

Bedeutung endogener und exogener Quellen reaktiver Sauerstoffspezies für die Entstehung des malignen Melanoms

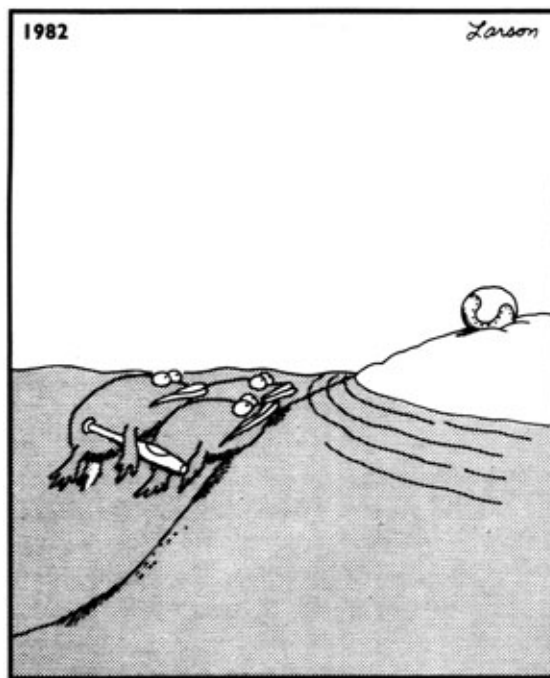
Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

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

vorgelegt von
Simone Hoffmann
geboren in Landau/Pfalz

Mainz, 2003

Unsterblichkeit ist nicht jedermanns Sache.
Kurt Schwitters



Great moments in evolution

(aus: Gary Larson, "The Far Side Gallery")

INHALTSVERZEICHNIS

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
2	EINLEITUNG UND STAND DER FORSCHUNG	3
2.1	MALIGNES MELANOM	3
2.1.1	VORKOMMEN UND BEDEUTUNG DES MALIGNEN MELANOMS	3
2.1.2	MECHANISMEN DER HAUTKREBS-ENTSTEHUNG	4
2.2	ENDOGENE MITOCHONDRIALE ROS-PRODUKTION UND IHRE KONSEQUENZEN	6
2.2.1	DIE MITOCHONDRIALE ATMUNGSKETTE	6
2.2.2	AUSWIRKUNGEN DER MITOCHONDRIALEN ROS-PRODUKTION	8
2.3	EXOGENE INDUKTION VON OXIDATIVEM STRESS DURCH EXPOSITION MIT SONNENLICHT	10
2.3.1	BEREICHE DES SONNENSPEKTRUMS UND IHRE BEDEUTUNG FÜR DIE ENTSTEHUNG DES MALIGNEN MELANOMS	10
2.3.2	MECHANISMUS DER DNA-SCHADENSINDUKTION	12
2.3.3	BEDEUTUNG ENDOGENER PHOTOSENSIBILISATOREN	14
2.3.3.1	Cryptochrome	15
2.3.3.2	Porphyrine	15
2.3.3.3	Melanine	18
2.4	REAKTION REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES MIT ZELLULÄREN MOLEKÜLEN	18
2.4.1	OXIDATIVE MODIFIKATIONEN DER DNA	19
2.4.2	MUTAGENES POTENTIAL OXIDATIVER DNA-MODIFIKATIONEN	20
2.4.2.1	Mutationen der nukleären DNA	20
2.4.2.2	Mutationen der mitochondrialen DNA	21
2.4.3	REAKTION MIT LIPIDEN UND PROTEINEN	21
2.5	REPARATUR VON OXIDATIVEN DNA-MODIFIKATIONEN IN ZELLEN	22
2.5.1	BASENEXZISIONSREPARATUR	23
2.5.2	ERKENNUNG OXIDATIVER DNA-MODIFIKATIONEN DURCH OGG1	25
2.5.3	REPARATUR VON 7,8-DIHYDRO-8-OXOGUANIN IN MITOCHONDRIEN	26
3	ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	28
4	MATERIAL UND METHODEN	30
4.1	MATERIAL	30
4.1.1	GERÄTE	30
4.1.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	32
4.1.3	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	33

4.1.4	PROTEINE (MARKER, ENZYME, ANTIKÖRPER)	35
4.1.5	OLIGONUKLEOTIDE	36
4.1.6	VERWENDETE ZELLINIEN	37
4.1.7	HERGESTELLTE LÖSUNGEN UND PUFFER	38
4.1.7.1	Zellkultur	38
4.1.7.2	Schädigung der Zellen	39
4.1.7.3	Herstellung von Zellpellets und Zellextrakten	39
4.1.7.4	Glutathion-Depletion	39
4.1.7.5	Protoporphyrin IX-Gehalt	40
4.1.7.6	Glutathion-Gehalt	40
4.1.7.7	Fluorimetrische Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies	40
4.1.7.8	Alkalische Elution	41
4.1.7.9	Cleavage-Assay	42
4.1.7.10	Western-Blot	43
4.1.7.11	Mikrokerntest	45
4.2	METHODEN	45
4.2.1	PFLEGE DER ZELLEN	45
4.2.1.1	Allgemeine Zellpflege	45
4.2.1.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	46
4.2.2	SCHÄDIGUNG DER ZELLEN	47
4.2.2.1	Bestrahlung mit sichtbarem Licht	47
4.2.2.2	Bestrahlung mit sichtbarem Licht durch einen Kantenfilter	47
4.2.2.3	Bestrahlung mit sichtbarem Licht und Ro 19-8022	48
4.2.2.4	Bestrahlung mit den OptoMed-Lampen (gepulstes und kontinuierliches Licht)	48
4.2.2.5	Inkubation mit mitochondrialen Giften	49
4.2.2.6	Inkubation mit tert.-Butylhydroperoxid	50
4.2.3	HERSTELLUNG VON ZELLELLETS	50
4.2.4	HERSTELLUNG VON ZELLEXTRAKTEN	50
4.2.5	DEPLETION VON GLUTATHION	51
4.2.6	FLUORIMETRISCHE BESTIMMUNG REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES	51
4.2.7	MESSUNG DES ZELLULÄREN PROTOPORPHYRIN IX-GEHALTES	52
4.2.8	ENZYMATISCHE QUANTIFIZIERUNG DES GLUTATHION-GEHALTES	52
4.2.9	ALKALISCHEN ELUTION	53
4.2.10	REPARATUR VON DNA-MODIFIKATIONEN	57
4.2.11	BESTIMMUNG DER 8-OXOG-GLYKOSYLASEAKTIVITÄT MITTELS <i>CLEAVAGE-ASSAY</i>	58
4.2.12	<i>WESTERN-BLOT</i> MIT OGG1-ANTI-KÖRPER	60
4.2.13	QUANTIFIZIERUNG VON MIKROKERNEN	61
4.2.14	STATISTISCHE AUSWERTUNG	63

5	ERGEBNISSE	64
5.1	SUSZEPTIBILITÄT VON MELANOMZELLEN GEGENÜBER DER INDUKTION OXIDATIVER DNA-MODIFIKATIONEN	64
5.1.1	HINTERGRUNDSPIEGEL OXIDATIVER DNA-MODIFIKATIONEN	64
5.1.2	SUSZEPTIBILITÄT VON MELANOMZELLEN GEGENÜBER SICHTBAREM LICHT	68
5.1.3	REPARATUR OXIDATIVER DNA-SCHÄDEN	69
5.1.3.1	Reparaturkapazität von Zellen mit signifikant verschiedenen Spiegeln oxidativer DNA-Modifikationen	70
5.1.3.2	Reparaturkapazität von Melanomzellen und Hautfibroblasten	71
5.2	AUSWIRKUNG ENDOGENER MITOCHONDRIALER ROS AUF DIE ANZAHL OXIDATIVER DNA-MODIFIKATIONEN	77
5.2.1	HEMMUNG DER PRODUKTION REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES IN MITOCHONDRIEN	77
5.2.2	STIMULATION DER MITOCHONDRIALEN ROS-PRODUKTION	84
5.3	EXOGENE INDUKTION VON OXIDATIVEN DNA-MODIFIKATIONEN DURCH SICHTBARES LICHT	91
5.3.1	IDENTIFIKATION VON ZELLULÄREN MOLEKÜLEN ALS PHOTOSENSIBILISATOREN	91
5.3.1.1	Protoporphyrin IX	91
5.3.1.2	Cryptochrome	94
5.3.2	DAUERBESTRAHLUNG	96
5.3.3	MEHRFACHBESTRAHLUNG UNTER REGENERIERUNG DER ENDOGENEN PHOTOSENSIBILISATOREN	97
5.3.3.1	Bestrahlung im Abstand von zwölf Stunden	97
5.3.3.2	Bestrahlung im Abstand von zwei Stunden	99
5.3.4	INDUKTION VON DNA-MODIFIKATIONEN DURCH GEPULSTES LICHT (400-500 NM)	102
5.3.5	SUSZEPTIBILITÄT VON MELANOMZELLEN GEGENÜBER DER INDUKTION VON MIKROKERNEN	104
5.3.5.1	Mikrokern in Melanomzellen und Hautfibroblasten nach Mehrfachbestrahlung mit sichtbarem Licht	104
5.3.5.2	DNA-Modifikationen und Mikrokern nach Bestrahlung durch einen Kantenfilter	106
5.3.5.3	Mikrokern durch Einzelstrangbrüche	108
6	DISKUSSION	111
6.1	SUSZEPTIBILITÄT DER HAUTZELLEN VON MELANOMPATIENTEN GEGENÜBER DER INDUKTION OXIDATIVER DNA-MODIFIKATIONEN	111
6.2	INTERINDIVIDUELLE SCHWANKUNGEN DES HINTERGRUNDSPIEGELS OXIDATIVER DNA-MODIFIKATIONEN IN GESUNDEN HAUTFIBROBLASTEN	114
6.3	EINFLUSS DER MITOCHONDRIALEN ROS-PRODUKTION AUF DIE ANZAHL OXIDATIVER DNA-MODIFIKATIONEN IM ZELLKERN	115
6.4	CHARAKTERISIERUNG ENDOGENER PHOTOSENSIBILISATOREN	121

6.5	GENTOXIZITÄT VON SICHTBAREM LICHT	123
7	LITERATURVERZEICHNIS	127

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-ALA	5-Aminolaevulinsäure
AP-Läsion	Apurinische/apyrimidinische Stelle der DNA
ATP	Adenosintriphosphat
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSO	Buthioninsulfoximin
tBuOOH	tert.-Butylhydroperoxid
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
CM-H ₂ DCFDA	5-(und-6-)-chloromethyl-2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat
CO ₂	Kohlendioxid
CPD	Cyclobutan-Pyrimidindimer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fapy	Formamidopyrimidin
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
FCCP	Carbonylcyanid-p-(Trifluoromethoxy)phenylhydrazon
FCS	Fetales Kälberserum
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GSH	Glutathion
HE (Hydroethidin)	2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl-9,10-Dihydrophenanthridin
k.o.	<i>knockout</i>
M	molar
MK	Mikrokern
MnSOD	Mangan-abhängige Superoxiddismutase
n	Anzahl der Versuche
NAO	Nonylacridinorange
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NOX	NADPH-Oxidasen
8-oxoG (8-Hydroxyguanin)	7,8-Dihydro-8-oxoguanin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PDT	Photodynamische Therapie

PPIX	Protoporphyrin IX
Ro 19-8022	[R]-1-[(10-chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl)-carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol]
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssb	<i>single strand break</i> (Einzelstrangbruch)
T4 Endo V	T4 Endonuklease V
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
UV	ultraviolettes Licht
VIS	<i>visible light</i> (sichtbares Licht)
wt	Wildtyp

1 ZUSAMMENFASSUNG

Der Entstehungsmechanismus des malignen Melanoms, der am häufigsten tödlich verlaufenden Hautkrebserkrankung, konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden. Im Gegensatz zu anderen Hauttumoren scheinen durch UV-B-Strahlung induzierte DNA-Modifikationen wie Cyclobutan-Pyrimidindimere für die Entstehung des malignen Melanoms keine Bedeutung zu besitzen. Dagegen gibt es Hinweise darauf, dass Melanomzellen erhöhtem oxidativem Stress ausgesetzt sind, der ursächlich am Kanzerogeneseprozess beteiligt gewesen sein könnte. Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung oxidativer DNA-Modifikationen für die Entstehung des malignen Melanoms zu untersuchen.

