro 19-8022 zur Generierung Fpg-sensitiver Modifikationen waren nicht zytotoxisch und beeinflussten die Proliferation der Zellen nicht.

1.1.2.2 Reaktive Sauerstoffspezies durch UVB

UVB kann entweder direkt durch Anregung der DNA zu DNA-Modifikationen führen oder die DNA indirekt über die Bildung reaktiver Spezies schädigen. Im ersten Fall entstehen vorwiegend Cyclobutanpyrimidindimere (**Mitchell et al. 1991**) durch photochemische [2+2]-Cycloaddition benachbarter Thymin sowie einige wenige Pyrimidin-(6-4)-Photoprodukte (**Lippke et al. 1981**). Nur nach hohen Dosen UVB konnten auch oxidative DNA-Modifikationen nachgewiesen werden, bei denen es sich teilweise um 8-oxoG handelte (**Budiyanto et al. 2002; Beehler et al. 1992**).

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

1.1.2.3 Reaktive Sauerstoffspezies durch *tert.*-Butylhydroperoxid

Über den Mechanismus der Schadensinduktion durch *tert.*-Butylhydroperoxid (tBuOOH) ist vergleichsweise wenig bekannt. Als mögliche Mechanismen der Einzelstrangbruchbildung durch tBuOOH werden die Ca²⁺-abhängige H₂O₂-Bildung in Mitochondrien und nachfolgende eisenkatalysierte OH[•] oder RO[•]-Bildung diskutiert (analoge Fenton-Reaktion) (**Guidarelli et al. 1997a und 1997b; Latour et al. 1995**). tBuOOH führt in Säugerzellen zur Induktion von Einzelstrangbrüchen und von wenigen bis keinen oxidierten Basen (**Lazzé et al. 2003; Latour et al. 1995**). Neben dem DNA-schädigenden Potential induziert tBuOOH die Lipidperoxidation, Veränderungen im Redox-Status der Zellen, die Hemmung der ATP-Synthese und den Zelltod (**Lazzé et al. 2003**).

tBuOOH wurde zur experimentellen Generierung von Einzelstrangbrüchen bzw. von AP-Läsionen in Zellen benutzt. Die jeweilige Arbeitskonzentration wurde durch Vorversuche ermittelt.

1.1.2.4 Reaktive Sauerstoffspezies durch Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid (H₂O₂) wurde in der vorliegenden Arbeit zur Erzeugung von Einzelstrangbrüchen eingesetzt. Der Mechanismus der DNA-Schädigung benötigt Eisen(II)ionen oder Kupfer(II)ionen (**Nakamura et al. 2003; Jezowska-Bojczuk et al. 2002**) und verläuft wahrscheinlich über eine metallionenvermittelte Bildung von Hydroxylradikalen (Fenton-Reaktion) (**Jezowska-Bojczuk et al. 2002**).

1.2 Biologische Konsequenzen der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

In Zellen besteht normalerweise ein Gleichgewicht zwischen der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und deren Beseitigung durch verschiedene antioxidative Strategien (**Klotz und Sies 2003; Sies 1993**). Bei einer Verschiebung dieses Gleichgewichts durch vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies oder verminderte Entfernung der reaktiven Spezies spricht man von oxidativem Stress. **Sies (1985)** definiert oxidativen Stress als "die Auslenkung des Oxidans/Antioxidans-Gleichgewichts zugunsten der Oxidantien". Als Folge des oxidativen Stresses werden Lipide, Proteine und Nukleinsäuren vermehrt geschädigt. Die Oxidationen dieser Moleküle in der Zelle spielen ohne Zweifel eine Rolle bei Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Arteriosklerose und Krebs, sowie beim Alterungsprozess, auch wenn die Bedeutung quantitativ bisher schwer einzuschätzen ist.

1.2.1 Lipidperoxidation

Als Lipidperoxidation bezeichnet man die radikalische Oxidation ungesättigter Fettsäuren. Als Produkte der Lipidperoxidation entstehen verschiedene reaktive Aldehyde, darunter 4-Hydroxy-2-nonenal, Malondialdehyd, und Radikale (vergleiche 1.1.1), die die DNA angreifen und so zu DNA-Modifikationen führen können. Durch Lipidperoxidation werden auch direkt Phospholipide der Zellmembranen geschädigt, was zum Untergang der betroffenen Zellen führt.

1.2.2 Proteinoxidation

Proteine können durch den Angriff reaktiver Sauerstoffspezies, wie Hydroxylradikale, Singulett-Sauerstoff und organischer Radikale, oxidiert werden (**Klotz et al. 2003; Andrae 2003**). Als Folge dieser Oxidation kommt es zur Störung bzw. dem Verlust der Struktur und der Enzymaktivität der Proteine.

1.2.3 Oxidative DNA-Modifikationen

Oxidative DNA-Modifikationen sind die Produkte der Reaktionen verschiedenster reaktiver Sauerstoffspezies mit Bestandteilen der DNA. Zu diesen verschiedenen Modifikationen der DNA zählen Einzel- und Doppelstrangbrüche, AP-Läsionen, oxidierte Basen, DNA-Quervernetzungen (**Epe 1995**) sowie DNA-Protein-Quervernetzungen (**Wallace 2002; Halliwell und Aruoma 1991**). Einige oxidative DNA-Modifikationen sind in Abbildung 1.6 dargestellt.

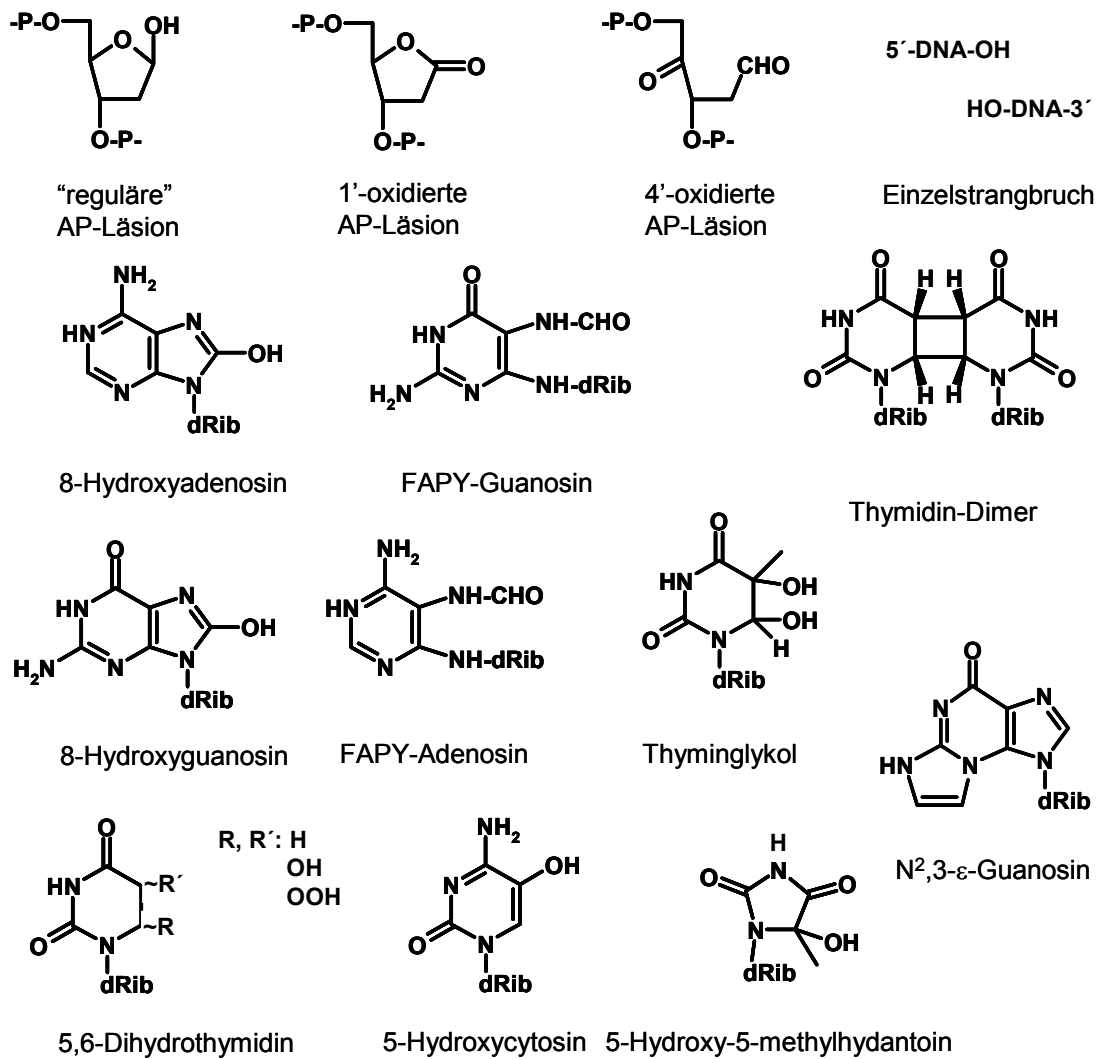


Abbildung 1.6: Strukturformeln einer Auswahl an DNA-Modifikationen, die durch reaktive Sauerstoffspezies oder als Folgeprodukte der Lipidperoxidation erzeugt werden.

Durch Wasserstoffabstraktion an den Desoxyribosegeresten kommt es über Zuckerradikale zur Ausbildung von AP-Läsionen oder zu Einzel- bzw. Doppelstrangbrüchen (**Halliwell und Aruoma 1991; Téoule 1987; von Sonntag 1987**). Oxidierte AP-Läsionen entstehen durch einen radikalischen Angriff an Position 1, 2 oder 4 des Zuckers (**Epe 1995**). Ein geringer Anteil nicht oxidierte AP-Läsionen entsteht durch spontane Depurinierung (**Lindahl 1993**). 8-Hydroxyguanin (8-oxoG) wird durch den Angriff von Hydroxylradikalen an Position 8 des Guanins gebildet. Aus dem primär gebildeten Radikal kann durch Öffnung des Imidazolrings alternativ (durch Reduktion) 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (FaPy-Guanin) entstehen (**Asagoshi et al. 2000; Cadet et**

al. 2000; Dizdaroglu 1993). Die Oxidation des Adenins verläuft analog, jedoch in weitaus geringerem Ausmaß.

Zu den oxidativen Modifikationen der Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin gehören verschiedene 5,6-Dihydropyrimidin-Derivate, wie Glykole und Hydrate, sowie deren Fragmentierungsprodukte (zum Beispiel 5-Hydroxy-5-methylhydantion) (**Halliwell und Aruoma 1991**). 5-Hydroxycytosin kann durch Wasserabspaltung aus Cytosinglykolen gebildet werden (**Tremblay et al. 1999**).

Durch den Angriff reaktiver Aldehyde aus der Lipidperoxidation können Etheno- und Propanaddukte des Guanin, Cytosin und Adenin gebildet werden.

DNA-Protein-Quervernetzungen können sich zwischen DNA-Basen und Aminosäuren ausbilden. In Gegenwart von Sauerstoff oder nach H₂O₂-Behandlung in Anwesenheit von Fe(III) oder Cu(II) bindet vorwiegend Thymin an Tyrosin (**Nackerdien et al. 1991**).

1.3 Konsequenzen oxidativer DNA-Veränderungen

Für eine Zelle gibt es nach Schädigung ihrer DNA prinzipiell drei Möglichkeiten zu reagieren: (i) Der DNA-Schaden kann durch die vorhandenen DNA-Reparaturmechanismen (siehe 1.4) erkannt und dann vollständig und fehlerfrei behoben werden. Die Integrität der DNA bleibt erhalten. (ii) Der DNA-Schaden ist so schwerwiegend, dass er durch die Reparaturmechanismen unzureichend oder gar nicht repariert werden kann. Es kommt zum Absterben der Zelle entweder durch Apoptose oder Nekrose. (iii) Der DNA-Schaden wird unvollständig erkannt oder nicht fehlerfrei repariert. Bei der nächsten Replikation der DNA führt dies zu einer Mutation. Wie bereits erwähnt, stellt eine Mutation einen Schritt auf dem Weg der malignen Transformation einer Zelle dar.

Im folgenden Abschnitt sollen die Konsequenzen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten DNA-Modifikationen näher erläutert werden.

Wegen des niedrigen Oxidationspotentials des Guanins (**Hüttermann 1982**) ist **8-Hydroxyguanin** (8-oxoG) in vielen Fällen die dominierende oxidative DNA-Basenmodifikation. 8-oxoG besitzt ein hohes promutagenes Potential, welches auf seine Fehlpaarung mit Adenin während der Replikation zurückzuführen ist (**Tchou et al. 1993**). Durch diese Fehlpaarung kommt es zu G:C → T:A Transversionen in Säugerzellen

(**Kuipers et al. 1999; Klein et al. 1992**). Untersuchungen zur Mutationsfrequenz eines 8-oxoG in Säugerzellen konnten zeigen, dass ein einzelner 8-oxoG-Rest in einem einzelsträngigen Shuttle-Vektor nur zu einer Mutagenität von 2.5 bis 4.8 % führt (**Moriya 1993**). Diese niedrige Mutagenität kann durch die effizienten Reparaturmechanismen der Zellen für 8-oxoG (*mismatch*-Reparatur, vergleiche 1.4.2.1) erklärt werden; sie ist jedoch immer noch relativ hoch im Vergleich zur Mutagenität anderer DNA-Modifikationen.

Formamidopyrimidine (FaPy-Guanin und FaPy-Adenin) besitzen kein mutagenes Potential. *In vitro* führen diese DNA-Modifikationen zum Stopp der Replikation (**O'Connor et al. 1988**). Sie sind somit zytotoxisch (**Tudek et al. 1992**).

AP-Läsionen tragen ebenfalls zur Mutagenese bei (**Yu et al. 2003; Epe 1995**). Dies kann über verschiedene Mechanismen erfolgen: (i) Die Replikation und die Transkription (**Yu et al. 2003**) können blockiert werden. (ii) Während der Replikation kann es zu Basenfehlpaarungen kommen (**Klinedinst und Drinkwater 1992; Neto et al. 1992; Lawrence et al. 1990**), die in Bakterien zu G:C → T:A Transversionen führen. (iii) Aus der AP-Läsion kann aber auch durch Hydrolyse (spontan oder enzymatisch) ein Einzelstrangbruch entstehen (**Burney et al. 1999**).

Durch Oxidantien induzierte **Einzelstrangbrüche** werden sehr schnell in einem zweiphasigen Prozess repariert (**Churcill et al. 1991**). Dabei stehen nach neueren Erkenntnissen zwei Möglichkeiten zur Verfügung (**Caldecott 2003; Caldecott 2001**; siehe 1.4.6). Trotzdem kann ein promutagenes Potential dieser Modifikationen nicht ausgeschlossen werden (**Epe 1995**).

Als "*bulky-lesions*" stören **Pyrimidindimere** die dreidimensionale Struktur der DNA. Diese Modifikationen werden als nicht-codierend angesehen und stören daher sowohl die Replikation als auch die Transkription (**Borden et al. 2002; Chan et al. 1985; Witkim 1976**). In Säugerzellen konnten mit Hilfe von Shuttle-Vektor-Experimenten T → C Substitutionen durch Pyrimidindimere nachgewiesen werden (**Gentil et al. 1996**).

1.4 DNA-Reparaturmechanismen

Die DNA der Zellen ist ständig den Angriffen reaktiver Sauerstoffpezies und schädlicher Umwelteinflüsse ausgesetzt. Um die Integrität des Genoms zu erhalten, bedarf es daher gut funktionierender DNA-Reparaturmechanismen. Bisher wurden mehr als 130 verschiedene Gene des Menschen beschrieben, die an Reparaturvorgängen beteiligt sind (**Wood et al. 2001; Lindahl und Wood 1999**). Die bisherigen Erkenntnisse über die an der DNA-Reparatur beteiligten Gene wurden entweder durch Homologiesuche anhand vorhandener Daten aus Bakterien, hier besonders aus *E. coli*, und Hefen erhalten oder wurden bei der Erforschung der Ursachen von Krankheiten des Menschen entdeckt (**Yu et al. 1999**). Weite Bereiche dieser komplexen Reparaturmechanismen sind jedoch noch weitgehend unverstanden. Nach heutigem Kenntnisstand kann man die DNA-Reparaturmechanismen in mehrere Gruppen einteilen, von denen einige in den folgenden Kapiteln näher betrachtet werden sollen.

1.4.1 Direkte Reparatur (Schadensreversion)

Zu den Mechanismen der Schadensreversion werden die enzymatische Photoreaktivierung der DNA, die Reparatur bestimmter alkylierter Basen und die direkte Ligation von Einzelstrangbrüchen gezählt (**Friedberg et al. 1995**).

Bakterien, Pflanzen und einige Säuger können durch photoreaktivierende Enzyme (DNA-Photolyasen) lichtabhängig Pyrimidindimere wieder in zwei Pyrimidinnukleotide spalten (**Sinha und Hader 2002**). In Plazenta-Säugetern konnte diese DNA-Photolyase-Aktivität bisher nicht nachgewiesen werden, obwohl auch hier Mechanismen zur Schadensreversion existieren. In menschlichen Zellen wurde eine spezifische O⁶-Alkylguaninalkyltransferase beschrieben, die O⁶-Methylguanin, das ständig durch reaktive Metabolite endogen in kleinen Mengen gebildet wird, repariert (**Vaughan et al. 1993**). Das Enzym entfernt dabei die schädliche Methylgruppe vom Guanin und überträgt diese auf einen seiner eigenen Cysteylreste (**Pegg 2000; Moore et al. 1994**). Da das dabei entstehende S-Methylcystein chemisch sehr stabil ist, kann das Enzym nicht mehr regeneriert werden und ist daher inaktiviert (Selbstmordenzym). Zusätzlich konnten kürzlich die Dioxigenasen ABH2 und ABH3 nachgewiesen werden, die die Oxidation und damit das Entfernen von Methylgruppen aus 1-Methyladenin und 3-Methylcytosin katalysieren (**Aas et al. 2003; Duncan et al. 2002**).

In *E. coli*, und möglicherweise auch in anderen Organismen, können durch γ -Strahlung erzeugte Einzelstrangbrüche, die eine 3'-Hydroxylgruppe und eine freie 5'-Phosphatgruppe besitzen, direkt durch eine NAD- und Mg^{2+} -abhängige DNA-Ligase geschlossen werden (**Jacobs et al. 1972**).

1.4.2 Basenexcisionsreparatur

Basenveränderungen, die die Helix-Struktur der DNA nicht stören, werden normalerweise von der Basenexcisionsreparatur (BER) in einem mehrstufigen Prozess, der durch substratspezifische Glykosylasen eingeleitet wird, repariert (**Gros et al. 2002; Memisoglu und Sarnson 2000; Lindahl und Wood 1999; Krokan et al. 1997**). Die Glykosylasen erkennen die geschädigten Basen und schneiden sie heraus. Dadurch entsteht eine abasische Stelle (AP-Läsion) in der DNA, die in nachfolgenden Schritten weiter prozessiert wird, so dass am Ende wieder die korrekte Basensequenz vorliegt (**Krokan et al. 2000; Lindahl und Wood 1999**).

Es gibt zwei Arten von Glykosylasen, mono- und bifunktionelle. Monofunktionelle Glykosylasen lösen die *N*-glykosidische Bindung zwischen der modifizierten Base und der Desoxyribose, so dass die modifizierte Base freigesetzt wird und dadurch als Endprodukt eine AP-Läsion entsteht. Diese AP-Läsion wird dann von einer 5'-AP-Endonuklease erkannt und prozessiert (**Laval 1977**). Bifunktionelle Glykosylasen trennen ebenfalls die *N*-glykosidische Bindung und setzen die modifizierte Base frei. Im Anschluss daran lösen sie die Phosphodiesterbindung, die 3' von der gebildeten AP-Läsion liegt, durch β - bzw. β - δ -Elimination (β -Lyase-Aktivität). Es bleibt ein Einzelstrangbruch mit einem durch einen Zuckerphosphatrest blockierten 3'-Ende und 5'-Phosphatrest zurück. Als nächstes wird der Zuckerphosphatrest durch eine AP-Endonuklease entfernt, damit eine DNA-Polymerase die entstandene Lücke (3'-Hydroxylrest und 5'-Phosphatrest) auffüllen kann, bevor die DNA-Ligase die DNA wieder schließt (Abbildung 1.7).

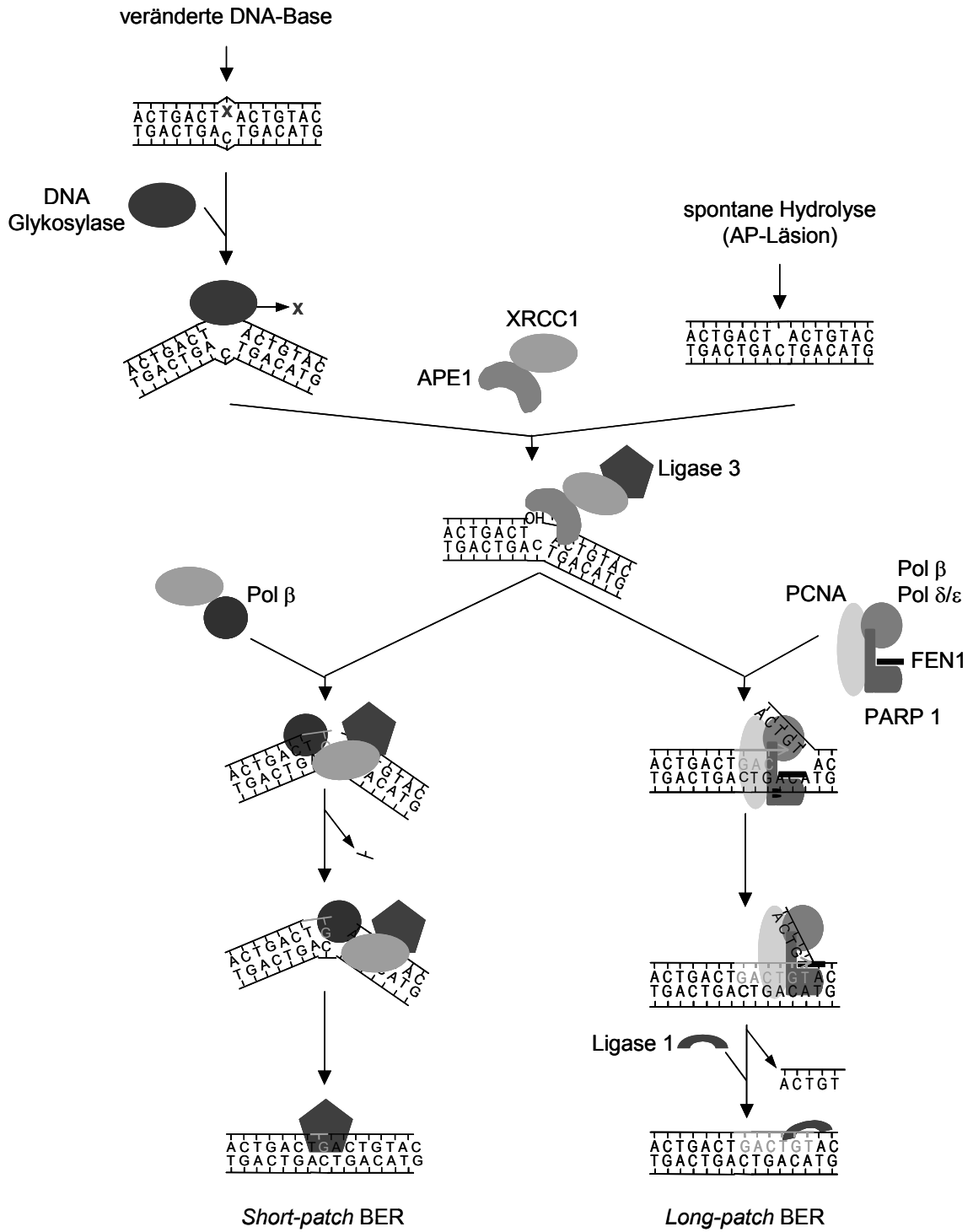


Abbildung 1.7: Die Basenexcisionsreparatur in Säugerzellen; zur Verfügung gestellt von J. P. Radicella.

In menschlichen Zellen kann die Basenexcisionsreparatur in zwei alternativen Wegen verlaufen; entweder der *short-patch* oder der *long-patch* BER. Bei der *short-patch* BER wird der verbliebene 5'-Phosphatrest durch die dRP-Lyase-Aktivität der DNA-Polymerase β entfernt und die Ein-Nukleotid-Lücke aufgefüllt. Der DNA-Strang

wird dann durch den DNA-Ligase III/XRCC1-Komplex verschlossen. XRCC1 stellt dabei die Verbindung zwischen der DNA-Polymerase β und der DNA-Ligase III her, wodurch deren Aktivität gesteigert wird (Abbildung 1.7 links) (**Bhattacharyya und Banerjee 2001**).

Alternativ zur *short-patch* BER kann die Reparatur einer modifizierten Base auch über einen anderen Mechanismus, die *long-patch* BER, erfolgen (Abbildung 1.7 rechts). Dieser Reparaturweg wird meist dann genutzt, wenn das entstandene 5'-Ende durch einen Zuckerrest blockiert ist und die DNA-Polymerase β deshalb nicht einschneiden kann (**Nilsen und Krokan 2001; Gary et al. 1999**). Unter Verdrängung des alten Stranges erfolgt dann eine Neusynthese von zwei bis acht Nukleotiden entweder durch die DNA-Polymerase β oder, wesentlich häufiger, durch die DNA-Polymerasen δ und ϵ . Zumindest im letzteren Fall sind als zusätzliche Faktoren Replikationsfaktor C (RFC) und PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) beteiligt (**Stucki et al. 1998**). Letzterer aktiviert die *flap*-Endonuklease (FEN1), was ein Abschneiden des verdrängten alten Stranges bewirkt (**Nilsen und Krokan 2001; Gary et al. 1999; Matsumoto et al. 1999; Pascucci et al. 1999; Klungland und Lindahl 1997**) und so erlaubt, dass die DNA-Ligase I, die ebenfalls mit PCNA interagiert (**Levin et al. 1997**), die Reparatur durch Verschließen des verbliebenen Strangbruchs beenden kann. Da die *long-patch* BER auch in DNA-Polymerase- β -defizienten Zellen reibungslos abläuft, wird angenommen, dass hauptsächlich die DNA-Polymerasen δ und ϵ an diesem Reparaturweg beteiligt sind (**Fortini et al. 1998; Sobol et al. 1996**). Experimente von **Otterlei et al. (1999)** weisen außerdem darauf hin, dass die *long-patch* BER parallel mit der Replikation abläuft.

Außer den Basenmodifikationen werden von der BER auch oxidative Einzelstrangbrüche, die 3' eine blockierende Gruppe (zum Beispiel einen Phosphoglycolatester) haben und daher nicht direkt durch die DNA-Ligase verschlossen werden können, repariert (**Demple und DeMott 2002; von Sonntag 1987**).

Die Erkennungsspektren einiger bakterieller Reparaturenendonukleasen bzw. menschlicher DNA-Glykosylasen sind in Tabelle 1.2 zusammengestellt.

Tabelle 1.2: Erkennungsspektren einer Auswahl menschlicher und bakterieller (nach Epe 1995) DNA-Glykosylasen; ergänzt durch Angabe der Chromosomenlokalisierung beim Menschen.

Bakterielles Enzym	Fpg	Endo III	Endo IV	Exo III	T4 Endo V	Endo VIII
Menschliches funktionelles Homolog	hOgg1	hNth ^a	-- ^b	Ape1	-- ^b	NEIL1-3
Chromosomenlokalisierung	3p26.2	16p13.2-13		14q11.2-12		15q11-q12
AP-Läsion						
Regulär	+	+	+	+	+	+
1'-oxidiert	-	-	+	+	-	+
4'-oxidiert	+	+	+	(+) ^c	+	+
Basenmodifikation						
8-Hydroxyguanin	+	-	-	-	-	-
FaPy-Guanin	+	(+) ^d	-	-	-	+
FaPy-Adenin	(+) ^e	(+) ^d	-	-	-	+
5,5-Dihydropyrimidine	-	+	-	-	-	+
Pyrimidindimere	-	-	-	-	+	-

^a anderer Name für Thymidinglykol-DNA-Glykosylase

^b kein menschliches Homolog

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

^d nicht prozessiert von Endo III

^e nicht prozessiert von hOgg1

Die 8-Hydroxyguanin-DNA-Glykosylase der Pro- bzw. Eukaryoten soll ausführlicher in Kapitel 1.4.2.1 besprochen werden.

Das Nth-Protein (**Endonuklease III**) wurde zuerst als eine Endonuklease identifiziert, das vorwiegend DNA schneidet, die durch γ -Strahlung, UV-Licht und freie Radikale geschädigt wurde (**Gros et al. 2002; Demple und Linn 1980**). Das Enzym besitzt eine breite Substratspezifität für Pyrimidine mit gesättigtem, geöffnetem und fragmentiertem Ring (**Gros et al. 2002; Dizdaroglu et al. 1993**). Der Einschnitt des Nth-Proteins an AP-Läsionen geschieht durch seine assoziierte AP-Lyase-Aktivität, durch die die Phosphodiestergruppe durch β -Elimination gespalten wird. Dabei entstehen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylreste, die für die Reparatur weiter prozessiert werden müssen (**Kim und**

Linn 1988). Die Aktivität des Enzyms wird durch XPG, einer Endonuklease, die an der Nukleotidexcisionsreparatur beteiligt ist, gesteigert (**Bessho 1999**).

Das Nfo-Protein (**Endonuklease IV**) ist eine induzierbare, EDTA-resistente AP-Endonuklease, deren Aktivität aber nur 5 % der Gesamt-AP-Endonuklease-Aktivität in *E. coli* ausmacht. Das Protein besitzt mehrere Enzymaktivitäten: AP-Endonuklease-, 3'-Phosphatase- und eine 3'-Phosphoglycoaldehyddiesteraseaktivität (**Ljungquist 1977**).

Die bedeutendste menschliche AP-Endonuklease Ape1 (**Exonuklease III** oder Xth) wurde unabhängig voneinander als AP-Endonuklease (**Demple et al. 1991; Robson und Hickson 1991**) und als Redoxregulator für Transkriptionsfaktoren (**Xanthoudakis et al. 1992**) identifiziert. Zusätzlich zur seiner 5'-AP-Endonuklease-Aktivität hat das Enzym eine 3' → 5'-Exonuklease- (**Chou et al. 2000**), eine Phosphodiesterase-, 3'-Phosphatase-, eine RNase-H- (**Rothwell et al. 1997**) sowie eine 3'-Mismatch-Exonuklease-Aktivität (**Chou und Cheng 2002**). Diese zusätzlichen Enzymaktivitäten sind jedoch um Faktor drei geringer als die AP-Endonuklease-Aktivität. Ape1 spielt eine zentrale Rolle in der BER; sie kann sowohl mono- als auch bifunktionelle Glykosylasen stimulieren (**Hill et al. 2001; Vidal et al. 2001a**). Zusätzlich interagiert Ape1 mit der DNA-Polymerase β (**Bennett et al. 1997**). Diese Interaktion ermöglicht der DNA-Polymerase 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 Pyrimidindimer-DNA-Glykosylase **T4 Endonuklease V** ist spezifisch für Cyclobutanpyrimidindimere (**Yasuda und Sekiguchi 1976**). Das Enzym löst hydrolytisch die 5'-Glycosylbindung in UV-geschädigter DNA und schneidet dann mittels seiner DNA-Lyase-Aktivität die DNA ein (**Minton et al. 1975**).

Bei der Charakterisierung geschädigter DNA kann man sich die Substratspezifität der verschiedenen Reparaturenukleasen experimentell zu Nutze machen. Die durch die Aktivität der Reparaturenukleasen gebildeten Einzelstrangbrüche können mit der alkalischen Elution (2.12) und dem PM2-DNA-Relaxations-Assay (2.13) quantifiziert werden. So können die gereinigten Enzyme als Sonden zur Charakterisierung von DNA-Modifikationen eingesetzt werden.

1.4.2.1 Reparaturenzyme für 8-Hydroxyguanin

Aufgrund des hohen mutagenen Potentials von 8-Hydroxyguanin gibt es verschiedene Mechanismen, durch die Zellen die Oxidationsprodukte des Guanins entfernen können. Die Bedeutung dieser Mechanismen spiegelt sich in deren Konservierung während der Evolution vom Prokaryoten bis zum Menschen wider.

In *E. coli*:

In *E. coli* gibt es ein gut funktionierendes Verteidigungssystem, bestehend aus drei Proteinen, gegen 8-oxoG: Die Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg-Protein oder MutM) entfernt effizient 8-oxoG wenn dieses mit C gepaart ist. Falls diese Reparatur nicht stattfindet und bei der Replikation ein A gegenüber 8-oxoG eingebaut wird, entfernt das Reparaturenzym MutY das fehlgepaarte A. Um die Gefahr von Mutationen durch 8-oxoG-Addukte weiter zu verringern, hydrolisiert das Enzym MutT 8-oxodGTP im Nukleotid-Pool zu 8-oxodGMP, so dass dieses während der Replikation nicht gegenüber A eingebaut werden kann (**Wallace 2002**).

Das Fpg-Protein ist eine bifunktionelle Glykosylase, die mit einer AP-Lyase-Aktivität (**Bailly et al. 1989; O'Connor und Laval 1989**) und einer 5'-dRPase (**Graves et al. 1992**) ausgestattet ist. Das Enzym erkennt eine Reihe von oxidativ modifizierten Purinen (**D'Ham et al. 1999; Jurado et al. 1998; Hatahet et al. 1994; Boiteux et al. 1990**). Am carboxyterminalen Ende des Proteins befindet sich ein Zink-Finger-Motiv, das für seine Bindung an die DNA und für seine katalytische Aktivität Voraussetzung ist (**O'Connor et al. 1993**).

MutY ist eine bifunktionelle DNA-Glykosylase, die A gegenüber G, C (**Tsai-Wu et al. 1991; Michaels et al. 1990**), 8-oxoG und 8-oxoA entfernt. Die Spezifität des Enzyms für 8-oxoG ist auf seine C-termiale Domäne zurückzuführen (**Chmiel et al. 2001**). Seine katalytische Aktivität wird durch Anwesenheit der AP-Endonukleasen Nfo und Xth stark erhöht (**Gros et al. 2002; Pope et al. 2002**).

Die große Bedeutung der Proteine Fpg, MutY und MutT für die Integrität der DNA wird bei der Betrachtung der Phänotypen, die durch Inaktivierung des entsprechenden Gens entstehen, deutlich. Fpg-defiziente *E. coli* sind nicht überempfindlich gegenüber Oxidantien, aber schwache Mutatoren (**Michaels et al. 1992; Cabrera et al. 1988**). Inaktiviert man zusätzlich das *mutY* in den *fpg*-Mutanten erhält man einen starken Mutatorphänotyp, der 400mal stärker als der eines Wild-Typ-Stammes ist. Dabei

dominieren G:C → T:A Transversionen, die sich auf 8-oxoG zurückführen lassen, das Mutationsspektrum (**Kuipers et al. 2000; Michaels et al. 1992**). Die Inaktivierung des *mutT*-Gens in *E.coli* führt zu einem Stamm mit einer hohen Anzahl an A:T → G:C Transversionen, die ebenfalls auf die Fehlpaarung von A mit 8-oxoG zurückzuführen sind (**Schaaper 1996**).

In Säugerzellen:

Das menschliche und das murine Homolog der 8-Hydroxyguanin-DNA-Glykosylase wurden 1997 unter Zuhilfenahme der Hefe-*ogg1*-Sequenz gleichzeitig von mehreren Arbeitsgruppen kloniert und charakterisiert (**Aburatani et al. 1997; Arai et al. 1997; Lu et al. 1997; Radicella et al. 1997; Bjoras et al. 1997; Roldan-Arjona et al. 1997; Rosenquist et al. 1997; Tani et al. 1998**). Die Analyse der menschlichen cDNA-Sequenzen ergab, dass zwei alternative Spleißprodukte der mRNA mit offenem Leserahmen vorliegen, die für die α - bzw. die β -Form von hOgg1 kodieren. Ein Vergleich der α -hOgg1- mit der β -hOgg1-Sequenz zeigte, dass die ersten 316 Aminosäuren am Aminoterminus, die ein *mitochondrial target signal* enthalten, identisch sind, das carboxyterminale Ende aber völlig unterschiedlich ist (**Boiteux und Radicella 2000; Boiteux und Radicella 1999**). Durch Immunohistochemie konnte später gezeigt werden, dass die α -Form anhand der carboxyterminalen *nuclear localization sequence (NLS)* in den Zellkern transportiert wird, während die β -Form für die Mitochondrien bestimmt ist (**Boiteux und Radicella 1999; Takao et al. 1998**). Neben der *NLS*-Sequenz besitzt das menschliche *ogg1*-Gen ein weiteres hoch konserviertes Motiv: das *helix-hairpin-helix*-Motiv, das charakteristisch für das aktive Zentrum der DNA-Glykosylasen/AP-Lyase der Endonuklease-III-Familie ist. Eine Expression des *ogg1*-Gens konnte anhand *Northern-Blot*-Analyse in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Aus der Promotorstruktur des Gens lässt sich schließen, dass *hoggl* ein so genanntes *housekeeping gene* ist (**Dhénaut et al. 2000**), das jedoch durch oxidativen Stress induziert werden kann (**Rusyn et al. 2000; Lee et al. 1996**). Die Expression des *ogg1*-Gens in verschiedenen Geweben war sehr unterschiedlich (**Boiteux et al. 1998; Rosenquist et al. 1997**).

Die Substratspezifität der isolierten nukleären hOgg1-Form wurde an γ -bestrahlter DNA und an modifizierten Oligodesoxyribonukleotiden untersucht. Das Enzym schneidet demnach vorwiegend an 8-oxoG, FaPy-Guanin und AP-Läsionen, falls diese mit C gepaart sind. Während des Einschnitts durch hOgg1 an diesen Substraten kommt es zur

Ausbildung einer Schiff'schen Base zwischen der Aminogruppe des Lysins 249 im aktiven Zentrum des Enzyms und dem C1 der Desoxyribose, die das 8-oxoG trägt. Die modifizierte Base kann dann abgespalten werden (**Bruner et al. 2000**).

Beim Menschen konnten auch die zu *mutY* und *mutT* aus *E. coli* homologen Gene *hmyh* und *hmth1* nachgewiesen werden. hMYH ist eine monofunktionelle Glykosylase, die wie das Homolog aus *E. coli* A entfernt, wenn es gepaart mit 8-oxoG vorliegt. Das Enzym ist in den Mitochondrien und im Zellkern lokalisiert (**Nakabeppu 2001; Ohtsubo et al. 2000**). Das Enzym interagiert mit Enzymen der *long-patch* BER (**Parker et al. 2001**) und der *mismatch*-Reparatur (**Gu et al. 2002**).

hMTH1 ist ein Enzym, das oxidierte Purinnukleotidtriphosphate, wie 8-oxoG, 8-oxoA und 2-Hydroxyadenin, hydrolysiert (**Nakabeppu 2001; Fujikawa et al. 1999**). Auf diese Weise entfernt hMTH1 8-oxoGTP aus dem Nukleotid-Pool der Zelle und verhindert damit dessen Einbau in die DNA durch DNA-Polymerasen während der Replikation oder Reparatur.

Homozygote *ogg*^{-/-} Mäuse zeigen nur einen schwachen Mutatorphänotyp in bestimmten Geweben (**Epe 2002, Klungland et al. 1999**). Dieser Befund stimmt mit den Daten aus *fpg*-mutierten *E. coli* überein. Mäuse, denen das *ogg1*- und das *myh*-Gen fehlt, haben ebenfalls keinen Phänotyp (**Friedberg und Meira 2000**). Dies lässt darauf schließen, dass es in Säugern -im Gegensatz zu *E. coli*- einen zusätzlichen Reparaturmechanismus für 8-oxoG gibt (**Wallace 2002**).

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Reparaturwegen für 8-oxoG gibt es noch weitere Reparaturmechanismen, die dem mutagenen Potential des 8-oxoG entgegenwirken. Zu diesen Reparaturmechanismen gehören die transkriptionsgekoppelte Reparatur (siehe 1.4.4) und möglicherweise auch die Nukleotidexcisionsreparatur (**Gellon et al. 2001**; siehe 1.4.3).

1.4.3 Nukleotidexcisionsreparatur (*global genome repair*)

Die Nukleotidexcisionsreparatur (NER) repariert überwiegend DNA-Schäden, die durch ihre Größe die Helixstruktur der DNA stören und damit die Replikation und die Transkription blockieren. Die NER kann ein breites Spektrum strukturell nicht verwandter *bulky-lesions*, wie durch UV-Strahlung induzierte Pyrimidindimere und (6-4)-Photoproducte, chemische Addukte aber auch modifizierte Basen erkennen und entfernen (**Ura und Hayes 2002; de Laat et al. 2000; Friedberg et al. 1995**). Der Prozess der NER

ist hoch konserviert und verläuft prinzipiell in vier Schritten: (i) Schadenserkennung, (ii) Einschneiden des Stranges, der den Schaden enthält, 3' und 5' neben der veränderten Base, (iii) Reparatur-Synthese durch DNA-Polymerasen und (iv) die Ligation der DNA. In menschlichen Zellen werden für die Schadenserkennung und das Einschneiden mindestens sechs Enzymkomplexe benötigt. Die Reparatursynthese und die Ligation hängen von weiteren Faktoren ab (Abbildung 1.8).

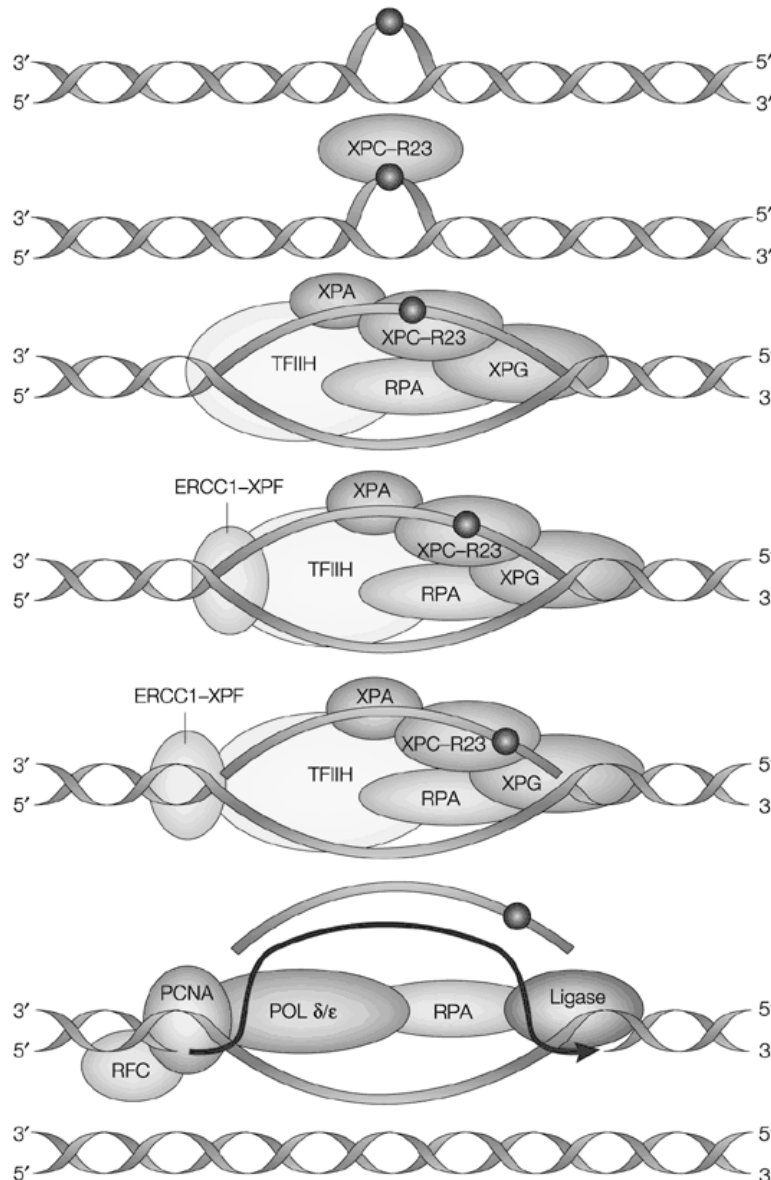


Abbildung 1.8: Die Nukleotidexcisionsreparatur in nicht transkribierten Bereichen des Genoms (Friedberg 2001).