Die bedeutendste exogene Quelle reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) für Hautzellen ist die wiederholte Exposition mit Licht. Deshalb wurde überprüft, ob sich primäre Melanomzellen und Hautfibroblasten von drei an malignem Melanom erkrankten Patienten hinsichtlich der Bildung und Reparatur Licht-induzierter oxidativer DNA-Modifikationen unterscheiden. Dabei wurde die Anzahl dieser DNA-Schäden in der Alkalischen Elution unter Verwendung von Fpg-Enzym quantifiziert. Während die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen und die durch einmalige Bestrahlung mit einer Halogenlampe (1000 W, 675 kJ/m² zwischen 400-800 nm) induzierten oxidativen DNA-Schäden in allen Zellen gleich hoch waren, reagierten M8,99-Melanomzellen auf chronische Bestrahlung sensitiver mit der Bildung oxidativer DNA-Schäden als F8,99-Fibroblasten des gleichen Spenders. In einer anderen Melanomzelle (M2/02) war ein klarer Reparaturdefekt oxidativer DNA-Modifikationen zu beobachten: M2/02-Zellen benötigten die vierfache Zeit verglichen mit den Hautfibroblasten desselben Patienten, um den Licht-induzierten DNA-Schaden auf die Hälfte zu reduzieren. Auch die Aktivität von Ogg1-Protein, das die Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen beim Menschen einleitet, war in M2/02-Zellen am geringsten. Diese Ergebnisse weisen auf einen Zusammenhang zwischen der Suszeptibilität von Zellen gegenüber oxidativer DNA-Schädigung und der Entwicklung eines malignen Melanoms hin.

Um das gentoxische Potential einer Mehrfachbestrahlung abzuschätzen, wurden primäre M8,99-Melanomzellen viermal im Abstand von zwei Stunden bestrahlt (Halogenlampe, 1000 W; je 450 kJ/m² zwischen 400-800 nm). Eine Sättigung oxidativer DNA-Schäden, wie sie bei der chronischen Bestrahlung auftrat, konnte durch dieses Protokoll umgangen werden. Eine Adaptation der Reparatur im Sinne einer verbesserten Beseitigung der oxidativen DNA-Schäden war nicht vorhanden. Als empfindlicher Indikator für mutagene Folgen der oxidativen Schädigung wurde sodann die Bildung von Mikrokernen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die

Licht-induzierte oxidative DNA-Schädigung mit einer signifikanten Generierung von Mikrokernen bei der Teilung der Melanomzellen verbunden ist. Indem bei den Mehrfachbestrahlungen zusätzlich durch einen Kantenfilter (durchlässig für Licht > 395 nm) bestrahlt wurde, konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass ein Teil der Mikrokernkerne in Melanomzellen oberhalb einer Wellenlänge von 395 nm induziert wird. Dies ist ein klarer Nachweis für eine genotoxische Wirkung von sichtbarem Licht über eine DNA-Modifikation hinaus in Säugerzellen. Durch nähere Untersuchungen ging hervor, dass die Mikrokerninduktion oberhalb von 395 nm mechanistisch wahrscheinlich auf Einzelstrangbrüche und oxidative DNA-Modifikationen zurückzuführen ist.

Als weitere Quelle reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) könnte die endogene Induktion oxidativer DNA-Modifikationen für die Entstehung des malignen Melanoms relevant sein, insbesondere, da diese Tumorart häufig auch an nicht-exponierten Stellen auftritt. Die mitochondriale Atmungskette ist die Hauptquelle endogen induzierter ROS. Bislang konnte aber nicht gezeigt werden, ob in den Mitochondrien gebildete ROS dazu in der Lage sind, im Zellkern oxidative DNA-Modifikationen zu induzieren und so zum Kanzerogeneseprozess beizutragen. Um dies zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen in HeLa Wildtyp- und HeLa $\rho 0$ -Zellen untersucht. HeLa $\rho 0$ -Zellen besitzen keine mitochondriale DNA und können daher keine ROS über die Atmungskette produzieren. Trotzdem zeigten diese Zellen keinen verringerten Spiegel oxidativer DNA-Modifikationen im Zellkern. Weiterhin wurde die mitochondriale ROS-Produktion in HeLa Wildtyp-Zellen durch Inkubation mit mitochondrialen Giften gesteigert, auch dies zeigte keine Auswirkung auf die Anzahl oxidativer DNA-Modifikationen im Zellkern. Insgesamt konnte also gezeigt werden, dass mitochondriale ROS nicht zur Induktion oxidativer DNA-Modifikationen im Zellkern und damit auf diesem Weg nicht zur Entstehung des malignen Melanoms beitragen.

2 EINLEITUNG UND STAND DER FORSCHUNG

2.1 Malignes Melanom

2.1.1 Vorkommen und Bedeutung des malignen Melanoms

Das maligne Melanom, das auch als „schwarzer Hautkrebs“ bezeichnet wird, nimmt auf der Liste der zwanzig häufigsten Krebstodesfälle bei Männern den 17. und bei Frauen den 18. Platz ein (Abbildung 1). Damit ist das maligne Melanom die am häufigsten tödlich verlaufende Hautkrebserkrankung.

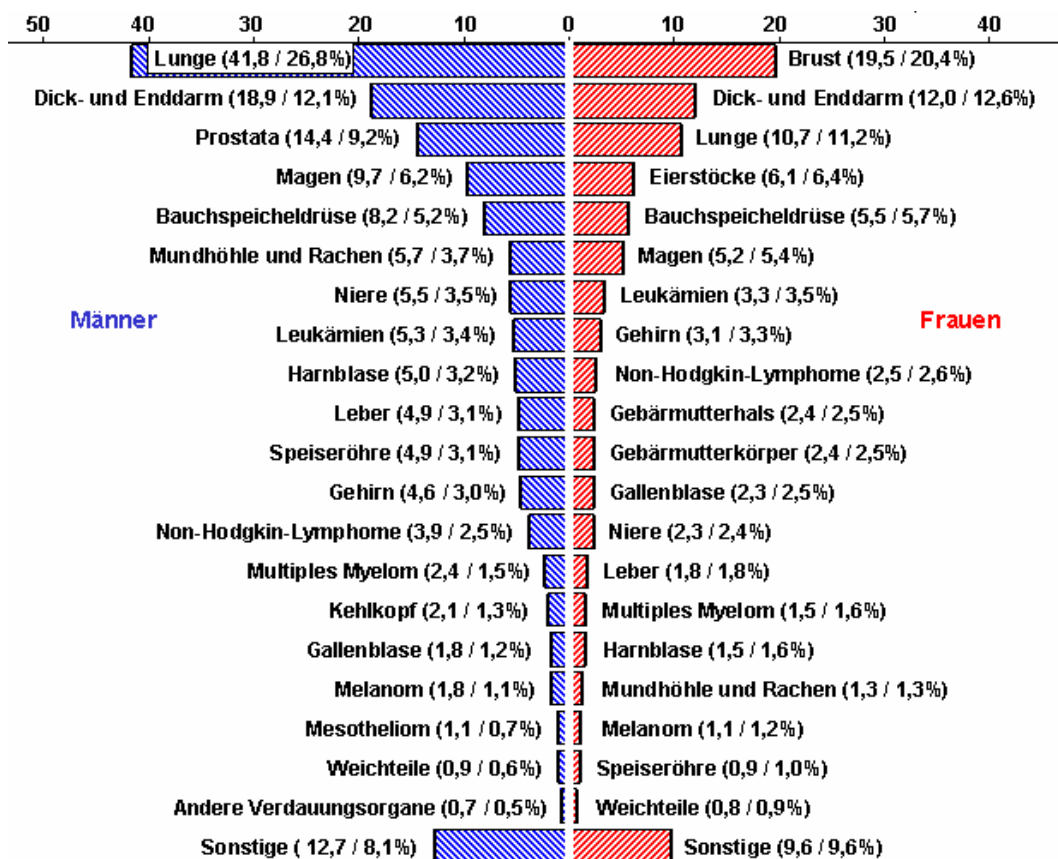


Abbildung 1: Die zwanzig häufigsten Krebstodesursachen im Jahr 2000 bei Männern (linker Ast) und Frauen (rechter Ast). Die Skalierung zeigt eine altersstandardisierte Mortalitätsrate pro 100 000 (aus (Becker, 2000)).

Außer dem malignen Melanom gibt es zwei weitere bedeutende, bösartige Hautveränderungen: das Basalzellkarzinom und das Plattenepithelzellkarzinom. Im Vergleich der drei Hautkrebsarten (Tabelle 1) fällt auf, dass das maligne Melanom wesentlich häufiger Metastasen bildet. Das Auftreten zahlreicher Metastasen ist für die bereits erwähnte hohe Sterblichkeit verantwortlich. Weiterhin ist bemerkenswert,

dass das maligne Melanom als einzige Hautkrebsart häufig bei relativ jungen Menschen und auch an wenig exponierten Körperstellen auftritt.

Table 1: Vergleich von malignem Melanom, Basalzellkarzinom, Plattenepithelzellkarzinom (Daten aus (Heller, 2001; Beckmann, 2003)).

	Malignes Melanom	Basalzellkarzinom	Plattenepithelzellkarzinom
Durchschnittsalter des Patienten beim Auftreten der Erkrankung	3.-4. Lebensjahrzehnt	6.-7. Lebensjahrzehnt	6.-7. Lebensjahrzehnt
Neuerkrankungen in der BRD (pro Jahr und 100.000 Einwohner)	8-10, steigende Inzidenz	60-90, steigende Inzidenz	10-30, steigende Inzidenz
Letalität	20 %	Äußerst niedrig	Niedrig
Metastasenbildung	20-30 %	Keine Metastasen	Invasiv wachsender, lokal destruierender Tumor, ab bestimmter Größe Metastasenbildung
Betroffene Körperstellen	Häufig an weniger exponierten Körperstellen	Bereiche chronisch lichtgeschädigter Haut	Bereiche chronisch lichtgeschädigter Haut

Während der Entstehungsmechanismus für das Basalzell- und Plattenepithelzellkarzinom durch zahlreiche Studien bereits hinreichend geklärt ist, besteht für das maligne Melanom noch großer Forschungsbedarf. Die zunehmende Inzidenz dieses Krebses und die hohe Letalität unterstreichen die Bedeutsamkeit der Mechanismusaufklärung.

2.1.2 Mechanismen der Hautkrebs-Entstehung

In diesem Kapitel sollen die bisher bekannten Fakten zur Hautkrebsentstehung bei Basalzell- und Plattenepithelzellkarzinom bzw. malignem Melanom dargelegt und offene Fragen aufgezeigt werden.

Der Verlauf der Tumorentstehung allgemein wird nach heutigem Kenntnisstand als Mehrstufenprozess angesehen, an dessen Anfang DNA-Modifikationen auftreten, die durch DNA-schädigende Agentien (Strahlung, reaktive Verbindungen, Retroviren) verursacht werden. Die DNA-Modifikationen können sich nach zwei Zellteilungen zu Mutationen manifestieren. Der Prozess der Kanzerogenese findet prinzipiell über

mehrere Jahre oder sogar Jahrzehnte statt, dabei sammeln sich weitere Mutationen an. Nur selten sind Einwirkungen DNA-schädigender Agentien mit einem spezifischen Mutationsmuster verknüpft, sodass ein Rückschluss auf die Ursache der Tumorentstehung möglich ist.

Beim Basalzell- und Plattenepithelzellkarzinom ist dies der Fall: Hier gelang es, die Krebsentstehung auf eine Bestrahlung mit kurzwelligem UV-Licht zurückzuführen. Dieses induziert bestimmte DNA-Modifikationen, nämlich Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD) und 6→4-Photoprodukte. Aus den CPD entstehen im weiteren Verlauf des Tumorigeneseprozesses typische C→T- bzw. CC→TT-Tandem-Mutationen, die in Basalzell- bzw. Plattenepithelzellkarzinomen von Mäusen bereits nachgewiesen wurden (Brash, 1991; Ziegler, 1993). Außerdem wurde für beide Tumorarten eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen UV-Exposition und Hautkrebsentstehung gefunden. Für Melanome ist dies epidemiologisch nicht nachweisbar. Experimentell induzierte eine wiederholte Bestrahlung von Mäusen mit UV-B und/oder UV-A zwar Papillome und Basalzellkarzinome, aber keine malignen Melanome (Pathak, 1991). Eine Untersuchung der Mutationen im *p53*-Tumorsuppressorgen der drei Hauttumorarten ergab signifikant verschiedene Typen von Mutationsmustern bei malignen Melanomen verglichen mit Basalzell-/Plattenepithelzellkarzinomen (Giglia-Mari, 2003). Diese Befunde unterstreichen den Verdacht, dass bei der Entstehung des malignen Melanoms und dem Basalzell- bzw. Plattenepithelzellkarzinom unterschiedliche DNA-Schädigungen zugrunde liegen.

Da Cyclobutan-Pyrimidindimere offensichtlich nicht an der Bildung eines malignen Melanoms beteiligt sind, stellt sich die Frage, auf welche DNA-Modifikationen dieser Hautkrebs ursächlich zurückzuführen ist. Es gibt Hinweise darauf, dass oxidative DNA-Modifikationen, die ebenfalls promutagene DNA-Modifikationen sind, bei der Melanomentwicklung eine Rolle spielen könnten. Neuere Arbeiten zeigen zum Beispiel, dass Melanomzellen im Vergleich zu gesunden Melanozyten eine gestörte Redox-Regulation besitzen (Meyskens, 2001b; Meyskens, 2001a; Sander, 2003). *Sander et al.* berichten, dass die antioxidative Kapazität der Melanomzellen im Vergleich zum umliegenden Gewebe sowie zum Basalzell- bzw. Plattenepithelzellkarzinom wesentlich erhöht ist (Sander, 2003). Gleichzeitig wurde von dieser Arbeitsgruppe signifikant mehr Protein-gebundener Malondialdehyd, ein Indikator für die Lipidperoxidation, in Melanomzellen gefunden. All diese Befunde sprechen dafür, dass Melanomzellen erhöhtem oxidativem Stress ausgesetzt sind, der ursächlich am Kanzerogeneseprozess beteiligt gewesen sein könnte. Bisher wurde jedoch nicht gezeigt, dass dieser oxidative Stress in Melanomzellen auch zu einem erhöhten Spiegel oxidativer DNA-Basenmodifikationen und weiteren gentoxischen Konsequenzen, wie beispielsweise der Mikrokernentstehung, führt.

Weiterhin herrscht Unklarheit darüber, worin die Ursache des oxidativen Stresses in Melanomzellen besteht. Oxidativer Stress einer Zelle wird durch so genannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) hervorgerufen. Für die Entstehung dieser ROS kommen zum einen endogene, körpereigene Prozesse in Betracht. In erster Linie ist hier die mitochondriale Atmungskette als Hauptproduzent reaktiver Sauerstoffspezies zu nennen. Zum anderen können exogene Ursachen zu einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen. Hier dürfte für Hautzellen vor allem die Bestrahlung mit Sonnenlicht bedeutend sein. Beide Einflussfaktoren auf oxidativen Stress in Melanomzellen (endogene und exogene ROS-Produktion) sollen in den folgenden Kapiteln näher erläutert werden.

2.2 Endogene mitochondriale ROS-Produktion und ihre Konsequenzen

Die beim malignen Melanom betroffenen Körperstellen sind häufig wenig gegenüber Sonnenlicht exponiert gewesen (Heller, 2001). Dieser Befund weist darauf hin, dass die Entstehung des malignen Melanoms eher auf endogene als auf exogene ROS zurückzuführen sein könnte. Wie im vorigen Kapitel (2.1.2) bereits angesprochen, entsteht ein Großteil der endogen in der Zelle gebildeten ROS in den Mitochondrien. In der mitochondrialen Atmungskette werden 90 % des von der Zelle konsumierten Sauerstoffs umgesetzt. Es konnte bereits gezeigt werden, dass etwa 1-5 % des Sauerstoffs, der für die Energiegewinnung in den Mitochondrien genutzt wird, unter normalen physiologischen Bedingungen zum Superoxidradikal ($O_2^{\bullet-}$) reduziert wird. Die prozentuale Entstehungsrate kann unter krankhaft abweichenden Bedingungen erhöht sein (Lee, 2001; Bhaskar S., 2002).

Es besteht noch Unklarheit darüber, inwiefern der mitochondriale oxidative Stress zu einer Erhöhung der Anzahl oxidativer DNA-Modifikationen im Zellkern und zur Tumorentstehung beiträgt. In den folgenden Unterkapiteln soll dargelegt werden, wie die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in den Mitochondrien zustande kommt und welche bereits bekannten toxischen Auswirkungen sie für die Zelle mit sich bringt.

2.2.1 Die mitochondriale Atmungskette

In eukaryotischen Zellen spielen die Mitochondrien eine entscheidende Rolle bei der Generierung von Energie, die aus dem Abbau von Kohlenhydraten und Fettsäuren gewonnen wird. Aus einem Molekül Glukose ergeben sich in den ersten Schritten des Abbaus, bei Glykolyse und Citratzyklus, vier Moleküle des Energieäquivalents

Der mitochondriale Multienzym-Komplex der Atmungskette besteht aus etwa 80 Untereinheiten. Die Information für die meisten Einheiten ist in der nukleären DNA vorhanden, nur 13 Protein-Untereinheiten sind durch die mitochondriale DNA (mtDNA) kodiert. Weiterhin enthält die mitochondriale DNA die Information für zwei ribosomale RNA's und 22 Transfer-RNA's. Insgesamt besteht die humane Mitochondrien-DNA aus 16500 Basenpaaren, ihre Sequenz ist seit 1981 bekannt (Anderson and Drouin, 1981) (Abbildung 3). Jedes Mitochondrium besitzt 2-10 Kopien von mtDNA-Molekülen, in jeder Zelle wiederum befinden sich mehrere Hunderte oder sogar Tausende Mitochondrien (Lee, 2001).

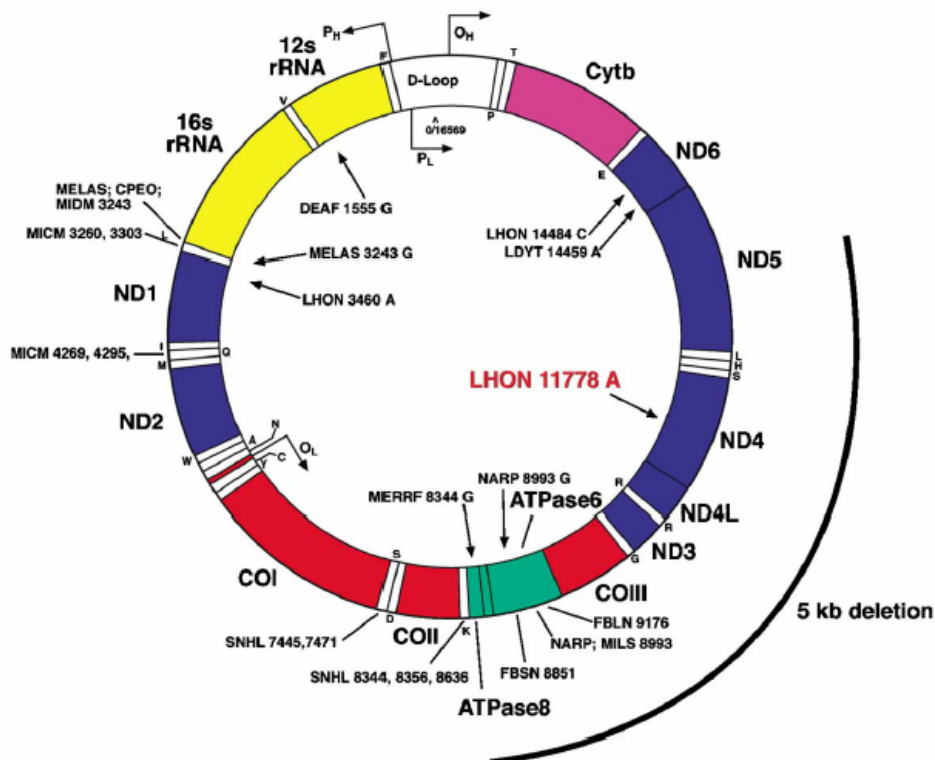


Abbildung 3: Das menschliche mitochondriale Genom (aus (Mandavilli, 2002)). Die 5 kb-Deletion wird auch als „common deletion“ bezeichnet, sie ist die häufigste Mutation der mtDNA (Berneburg, 1999).

2.2.2 Auswirkungen der mitochondrialen ROS-Produktion

Primär werden durch die während der mitochondrialen Atmungskette gebildeten, kurzlebigen Sauerstoffradikale Strukturen innerhalb der Mitochondrien geschädigt. Dazu gehören auch die Enzyme der Atmungskette, deren Schädigung langfristig zu einer Abnahme der zellulären Energieproduktion führt. Als weitere Konsequenz einer fehlerhaften Atmungskette produzieren die geschädigten Mitochondrien vermehrt

Sauerstoffradikale (Perl, 2003). Diese attackieren wiederum mitochondriale Strukturen, wobei sich der Teufelskreis zwischen ROS-Produktion und Schädigung schließt (Abbildung 4).

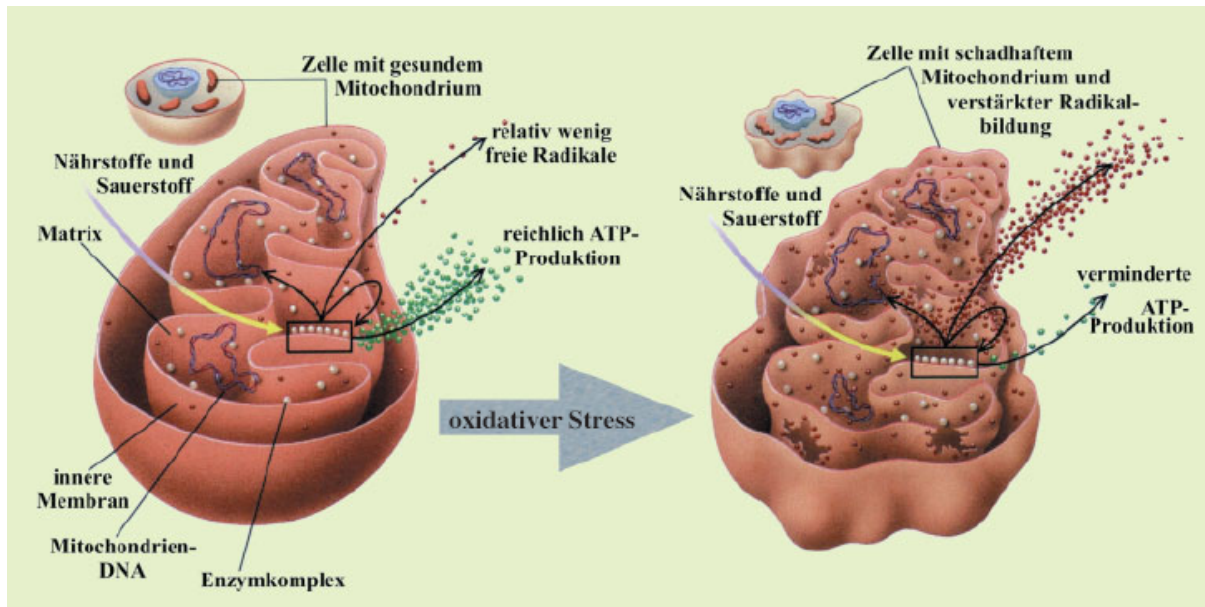


Abbildung 4: Auswirkungen von oxidativem Stress auf mitochondriale Strukturen (Perl, 2003).