Im Folgenden sollen die Schritte der NER näher betrachtet werden: Der XPC-hHRAD23-Komplex erkennt und bindet die geschädigte Base, was zu einer Konformationsänderung der DNA führt (**Janicijevic et al. 2003; Wood 1999**). Als nächstes binden XPA und RPA (**Batty und Wood 2000**). Dieser Schadenserkenkung folgt eine schrittweise Anordnung weiterer Proteine der NER, darunter TFIIH, bestehend aus sechs Untereinheiten inklusive der ATP-abhängigen DNA-Helikasen XPB und XPD, und die Endonukleasen XPG und ERCC1-XPF, die die einzelsträngige DNA 3' bzw. 5' neben dem Schaden einschneiden, so dass ein Oligonukleotid mit einer Länge zwischen 24 und 32 Nukleotiden entsteht (**Winkler et al. 2001**). Anschließend findet komplementär zum Gegenstrang die Reparatursynthese durch den DNA-Polymerase- δ/ϵ -RPA-RFC-Komplex statt. Zum Schluss wird die Lücke durch DNA-Ligase I verschlossen (**Friedberg 2001**).

1.4.4 Transkriptionsgekoppelte Reparatur

Mitte der 1980er Jahre beobachteten P. Hanawalt und seine Mitarbeiter, dass in Säugergenen, die aktiv transkribiert werden, die Reparatur schneller abläuft als in nicht transkribierten Regionen des Genoms. Weitere Untersuchungen zeigten, dass eine erhöhte Reparaturgeschwindigkeit in transkribierten Regionen des Genoms dafür verantwortlich ist. Diese Reparatur wird als transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR) bezeichnet (Abbildung 1.9) (**Svejstrup 2002**).

Die TCR benötigt prinzipiell die gleichen Proteine wie die globale Reparatur (siehe 1.4.3).

Die Schadenserkennung erfolgt bei der TCR nicht über XPC, sondern über die Blockade des RNA-Polymerase-II-Komplexes durch den DNA-Schaden (**Tsutakawa und Cooper 2000**). Dieser Vorgang benötigt zusätzliche Faktoren (**Le Page et al. 2000 a und b**), wie die Proteine Csa und Csb, die zwischen der gestoppten RNA-Polymerase II und den restlichen Reparaturenzymen vermitteln. Dabei besteht die Aufgabe dieser Proteine vor allem darin, die RNA-Polymerase II vom geschädigten Strang zu entfernen, damit der DNA-Schaden zugänglich für Proteine der NER wird (**van den Boom et al. 2002; Le Page et al. 2000a**). Die Entfernung des Schadens und die sich anschließende Reparatursynthese und Ligation verlaufen dann wie bei der NER (1.4.3) beschrieben.

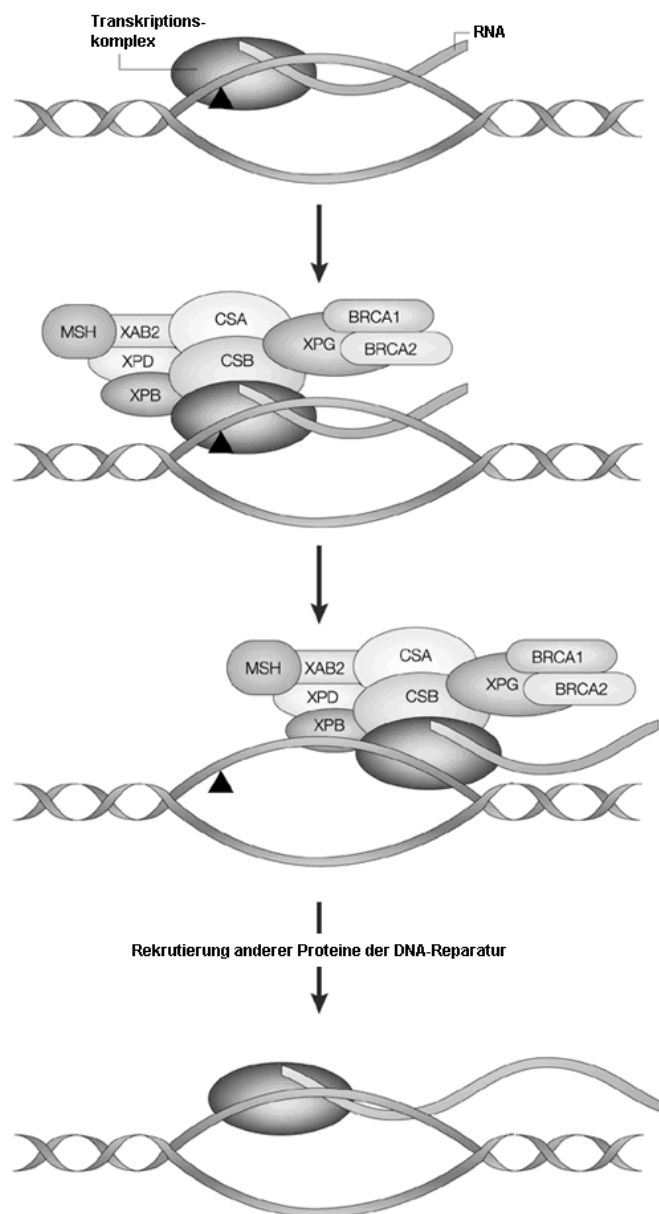


Abbildung 1.9: Die transkriptionsgekoppelte Reparatur in Säugerzellen. (Friedberg 2001).

Eine Reihe schwerer Erkrankungen des Menschen, wie Xeroderma pigmentosum, Cockayne Syndrom und Trichothiodystrophie, sind auf einen Ausfall oder einen Defekt der Proteine der NER oder der TCR zurückzuführen. Dies bedeutet im Falle der Xeroderma pigmentosum ein erhöhtes Krebsrisiko verbunden mit einer Überempfindlichkeit gegen Sonnenlicht und eine erhöhte Sterblichkeit. Die Erkrankungen Cockayne Syndrom und Trichothiodystrophie gehen nicht mit einer erhöhten Krebsinzidenz einher. Sie sind durch schwere neurologische Schäden gekennzeichnet.

1.4.5 Postreplikative Reparatur (*mismatch*-Reparatur)

Die Aufgabe der *mismatch*-Reparatur (MMR) besteht darin, Basenfehlpaarungen und Insertionsschleifen, die durch die Replikation entstanden sind, zu entfernen (**Peltomäki 2003; Marti et al. 2002; Hsieh 2001; Kolodner und Marsischky 1999**). Sowohl Pro- als auch Eukaryoten verfügen über eine postreplikative Reparatur. Der Mechanismus dieser Reparatur soll anhand des gut charakterisierten methyl-gesteuerten MutHLS-Systems von *E. coli* kurz erläutert werden (Abbildung 1.10).

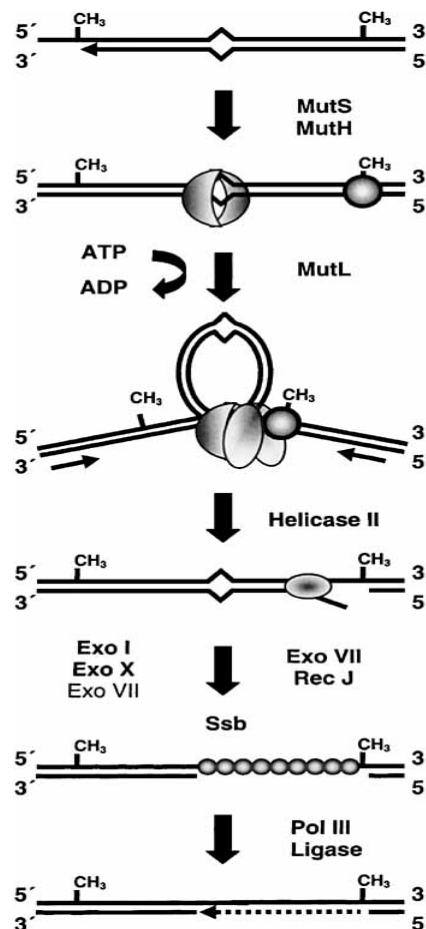


Abbildung 1.10: Die methyl-gesteuerte *mismatch*-Reparatur in *E. coli* (**Marti et al. 2002**).

Die Voraussetzung der postreplikativen Reparatur ist die Unterscheidbarkeit des neu synthetisierten DNA-Stranges vom Elternstrang. In *E. coli* wird dies 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*, schneiden den neuen Strang ein und ermöglichen damit weiteren Enzymen die vollständige Reparatur des *mismatch*-enthaltenden DNA-

Stranges. Mutationen in *mutS*, *mutH* und *mutL* führen in *E. coli* zu Mutatorphänotypen, was die Bedeutung der MMR unterstreicht. Im Menschen konnten Homologe der Bakterienproteine MutS (MSH) und MutL (MLH) identifiziert werden. Mutationen in den dazugehörigen Genen führen aufgrund fehlender MMR zu Mutatorphänotypen und dadurch zu einer erhöhten Prädisposition für die Entwicklung von Tumoren.

1.4.6 Einzelstrangbruchreparatur

Einzelstrangbrüche (ssb) können auf unterschiedliche Weise in der DNA entstehen. Zum einen können reaktive Sauerstoffspezies und andere Elektrophile die DNA direkt angreifen und schädigen, zum anderen können Einzelstrangbrüche auch als Folge enzymatischer Aktivitäten während der BER oder der Replikation bzw. der Transkription entstehen (**Caldecott 2003**). Einzelstrangbrüche können - falls sie nicht repariert werden - in Doppelstrangbrüche überführt werden, die ein großes mutagenes und zytotoxisches Potential haben. Da für Einzelstrangbrüche sehr effiziente Reparaturmechanismen existieren, wird ihre Toxizität als gering eingestuft (**Caldecott 2003; Caldecott 2001**).

Die Reparatur indirekter Einzelstrangbrüche, die zum Beispiel während der BER entstehen, wurde bereits in Kapitel 1.4.2 beschrieben, ist jedoch in Abbildung 1.11 rechts nochmals detailliert dargestellt. Für die direkt in die DNA eingefügten Einzelstrangbrüche, die meistens durch Zuckerfragmentierung und Abspaltung der Base auftreten, werden zwei Reparaturmechanismen diskutiert; die *short-patch* und die *long-patch* Reparatur (Abbildung 1.11). In beiden Fällen geht man davon aus, dass die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP 1) an den Einzelstrangbruch bindet, aktiviert wird und daraufhin negativ geladene ADP-Ribose-Polymere synthetisiert (**Wilson et al. 1998; de Murcia und Menissier de Murcia 1994**). Durch diese negativ geladenen Polymere wird der XRCC1/Ligase-III-Komplex an den Schaden rekrutiert. Daraufhin dissoziiert die PARP 1 vom Einzelstrangbruch ab und XRCC1 kann eine Plattform für weitere Reparaturproteine ausbilden. Falls der Einzelstrangbruch ohne 3'-OH-Gruppe und 5'-Phosphatrest vorliegt, muss er zuerst in einen Einzelstrangbruch mit diesen Gruppen überführt werden, um weiter prozessiert werden zu können. Dies kann durch die Lyase-Funktion der DNA-Polymerase β oder durch Ape1 bzw. Polynukleotidkinase (**Jilani et al. 1999; Karimi et al. 1999**) erreicht werden. Sobald die 3'-OH-Konformation des Einzelstrangbruchs hergestellt ist, kann die Reparatursynthese durch die DNA-Polymerase β (*short-patch* und *long-patch*) oder die DNA-Polymerasen δ bzw. ϵ (*long-patch*) und ihre

Hilfsproteine erfolgen. Anschließend werden die entstandenen Lücken durch die DNA-Ligasen I (*long-patch*) bzw. DNA-Ligase III (*short-patch*) verschlossen (Caldecott 2003).

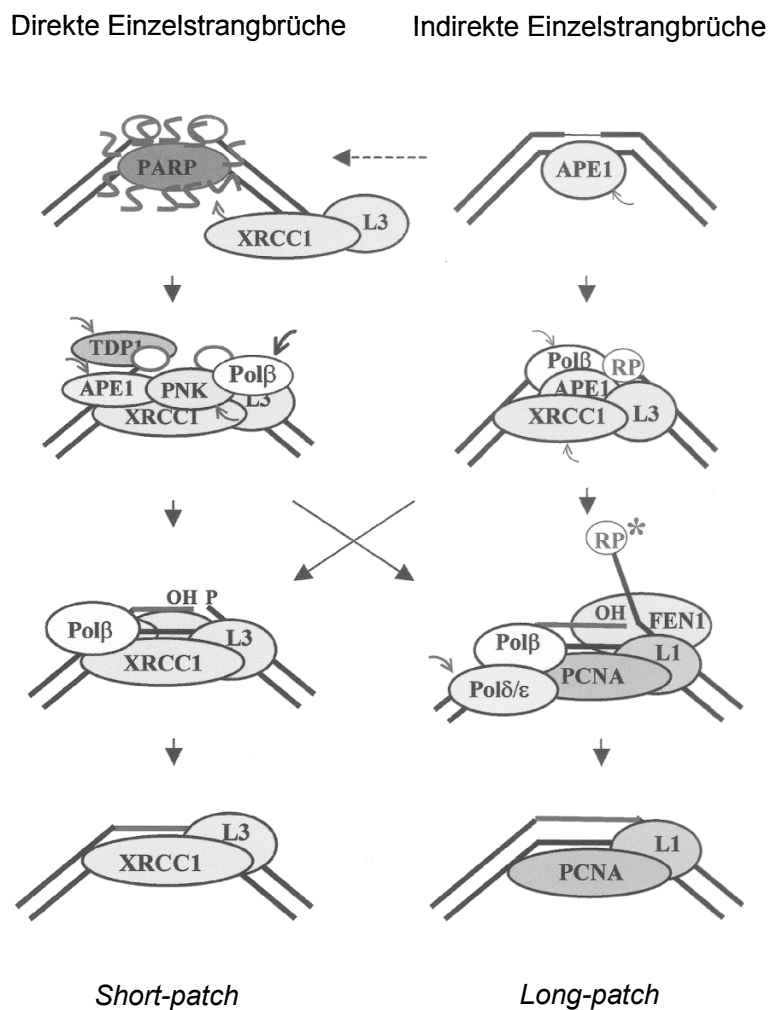


Abbildung 1.11: Modell für die Einzelstrangbruchreparatur in Säugerzellen (Caldecott 2003).

1.4.7 Die Rolle ausgewählter Hilfsproteine bei der DNA-Reparatur

In den folgenden Abschnitten soll näher auf einige Proteine eingegangen werden, die entweder die Aktivität anderer Proteine der DNA-Reparatur steigern bzw. die einzelnen Schritte der DNA-Reparatur koordinieren. Zu diesen sogenannten Hilfsproteinen zählen die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase, das Csb-Protein und das XRCC1-Protein.

1.4.7.1 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase

Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen sind eine Familie von Enzymen, die den Transfer von ADP-Ribose-Resten von NAD^+ auf Zielproteine katalysieren. Die am Besten charakterisierte PARP 1 ist ein nukleäres Protein, das an DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie möglicherweise andere DNA-Strukturen bindet. Durch diese DNA-Bindung wird PARP 1 aktiviert und heftet folglich Poly(ADP-Ribose)-Reste an Histone (**Althaus et al. 1994**), an verschiedene andere Proteine (**Pleschke et al. 2000**), die unter anderem an der DNA-Reparatur beteiligt sind, und sich selbst. Durch diese Automodifikation wird die katalytische Aktivität der PARP 1 beendet und diese dissoziiert von der DNA ab (**Bürkle 2001; Herceg und Wang 2001; Ziegler und Oei 2001; Shall und de Murcia 2000**).

Diese Aktivierung der PARP 1 durch Einzelstrangbrüche lässt eine Rolle dieses Enzyms in der Strangbruchreparatur vermuten. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die fehlende Poly(ADP)ribosylierung eine verlangsamte Einzelstrangbruchreparatur nach sich zieht (**Schreiber et al. 2002; Beneke et al. 2000; Durkacz et al. 1980**). Da Einzelstrangbrüche auch als Intermediate der BER (1.4.2) und der NER (1.4.3 und 1.4.4) auftreten, lässt sich auch hier ein Einfluss der PARP-Aktivität vermuten. Die Tatsache, dass die PARP 1 mit Proteinen, die an der BER beteiligt sind, direkt interagieren kann, stützt diese Vermutung (**Schreiber et al. 2002; Masson et al. 1998; Caldecott et al. 1996**). Anhand verschiedener *in vitro* Systeme konnte demonstriert werden, dass die PARP 1 die *long-patch* BER stimuliert (**Prasad et al. 2001; Dantzer et al. 2000**). Auch wird in DNA-Polymerase- β -defizienten Zellen die PARP 1 für die Ligation von Reparaturbrüchen benötigt (**Le Page et al. 2003**). Die genaue Rolle der PARP 1 bei der DNA-Reparatur *in vivo* ist bisher weitgehend ungeklärt.

Zellen, denen PARP 1 fehlt, zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber ionisierender Strahlung und Alkylantien sowie erhöhte genomische Instabilität (**Conde 2001; Herceg**

und Wang 2001). Außerdem wurde beobachtet, dass Zellen aus *parp-knockout* Mäusen ein verändertes Genexpressionmuster im Vergleich zu Wild-Typ-Zellen aufweisen (**Simbulan-Rosenthal et al. 2000**).

1.4.7.2 Csb-Protein

Das Csb-Protein gehört zur Familie der SWI2/SNF2-Proteine, die sieben Helikase-Motive, eine Region, die reich an sauren Aminosäuren ist und zwei *nuclear localization signals* (NLS) gemeinsam haben (**Tuo et al. 2002**). Trotz des Vorhandenseins dieser konservierten Motive konnte *in vitro* keine Helikase-Aktivität des Csb-Proteins an einzel- bzw. doppelsträngiger DNA nachgewiesen werden. Allerdings konnte eine intrinsische ATPase-Aktivität identifiziert werden (**Selby und Sancar 1997**).

Das Csb-Protein ist außer an der transkriptionsgekoppelten Reparatur (1.4.4) auch an der globalen Reparatur von 8-oxoG beteiligt. **Osterod et al. (2002)** zeigten, dass die Reparatur dieses DNA-Schadens in *csb^{-/-}*-Mausembryofibroblasten im Vergleich zum Wildtyp langsamer verläuft. Der Mechanismus, durch den das Csb-Protein in die globale Reparatur eingreift, ist bisher unbekannt. Zusätzlich zu den Reparaturdefekten kommt es in Csb-defizienten Zellen zu Störungen der Transkription und der Chromatinorganisation (**Kyng et al. 2003**).

1.4.7.3 XRCC1-Protein

Das XRCC1-Protein ist an der Reparatur von Einzelstrangbrüchen (1.4.6) und an der Basenexcisionsreparatur (1.4.2) beteiligt. XRCC1 wird in beiden Reparaturwegen als Plattformprotein beschrieben, das weitere Reparaturproteine an die Schadensstelle rekrutiert und dann durch Interaktion deren katalytische Aktivität steigert. Es konnte nachgewiesen werden, dass XRCC1 direkt mit der DNA-Polymerase β und der DNA-Ligase III interagieren kann und so diesen Komplex stabilisiert (**Caldecott et al. 2003; Nash et al. 1997; Caldecott et al. 1995**). Außerdem wurde von **Vidal et al. (2001a)** gezeigt, dass XRCC1 für die Koordination der ersten Schritte der BER verantwortlich ist, indem es mit der AP-Endonuklease 1 interagiert. Eine Interaktion zwischen XRCC1 und der PARP verläuft nicht nach dem oben genannten Aktivierungsmechanismus. **Masson et al. (1998)** beschrieben, dass XRCC1 mittels seiner BRCT-Domäne mit PARP interagiert und so dessen Aktivität senkt.

XRCC1-defiziente Zellen zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Alkylantien, ionisierender Strahlung, Wasserstoffperoxid und Camptothecin (**Thompson und West 2000**). Dies ist auf eine Anhäufung von Einzelstrangbrüchen und die dadurch verursachten Veränderungen im Genom (Translokationen und Deletionen) zurückzuführen (**Dominguez et al. 1998**). Außerdem kommen *XRCCI*^{-/-} Maus-Embryonen nicht über den siebten Tag der Embryonalentwicklung hinaus, da hohe Spiegel an Einzelstrangbrüchen nicht mit dem Leben vereinbar zu sein scheinen (**Tebbs et al. 1999**).

1.4.8 Die Bedeutung der DNA-Reparatur für die Kanzerogenese

Die Entwicklung normaler Zellen zu Tumorzellen ist ein progressiv ablaufender Prozess, der sich in mindestens drei Stufen einteilen lässt. In der ersten Phase wird die genomische DNA der Zellen direkt durch chemische, physikalische oder biologische Einflüsse irreversibel verändert (Initiation). Diese initiierten Zellen werden zunächst noch wie normale Zellen durch verschiedene Kontrollmechanismen, an denen unter anderen Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene beteiligt sind, am unkontrollierten Wachstum gehindert. Erst wenn diese Kontrollmechanismen durch weitere Mutationen ausgeschaltet werden, treten in den initiierten Zellen Veränderungen der Genexpression und schließlich der Zellproliferation und -differenzierung auf (Promotion). In dieser Phase spielen auch Substanzen eine Rolle, die selbst kein genotoxisches Potential besitzen, jedoch in der Lage sind, initiierte Zellen zum Wachstum und dadurch zur Tumorbildung zu stimulieren (Promotoren). Die nächste Phase der Tumorentstehung ist die Progression. Die prämaligene 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**). Generell sind die von Stufe zu Stufe führenden Prozesse verbunden mit einer großen Anzahl irreversibler Veränderungen in der Basensequenz des Genoms. Spontane Mutationen, die täglich in jeder Zellen auftreten, stellen mit einer Häufigkeit von etwa 10^{-10} Mutationen pro Nukleotid und Tag ein eher seltenes Ereignis dar. Daher kann die Bildung endogener Mutationen nicht alleine für die Krebsentstehung verantwortlich sein. Es wird deshalb angenommen, dass es schon sehr früh während der Kanzerogenese zur Ausbildung eines Mutatorphänotyps kommt, der die Entstehung weiter Mutationen begünstigt (**Loeb et al. 2003; Loeb 2001**). So können Mutationen in Genen, die an der DNA-Reparatur und an der Replikation beteiligt sind, zur

Funktionsänderung oder zum Funktionsverlust des entsprechenden Proteins führen (Mutatorhypothese).

Es ist bekannt, dass der Ausfall bestimmter, an der DNA-Reparatur beteiligter, Gene ein erhöhtes Krebsrisiko zur Folge hat. So weiß man, dass der Ausfall des MSH2-Proteins, das an der *mismatch*-Reparatur (1.4.5) beteiligt ist, zu einer erblichen Form des Dickdarmkrebses (HNPCC: *hereditary non-polyposis colon cancer*) führt. Da der Ausfall der Reparaturgene *fpg* und *mutY* in *E. coli* zu einem Mutatorphänotyp führt (1.4.2.1), liegt die Vermutung nahe, dass ein Funktionsverlust des funktionell homologen Enzyms hOgg1 im Menschen ähnliche Konsequenzen wie der Ausfall des MSH-Proteins haben könnte. Diese Hypothese wird durch Befunde gestützt, die zeigen, dass bestimmte Krebsarten des Menschen mit einem Verlust des Genabschnitts von *hogg1* (*LOH: loss of heterozygosity*) (**Wikman et al. 2000; Audebert et al. 2000; Chevillard et al. 1998**) oder mit inaktivierenden Mutationen in *hogg1* (**Xu et al. 2002**) einhergehen. Ein weiteres Indiz für die Wichtigkeit der Reparatur oxidativer Basenmodifikationen, vor allem des 8-oxoG, ergibt sich aus der Analyse der Mutationsmuster im Tumorsupressorgen *p53* verschiedener Tumortypen. In verschiedenen Krebsarten konnten vorwiegend G:C → T:A Transversionen, die auf nicht repariertes 8-oxoG zurückzuführen sind, als Ursachen der Mutationen in *p53* identifiziert werden (**Wiseman und Halliwell 1996**).

1.5 Ziel der Arbeit

Eine funktionierende DNA-Reparatur benötigt eine Vielzahl an Proteinen. Einige dieser Proteine sind unverzichtbare Bestandteile der verschiedenen DNA-Reparaturwege, da ihr Ausfall in der Regel zu einer Störung des entsprechenden Reparaturweges führt. Zusätzlich werden für den reibungslosen Ablauf der DNA-Reparatur noch weitere sogenannte Hilfsproteine, wie die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1, XRCC1 und Csb, benötigt, die die DNA-Reparatur wahrscheinlich entweder koordinieren oder stimulieren. Die genaue Funktion dieser Hilfsproteine ist jedoch noch weitgehend ungeklärt, nur zum Teil kennt man die Folgen ihrer Abwesenheit. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit die Rolle dieser Hilfsproteine bei der DNA-Reparatur in Säugerzellen geklärt werden.

Zunächst sollte der Einfluss der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) auf die Reparatur verschiedener DNA-Modifikationen untersucht werden. Anhand eines Zellmodells zur *trans*-dominanten PARP-Hemmung (**Küpper et al. 1995**) sollte der Einfluss der Poly(ADP-Ribosyl)ierung auf die Reparatur oxidativer Basenmodifikationen geklärt werden. Im Anschluss daran wurden mit demselben Zellmodell die Auswirkungen der PARP-Aktivität auf die Reparatur von Pyrimidindimeren und Einzelstrangbrüchen untersucht. Um Informationen über mögliche Mechanismen des PARP-Einflusses auf die DNA-Reparatur zu erhalten, wurde in verschiedenen Zelllinien, die in unterschiedlichen DNA-Reparaturgenen defizient waren, die katalytische PARP-Aktivität durch einen Hemmstoff unterdrückt.

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit, war die Untersuchung des Einflusses des XPA-Proteins auf die *back-up* Reparatur von 8-Hydroxyguanin in Ogg1-defizienten Zellen, unabhängig von seiner bekannten Rolle in der Nukleotidexcisionsreparatur. Anhand von Fibroblasten des Menschen, denen zuvor ein hOgg1-antisense transfiziert worden war, sollte geklärt werden in welchem Maße ein Defekt des XPA-Proteins zu einer Veränderung der Steady-State-Spiegel, der Empfindlichkeit gegenüber Oxidantien und der Reparaturgeschwindigkeit oxidativer Basenmodifikationen in diesen Zellen führt.

Schließlich sollte untersucht werden, ob in XRCC1-defizienten Zellen, die defekt in der Einzelstrangbruchreparatur sind, eine AP-Endonuklease 1-Überexpression zu einer Verbesserung der Reparatur von Einzelstrangbrüchen sowie zu einer Veränderung der Steady-State-Spiegel dieser Modifikationen und der Empfindlichkeit der Zellen gegenüber der Induktion von Einzelstrangbrüchen führt. Dazu wurde in XRCC1-defiziente und -profiziente Zellen ein Vektor zur Ape1-Überexpression eingebracht.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

1 kb DNA-Längenstandard für Agarosegele	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Acrylamid	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma Aldrich, Steinheim
Antipain	Sigma Aldrich, Steinheim
Aprotinin	Sigma Aldrich, Steinheim
Bacto-Agar	Difco Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Frankreich
Bacto-Trypton (Pepton)	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Bisbenzimid Hoechst Nr. 33258	Sigma Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Dexamethason	Sigma Aldrich, Steinheim
Dextran 500	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Dimethylsulfoxid	Sigma Aldrich, Steinheim
Dithioerythriol	Sigma Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol	Sigma Aldrich, Steinheim
DPQ	Alexis Biochemicals, Grünberg
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethylenglykol	Roth, Karlsruhe
Full Range Rainbow™, Molekulargewicht- Standard für SDS-Gele	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Glycerol	VWR International GmbH, Darmstadt
Glycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Harnstoff	Sigma Aldrich, Steinheim
Hefeextrakt	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
IPTG	Sigma Aldrich, Steinheim

Kristallviolett	Sigma Aldrich, Steinheim
Leupeptin	Sigma Aldrich, Steinheim
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Methylmethansulfonat	Sigma Aldrich, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	BioRad, München
Natriumdodecylsulfat	Roth, Karlsruhe
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma Aldrich, Steinheim
Polyethylenglycol 6000	Serva, Heidelberg
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
Rinderserumalbumin	Sigma Aldrich, Steinheim
Ro 19-8022	Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
<i>tertiäres</i> Butylhydroperoxid	VWR International GmbH, Darmstadt
TEAH	VWR International GmbH, Darmstadt
Trichloracetat	Roth, Karlsruhe
Tween 20™	BioRad, München
Wasserstoffperoxid	Sigma Aldrich, Steinheim

Standardchemikalien, wie Salze und Lösungsmittel, sind nicht aufgeführt. Sie wurden, wenn nicht ausdrücklich im Text angegeben, von den Firmen VWR International GmbH, Darmstadt, Roth, Karlsruhe oder Sigma Aldrich, Steinheim bezogen.

2.2 Radiochemikalien

[γ -³²P]ATP in wässriger Lösung (spezifische Aktivität 110 TBq/mmol) wurde von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg bezogen.

2.3 Enzyme, DNA und Primer

AP-Endonuklease Ape1	zur Verfügung gestellt von J. Pablo Radicella (CEA, Fontenay-aux-Roses, Frankreich)
EcoRI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
Endonuklease IV	zur Verfügung gestellt von Bruce Demple (Harvard University, Cambridge USA)

Exonuklease III	Boehringer Mannheim, Mannheim bzw. Sigma Aldrich, Steinheim
Fpg-Protein	hergestellt als Rohextrakt aus <i>E. coli</i> JM 105 von Marcel Osterod nach Boiteux et al. 1990
NcoI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
Ogg1	zur Verfügung gestellt von Serge Boiteux (CEA, Fontenay-aux-Roses, Frankreich)
Pfu	Stratagene, Heidelberg
Proteinase K	Roth, Karlsruhe
T4 DNA Ligase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
T4 Endonuklease V	aus <i>E. coli</i> A 32480 plus ptac-denV; wurde isoliert von M. Pflaum bzw. Claudia Flohr und Ina Schulz, Mainz (vergleiche 2.15.2)
T4 Polynukleotidkinase	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
Taq DNA-Polymerase	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
XbaI	New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main
Kalbsthymus-DNA	Serva, Heidelberg
PM2-Plasmid-DNA	Präparation nach Salditt et al. 1972 durch Nicole Phoa und Ina Schulz, Mainz
34mer Oligonukleotid	zur Verfügung gestellt von Serge Boiteux (CEA, Fontenay-aux-Roses, Frankreich)
ECOAPF-Primer	zur Verfügung gestellt von J. Pablo Radicella (CEA, Fontenay-aux-Roses, Frankreich) 5'-CCGGAATTCATGCCGAAGCGTGGG AAAAAGG

XBAAPER-Primer	zur Verfügung gestellt von J. Pablo Radicella (CEA, Fontenay-aux-Roses, Frankreich) 5'-GCTCTAGAAGTGCTAGGTATAGGGT
OGG2-Primer	MWG-Biotech, Ebersberg 5'-CTGCGCTTTGCTGGTGGCTCCTG
OGG3-Primer	MWG-Biotech, Ebersberg 5'-TCCATCCCGTGCCCTCGCTCTG

2.4 Bakterienstämme und Vektoren

E. coli A32480 (uvrA, recA, F'lac IQ1)

plus ptac-denV(Ap^r)

zur Verfügung gestellt von Leon Mullenders (Leiden, Niederlande)

E. coli DH5 α

überlassen von J. Pablo Radicella (CEA, Fontenay-aux-Roses, Frankreich)

pcDNA 3,1/Myc-His[©] A MCS

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

pEGFP-N1

Clontech, Heidelberg

2.5 Antikörper

Der polyklonale Kaninchen-Antikörper gegen hOgg1 und der *horse-raddish-peroxidase*-gekoppelte Antikaninchen-Ziegenantikörper IG NA 934 B 110 475 waren ein Geschenk von S. Boiteux, CEA, Fontenay-aux-Roses, Frankreich.

Der Antikörper 10H gegen Poly(ADP-Ribose) wurde freundlicherweise von Prof. A. Bürkle, Konstanz zur Verfügung gestellt.

Der Ziegenantikörper gegen Maus-IGG (Fab-spezifisch; FITC-Konjugat) wurde von Sigma Aldrich, Steinheim bezogen.

2.6 Hilfsmaterialien

Bio-Rad Protein Assay[®]

BioRad, München

Western-Blocking-Reagent

Roche Diagnostics, Mannheim

CM Sephadex C25

Sigma Aldrich, Steinheim

Dialyseschläuche Spectra Por	Serva; Heidelberg
ECL+Plus™	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Eindeckmedium Vectashield® mit DAPI	Alexis Biochemicals, Grünberg
Entwicklungskassetten	AGS GmbH, Heidelberg
Filterhalter Swinnex SX 2500	Millipore, Holstein, Frankreich
GFX™ PCR DNA and Gel Purification Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Hyperfilm™ ECL™	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Isopore™ Membranfilter, Typ 2.0 µm TTTP	Millipore, Eschborn
Nitrocellulosemembran Hyperbond P	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
QIAshredder™	Qiagen, Hilden
Rneasy® MiniKit	Qiagen, Hilden
Superscript™ Preamplification System	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Whatman-Papier	Millipore/Whatman, Eschborn
Wizard®Plus SV Minipreps	
DNA Purification System Cat. # A1460	Promega GmbH, Mannheim

2.7 Geräte

Äkta	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Coulter Counter™	Beckman, München
Cytospin	Shandon, Astmoor, Großbritannien
Fluoreszenzmikroskop Eclipse E400	Nikon, Düsseldorf
Fluorimeter TKO 100	Hoefer Scientific Instruments, San Fransisco, CA, USA
Fraktionssammler MM 10,	
Neolab 4 mit Zeitnehmer SM 999	Neolab, Heidelberg
Geldokumentationssystem Gel Doc 1000 inklusive Software Molecular Analyst®	BioRad, München
Gelkammer für Agarosegele Mupid-21	Cosmo Bio Co. Ltd., Tokio, Japan
Gelkammer für SDS-Gele	BioRad, München
Halogenlampe Osram SLG 1000-Studio	Osram, München
Luxmeter 110 mit Photoelement GaP	PRC Krochmann GmbH, Berlin

Peristaltikpumpe ISM 759	Ismatec Laboratoriumstechnik, Wertheim
Phosphoimager Molecular Dynamics	
Storm 860 inklusive Zubehör	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Photometer, Modell LKB Biochrom	
Ultrospec II	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Thermocycler Progene	Techne, Cambridge, UK
Tischzentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Transferkammer für Western Blot	BioRad, München
Ultraschallgerät vibracell™ 72408	Bioblock Scientific, Illkirch, Frankreich
Ultrazentrifuge Optima™ TL	Beckman, Palo Alto, CA, USA
UV-B Lampe TL20W/12RS	Philips Licht, Hamburg
Zentrifuge Biofuge 28RS	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Laborfuge 400R	Heraeus, Hanau

2.8 Zellkultur

2.8.1 Zelllinien

Alle für diese Arbeit verwendeten Zelllinien wuchsen adhärent als Monolayer. Die verwendeten Kulturmedien sind in Abschnitt 2.11.2 angegeben.

AS 52

Ovarzellen des chinesischen Hamsters, erhalten von W. J. Caspary (Laboratory of Environmental Carcinogenesis and Mutagenesis, Research Triangle Park, North Carolina, USA). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 16 h. 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 Transfektion mit dem pSV2-gpt Vektor wurde eine Kopie des analogen bakteriellen Gens (*Ecogpt*), das für die Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (XPRT bzw. XGPRT) kodiert, eingeführt (**Mulligan und Berg 1980**).

AA8-1

Wildtyp-Ovarzellen des chinesischen Hamsters, erhalten von E. Sage (Institut Curie Recherche, Paris, Frankreich). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 16 h.

AA8-1 vo

Wildtyp-Transfektant, der aus der Transfektion der AA8-1-Zellen mit dem Plasmid pcDNA 3,1/Myc-His[®] A MCS, resultierte, erhalten von J. Pablo Radicella (CEA, Fontenay-aux-Roses, Frankreich). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 24 h.

AA8 APE1

Wildtyp-Transfektant, der aus der Transfektion der AA8-1-Zellen mit dem Plasmid pcDNA 3,1/Myc-His[®] A MCS, das die codierende Sequenz für die AP-Endonuklease enthält, resultierte, erhalten von J. Pablo Radicella (CEA, Fontenay-aux-Roses, Frankreich). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 20 h.

EM9

XRCC1-defiziente Ovarzellen des chinesischen Hamsters, erhalten von E. Sage (Institut Curie Recherche, Paris, Frankreich) bzw. von J. Pablo Radicella (CEA, Fontenay-aux-Roses, Frankreich). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 18 h.

EM9 vo

XRCC1-defizienter Transfektant (Klon 2), der aus der Transfektion der EM9-Zellen mit dem Plasmid pcDNA 3,1/Myc-His[®] A MCS resultierte, erhalten von J. Pablo Radicella (CEA, Fontenay-aux-Roses, Frankreich). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 18 h.

EM9 XH

XRCC1-komplementierter Transfektant, der aus der Transfektion der EM9-Zellen mit dem Plasmid pcD2EXH, das die codierende Sequenz für das XRCC1-Protein enthält, resultierte (**Caldecott et al. 1995**), erhalten von J. Pablo Radicella (CEA, Fontenay-aux-Roses, Frankreich). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 21 h.

EM9 APE1 1

XRCC1-defizienter Transfektant (Klon 1), der aus der Transfektion der EM9-Zellen mit dem Plasmid pcDNA 3,1/Myc-His[®] A MCS, das die codierende Sequenz für die AP-Endonuklease enthält, resultierte, erhalten von J. Pablo Radicella (CEA, Fontenay-aux-Roses, Frankreich). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 19 h.

COR3

SV-40 transformierte Zellen des chinesischen Hamsters (CO60), die die genetische Information für den humanen Glucocorticoid-Rezeptor auf dem Plasmid HG0 tragen (**Küpper et al. 1995**), erhalten von A. Bürkle, Molekulare Toxikologie der Universität Konstanz. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 21 h. Die Zellen wachsen unter ständiger Selektion mit 800 U/ml Hygromycin B. Einen Tag vor der Dexamethason-Behandlung werden die Zellen ohne Antibiotika kultiviert.

COM3

Transfektant der COR3-Zellen, der induzierbar (Dexamethason-Präinkubation (50 nM) für 24 h) die PARP-DNA-Bindungsdomäne (PARP-DBD) überexprimiert (**Küpper et al. 1995**), erhalten von A. Bürkle, Molekulare Toxikologie der Universität Konstanz. COM3-Zellen tragen zusätzlich zum HG0-Plasmid (vergleiche COR3) den Vektor pPARP125 mit der codierenden Sequenz für die DNA-Bindungsdomäne von PARP. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 21 h. Die Kultur der Zellen erfolgt in Medium, dem 800 U/ml Hygromycin B und 800 µg/ml Geneticin zugesetzt werden. Einen Tag vor der Induktion der PARP-DBD-Überexpression durch Dexamethason werden die Zellen ohne Antibiotika kultiviert.

F11.1

Spontan immortalisierte Maus-Embryo-Fibroblasten von Wildtyp-Mäusen, erhalten von D. Barnes (Imperial Cancer Research Fund, Clare Hall Laboratories, South Mimms, UK). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 22 h.

1.2 *ogg*^{-/-}

Spontan immortalisierte Maus-Embryo-Fibroblasten von *mogg1*^(-/-)-knockout-Mäusen, erhalten von D. Barnes (Imperial Cancer Research Fund, Clare Hall Laboratories, South Mimms, UK). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 19 h.

13.1 *csb*^{-/-}

Spontan immortalisierte Maus-Embryo-Fibroblasten von *mcsb*^(-/-)-knockout-Mäusen, erhalten von A. Klungland (Department of Molecular Biology, The National Hospital, University of Oslo, Oslo, Norwegen). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 18 h.

parp^{-/-}

Spontan immortalisierte Maus-Embryo-Fibroblasten von *mparp*^(-/-)-*knockout*-Mäusen, erhalten von A. Klungland (Department of Molecular Biology, The National Hospital, University of Oslo, Oslo, Norwegen). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 20 h.

MRC5

SV-40 transformierte Fibroblasten des Menschen, erhalten von F. Le Page (CEA, Fontenay-aux-Roses, Frankreich). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 26 h.

MRC5 *ogg1*-antisense

SV-40 transformierte Fibroblasten des Menschen mit *hogg1*-Antisense-Konstrukt, erhalten von F. Le Page (CEA, Fontenay-aux-Roses, Frankreich). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 21 h.

XPA (XP125loSV)

SV-40 transformierte XPA-defiziente Fibroblasten des Menschen, erhalten von F. Le Page (CEA, Fontenay-aux-Roses, Frankreich). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 27 h.

XPA *ogg1*-antisense

SV-40 transformierte XPA-defiziente Fibroblasten des Menschen mit *hogg1*-Antisense-Konstrukt, erhalten von F. Le Page (CEA, Fontenay-aux-Roses, Frankreich). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 26 h.

786-O

VHL-defiziente Nierenkarzinomzelllinie des Menschen, erhalten von E. Weidt (Labor für molekulare Tumorgenetik der Universität Mainz). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 27 h.

786-O vo

VHL-defizienter Transfektant, der aus der Transfektion der 786-O-Zellen mit dem Expressionsvektor pEGFP-N1 (Clontech) resultierte, erhalten von E. Weidt (Labor für molekulare Tumorgenetik der Universität Mainz). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 27 h. Die Zellen wachsen unter ständiger Selektion mit 600 µg/ml Geneticin.

786-O VHL

VHL-komplementierter Transfektant, der aus der Transfektion der 786-O-Zellen mit dem Expressionsvektor pEGFP-N1 (Clontech), der die codierende Sequenz für das VHL-Protein enthält, resultierte, erhalten von E. Weidt (Labor für molekulare Tumorgenetik der Universität Mainz). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 31 h. Die Zellen wachsen unter ständiger Selektion mit 600 µg/ml Geneticin.

Caki-1

VHL-defiziente Nierenkarzinomzelllinie des Menschen, erhalten von E. Lausch (Labor für molekulare Tumorgenetik der Universität Mainz). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 27 h.

Caki-1 VHL

VHL-komplementierter Transfektant, der aus der Transfektion der Caki-1-Zellen mit dem Expressionsvektor pEGFP-N1 (Clontech), der die codierende Sequenz für das VHL-Protein enthält, resultierte, erhalten von E. Weidt (Labor für molekulare Tumorgenetik der Universität Mainz). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 31 h. Die Zellen wachsen unter ständiger Selektion mit 600 µg/ml Geneticin.

IMCD3

SV-40 immortalisierte Nierenepithelzellen der Maus, erhalten von G. Rousselet (CEA, Gif-Sur-Yvette, Frankreich). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 19 h.

2.8.2 Medien, Puffer und Lösungen

α-MEM	PAA, Cölbe
DMEM-Medium high glucose	PAA, Cölbe
DMEM-Medium low glucose	PAA, Cölbe
McCoy's 5A-Medium	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Kallsruhe
HAM's F12-Medium	PAA, Cölbe
RPMI 1640 ohne Glutamin	PAA, Cölbe
Fetales Kälberserum	PAA, Cölbe
Fungizon [®]	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Kallsruhe

L-Glutamin	PAA, Cölbe
Geneticin [®]	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
HEPES	Sigma Aldrich, Steinheim
Hygromycin B	Roche Diagnostics, Mannheim
Natriumpyruvat	Sigma Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin	PAA, Cölbe
Trypsin/EDTA	PAA, Cölbe

2.9 Standard-Puffer und Lösungen

LB-Medium (pH 7.0)	10 g/l Bacto-Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl (pH Einstellung mit NaOH)
PBSCMF (pH 7.5)	137 mM NaCl 2.7 mM KCl 8.3 mM Na ₂ HPO ₄ 1.5 mM KH ₂ PO ₄
1 x TAE (pH 7.8)	40 mM Tris-HCl 5 mM Na-Acetat 1 mM EDTA
1 x TBE (pH 8.5)	10 mM Tris-HCl 25 mM Natriumborat 0.25 mM EDTA
1 x TE (pH 7.4)	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA

2.10 Techniken zur Arbeit mit Bakterien

2.10.1 Transformation kompetenter Bakterien

2.10.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde eine Übernachtskultur angesetzt. Dazu wurden 50 ml LB-Medium mit Ampicillinzusatz (100 µg/ml) mit einer Kolonie von *E. coli* DH5α beimpft und über Nacht bei 160 rpm und 37 °C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurde die Kultur 1:10 mit LB-Medium verdünnt, bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ von 0.6 (Phase des exponentiellen Wachstums) weiterkultiviert und dann sofort für 10 min in Eiswasser abgekühlt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (15 min bei 1000 x g und 4 °C), der Überstand dekantiert, die Zellen in 250 ml 1mM kaltem HEPES-Puffer (pH 7.5) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit HEPES-Puffer wurden die sedimentierten Bakterien mit 10%igem eiskaltem Glycerol gewaschen, nochmals zentrifugiert und das Pellet sorgfältig in 1.5 ml 10%igem Glycerol resuspendiert. Die Suspension der kompetenten Bakterien wurde aliquotiert (100-200 µl), in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zu ihrer Verwendung bei -70 °C gelagert.

2.10.1.2 Elektroporation

Bei der Elektroporation wird durch kurze elektrische Impulse mit hoher Feldstärke kurzzeitig die Permeabilität der Zellwand erhöht, so dass DNA-Moleküle in die Zellen gelangen können.

Für die Elektroporation wurden kompetente Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. Je Ansatz wurden 40 µl Bakteriensuspension mit 2 ng Plasmid-DNA vermischt. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurden die Suspensionen in Küvetten überführt und unmittelbar dem elektrischen Feld ausgesetzt (elektroporiert). Anschließend wurden die Bakterien in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 180 rpm und 37 °C zur Expression der Antibiotikaresistenz inkubiert. Zur Bestimmung der Elektroporationseffizienz wurden die Transformationsansätze in geeigneten Verdünnungen auf ampicillinhaltigen Agarplatten (LB-Medium plus 15 g/l Agar) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Als Kontrollen wurden parallel der leere Klonierungsvektor und DNA-freie Bakterienansätze mitgeführt.

2.10.1.3 Transformation durch Hitzeschock

Kompetente Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut. Je Ansatz wurden 50 µl Bakteriensuspension mit 4 ng Plasmid-DNA vermischt, 20 min auf Eis und dann 2 min bei 42 °C inkubiert. Es wurden 450 µl LB-Medium zugegeben und für 1 h bei 37 °C zur Expression der Antibiotikaresistenz inkubiert. Anschließend wurde weiter verfahren wie unter 2.10.1.2 beschrieben.

2.10.1.4 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung eines handelsüblichen Isolierungssystems (Promega). Hierzu wurden 5 ml einer Übernachtskultur (in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) zentrifugiert (4 min bei 7000 x g und 20 °C) und der Überstand dekantiert. Das Bakteriensediment wurde in alkalischem Lysepuffer resuspendiert. Nach einem Neutralisationsschritt wurde die Lösung auf eine Ionen-Austauscher-Säule gegeben. Die an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNA wurde in mehreren Schritten gewaschen und schließlich mit nukleasefreiem Wasser eluiert. Anschließend wurde die Konzentration der DNA-Präparation photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf) bestimmt.

2.11 Techniken zur Arbeit mit Zellkulturen

2.11.1 Zellkultivierung

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die in dieser Arbeit beschriebenen Zelllinien wurden alle bei 37 °C, 5 % CO₂ und 99 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Passagieren der Zellen erfolgte abhängig von deren Verdopplungszeit. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt, einmal mit PBSCMF gewaschen und kurz mit Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, um die Zellen abzulösen. Der Ablösevorgang wurde im Lichtmikroskop kontrolliert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die Zellzahl wurde bestimmt (Coulter CounterTM Zellzählgerät) und die Zellen verdünnt ausgesät.

Für alle Experimente wurden Zellen verwendet, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden.

2.11.2 Kulturmedien

Kulturmedium für AA8-1 und EM9	α -MEM 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin
Kulturmedium für AA8 vo, AA8 APE, EM9, EM9 vo, EM9 XH,EM9 APE 1	DMEM high glucose 10 % FCS 1 mM Natriumpyruvat 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % Fungizon
Kulturmedium für COR3 und COM3	DMEM high glucose 5 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin
Kulturmedium für Maus-Embryo-Fibroblasten	DMEM high glucose 15 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin
Kulturmedium für MRC5, MRC5 [ogg1-], XPA und XPA [ogg1-]	DMEM high glucose 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % Fungizon
Kulturmedium für 786-O, 786-O vo und 786-O VHL	RPMI 1640 10 % FCS 10 mM HEPES 1 mM Natriumpyruvat 1 % Penicillin/Streptomycin
Kulturmedium für Caki-1 und Caki-1 VHL	McCoy's 5A mit Zusätzen 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin

Kulturmedium für IMCD3	DMEM high glucose/HAM's F12 1:1
	10 % FCS
	2mM Glutamin
	1 % Penicillin/Streptomycin

2.11.3 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Um Zellen über einen längeren Zeitraum aufzubewahren, wurden sie kryokonserviert. Hierzu wurden nach 2.11.1 abgelöste, resuspendierte Zellen 5 min bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet in gekühltem Einfriermedium (Kulturmedium mit 10 % DMSO) resuspendiert ($2-3 \times 10^6$ Zellen/ml), dann die Zellsuspension in Kryoröhrchen aliquotiert, die sofort bei - 20 °C gelagert wurden. Nach 2 h Lagerung bei - 20 °C wurden die Kryoröhrchen über Nacht bei - 70 °C aufbewahrt und dann in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Reaktivierung wurden die kryokonservierten Zellen bei 37 °C aufgetaut und direkt in kaltes Kulturmedium überführt. Um das zelltoxische DMSO zu entfernen, wurden die Zellen zentrifugiert (5 min bei 1000 x g und 4 °C), der Überstand dekantiert und das Zellpellet in frischem Kulturmedium resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 24 h im CO₂-Inkubator wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Experimente mit aufgetauten Zellen wurden erst nach mindestens 2 Passagen durchgeführt.

2.12 Alkalische Elution

Die alkalische Elution ist eine sehr empfindliche Methode zur Quantifizierung intrazellulärer DNA-Modifikationen *in vitro*. Die von **Kohn et al. (1976)** entwickelte Technik ermöglicht es, Einzelstrangbrüche, DNA-DNA- und DNA-Proteinquervernetzungen nachzuweisen. Erweitert man das Protokoll durch eine zusätzliche Inkubation mit Reparaturenukleasen lassen sich auch DNA-Basenmodifikationen nachweisen; sie werden als zusätzliche Einzelstrangbrüche sichtbar. Mit der alkalischen Elution lassen sich DNA-Schäden mit einer Empfindlichkeit von 0.5 Läsionen pro 10^7 Basenpaaren (bp) nachweisen. Damit ist die Alkalische Elutionstechnik etwa 200mal empfindlicher als der Relaxations-Assay mit PM2-DNA (siehe 2.13). Auch der Nachweis von Basenmodifikationen durch HPLC/ECD ist unempfindlicher (**Pflaum et al. 1997**). Das Prinzip der alkalischen Elution ist in Abbildung 2.1 dargestellt.

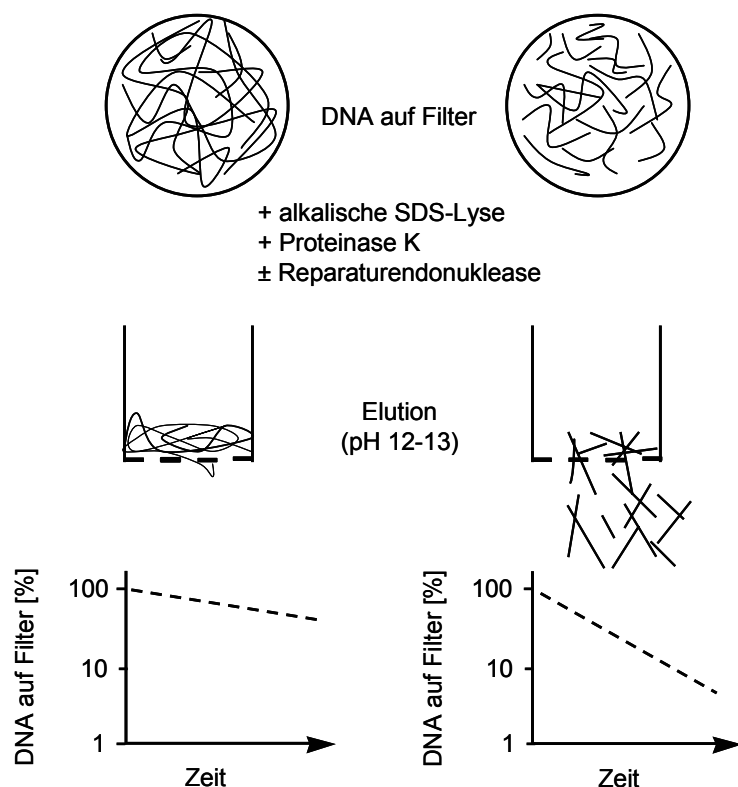


Abbildung 2.1: Prinzip der alkalischen Elution (nach Pflaum).

In Medium resuspendierte Zellen werden auf Polycarbonatfilter aufgetragen und mit PBSCMF gewaschen. Anschließend werden durch Spülen mit einem alkalischen Lysepuffer, der SDS und Proteinase K enthält, die Zellen lysiert. Dabei werden Zellbestandteile, RNA und Proteine vom Filter entfernt. Die doppelsträngige DNA bleibt auf dem Filter zurück. Nun wird gewaschen, um den Lysepuffer zu entfernen und anschließend mit den Reparaturenzymen inkubiert. Abschließend wird der alkalische Elutionspuffer (pH 12.15) zugegeben, wobei die DNA in ihre einzelsträngige Form übergeht, und die Elution gestartet. Die Elutionsgeschwindigkeit der DNA-Fragmente ist abhängig von deren Länge, wobei kürzere Fragmente - entsprechend höher geschädigter DNA - schneller eluieren als längere. Nach der fraktionierten Elution werden die Eluate neutralisiert und der DNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen sowie die Menge der auf dem Filter verbliebenen DNA fluorimetrisch bestimmt. Man berechnet die Elutionsrate der DNA, die proportional zum Gehalt an Einzelstrangbrüchen und alkalilabilen Läsionen ist. Die Kalibrierung der Methode erfolgt durch Vermessung einer mit γ -Strahlen geschädigten Probe: 6 Gy γ -Strahlung erzeugen 1 Läsion pro 10^6 bp (Kohn et al. 1976). Die Gesamtmenge der DNA einer Probe ist proportional der Summe der

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

Die absolute Zahl an Einzelstrangbrüchen errechnet sich aus Gleichung 2.1:

$$\text{ssb} = m \cdot 2.24 \cdot 10^{-6} \quad (2.1)$$

ssb: Zahl der Einzelstrangbrüche pro bp

m: mittlere Steigung

Der Faktor 2.24 wurde von M. Pflaum anhand einer Kalibrierung durch γ -Strahlung bestimmt (**Pflaum 1996, Epe et al. 1993**).

2.12.1 Behandlung der Zellen

Alle Zellen wurden vor der Elution bzw. gegebenenfalls nach Behandlung zweimal mit PBSCMF gewaschen und anschließend trypsiniert (siehe 2.11.1). Nach dem Ablösen wurden die Zellen sofort in kaltem Medium resuspendiert, auf Eis gestellt und zügig auf die Filter aufgetragen.

Wurden unbehandelte Zellen verwendet, so spricht man von einer Bestimmung der Steady-State-Spiegel an DNA-Modifikationen.

2.12.1.1 Schädigung mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022 und sichtbarem Licht

Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen. Dann wurden 50 nM Ro 19-8022 in PBSCMF zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit sichtbarem Licht (1000 Watt Halogenlicht im Bereich von 400-800 nm) bei einem Abstand von 38 cm 10 min auf Eis bestrahlt. Dies entspricht einer Energiedosis von 166 kJ/m². Nach der Schädigung wurden die Zellen erneut zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen, trypsiniert, in kaltem Medium resuspendiert und auf die Filter aufgetragen (1 x 10⁶ Zellen pro Filter).

2.12.1.2 Schädigung mit UVB

Zur UVB-Schädigung wurden die Zellen in Zellkulturschalen kultiviert. Vor der Schädigung wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen. Die Bestrahlung erfolgte in 10 ml PBSCMF bei geöffnetem Deckel im Abstand von 50 cm mit vor der Lampe eingelegtem Gitter für 10 min (entsprechend einer Energiedosis von $2.4 \pm 0.3 \text{ J/m}^2$). Anschließend wurde wie unter 2.12.1.1 nach der Schädigung verfahren.

2.12.1.3 Schädigung mit *tert.*-Butylhydroperoxid (tBuOOH)

Vor der Schädigung wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen. Dann wurde tBuOOH in verschiedenen Konzentrationen (abhängig von der Zellart) in serumfreiem, vorgewärmtem (37 °C) Medium zu den Zellen gegeben. Die Schadensinduktion erfolgte unter Kulturbedingungen für 15 min. Anschließend wurde wie unter 2.12.1.1 nach der Schädigung verfahren.

Zum Nachweis Endonuklease-sensitiver DNA-Modifikationen nach tBuOOH-Schädigung wurden die Zellen nach der Schädigung für 15 min in Medium im Brutschrank belassen, damit Einzelstrangbrüche repariert werden konnten.

2.12.1.4 Schädigung mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂)

Die Zellen wurden abgelöst und in vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert. H₂O₂ wurde in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben und für 5 min unter Kulturbedingungen inkubiert.

2.12.1.5 Schädigung mit Methylmethansulfonat (MMS)

Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen. Dann wurden 100 µM MMS in vorgewärmtes, serumfreies Medium zugegeben und die Zellen für 30 min unter Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend wurde wie unter 2.12.1.1 nach der Schädigung verfahren.

2.12.1.6 Bestimmung der Reparaturgeschwindigkeit von DNA-Modifikationen

Die Zellen wurden nach der Schädigung zweimal mit PBSCMF gewaschen. Anschließend wurden sie in Kulturmedium für die vorgesehene Reparaturzeit bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach der Reparaturzeit wurde verfahren wie unter 2.12.1.1 beschrieben.

Die Zellen, die zur Bestimmung des induzierten Schadens herangezogen werden sollten (0 h-Wert), wurden geschädigt, als die Reparaturzeit der reparierenden Zellen fast beendet war. Nach der Schädigung des „0 h-Wertes“ wurde mit allen Ansätzen verfahren wie unter 2.12.1.1 beschrieben.

Bei längeren Reparaturzeiten (> 6 h) musste die Proliferation der Zellen berücksichtigt werden. Hierzu wurde zum Zeitpunkt des Reparaturbeginns je eine zusätzliche Flasche pro Ansatz geschädigter Zellen abgelöst und mittels Coulter Counter™ die Zellzahl bestimmt. Die dabei erhaltene Zellzahl wurde später mit der Zellzahl der identisch geschädigten Zellen nach der Reparaturzeit ins Verhältnis gesetzt (Proliferationsfaktor). Der so errechnete Proliferationsfaktor wurde bei der Berechnung der "DNA-Modifikationen ohne Reparatur" berücksichtigt, indem die induzierte Zahl der Modifikationen durch diesen Proliferationsfaktor geteilt wurde.

2.12.2 Vorbereitung, Auftragen der Zellen, Zellyse, Enzyminkubation und alkalische Elution der DNA

Puffer für die alkalische Elution:

Lysepuffer:	100 mM Glycin (pH 10.0) , 20 mM EDTA und 2 % SDS
BE ₁ -Puffer:	20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl und 1 mM EDTA
BE ₁₅ /KCl-Puffer:	20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 75 mM KCl und 15 mM EDTA
TC-Puffer:	50 mM Tris-HCl (pH 8.0) und 25 mM CaCl ₂
Waschpuffer:	20 mM EDTA (pH 10.0)
Elutionspuffer:	20 mM H ₄ EDTA (pH 12.15)

Polycarbonatfilter wurden luftblasenfrei auf Frittenböden gelegt, die in Filterhaltern eingelegt waren, dann das System mit kaltem PBSCMF gespült. Die Zellsuspensionen (1×10^6 Zellen pro Filter) wurden bei 4 °C auf die Filter gegeben und mit kaltem PBSCMF gewaschen, um Reste des Kulturmediums zu entfernen. Bei einer Temperatur von 25 °C wurden zuerst 2 ml Lysepuffer mit einer Pumpgeschwindigkeit von 80 ml/h auf die Filter gegeben, dann 5 ml Lysepuffer mit Proteinase K (0.2 bzw. 0.4 mg/ml) durchgepumpt (Pumpgeschwindigkeit 3 ml/h). Anschließend wurde siebenmal mit 5 ml BE₁-Puffer gewaschen (Pumpgeschwindigkeit 80 ml/h), wobei nach jedem Waschschrift Reste des Puffers im Vorratsbehälter entfernt wurden. Für die folgende Enzyminkubation wurden 2 ml Enzymlösung bei einer Pumpgeschwindigkeit von 2 ml/h bei 37 °C auf die Filter

gegeben. Angaben zu den Puffern und den Konzentrationen der einzelnen Enzyme sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Nach der Enzyminkubation wurden Reste der Enzymlösung vom Filter entfernt, zweimal mit 5 ml BE₁-Puffer und einmal mit 4 ml Waschpuffer bei einer Pumpgeschwindigkeit von 80 ml/h gespült und abschließend die Vorratsbehälter mit Elutionspuffer befüllt. Die fraktionierte Elution der DNA (Fraktionsgröße 4.0 ml) erfolgte über 12 h bei einer Pumpgeschwindigkeit von 2 ml/h.

Tabelle 2.1: Arbeitspuffer und -konzentrationen der in der alkalischen Elution verwendeten Reparaturenukleasen.

Enzym	Puffer	Arbeitskonzentration
Endonuklease IV	BE ₁ mit 0.5 mg/ml BSA	30 ng/ml
Exonuklease III	TC mit 0.5 mg/ml BSA	500 ng/ml
Fpg-Rohextrakt	BE ₁ mit 0.5 mg/ml BSA	10 µg/ml
T4 Endonuklease V	BE ₁₅ /KCl mit 0.5 mg/ml BSA	100 ng/ml

2.12.3 Auswertung

Nach der Elution wurde der restliche, noch im Vorratsgefäß verbliebene Elutionspuffer, in die sechste Fraktion gepumpt (80 ml/h). Die Frittenböden mit den Filtern wurden mit dem Eluat der sechsten Fraktion vereinigt und 2 h bei 60 °C geschüttelt, um die auf den Filtern verbliebene DNA in Lösung zu bringen (Filterwert). Nach dem Schütteln wurde aus diesen Proben ein Aliquot (4.0 ml) entnommen.

Zur Bestimmung der DNA-Menge wurde zunächst jede Fraktion mit dem gleichen Volumen (4.0 ml) Phosphatpuffer I (pH 6.0) neutralisiert, wodurch sich die DNA-Doppelstränge wieder ausbildeten. Nach 15 min wurden jeweils 4.0 ml Phosphatpuffer II (pH 7.2) mit Bisbenzimid (1.5 µM) zugegeben und die Proben 15 min im Dunkeln inkubiert. Die Messung erfolgte durch Anregung des Bisbenzimid 33258-DNA-Komplexes bei 360 nm und Bestimmung der Emission bei 450 nm. Als Blindwert diente eine Mischung aus gleichen Volumina (je 4.0 ml) Elutionspuffer, Phosphatpuffer I und Phosphatpuffer II mit Bisbenzimid. Der absolute DNA-Gehalt wurde durch Messung einer Probe Elutionspuffer, die 10 µg Kalbsthymus-DNA enthielt, bestimmt.

2.13 PM2-DNA-Relaxations-Assay

Das Plasmid des Bakteriophagen PM2 (PM2-DNA) liegt normalerweise in der superhelikalen Form vor. Wird ein Einzelstrangbruch (Unterbrechung des Zucker-Phosphat-Gerüsts) in das Plasmid eingeführt, führt das zur Relaxation des Plasmids; es geht in die offene zirkuläre Form über. Ein Doppelstrangbruch bewirkt die Linearisierung des Plasmids. Da sich die beiden Formen der DNA, die superhelikale und die offen zirkuläre, in ihren Laufeigenschaften im nativen Agarosegel unterscheiden, können sie elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend mittels Fluoreszenzmessung quantifiziert werden.

2.13.1 Schädigung der PM2-DNA mit UVB

Zur Bestrahlung der DNA wurde eine UVB-Dosis von 309 J/m^2 verwendet. Während der Bestrahlung befand sich die DNA in BE₁₅-Puffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 75 mM KCl und 15 mM EDTA) gelöst als Tropfen auf einer gekühlten Tüpfelplatte.

2.13.2 Enzyminkubation mit T4 Endonuklease V

Der Reaktionsansatz (30 μl) enthielt 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 75 mM KCl, 15 mM EDTA, 0.1 g/l BSA, 0.2 μg PM2-DNA und 10 μl der zu testenden Enzymfraktion bzw. unterschiedliche Konzentrationen der aktiven Enzympräparation. Zum Nachweis von direkten Einzelstrangbrüchen wurde die DNA nur mit BE₁₅-Puffer inkubiert. Durch Zugabe von 10 μl Stopppuffer (40 mM Tris-HCl (pH 7.8), 21 mM EDTA, 5 mM Na-Acetat, 70 % Glycerol, 4 % (v/v) SDS und 0.05 % (v/v) Bromphenolblau) wurde die Reaktion beendet.

2.13.3 Agarose-Gelelektrophorese der PM2-Plasmid DNA

Die Auftrennung der DNA des Reaktionsansatzes (aus 2.13.2) in die superhelikale, offene zirkuläre und linearisierte PM2-DNA erfolgte mittels nativer Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.14.3) mit TAE als Laufpuffer bei 80 V für 90 min. Anschließend wurde das Gel zur Färbung in ein Ethidiumbromidbad (0.5 mg/ml H₂O) überführt und 1 h auf dem Schüttler bei Raumtemperatur bewegt.

2.13.4 Auswertung

Nach der Färbung wurde das Gel kurz gewässert und dann mit Hilfe des Geldokumentationssystems von BioRad mit einer Belichtungszeit von 10 s dokumentiert. Die quantitative Bestimmung der Anteile an superhelikaler, offen zirkulärer und linearer Plasmid-DNA an der Gesamt-DNA-Menge erfolgte durch Integration der Fluoreszenzintensitäten der Banden in Abhängigkeit von deren Laufstrecke mit Hilfe der Software Molecular Analyst[®]. Die Anzahl der Einzelstrangbrüche pro Plasmid -unter der Voraussetzung einer zufälligen Verteilung (Poisson-Verteilung) der Einzelstrangbrüche- konnte dann anhand der Gleichung 2.2 berechnet werden (**Lloyd et al. 1978**).

$$SSB_g = -\ln \frac{1.42 \cdot s}{1.42 \cdot s + r} \quad (2.2)$$

SSB_g: Gesamtzahl der Einzelstrangbrüche

1.42: Korrekturfaktor für die geringere Interkalation von Ethidiumbromid in superhelikale DNA

s: Integral unter der Fläche der superhelikalen DNA

r: Integral unter der Fläche der relaxierten (offen zirkulären) DNA

Bei der Berechnung wird berücksichtigt, dass nur der erste Einzelstrangbruch im Molekül als Konformationsänderung erfasst wird, nicht aber weitere Einzelstrangbrüche, da sie die offen zirkuläre Form nicht mehr weiter beeinflussen.

Zur Berechnung Endonuklease-sensitiver Modifikationen wurde die Anzahl der ermittelten direkten Einzelstrangbrüche (ohne Endonukleaseinkubation) von der Gesamtzahl der Einzelstrangbrüche nach Gleichung 2.3 subtrahiert.

$$ESS = SSB_g - SSB_d \quad (2.3)$$

ESS: endonuklease-sensitive Modifikationen

SSB_g: Gesamtzahl der Einzelstrangbrüche

SSB_d: direkte Einzelstrangbrüche

2.14 Techniken zur Arbeit mit RNA bzw. DNA

2.14.1 Isolierung von RNA aus eukaryoten Zellen

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mittels Rneasy[®] MiniKit der Firma Qiagen. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Zur Präparation von Gesamt-RNA wurden etwa 5×10^6 Zellen nach dem Ablösen zentrifugiert (5 min bei 1000 x g und 4 °C). Das Zellpellet wurde in 600 µl RLT-Lysepuffer aufgenommen und resuspendiert, so dass keine Zellklumpen mehr sichtbar waren. Die Suspension wurde mittels einer QIAshredder-Säule homogenisiert und anschließend mit 600 µl Ethanol 70 % durch Pipettieren vermischt. Die Probe wurde dann in zwei Aliquots auf eine RNeasy-mini-spin-Säule gegeben und 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Die Gesamt-RNA, die sich auf der Säule befand, wurde mit 700 µl RW1-Puffer und dann mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen (jeweils 15 s bei 8000 x g). Der Waschschrift mit RPE-Puffer wurde wiederholt. Zur vollständigen Trocknung der Säule wurde für zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurde die RNA mit insgesamt 80 µl RNase-freiem Wasser eluiert (1 min bei 8000 x g).

Die Konzentration und die Reinheit der RNA-Präparation wurden photometrisch bestimmt und die erhaltenen Werte gelelektrophoretisch überprüft.

2.14.2 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion

Die Synthese des ersten cDNA-Stranges erfolgte mit Hilfe der Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) RNase H-Reversen Transkriptase (Superscript[™] II, Gibco BRL) (**Kotewicz et al. 1985 und Gerard et al. 1986**). Dem Enzym fehlt die RNase H-Aktivität (**Kotewicz et al. 1988**), was zu einer erhöhten Prozessivität verbunden mit der Synthese längerer Transkripte führt. Als Starter-Oligonukleotid (Primer) diente Oligo(dT) der Kettenlänge 12 bis 18. Die Reaktion wurde nach detaillierten Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

2.5 ng Gesamt-RNA (siehe 2.14.1) wurden nach Zugabe von 0.5 µg Oligo(dT) mit H₂O auf ein Volumen von 12 µl ergänzt, 10 min bei 70 °C und dann auf Eis inkubiert. Der Reaktionsansatz (20 µl) für die Erststrangsynthese enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM dNTP-Mix und die

RNA/Oligo(dT)-Mischung. Der Ansatz wurde 5 min bei 42 °C inkubiert, dann die Reaktion durch Zugabe der Reversen Transkriptase (200 Units) gestartet. Nach 50 min bei 42 °C wurde die Reaktion durch Erhitzen (10 min bei 70 °C) gestoppt. Der Reaktionsansatz diente als Matrize für die anschließende PCR. Die Amplifikation der cDNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 50 µl. Der Ansatz enthielt 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP-Mix, 25 pmol 3'-flankierender Primer, 25 pmol 5'-flankierender Primer, 2.5 Units Taq-Polymerase und 2 µl cDNA. Vor Beginn der zyklischen Reaktionsfolge wurde der Reaktionsansatz ohne cDNA in einem Thermocycler auf 94 °C erhitzt (Hot Start). Nach Erreichen der Zieltemperatur wurde die cDNA, die zuvor 10 min bei 94 °C und dann in Eiswasser inkubiert worden war, zugegeben und die Reaktionsfolge gestartet. Im ersten Schritt (Denaturierung der DNA) wurde der Ansatz 1 min bei 94 °C erhitzt und die so entstandenen Einzelstränge für 2 min mit dem entsprechenden Primerpaar hybridisiert (Annealing), wobei die Temperatur während der Primerhybridisierung von 68 °C in 10 Stufen von jeweils 0.5 °C bis auf 63.5 °C verringert wurde (Touch-down). Anschließend erfolgte die Verlängerung der Primer durch die Polymerase (Extension) für 3 min bei 72 °C. Diese Reaktionsfolge wurde in insgesamt 35 Zyklen durchlaufen. Abschließend wurde 10 min bei 72 °C inkubiert.

2.14.3 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gelsysteme dienen zur Analyse bzw. zur präparativen Isolierung linearer DNA-Fragmente, wie PCR-Produkten, und isolierter RNA sowie zur Analyse von PM2 Plasmid-DNA.

Die Auftrennung erfolgte in 1%igen (w/v) bzw. 0.8%igen (w/v) Agarose-Gelen unter nativen Bedingungen mit TAE bzw. TBE als Laufpuffer. Der Nachweis der Nukleinsäuren erfolgte in Anwesenheit von Ethidiumbromid (0.5 µg/ml Gelmatrix) durch Anregung mit UV-Licht (302 nm).

2.14.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Im Rahmen präparativer Gelelektrophoresen wurden DNA-Fragmente aus Agarosegelen isoliert. Die DNA-Moleküle wurden in einem 1%igen (w/v) Agarosegel (siehe 2.14.3) aufgetrennt und die DNA-Bande aus dem Gel geschnitten. Die Elution der DNA erfolgte

anschließend mit dem GFXTM-System (Glasfasermatrix-Säule) von Amersham Pharmacia Biotech nach Angaben des Herstellers.

Zur Aufreinigung der DNA wurde die ausgeschnittene DNA-Bande mit Aufnahmebuffer (100 µl für 100 µg Agarosegel) versetzt, durch vortexen resuspendiert und 15 min bei 60 °C inkubiert. Die gesamte Probe wurde dann in eine GFX-Säule überführt und 1 min bei 10000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen und die Säule mit 500 µl Waschpuffer gewaschen (1 min bei 10000 x g und Raumtemperatur). Dieses Eluat wurde ebenfalls verworfen und dann die DNA mit 50 µl TE-Puffer eluiert (1 min bei 10000 x g und Raumtemperatur). Anschließend wurde die Konzentration der DNA-Präparation photometrisch (BioPhotometer, Eppendorf) bestimmt.

2.14.5 Restriktionsanalysen

Die Restriktionsspaltungen wurden mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und XbaI durchgeführt. Der Reaktionsansatz (50 µl) enthielt 10 mM Tris-HCl (pH 7.9), 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 100 µg/ml BSA, 40 Units EcoRI, 40 Units XbaI und entweder 1 µg PCR-Produkt oder 5 µg Plasmid-DNA. Die Reaktion erfolgte für 3 h bei 37 °C. Die so behandelten DNAs wurden zur Kontrolle in Agarose-Gelen aufgetrennt bzw. zur weiteren Verwendung (Sequenzierung oder DNA-Klonierung) mit Hilfe von DNA-Reinigungssystemen (GFXTM, Amersham Pharmacia Biotech) aufgereinigt.

2.14.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligationen wurde T4 DNA Ligase verwendet. Das Enzym katalysiert die Ausbildung einer Phosphodiestergruppe zwischen benachbarten Nukleotiden doppelsträngiger DNA. Als Substrat dient dabei eine freie 5'-Phosphatgruppe und eine 3'-Hydroxylgruppe.

Der Reaktionsansatz (13 µl) enthielt 250 ng Plasmid-DNA, 500 ng PCR-Produkt, 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA und 400 Units T4 DNA Ligase. Die Reaktion erfolgte für 12 bis 16 h bei 16 °C.

Die erhaltenen Ligationenprodukte wurden für die Transformation in kompetente *E. coli* (2.10.1) verwendet und anschließend sequenziert (2.14.8).

2.14.7 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Analyse der Produkte zum Nachweis der Enzymaktivität in Proteinextrakten (siehe 2.15.6) erfolgte in 20%igen Polyacrylamidgelen, die 7 M Harnstoff enthielten. Die vertikale Elektrophorese wurde für 40 min bei 400 V mit TBE als Laufpuffer durchgeführt. Das Gel wurde anschließend in Plastikfolie eingeschweißt, ein Detektionsfilm aufgelegt und dieser nach 30 bis 60 min mit Hilfe eines Phosphoimagers analysiert.

Aus dem Verhältnis der Bandenintensität des eingeschnittenen Oligonukleotids (16mer) zur Gesamtintensität beider Banden (34mer plus 16mer) ließ sich die spezifische Enzymaktivität im Extrakt errechnen.

2.14.8 DNA-Sequenzanalyse

Die Sequenzierung der nach 2.14.2 erhaltenen PCR-Produkte wurden von der Firma GENterprise™, Mainz nach der Kettenabbruchmethode (**Sanger et al. 1977**) durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte mit Hilfe von Didesoxynukleotiden (Dye-Terminator™), die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt waren, in Kombination mit den Desoxynukleotiden und geeigneten Primern.

2.15 Techniken zur Arbeit mit Proteinen

2.15.1 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt der Zellextrakte bzw. der Fraktionen wurde mit Hilfe des BioRad Proteintests photometrisch bestimmt. Das Prinzip des Tests basiert auf der Bindung von Coomassie Brilliant Blau G-250 an Proteine, wobei eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 465 nm (ohne Protein) nach 595 nm (mit Protein) eine quantitative Proteinbestimmung ermöglicht (**Bradford 1976**). Als Eichprotein wurde Rinderserumalbumin verwendet. Die Steigung der Eichgerade wurde durch lineare Regression ermittelt.

2.15.2 Isolierung der T4 Endonuklease V

Die Isolierung der T4 Endonuklease V wurde nach der Methode von **Nakabeppu et al. (1982)** in modifizierter Form durchgeführt.

Puffer für die Reinigung:

Puffer I: 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 10 % Ethylenglykol und 1 mM DTE.

Puffer II: 10 mM Kaliumphosphat (pH 6.5), 2 mM EDTA, 10 % Ethylenglykol und 0.5 mM DTE.

Dextran T500-Lösung: 20 % (w/w) in Puffer II

Polyethylenglykol-6000-Lösung: 30 % (w/w) in Puffer II.

2.15.2.1 Anzucht der Bakterien

Die Bakterien *E. coli* A 32480 wuchsen als Schüttelkultur in ampicillinhaltigem (50 mg/l) LB-Medium bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 1 (Messung bei 590 nm mit LB-Medium als Referenz). Dann erfolgte die Induktion der T4-Endonuklease-V-Synthese durch 0.5 mM IPTG unter Kulturbedingungen. Nach zweistündiger Induktion wurde das Medium durch Zentrifugation entfernt (5 min bei 9000 x g und 4 °C) und die Masse des Pellets bestimmt.

Alle weiteren Reinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt.

2.15.2.2 Präparation des Rohextraktes

Die Bakterien wurden in Puffer I aufgenommen (4 ml/g Pellet) und die Bakterienwände durch Ultraschallbehandlung (30 s Puls (maximale Amplitude) plus 30 s Pause; 4 Zyklen) aufgebrochen. Diese Suspension wurde 30 min bei 10000 x g zentrifugiert. Zum Überstand wurde unter Rühren 11.5 % (v/v) Dextran T500-Lösung, 32 % (v/v) Polyethylenglykol-6000-Lösung und festes NaCl bis zu einer Endkonzentration von 2 M zugegeben. Nach 1 h Rühren wurde zur Phasentrennung 30 min bei 10000 x g zentrifugiert. Die obere Phase, die den Rohextrakt enthielt, wurde über Nacht gegen 1 l Puffer II dialysiert.

2.15.2.3 Chromatographische Reinigung

Der Rohextrakt wurde auf eine Anionenaustausch-Säule (CM Sephadex C25, Säulenvolumen 36 ml) aufgetragen (Flussgeschwindigkeit 0.5 ml/min), die zuvor mit Puffer II äquilibriert worden war. Die Säule wurde mit 2 Säulenvolumina Puffer II gespült, dann das Enzym mit einem linearen Gradienten (150-500 mM KCl in Puffer II, Volumen 120 ml) in 2.5 ml Fraktionen eluiert. Die Proteinkonzentration im Eluat wurde durch UV-Messung bei 280 nm bestimmt.

2.15.2.4 Nachweis der Enzymaktivität an UVB-geschädigter PM2-DNA

Der Nachweis der T4 Endonuklease-Aktivität in den Fraktionen erfolgte anhand des PM2-DNA-Relaxations-Assays (siehe 2.13). Die Aktivität des Enzyms wurde an PM2-DNA geprüft, die mit UVB geschädigt worden war. Als Kontroll-DNA wurde ungeschädigte bzw. mit Ro 19-8022 geschädigte DNA verwendet (Abbildung 2.2).

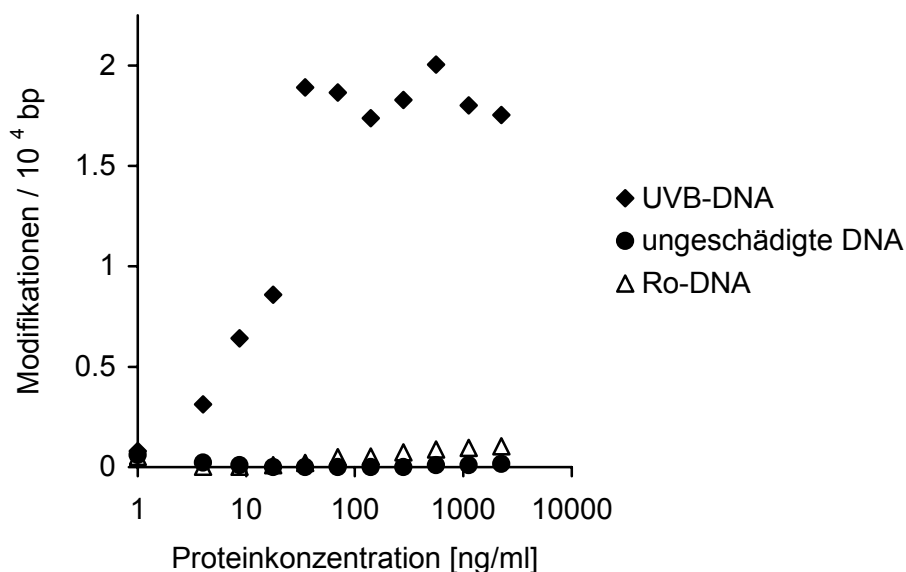


Abbildung 2.2: T4 Endonuklease-V-sensitive Modifikationen in mit 312 J/m² UVB-geschädigter, ungeschädigter und mit Ro 19-8022 und sichtbarem Licht geschädigter PM2-DNA in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration.

2.15.2.5 Test der T4 Endonuklease V in der alkalischen Elution

Die weitere Testung der T4 Endonuklease V erfolgte mit Hilfe der alkalischen Elution. Hierzu wurden Zellen mit UVB (3.1 J/m²) geschädigt (siehe 2.12.1.2) und parallel mit ungeschädigten Zellen auf die Filter der alkalischen Elution aufgetragen. Durch die

Verwendung einer Konzentrationsreihe von T4 Endonuklease V (0 bis 5000 ng/ml) bei der Enzyminkubation in BE₁₅ mit 0.5 mg/ml BSA konnte der Sättigungsbereich des Enzyms ermittelt werden (Abbildung 2.3).

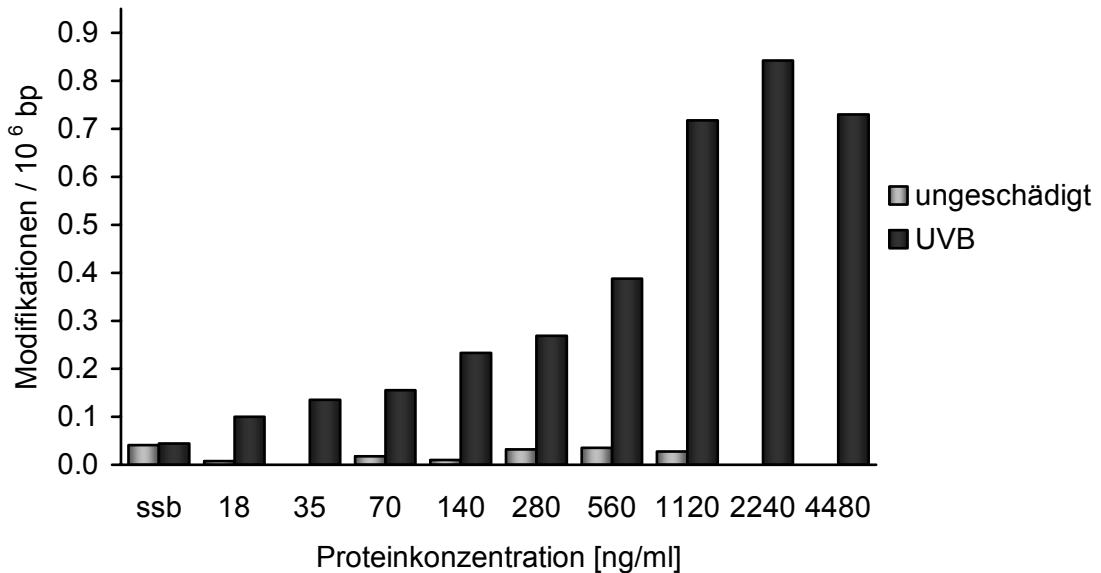


Abbildung 2.3: T4 Endonuklease-V-sensitive Modifikationen in der DNA mit 3.12 J/m² UVB-geschädigter und ungeschädigter Zellen in Abhängigkeit der Enzymkonzentration.