Wie in Abbildung 4 gezeigt, gelangen mit zunehmendem Integritätsverlust der Mitochondrien auch mehr reaktive Sauerstoffspezies ins Zytoplasma, wo sie mit anderen Zellbestandteilen abreagieren. Mitochondrien neigen dazu, Cluster um den Zellkern zu bilden, möglicherweise um dessen Energieversorgung zu gewährleisten (Dzeja, 2002). Aus defekten Mitochondrien heraustretende reaktive Sauerstoffspezies könnten daher leicht durch die Kernmembran zur DNA diffundieren und mit dieser reagieren. Für diese Hypothese spricht weiterhin, dass jede Zelle einen Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen besitzt, der höher ist als die basalen Spiegel anderer DNA-Modifikationen und offensichtlich auf die endogene ROS-Produktion zurückzuführen ist (Collins, 1993; Kasai, 1997; Pflaum, 1997; Helbeck, 1998). Die Mitochondrien als wichtigste endogene Produzenten reaktiver Sauerstoffspezies könnten für diesen Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen hauptverantwortlich sein. Sollte erhöhter endogener oxidativer Stress zur Bildung des malignen Melanoms beitragen, würde man erwarten, dass Melanomzellen einen höheren Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen besitzen als gesunde Zellen aus dem gleichen Individuum.

Für die Bildung des malignen Melanoms könnten endogene Prozesse von Bedeutung sein, da das maligne Melanom (wie bereits in Kapitel 2.1.1 erwähnt) im

Gegensatz zu anderen Hautkrebsarten häufig auch auf nicht-exponiertem Gewebe entsteht und die Entstehung dieses Hautkrebses offenbar mit einer Störung des endogenen Redox-Haushaltes einhergeht. Bisher konnte jedoch weder bewiesen werden, dass reaktive Sauerstoffspezies aus den Mitochondrien im Zellkern zu oxidativen DNA-Modifikationen führen, noch dass dadurch die Entstehung von Melanomen und anderen Krebsarten begünstigt wird.

2.3 Exogene Induktion von oxidativem Stress durch Exposition mit Sonnenlicht

Außer der endogenen Produktion reaktiver Sauerstoffspezies kommen auch exogene Quellen der ROS für die Induktion eines malignen Melanoms infrage. Obwohl Melanome häufig auf nicht-exponiertem Gewebe auftreten, stuft das Internationale Krebsforschungszentrum (IARC) Sonnenstrahlung als exogene Ursache von malignen Melanomen der Haut ein (IARC, 1992). Ein Befund, der diese Annahme stützt, ist die Korrelation zwischen exzessivem Sonnenbaden und der Entstehung des malignen Melanoms. Dabei korreliert das Risiko, am malignen Melanom zu erkranken, offenbar weniger mit der lebenslangen kumulativen Dosis, sondern vielmehr mit einer großen Zahl von Expositionsschüben, wie sie beispielsweise bei exzessivem Sonnenbaden für wenige Wochen pro Jahr im Urlaub auftreten (Elwood, 1994). Ein weiterer Risikofaktor ist auch die Anzahl an Pigmentflecken (Naevi) (Koh, 1991). Diese Zusammenhänge sprechen für eine Induktion von Melanomen durch den exogenen Faktor Sonnenlicht.

In den folgenden Unterkapiteln sollen der bisherige Kenntnisstand zum Mechanismus der Induktion reaktiver Sauerstoffspezies durch Sonnenlicht und daraus resultierende genotoxische Konsequenzen für die Zelle näher dargelegt werden.

2.3.1 Bereiche des Sonnenspektrums und ihre Bedeutung für die Entstehung des malignen Melanoms

Zunächst sollen die unterschiedlichen Wellenlängenbereiche des Sonnenspektrums beschrieben und die dadurch induzierten DNA-Modifikationen zugeordnet werden. Das auf der Erde ankommende Sonnenlicht besteht aus verschiedenen Wellenlängenanteilen, die wie folgt unterteilt werden können (Abbildung 5):

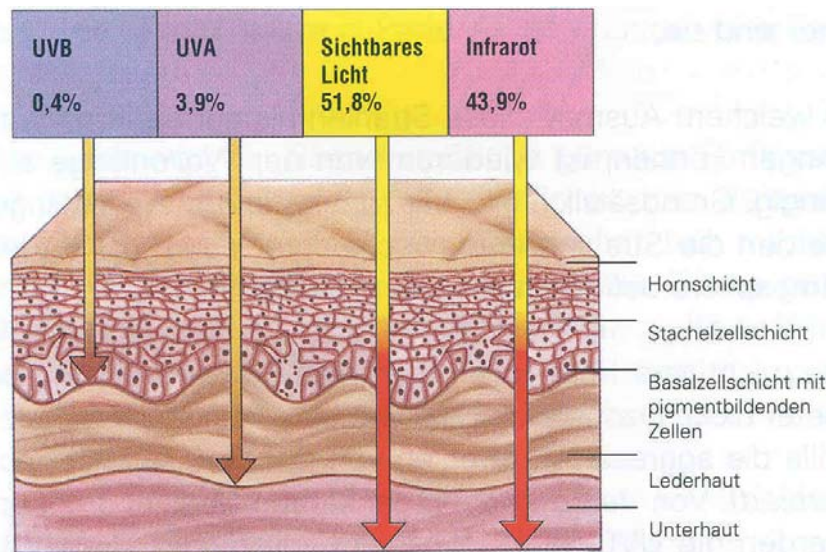


Abbildung 5: Die Anteile des Sonnenspektrums und ihre Eindringtiefe in menschliche Haut (Beckmann, 2003).

Der größte Anteil des Sonnenspektrums macht mit 51,8 % das sichtbare Licht (380-780 nm) aus, an zweiter Stelle folgt die Infrarot-Strahlung (780-1400 nm) mit 43,9 %. Einen vergleichsweise geringen Anteil haben UV-A-Licht (3,9 %; 315-380 nm) und die UV-B-Strahlen (0,4 %; 280-315 nm). Sonnenlicht unterschiedlicher Wellenlänge dringt verschieden tief in die Haut ein und wird von unterschiedlichen Zellbestandteilen absorbiert. Die Eindringtiefe ist dabei umso größer, je längerwelliger die Strahlung ist (Heller, 2001; Beckmann, 2003).

Welche Zielzellen durch Sonnenlicht erreicht und geschädigt werden, hängt daher von der Wellenlänge der Strahlen ab. In Abbildung 5 ist erkennbar, dass UV-B-Strahlung, die (wie bereits in Kapitel 2.1.2 erwähnt) in erster Linie Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD) und 6→4-Photoprodukte in der DNA induziert, kaum bis zur Schicht mit den pigmentierten Zellen (Melanozyten) vordringt. Es ist daher nicht überraschend, dass in bisherigen wissenschaftlichen Studien kein Zusammenhang zwischen UV-B-Strahlung und dem malignen Melanom nachgewiesen werden konnte. Dagegen dringen UV-A-Strahlen und sichtbares Licht, die beide oxidative DNA-Modifikationen erzeugen, sogar in noch tiefer gelegene Hautschichten vor. Eine für die Entwicklung eines malignen Melanoms bedeutsame Induktion von oxidativen DNA-Modifikationen in pigmentierten Melanozyten durch UV-A- und sichtbares Licht ist daher realistisch.

Die Frage, welcher Wellenlängenbereich für die Induktion des malignen Melanoms verantwortlich sein könnte, wurde bereits Anfang der Neunziger Jahre von *Setlow et al.* (Setlow, 1993) im *Xiphophorus*-Fischmodell untersucht. Das Spektrum der Melanomentstehung auf der Fischhaut stimmte ebenfalls nicht mit dem für die Induktion UV-B-induzierter Cyclobutan-Pyrimidin- bzw. Thymidindimere überein

(Abbildung 6). Dieser Befund stützt die Annahme, dass UV-B-Strahlung nicht für die Bildung des malignen Melanoms von Bedeutung ist.

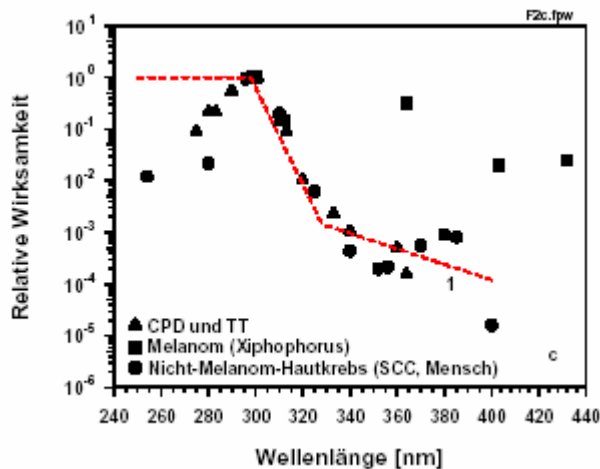


Abbildung 6: Relative Wirksamkeit von Strahlung verschiedener Wellenlänge für die Entstehung von Cyclobutanpyrimidindimeren (CPD)/Thymidin-Dimeren (TT, ▲), Melanomkrebs (■) und Plattenepithelzellkarzinom (squamous cell carcinoma, = SCC, ●) (Heller, 2001).

Die Untersuchungen am Fischmodell zeigten weiterhin, dass 90-95 % der Sonnenlicht-induzierten Melanome durch Wellenlängen > 320 nm bis hin zum sichtbaren Bereich (400-800 nm) des Spektrums ausgelöst werden könnten (Setlow, 1993). Diese Befunde sind allerdings nur bedingt auf den Menschen übertragbar, da *Xiphophorus*-Fische sehr viel empfindlicher mit der Bildung von malignen Melanomen reagieren. Ein weiterer Nachteil des Testsystems ist die relativ hohe spontane Melanomfrequenz bei unbehandelten Tieren.

2.3.2 Mechanismus der DNA-Schadensinduktion

Über welchen Mechanismus der sichtbare Anteil des Sonnenlichts oxidative DNA-Modifikationen in Zellen induziert, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Während UV-B-Licht der Wellenlänge von 260 nm direkt von der DNA absorbiert wird und diese in einen angeregten Zustand versetzen kann, ist zur Schädigung der DNA mit sichtbarem Licht die Anwesenheit eines zellulären Photosensibilisator nötig, der Licht dieser Wellenlänge absorbiert und die Energie auf andere Moleküle (Sauerstoff, DNA) überträgt. Bei den Photosensibilisator-vermittelten Reaktionen unterscheidet man, ob sie zu einer direkten oder indirekten Modifikation der DNA führen.

Im Fall der so genannten Typ I-Reaktion reagiert ein angeregtes Photosensibilisator-Molekül direkt mit der DNA, ohne dass weitere Zwischenprodukte entstehen. Dabei kann es zur kovalenten Bindung des Photosensibilisators an die DNA, zur

Energieübertragung oder zum Elektronentransfer kommen (Abbildung 7). Die angeregte DNA (DNA^{*}) beziehungsweise das positiv geladene DNA-Radikal (DNA^{•+}) kann anschließend weiter abreagieren (Epe, 1998).