2.15.3 Präparation von Zellextrakten

Zur Herstellung von Zellextrakten wurden etwa 5×10^6 Zellen verwendet. Die Zellen wurden abgelöst und zentrifugiert (5 min bei 1000 x g und 4 °C). Anschließend wurde das Zellpellet zweimal mit kaltem PBS gewaschen (5 min bei 1000 x g und 4 °C) und sofort weiterverarbeitet bzw. bei -70 °C gelagert.

2.15.3.1 Kernextrakte

Die Zellen wurden in doppeltem Volumen Puffer A (10 mM Tris-HCl (pH7.5), 10 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1mM DTT und 0.5 mM PMSF) resuspendiert und anschließend unter Schwenken 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat wurde zentrifugiert (15 min bei 9500 x g und 4 °C). Der Überstand, der Zytoplasma und Membranbestandteile enthielt, wurde abgenommen und für weitere Untersuchungen bei -20 °C aufbewahrt. Das Pellet, bestehend aus den Kernen, wurde in zwei Volumina Lysepuffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.1), 200 mM NaCl, 1mM EDTA und 0.5 mM PMSF) aufgenommen und einer Ultraschallbehandlung (1 s Puls (25 % Amplitude) plus 9 s Pause;

8 Zyklen) unterzogen. Die Suspension wurde dann in einer Ultrazentrifuge 45 min bei 85000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand („Kernextrakt“) wurde abgenommen, sein Proteingehalt nach Bradford (siehe 2.15.1) bestimmt und entweder sofort weiter verarbeitet oder bei -20 °C gelagert. Die verschiedenen Aufarbeitungsschritte wurden durch Kristallviolett-Färbung mikroskopisch kontrolliert.

2.15.3.2 Gesamtzellextrakte

Die Zellen wurden in 300 µl Lysepuffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 250 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.8 µg/ml Antipain, 0.8 µg/ml Leupeptin und 0.8 µg/ml Aprotinin) aufgenommen und durch eine Ultraschallbehandlung (1 s Puls (20 % Amplitude) plus 9 s Pause; 10 Zyklen) aufgebrochen. Die Suspension wurde dann in einer Ultrazentrifuge 45 min bei 85000 x g und 4 °C zentrifugiert, um Zell- und Zellkerntrümmer abzutrennen. Der Überstand dieses Zentrifugationsschrittes wurde als „zellfreier Extrakt“ bezeichnet. Der Proteingehalt des zellfreien Extraktes wurde nach Bradford (siehe 2.15.1) bestimmt.

2.15.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in einem denaturierenden, diskontinuierlichen Gelsystem, in dem ein Sammelgel ein Trenngel überschichtet (**Lämmli 1970**). Vor dem Auftragen wurden die Proben in SDS-Probenpuffer denaturiert, um sie in Polyanionen zu überführen, die sich nur in Größe und Ladung unterscheiden. Damit wird eine Trennung der Proteine nach ihrer relativen molekularen Masse möglich.

Es wurde ein diskontinuierliches 12.5%iges SDS-Polyacrylamidgel in Puffer A (375 mM Tris-HCl (pH 8.8), 0.1 % (w/v) SDS, 0.001 % (w/v) APS und 0.001 % TEMED) mit einem 6.25%igen Sammelgel in Puffer B (125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.1 % (w/v) SDS, 0.001 % (w/v) APS und 0.001 % TEMED) gegossen.

Vor der SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine (20 µg Gesamtprotein) in Probenpuffer (100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20 % Glycerol, 4 % (w/v) SDS, 0.2 % (w/v) Bromphenolblau und 200 µM DTE) gelöst, denaturiert (10 min bei 95 °C) und auf das Gel aufgetragen. Gleichzeitig wurde ein Gemisch von Eichproteinen aufgetragen.

Die Proteine wurden bei 220 V für 60 min getrennt (Laufpuffer: 25 mM Tris-Glycin (pH 8.8) und 1 % SDS) und anschließend auf eine Membran übertragen (2.15.5).

2.15.5 Western-Blot

Beim Western- oder Immuno-Blot werden Proteine, die durch SDS-PAGE aufgetrennt wurden, auf eine Membran übertragen und dort mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen (**Tobwin et al. 1979**).

Proteinextrakte wurden über diskontinuierliche SDS-PAGE aufgetrennt, das Trenngel nach der Elektrophorese 30 min in Transferpuffer geschwenkt und dann mittels elektrophoretischer Diffusion in einer „feuchten“ Blotting-Apparatur auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Für den Transfer wurde die „aktivierte“ (kurzes Schwenken in Methanol) Nitrocellulosemembran und 2 Lagen Whatman-Papier 15 min in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl (pH 8.3), 192 mM Glycin, 5 % (v/v) Methanol) äquilibriert. Zum Aufbau des „Blotting-Sandwich“ wurden von der Anode ausgehend nacheinander eine Lage getränktes Whatman-Papier, das Trenngel, die Nitrocellulosemembran und ein weiteres Whatmanpapier luftblasenfrei aufgelegt. Der Elektrotransfer erfolgte in einer horizontalen Blotting-Apparatur in etwa 1 l Transferpuffer für 1 h bei 100 V und 4 °C. Zur Kontrolle des Proteintransfers wurde die Nitrocellulosemembran für 1 min in einer 2%igen Ponceau S-Lösung (Stammlösung: 20 % (w/v) in 30 % Trichloressigsäure) angefärbt und dann wieder vollständig mit Wasser entfärbt. Die Membran wurde dann für 10 min in TBS-T (10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 137 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen wurde 1 h mit TBS-B (10 % (v/v) Western-Blocking-Reagent in TBS-T) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran nochmals 1 h mit TBS-T gewaschen, dann mit dem spezifischen Antikörper Anti-hOgg1 (1/2500 Verdünnung in TBS-B) unter Schwenken für 2 h bei Raumtemperatur oder alternativ bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach dieser ersten Antikörperinkubation wurde die Membran nacheinander für 20, 15, 10 und 5 min in jeweils frischem TBS-T gewaschen, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Im Anschluss an diese Waschschriffe erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (polyklonaler Kaninchenantikörper NA934 B110475; 1/25000 Verdünnung in TBS-B) für 1 h bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen (dreimal für 20 min mit jeweils frischem TBS-T) konnten die mit Antikörpern markierten Proteine mittels Chemilumineszenz (ECL+Plus™, Amersham Pharmacia Biotech) sichtbar gemacht werden. Dazu wurden 950 µl Lösung A mit 50 µl Lösung B gemischt, auf die Membran gegeben und 5 min unter

Lichtausschluss inkubiert. Anschließend wurde die Membran luftblasenfrei in Frischhaltefolie verpackt und in einer Autoradiographiekassette fixiert, um einen Film (Hyperfilm™ ECL™) zu exponieren. Die Belichtungszeit war abhängig von der Bindung des 2. Antikörpers und musste experimentell ermittelt werden.

2.15.6 Nachweis der Enzymaktivität

Mit Hilfe spezifischer Substrate in Oligonukleotiden kann die *in vitro* Enzymaktivität in Zellextrakten (siehe 2.15.3) nachgewiesen werden.

2.15.6.1 Nachweis der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität

Zum Nachweis der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität wurde ein 34mer Oligonukleotid verwendet, das an Position 16 ein einzelnes 8-oxoG enthält. Die Synthese des Oligomers erfolgte wie bei **Girard et al. (1998)** beschrieben. Folgende Sequenz wurde eingesetzt:

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

Dieses Oligonukleotid wurde mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase und [γ -³²P]ATP am 5'-Ende radioaktiv markiert. Der ³²P-markierte Strang wurde mit einem komplementären Oligonukleotid hybridisiert, das an Position 16 ein C trug, so dass man einen Doppelstrang mit 8-oxoG:C erhielt.

Der Reaktionsansatz (16 μ l) enthielt 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 75 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 0.4 mg/ml BSA, 50 fmol des 5'-markierten Doppelstranges und den zu testenden Zellextrakt (maximal 4 μ l). Die Reaktion erfolgte für 30 min bei 37 °C und wurde durch Zugabe von 6 μ l Auftragepuffer (80 % Formamid, 0.1 % (w/v) Xylencyanol, 0.1 % (w/v) Bromphenolblau, 2 mM EDTA) gestoppt. Anschließend wurden die Reaktionsprodukte denaturiert (5 min bei 95 °C) und sofort auf eine denaturierende PAGE aufgetragen (2.14.7) (**Vidal et al. 2001**).

2.15.6.2 Nachweis der AP-Endonukleaseaktivität

Zum Nachweis der AP-Endonukleaseaktivität wurde ein 34mer Oligonukleotid verwendet, das an Position 16 ein Tetrahydrofuranylest (THF) (Eurogentec, Frankreich) enthielt.

Dieses Oligonukleotid wurde mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase und [γ -³²P]ATP am 5'-Ende radioaktiv markiert. Der ³²P-markierte Strang wurde mit einem komplementären

Oligonukleotid hybridisiert, das an Position 16 ein C trug, so dass man einen Doppelstrang mit THF:C erhielt.

Der Reaktionsansatz (16 μ l) enthielt 25 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM MgCl₂, 0.4 mg/ml BSA, 50 fmol des 5'-markierten Doppelstranges und unterschiedliche Mengen des zu testenden Zellextrakts (maximal 4 μ l). Die Reaktion erfolgte für 30 min bei 37 °C und wurde durch Zugabe von 6 μ l Auftragepuffer (80 % Formamid, 0.1 % (w/v) Xylencyanol, 0.1 % (w/v) Bromphenolblau, 2 mM EDTA) gestoppt. Anschließend wurden die Reaktionsprodukte denaturiert (5 min bei 95 °C) und sofort auf eine denaturierende PAGE aufgetragen (2.14.7) (**Vidal et al. 2001**).

2.15.7 Bestimmung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-Aktivität mittels Immunohistochemie

Das Ausmaß der Poly(ADP-Ribosyl)ierung in Zellen mit und ohne Behandlung wurde *in situ* mit Hilfe eines monoklonalen Mausantikörpers gegen Poly(ADP-Ribose) (10H) in Kombination mit einem FITC-gekoppelten zweiten Antikörper bestimmt (**Bürkle et al. 1993**).

Die Zellen wurden - abhängig von der Schädigungsart - in kleinen Zellkulturflaschen (25 cm²) oder in Petrischalen (27 cm²) ausgesät. Zum Zeitpunkt der Schädigung (nach etwa 48 h) sollten die Zellen halb konfluent sein. Die Schädigung der Zellen erfolgte wie unter 2.12.2 beschrieben; die Schädigung mit *tert.*-Butylhydroperoxid erfolgte allerdings in Suspension für 10 min. Als Positivkontrolle wurden Zellen in Suspension mit 1 mM H₂O₂ in Vollmedium für 5 min unter Kulturbedingungen geschädigt. Nach der Schädigung wurden die noch festwachsenden Zellen abgelöst, in kaltem Medium resuspendiert und nach Bestimmung der Zellzahl mit einer Zytocentrifuge für 5 min bei 1000 Umdrehungen/min auf Objektträger aufgeschleudert. Für jeden Ansatz wurden 2 Objektträger präpariert. Die auf der Glasoberfläche anhaftenden Zellen wurden kurz in kaltem PBS geschwenkt und dann zur Fixierung für mindestens 10 min in kalter 10%iger Trichloressigsäure auf Eis inkubiert. Anschließend wurde aufeinander folgend für jeweils 5 min mit 70 %, 90 % und Ethanol absolut (vorgekühlt bei -20 °C) auf Eis gewaschen. Die Objektträger wurden luftgetrocknet und kurz vor der Inkubation mit dem ersten Antikörper durch Schwenken in PBS bei Raumtemperatur rehydriert. Die Inkubation mit 5 μ g/ml Antikörper 10H gegen Poly(ADP-Ribose) erfolgte in PBSMT (5 % Magermilchpulver und 0.05 % Tween 20 in PBS) in einer feuchten Kammer für

30 min bei 37 °C. Dann folgten vier Waschschrirte für jeweils 5 min unter leichtem Schütteln mit PBS bei Raumtemperatur. Die Inkubation mit dem FITC-gekoppelten Anti-Maus-Antikörper (1:50 Verdünnung in PBSMT) wurde unter Lichtausschluss ebenfalls für 30 min in einer feuchten Kammer durchgeführt. Es folgten vier Waschschrirte mit PBS (siehe oben). Danach wurden die Präparate abgetrocknet und mit 10 µl Eindeckmedium, das 1 µg/ml DAPI enthielt, eingedeckt. Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop.

3. Ergebnisse

3.1 Auswirkungen der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-Aktivität auf die Reparatur verschiedener DNA-Modifikationen

Die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP 1) wird durch Strangbrüche in der DNA aktiviert und heftet dann Poly(ADP-Ribose)-Reste an verschiedene nukleäre Proteine, die unter anderem an der DNA-Reparatur beteiligt sind, und sich selbst. Die Rolle dieser Poly(ADP-Ribosyl)ierung für die DNA-Reparatur ist bislang noch weitgehend ungeklärt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher zwei unterschiedliche Modelle genutzt, um den Einfluss der PARP-Aktivität auf die Reparatur verschiedener DNA-Modifikationen zu untersuchen. Zum einen die *trans*-dominante PARP-Hemmung durch die induzierbare Überexpression der PARP-DNA-Bindungs-Domäne (PARP-DBD) (**Küpper et al. 1995**) und zum anderen die Hemmung der Aktivität der PARP durch den Hemmstoff DPQ, der das katalytische Zentrum des Enzyms blockiert.

3.1.1 *Trans*-dominante PARP-Hemmung

Um eine *trans*-dominante Hemmung der PARP-Aktivität zu erreichen, wurden COM3-Zellen, die Vektoren mit den Sequenzen für die PARP-DBD sowie den menschlichen Glucocorticoidrezeptor enthalten, für 24 h mit Dexamethason (Dex) kultiviert (2.8.1). COM3-Zellen ohne Dexamethason-Behandlung und COR3-Zellen, die ausschließlich die Information für den menschlichen Glucocorticoidrezeptor trugen, mit bzw. ohne Dexamethason-Behandlung dienten als Kontrolle. Während der Schädigung und der Reparaturzeit war Dexamethason (50 nM) ebenfalls anwesend.

3.1.1.1 Auswirkungen der *trans*-dominanten PARP-Hemmung auf die Proliferation der Zellen

Da die Poly(ADP-Ribosyl)ierung bei vielen physiologischen Abläufen in den Zellen eine Rolle spielt, wurden zunächst die Konsequenzen der *trans*-dominanten PARP-Hemmung auf das Zellwachstum untersucht. Abbildung 3.1 zeigt, dass durch die Dexamethason-Behandlung sowohl die COR3- als auch die COM3-Zellen signifikant ($p \leq 0.004$ bzw. $p \leq 0.0002$) langsamer wuchsen als die jeweiligen Lösungsmittelkontrollen, die Expression

der PARP-DNA-Bindungsdomäne in den COM3-Zellen jedoch keinen zusätzlichen Einfluss auf die Proliferation hatte.

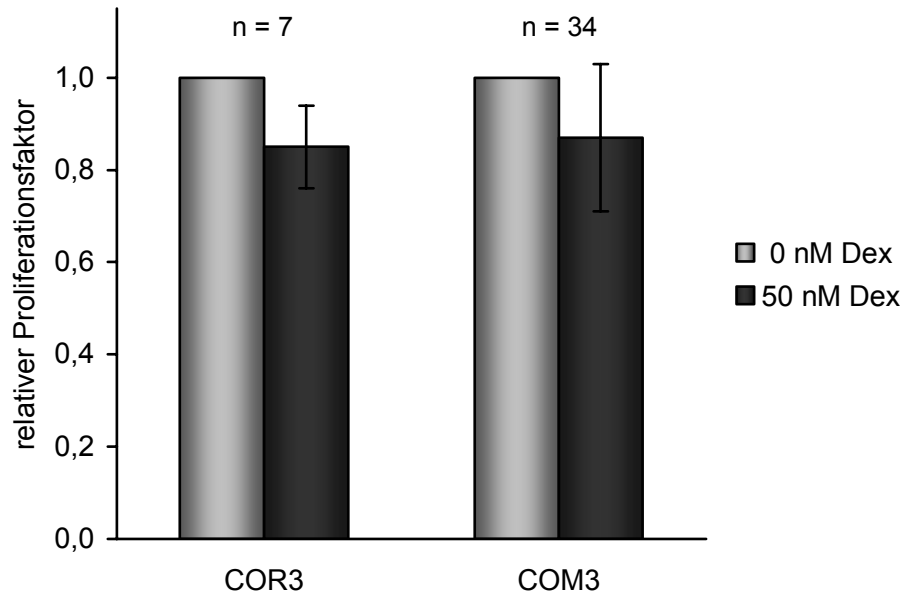


Abbildung 3.1: Einfluss einer Dexamethason-Behandlung (50 nM) auf den relativen Proliferationsfaktor von COR3- und COM3-Zellen. Die Zellen wuchsen 24 h unter Kulturbedingungen in An- oder Abwesenheit von Dexamethason. Zur Berechnung der relativen Proliferationsfaktoren wurde nach diesen 24 h die Zahl Dexamethason-behandelter und -unbehandelter Zellen bestimmt. Der relative Proliferationsfaktor errechnete sich aus dem Quotienten Dexamethason-behandelter Zellen zu Dexamethason-unbehandelten Zellen. Der Proliferationsfaktor der nicht Dexamethason-behandelten Zellen wurde "1" gesetzt.

3.1.1.2 Auswirkungen der *trans*-dominanten PARP-Hemmung auf die Reparaturgeschwindigkeit Fpg-sensitiver Basenmodifikationen

Es ist bekannt, dass die PARP 1 durch Einzel- sowie Doppelstrangbrüche aktiviert wird. Einzelstrangbrüche können sowohl direkt als auch als Intermediate der Basenexcisionsreparatur (BER) gebildet werden. Bisher ist die genaue Rolle der Aktivität der PARP bei der BER nicht geklärt. In *trans*-dominant PARP-gehemmten Zellen (COM3+Dex) und den Kontrollen (COM3, COR3+Dex und COR3) wurde daher nach der Induktion eines DNA-Schadens mit Ro 19-8022 plus sichtbarem Licht der Verlauf der Reparatur der induzierten oxidativen Fpg-sensitiven Basenmodifikationen verfolgt, um eine Aussage über die Bedeutung der Poly(ADP-Ribosyl)ierung bei der Reparatur dieser Modifikationen machen zu können. Zur Bestimmung der Reparaturkinetiken wurden die zu verschiedenen Zeitpunkten mit der alkalischen Elution (2.12) gemessenen DNA-

Modifikationen als prozentualer Anteil vom Schadensausmaß zum Zeitpunkt 0 h gegen die Zeit aufgetragen. Bei allen Werten wurde die Anzahl der DNA-Modifikationen, die in unbehandelten Zellen vorliegen (Steady-State-Spiegel), subtrahiert. In Abbildung 3.2 sind die Reparaturkinetiken der verschiedenen Zellen dargestellt.

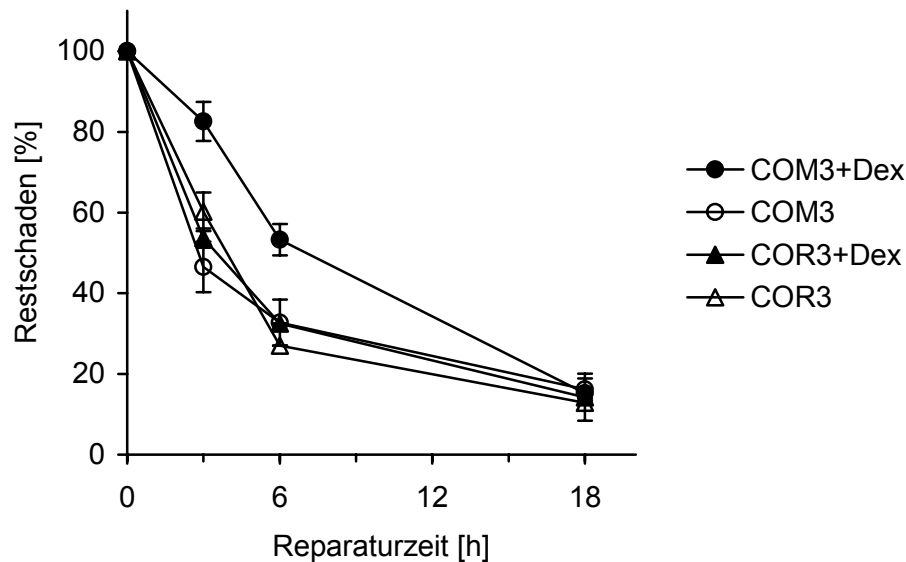


Abbildung 3.2: Reparatur Fpg-sensitiver Basenmodifikationen in *trans*-dominant PARP-gehemmten Zellen (COM3+Dex) und Kontrollen (COM3, COR3+Dex und COR3) in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Schadensinduktion erfolgte mit 50 nM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m²) auf Eis. 100 % entsprechen circa 0.45 induzierten Modifikationen/10⁶ bp. Die gemessenen 18-h-Werte wurden mit dem Proliferationsfaktor (2.12.1.6) korrigiert. (n = 3 bis 4)

Es zeigte sich, dass die Reparatur der induzierten oxidativen Basenmodifikationen in den *trans*-dominant PARP-gehemmten Zellen nach 3 h und 6 h signifikant ($p \leq 0.004$ bzw. $p \leq 0.04$) langsamer verlief als in den Kontrollen. Um die Hälfte der induzierten Fpg-sensitiven Modifikationen zu reparieren, benötigten die *trans*-dominant PARP-gehemmten Zellen etwa 6 h, die Kontrollzellen nur 3 h.

Um genauere Aussagen über den Hintergrund der langsameren Reparatur der Fpg-sensitiven Basenmodifikationen machen zu können, wurde während der Reparatur dieser Fpg-sensitiven Basenmodifikationen der Verlauf an AP-Läsionen und Einzelstrangbrüchen, die Intermediate der Reparatur Fpg-sensitiver Basenmodifikationen darstellen, beobachtet (Abbildung 3.3). Dabei zeigte sich, dass sowohl in den Kontrollen

als auch in den PARP-gehemmten Zellen weder AP-Läsionen noch Einzelstrangbrüche während der Reparatur Fpg-sensitiver Basenmodifikationen akkumulieren.

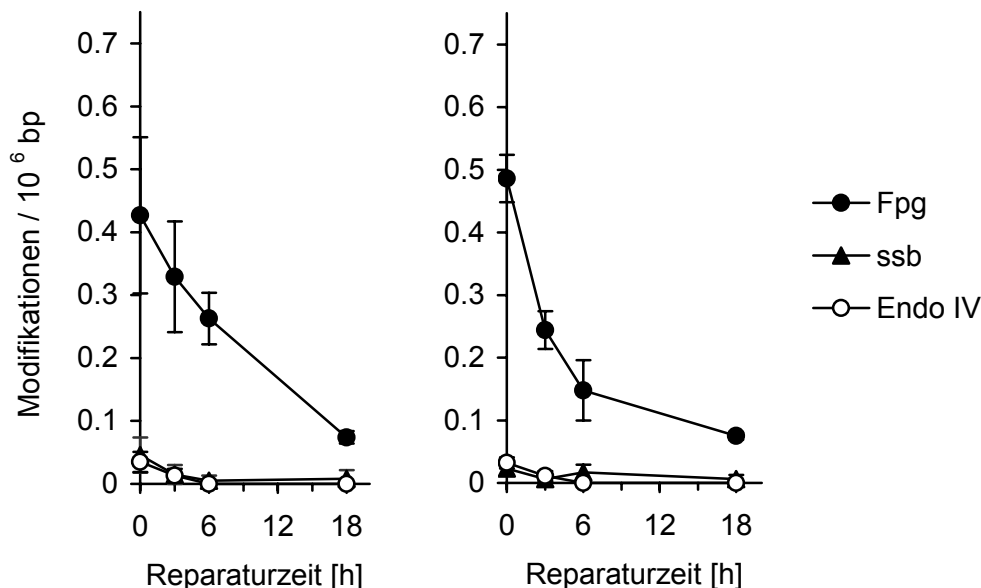


Abbildung 3.3: Anzahl von Einzelstrangbrüchen (ssb) und Endonuklease-IV-sensitiven AP-Läsionen während der Reparatur Fpg-sensitiver Basenmodifikationen in *trans*-dominant PARP-gehemmten Zellen (COM3+Dex) (**links**) und COM3 Kontrollzellen (**rechts**). Steady-State-Spiegel wurden abgezogen. (n = 3)

Zusätzlich wurde in *trans*-dominant PARP-gehemmten Zellen und COM3-Kontrollzellen die Reparatur durch Methylmethansulfonsäure (MMS) induzierter AP-Läsionen gemessen. Auch nach dieser Schädigung wurde keine Akkumulation von Einzelstrangbrüchen bzw. AP-Läsionen gefunden (Daten nicht gezeigt).

Neben den Reparaturkinetiken wurde in *trans*-dominant PARP-gehemmten Zellen und Kontrollen die Empfindlichkeit gegenüber oxidativen DNA-Modifikationen durch die Behandlung mit dem Photosensibilisator Ro 18-8022 plus sichtbarem Licht (2.12.1.1) bestimmt. Wie Abbildung 3.4 zeigt, war die Anzahl der durch Ro 19-8022 induzierten DNA-Modifikationen zwischen *trans*-dominant PARP-gehemmten und Kontrollzellen nicht signifikant unterschiedlich. In allen Zellen wurden durch den Photosensibilisator plus sichtbares Licht etwa 0,45 Fpg-sensitive Modifikationen/10⁶ bp induziert.

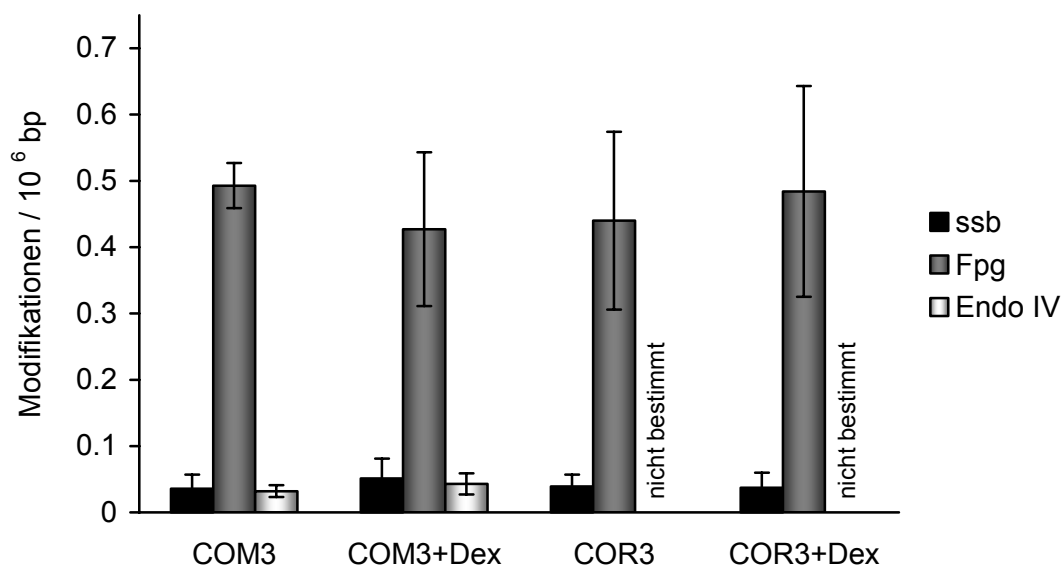


Abbildung 3.4: Einzelstrangbrüche (ssb), oxidative Fpg-sensitive Basenmodifikationen und Endonuklease-IV-sensitive AP-Läsionen in *trans*-dominant PARP-gehemmten (COM3+Dex) und Kontrollzellen, induziert durch 50 nM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m^2) auf Eis. Steady-State-Spiegel wurden abgezogen. (n = 3 bis 8)

3.1.1.3 Aktivität der 8-oxoG-Glykosylase in PARP-gehemmten Zellen

Zusätzlich zur Messung der Reparatur Fpg-sensitiver Basenmodifikationen, die nach früheren Untersuchungen hauptsächlich 8-oxoG darstellen (1.1.2.1), mit der alkalischen Elution, wurde in Zellextrakten aus PARP-gehemmten Zellen und Kontrollen die 8-oxoG-Glykosylaseaktivität an einem synthetischen Oligonukleotid, das an Position 16 ein 8-oxoG:C enthielt, gemessen (2.15.6.1). Dazu wurden aus unbehandelten Zellen und Zellen, die zur Induktion von Einzelstrangbrüchen und damit von Poly(ADP-Ribosyl)ierung mit $100 \mu\text{M}$ tBuOOH behandelt worden waren (2.12.1.3), Zellextrakte (2.15.3) hergestellt. Als Negativkontrolle wurde nur Lysepuffer eingesetzt, als Positivkontrolle wurde gereinigtes hOgg1 ($1 \mu\text{g}$) verwendet.

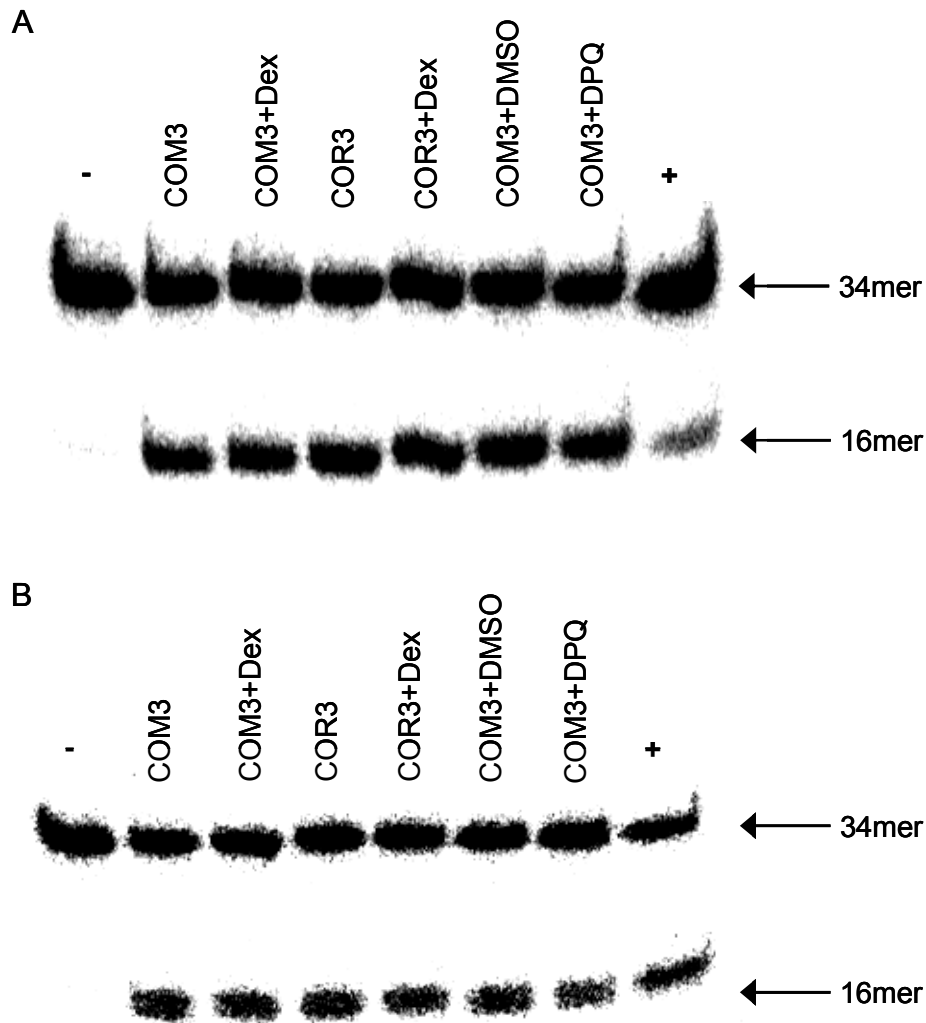


Abbildung 3.5: Nachweis der 8-oxoG-Glykosylase-Aktivität in Zellextrakten aus PARP-gehemmten (COM3+Dex und COM3+DPQ) Zellen und Kontrollen an einem Oligonukleotid, das an Position 16 ein 8-oxoG:C enthielt. **A:** Zellen ohne Strangbruchinduktion. **B:** Zellen, die vor der Präparation der Zellextrakte zur Einzelstrangbruchinduktion mit 100 μ M tBuOOH behandelt worden waren. Die Reaktionsprodukte wurden durch eine denaturierende PAGE getrennt und das Gel anschließend mit einem Phosphoimager aufgenommen (2.14.7). Als Negativkontrolle (-) wurde nur Lysepuffer eingesetzt, als Positivkontrolle (+) wurde gereinigtes hOgg1 (1 μ g) verwendet.

Aus Abbildung 3.5 A ist ersichtlich, dass sich die 8-oxoG-Glykosylaseaktivität in PARP-gehemmten Zellen und Kontrollen nicht wesentlich unterschied. Dieser Befund war unabhängig davon, ob vor der Präparation der Zellextrakte Einzelstrangbrüche induziert wurden (Abbildung 3.5 B).

3.1.1.4 Aktivität der AP-Endonuklease in PARP-gehemmten Zellen

Neben der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität wurde auch die AP-Endonukleaseaktivität (2.15.6.2) der in 3.1.1.3 eingesetzten Zellextrakte gemessen, um zu untersuchen, ob die verlangsamte Reparatur der Fpg-sensitiven Basenmodifikationen möglicherweise auf eine erniedrigte AP-Endonukleaseaktivität zurückgeführt werden konnte. Als Negativkontrolle diente Lysepuffer, als Positivkontrolle wurden 10 ng gereinigte Ape1 eingesetzt. Auch hier gab es keine Unterschiede in der Aktivität der verschiedenen Zellextrakte ein synthetisches Oligonukleotid mit einem Tetrahydrofuranylest an Position 16 einzuschneiden zwischen unbehandelten (Abbildung 3.6) und mit 100 μ M tBuOOH behandelten Zellen (Abbildung 3.7).

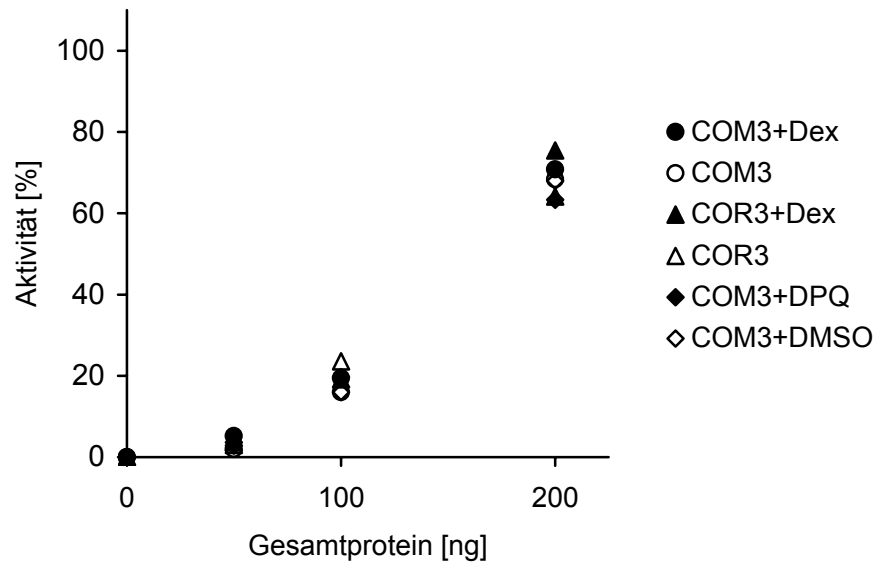


Abbildung 3.6: Nachweis der AP-Endonuklease-Aktivität in Zellextrakten aus PARP-gehemmten (COM3+Dex und COM3+DPQ) und Kontrollzellen an einem Oligonukleotid, das an Position 16 einen Tetrahydrofuranylest enthält. Als Negativkontrolle (-) wurde nur Lysepuffer eingesetzt, als Positivkontrolle (+) wurde gereinigte Ape1 (10 ng) verwendet. Die Reaktionsprodukte wurden durch eine denaturierende PAGE getrennt und das Gel anschließend mit einem Phosphoimager aufgenommen (2.14.7). Dargestellt ist die AP-Endonuklease-Aktivität der Extrakte als prozentualer Anteil des eingeschnittenen Oligonukleotids an der Gesamtmenge des Oligonukleotids. (n = 3)

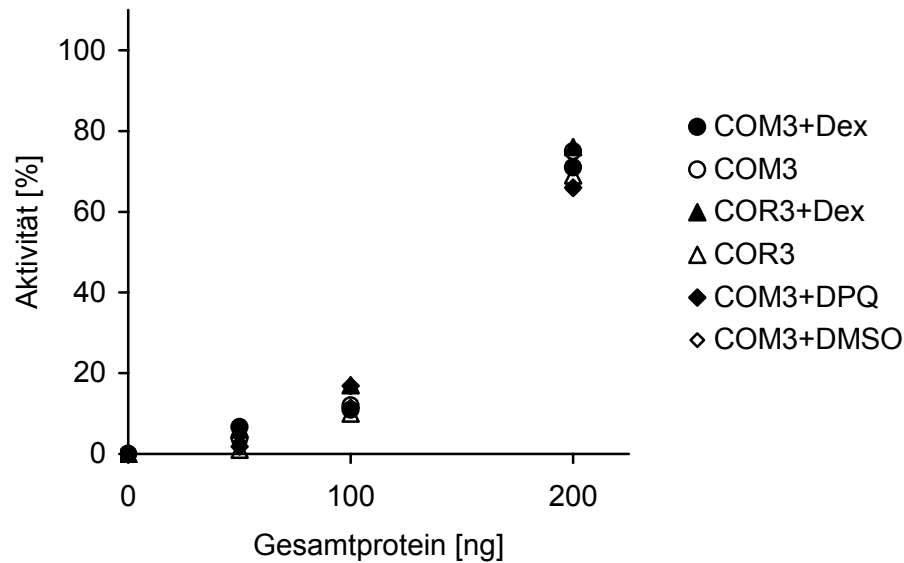


Abbildung 3.7: Nachweis der AP-Endonuclease-Aktivität in Zellextrakten aus PARP-gehemmten (COM3+Dex und COM3+DPQ) und Kontrollzellen, die zuvor, um Einzelstrangbrüche zu generieren, mit 100 μ M tBuOOH behandelt worden waren, an einem Oligonukleotid, das an Position 16 einen Tetrahydrofuranylest enthält. Als Negativkontrolle (-) wurde nur Lysepuffer eingesetzt, als Positivkontrolle (+) wurde gereinigte Apel (10 ng) verwendet. Die Reaktionsprodukte wurden durch eine denaturierende PAGE getrennt und das Gel anschließend mit einem Phosphoimager aufgenommen (2.14.7). Dargestellt ist die AP-Endonuclease-Aktivität der Extrakte als prozentualer Anteil des eingeschnittenen Oligonukleotids an der Gesamtmenge des Oligonukleotids. (n = 3)

3.1.1.5 Auswirkungen der *trans*-dominanten PARP-Hemmung auf die Reparatur und die Induzierbarkeit von Pyrimidindimeren durch UVB

Da in *trans*-dominant PARP-gehemmten Zellen eine verlangsamte Reparatur oxidativer Basenmodifikationen beobachtet werden konnte, war es ebenfalls interessant, den Einfluss der PARP auf die Reparatur von Pyrimidindimeren zu untersuchen, die im Gegensatz zu den oxidativen Basenmodifikationen in Säugierzellen ausschließlich durch die Nukleotidexcisionsreparatur (NER) repariert werden (1.4.3). Dabei wurde auch die Empfindlichkeit der verschiedenen Zellen gegenüber der Bestrahlung mit UVB erfasst (2.12.1.2).

Wie Abbildung 3.8 zeigt, war in *trans*-dominant PARP-gehemmten Zellen (COM3+Dex) die Reparaturgeschwindigkeit von Pyrimidindimeren deutlich langsamer als in der Kontrolle. In den Kontrollzellen war nach etwa 9 h die Hälfte der induzierten Pyrimidindimere repariert. In den *trans*-dominant PARP-gehemmten Zellen war dies erst nach ungefähr 22 h der Fall.

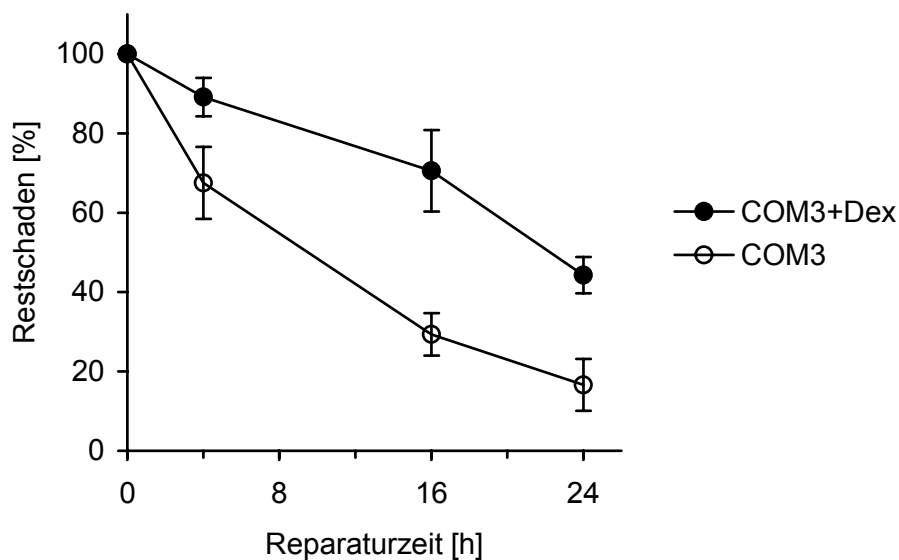


Abbildung 3.8: Reparatur von Pyrimidindimeren in *trans*-dominant PARP-gehemmten Zellen (COM3+Dex) und Kontrolle in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Schadensinduktion erfolgte mit 2.4 J/m² UVB. 100 % entsprechen etwa 0.27 induzierten Pyrimidindimeren/10⁶ bp. 16- und 24-h-Werte wurden mit dem Proliferationsfaktor korrigiert. (n = 3 bis 4)

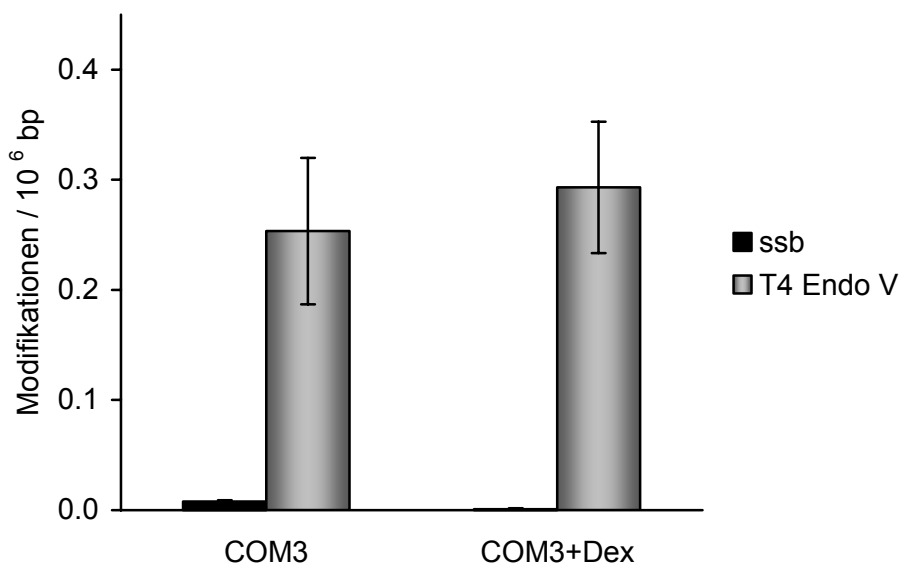


Abbildung 3.9: Einzelstrangbrüche (ssb) und T4 Endonuklease-V-sensitive Pyrimidindimere, die durch 2.4 J/m² UVB in *trans*-dominant PARP-gehemmten Zellen (COM3+Dex) und der Kontrolle induziert wurden. Steady-State-Spiegel wurden abgezogen. (n = 10)

Erwartungsgemäß unterschieden sich die durch UVB induzierten DNA-Modifikationen in *trans*-dominanten PARP-gehemmten Zellen nicht signifikant vom Schadensausmaß in den

Kontrollen (Abbildung 3.9). Bei der Schädigung wurden fast ausschließlich Pyrimidindimere generiert.