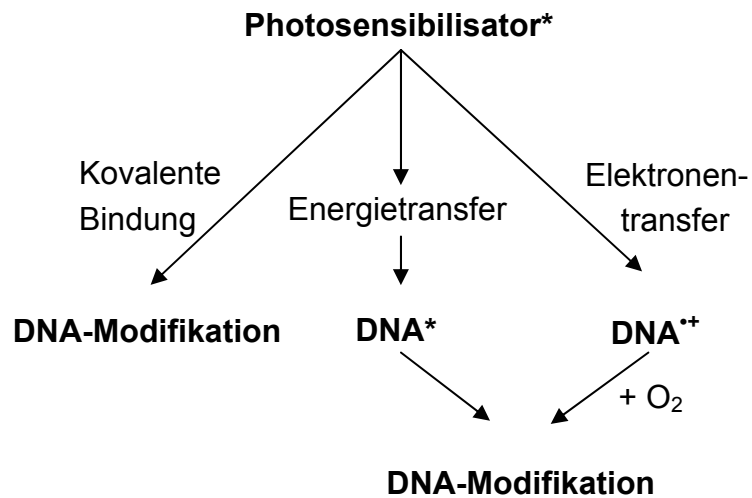


Abbildung 7: Typ I-Reaktion der Induktion von DNA-Modifikationen durch Photosensibilisatoren (nach (Epe, 1998)).

Unter den indirekt verlaufenden Reaktionen zwischen einem Photosensibilisator und einem DNA-Molekül unterscheidet man zwischen Mechanismen mit Sauerstoff-Beteiligung (so genannte Typ II-Reaktionen) und anderen indirekten Reaktionen. Die möglichen Reaktionsabläufe sind in Abbildung 8 gezeigt.

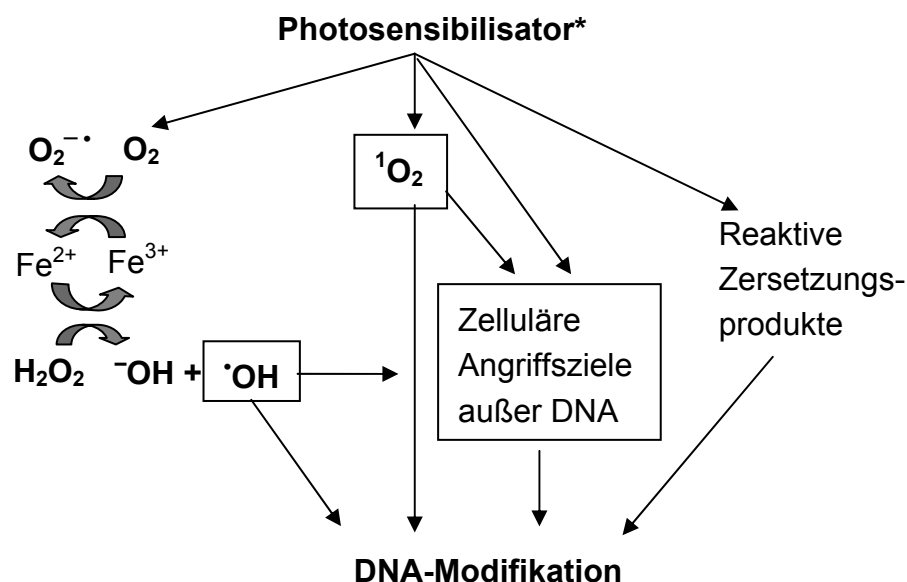


Abbildung 8: Indirekte Mechanismen zur Induktion von DNA-Modifikationen (modifiziert nach (Epe, 1998)).

Eine indirekte Typ II-Reaktion kann über Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) oder das Superoxidradikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$) verlaufen. In Anwesenheit von Übergangsmetallen findet die so genannte Fenton-Reaktion statt, bei der ein hochreaktives Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$) entsteht. Weitere indirekte Mechanismen verlaufen über die Schädigung anderer zellulärer Komponenten. So führt die Lipidperoxidation zu reaktiven Zwischenprodukten wie beispielsweise Thiyl-, Peroxyl- und Alkylradikalen (zusammengefasst von (Epe, 1998)).

Welche dieser Reaktionen abläuft, hängt auch davon ab, welche Komponenten im System zur Verfügung stehen. In zellulärer Umgebung sind die Reaktionen von Photosensibilisatoren vielfältiger als in zellfreien Systemen. Während dort die DNA nur direkt oder über Singulett-Sauerstoff geschädigt werden kann, ist in Zellen zusätzlich die Bildung von Hydroxyl-Radikalen über die Fenton-Reaktion denkbar, da Übergangsmetalle zur Katalyse zur Verfügung stehen (Abbildung 8, links) (Epe, 1995). Bei der Bestrahlung von Zellen mit sichtbarem Licht zeigt das DNA-Schadensprofil eine wesentlich höhere Anzahl oxidativer DNA-Modifikationen (gemessen als Fpg-sensitive Läsionen) als Exonuklease III-sensitive AP-Läsionen, 5,6-Dihydropyrimidine (gemessen mittels Endonuklease III) oder Einzelstrangbrüche (Pflaum, 1996). Dieser Befund deutet darauf hin, dass der zelluläre DNA-Schaden durch sichtbares Licht nicht durch Hydroxylradikale oder über die Aktivierung zellulärer Endonuklease induziert wird, sondern vielmehr ein Resultat der direkten Reaktion der DNA mit angeregten Photosensibilisatoren darstellt (Epe, 1995).

2.3.3 Bedeutung endogener Photosensibilisatoren

Neben der Aufklärung des Schädigungsmechanismus besteht auch Bedarf, den Einfluss der Photosensibilisatoren näher zu charakterisieren, die an der Schadensvermittlung durch sichtbares Licht beteiligt sind. Selbst ohne Zugabe von photosensibilisierenden Fremdstoffen (z.B. bestimmte Antibiotika und Antirheumatika sowie Cumarine (Heller, 2001)) werden nämlich durch sichtbares Licht in Zellen oxidative DNA-Modifikationen erzeugt. Dieser Befund zeigt, dass in physiologisch gesunden Zellen ein oder mehrere chromophore Verbindungen existieren, die als Photosensibilisatoren wirken können. Der bzw. die endogenen Photosensibilisatoren, die an der Induktion von oxidativen DNA-Schäden durch sichtbarem Licht verantwortlich sind, konnten bisher noch nicht identifiziert werden. In einer früheren Publikation unseres Arbeitskreises wurde bereits beschrieben, dass die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Sonnenlicht ein relatives Maximum im blauviolettten Bereich zwischen 400-450 nm besitzt (Kielbassa, 1997). Eine Eigenschaft der gesuchten zellulären Chromophore muss demnach sein, dass sie Licht dieser Wellenlänge absorbieren. Zelluläre Moleküle, auf die diese Voraussetzung prinzipiell zutrifft und die daher für die Schadensvermittlung verantwortlich

sein könnten, sind Melanine, Porphyrine und Cryptochrome. Diese drei Substanzklassen sollen im folgenden näher beschrieben werden.

2.3.3.1 Cryptochrome

Cryptochrome sind in der Natur weit verbreitet und in vielen Bakterien, Pflanzen, Tieren und auch beim Menschen (Cry1 und Cry2) zu finden. Sie besitzen eine strukturelle Ähnlichkeit zur Familie der Photolyasen, die in vielen niederen Organismen für die Reparatur von Cyclobutan-Pyrimidindimeren verantwortlich sind. In Säugerzellen haben Cryptochrome als zirkadianische Photorezeptoren die Funktion, den Tag-Nacht-Rhythmus aufrechtzuerhalten (Van der Horst, 1999; Sancar, 2003). Der Mechanismus der Photorezeptor-Wirkung ist bisher ungeklärt, möglicherweise handelt es sich um einen photoinduzierten Elektronentransfer. Hinweise auf eine photochemische Reaktion mit Beteiligung von Cryptochromen gibt es bisher allerdings nicht (Sancar, 2003). Da Cryptochrome als Transkriptionsfaktoren (unter anderem als negative transkriptionale Regulatoren ihrer eigenen Gene) agieren, sind sie auch innerhalb des Zellkerns zu finden (Sancar, 2003) und könnten daher absorbierte Lichtenergie direkt auf die DNA übertragen.

2.3.3.2 Porphyrine

Endogen gebildete Porphyrine sind seit Jahren als Photosensibilisatoren bekannt, da Stoffwechselstörungen des Porphyrin-Haushalts (so genannte Porphyrien) in der Regel mit einer Lichtdermatose einhergehen (Hildebrandt, 1998). Bei der erythropoetischen Protoporphyrinopathie fehlt Patienten das Enzym Ferrochelatase, das sich in der inneren Mitochondrienmembran befindet und die Bildung von Häm aus Protoporphyrin IX (PPIX) katalysiert. Als Folge kommt es zu einer Akkumulation von Protoporphyrin IX im Gewebe, die bei Bestrahlung mit Licht zwischen 380-560 nm zur Phototoxizität führt. Die Gabe von Antioxidantien wie Cystein dämpft die phototoxischen Effekte ein und verlängern den symptomfreien Aufenthalt bei Licht (Mathews-Roth, 2002).

Weiterhin nutzt man die photosensibilisierende Eigenschaft der Porphyrine für den Einsatz in der photodynamischen Therapie (PDT). Besonders das Hämatoporphyrin („Photofrin II“) wurde bisher intensiv erforscht und zu Therapie Zwecken verwendet (Elstner, 1990). Der Wirkmechanismus verläuft unter der Beteiligung von Superoxidradikalen (Athar M., 1988). Auch die Applikation von 5-Aminolaevulinäure (5-ALA), des Ausgangsmoleküls für die Häm-Synthese, führt in Zellen zur Akkumulation des als Photosensibilisators wirkenden Protoporphyrins IX und bietet daher eine gute Voraussetzung für die Anwendung im Rahmen der photodynamischen Therapie (Kennedy, 1992). In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass eine

Induktion der Protoporphyrin-Synthese durch 5-ALA in Zellen den Porphyringehalt und die Anzahl oxidativer DNA-Schäden (gemessen als Fpg-sensitive DNA-Modifikationen) nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht ansteigen lässt (Pflaum, 1996). Ein Teil der Häm-Synthese über 5-ALA und Protoporphyrin IX findet dabei in den Mitochondrien statt (siehe Abbildung 9). In nicht-erythroiden Zellen ist der erste Schritt der Häm-Synthese durch Aminolaevulinsäure-Synthase 1 katalysiert. Diese Reaktion ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt (Ponka, 1999). Eine Schädigung der Mitochondrien geht daher oft mit einer Störung der Häm-Biosynthese einher. Dabei reicht es offenbar aus, das Membranpotential durch mitochondriale Gifte wie CCCP, Antimycin A oder Oligomycin aufzuheben. In diesem Fall findet kein Eisentransport statt, es können keine Porphyrine mehr synthetisiert werden (Lange, 1999). Nach *Gattermann* (Gattermann, 1999) verläuft der Transport von Eisen in die mitochondriale Matrix und die dabei stattfindende Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} über Komplex IV. Zur vollständigen Synthese des Häms ist demnach das Vorhandensein eines intakten Komplexes IV Voraussetzung. Auch eine Inhibierung der mitochondrialen Proteinsynthese durch das Antibiotikum Chloramphenicol führt zum Fehlen von Untereinheiten der Atmungskette und daher zur Störung der Häm-Synthese. Dabei treten verschiedene hämatotoxischer Krankheitsbilder auf, die wohl letztendlich auf den gestörten Eisen-Haushalt der Mitochondrien zurückzuführen sind (Vetsch, 1979; Leiter, 1999). Mutationen oder Deletionen der mitochondrialen DNA (mtDNA) sind ebenfalls mit einer Störung der Häm-Biosynthese und dem Auftreten einer sideroblastischen Anämie beim Menschen verbunden (Gattermann, 1999). Ein Beispiel dafür liefert das Pearson-Syndrom, das durch große Deletionen der mitochondrialen DNA verursacht wird (Rötig, 1989; Rötig, 1991).