3.1.1.6 Auswirkungen der *trans*-dominanten PARP-Hemmung auf die Reparatur und Induzierbarkeit von Einzelstrangbrüchen durch tBuOOH

Der Einfluss der PARP-Aktivität auf die Reparatur von Einzelstrangbrüchen sollte ebenfalls betrachtet werden. Hierzu wurden *trans*-dominant PARP-gehemmte Zellen und Kontrollzellen mit 100 μM tBuOOH geschädigt (2.12.1.3) und dann die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber dieser Schädigung bzw. die Reparaturkapazität der Zellen für Einzelstrangbrüche gemessen.

In Abbildung 3.10 sind die Reparaturkinetiken (3.1.1.2) der induzierten Einzelstrangbrüche für *trans*-dominant PARP-gehemmte Zellen und die Kontrolle dargestellt. Hier war ebenfalls eine deutlich langsamere Reparatur der Einzelstrangbrüche in den PARP-gehemmten Zellen im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar. In den Kontrollzellen war die Hälfte der induzierten Einzelstrangbrüche bereits nach etwa 7 Minuten repariert, wogegen die Halbwertszeit in den *trans*-dominant PARP-gehemmten Zellen auf etwa 15 min erhöht war.

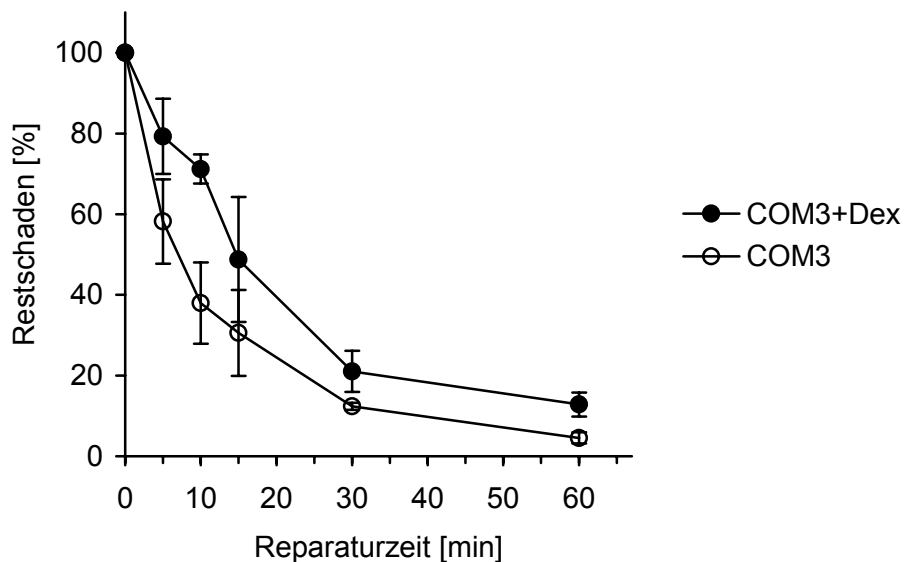


Abbildung 3.10: Reparatur von Einzelstrangbrüchen in *trans*-dominant PARP-gehemmten Zellen (COM3+Dex) und Kontrollen in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Schadensinduktion erfolgte mit 100 μM tBuOOH in serumfreiem Medium unter Kulturbedingungen. (n = 3 bis 6)

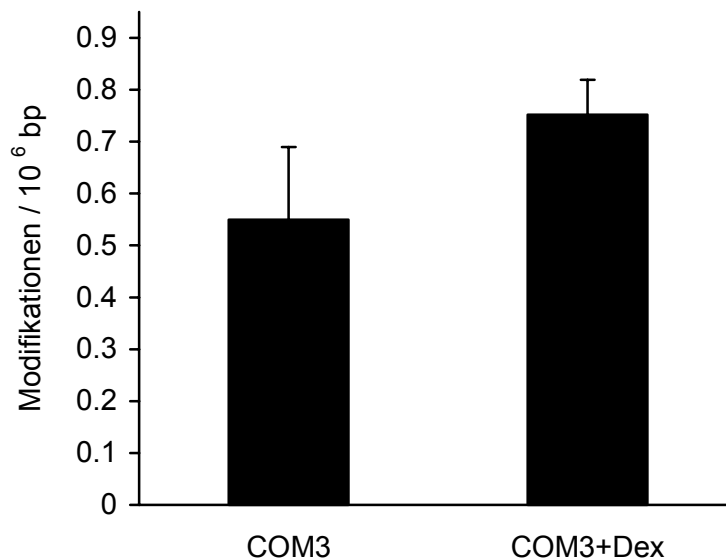


Abbildung 3.11: Einzelstrangbrüche in *trans*-dominant PARP-gehemmten Zellen (COM3+Dex) und in der Kontrolle, induziert durch 100 μ M tBuOOH in serumfreiem Medium bei 37 °C. Die Steady-State-Spiegel wurden abgezogen. (n = 6)

Wie in Abbildung 3.11 zu ersehen, war die Anzahl der durch tBuOOH induzierten Einzelstrangbrüche in den *trans*-dominant PARP-gehemmten Zellen signifikant ($p < 0.005$) höher als in den Kontrollzellen. Die sehr schnelle Reparatur der Einzelstrangbrüche (Abbildung 3.10) lässt vermuten, dass die in Abbildung 3.11 beobachtete höhere Anzahl induzierter Einzelstrangbrüche in den *trans*-dominant PARP-gehemmten Zellen nicht auf eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dieser Schädigung, sondern auf eine schon während der Schädigung und Aufarbeitung ablaufende, in den COM3+Dex verlangsamte Reparatur zurückzuführen ist.

Außerdem wurden die Steady-State-Spiegel verschiedener DNA-Modifikationen in den *trans*-dominant PARP-gehemmten Zellen und den Kontrollen bestimmt. Dadurch sollte ein möglicher Einfluss der Poly(ADP-Ribosyl)ierung auf das Fließgleichgewicht zwischen endogener Bildung und der Reparatur der DNA-Modifikationen erkannt werden. Wie in Abbildung 3.12 zu sehen, gab es keine signifikanten Unterschiede in den Steady-State-Spiegeln zwischen den *trans*-dominant PARP-gehemmten Zellen und den Kontrollen.

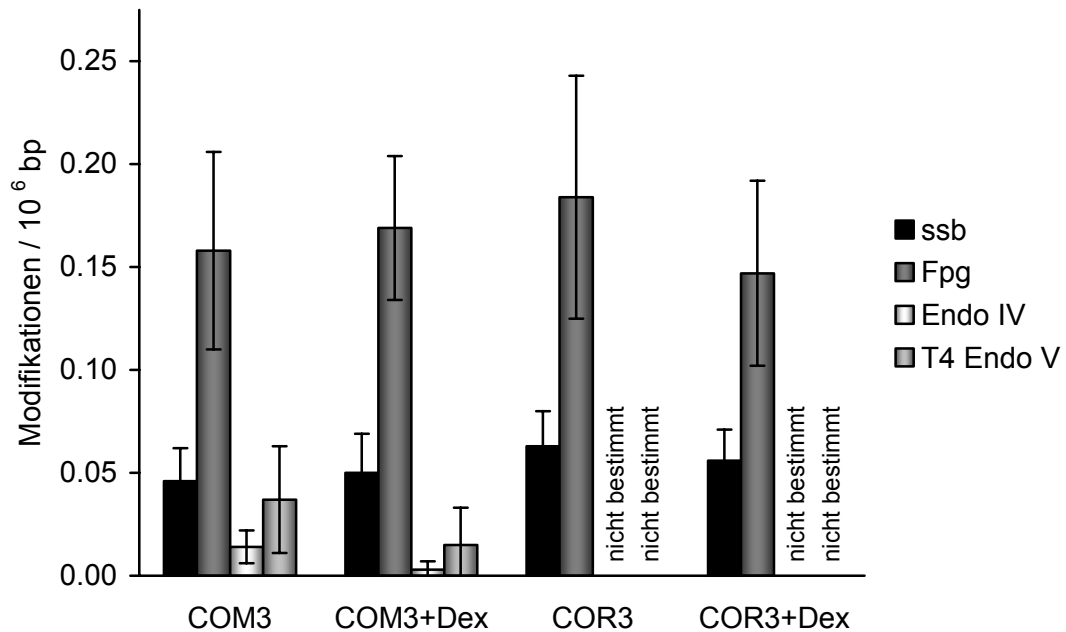


Abbildung 3.12: Steady-State-Spiegel von Einzelstrangbrüchen (ssb) bzw. oxidativen Fpg-sensitiven Basenmodifikationen, Endonuklease-IV-sensitiven AP-Läsionen und T4 Endonuklease-V-sensitiven Modifikationen in unbehandelten Zellen mit (COM3+Dex) und ohne *trans*-dominante PARP-Hemmung. (n = 5 bis 9)

3.1.2 PARP-Hemmung durch den Hemmstoff DPQ

Zur weiteren Charakterisierung des Einflusses der PARP auf die Reparatur verschiedener DNA-Modifikationen sollten auch Fibroblasten, die defizient in bestimmten Reparaturgenen waren, untersucht werden. Um auch in diesen Zellen die Poly(ADP-Ribosyl)ierung unterdrücken zu können, wurde der PARP-Hemmstoff DPQ eingesetzt. Der Hemmstoff DPQ blockiert das katalytische Zentrum der PARP. Das Enzym kann deshalb NAD^+ nicht mehr als Substrat nutzen, um Poly(ADP-Ribose) zu synthetisieren (**Suto et al. 1991**). Für die Experimente wurden die Zellen für 30 min mit $10 \mu\text{M}$ DPQ unter Kulturbedingungen präinkubiert. Während der Schädigung und der Reparatur waren ebenfalls $10 \mu\text{M}$ DPQ anwesend.

3.1.2.1 Überprüfung der Hemmung der katalytischen Aktivität der PARP durch DPQ in COM3-Zellen

Um Informationen über die Effektivität der PARP-Hemmung durch DPQ zu erhalten, wurden zunächst die COM3-Zellen mit 10 μM DPQ behandelt und dann das Ausmaß der Reparatur von Einzelstrangbrüchen, Fpg-sensitiven Modifikationen und Pyrimidindimeren an ausgesuchten Zeitpunkten bestimmt. Die erhaltenen Daten wurden anschließend mit den Daten der *trans*-dominanten PARP-Hemmung verglichen.

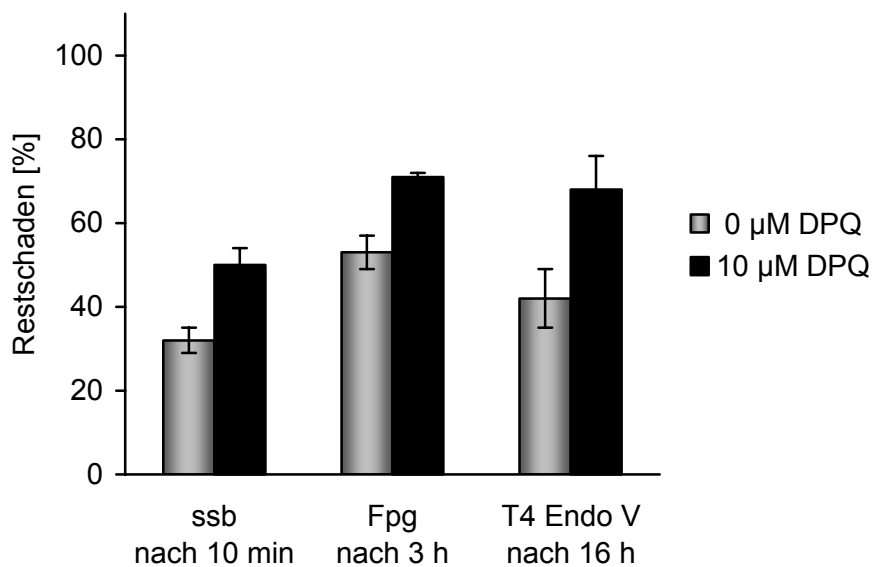


Abbildung 3.13: Einfluss der PARP-Hemmung durch DPQ (10 μM) auf die Reparatur von durch 100 μM tBuOOH induzierten Einzelstrangbrüchen (ssb), durch 50 nM Ro 19-8022 plus Licht induzierten oxidativen Fpg-sensitiven Basenmodifikationen und durch 2.4 J/m^2 induzierten T4 Endonuklease-V-sensitiven Pyrimidindimeren nach ausgesuchten Reparaturzeiten. (n = 3)

Die Ergebnisse der PARP-Hemmung durch 10 μM DPQ bestätigten die Ergebnisse, die durch *trans*-dominante PARP-Hemmung erhalten wurden (Abbildung 3.13). Die Effekte der PARP-Hemmung durch DPQ waren, außer bei der Reparatur der Einzelstrangbrüche, ähnlich stark ausgeprägt wie bei der *trans*-dominanten PARP-Hemmung (Abbildung 3.4, Abbildung 3.9 und Abbildung 3.10).

In COM3-Zellen hatte die PARP-Hemmung durch DPQ weder einen Einfluss auf die Steady-State-Spiegel noch auf die Induzierbarkeit der verschiedenen DNA-Modifikationen (Daten nicht gezeigt).

3.1.2.2 Auswirkungen der PARP-Hemmung durch DPQ auf die Reparatur und Induzierbarkeit oxidativer Basenmodifikationen in reparaturdefizienten Mausembryofibroblasten

Da bei *trans*-dominanter PARP-Hemmung eine verlangsamte Reparatur oxidativer Fpg-sensitiver Basenmodifikationen beobachtet worden war (3.1.1.2), sollte mit Hilfe verschiedener Zelllinien, die einen genetischen Defekt in bestimmten Reparaturgenen besaßen, ein möglicher Zusammenhang zwischen der Poly(ADP-Ribosyl)ierung und der Aktivität dieser Proteine im Rahmen der Basenexcisionsreparatur untersucht werden. Als Zellmodelle dienten zum einen 8-oxoG-Glykosylase-(Ogg1)-defiziente Zellen, die nicht in der Lage sind, effizient 8-oxoG zu reparieren, und Csb-defiziente Zellen, die weder zur transkriptionsgekoppelten Reparatur (1.4.4) noch zur *back-up* Reparatur von 8-oxoG beim Fehlen von Ogg1 fähig sind. In Wildtyp- (F11.1) und *csb*^{-/-}-Zellen wurden die Reparaturkinetiken oxidativer Basenmodifikationen bestimmt (3.1.1.2). In *ogg*^{-/-}-Zellen wurde das Ausmaß der Reparatur nur zum Zeitpunkt 18 h untersucht, da in diesen Zellen zu früheren Zeitpunkten noch keine ausreichende Reparatur nachweisbar war (Osterod 2002).

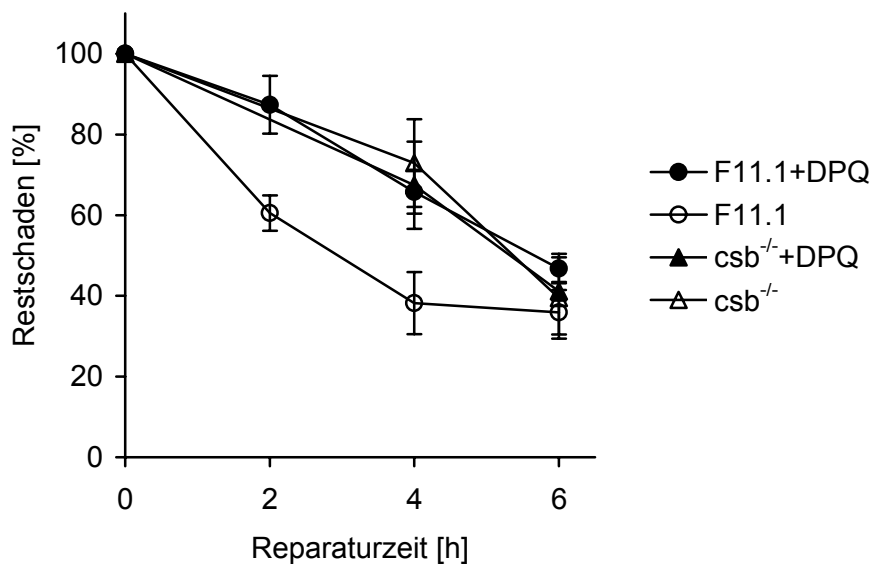


Abbildung 3.14: Reparatur Fpg-sensitiver Basenmodifikationen in PARP-gehemmten Zellen (F11.1+DPQ und *csb*^{-/-}+DPQ) und Kontrollen (F11.1 und *csb*^{-/-}) in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Schadensinduktion erfolgte mit 50 nM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m²) auf Eis. 100 % entsprechen circa 0.5 induzierten Modifikationen/10⁶ bp. (n = 3)

Die Zellen zeigten unterschiedliche Reparaturkinetiken (Abbildung 3.14). In Wildtyp-Zellen (F11.1) war nach etwa drei Stunden die Hälfte der induzierten oxidativen Fpg-sensitiven Basenmodifikationen repariert. In Wildtyp-Zellen mit PARP-Hemmung (F11.1+DPQ) erhöhte sich die Halbwertszeit der induzierten DNA-Modifikationen auf sechs Stunden. Die Csb-defizienten (*csb*^{-/-}) Zellen reparierten die induzierten DNA-Modifikationen langsamer als die Wildtyp-Zellen ohne PARP-Hemmung und ähnelten in ihrem Reparaturverhalten eher den Wildtyp-Zellen mit PARP-Hemmung (F11.1+DPQ). In diesen Csb-defizienten Zellen hatte eine Hemmung der PARP-Aktivität keinen weiteren Einfluss auf die Reparaturgeschwindigkeit oxidativer Basenmodifikationen.

In Ogg-defizienten Zellen hatte eine Hemmung der PARP keinen Einfluss auf die Reparatur Fpg-sensitiver oxidativer Basenmodifikationen nach 18 Stunden. Die Reparatur schien eher schneller (Abbildung 3.15).

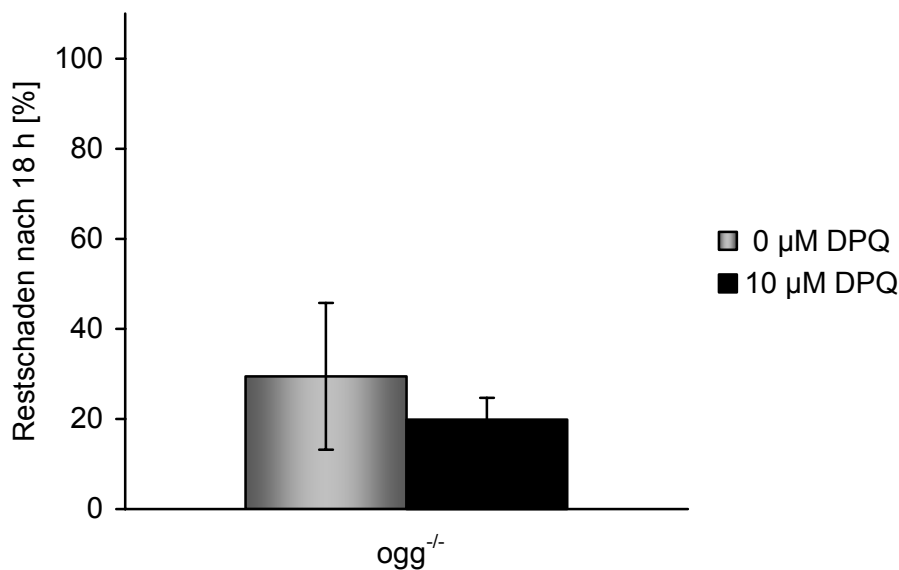


Abbildung 3.15: Reparatur Fpg-sensitiver Basenmodifikationen in PARP-gehemmten Zellen (*ogg*^{-/-}+DPQ) und der Kontrolle in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Schadensinduktion erfolgte mit 50 nM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m²) auf Eis. 100 % entsprechen circa 0.4 induzierten Modifikationen/10⁶ bp. Die gemessenen 18-h-Werte wurden mit dem Proliferationsfaktor (2.12.1.6) korrigiert. (n = 4)

Zusätzlich sollte anhand der Schädigung der Wildtyp- und *knockout*-Zelllinien mit Ro 19-8022 in Kombination mit sichtbarem Licht (2.12.1.1) gezeigt werden, ob eine Hemmung der PARP durch DPQ die Induktion oxidativer Basenmodifikationen beeinflusste. Abbildung 3.16 zeigt die Anzahl der induzierten DNA-Modifikationen. Die

durch Ro 19-8022 und sichtbarem Licht hauptsächlich erzeugten Fpg-sensitiven Basenmodifikationen unterschieden sich nicht signifikant zwischen PARP-gehemmten Zellen und Kontrollen. Der Ausfall von Csb bzw. Ogg1 hatte ebenfalls keinen Einfluss auf das Schadensausmaß.

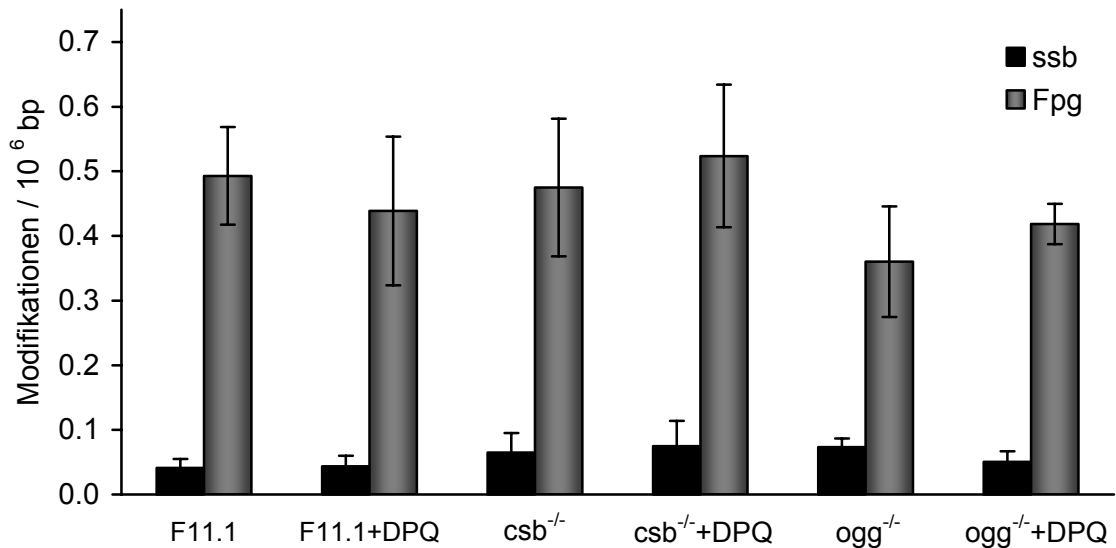


Abbildung 3.16: Anzahl der durch Ro 19-8022 und sichtbarem Licht (166 kJ/m^2) induzierten Einzelstrangbrüche (ssb) und oxidativen Fpg-sensitiven Basenmodifikationen in Wildtyp- und *Knockout*-Zellen mit (+DPQ) bzw. ohne PARP-Hemmung. Steady-State-Spiegel wurden abgezogen. (n = 4 bis 7)

Kurz vor Beendigung dieser Arbeit wurden von A. Klungland (Oslo) Mausembryofibroblasten aus *parp1^{-/-}-knockout*-Mäusen zur Verfügung gestellt. Anhand dieser Zellen sollte eine mögliche Beteiligung der PARP 2 bei der Reparatur oxidativer Fpg-sensitiver Basenmodifikationen untersucht werden. Zusätzlich war mit diesen PARP-defizienten Zellen eine weitere Überprüfung der PARP-Hemmung durch DPQ (vergleiche 3.1.2.1) in den anderen verwendeten Mausembryofibroblasten möglich.

Wie Abbildung 3.17 zeigt, hatte eine Hemmung der PARP-Aktivität durch den Hemmstoff DPQ keine weitere Verschlechterung der Reparatur oxidativer Fpg-sensitiver Basenmodifikationen in PARP-defizienten Zellen zur Folge. Daraus konnte geschlossen werden, dass die PARP 2, die von DPQ vermutlich ebenso wie die PARP 1 gehemmt wird, nicht an der Reparatur dieser Modifikationen beteiligt ist. Außerdem wurde die Wirksamkeit der PARP-Hemmung durch DPQ erneut bestätigt (vergleiche Abbildung

3.13). Die DPQ-Behandlung hemmte die Reparatur in Wildtyp-Zellen (F11.1+DPQ) auf das gleiche Niveau wie in PARP-defizienten Zellen.

In den PARP-defizienten Zellen waren weder die Steady-State-Spiegel verschiedener DNA-Modifikationen noch die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber der Schädigung mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022 plus sichtbares Licht verändert (Daten nicht gezeigt).

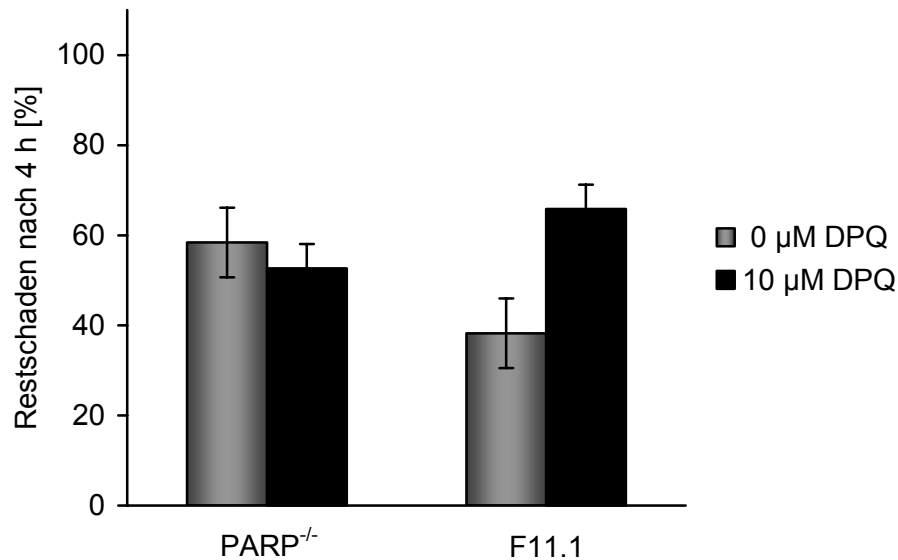


Abbildung 3.17: Reparatur Fpg-sensitiver Basenmodifikationen in PARP-defizienten Zellen und F11.1-Wildtyp-Zellen mit (+DPQ) und ohne DPQ-Behandlung in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Schadensinduktion erfolgte mit 50 nM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m²) auf Eis. 100 % entsprechen circa 0.4 induzierten Modifikationen/10⁶ bp. Die Werte der Wildtyp-Zellen sind Abbildung 3.14 entnommen. (n = 3 bis 4)

3.1.2.3 Auswirkungen der PARP-Hemmung durch DPQ auf die Reparatur und Induzierbarkeit von Pyrimidindimeren in Mausembryofibroblasten

Die Hemmung der katalytischen Aktivität der PARP durch DPQ (10 μM) beeinflusste wie im Fall der COM3-Zellen mit *trans*-dominanter PARP-Hemmung die Reparatur von Pyrimidindimeren in den Wildtyp-Zellen (F11.1). Der Effekt war jedoch schwächer ausgeprägt als in den COM3-Zellen (Abbildung 3.8). Ähnlich wie bei der Reparatur oxidativer Basenmodifikationen war in Csb-defizienten Zellen die Reparaturgeschwindigkeit von Pyrimidindimeren etwas langsamer als in Wildtyp-Zellen. Die Hemmung der PARP durch DPQ hatte in Csb-defizienten Zellen keine weitere Verlangsamung der Reparatur von Pyrimidindimeren (Abbildung 3.18) zur Folge.

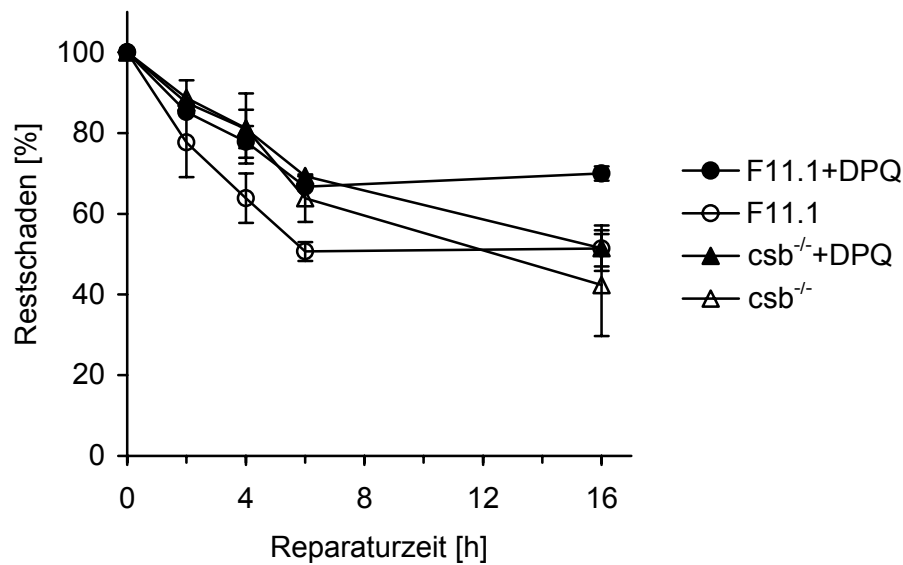


Abbildung 3.18: Reparatur von Pyrimidindimeren in PARP-gehemmten Zellen (F11.1+DPQ und $csb^{-/+}$ +DPQ) und Kontrollen in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Schadensinduktion erfolgte mit 2.4 J/m² UVB. 100 % entsprechen etwa 0.4 induzierten Pyrimidindimeren/10⁶ bp. 16-h-Werte wurden mit dem Proliferationsfaktor korrigiert. (n = 4 bis 5)

Zusätzlich zur Empfindlichkeit gegenüber oxidativen Basenmodifikationen (Abbildung 3.16) wurde die Induzierbarkeit von Pyrimidindimeren durch UVB in PARP-gehemmten Zellen und Kontrollen untersucht. Hier konnten wie bei den *trans*-dominant PARP-gehemmten COM3-Zellen (Abbildung 3.9) keine Unterschiede zwischen PARP-gehemmten Zellen und Kontrollen nachgewiesen werden (Abbildung 3.19).

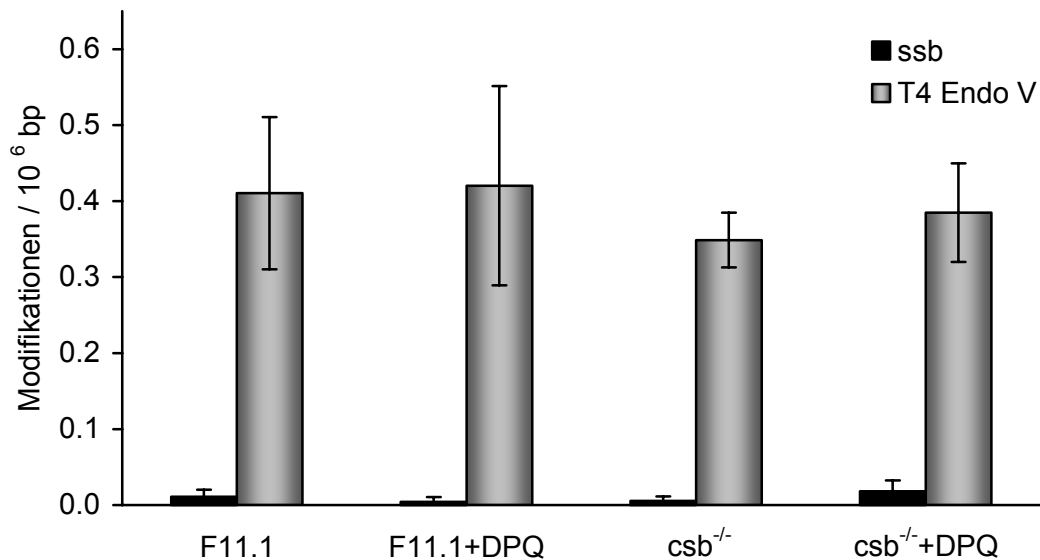


Abbildung 3.19: Einzelstrangbrüche (ssb) und T4 Endonuklease-V-sensitive Pyrimidindimere, die durch 2.4 J/m² UVB in PARP-gehemmten Zellen (F11.1+DPQ und csb^{-/-}+DPQ) und den Kontrollen induziert wurden. Steady-State-Spiegel wurden abgezogen. (n = 6 bis 8)

3.1.2.4 Auswirkungen der PARP-Hemmung durch DPQ auf die Reparatur und Induzierbarkeit von Einzelstrangbrüchen in Mausembryofibroblasten

Zur Messung des Einflusses der Poly(ADP-Ribosyl)ierung auf die Einzelstrangbruchreparatur in Ogg1- und Csb-defizienten Zellen wurden die verschiedenen Zellen mit tBuOOH behandelt (2.12.1.3) und dann die Empfindlichkeit bzw. die Reparaturkapazität dieser Zellen für Einzelstrangbrüche untersucht.

Aus Abbildung 3.20 wird ersichtlich, dass in Mausembryofibroblasten die Reparatur von Einzelstrangbrüchen sehr unterschiedlich verlief. Die Wildtyp- (F11.1) und Csb-defizienten Zellen benötigten etwa 13 min um die Hälfte der induzierten Einzelstrangbrüche zu reparieren. Die Ogg1-defizienten Zellen hatten bereits nach circa 6 min 50 % der induzierten Einzelstrangbrüche repariert. Ein Einfluss der Hemmung der PARP-Aktivität durch DPQ war in allen Zelllinien jedoch nur schwach zu erkennen.

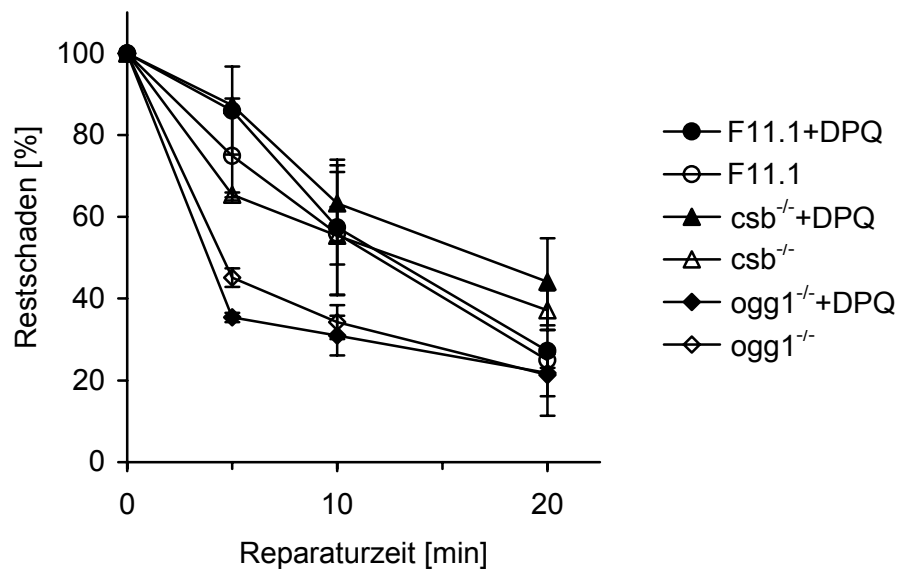


Abbildung 3.20: Reparatur von Einzelstrangbrüchen in PARP-gehemmten Zellen (F11.1+DPQ, csb^{-/-}+DPQ und ogg1^{-/-}+DPQ) und Kontrollen in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Schadensinduktion erfolgte mit 100 µM tBuOOH in serumfreiem Medium unter Kulturbedingungen. (n = 4 bis 5)

Die Empfindlichkeit der PARP-gehemmten Zellen (10 µM DPQ) gegenüber der Induktion von Einzelstrangbrüchen durch tBuOOH war wie bei *trans*-dominanter PARP-Hemmung in COM3-Zellen etwas höher als die der Kontrollzellen (siehe auch 3.1.1.6). Dabei hatte das Fehlen von Csb bzw. Ogg1 keinen weiteren Einfluss auf die Induzierbarkeit der Einzelstrangbrüche (Abbildung 3.21).

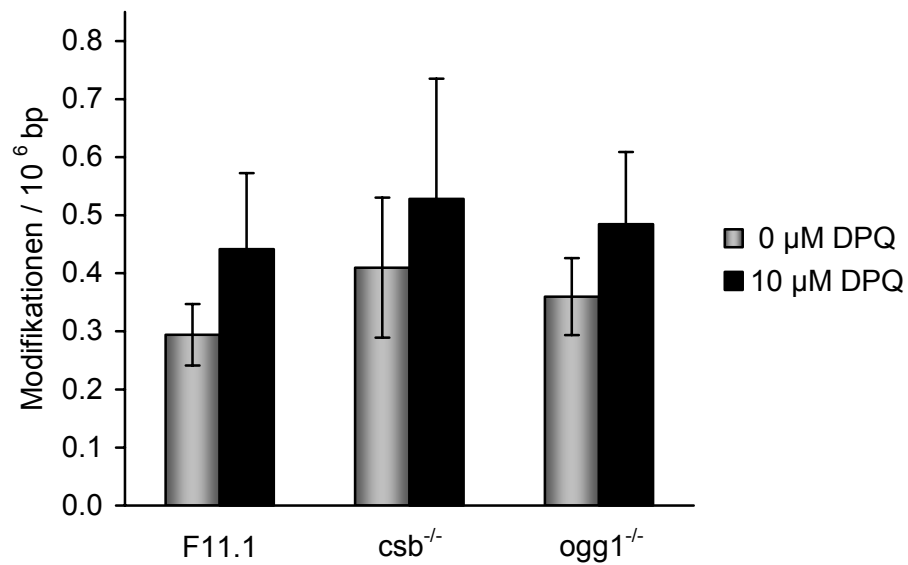


Abbildung 3.21: Einzelstrangbrüche in PARP-gehemmten Zellen (10 μM DPQ) und in Kontrollen induziert durch 100 μM tBuOOH in serumfreiem Medium bei 37 °C. Die Steady-State-Spiegel wurden abgezogen. (n = 4 bis 5)

Wie bei den COM3-Zellen mit *trans*-dominanter PARP-Hemmung hatte sowohl in *Csb*- und *Ogg1*-defizienten Zellen als auch in Wildtypzellen (F11.1) die Hemmung der PARP-Aktivität durch DPQ keinen Einfluss auf die Steady-State-Spiegel von Einzelstrangbrüchen, oxidativen Fpg-sensitiven Basenmodifikationen und T4 Endonuklease-V-sensitiven Modifikationen (Abbildung 3.22).

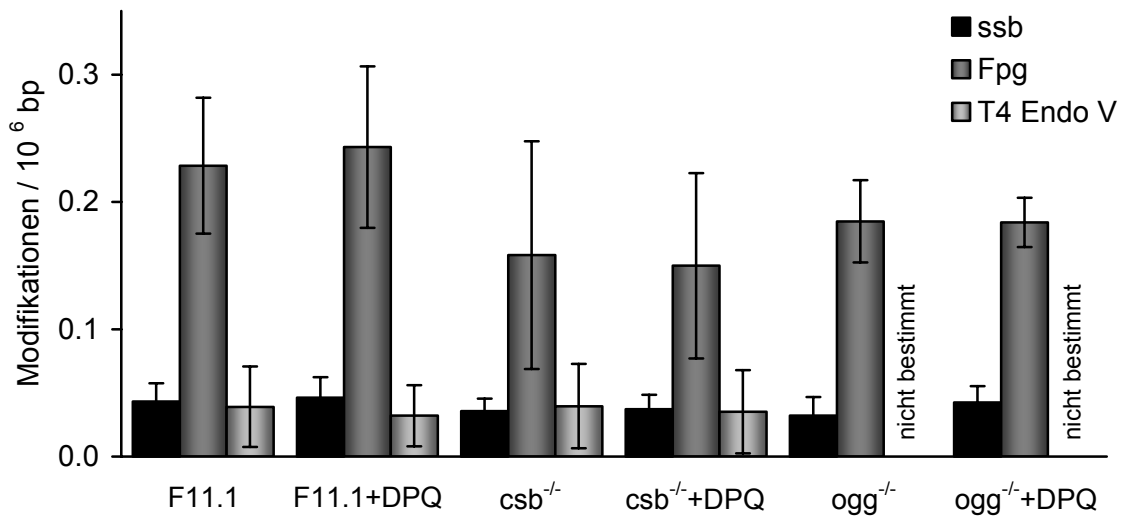


Abbildung 3.22: Steady-State-Spiegel von Einzelstrangbrüchen (ssb), oxidativen Fpg-sensitiven Basenmodifikationen und T4 Endonuklease-V-sensitiven Modifikationen in unbehandelten Wildtyp- (F11.1), *csb*^{-/-}-sowie *ogg*^{-/-}-Mausembryofibroblasten mit (+DPQ) und ohne PARP-Hemmung. (n = 4 bis 7)

3.1.2.5 Auswirkungen der PARP-Hemmung durch DPQ auf die Reparatur und Induzierbarkeit oxidativer Basenmodifikationen in XRCC1-defizienten Zellen

Der Einfluss der XRCC1-Defizienz mit und ohne gleichzeitiger Hemmung der katalytischen Aktivität der PARP auf die Reparatur und die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Ro 19-8022 plus sichtbares Licht wurden untersucht, da bekannt ist, dass die PARP und XRCC1 direkt interagieren können und diese Interaktion bei der Basenexcisionsreparatur *in vivo* eine Rolle spielen könnte (vergleiche 1.4.7.3). XRCC1 hat selbst keine enzymatische Aktivität, wird aber als Plattformprotein für DNA-Reparaturenzyme angesehen, das die Aktivität dieser Enzyme koordiniert bzw. stimuliert.