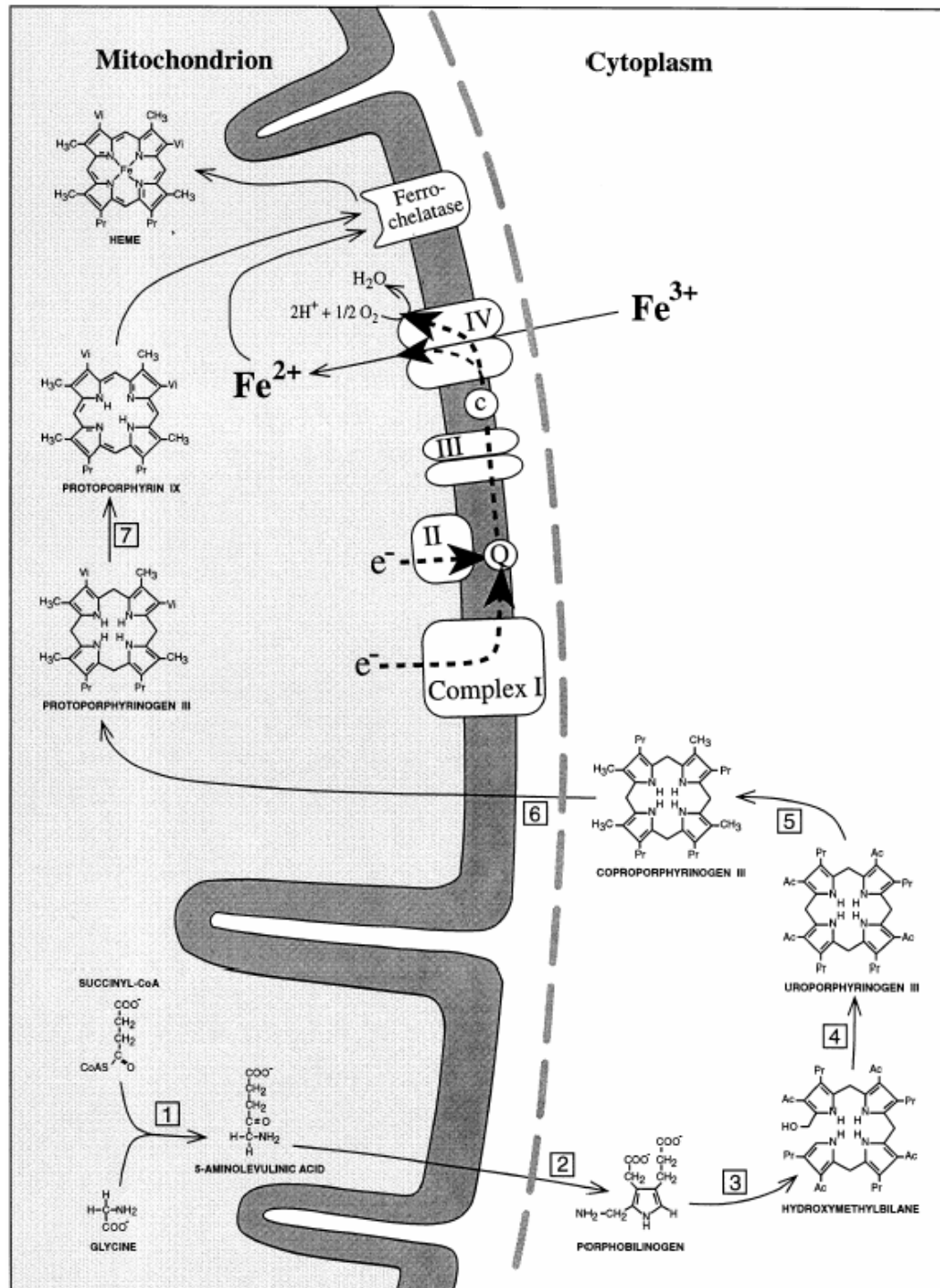


Abbildung 9: Biosynthese von Häm in Mitochondrien und Cytosol (Gattermann, 1999; Ponka, 1999).

1: Aminolävulinäure-Synthetase, 2: Aminolävulinäure-Dehydratase, 3: Porphobilinogen-Deaminase, 4: Uroporphyrinogen III-Synthetase, 5: Uroporphyrinogen III-Decarboxylase, 6: Coporphorinogen III-Oxidase, 7: Protoporphyrinogen III-Oxidase. Komplex I: NADH-Dehydrogenase, Komplex II: Succinat-Dehydrogenase, Komplex III: b/c1-Komplex, Ubichinol-Cytochrom C-Reduktase, Komplex IV: Cytochrom C-Oxidase. Q: Coenzym Q, Ubichinon; C: Cytochrom C.

Es bisher nicht nur bekannt, dass sich durch den Eingriff in die mitochondriale Funktion auch die Porphyrinsynthese beeinflussen lässt, darüber hinaus wurde auch

eine Veränderung der Sensitivität gegenüber Licht beobachtet. Eine Inhibierung der mitochondrialen Energieproduktion führt bei der photodynamischen Therapie mit Gabe von 5-Aminolaevulinsäure (5-ALA) zu erhöhten Überlebensraten der bestrahlten Zellen verglichen mit nicht-inhibierten bestrahlten Zellen (Shevchuk, 1996). Offenbar entstehen durch die reduzierte Anzahl an Porphyrinen weniger oxidative Zellschäden, die toxische Wirkung bleibt aus.

Mitochondrien können an der Entstehung des malignen Melanoms daher nicht nur über die bereits in Kapitel 2.2 erwähnte endogene ROS-Produktion beteiligt sein. Durch ihre tragende Rolle bei der Porphyrinsynthese kann die mitochondriale Integrität und Funktion auch für die exogene Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch sichtbares Licht (unter Vermittlung der Porphyrine) eine Rolle spielen.

2.3.3.3 *Melanine*

Die Rolle der Melanine bei der Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies und daraus resultierender oxidativer DNA-Modifikationen ist umstritten. In der Literatur wird sowohl von prooxidativen, als auch von antioxidativen Einflüssen berichtet (zusammengefasst von (Meyskens, 2001b; Meyskens, 2001a)).

Isolierte Melanine besitzen eine antioxidative Aktivität ähnlich der Superoxid-dismutase und katalysieren die Disproportionierung von Superoxid in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Die Hefe *E. dermatitidis* nutzt die antioxidativen Eigenschaften dieser Moleküle, um sich gegen den *oxidative burst* des Wirtsorganismus erfolgreich zu schützen (Meyskens, 2001a).

Während der Polymerisation der Melanine in der Zelle werden reaktive Sauerstoffspezies generiert, insbesondere bei der Eumelanin-Synthese. Eine weitere prooxidative Disposition der Melanine beruht auf ihrer Eigenschaft, Metallionen aufzunehmen, die wiederum ROS-generierende Prozesse katalysieren können (Meyskens, 2001a). Für die prooxidative Wirkung des Melanins und eine Beteiligung bei der Entstehung des malignen Melanoms spricht ebenfalls (wie zu Beginn von Kapitel 2.3 bereits erwähnt), dass Menschen mit zahlreichen Naevi statistisch häufiger an Melanomkrebs erkranken (Heller, 2001).

2.4 **Reaktion reaktiver Sauerstoffspezies mit zellulären Molekülen**

Endogen und exogen gebildete reaktive Sauerstoffspezies können in Zellen mit verschiedenen Molekülen abreagieren, darunter mit nukleärer oder mitochondrialer

DNA, mit Lipiden und Proteinen. In diesem Kapitel soll der Kenntnisstand zur Entstehung der unterschiedlichen Produkte dieser Oxidationsprozesse dargelegt werden.

2.4.1 Oxidative Modifikationen der DNA

Da die physiologisch vorkommenden (endogen und exogen induzierten) reaktiven Sauerstoffspezies in Anzahl und Struktur sehr variabel sind und mit der DNA an mehreren Positionen reagieren können, ist die Bildung zahlreicher Reaktionsprodukte und Folgeprodukte möglich. Von diesen sind mehrere Hundert bereits identifiziert, darunter DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche, Basenmodifikationen, apurinische/apyrimidinische Stellen (AP-Läsionen) und Vernetzungen (*cross-links*) zwischen DNA-DNA- oder DNA-Protein-Molekülen (Dizdaroglu, 1992).

Unter den oxidativen Basenmodifikationen der DNA, die durch Reaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies entstehen, ist 8-Hydroxyguanin (7,8-Dihydro-8-oxoguanin; 8-oxoG, Abbildung 10) die wahrscheinlich häufigste. Im Vergleich dazu entsteht z.B. durch Einwirkung von Hydroxylradikalen auf die DNA erheblich weniger 8-Hydroxyadenin. Diese Basenmodifikation scheint zudem um mindestens eine Größenordnung weniger mutagen zu sein als 8-oxoG in der gleichen Position eines Vektors (zusammengefasst von (Epe, 1995)).

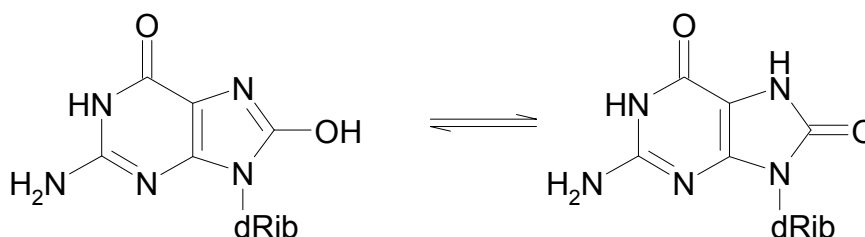


Abbildung 10 : Struktur von 8-Hydroxyguanin.

Wie bereits in Kapitel 2.2.2 beschrieben, besitzt jede Säugerzelle einen Hintergrundspiegel an oxidativen DNA-Modifikationen, der variabel zu sein scheint. Die absoluten Werte für die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen sind umstritten, da unterschiedliche Methoden zu dessen Bestimmung bisher stark abweichende Ergebnisse liefern (Collins, 1997). Die Hintergrundspiegel lassen sich als Gleichgewicht zwischen Induktion und Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen verstehen.

Die Bildung oxidativer DNA-Modifikationen durch reaktive Sauerstoffspezies kann durch Antioxidantien eingedämmt und der Hintergrundspiegel dieser DNA-Schäden

dadurch niedrig gehalten werden. Der Körper selbst verfügt über eine antioxidative Abwehr zum Abfangen von reaktiven Sauerstoffspezies. Zu diesem Abwehrsystem zählen auch Glutathion und Enzyme wie Superoxiddismutase, Katalase und Glutathion-Peroxidase (Sies, 1989). Weitere protektiv wirkende Substanzen werden offenbar mit der Nahrung aufgenommen. Unter diesen Antioxidantien sind die Vitamine C und E, sowie die Gruppe der Carotinoide, einige Mineralstoffe (Zink, Selen, Mangan) und polyphenolische Substanzen wie Flavonoide. Nach Gabe von Vitamin C konnte ein Absinken der Anzahl oxidativer DNA-Modifikationen *in vivo* beobachtet werden (Carr, 1999; Collins, 1999; Halliwell, 2001). Die Schutzwirkung mancher zusätzlich aufgenommener Antioxidantien ist allerdings noch umstritten. Einige epidemiologische Studien zeigten sogar eine Tumor-fördernde Wirkung von β -Carotin bei Rauchern (zusammengefasst von (Diplock, 2000)).

Neben einer geringen Zufuhr reaktiver Sauerstoffspezies kann auch eine funktionierende Reparatur der oxidativen DNA-Modifikationen zu einem gleichbleibend niedrigen Hintergrundspiegel dieser DNA-Schäden im Zellkern beitragen und dadurch das Risiko der Tumorentstehung klein halten. Die Reparaturmechanismen zur Beseitigung oxidativer DNA-Modifikationen werden in Kapitel 2.5 näher erläutert.

2.4.2 Mutagenes Potential oxidativer DNA-Modifikationen

Abhängig vom Entstehungsort reaktiver Sauerstoffspezies können diese sowohl mit der nukleären als auch mit der mitochondrialen DNA abreagieren. Im folgenden sollen die Konsequenzen dieser Reaktionen für beide Ereignisse dargelegt werden.

2.4.2.1 Mutationen der nukleären DNA

Oxidative DNA-Modifikationen im nukleären Genom, die nicht repariert werden, können bei einer Teilung der Zelle zu einer Basen-Fehlpaarung führen. Die Modifikationen können sich über zwei Replikationsschritte zu Mutationen manifestieren. Man weiß, dass unterschiedliche DNA-Basenmodifikationen bestimmte Mutationen hervorrufen, sodass sich aus dem Mutationsmuster auf den ursprünglichen Schaden schließen lässt. im Falle des 8-Hydroxyguanins, das mit Adenin anstelle von Cytosin paart, wurden G:C \rightarrow T:A-Transversionen als mutagene Konsequenz in Säugierzellen beobachtet. Die Mutationsfrequenz betrug dabei für eine einzelne 8-oxoG-Läsion im einzelsträngigen Vektor von Säugierzellen 2,5-4,8 % (zusammengefasst von (Epe, 1995)).

2.4.2.2 Mutationen der mitochondrialen DNA

Durch ihre Nähe zur mitochondrialen Atmungskette, bei deren Prozessen auch reaktive Sauerstoffspezies gebildet werden, ist die mtDNA einem hohem Risiko oxidativer DNA-Schädigung ausgesetzt. Da mitochondriale DNA keine Histone besitzt und daher weniger komprimiert ist, können schädigende Spezies leichter die DNA erreichen. Modifikationen und daraus resultierende Mutationen der mtDNA treffen stets kodierende Sequenzen, da die mtDNA keine Introns besitzt (Richter, 1988; Bohr, 2002).

Diese Unterschiede zwischen mitochondrialer und nukleärer DNA tragen offenbar dazu bei, dass die mtDNA in vielen untersuchten Geweben einen mehrfach höheren Hintergrundspiegel an 8-oxoG aufweist (Hamilton, 2001). Mit zunehmendem Alter scheint sich 8-oxoG im mitochondrialen Genom von Rattenlebern zu akkumulieren (Hudson, 1998). In der nukleären DNA von Ratten- oder Maushepatozyten findet man dagegen keinen alterskorrelierten Anstieg oxidativer DNA-Modifikationen (Hudson, 1998; Osterod, 2001).

Insgesamt scheint mitochondriale DNA also wesentlich stärker von der endogenen oxidativen Schädigung betroffen zu sein als nukleäre DNA. Allerdings erscheinen die Folgen im Fall einer oxidativen Schädigung der nukleären DNA für die Tumorentstehung schwerwiegender: Hier könnte eine Mutation die Transformation zur Krebszelle einleiten. Dagegen führt eine Mutation in der mitochondrialen DNA zunächst höchstens zum Funktionsverlust eines einzigen Mitochondriums, welcher durch die zahlreichen anderen Mitochondrien der Zelle kompensiert werden kann. Eine Ansammlung von Mutationen in Mitochondrien kann aber offenbar zum Alterungsprozess und einer Reihe degenerativer Erkrankungen beitragen. Möglicherweise wird durch mitochondriale Mutationen indirekt auch die Tumorentstehung gefördert, indem die endogene ROS-Produktion (vgl. Kapitel 2.2.2) erhöht wird, was zu oxidativen DNA-Modifikationen im Zellkern führen könnte (Bandy, 1990; Orth, 2001). Der Beweis dafür steht allerdings noch aus.

2.4.3 Reaktion mit Lipiden und Proteinen

Weiterhin können reaktive Sauerstoffspezies mit anderen Proteinen und Lipiden abreagieren und diese dabei in reaktive Verbindungen überführen. Dies kann wiederum eine Reaktion zwischen diesen Molekülen und der DNA zur Folge haben (vgl. Seite 13, Abbildung 8). Dies ist beispielsweise der Fall, wenn als Endprodukt der Lipidperoxidation von Arachidonsäure der Malondialdehyd gebildet wird. Der entstandene Aldehyd kann mit DNA zu Ethenoaddukten reagieren. Derartige DNA-Addukte haben sich als mutagen in Bakterien und Säugerzellen erwiesen, dabei

besitzen sie eine ähnliche Mutationsfrequenz wie 8-Hydroxyguanin. Weiterhin konnte bereits die Karzinogenität des Malondialdehyds für Ratten nachgewiesen werden (zusammengefasst von (Marnett, 2000)).

Reaktive Sauerstoffspezies können auch mit Proteinen reagieren, zum Beispiel sind im Fall des Superoxidanions zahlreiche Reaktionen bekannt. Unter anderem reagiert dieses Radikal mit Häm-Proteinen unter Freisetzung von Eisen, welches wiederum die Hydroxylradikal-Bildung (siehe Kapitel 2.3.2) katalysieren kann (Elstner, 1990). Ein Hauptziel für den Angriff reaktiver Sauerstoffspezies auf Proteine der Mitochondrien scheint die DNA-Polymerase γ zu sein. Die oxidative Modifikation dieses Enzyms geht mit einem Funktionsverlust einher, der sich auf Abnahme der Replikation und Reparatur der mitochondrialen DNA auswirkt (Graziewicz, 2002). Die beschriebenen Reaktionen von ROS mit Proteinen können also indirekt die Entstehung von Tumoren begünstigen.

2.5 Reparatur von oxidativen DNA-Modifikationen in Zellen

Die Entstehung des malignen Melanoms setzt DNA-Schäden voraus, die nicht repariert werden und daher zu Mutationen führen (siehe auch Kapitel 2.1.2). Eine funktionierende Reparatur ist daher essentiell zur Protektion gegen die Tumorentstehung. Umgekehrt kann ein Reparaturdefekt, zum Beispiel bei der Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen, die Entstehung eines Tumors begünstigen, wie in diesem Kapitel dargelegt werden wird.

Man geht davon aus, dass jede Zelle unseres Körpers pro Tag viele Tausend veränderte Basen generiert (Loeb, 2001). Dem gegenüber steht die zelluläre DNA-Reparatur, von der bisher 130 menschliche Reparaturgene bekannt sind. Die Aufgabe der daraus gebildeten DNA-Reparaturproteine ist die Beseitigung der endogen und exogen induzierten Schäden und damit die Aufrechterhaltung der Integrität der DNA (Wood, 2001). Dem Körper stehen prinzipiell mehrere verschiedene Strategien zur DNA-Reparatur zur Verfügung (zusammengefasst von (Wood, 2001)):

- i) die Basenexzisionsreparatur (BER), die definiert veränderte DNA-Basen ausschneidet und ersetzt und auch Einzelstrangbrüche berichtigt,
- ii) die Nukleotidexzisionsreparatur (NER), die großräumige, Helix-deformierende, meist exogen induzierte Addukte repariert,
- iii) die postreplikative *mismatch*-Reparatur (MMR), die fehlgepaarte Basen korrigiert,

- iv) die Reversion von Methyl- und kleinen Alkylgruppen an Position O⁶ des Guanins durch Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) oder ihre Entfernung aus 1-Methyladenin bzw. 3-Methylcystein durch Oxidation mittels Alk B (Aas, 2003),
- v) die Beseitigung von Doppelstrangbrüchen durch Homologe Rekombination (HR) oder durch den *nonhomologous end-joining* (NHEJ)-Reparaturweg, und
- vi) die Transkriptions-gekoppelte Reparatur, die für eine wesentlich schnellere Reparatur des transkribierten Stranges verglichen mit dem nicht-transkribierten Strang verantwortlich und vermutlich überwiegend als Nukleotidexzisionsreparatur tätig ist.

Da die in dieser Arbeit betrachteten oxidativen DNA-Modifikationen überwiegend durch die Basenexzisionsreparatur behoben werden, soll dieser Mechanismus im folgenden näher erläutert werden.

2.5.1 Basenexzisionsreparatur

Die Bedeutung der Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen wird dadurch deutlich, dass allein durch physiologisch notwendige Prozesse gebildete reaktive Sauerstoffspezies bereits eine ernstzunehmende Gefahr für die Integrität des zellulären Genoms ausgeht (Halliwell, 1986; Sies, 1986; Joenje, 1989). Bestimmte Defekte in der spezifischen Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen gehen mit einer bis zu tausendfach erhöhten spontanen Mutationsrate einher (Michaels, 1992). Es wird geschätzt, dass ROS pro Tag und Zelle für die Induktion von zehn- bis zwanzigtausend DNA-schädigenden Ereignissen verantwortlich sind (Jackson, 2001; Loeb, 2001).

Oxidative DNA-Basenmodifikationen werden durch die Basenexzisionsreparatur erkannt und beseitigt. Dieser Reparaturweg ist insbesondere für die Beseitigung von endogenen Läsionen geringer Größe und Masse (*non-bulky lesions*) aus der DNA zuständig. Die Enzyme der BER sorgen auch für die Korrektur von Einzelstrangbrüchen in der DNA. Sämtliche großräumigeren Basenveränderungen, die auch eine deutliche Helix-Deformation bewirken, sowie einige kleinere Läsionen wie Cyclopurine und Pyrimidopurine, werden dagegen durch die Nukleotidexzisionsreparatur erkannt und behoben (Wood, 2001; Gros, 2002). Abbildung 11 zeigt eine Übersicht des Mechanismus der Basenexzisionsreparatur nach heutigem Kenntnisstand. Man unterscheidet zwei Zweige der BER. Wenn ein einzelnes Nukleotid ausgetauscht wird, spricht man vom *Short-patch*-Weg (in Abbildung 11 als „1 nucleotide patch“ bezeichnet). Dagegen werden bei der so genannten *Long-Patch*-Reparatur zwei bis

acht Nukleotide (in Abbildung 11 als „2-8 nucleotide patch“ dargestellt) ausgetauscht (Krokan, 2000; Bernstein, 2002).

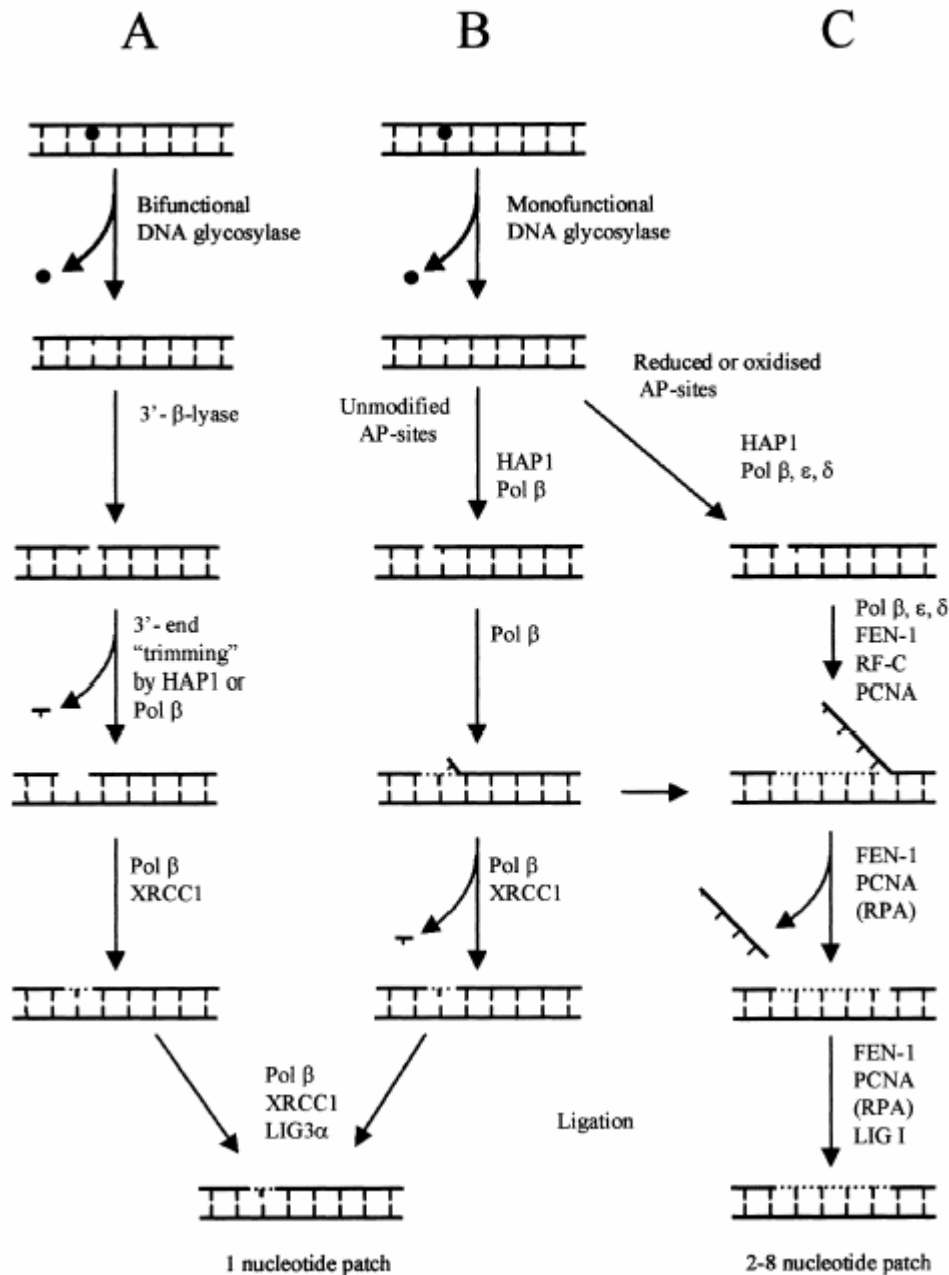


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Mechanismus der Basenexzisionsreparatur beim Menschen (Krokan, 2000).