In Abbildung 3.23 ist das Ausmaß der Reparatur oxidativer Fpg-sensitiver Basenmodifikationen dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass die Reparatur dieser Modifikationen in XRCC1-defizienten Zellen (EM9) und Wildtyp-Zellen (AA8-1) ähnlich verlief, das heisst, die XRCC1-Defizienz alleine hatte keinen Einfluss auf die Reparatur der Fpg-sensitiven Modifikationen. Wurde zusätzlich die Aktivität der PARP durch DPQ (10 µM) gehemmt, war die Reparatur signifikant langsamer als in nicht PARP-gehemmten Zellen. Diese Verlangsamung der Reparatur oxidativer Basenmodifikationen durch DPQ war in den XRCC1-defizienten Zellen ausgeprägter (Signifikanz $p \leq 0.03$) als in den Wildtyp-Zellen.

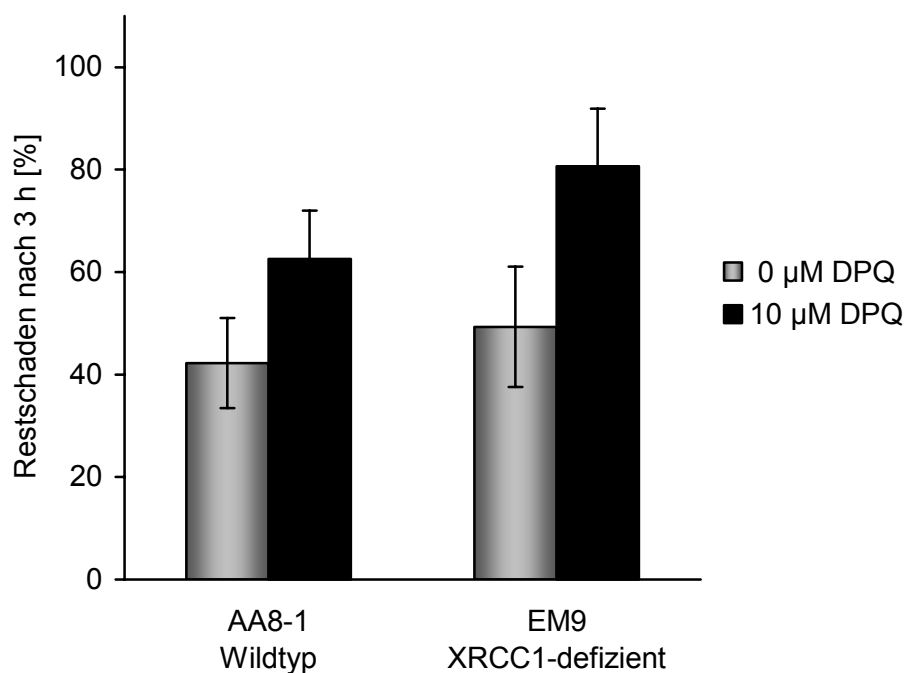


Abbildung 3.23: Reparatur Fpg-sensitiver Basenmodifikationen in PARP-gehemmten Zellen (+DPQ) und Kontrollen in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Schadensinduktion erfolgte mit 50 nM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m²) auf Eis. 100 % entsprechen etwa 0.45 induzierten Modifikationen/10⁶ bp. (n = 3 bis 4)

Eine signifikante Beeinflussung der Induzierbarkeit oxidativer Basenmodifikationen konnte nicht nachgewiesen werden (Abbildung 3.24). Die Zahl der Einzelstrangbrüche nach Behandlung mit Ro 19-8022 war in den XRCC1-defizienten Zellen (EM9) scheinbar signifikant ($p \leq 0.04$) höher als in Wildtyp-Zellen. Diese scheinbar erhöhte Empfindlichkeit konnte jedoch auf die im Vergleich zu den XRCC1-defizienten Zellen (EM9) extrem schnelle Reparatur der Einzelstrangbrüche in den Wildtyp-Zellen zurückgeführt werden (Abbildung 3.25). Die zusätzliche Hemmung der PARP-Aktivität hatte keinen weiteren Einfluss auf die Induzierbarkeit von Einzelstrangbrüchen durch Ro 19-8022.

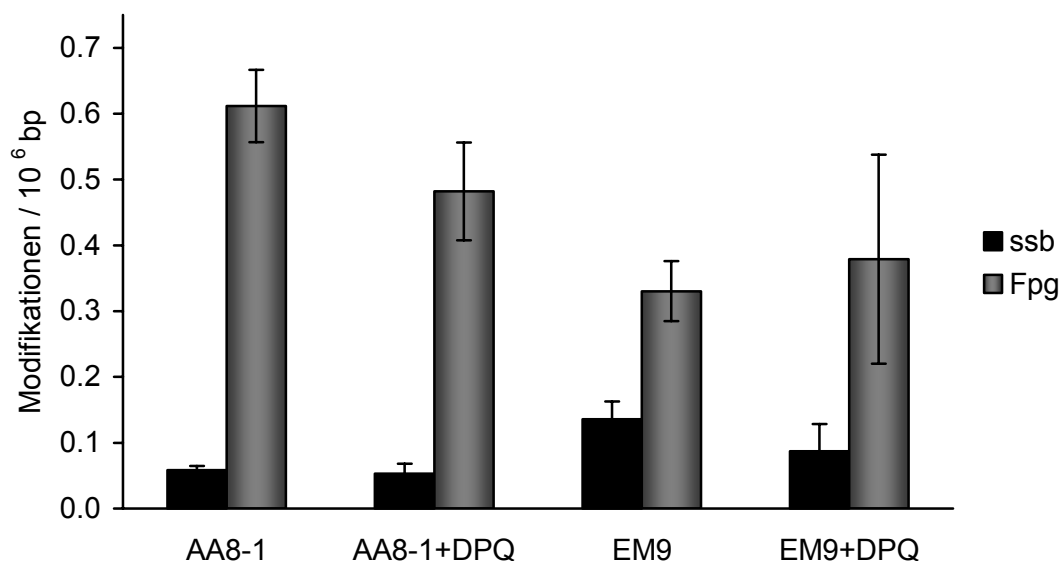


Abbildung 3.24: Anzahl der durch Ro 19-8022 und sichtbarem Licht (166 kJ/m^2) induzierten Einzelstrangbrüche (ssb) und oxidativen Fpg-sensitiven Basenmodifikationen in Wildtyp- und XRCC1-defizienten Zellen mit (+DPQ) bzw. ohne PARP-Hemmung. Steady-State-Spiegel wurden abgezogen. ($n = 3$)

3.1.2.6 Auswirkungen der PARP-Hemmung durch DPQ auf die Reparatur und Induzierbarkeit von Einzelstrangbrüchen in XRCC1-defizienten Zellen

Der Verlauf der Einzelstrangbruchreparatur in Wildtyp- und XRCC1-defizienten Zellen mit und ohne zusätzliche PARP-Hemmung durch DPQ ist in Abbildung 3.25 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Reparatur in XRCC1-defizienten Zellen (EM9) signifikant langsamer verlief als in Wildtyp-Zellen (AA8-1). Die Halbwertszeit der induzierten Einzelstrangbrüche betrug in den XRCC1-defizienten Zellen 8 min, in den Wildtyp-Zellen 4 min. Die zusätzliche Verlangsamung der Einzelstrangbruchreparatur durch DPQ konnte nur in den -schon langsamer reparierenden- XRCC1-defizienten Zellen gut nachgewiesen werden.

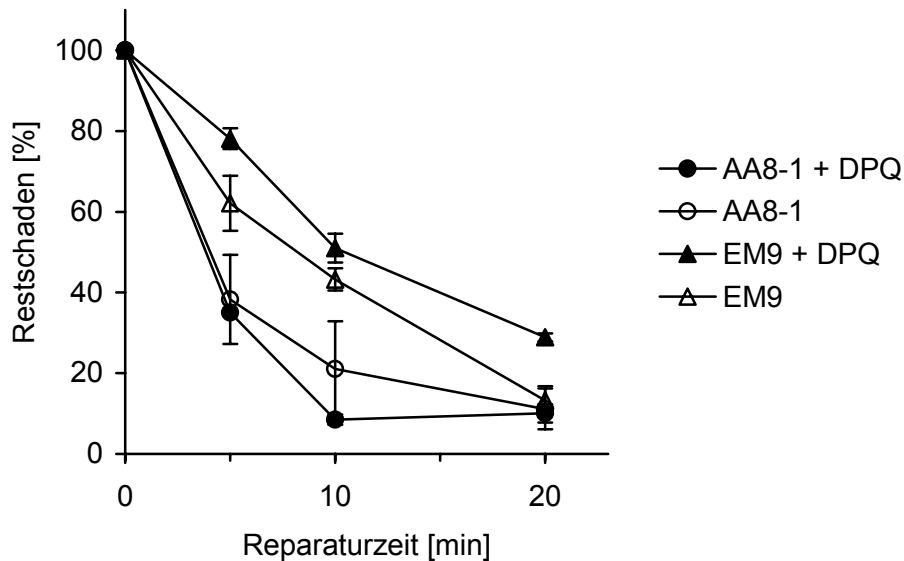


Abbildung 3.25: Reparatur von Einzelstrangbrüchen in PARP-gehemmten Zellen (AA8-1+DPQ und EM9+DPQ) und Kontrollen in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Schadensinduktion erfolgte mit 100 µM tBuOOH in serumfreiem Medium unter Kulturbedingungen. (n = 2 bis 5)

Abbildung 3.26 zeigt die Induzierbarkeit von Einzelstrangbrüchen durch 100 µM tBuOOH in XRCC1-defizienten Zellen (EM9) und Kontrollen (AA8-1) mit (10 µM DPQ) und ohne Hemmung der katalytischen Aktivität der PARP. In den XRCC1-defizienten Zellen (EM9) wurden -ähnlich wie nach Ro-Behandlung (Abbildung 3.24)- signifikant mehr Einzelstrangbrüche gefunden als in den Wildtyp-Zellen (AA8-1). Diese scheinbar erhöhte Empfindlichkeit ist jedoch mit großer Wahrscheinlichkeit auf eine extrem schnelle Reparatur der induzierten Einzelstrangbrüche in den Wildtyp-Zellen in Gegensatz zu den XRCC1-defizienten Zellen (EM9) zurückzuführen (Abbildung 3.25). Daher wurden die AA8-1-Zellen, um die Reparatur während der Aufarbeitung der Zellen zu verringern, in anderen Experimenten in Suspension geschädigt. Dabei ergaben sich bei Schädigung mit 100 µM tBuOOH Werte von 0.412 ± 0.24 Modifikationen/ 10^6 bp für die Wildtyp-Zellen ohne PARP-Hemmung (Daten nicht gezeigt; n = 3), also Werte, die deutlich höher lagen als bei Schädigung adhärent wachsender Zellen und dem dadurch erforderlichen Trypsinieren bei 37 °C. Aus Abbildung 3.26 wird weiterhin ersichtlich, dass sowohl in Wildtyp- als auch in XRCC1-defizienten Zellen die scheinbare Empfindlichkeit gegenüber der Induktion von Einzelstrangbrüchen durch eine zusätzliche PARP-Hemmung erhöht wurde. Als Grund für dieses erhöhte Schadensausmaß kann die zusätzliche Verlangsamung der Einzelstrangbruchreparatur durch die PARP-Hemmung angesehen werden (Abbildung 3.25).

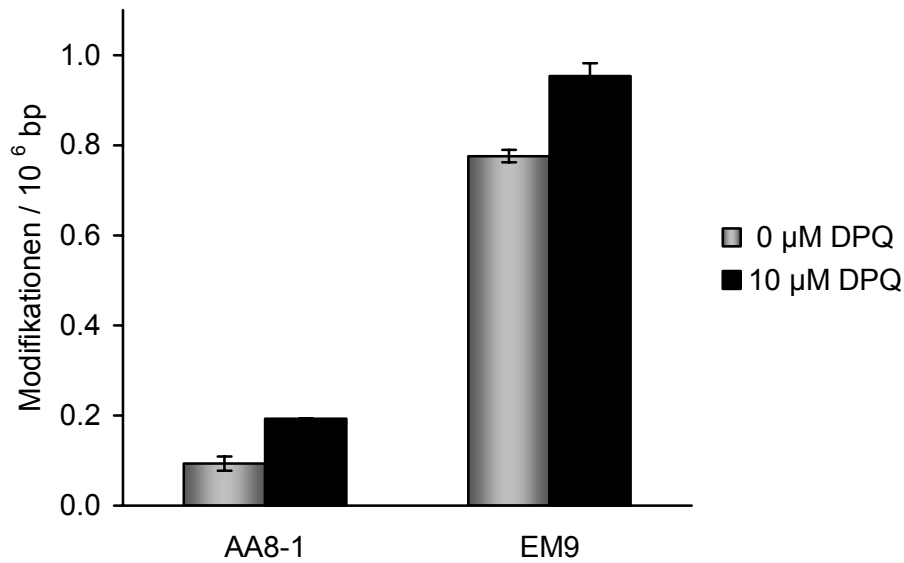


Abbildung 3.26: Einzelstrangbrüche in Wildtyp- (AA8-1) und XRCC1-defizienten (EM9) Zellen mit (10 μM DPQ) und ohne PARP-Hemmung, die durch 100 μM tBuOOH in serumfreiem Medium bei 37 °C induziert wurden. Die Steady-State-Spiegel wurden abgezogen. (n = 2 bis 4)

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass weder die XRCC1-Defizienz alleine, noch eine Kombination der XRCC1-Defizienz mit der PARP-Hemmung durch DPQ (10 μM) die Steady-State-Spiegel oxidativer DNA-Modifikationen beeinflusste (Abbildung 3.27).

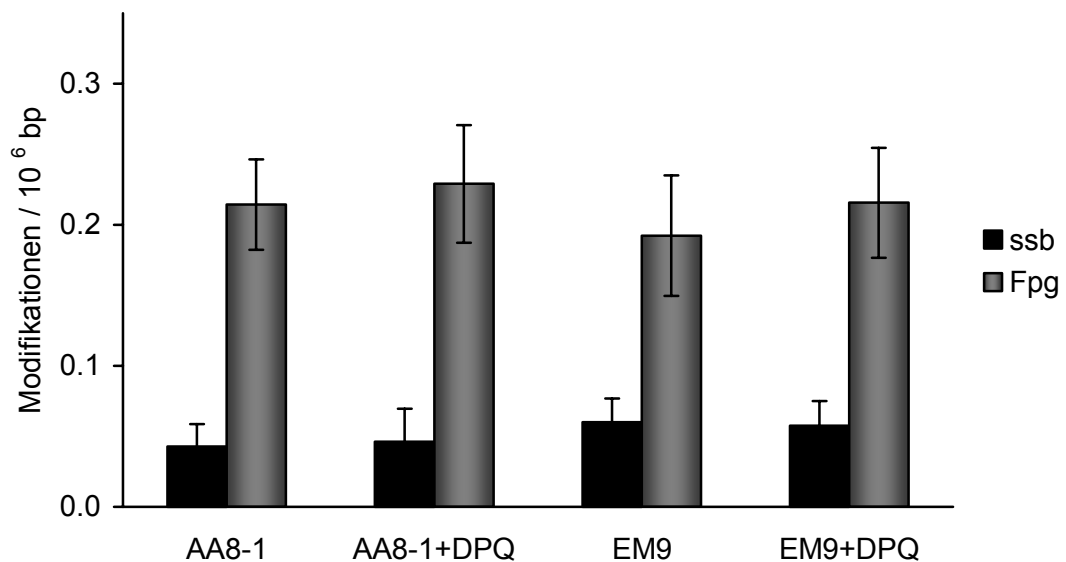


Abbildung 3.27: Steady-State-Spiegel von Einzelstrangbrüchen (ssb) und oxidativer Fpg-sensitiver Basenmodifikationen in unbehandelten XRCC1-defizienten Zellen (EM9) und Kontrollen (AA8-1) mit (+DPQ) und ohne PARP-Hemmung. (n = 3 bis 7)

3.1.3 Nachweis der Poly(ADP-Ribosyl)ierung

Zusätzlich zur Bestimmung der Anzahl der DNA-Modifikationen mit Hilfe der alkalischen Elution sollte das Ausmaß der Poly(ADP-Ribosyl)ierung nach verschiedenen Schädigungsarten anhand Immunfluoreszenzfärbung (2.15.7) gezeigt werden.

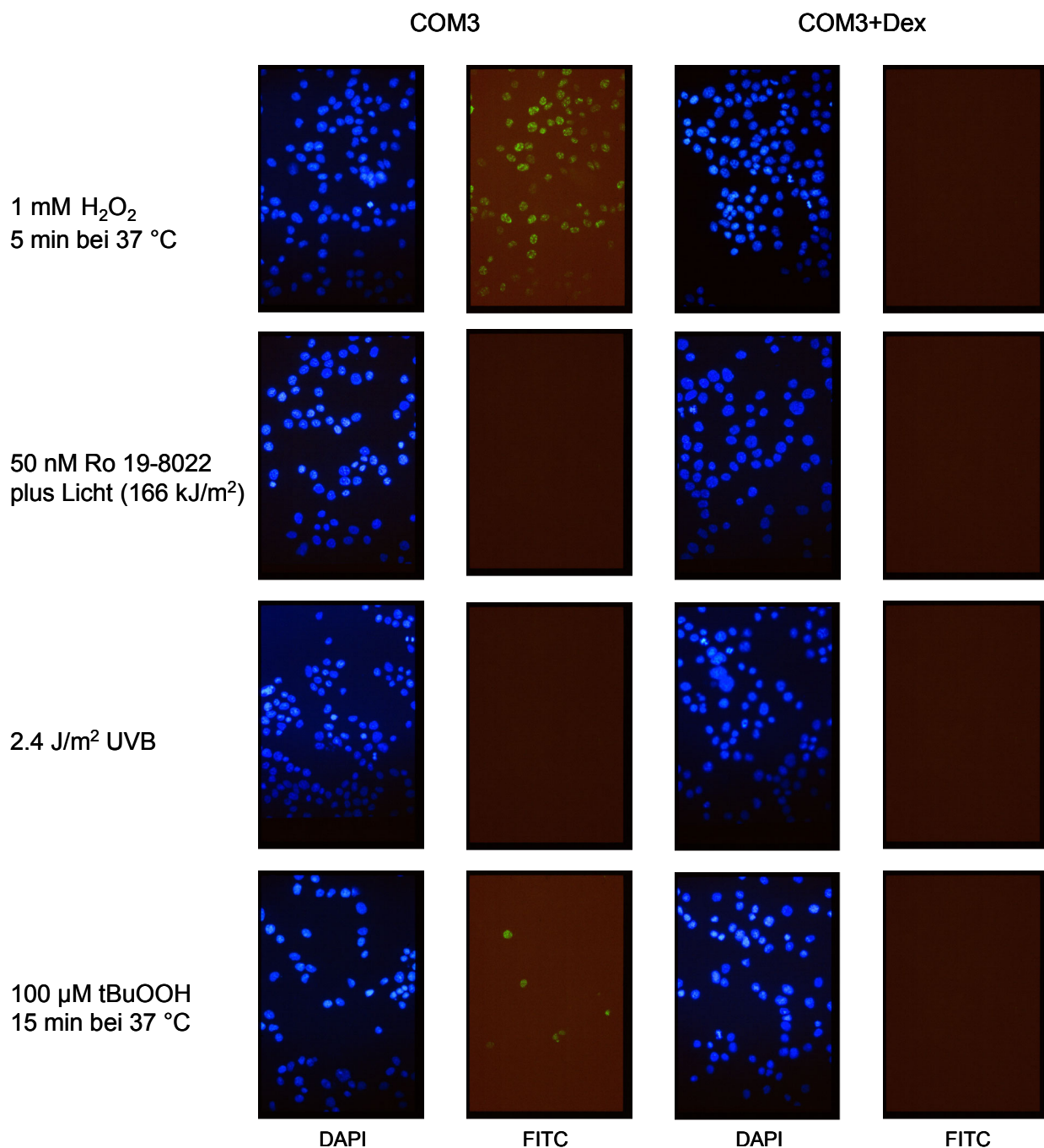


Abbildung 3.28: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (100fach vergrößert) *trans*-dominant PARP-gehemmter Zellen (COM3+Dex) und Kontrollen (COM3) nach Schädigung mit H₂O₂, Ro 19-8022 plus Licht, UVB und tBuOOH.

Abbildung 3.28 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von COM3-Zellen mit und ohne *trans*-dominanter PARP-Hemmung nach Schädigung mit Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (2.12.1.1), UVB (2.12.1.2), *tert.*-Butylhydroperoxid (tBuOOH) (2.12.1.3) und H₂O₂ (2.12.1.4), bei denen die Kerne mit DAPI und die Poly(ADP-Ribose)-Reste mit einem FITC-markierten Antikörper angefärbt wurden (2.15.7).

Aus den Aufnahmen wird deutlich, dass ausschließlich durch die Schädigung mit strangbruchgenerierenden Substanzen (tBuOOH und H₂O₂) eine Poly(ADP-Ribosyl)ierung nachweisbar war, obwohl bei der Schädigung mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022 plus Licht und UVB eine ähnliche Anzahl an DNA-Modifikationen entstand, wie aus den in Abbildung 3.4, Abbildung 3.9 und Abbildung 3.11 gezeigten Daten hervorgeht.

3.2 Auswirkungen eines XPA-Ausfalls sowie eines kombinierten XPA/hOgg1-Ausfalls in menschlichen Fibroblasten

Die bedeutendste oxidative Basenmodifikation, das 8-Hydroxyguanin (8-oxoG), wird beim Menschen durch das Enzym hOgg1 erkannt und prozessiert (1.4.2.1). Um den Einfluss einer eingeschränkten 8oxoG-Reparatur *in vivo* zu untersuchen, wurden vor einiger Zeit *ogg1^{-/-}-knockout*-Mäuse generiert (Sakumi et al. 2003; Klungland et al. 1999). Diese Mäuse zeigten eine Erhöhung der Steady-State-Spiegel oxidativer Basenmodifikationen (Osterod et al. 2001; Hollenbach 1999), hohe spontane Mutationsraten in verschiedenen nicht proliferierenden Geweben sowie spontane Tumore der Lunge (Sakumi et al. 2003). Um diese Veränderungen der DNA und ihre Folgen mechanistisch erklären zu können, wurden aus den *ogg1^{-/-}-knockout*-Mäusen Mausembryofibroblasten gewonnen. In diesen Ogg1-defizienten Zellen wurde anschließend die Reparaturgeschwindigkeit von 8-oxoG bestimmt. Dabei zeigte sich, dass in diesen Zellen die Reparatur von 8-oxoG weiterhin -wenn auch stark verlangsamt- stattfand (Osterod et al. 2001). In Ogg1-defizienten Zellen mussten daher andere Reparaturmechanismen existieren, die 8-oxoG alternativ aus der DNA entfernen. Die Ogg1-unabhängige transkriptionsgekoppelte Reparatur von 8-oxoG konnte das Ausmaß der verbliebenen Reparatur nicht erklären. Folglich musste für 8-oxoG ein weiterer Reparaturweg existieren, der für die Reparatur von 8-oxoG im nicht-transkribierten Strang der DNA sowie in Ogg1-defizienten Zellen verantwortlich ist (*back-up* Reparatur). Verschiedene *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen führten zu der Vorstellung, dass beim Fehlen der Glykosylase die Nukleotidexcisionsreparatur die Reparatur von 8-oxoG übernehmen kann. Um diese Hypothese zu untersuchen wurden von F. Le Page (Fontenay-aux-Roses) Zellen generiert, die hOgg1-defizient und gleichzeitig XPA-defizient waren. Ein Ausfall oder eine Mutation des für das XPA-Protein kodierenden Gens führt beim Menschen zu einer als Xeroderma pigmentosum (XP) bezeichnete Erkrankung (1.4.3 und 1.4.4). Auf zellulärer Ebene bedeutet ein nicht funktionierendes XPA-Protein den Ausfall sowohl der *Global Genome Repair* als auch der transkriptionsgekoppelten Reparatur (1.4.3 und 1.4.4).

F. Le Page generierte diese doppelt-defizienten Zellen, indem sie ein hOgg1-antisense-Konstrukt in XPA-defiziente und normale menschliche Fibroblasten (MRC5) einschleuste. Das Ausmaß der Reduktion des hOgg1-Proteins wurde mittels Western-Blot (2.15.5) und der Messung der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität (2.15.6.1) kontrolliert. In den hier

verwendeten Zellen war die 8-oxoG-Glykosylaseaktivität um mindestens 95 % im Vergleich zum entsprechenden Wildtyp verringert.

In den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen sollte nun festgestellt werden, ob (i) das XPA-Protein für die beschriebene *back-up* Reparatur von Fpg-sensitiven Basenmodifikationen verantwortlich ist, und (ii) ob der kombinierte Ausfall der gesamten Nukleotidexcisionsreparatur und der hOgg1-vermittelten Basenexcisionsreparatur die Steady-State-Spiegel oxidativer Fpg-sensitiver Basenmodifikationen erhöht.

3.2.1 Auswirkungen eines XPA-Ausfalls sowie eines kombinierten XPA/hOgg1-Ausfalls auf die Steady-state-Spiegel oxidativer Basenmodifikationen

Zunächst wurde überprüft, ob ein Ausfall des XPA-Proteins bzw. ein kombinierter Ausfall sowohl des XPA- als auch des hOgg1-Proteins die Steady-State-Spiegel oxidativer DNA-Modifikationen beeinflusst.

Wie in Abbildung 3.29 zu sehen, kam es durch den XPA-, den hOgg1- bzw. den kombinierten XPA/hOgg1-Ausfall nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Steady-State-Spiegel oxidativer DNA-Modifikationen im Vergleich zur Kontrolle (MRC5).

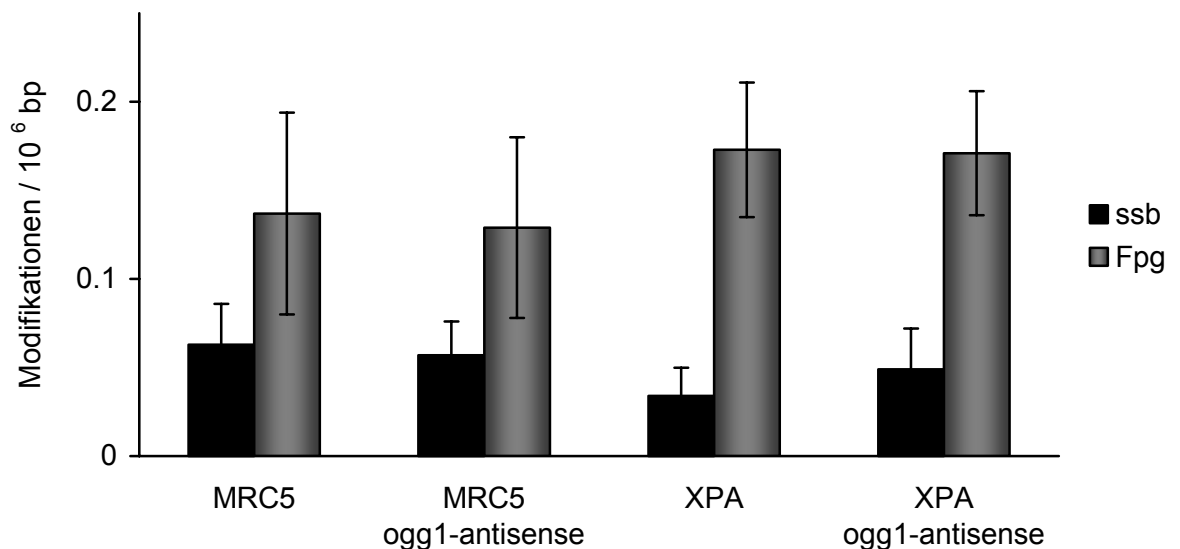


Abbildung 3.29: Steady-State-Spiegel von Einzelstrangbrüchen (ssb) und oxidativer Fpg-sensitiver Basenmodifikationen in unbehandelten Wildtyp- (MRC5), ogg1-antisense- (MRC5 ogg1-antisense), XPA-defizienten und XPA-ogg1-antisense-Zellen. (n = 8 bis 14)

3.2.2 Auswirkungen eines XPA-Ausfalls sowie eines kombinierten XPA/hOgg1-Ausfalls auf die Induzierbarkeit oxidativer Basenmodifikationen durch Ro 19-8022

Durch gleichartige Schädigung der Wildtyp- und der verschiedenen defizienten Zellen mit Ro 19-8022 in Kombination mit sichtbarem Licht sollte untersucht werden, ob die Expression von XPA bzw. hOgg1 einen Einfluss auf das Ausmaß der induzierten oxidativen DNA-Modifikationen hat. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.30 dargestellt.

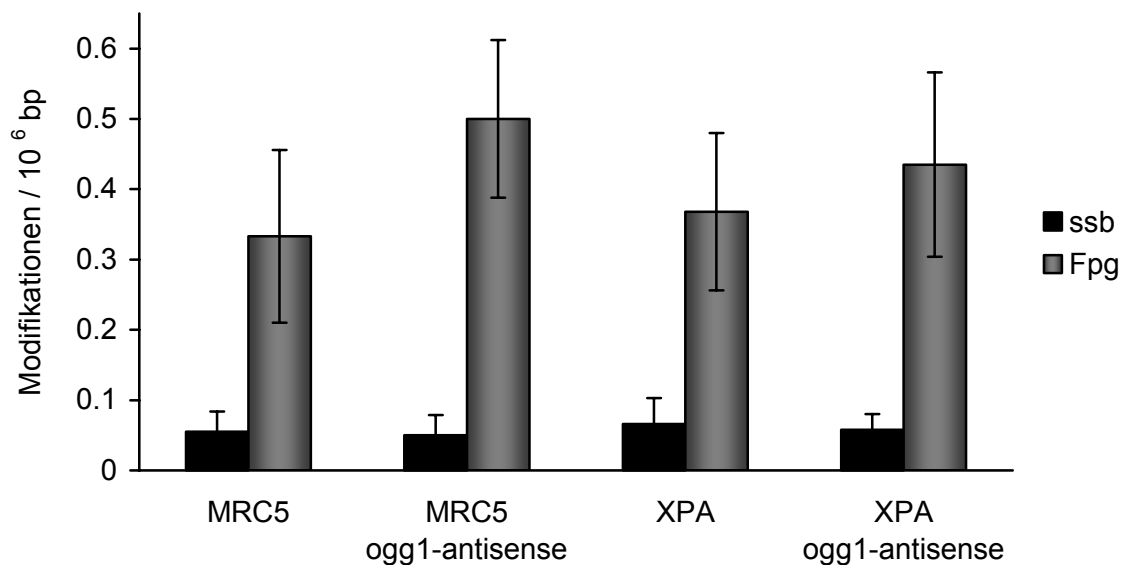


Abbildung 3.30: Anzahl der durch Ro 19-8022 und sichtbarem Licht (166 kJ/m²) induzierten Einzelstrangbrüche (ssb) und oxidativen Fpg-sensitiver Basenmodifikationen in Wildtyp- (MRC5), ogg1-antisense- (MRC5 ogg1-antisense), XPA-defizienten und XPA-ogg1-antisense-Zellen. Steady-State-Spiegel (vergleiche Abbildung 3.29) wurden abgezogen. (n = 8 bis 14)

Die durch Ro 19-8022 und sichtbarem Licht induzierten DNA-Modifikationen in den XPA-defizienten Zellen unterschieden sich erwartungsgemäß nicht vom Schadensausmaß in den Wildtyp-Zellen (MRC5). In den Zellen, die den Vektor mit dem ogg1-antisense trugen, war die Anzahl der induzierten oxidativen Fpg-sensitiven Basenmodifikationen höher als in den dazugehörigen Kontrollen. Im Falle der XPA-profizienten Zellen, die den Vektor mit ogg1-antisense trugen, war diese Erhöhung gegenüber den Wildtyp-Zellen (MRC5) signifikant ($p \leq 0.003$). Die Ursache dafür ist nicht bekannt.

3.2.3 Auswirkungen eines XPA-Ausfalls sowie eines kombinierten XPA/hOgg1-Ausfalls auf die Reparaturgeschwindigkeit oxidativer Basenmodifikationen

Um den Einfluss der Proteine hOgg1 und XPA auf die Reparatur oxidativer Basenmodifikationen zu untersuchen, wurden in den verschiedenen Zelllinien die Reparaturgeschwindigkeit nach Induktion dieser Modifikationen durch Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht bestimmt (3.1.1.2). Die Reparaturkinetik dieser oxidativen Fpg-sensitiven Basenmodifikationen ist in Abbildung 3.31 dargestellt. Es zeigte sich, dass sowohl die Wildtyp- (MRC5) als auch die XPA-defizienten Zellen nach etwa 3 h die Hälfte des induzierten Schadens repariert hatten. Im Gegensatz dazu war in den Zellen, die das ogg1-antisense trugen, die Reparatur der oxidativen Basenmodifikationen deutlich langsamer als in den Wildtyp-Zellen bzw. den XPA-defizienten Zellen. Nach 3 h und 18 h wurde auch in Anwesenheit der antisense-RNA kein Unterschied zwischen den XPA-defizienten und XPA-profizienten Zellen gefunden. Ein leichter Unterschied bei 6 h war statistisch nicht signifikant.

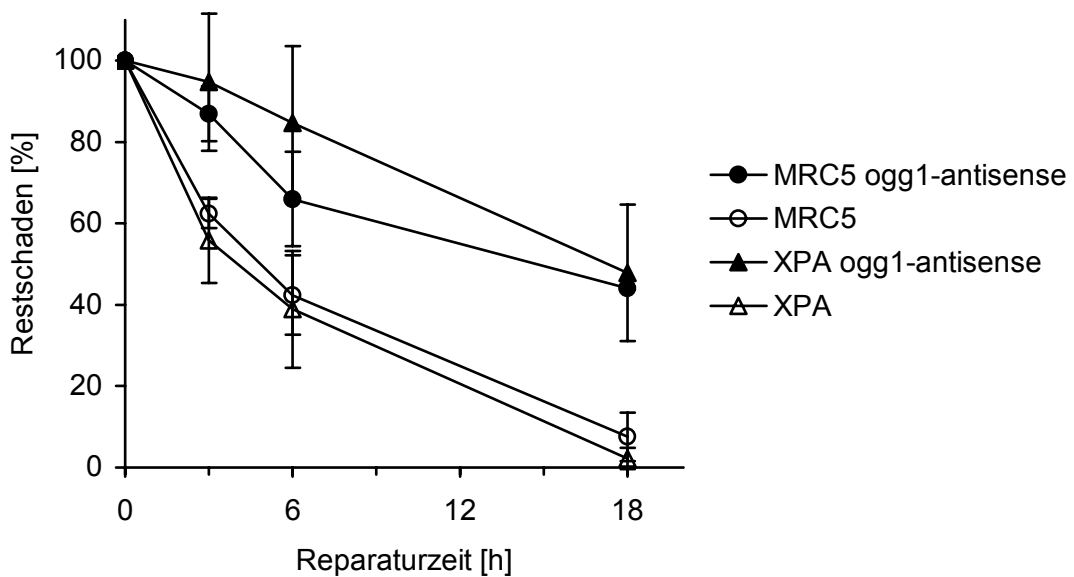


Abbildung 3.31: Reparatur Fpg-sensitiver Basenmodifikationen in Wildtyp- (MRC5), ogg1-antisense- (MRC5 ogg1-antisense), XPA-defizienten und XPA-ogg1-antisense-Zellen in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Schadensinduktion erfolgte mit 50 nM Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht (166 kJ/m²) auf Eis. Die gemessenen 18-h-Werte wurden mit dem Proliferationsfaktor (2.12.1.6) korrigiert. (n = 3 bis 4)

3.3 Auswirkungen einer AP-Endonuklease 1-Überexpression bei XRCC1-Defizienz

Die Proteine XRCC1 und AP-Endonuklease 1 sind beide sowohl in der Einzelstrangbruchreparatur (1.4.6) als auch in der Basenexcisionsreparatur (1.4.2) beteiligt. Es ist bekannt, dass XRCC1-defiziente Zellen (EM9) in der Einzelstrangbruchreparatur defekt sind (vergleiche 3.1.2.5) und es daher vermehrt zu Chromosomenaberrationen kommt. XRCC1 hat selbst keine enzymatische Aktivität, stimuliert aber als Plattformprotein die Aktivität der AP-Endonuklease 1. Es stellte sich daher die Frage, ob eine erhöhte AP-Endonukleaseaktivität, den Einzelstrangbruchreparaturdefekt in XRCC1-defizienten Zellen komplementieren könnte. Um diese Fragestellung zu überprüfen, wurde in XRCC1-defiziente Zellen und Kontrollen ein Vektor zur AP-Endonuklease 1-Überexpression eingebracht (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: XRCC1- bzw. Ape1-Status der verwendeten Zellen.

Zelllinie	XRCC1-Status	Ape1-Überexpression
EM9	-	-
EM9 vo	-	-
EM9 APE1	-	+
EM9 XH	+	-
AA8-1 vo	+	-
AA8-1 APE1	+	+

3.3.1 Auswirkungen einer Ape1-Überexpression bei XRCC1-Defizienz auf die Steady-State-Spiegel von Einzelstrangbrüchen

Zunächst wurden die Anzahl der Einzelstrangbrüche in unbehandelten Zellen bestimmt. Dies sollte zeigen, ob die XRCC1-Defizienz in diesen Zellen eine Veränderung des Fließgleichgewichts zwischen endogener Bildung und der Reparatur der Einzelstrangbrüche bedingt. Wie Abbildung 3.32 zeigt, unterschieden sich die Steady-State-Spiegel von Einzelstrangbrüchen zwischen XRCC1-defizienten Zellen (EM9 und EM9 vo) und Kontrollen (AA8-1 vo und EM9 XH) nicht. Auch die Überexpression der AP-Endonuklease 1 beeinflusste die Steady-State-Spiegel von Einzelstrangbrüchen in XRCC1-defizienten (EM9 APE1 1) und Wildtyp-Zellen (AA8-1 APE1) nicht.

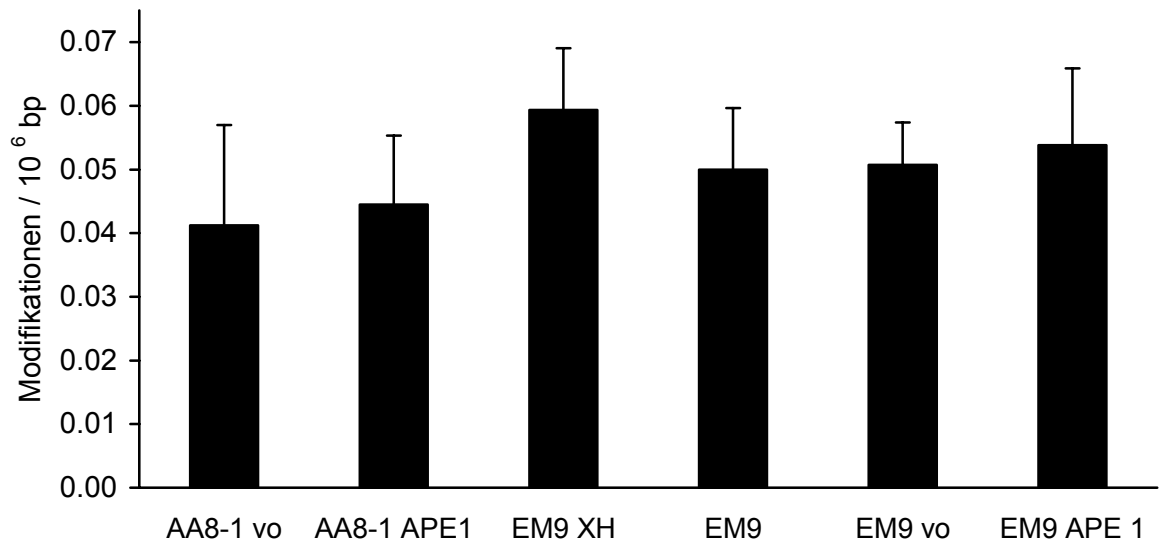


Abbildung 3.32: Steady-State-Spiegel von Einzelstrangbrüchen (ssb) in unbehandelten XRCC1-defizienten (EM9, EM9 vo und EM9 APE 1) und XRCC1-profizienten Zellen (AA8-1 vo, AA8-1 APE 1 und EM9 XH). (n = 3 bis 5)

3.3.2 Auswirkungen einer Ape1-Überexpression bei XRCC1-Defizienz auf die Induzierbarkeit von Einzelstrangbrüchen

Es sollte ebenfalls untersucht werden, ob die XRCC1-Defizienz eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der Induktion von Einzelstrangbrüchen zur Folge hat und ob eine AP-Endonuklease 1-Überexpression diesen möglichen Effekt ausgleichen kann. Hierzu wurden alle Zelllinien mit 75 μ M *tert.*-Butylhydroperoxid (2.12.1.3) geschädigt. Die Anzahl der durch die Schädigung induzierten Einzelstrangbrüche ist in Abbildung 3.33 dargestellt. In allen XRCC1-defizienten Zellen (EM9, EM9 vo und EM9 APE1) war die Anzahl der unmittelbar nach der Behandlung beobachteten Einzelstrangbrüche signifikant ($p \leq 0.002$) höher als in den XRCC1-profizienten Kontrollen AA8-1 vo, AA8-1 APE1 und EM9 XH. Dieser scheinbare Unterschied in der Induzierbarkeit von Einzelstrangbrüchen lässt sich wiederum durch die sehr schnelle Reparatur in den Wildtyp-Zellen erklären. Durch Schädigung der Zellen in Suspension und die dadurch verkürzte Aufarbeitungszeit waren nämlich die Anzahl der induzierten Einzelstrangbrüche pro 10⁶ bp ähnlich hoch (0.65 ± 0.19) wie in XRCC1-defizienten Zellen (EM9, EM9 vo und EM9 APE1). Die Überexpression der AP-Endonuklease 1 hatte weder in XRCC1-defizienten (EM9 APE1) noch in Wildtyp-Zellen einen signifikanten Einfluss auf die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber der Induktion von Einzelstrangbrüchen.

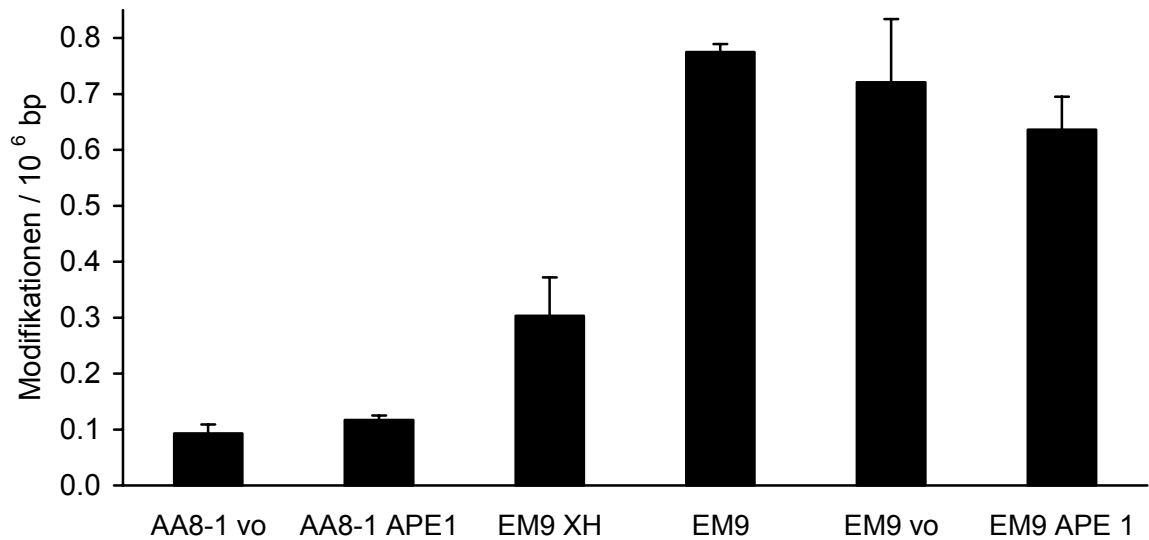


Abbildung 3.33: Einzelstrangbrüche in Kontrollen (AA8-1 vo, AA8-1 APE 1 und EM9 XH) und XRCC1-defizienten (EM9, EM9 vo und EM9 APE 1) Zellen mit und ohne Ape1-Überexpression; induziert durch 75 μ M tBuOOH in serumfreiem Medium bei 37 °C. Steady-State-Spiegel wurden abgezogen. (n = 3 bis 5)

3.3.3 Auswirkungen einer Ape1-Überexpression bei XRCC1-Defizienz auf die Reparaturgeschwindigkeit von Einzelstrangbrüchen

Abschließend sollte noch die Reparaturgeschwindigkeit induzierter Einzelstrangbrüche in Abhängigkeit von der Ape1-Überexpression in XRCC1-defizienten und -komplementierten Zellen bestimmt werden. Bereits in Abschnitt 3.1.2.6 wurde beschrieben, dass die Reparatur induzierter Einzelstrangbrüchen in XRCC1-defizienten Zellen deutlich langsamer verlief als in Wildtyp-Zellen (AA8-1). Die in Abbildung 3.34 gezeigten Reparaturkinetiken bestätigen diese Ergebnisse: XRCC1-defiziente Zellen (EM9 und EM9 vo) benötigten fast 10 min um 50 % der induzierten Einzelstrangbrüche zu reparieren, dagegen waren in XRCC1-komplementierten Zellen (EM9 XH) bereits nach weniger als 5 min die Hälfte der induzierten Einzelstrangbrüche repariert. Die Überexpression der AP-Endonuklease 1 in XRCC1-defizienten Zellen (EM9 APE 1) führte zu frühen Zeitpunkten im Vergleich den ausschließlich XRCC1-defizienten Zellen (EM9 und EM9 vo) ebenfalls zu einer Verbesserung der Reparatur.

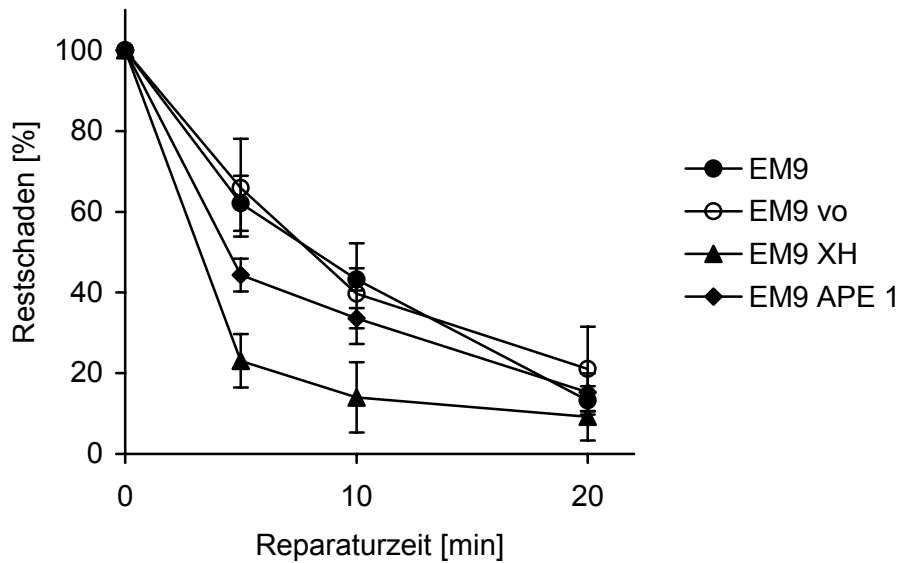


Abbildung 3.34: Reparatur von Einzelstrangbrüchen in XRCC1-defizienten Zellen (EM9 und EM9 vo), XRCC1-defizienten Zellen mit Ape1-Überexpression (EM9 APE 1) und XRCC1-profizienten Zellen (EM9 XH) in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Schadensinduktion erfolgte mit 75 µM tBuOOH in serumfreiem Medium unter Kulturbedingungen. (n = 3 bis 5)

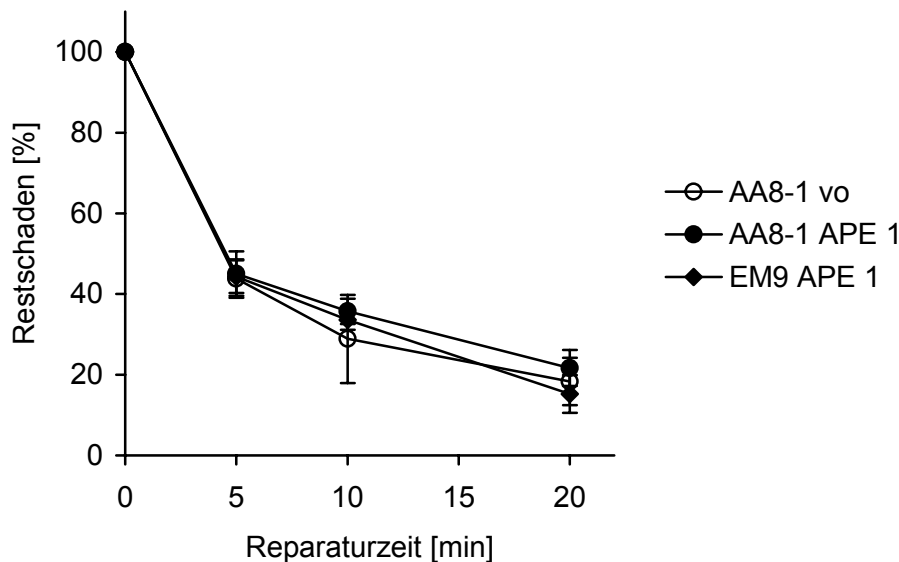


Abbildung 3.35: Reparatur von Einzelstrangbrüchen in XRCC1-profizienten Zellen (AA8-1 vo) und XRCC1-defizienten Zellen (EM9) mit (AA8-1 APE 1 und EM9 APE 1) bzw. ohne (AA8-1 vo und EM9) Ape1-Überexpression in Kulturmedium bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Schadensinduktion erfolgte mit 75 µM tBuOOH in serumfreiem Medium unter Kulturbedingungen. (n = 3 bis 5)

Aus Abbildung 3.34 und Abbildung 3.35 wird deutlich, dass die Reparatur von Einzelstrangbrüchen in XRCC1-komplementierten Zellen (EM9 XH) sogar noch schneller

verlief als in Wildtyp-Zellen (AA8-1 vo). Außerdem ist erkennbar, dass in XRCC1-defizienten Zellen durch die Überexpression der AP-Endonuklease 1 die Reparaturgeschwindigkeit von Wildtyp-Zellen erreicht wurde. Dagegen hatte in Wildtyp-Zellen die Ape1-Überexpression keinen Einfluss auf die Reparatur induzierter Einzelstrangbrüche (Abbildung 3.35).

4. Diskussion

Die Identifikation von Proteinen, die an der DNA-Reparatur in Säugerzellen beteiligt sind, ist Gegenstand intensiver Forschung. Die meisten dieser Untersuchungen werden in zellfreien Systemen mit Zellextrakten oder gereinigten Proteinen durchgeführt. In dieser Arbeit wurde eine sehr empfindliche Methode, die alkalische Elution (2.12), genutzt, um den Einfluss sogenannter Hilfsproteine auf die Reparatur der DNA in intakten Zellen zu untersuchen.

4.1 Einfluss der Hemmung der katalytischen Aktivität der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 auf die DNA-Reparatur

Die genaue Rolle der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP 1) bei der DNA-Reparatur ist bisher nur unzureichend geklärt (vergleiche 1.4.7.1). Daher sollte in dieser Arbeit der Einfluss der katalytischen Aktivität der PARP 1 auf die Reparatur verschiedener DNA-Modifikationen *in vivo* untersucht werden. Hierzu wurden zwei unterschiedliche Modelle genutzt: die *trans*-dominante PARP-Hemmung durch die induzierbare Überexpression der PARP-DNA-Bindungsdomäne (**Küpper et al. 1995**) und die direkte Hemmung der katalytischen Aktivität der PARP durch den Hemmstoff DPQ (**Suto et al. 1991**).

Um den Einfluss der PARP 1 auf die Integrität der zellulären DNA zu untersuchen, wurden die Reparaturkinetiken verschiedener DNA-Modifikationen in PARP-gehemmten Zellen und Kontrollen bestimmt. Die Untersuchung der Reparaturgeschwindigkeiten verschiedener DNA-Modifikationen in PARP-gehemmten Zellen und Kontrollen ließen einen eindeutigen Einfluss der Poly(ADP-Ribosyl)ierung auf die globale Reparatur dieser Modifikationen erkennen. Sowohl die Beseitigung oxidativer Fpg-sensitiver Purinmodifikationen, die in Säugerzellen überwiegend durch die Basenexcisionsreparatur (BER) prozessiert werden, als auch die Beseitigung von Pyrimidindimeren, die durch die Nukleotidexcisionsreparatur repariert werden, war in PARP-gehemmten Zellen signifikant langsamer als in den jeweiligen Kontrollen (Abbildung 3.2 und Abbildung 3.14 bzw. Abbildung 3.8 und Abbildung 3.18). Dieser Effekt konnte nicht durch die bekannte Rolle der PARP 1 beim Verschließen von Einzelstrangbrüchen während der (*long-patch*) Basenexcisionsreparatur erklärt werden (**Prasad et al. 2001**), da auch unter den Bedingungen der PARP-Hemmung die Menge an Reparaturbrüchen nur einen sehr geringen Anteil an den Gesamtmodifikationen ausmachte (Abbildung 3.3). Dies deutet

darauf hin, dass das Verschließen der Einzelstrangbrüche nicht der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des gesamten Reparaturprozesses sein kann, selbst wenn PARP gehemmt ist. Im Gegensatz dazu spiegelt die bereits beschriebene Akkumulation von Einzelstrangbrüchen in PARP-gehemmten oder PARP-defizienten Zellen, die mit Alkylantien behandelt wurden, möglicherweise die beeinträchtigte Reparatur von Einzelstrangbrüchen wider, die in diesem Fall enzymatisch (Reparaturbrüche) oder nicht-enzymatisch durch Depurinierung gebildet werden (**Trucco et al. 1998**).

Ein weiterer interessanter Hinweis auf die Rolle der PARP-Aktivität bei der Basen- bzw. Nukleotidexcisionsreparatur kommt von der Beobachtung, dass Csb-defiziente Zellen eine ähnliche Reparaturverzögerung zeigten wie Wildtyp-Zellen, deren PARP-Aktivität gehemmt wurde. Diese bereits verlangsamte DNA-Reparatur in Csb-defizienten Zellen wurde durch die Hemmung der PARP nicht zusätzlich beeinträchtigt (Abbildung 3.14 und Abbildung 3.18). Das Csb-Protein ist bekannterweise für die transkriptionsgekoppelte Reparatur verschiedener DNA-Modifikationen, darunter Pyrimidindimere und 8-oxoG, notwendig (**Le Page et al. 2000a; Tornaletti und Hannawalt 1999; Friedberg 1996; Venema 1990**). Außerdem konnte kürzlich die Beteiligung dieses Proteins an der "globalen" Reparatur von 8-oxoG gezeigt werden (**Osterod et al. 2002; Sunesen et al. 2002; Tuo et al. 2001**). Der zugrunde liegende Mechanismus ist bislang noch nicht geklärt. **Osterod et al. (2002)** zeigten, dass in Csb-defizienten Zellen – wie im Falle der PARP-Hemmung – keine Veränderung der Aktivität der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität nachweisbar war. Dagegen wird von **Tuo et al. (2002)** diskutiert, dass Csb sich zusammen mit hOgg1 am DNA-Schaden anordnet, um der Glykosylase durch seine Helikasefunktion die zum Einschnitt notwendige Struktur der DNA zu schaffen. Stattdessen lassen die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse vermuten, dass Csb durch die ATP-abhängige Umgestaltung des Chromatins (**Citterio et al. 2000**) die Reparatur durch Öffnung der DNA erleichtert (**Ura und Hayes 2002**). In diesen Mechanismus scheinen auch die direkte Poly(ADP-Ribosyl)ierung von Histonen bzw. die Automodifikation der PARP 1, die zur Dekondensation des Chromatins führt (**Kraus und Lis 2003; Realini und Althaus 1992**), involviert zu sein. Die Effekte der Csb-Defizienz und der PARP-Hemmung waren nämlich nicht additiv. Vorstellbar wäre, dass das Csb-Protein und die PARP 1, ausgelöst durch die blockierte Transkriptionsmaschinerie, gemeinsam das Chromatin öffnen und so die schnellere Reparatur von DNA-Modifikationen, die auch

weiter entfernt von der Transkription lokalisiert sind, erlauben. Diese Annahme wird durch die Beobachtung, dass die Beschleunigung der Csb-vermittelten "globalen" Reparatur bereits zu frühen Zeitpunkten beobachtbar war und dass diese Beschleunigung der Reparatur aktive Transkription voraussetzte (**Osterod et al. 2002**), bestätigt. Auch die Annahme, dass Poly(ADP-Ribose) möglicherweise als ATP-Quelle genutzt werden kann (**Oei und Ziegler 2000**) erscheint im Zusammenhang mit der DNA-abhängigen ATPase-Aktivität des Csb-Proteins (**Brosh et al. 1999**) interessant.

Zusätzlich wurde der direkte Einfluss der PARP-Aktivität auf das XRCC1-Protein bei der Basenexcisionsreparatur untersucht. Es ist bekannt, dass die PARP 1 direkt mit XRCC1, DNA-Polymerase β und DNA-Ligase III interagieren kann (**Schreiber et al. 2002; Dantzer et al. 2000; Masson et al. 1998; Caldecott et al. 1996**). Trotzdem bleibt ihre genaue Rolle bei der Basenexcisionsreparatur weiterhin unklar.

Obwohl *in vitro* eine Interaktion zwischen XRCC1 und hOgg1, die die Aktivität der Glykosylase steigert, bei der Basenexcisionsreparatur beschrieben wurde (**Vidal et al. 2001b**), konnte in lebenden Zellen kein Einfluss der XRCC1-Defizienz auf die Reparatur oxidativer Fpg-sensitiver Basenmodifikationen nachgewiesen werden (Abbildung 3.23). Erst eine zusätzliche Hemmung der PARP-Aktivität verschlechterte die Reparatur Fpg-sensitiver Modifikationen in XRCC1-defizienten Zellen deutlich gegenüber den Wildtyp-Zellen, die ebenfalls PARP-gehemmt waren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die PARP-Aktivität ein wichtiger Faktor bei der Erkennung beziehungsweise Prozessierung oxidativer Basenmodifikationen durch die Basenexcisionsreparatur ist, wohingegen der alleinige XRCC1-Defekt bei der (*short-patch*) Basenexcisionsreparatur *in vivo*, möglicherweise durch die PARP 1, kompensiert werden kann. Es ist wahrscheinlich, dass die Beschleunigung der Basenexcisionsreparatur durch die PARP 1 und durch XRCC1 möglicherweise über zwei unterschiedliche, jedoch stark interagierende, Wege verläuft, da der kombinierte XRCC1/PARP-Ausfall den größten Einfluss auf die Reparaturgeschwindigkeit oxidativer Basenmodifikationen hatte. Dabei spielt das XRCC1-Protein eher in der *short-patch* BER eine Rolle. Kommt es durch den Wegfall dieses Proteins zu einer Störung dieses Reparaturweges, dann kann eine DNA-Polymerase β - und PARP 1-abhängige *long-patch* BER ablaufen (**Prasad et al. 2001**). Durch die fehlende Aktivität der PARP 1 ist zusätzlich dieser Reparaturweg gestört. Die deutlich langsamere Reparatur der oxidativen Basenmodifikationen in PARP-gehemmten XRCC1-defizienten

Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen mit PARP-Hemmung kann nicht auf eine verringerte DNA-Ligase III-Aktivität in den XRCC1-defizienten Zellen (**Thompson und West 2000**) zurückgeführt werden, da in diesem Fall Reparaturbrüche akkumulieren müssten. Dies ist nicht der Fall.

Die Beteiligung der PARP 1 (und von XRCC1) an der Einzelstrangbruchreparatur ist unbestritten. Diese (Abbildung 3.10, Abbildung 3.20 und Abbildung 3.25) und andere Arbeiten zeigen, dass sowohl in PARP-gehemmten Zellen (**Schreiber et al. 2002; Beneke et al. 2000; Durkacz et al. 1980**) als auch in XRCC1-defizienten Zellen (**Caldecott 2003; Thompson und West 2000**) die Einzelstrangbruchreparatur langsamer verläuft als in Wildtyp-Zellen. Ein kombinierter PARP/XRCC1-Ausfall hatte den größten Einfluss auf die Einzelstrangbruchreparatur. Da angenommen wird, dass sowohl die PARP 1 als auch XRCC1 bei der *short-patch* Einzelstrangbruchreparatur agieren (**Caldecott 2003**), kann dieser additive Effekt wahrscheinlich nur durch eine eingeschränkte Erreichbarkeit des Einzelstrangbruchs für Reparaturproteine aufgrund fehlender Poly(ADP-Ribosyl)ierung erklärt werden. Interessanterweise waren die Effekte dieser beiden Proteine auf die Kinetiken der Einzelstrangbruchreparatur nach Literaturangaben in anderen Zellen oft nur gering oder sogar nicht vorhanden, obwohl die Hypersensitivität gegenüber ionisierender Strahlung und alkylierenden Substanzen sowie die genomische Instabilität, die im allgemeinen als Folgen der defekten Einzelstrangbruchreparatur angesehen werden, stark ausgeprägt waren (**Herceg und Wang 2001; Vodenicharov et al. 2000**).

Es ist bekannt, dass die PARP 1 – neben der DNA-Reparatur - auch die Transkription reguliert (**Kraus und Lis 2003**). Diese Regulation der Transkription kann entweder über die Beeinflussung der Aktivität von Transkriptionsfaktoren (**Wieler et al. 2003; Ziegler und Oei 2001; Beneke et al. 2000; Oliver et al. 1999, Agarwal et al. 1997**) oder direkt über die Interaktion mit der Transkriptionsmaschinerie (**Pirrotta 2003; Vispé et al. 2000**) erfolgen. Bisher wurde unter anderen ein Zusammenhang der Aktivität der PARP 1 mit der Aktivität der Transkriptionsfaktoren p53, NF- κ B und Ying-Yang 1 (**Pirrotta 2003, Hassa und Hottiger 2002; Herceg und Wang 2001; Chang und Alvarez-Gonzalez 2001; Oei und Shi 2001**) beschrieben. Die Beschleunigung der DNA-Reparatur kann jedoch nicht über eine erhöhte Expression bzw. eine erhöhte Aktivität von Reparaturproteinen, die zum Beispiel an der Basenexcisionsreparatur beteiligt sind, erklärt werden (**Simbulan-Rosenthal et al. 2000**). Dies bestätigt auch die Messung der *in vitro* 8-oxoG-

Glykosylaseaktivität in Zellextrakten aus PARP-gehemmten (3.1.1.3) bzw. -defizienten Zellen (**Le Page et al. 2003**), denn die Aktivität des Ogg1-Proteins war unabhängig von der PARP-Aktivität. Zusätzlich konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, dass auch die AP-Endonuklease 1-Aktivität in PARP-gehemmten Zellen nicht verändert war (Abbildung 3.6 und Abbildung 3.7). Eine Beteiligung von p53 an der beschleunigten DNA-Reparatur erscheint ebenfalls unwahrscheinlich, da der Effekt der Reparaturbeschleunigung auch in COM3-Zellen beobachtet wurde, denen durch die SV40-Transformation eine funktionelles p53 fehlt (3.1.1.2 und 3.1.2.1).

4.2 Einfluss des XPA- und des hOgg1-Proteins auf die Induktion und Reparatur oxidativer Basenmodifikationen

Eine Hemmung bzw. eine Stimulation der DNA-Reparatur sind Möglichkeiten, die Höhe der Steady-State-Spiegel von DNA-Modifikationen und folglich die Anzahl der Mutationen in Zellen zu beeinflussen. 8-Hydroxyguanin (8-oxoG), die bedeutendste oxidative Basenmodifikationen wird durch eine spezifische DNA-Glykosylase Ogg1 erkannt, die damit die Basenexcisionsreparatur einleitet (1.4.2). Beim Fehlen dieser 8-oxoG-Glykosylase findet die Reparatur von 8-oxoG weiterhin -wenn auch stark verlangsamt- statt (**Osterod et al. 2001**). In Ogg1-defizienten Zellen mussten daher andere Reparaturmechanismen existieren, die 8-oxoG alternativ aus der DNA entfernen. Verschiedene *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen führten zu der Vorstellung, dass beim Fehlen der Glykosylase die Nukleotidexcisionsreparatur die Reparatur von 8-oxoG übernehmen kann. Um diese Hypothese zu untersuchen wurden von F. Le Page Zellen generiert, die hOgg1-defizient und gleichzeitig XPA-defizient waren (3.2). In diesen Zellen wurden zunächst die Steady-State-Spiegel oxidativer Basenmodifikationen untersucht. Dabei zeigte sich, dass es durch einen XPA-, hOgg1- bzw. einen kombinierten XPA/hOgg1-Ausfall nicht zu einer Erhöhung der Steady-State-Spiegel oxidativer Fpg-sensitiver Basenmodifikationen kam (Abbildung 3.29). Die Daten der *ogg1*-antisense Zellen bestätigen Ergebnisse, die beschreiben, dass in Zelllinien, die aus *ogg1*^{-/-}-knockout-Mäusen gewonnen wurden, sich relativ wenig 8-oxoG in der DNA anreicherte (Abbildung 3.22; **Klungland et al. 1999**). Zur weiteren Charakterisierung der Zellen wurde deren Empfindlichkeit gegenüber der Induktion oxidativer Basenmodifikationen bestimmt. Das Schadensausmaß dieser Basenmodifikationen war in allen untersuchten Zellen annähernd gleich (Abbildung 3.30), wobei die Ogg1-antisense bzw. die XPA/hOgg1-antisense Zellen

etwas empfindlicher zu sein schienen. Diese "erhöhte" Empfindlichkeit war wahrscheinlich auf das Transfektionsprotokoll und die sich anschließende Selektion zurückzuführen, da in *ogg1^{-/-}-knockout*-Mausembryofibroblasten keine veränderte Empfindlichkeit gegenüber der Induktion oxidativer Fpg-sensitiver Basenmodifikationen im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden konnte (Abbildung 3.16; **Osterod 2002; Hollenbach 1999**). Um die Bedeutung des XPA- und des hOgg1-Proteins auf die DNA-Reparatur zu untersuchen, wurde in Wildtyp-, hOgg1-antisense-, XPA-defizienten und XPA-hOgg1-antisense-Zellen die Reparaturgeschwindigkeit induzierter oxidativer Fpg-sensitiver Basenmodifikationen bestimmt (3.1.1.2). Wie die Reparaturkinetiken zeigen (Abbildung 3.31), hatte ein Ausfall des hOgg1-Proteins eine Verlangsamung der Reparatur dieser Modifikationen zur Folge. Das Ausmaß der Verlangsamung der Reparatur Fpg-sensitiver Basenmodifikationen in den hOgg1-antisense Zellen war dabei vergleichbar mit der Reparaturverzögerung in Mausembryofibroblasten aus *ogg1^{-/-}-knockout*-Mäusen (**Osterod 2002; Klungland et al. 1999**). Die Reparaturkinetiken der XPA- und der Wildtyp- Zellen waren nahezu identisch. XPA beeinflusste folglich die Reparatur oxidativer Basenmodifikationen in Ogg1-profizienten nicht. In den XPA-hOgg1-antisense-Zellen war ausschließlich an frühen Zeitpunkten eine geringfügig verlangsamte Reparatur der Fpg-sensitiven Basenmodifikationen im Vergleich zu den hOgg1-antisense-Zellen erkennbar. Möglicherweise benötigt die Reparatur von 8-oxoG in Ogg1-defizienten Zellen zu Beginn zusätzlich ein funktionelles XPA-Protein. An späteren Zeitpunkten war dieser Einfluss des XPA-Proteins nicht mehr sichtbar. Es kann also nicht von einem direkten Zusammenhang des XPA-Proteins mit der *back-up* Reparatur oxidativer Basenmodifikationen in Ogg1-defizienten Zellen ausgegangen werden. Kürzlich konnte ein Bestandteil der *back-up* Reparatur von 8-oxoG, das Csb-Protein, beschrieben werden (**Osterod et al. 2002, Sunesen et al. 2002**). In Zellen, denen sowohl das Ogg1- als auch das Csb-Protein fehlen, konnte selbst nach 48 h keine nennenswerte Reparatur von 8-oxoG festgestellt werden. Die Situation ist also anders als bei der transkriptionsgekoppelten Reparatur, bei der sowohl Csb und XPA gebraucht werden (1.4.4).

4.3 Einfluss einer AP-Endonuklease 1-Überexpression auf die Reparatur von Einzelstrangbrüchen in XRCC1-defizienten Zellen

Es ist bekannt, dass das XRCC1-Protein und die AP Endonuklease 1 sowohl an der Basenexcisionsreparatur als auch an der Reparatur von Einzelstrangbrüchen beteiligt sind (**Caldecott 2003; Vidal et al. 2001b; Thompson und West 2000**). *In vitro* stimuliert XRCC1 die Aktivität der 8-oxoG-Glykosylase und der AP-Endonuklease 1 bei der Basenexcisionsreparatur (**Vidal et al. 2001b**). Bei der Reparatur von Einzelstrangbrüchen ist XRCC1 für die Rekrutierung weiterer Proteine, die zur Vervollständigung der Reparatur notwendig sind, zuständig. Das XRCC1-Protein interagiert dabei direkt mit der DNA-Ligase III, der AP-Endonuklease 1, DNA-Polymerase β und der Polynukleotidkinase (**unveröffentlichte Daten aus dem Labor von Caldecott; Caldecott 2003; Whitehouse et al. 2001; Thompson und West 2000**). Die Hauptaufgabe des XRCC1-Proteins ist dabei wahrscheinlich die Koordination dieser Reparaturwege durch sequentielle Interaktionen mit verschiedenen Proteinen. Die Stimulation der Aktivität beteiligter Enzymproteine kann eher als ein Nebeneffekt angesehen werden (**persönliche Mitteilung von J. P. Radicella**).

Zur Bestimmung des Einflusses des XRCC1-Proteins auf die Integrität der zellulären DNA wurden die Reparaturkinetiken induzierter Einzelstrangbrüche in verschiedenen XRCC1-defizienten und -profizienten Zellen, die teilweise AP-Endonuklease 1 überexprimierten, bestimmt. Die Untersuchung dieser Reparaturgeschwindigkeiten ließen einen eindeutigen Einfluss des XRCC1-Proteins auf die Reparatur dieser Modifikationen erkennen (Abbildung 3.34). Das Fehlen von XRCC1 hatte eine verlangsamte Reparatur der induzierten Einzelstrangbrüche zur Folge. Die Überexpression der AP-Endonuklease 1 in den XRCC1-defizienten Zellen beschleunigte zu frühen Zeitpunkten die Reparatur der induzierten Einzelstrangbrüche im Vergleich zu den XRCC1-defizienten Zellen. Die Reparatur in den AP-Endonuklease-1-überexprimierenden XRCC1-defizienten Zellen war dem Reparaturverlauf in Wildtyp-Zellen sehr ähnlich (Abbildung 3.35). Diese unvollständige Wiederherstellung der Einzelstrangbruchreparatur durch die AP-Endonuklease-1-Überexpression in den XRCC1-defizienten Zellen kann dadurch erklärt werden, dass nur ein kleiner Teil der Einzelstrangbrüche durch AP-Endonuklease 1, der größere Teil der Einzelstrangbrüche jedoch durch die Polynukleotidkinase, die eine 5'-Hydroxyl- und 3'-Phosphataseaktivität besitzt, prozessiert wird (**Caldecott 2003**). Außerdem arbeitet die AP-Endonuklease 1 auch in Abwesenheit von XRCC1, wenn auch

weniger effizient. Bei einem Überschuß an AP-Endonuklease 1 funktioniert die Reparatur auch ohne XRCC1. In XRCC1-profizienten Zellen war die Reparatur der Einzelstrangbrüche durch die Überexpression der AP-Endonuklease 1 nicht beeinflusst (Abbildung 3.35). Dies kann durch den durch XRCC1 präzise koordinierten Ablauf der Reparatur erklärt werden, der eine erhöhte Anzahl an AP-Endonuklease 1-Molekülen nicht benötigt.

Außerdem wurden die Steady-State-Spiegel von Einzelstrangbrüchen in verschiedenen XRCC1-defizienten und -profizienten Zellen, die teilweise AP-Endonuklease 1 überexprimierten, bestimmt (Abbildung 3.32). Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen unbehandelten XRCC1-defizienten und -profizienten Zellen beobachtet werden. Die Zahl der Einzelstrangbrüche war in allen Fällen sehr niedrig. In den XRCC1-defizienten Zellen würde man aufgrund der erhöhten genetischen Instabilität jedoch eine größere Zahl an Einzelstrangbrüchen als in den XRCC1-profizienten Zellen erwarten (**Thompson und West 2000**). Die Empfindlichkeit der XRCC1-defizienten Zellen gegenüber der Induktion von Einzelstrangbrüchen durch *tert.*-Butylhydroperoxid war in allen XRCC1-defizienten Zellen im Vergleich zu den XRCC1-profizienten Zellen scheinbar erhöht (Abbildung 3.33). Diese scheinbar "erhöhte Empfindlichkeit" gegenüber der Induktion von Einzelstrangbrüchen konnte jedoch auf die schnelle Reparatur der Einzelstrangbrüche in den XRCC1-profizienten Zellen schon während der Aufarbeitungszeit zurückgeführt werden (3.3.2).

Die Überexpression von Proteinen stört im Allgemeinen das zelluläre Gleichgewicht an Proteinen, was auch zu Veränderungen der DNA-Reparatur führen kann. So hatte zum Beispiel die Komplementierung der EM9-Zellen mit der menschlichen XRCC1-Sequenz eine schnellere Einzelstrangbruchreparatur als in Wildtyp-Zellen zur Folge (Abbildung 3.34). Mögliche Auswirkungen der AP-Endonuklease-1-Überexpression in den Zellen sollten genauer untersucht werden, da dieses Enzym, neben seiner Funktion in der DNA-Reparatur, auch als Redoxregulator in den Zellen fungiert (**Fritz 2000**).

Eine weitere Möglichkeit, den Einfluss der AP-Endonuklease 1 auf die Reparatur von Einzelstrangbrüchen zu untersuchen, wäre eine Unterdrückung der AP-Endonuklease-1-Expression durch ein antisense- oder ein RNA-Interferenz-Modell in XRCC1-defizienten und -profizienten Zellen.

5. Zusammenfassung

Die endogene Bildung reaktiver Sauerstoffspezies trägt in Zellen zur Schädigung von Makromolekülen bei. Von besonderem Interesse ist dabei die Schädigung der DNA, da bekannt ist, dass DNA-Modifikationen -falls sie nicht repariert werden- zu Mutationen führen können, die als Ursachen für Krebs angesehen werden. Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung der Bedeutung von drei Proteinen für die Reparatur von DNA-Modifikationen in Säugerzellen, nämlich Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP 1), AP-Endonuklease 1 (Ape 1) und Xeroderma pigmentosum A (XPA). Die Quantifizierung der DNA-Modifikationen in der zellulären DNA erfolgte mit Hilfe einer modifizierten alkalischen Elution in Kombination mit verschiedenen Reparaturoendonukleasen, die spezifisch Veränderungen der DNA erkennen.

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses der PARP 1-Aktivität auf die Reparatur verschiedener DNA-Modifikationen. Als Modelle dienten dabei Zellen mit induzierbarer *trans*-dominanter PARP-Hemmung sowie verschiedene reparaturdefiziente Zellen in denen die katalytische Aktivität der PARP 1 direkt durch den Hemmstoff DPQ blockiert wurde. Die Ergebnisse zeigen erstmalig, dass eine Hemmung der PARP-Aktivität nicht nur eine deutliche Verlangsamung der Reparatur von Einzelstrangbrüchen, sondern auch von oxidativen Fpg-sensitiven Purinmodifikationen und von Pyrimidindimeren zur Folge hat. Bei der verzögerten Reparatur oxidativer Fpg-sensitiver Basenmodifikationen akkumulierten keine Basenexcisionsreparaturintermediate wie Einzelstrangbrüche und AP-Läsionen. Interessanterweise erfolgte diese Verlangsamung der DNA-Reparatur nicht in Csb-defizienten Zellen. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aktivierung der PARP 1 und das Csb-Protein zusammen an einem neuartigen Mechanismus beteiligt sind, der die globale Reparatur verschiedener DNA-Modifikationen beschleunigt. Zusätzlich wurden die Auswirkungen der PARP-Aktivität in XRCC1-defizienten Zellen auf die Basenexcisionsreparatur und die Reparatur von Einzelstrangbrüchen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die XRCC1-Defizienz alleine keinen Einfluss auf die Reparaturgeschwindigkeit oxidativer Fpg-sensitiver Basenmodifikationen hat. Erst eine Hemmung der PARP-Aktivität führte in XRCC1-defizienten Zellen zu einer Verlangsamung der Basenexcisionsreparatur, die größer war als durch die Hemmung der PARP-Aktivität alleine.

Weiterhin wurde die Bedeutung der Nukleotidexcisionsreparatur als *back-up* Reparatur von 8-Hydroxyguanin (8-oxoG) in immortalisierten Fibroblasten des Menschen untersucht. Dazu wurden normale und XPA-defiziente Fibroblasten mit einem hOgg1-*antisense* transfiziert. Die Reparaturkinetik oxidativer Basenmodifikationen, hauptsächlich 8-oxoG, der XPA-defizienten Fibroblasten zeigte keinen Unterschied zur Reparaturkinetik in Wildtyp-Zellen. Die Reparaturkinetik in den hOgg1-*antisense*-Zellen verlief ähnlich der Reparaturkinetik in *ogg1*^{-/-}-*knockout*-Mausembryofibroblasten. Der kombinierte Ausfall von XPA/hOgg1 hatte keinen signifikanten zusätzlichen Einfluss auf die DNA-Reparatur. Eine Bedeutung des XPA-Proteins für die *back-up* Reparatur von 8-oxoG in hOgg1-defizienten Zellen konnte somit ausgeschlossen werden.

In einem weiteren Schwerpunkt der Arbeit wurden die Auswirkungen einer AP-Endonuklease-1-Überexpression in XRCC1-defizienten Zellen auf die Reparatur von Einzelstrangbrüchen untersucht. Die Reparatur der induzierten Einzelstrangbrüche war in XRCC1-defizienten Zellen erwartungsgemäß deutlich langsamer als in XRCC1-profizienten Zellen. Die Überexpression der AP-Endonuklease 1 in den XRCC1-defizienten Zellen führte zu einer teilweisen Beschleunigung der Einzelstrangbruchreparatur.

6. Literaturverzeichnis

- Aas, P. A., Otterlei, M., Falnes, P. O., Vagbo, C. B., Skorpen, F., Akbari, M., Sundheim, O., Bjoras, M., Slupphaug, G., Seeberg, E. und Krokan, H. E. (2003) Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature*, 421:859-863.
- Aburatani, H., Hippo, Y., Ishida, T., Takashima, R., Matsuba, C., Kodama, T., Takao, M., Yasui, A., Yamamoto, K. und Asano, M. (1997) Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue. *Cancer Res.*, 57:2151-2156.
- Agarwal, M. L., Agarwal, A., Taylor, W. R., Wang, Z. Q., Wagner, E. F. und Stark, G. R. (1997) Defective induction but normal activation and function of p53 in mouse cells lacking poly-ADP-ribose polymerase. *Oncogene*, 15:1035-1041.
- Althaus, F. R., Hofferer, L., Kleczkowska, H. E., Malanga, M., Naegeli, H., Panzeter, P. L. und Realini, C. A. (1994) Histone shuttling by poly ADP-ribosylation. *Mol. Cell. Biochem.*, 138:53-59.
- Andrae, U. (2003) Störung der Struktur und Funktion von Makromolekülen durch Chemikalien. Skript zum DGPT-Kurs Molekulare Zelltoxikologie.
- Arai, K., Morishita, K., Shinmura, K., Kohno, T., Kim, S. R., Nohmi, T., Taniwaki, M., Ohwada, S. und Yokota, J. (1997) Cloning of a human homolog of the yeast OGG1 gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage. *Oncogene*, 14:2857-2861.
- Asagoshi, K., Yamada, T., Terato, H., Ohyama, Y., Monden, Y., Arai, T., Nishimura, S., Aburatani, H., Lindahl, T. und Ide, H. (2000) Distinct repair activities of human 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase and formamidopyrimidine DNA glycosylase for formamidopyrimidine and 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *J. Biol. Chem.*, 275:4956-4964.
- Audebert, M., Chevillard, S., Levalois, C., Gyapay, G., Vieillefond, A., Klijanienko, J., Vielh, P., El Naggar, A. K., Oudard, S., Boiteux, S. und Radicella, J. P. (2000) Alterations of the DNA repair gene OGG1 in human clear cell carcinomas of the kidney. *Cancer Res.*, 60:4740-4744.

- Baeuerle, P. A., Rupec, R. A. und Pahl, H. L. (1996) Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. *Pathol. Biol. (Paris)*, 44:29-35.
- Bailly, V., Verly, W. G., O'Connor, T. und Laval, J. (1989) Mechanism of DNA strand nicking at apurinic/apyrimidinic sites by *Escherichia coli* [formamidopyrimidine]DNA glycosylase. *Biochem. J.*, 262:581-589.
- Bartsch, H. und Nair, J. (2000) New DNA-based biomarkers for oxidative stress and cancer chemoprevention studies. *Europ. Journal of Cancer*, 36:1229-1234.
- Batty, D. P. und Wood, R. D. (2000) Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene*, 241:193-204.
- Beckman, K. B. und Ames, B. N. (1997) Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.*, 272:19633-19636.
- Behler, B. C., Przybyszewski, J., Box, H. B. und Kulesz-Martin, M. F. (1992) Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine within DNA of mouse keratinocytes exposed in culture to UVB and H₂O₂. *Carcinogenesis*, 13:737-742.
- Beneke, R., Geisen, C., Zevnik, B., Bauch, T., Muller, W. U., Küpper, J. H. und Moroy, T. (2000) DNA excision repair and DNA damage-induced apoptosis are linked to Poly(ADP-ribosyl)ation but have different requirements for p53. *Mol. Cell. Biol.*, 20:6695-6703.
- Bennett, R. O., Wilson, D. M. III, Wong, D. und Demple, B. (1997) Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase β in the base excision repair pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:7166-7169.
- Bessho, T. (1999) Nucleotide excision repair 3' endonuclease XPG stimulates the activity of base excision repair enzyme thymine glycol DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res.*, 27:979-983.
- Bhattacharyya, N. und Banerjee, S. (2001) A novel role of XRCC1 in the functions of a DNA polymerase beta variant. *Biochemistry*, 40:9005-9013.
- Bjoras, M., Luna, L., Johnsen, B., Hoff, E., Haug, T., Rognes, T. und Seeberg, E. (1997) Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites. *EMBO J.*, 16:6314-6322.

- Boiteux, S. und Radicella, J. P. (1999) Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie*, 81:59-67.
- Boiteux, S. und Radicella, J. P. (2000) The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 377:1-8.
- Boiteux, S., Dherin, C., Reille, F., Apiou, F., Dutrillaux, B. und Radicella, J. P. (1998) Excision repair of 8-hydroxyguanine in mammalian cells: the mouse Ogg1 protein as a model. *Free Radic. Res.*, 29:487-497.
- Boiteux, S., O'Connor, T. R., Lederer, F., Gouyette, A. und Laval, J. (1990) Homogeneous *Escherichia coli* FPG protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/apyrimidinic sites. *J. Biol. Chem.*, 265:3916-3922.
- Borden, A., O'Grady, P. I., Vandewiele, D., Fernandez de Henestrosa, A. R., Lawrence, C. W. und Woodgate, R. (2002) *Escherichia coli* DNA polymerase III can replicate efficiently past a T-T cis-syn cyclobutane dimer if DNA polymerase V and the 3' to 5' exonuclease proofreading function encoded by dnaQ are inactivated. *J. Bacteriol.*, 184:2674-2681.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, 72:248-254.
- Brosh, R. M. Jr., Balajee, A. S., Selzer, R. R., Sunesen, M., Proietti De Santis, L. und Bohr V. A. (1999) The ATPase domain but not the acidic region of Cockayne syndrome group B gene product is essential for DNA repair. *Mol. Biol. Cell.*, 10:3583-3594.
- Bruner, S. D., Norman, D. P. und Verdine, G. L. (2000) Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature*, 403:859-866.
- Budiyanto, A., Ueda, M., Ueda, T. und Ichihashi, M. (2002) Formation of cyclobutane pyrimidine dimers and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in mouse and organ-cultured human skin by irradiation with broadband or with narrowband UVB. *Photochem. Photobiol.*, 76:397-400.
- Bürkle, A. (2001) Physiology and pathophysiology of poly(ADP-ribosyl)ation. *Bioessays*, 23:795-806.

- Bürkle, A. (2001) Poly(ADP-ribosyl)ation, a DNA damage-driven protein modification and regulator of genomic instability. *Cancer Lett.*, 163:1-5.
- Bürkle, A., Chen, G., Küpper, J. H., Grube, K. und Zeller, W. J. (1993) Increased poly(ADP-ribosyl)ation in intact cells by cisplatin treatment. *Carcinogenesis*, 14:559-561.
- Burney, S., Caulfield, J. L., Niles, J. C., Wishnok, J. S. und Tannenbaum, S. R. (1999) The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat. Res.*, 424:37-49.
- Cabrera, M., Nghiem, Y. und Miller, J. H. (1988) mutM, a second mutator locus in *Escherichia coli* that generates G:T → T:A transversions. *J. Bacteriol.*, 170:5405-5407.
- Cadet, J., Bourdat, A. G., D'Ham, C., Duarte, V., Gasparutto, D., Romieu, A. und Ravanat, J. L. (2000) Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. *Mutat. Res.*, 462:121-128.
- Caldecott, K. W. (2001) Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. *BioEssays*, 23:447-455.
- Caldecott, K. W. (2003) Protein-protein interactions during mammalian DNA single-strand break repair. *Biochem. Soc. Trans.*, 31:247-251.
- Caldecott, K. W., Aoufouchi, S., Johnson, P. und Shall, S. (1996) XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly(ADP-ribose)polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, 24:4387-4394.
- Caldecott, K. W., Tucker, J. D., Stanker, L. H. und Thompson, L. H. (1995) Characterization of the XRCC1-DNA ligase III complex *in vitro* and its absence from mutant hamster cells. *Nucleic Acids Res.*, 23:4836-4843.
- Chan, G. L., Doetsch, P. W. und Haseltine, W. A. (1985) Cyclobutane pyrimidine dimers and (6-4) photoproducts block polymerization by DNA polymerase I. *Biochemistry*, 24:5723-5728.

- Chang, W. J. und Alvarez-Gonzalez, R. (2001) The sequence-specific DNA binding of NF-kappa B is reversibly regulated by the automodification reaction of poly (ADP-ribose) polymerase 1. *J. Biol. Chem.*, 276:47664-47670.
- Cheng, K. C. und Loeb, L. A. (1997) In: Kastan, M. B. (Herausgeber) Genetic instability and tumorigenesis. Springer Verlag, Berlin, 5-18.
- Chevillard, S., Radicella, J. P., Levalois, C., Lebeau, J., Poupon, M. F., Oudard, S., Dutrillaux, B. und Boiteux, S. (1998) Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours. *Oncogene*, 16:3083-3086.
- Chmiel, N. H., Golinelli, M. P., Francio, A.W. und David, S. S. (2001) Efficient recognition of substrates and substrate analogs by the adenine glycosylase MutY requires the C-terminal domain. *Nucleic Acids Res.*, 29:553-564.
- Chou, K. M. und Cheng, Y. C. (2002) An exonucleolytic activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease on 3' mispaired DNA. *Nature*, 415:655-659.
- Chou, K. M., Kukhanova, M. und Cheng, Y. C. (2000) A novel action of human apurinic/apyrimidinic endonuclease: excision of L-configuration deoxyribonucleoside analogs from the 3' termini of DNA. *J. Biol. Chem.*, 275:31009-31015.
- Churchill, M. E., Peak, J. G. und Peak, M. J. (1991) Repair of near-visible- and blue-light-induced DNA single-strand breaks by the CHO cell lines AA8 and EM9. *Photochem. Photobiol.*, 54:639-644.
- Citterio, E., Van Den Boom, V., Schnitzler, G., Kanaar, R., Bonte, E., Kingston, R. E., Hoeijmakers, J. H. und Vermeulen, W. (2000) ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor. *Mol. Cell. Biol.*, 20:7643-7653.
- Conde, C., Mark, M., Oliver, F. J., Huber, A., de Murcia, G. und Menissier-de Murcia, J. (2001) Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-1 causes increased tumour latency in p53-deficient mice. *EMBO J.*, 20:3535-3543.

- Dantzer, F., de La Rubia, G., Menissier-De Murcia, J., Hostomsky, Z., de Murcia, G. und Schreiber, V. (2000) Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose)polymerase-1. *Biochemistry*, 39:7559-7569.
- de Laat, W. L., Jaspers, N. G. und Hoeijmakers, J. H. (1999) Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.*, 13:768-785.
- de Murcia, G. und Menissier de Murcia, J. (1994) Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem. Sci.*, 19:172-176.
- Demple, B. und DeMott M. S. (2002) Dynamics and diversions in base excision repair of oxidised abasic sites. *Oncogene*, 21:8926-8934.
- Demple, B. und Linn, S. (1980) DNA N-glycosylases and UV repair. *Nature*, 287:203-208.
- Demple, B., Herman, T. und Chen, D. S. (1991) 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. USA*, 88:11450-11454.
- D'Ham, C., Romieu, A., Jaquinod, M., Gasparutto, D. und Cadet, J. (1999) 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*, 38:3335-3344.
- Dhenaut, A., Boiteux, S. und Radicella, J. P. (2000) Characterization of the hOGG1 promoter and its expression during the cell cycle. *Mutat. Res.*, 461:109-118.
- Dianova, I. I., Bohr, V. A. und Dianov, G. L. (2001) Interaction of human AP endonuclease 1 with flap endonuclease 1 and proliferating cell nuclear antigen involved in long-patch base excision repair. *Biochemistry*, 40:12639-12644.
- Dizdaroglu, M., Laval, J. und Boiteux, S. (1993) Substrate specificity of the *Escherichia coli* endonuclease III: excision of thymine- and cytosine-derived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals. *Biochemistry*, 32:12105-12111.
- Dominguez, I., Daza, P., Natarajan, A. T, und Cortes, F. (1998) A high yield of translocations parallels the high yield of sister chromatid exchanges in the CHO mutant EM9. *Mutat Res.*, 398:67-73.

- Duncan, T., Trewick, S. C., Koivisto, P., Bates, P. A., Lindahl, T. und Sedgwick, B. (2002) Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99:16660-16665.
- Durkacz, B. W., Omidiji, O., Gray, D. A. and Shall, S. (1980) (ADP-ribose)_n participates in DNA excision repair. *Nature*, 283:593-596.
- Durkacz, B. W., Shall, S. und Irwin, J. (1981) The effect of inhibition of (ADP-ribose)_n biosynthesis on DNA repair assayed by the nucleoid technique. *Eur. J. Biochem.*, 121:65-69.
- Elstner, E. F. (1990) *Der Sauerstoff; Biochemie, Biologie, Medizin*. BI Wissenschaftsverlag, Mannheim/Wien/Zürich.
- Epe, B. (1991) Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem.-Biol. Interactions*, 80:239-260.
- Epe, B. (1995) DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 127:223-249.
- Epe, B. (2002) Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice? *Biol. Chem.*, 383:467-475.
- Epe, B. (2003) Wie wichtig sind oxidative DNA-Schäden bei der Krebsentstehung? *BIOforum*, 4:218-219.
- Epe, B., Pflaum, M., Häring, M., Hegler, J. und Rüdiger, H. (1993) DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems. *Mutat. Res.*, 299:135-145.
- Fischer, U., Möhler, H., Schneider, F. und Widmer, U. (1990) Tricyclic pyridine derivatives with high affinity to central benzodiazepine receptor. *Helv. Chem. Acta*, 73:763-781.
- Floyd, R. A. (1990) The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11:1447-1450.
- Fortini, P., Pasucci, B., Parlanti, E., Sobol, R. W., Wilson, S. H. und Dogliotti, E. (1998) Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry*, 37:3575-3580.
- Friedberg, E. C. (2001) How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nature*, 1:22-31.

- Friedberg, E. C. und Meira, L. B. (2000) Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting cellular responses to DNA damage. Version 4. *Mutat. Res.*, 459:243-274.
- Friedberg, E. C., Walker, G. C. und Siede, W. (1995) DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington D.C., USA.
- Friedberg, E.C. (1996) Relationships between DNA repair and transcription. *Ann. Rev. Biochem.*, 65:15-42.
- Fritz, G. (2000) Human APE/Ref-1 protein. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 32:925-929.
- Fujikawa, K., Kamiya, H., Yakushiji, H., Fujii, Y., Nakabeppu, Y. und Kasai, H. (1999) The oxidized forms of dATP are substrates for the human MutT homologue, the hMTH1 protein. *J. Biol. Chem.*, 274:18201-18205.
- Gary, K., Kim, K., Cornelius, H. L., Park, S. M. und Matsumoto, Y. (1999) Proliferating cell nuclear antigen facilitates excision in long-patch base excision repair. *J. Biol. Chem.*, 274:4354-4363.
- Gellon, L., Barbey, R., Auffret van der Kemp, P., Thomas, D. und Boiteux, S. (2001) Synergism between base excision repair, mediated by the DNA glycosylases Ntg1 and Ntg2, and the nucleotide excision repair in the removal of oxidatively damaged DNA bases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Genet. Genomics*, 265:1087-1096.
- Gentil, A., Le Page, F., Margot, A., Lawrence, C. W., Borden, A. und Sarasin, A. (1996) Mutagenicity of a unique thymine-thymine dimer or thymine-thymine pyrimidine pyrimidone (6-4) photoproduct in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, 24:1837-1840.
- Gerard, G. F., D'Alessio, J. M., Kotewicz, M. L. und Noon, M. C. (1986) Influence on stability in *Escherichia coli* of the carboxy-terminal structure of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *DNA*, 35:249-258.
- Girard, P. M., D'Ham, C., Cadet, J. und Boiteux, S. (1998) Opposite base-dependent excision of 7,8-dihydro-8-oxoadenine by the Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Carcinogenesis*, 19:1299-1305.

- Graves, R. J., Felzenszwalb, I., Laval, J. und O'Connor, T. R. (1992) Excision of 5'-terminal deoxyribose phosphate from damaged DNA is catalyzed by the Fpg protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 267:14429-14435.
- Gros, L., Saporbaev, M. K. und Laval, J. (2002) Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. *Oncogene*, 21:8905-8925.
- Guidarelli, A., Cattabeni, F. und Cantoni, O. (1997a) Alternative mechanisms for hydroperoxide-induced DNA single strand breakage. *Free Radic. Res.*, 26:537-547.
- Guidarelli, A., Clementi, E., Sciorati, C., Cattabeni, F. und Cantoni, O. (1997b) Calcium-dependent mitochondrial formation of species mediating DNA single strand breakage in U937 cells exposed to sublethal concentrations of tert-butylhydroperoxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 283:66-74.
- Halliwell, B. (1996) Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathol. Biol. (Paris)*, 44:6-13.
- Halliwell, B. und Aruoma, O. I. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. *FEBS Letters*, 281:9-19.
- Halliwell, B. und Gutteridge, J. M. C. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, 219:1-14.
- Halliwell, B. und Gutteridge, J. M. C. (1989) Free radicals in biology and medicine. Second Edition, Clarendon Press, Oxford.
- Halliwell, B. und Gutteridge, J. M. C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.*, 86:1-85.
- Hassa, P. O. und Hottiger, M. O. (2002) The functional role of poly(ADP-ribose)polymerase 1 as novel coactivator of NF-kappaB in inflammatory disorders. *Cell. Mol. Life Sci.*, 59:1534-1553.
- Hatahet, Z., Kow, Y. W., Purmal, A. A., Cunningham, R. P. und Wallace, S. S. (1994) New substrates for old enzymes. 5-Hydroxy-2'-deoxycytidine and 5-hydroxy-2'-deoxyuridine are substrates for *Escherichia coli* endonuclease III and formamidopyrimidine DNA N-glycosylase, while 5-hydroxy-2'-deoxyuridine is a substrate for uracil DNA N-glycosylase. *J. Biol. Chem.*, 269:18814-18820.

- Herceg, Z. und Wang, Z. Q. (2001) Functions of poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutat. Res.*, 477:97-110.
- Hill, J. W., Hazra, T. K., Izumi, T. und Mitra, S. (2001) Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA-glycosylase by AP endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair. *Nucleic Acids Res.*, 29:430-438.
- Hollenbach, S. (1999) Bedeutung endogener Faktoren für Steady-State-Level und Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen in Säugerzellen. Dissertation, Universität Mainz.
- Hsieh, P. (2001) Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. *Mutat. Res.* 486:71-87.
- Hüttermann, J. (1982) Solid-state radiation chemistry of DNA and its constituents. *J. Ultramicroscopy*, 10:25-40.
- Jacobs, A., Bopp, A. und Hagen, U. (1972) *In vitro* repair of single-strand breaks in γ -irradiated DNA by polynucleotide ligase. *Int. J. Radiat. Biol.*, 22:431-435.
- Janicijevic, A., Sugasawa, K., Shimizu, Y., Hanaoka, F., Wijgers, N., Djurica, M., Hoeijmakers, J. H. und Wyman, C. (2003) DNA bending by the human damage recognition complex XPC-HR23B. *DNA Repair (Amst.)*, 2:325-336.
- Jezowska-Bojczuk, M., Szczepanik, W., Lesniak, W., Ciesiolka, J., Wrzesinski, J. und Bal, W. (2002) DNA and RNA damage by Cu(II)-amikacin complex. *Eur. J. Biochem.*, 269:5547-5556.
- Jilani, A., Ramotar, D., Slack, C., Ong, C., Yang, X. M., Scherer, S. W. und Lasko, D. D. (1999) 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.*, 274:24176-24186.
- Jurado, J., Sapparbaev, M., Matray, T. J., Greenberg, M. M. und Laval, J. (1998) The ring fragmentation product of thymidine C5-hydrate when present in DNA is repaired by the *Escherichia coli* Fpg and Nth proteins. *Biochemistry*, 37:7757-7763.
- 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. und Weinfeld, M. (1999) Molecular characterization of a human DNA kinase. *J. Biol. Chem.*, 274:24187-24194.

- Kasai, H. und Nishimura, S. (1993) Formation of 8-hydroxyguanine by oxidative DNA damage, its repair and its mutagenic effects. *Adv. Mutagen. Res.*, 4:31-45.
- Kim, J. und Linn, S. (1988) The mechanisms of action of *E. coli* endonuclease III and T4 UV endonuclease (endonuclease V) at AP sites. *Nucleic Acids Res.*, 16:1135-1141.
- Klein, J. C., Bleeker, M. J., Saris, C. P., Roelen, H. C., Brugghe, H. F., van der Elst, H., van der Marel, G. A., van Boom, J. H., Westra, J. G., Kriek, E. und Berns, A. J. M. (1992) Repair and replication of a plasmid with site-specific 8-oxodG and 8-AAFdG residues in normal and repair-deficient human cells. *Nucleic Acids Res.*, 20:4437-4443.
- Klinedinst, D. K. und Drinkwater, N. R. (1992) Mutagenesis by apurinic sites in normal and ataxia telangiectasia human lymphoblastoid cells. *Mol. Carcinog.*, 6:32-42.
- Klotz, L. O. (2002) Oxidant-induced signaling: effects of peroxynitrite and singlet oxygen. *Biol. Chem.*, 383:443-456.
- Klotz, L. O. und Sies, H. (2003) Defenses against peroxynitrite: selenocompounds and flavonoids. *Toxicol. Lett.*, 140-141:125-132.
- Klotz, L. O., Kroncke, K. D. und Sies, H. (2003) Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2:88-94.
- Klungland, A. und Lindahl, T. (1997) Second pathway for completion of human base excision repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J.*, 16:3341-3348.
- Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T. und Barnes, D. E. (1999) Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96:13300-13305.
- Kohn, K. W., Erickson, L. C., Ewig, R. A. G. und Friedman, C. A. (1976) Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry*, 15:4629-4637.
- Koloder, R. D. und Marsischky, G. T. (1999) Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 9:89-96.

- Kotewicz, M. L., D'Alessio, J. M., Driftmier, K. M., Blodgett, K. P. und Gerard, G. F. (1985) Cloning and overexpression of Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase in *Escherichia coli*. *Gene*, 35:249-258.
- Kotewicz, M. L., Sampson, C. M., D'Alessio, J. M. und Gerard, G. F. (1988) Isolation of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase lacking ribonuclease H activity. *Nucleic Acids Res.*, 16:265-277.
- Kraus, W. L. und Lis, J. T. (2003) PARP goes transcription. *Cell*, 113:677-683.
- Krokan, H. E., Nilsen, H., Skorpen, F., Otterlei, M. und Slupphaug, G. (2000) Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett.*, 476:73-77.
- Krokan, H. E., Standal, R. und Slupphaug, G. (1997) DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem. J.*, 325:1-16.
- Kuipers, G. K., Poldervaart, H. A., Slotman, B. J. und Lafleur, M.V. (1999) The influence of formamidopyrimidine-DNA glycosylase on the spontaneous and gamma-radiation-induced mutation spectrum of the lacZ alpha gene. *Mutat. Res.*, 435:141-150.
- Kuipers, G. K., Slotman, B. J., Poldervaart, H. A., Reitsma-Wijker, C. A. und Lafleur, M. V. (1996) The influence of combined Fpg- and MutY-deficiency on the spontaneous and gamma-radiation-induced mutation spectrum in the lacZalpha gene of m13mp10. *Mutat. Res.*, 461:189-195.
- Küpper, J. H., Müller, M., Jacobson, M. K., Tatsumi-Miyajima, J., Coyle, D. L., Jacobson, E. L. und Bürkle, A. (1995) *Trans*-dominant inhibition of Poly(ADP-Ribosyl)ation sensitizes cells against γ -irradiation and N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine but does not limit DNA replication of a polyomavirus replicon. *Mol. Cell. Biol.*, 15:3154-3163.
- Kyng, K. J., May, A., Brosh, R. M. Jr., Cheng, W. H., Chen, C., Becker, K. G. und Bohr, V. A. (2003) The transcriptional response after oxidative stress is defective in Cockayne syndrome group B cells. *Oncogene*, 22:1135-1149.
- Lämmler, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685.

- Latour, I., Demoulin, J. B. und Buc-Calderon, P. (1995) Oxidative DNA damage by t-butyl hydroperoxide causes DNA single strand breaks which is not linked to cell lysis. A mechanistic study in freshly isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett.*, 373:299-302.
- Laval, J. (1977) Two enzymes are required from strand incision in repair of alkylated DNA. *Nature*, 269:829-832.
- Lawrence, C. W., Borden, A., Banerjee, S. K. und LeClerc, J. E. (1990) Mutation frequency and spectrum resulting from a single abasic site in single stranded vector. *Nucleic Acids Res.*, 18:2153-2157.
- Lazzé, M. C., Pizzala, R., Savio, M., Stivala, L. A., Prosperi, E. und Bianchi, L. (2003) Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butyl-hydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells. *Mutat Res.*, 535:103-115.
- Le Page, F., Kwoh, E. E., Avrutskaya, A., Gentil, A., Leadon, S. A., Sarasin, A. und Cooper, P.K. (2000a) Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. *Cell*, 101:159-171.
- Le Page, F., Randrianarison, V., Marot, D., Cabannes, J., Perricaudet, M., Feunteun, J. und Sarasin, A. (2000b) BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells. *Cancer Res.*, 60:5548-5552.
- Le Page, F., Schreiber, V., Dherin, C., De Murcia, G. und Boiteux, S. (2003) 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.*, 278:18471-18477.
- Lee, Y. S., Choi, J. Y., Park, M.K., Choi, E. M., Kasai, H. und Chung, M. H. (1996) Induction of oh8Gua glycosylase in rat kidneys by potassium bromate (KBrO₃), a renal oxidative carcinogen. *Mutat. Res.*, 364:227-233.
- Levine, A. J. (1997). P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88:323-331.
- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, 362:709-715.

- Lindahl, T. und Wood, R. D. (1999) Quality control by DNA repair. *Science*, 286:1897-1905.
- Lippke, J. A., Gordon, L. K., Brash, D. E. und Hannawalt W. A. (1981) Distribution of UV-light induced damage in a specified sequence of human DNA: detection of alkaline sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:3388-3392.
- Ljungquist, S. (1977) A new endonuclease from *Escherichia coli* acting at apurinic sites in DNA. *J. Biol. Chem.*, 252:2808-2814.
- Lloyd, R. S., Haidle, C. W. und Robertson, D. L. (1978) Bleomycin-specific fragmentation of double-stranded DNA. *Biochemistry*, 17:1890-1896.
- Loeb, L. A. (1998) Cancer cells exhibit a mutator phenotype. *Adv. Cancer Res.*, 72:25-56.
- Loeb, L. A. (2001) A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.*, 61:3230-3239.
- Loeb, L. A., Loeb, K. R. und Anderson, J. P. (2003) Multiple mutations and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:776-781.
- Lu, R., Nash, H. M. und Verdine, G. L. (1997) A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer. *Curr. Biol.*, 7:397-407.
- Mahler, H. C. (1999) Einfluss endogener und exogener Faktoren auf die Bildung und Reparatur oxidativer DNA-Schäden. Dissertation, Universität Mainz.
- Markant, A., Rimbach, G., Krämer, K., Mayer, H. und Pallauf, J. (1995) Reaktive Sauerstoffradikale: Entstehung, Wirkung, Eliminierung. *PZ*, 140:2313-2327.
- Marnett, L. J. (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, 21:361-370.
- Marnett, L. J. und Plastaras, J. P. (2001) Endogenous DNA damage and mutation. *TRENDS in Genetics*, 17:214-221.
- Marti, T. M., Kunz, C. und Fleck, O. (2002) DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J. Cell. Physiol.*, 191:28-41.
- Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-de Murcia, J. und de Murcia, G. (1998) XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose)

- polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol. Cell. Biol.*, 18:3563-3571.
- Matsumoto, Y., Kim, K., Hurwitz, J., Gary, K., Levin, D. S., Tomkinson, A. E. und Park, M. S. (1999) Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/apyrimidinic sites with purified human proteins. *J. Biol. Chem.*, 274:33703-33708.
- Memisoglu, A. und Samson, L. (2000) Base excision repair in yeast and mammals. *Mutat. Res.*, 451:39-51.
- Michaels, M. L. und Miller, J. H. (1992) The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). *J. Bacteriol.*, 174:6321-6325.
- Michaels, M. L., Cruz, C., Grollman, A. P. und Miller, J. H. (1992) Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:7022-7025.
- Michaels, M. L., Pham, L., Nghiem, Y., Cruz, C. und Miller, J. H. (1990) MutY, an adenine glycosylase active on G-A mispairs, has homology to endonuclease III. *Nucleic Acids Res.*, 18:3841-5348.
- Minton, K., Durphy, R., Taylor, R. und Friedberg, E. C. (1975) The ultraviolet endonuclease of bacteriophage T4. Further characterization. *J. Biol. Chem.*, 250:2823-2829.
- Mitchell, D. L., Jen, J. und Cleaver, J. E. (1991) Relative induction of cyclobutane dimers and cytosine photohydrates in DNA irradiated *in vitro* and *in vivo* with ultraviolet-C und ultraviolet-B light. *Photochem. Photobiol.*, 54:741-746.
- Moore, M. H., Gulbis, J. M., Dodson, E. J., Demple, B. und Moody, P. C. E. (1994) Crystal structure of a suicidal DNA repair protein: the Ada O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase from *E. coli*. *EMBO J.*, 13:1495-1501.
- Moriya, M. (1993) Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G:C → T:A transversions in simian kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1122-1126.

- Mulligan, R. C. und Berg, P. (1980) Expression of a bacterial gene in mammalian cells. *Science*, 209:1422-1427.
- Nackerdien, Z., Rao, G., Cacciuttolo, M. A., Gajewski, E. und Dizdaroglu, M. (1992) Chemical nature of DNA-protein-cross-links produced in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of iron or copper ions. *Biochemistry*, 30:4873-4879.
- Nakabeppu, Y. (2001) Regulation of intracellular localization of human MTH1, OGG1, and MYH proteins for repair of oxidative DNA damage. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 68:75-94.
- Nakabeppu, Y., Yamashita, K. und Sekiguchi, M. (1982) Purification and characterization of normal and mutant forms of T4 endonuclease V. *J. Biol. Chem.*, 257:2556-2562.
- Nakamura, J., Purvis, E. R. und Swenberg, J. A. (2003) Micromolar concentrations of hydrogen peroxide induce oxidative DNA lesions more efficiently than millimolar concentrations in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, 31:1790-1795.
- Nash, R. A., Caldecott, K. W., Barnes, D. E. und Lindahl, T. (1997) XRCC1 protein interacts with one of two distinct forms of DNA ligase III. *Biochemistry*, 36:5207-5211.
- Neto, J. B., Gentil, A., Cabral, R. E. und Sarasin, A. (1992) Mutation spectrum of heat-induced abasic sites on a single-stranded shuttle vector replicated in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 267:19718-19723.
- Nilsen, H. und Krokan, H. E. (2001) Base excision repair in a network of defence and tolerance. *Carcinogenesis*, 22:987-998.
- O'Connor, T. R. und Laval, J. (1989) 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. USA*; 86:5222-5226.
- O'Connor, T. R., Boiteux, S. und Laval, J. (1988) Ring-opened 7-methylguanine residues in DNA are a block to *in vitro* DNA synthesis. *Nucleic Acids Res.*, 16:5879-5894.
- Oei, S. L. und Shi, Y. (2001) Poly(ADP-ribosyl)ation of transcription factor Yin Yang 1 under conditions of DNA damage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 285:27-31.

- Oei, S. L. und Ziegler, M. (2000) ATP for the DNA ligation step in base excision repair is generated from poly(ADP-ribose). *J. Biol. Chem.*, 275:23234-23239.
- Ohtsubo, T., Nishioka, K., Imaiso, Y., Iwai, S., Shimokawa, H., Oda, H., Fujiwara, T. und Nakabeppu, Y. (2000) Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucleic Acids Res.*, 28:1355-1364.
- Oliver, F. J., Menissier-de Murcia, J., Nacci, C., Decker, P., Andriantsitohaina, R., Muller, S., de la Rubia, G., Stoclet, J. C. and de Murcia, G. (1999) Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose)polymerase-1 deficient mice. *EMBO J.*, 18:4446-4454.
- Osterod, M. (2002) Einfluss genetischer Defekte auf die Reparatur oxidativer DNA-Schäden in Säugerzellen. Dissertation, Universität Mainz.
- Osterod, M., Hollenbach, S., Hengstler, J. G., Barnes, D.E., Lindahl, T. und Epe, B. (2001) Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1) deficient mice. *Carcinogenesis*, 22:1459-1563.
- Osterod, M., Larsen, E., Le Page, F., Hengstler, J. G., Van Der Horst, G. T., Boiteux, S., Klungland, A. und Epe, B. (2002) A global DNA repair mechanism involving the Cockayne syndrome B (CSB) gene product can prevent the *in vivo* accumulation of endogenous oxidative DNA base damage. *Oncogene*, 21:8232-8239.
- Otterlei, M., Warbrick, E., Nagelhus, T. A., Haug, T., Slupphaug, G., Akbari, M, Aas, P. A., Steinsbekk, K., Bakke, O. und Krokan, H. E. (1999) Post-replication base excision repair in replication foci. *EMBO J.*, 18:3834-3844.
- Palomba, L., Guidarelli, A., Scovassi, A. I. und Cantoni, O. (2001) Different effects of tert-butylhydroperoxide-induced peroxynitrite-dependent and -independent DNA single-strand breakage on PC12 cell poly(ADP-ribose) polymerase activity. *Eur. J. Biochem.*, 268:5223-5228.
- Pascucci, B., Stucki, M., Jonsson, Z. O., Dogliotti, E. und Hübscher, U. (1999) Long patch base excision repair with purified human proteins. *J. Biol. Chem.*, 274:33696-33702.

- Pegg, A. E. (2000) Repair of O⁶-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat. Res.*, 462:83-100.
- Peltomäki, P. (2003) Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J. Clin. Oncol.*, 21:1174-1179.
- Pflaum, M. (1996) Oxidative DNA-Modifikationen durch langwelliges UV-Licht und sichtbares Licht. Dissertation, Universität Würzburg.
- Pflaum, M., Will, O. und Epe, B. (1997) Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis*, 18:2225-2231.
- Phoa, N. (2002) Einfluss von Stickstoffmonoxid, Hydroxylradikalen und Peroxynitrit auf DNA-Schäden, DNA-Reparatur und Mutationen. Dissertation, Universität Mainz.
- Pirrotta, V. (2003) Puffing with PARP. *Science*, 299:528-529.
- Pleschke, J. M., Kleczkowska, H. E., Strohm, M. und Althaus, F. R. (2000) Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J. Biol. Chem.*, 275:40974-40980.
- Pope, M. A., Porello, S. L. und David, S. S. (2002) *Escherichia coli* apurinic-apyrimidinic endonucleases enhance the turnover of the adenine glycosylase MutY with G:A substrates. *J. Biol. Chem.*, 277:22605-22615.
- Prasad, R., Lavrik, O. I., Kim, S. J., Kedar, P., Yang, X. P., Vande Berg, B. J. und Wilson, S. H. (2001) DNA polymerase beta-mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. *J. Biol. Chem.*, 276:32411-32414.
- Radicella, J. P., Dherin, C., Desmaze, C., Fox, M. S. und Boiteux, S. (1997) Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:8010-8015.
- Realini, C. A. und Althaus, F.R. (1992) Histone shuttling by poly(ADP-ribosylation). *J. Biol. Chem.*, 267:18858-18865.
- Riede, U.-N., Wiestler, O. D. und Müller, H. J. (1995) Autonomes Tumorwachstum (Tumorpathologie). In: Riede, U.-N. und Schaefer, H.-E. (Herausgeber), *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 344-392.

- Robson, C. N. und Hickson, I. D. (1991) 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.*, 19:5519-5523.
- Roldan-Arjona, T., Wei, Y. F., Carter, K. C., Klungland, A., Anselmino, C., Wang, R. P., Augustus, M. und Lindahl, T. (1997) Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:8016-8020.
- Rosenquist, T. A., Zharkov, D. O. und Grollman, A. P. (1997) Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:7429-7434.
- Rothwell, D. G., Barzilay, G., Gorman, M., Morera, S., Freemont, P. und Hickson, I. D. (1997) The structure and functions of the HAP1/Ref-1 protein. *Oncol. Res.*, 9:275-280.
- Rusyn, I., Denissenko, M. F., Wong, V. A., Butterworth, B. E., Cunningham, M. L., Upton, P. B., Thurman, R. G. und Swenberg, J. A. (2000) Expression of base excision repair enzymes in rat and mouse liver is induced by peroxisome proliferators and is dependent upon carcinogenic potency. *Carcinogenesis*, 21:2141-2145.
- Sakumi, K., Tominaga, Y., Furuichi, M., Xu, P., Tsuzuki, T., Sekiguchi, M. und Nakabeppu, Y. (2003) Ogg1 knockout-associated lung tumorigenesis and its suppression by Mth1 gene disruption. *Cancer Res.*, 63:902-925.
- Salditt, M., Braunstein, S. N., Camerini-Otero, R. D. und Franklin, R. M. (1972) Structure and synthesis of a lipid containing bacteriophage. Improved techniques for the purifications of bacteriophage PM2. *Virology*, 48:259-262.
- Sambrook, J., Fritsch, I. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:5463-5467.
- Schaaper, R. M. (1996) Suppressors of *Escherichia coli* mutT: antimutators for DNA replication errors. *Mutat. Res.*, 350:17-23.

- Schreiber, V., Ame, J. C., Dolle, P., Schultz, I., Rinaldi, B., Fraulob, V., Menissier-de Murcia, J. und de Murcia, G. (2002) Poly(ADP-ribose)polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J. Biol. Chem.*, 277:23028-23036.
- Sekiguchi, M. und Tsuzuki, T. (2002) Oxidative nucleotide damage: consequences and prevention. *Oncogene*, 21:8895-8904.
- Selby, C. P. und Sancar, A. (1997) Human transcription-repair coupling factor CSB/ERCC6 is a DNA-stimulated ATPase but is not a helicase and does not disrupt the ternary transcription complex of stalled RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.*, 272:1885-1890.
- Shall, S. und de Murcia, G. (2000) Poly(ADP-ribose)polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat. Res.*, 460:1-15.
- Sies, H. (1986) Biochemie des oxidativen Stress. *Angew. Chem.*, 98:1061-1075.
- Sies, H. (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*, ;215:213-219.
- Simbulan-Rosenthal, C. M., Ly, D. H., Rosenthal, D .S., Konopka, G., Luo, R., Wang, Z. Q., Schultz, P. G. und Smulson, M. E. (2000) Misregulation of gene expression in primary fibroblasts lacking poly(ADP-ribose)polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:11274-11279.
- Sinha, R. P. und Hader, D. P. (2002) UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 4:225-236.
- Sobol, R. W., Horton, J. K., Kühn, R., Gu, H., Singhal, R. K., Prasad, R., Rajewsky, K. und Southorn, P. A. und Powis, G. (1988) Free radicals in medicine. Chemical nature and biological reactions. *Mayo. Clin. Proc.*, 63:381-389.
- Stucki, M., Pascucci, B., Parlanti, E., Fortini, P., Wilson, S. H., Hübscher, U. und Dogliotti, E. (1998) Mammalian base excision repair by DNA polymerases δ and ϵ . *Oncogene*, 17:835-843.
- Sugasawa, K., Shimizu, Y., Iwai, S. und Hanaoka, F. (2002) A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex. *DNA Repair (Amst)* 1:95-107.

- Sunesen, M., Stevnsner, T., Brosh Jr, R. M., Dianov, G. L. und Bohr, V. A. (2002) Global genome repair of 8-oxoG in hamster cells requires a functional CSB gene product. *Oncogene*, 21:3571-3578.
- Suto, M. J., Turner, W. R., Arundel-Suto, C. M., Werbel, L. M. und Sebolt-Leopold, J. S. (1991) Dihydroisoquinolinones: the design and synthesis of a new series of potent inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Anticancer Drug Des.*, 6:107-117.
- Svejstrup, J. Q. (2002) Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3:21-29.
- Takao, M., Aburatani, H., Kobayashi, K. Und Yasui, A. (1998) Mitochondrial targeting of human DNA glycosylase for repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.*, 26:2917-2922.
- Tani, M., Shinmura, K., Kohno, T., Shiroishi, T., Wakana, S., Kim, S. R., Nohmi, T., Kasai, H., Takenoshita, S., Nagamachi, Y. und Yokota, J. (1998) Genomic structure and chromosomal localization of the mouse *ogg1* gene that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in DNA damage. *Mamm. Genome*, 9:32-37.
- Tchou, J. und Grollmann, A. (1993) Repair of DNA containing the oxidatively-damaged base 8-oxoguanine. *Mutat. Res.*, 299:277-287.
- Tebbs, R. S., Flannery, M. L., Meneses, J. J., Hartmann, A., Tucker, J. D., Thompson, L. H., Cleaver, J. E. und Pedersen, R. A. (1999) Requirement for the Xrcc1 DNA base excision repair gene during early mouse development. *Dev. Biol.*, 208:513-529.
- Téoule, R. (1987) Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int. J. Radiat. Biol.*, 51:573-589.
- Thompson, L. H. und West, M. G. (2000) XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mutat. Res.*, 459:1-18.
- Tobwin, H., Staehlin, T. und Gordon, J. (1977) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:4350-4354.
- Tornaletti, S. und Hanawalt, P. C. (1999) Effect of DNA lesions on transcription elongation. *Biochimie*, 81:139-146.

- Tremblay, S., Douki, T., Cadet, J. und Wagner, J. R. (1999) 2'-Deoxycytidine glycols, a missing link in the free radical-mediated oxidation of DNA. *J. Biol. Chem.*, 274:20833-20838.
- Trucco, C., Oliver, F. J., de Murcia, G. und Menissier-de Murcia, J. (1998) DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Nucleic Acids Res.*, 26:2644-2649.
- Tsai-Wu, J. J., Radicella, J. P. und Lu, A. L. (1991) Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* *micA* gene required for A/G-specific mismatch repair: identity of *micA* and *mutY*. *J. Bacteriol.*, 173:1902-1910.
- Tsutakawa, S. E. und Cooper, P. K. (2000) Transcription-coupled repair of oxidative DNA damage in human cells: mechanisms and consequences. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 65:201-215.
- Tudek, B., Boiteux, S. und Laval, J. (1992) Biological properties of imidazole ring-opened N7-methylguanine in M13mp18 phage DNA. *Nucleic Acids Res.*, 20:3079-3084.
- Tuo, J., Chen, C., Zeng, X., Christiansen, M. und Bohr, V. A. (2002) Functional crosstalk between hOgg1 and the helicase domain of Cockayne syndrome group B protein. *DNA Repair (Amst.)*, 1:913-927.
- Tuo, J., Muftuoglu, M., Chen, C., Jaruga, P., Selzer, R. R., Brosh, R. M. Jr., Rodriguez, H., Dizdaroglu, M. und Bohr, V. A. (2001) The Cockayne Syndrome group B gene product is involved in general genome base excision repair of 8-hydroxyguanine in DNA. *J. Biol. Chem.*, 276:45772-45779.
- Ura, K. und Hayes, J. J. (2002) Nucleotide excision repair and chromatin remodeling. *Eur. J. Biochem.*, 269:2288-2293.
- van den Boom, V., Jaspers, N. G. J. und Vermeulen, W. (2002) When machines get stuck-obstructed RNA polymerase II: displacement, degradation or suicide. *BioEssays*, 24:780-784.
- Vaughan, P., Lindahl, T. und Sedgwick, B. (1993) Induction of adaptive response of *Escherichia coli* to alkylation damage by the environmental mutagen methyl chloride. *Mutat. Res.*, 293:249-257.

- Venema, J., Mullenders, L. H., Natarajan, A. T., van Zeeland, A. A. and Mayne, L. V. (1990) The genetic defect in Cockayne syndrome is associated with a defect in repair of UV-induced DNA damage in transcriptionally active DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4707-4711.
- Vidal, A. E., Boiteux, S., Hickson, I. D. und Radicella, J. P. (2001b) XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *EMBO*, 22:6530-6539.
- Vidal, A. E., Hickson, I. D., Boiteux, S. und Radicella, J. P. (2001a) Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: bypass of the AP lyase activity step. *Nucleic Acids Res.*, 29:1285-1292.
- Vispé, S., Yung, T. M., Ritchot, J., Serizawa, H. und Satoh, M. S. (2000) A cellular defense pathway regulating transcription through poly(ADP-ribosyl)ation in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:9886-9891.
- Vodenicharov, M. D., Sallmann, F. R., Satoh, M. S. and Poirier, G. G. (2000) Base excision repair is efficient in cells lacking poly(ADP-ribose)polymerase 1. *Nucleic Acids Res.*, 28:3887-3896.
- von Sonntag, C. (1987) *The chemical basis of radiation biology*. Taylor & Francis, London.
- Wallace, S. S. (2002) Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radi. Biol. Med.*, 33:1-14.
- Weinberg, R. A. (1996) The molecular basis of carcinogenesis: understanding the cell cycle clock. *Cytokines Mol. Ther.*, 2:105-110.
- Whitehouse, C. J., Taylor, R. M., Thistlethwaite, A., Zhang, H., Karimi-Busheri, F., Lasko, D. D., Weinfeld, M. und Caldecott, K. W. (2001) XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell*, 104:107-117.
- Wieler, S., Gagne, J. P., Vaziri, H., Poirier, G. G. und Benchimol, S. J. (2003) Poly(ADP-ribose)polymerase-1 is a positive regulator of the p53-mediated G1 arrest response following ionizing radiation. *J. Biol. Chem.*, 278:18914-18921.

- Wikman, H., Risch, A., Klimek, F., Schmezer, P., Spiegelhalder, B., Dienemann, H., Kayser, K., Schulz, V., Drings, P. und Bartsch, H. (2000) hOGG1 polymorphism and loss of heterozygosity (LOH): significance for lung cancer susceptibility in a caucasian population. *Int. J. Cancer*, 88:932-937.
- Will, O. (1995) Untersuchung zellulärer DNA-Schäden induziert durch Ro 19-8022 in Gegenwart von Licht und deren Charakterisierung mit Hilfe von Reparaturenukleasen. Diplomarbeit an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Will, O. (1999) Steady-State Level oxidativer DNA-Modifikationen in Säugerzellen und ihre Beeinflussbarkeit. Dissertation, Universität Mainz.
- Will, O., Mahler, H. C., Arrigo, A. P. und Epe, B. (1999) Influence of glutathione levels and heat-shock on the steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 20:333-337.
- Wilson, III, D. M., Engelward, B. P. und Samson, L. (1998) in DNA damage and repair Vol. 1: DNA repair in prokaryotes and eukaryotes (Nickoloff, J. A. und Hoekstra, M. F., Herausgeber), 29-64, Human Press, Totowa, NJ.
- Wilson, S. H. (1996) Requirement of mammalian DNA polymerase β in base excision repair. *Nature*, 379:183-186.
- Winkler, G. S., Sugasawa, K., Eker, A. P., de Laat, W. L. und Hoeijmakers, J. H. (2001) Novel functional interactions between nucleotide excision DNA repair proteins influencing the enzymatic activities of TFIIH, XPG, and ERCC1-XPF. *Biochemistry*, 40:160-165.
- Wiseman, H. und Halliwell, B. (1996) Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.*, 313:17-29.
- Wiseman, H., Kaur, H. und Halliwell, B. (1995) DNA damage and cancer: measurement and mechanism. *Cancer Lett.*, 93:113-120.
- Witkin, E. M. (1976) Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.*, 40:869-907.

-
- Wood, R. D. (1999) DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells. *Biochimie*, 81:39-44.
- Wood, R. D., Mitchell, M., Sgouros, J. und Lindahl, T. (2001) Human DNA repair genes. *Science*, 291:1284-1289.
- Xanthoudakis, S., Miao, G., Wang, F., Pan, Y. C. und Curran, T. (1992) Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme. *EMBO J.*, 11:3323-3335.
- 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. und Isaacs, W. B. (2002) Associations between hOGG1 sequence variants and prostate cancer susceptibility. *Cancer Res.*, 62:2253-2257.
- Yasuda, S. und Sekiguchi, M. (1976) Further purification and characterization of T4 endonuclease V. *Biochim. Biophys. Acta*, 442:197-207.
- Yu, S. L., Lee, S. K., Johnson, R. E., Prakash, L. und Prakash, S. (2003) The stalling of transcription at abasic sites is highly mutagenic. *Mol. Cell. Biol.*, 1:382-388.
- Yu, Z., Chen, J., Ford, B. N., Brackley, M. E. und Glickman, B. W. (1999) Human DNA repair systems: an overview. *Environ. Mol. Mutagenesis*, 33:3-20.
- Zhang, Z., Yang, X.-Y. und Cohen, D. M. (1999) Urea-associated oxidative stress and Gadd153/CHOP induction. *Renal Physiology*, 276:786-793.
- Ziegler, M. und Oei, S. L. (2001) A cellular survival switch: poly(ADP-ribosylation) stimulates DNA repair and silences transcription. *Bioessays*, 23:543-548.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

Publikationen:

C. Flohr, A. Bürkle, J. P. Radicella, B. Epe (2003) Poly(ADP-ribosyl)ation accelerates DNA repair in a pathway dependent on Cockayne syndrome B protein. *Nucleic Acids Res.*, 31:5332-5337.

Poster bzw. Fachvorträge:

C. Flohr, E. Weidt, J. Decker, B. Epe (September 2001) Influence of *VHL* expression on DNA repair. 31. Tagung der EEMS in Gent, Belgien. *European Journal of Genetic and Molecular Toxicology*.

C. Flohr, E. Weidt, E. Lausch, H.-J. Decker, B. Epe (März 2002) Influence of *VHL* expression on DNA repair. 43. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie in Mainz. *Archives of Pharmacology*, 365 Supplement 1, 554.

C. Flohr, A. Bürkle, B. Epe (September 2002) Influence of poly(ADP-ribosyl)ation on the repair of oxidative DNA damage. 32. Tagung der EEMS in Warschau, Polen. *European Journal of Genetic and Molecular Toxicology*.

C. Flohr, A. Bürkle, B. Epe (September 2002) *Trans*-dominant inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation slows down both base excision and nucleotide excision repair. 7. Symposium des DNA-Reparaturnetzwerks in Karlsruhe.

C. Flohr, A. Bürkle, J. P. Radicella, B. Epe (März 2003) Poly(ADP-ribosyl)ation accelerates the repair of various types of DNA modifications. 44. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie in Mainz. *Archives of Pharmacology*, 367 Supplement 1, 573.

C. Flohr, I. Schulz, A. Bürkle, P. Radicella, B. Epe (Mai 2003) Efficient DNA repair requires poly(ADP-ribosyl)ation together with a functional Csb protein. International Workshop "Biological Basis of Sensitivity to Ionizing radiation" in Heidelberg.

Erklärung

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

Claudia Flohr

Mainz, im August 2003