Beim Einschnitt der N-C1'-glykosidischen Bindung zwischen Base und Desoxyribose durch eine monofunktionale Glykosylase (erster Schritt von Weg B in Abbildung 11) bleibt eine apurinische bzw. apyrimidinische Stelle zurück, die auch als AP-Läsion bezeichnet wird. Diese abasische Stelle wird von dem Enzym AP-Endonuklease (APE1, auch HAP1 genannt) weiter in einen Einzelstrangbruch überführt, wobei eine freie 3'-OH-Gruppe entsteht, die als Substrat für Polymerase β (Pol β) dient (Bohr,

1999; Krokan, 2000; Nilsen, 2001; Demple, 2002). Die nächsten Schritte sind beim *Short-patch*- und *Long-Patch*-Weg verschieden.

Am *Long-patch*-Reparaturweg sind außer der DNA-Glykosylase und APE1 (HAP1) noch die *flap*-Endonuklease (FEN-1), das *Proliferation cell nuclear antigen*-Protein (PCNA), verschiedene DNA-Polymerasen und die DNA-Ligase I involviert. Dieser Weg wird gewählt, wenn am 3'-Ende des durch APE1 induzierten Strangbruchs mehrere Nukleotide (meist sind es zwei) durch eine DNA-Polymerase (z.B. Pol β) hinzugefügt werden. Beim *Short patch*-Weg spielt das XRCC1-Protein eine entscheidende Rolle (Nilsen, 2001; Bohr, 2002).

Bifunktionelle Glykosylasen besitzen neben der Glykosylase-Aktivität auch noch die Fähigkeit, das 3'-Ende der entstandenen abasischen Stelle einzuschneiden (Lyase-Aktivität, Weg A in Abbildung 11).

2.5.2 Erkennung oxidativer DNA-Modifikationen durch Ogg1

Die Basenexzisionsreparatur von 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG), der wichtigsten oxidativen DNA-Modifikation, wird in Hefe, Maus und Mensch durch die Reparaturglykosylase Ogg1 eingeleitet. Dieses Enzym ist eine bifunktionelle Glykosylase, die im ersten Schritt der Basenexzisionsreparatur die oxidierte Base aus dem Genom entfernt (Boiteux, 2000; Bruner, 2000; Krokan, 2000). Im weiteren Verlauf der Reparatur wird meist der *Short-patch*-Weg beschrritten, bei Fehlen von Polymerase β kann die Reparatur jedoch auch über den *Long-patch*-Weg stattfinden (Stucki, 1998). Im folgenden soll das Ogg1-Reparaturenzym näher beschrieben und seine Bedeutung erläutert werden.

Das humane *ogg1*-Gen ist auf Chromosom 3p25 lokalisiert (Boiteux, 2000). Eine Analyse der cDNA von *ogg1* zeigte, dass zwei Ogg1-Proteine parallel produziert werden, nämlich das α -hOgg1 (345 Aminosäuren) und das β -hOgg1 (424 Aminosäuren) (Radicella, 1997). Wie sich in immunhistochemischen Versuchen herausstellte, werden beide Formen zu unterschiedlichen Zielen dirigiert: während die α -Form des Ogg1-Proteins im Kern verbleibt, wird die β -Form in die Mitochondrien transloziert (Takao, 1998). Audebert *et al.* konnten zeigen, dass eine Mutation an Position 12 im *ogg1*-Gen eines Nierentumors keine Auswirkung auf die Aktivität des Genprodukts hat, aber die Lokalisation in die Mitochondrien verhindert (Audebert, 2002).

Ogg1-Protein erkennt verschiedene DNA-Modifikationen, nämlich 8-oxoG, Fapy-G und Methyl-Fapy-G. Die veränderten Basen werden von Ogg1 allerdings nur dann erkannt, wenn sie noch mit Cytosin gepaart sind. Nach einer Verdopplung des Zelle

findet man im Genom 8-oxoG bevorzugt gegenüber Adenin oder Guanin, dieser Fehler wird durch die Enzyme der so genannten *mismatch*-Reparatur behoben (Auffret van der Kemp, 1996).

Zur Überprüfung der Bedeutung von Ogg1 wurden bereits *knockout*-Zellen und -Mäuse generiert. Der Ausfall von Ogg1 führte in Hefen zu einem starken Anstieg der spontanen Mutationsrate, einem so genannten Mutator-Phänotyp (Thomas, 1997). In Vorarbeiten, an denen unsere Arbeitsgruppe beteiligt war, konnte ebenfalls ein erhöhtes Auftreten spontaner Mutationen bei *ogg1-knockout*-Mäusen beobachtet werden, jedoch nur in der Leber und nicht in anderen Organen (Klungland, 1999; Osterod, 2001). Weiterhin wird die Wichtigkeit des Ogg1-Enzyms für den Menschen dadurch deutlich, dass in Tumoren aus Niere und Lunge bereits Mutationen im *ogg1*-Gen gefunden wurden, die möglicherweise ursächlich an der malignen Entartung beteiligt gewesen waren (Chevillard, 1998). In der Bevölkerung existiert ein Ser326Cys-Polymorphismus für das *ogg1*-Gen, der offenbar mit einem erhöhten Lungenkrebsrisiko einhergeht (Sugimura, 1999).

Es wird vermutet, dass für die Reparatur von 8-oxoG bei Abwesenheit von Ogg1 ein *back-up*-Reparaturmechanismus besteht, der unter Mitwirkung von *Cockayne syndrome B* (Csb)-Protein abläuft. Ein Hinweis auf die Beteiligung von Csb ergab sich aus der Messung der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen, der in *ogg1/csb-double-knockout*-Mäusen mit steigendem Alter in murinen Hepatozyten wesentlich stärker ansteigt als in *ogg1-knockout*-Mäusen. Weiterhin reparieren *ogg1/csb-double-knockout*-Mausfibroblasten induzierte oxidative DNA-Schäden kaum oder gar nicht, während in *ogg1-knockout*-Zellen noch eine im Vergleich zu Wildtyp-Zellen verzögerte Reparatur dieser Schäden messbar war (Osterod, 2002).

Zusammenfassend besitzt Ogg1 eine Schlüsselfunktion für die Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen. Das Fehlen dieses Proteins kann zwar durch eine *back-up*-Reparatur teilweise kompensiert werden, dennoch scheint der Ausfall von Ogg1 beim Menschen mit einem erhöhten Tumorrisiko einherzugehen. Für das maligne Melanom wurde bisher nicht untersucht, ob unzureichende Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen, insbesondere Defekte von Ogg1, für der Entstehung dieses Hautkrebses eine Bedeutung besitzen.

2.5.3 Reparatur von 7,8-Dihydro-8-oxoguanin in Mitochondrien

Die Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen scheint in der mitochondrialen DNA schneller abzulaufen als im nukleären Genom (Thorslund, 2002). Ein kompletter Ausfall des *ogg1*-Gens ist offenbar aber in Mitochondrien weniger gut kompensierbar als im Zellkern, wie *Souza-Pinto et al.* (Souza-Pinto, 2001a) zeigen konnten.

Untersuchte mitochondriale Extrakte aus der Leber von *ogg1*-knockout-Mäusen wiesen einen neunfach erhöhten Spiegel an 7,8-Dihydro-8-oxoguanin auf als vergleichbare Extrakte von Wildtyp-Mäusen. Der 8-oxoG-Gehalt der Kern-DNA war im Vergleich zum Wildtyp nur um das Doppelte erhöht. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist eine fehlende *backup*-Reparatur in Mitochondrien im Gegensatz zum Zellkern.

Mit zunehmendem Alter nimmt der Reparaturkapazität bezüglich 8-oxoG in nukleärer DNA aus Mauslebern leicht ab, in Mausmitochondrien jedoch zu (Souza-Pinto, 2001b). Möglicherweise ist diese altersabhängige Zunahme der Reparaturaktivität eine zelluläre Antwort auf den Anstieg oxidativer DNA-Schäden in der mtDNA (Bohr, 1999).

Nach der Erkennung und Entfernung der oxidativ modifizierten DNA-Base durch Ogg1 wird die entstehende abasische Stelle der DNA in Mitochondrien durch mitochondriale AP-Endonuklease, DNA-Polymerase γ und mitochondriale DNA-Ligase repariert (Croteau, 1999). Dies entspricht dem *Short-Patch*-Weg der Basenexzisionsreparatur, wie er auch in Kern-DNA vorkommt (siehe auch Kapitel 2.5.1). *Long-Patch*- und Transkriptions-gekoppelte Reparatur ist in Mitochondrien bisher nicht bekannt. Es gibt bisher ebenfalls keine Hinweise darauf, dass Nukleotidexzisionsreparatur in Mitochondrien stattfindet (Bohr, 2002).

Wie bereits in Kapitel 2.4.2.2 dargelegt, könnten oxidative DNA-Modifikationen der mitochondrialen DNA und daraus entstehende Mutationen indirekt zur Tumorentstehung beitragen, da sie eine erhöhte ROS-Produktion der Zelle bewirken und dadurch Mutationen der Kern-DNA begünstigen könnten. Daher kommt auch der Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen in den Mitochondrien für die Tumorigenese eine gewisse Bedeutung zu. Auf das maligne Melanom bezogen besteht noch Forschungsbedarf, ob diese Art von Reparaturdefekt für die Entstehung des Melanoms eine Rolle spielen könnte.

3 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und durch sie induzierte oxidative DNA-Modifikationen für die Entstehung des malignen Melanoms eine Rolle spielen. Obwohl einige Befunde auf oxidativen Stress als Ursache dieses Hautkrebses hinweisen, gibt es bisher keine Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen oxidativen DNA-Modifikationen und dem malignen Melanom.

Zunächst sollte daher untersucht werden, ob Melanomzellen im Vergleich zu Hautfibroblasten des gleichen Patienten bzw. gegenüber Hautfibroblasten gesunder Probanden sensitiver mit der Bildung oxidativer DNA-Modifikationen reagieren. Dazu war zu überprüfen, ob Melanomzellen sich im Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen, in der Anzahl Licht-induzierter oxidativer DNA-Schäden oder in deren Reparatur unterscheiden.

Als Quelle reaktiver Sauerstoffspezies und oxidativer DNA-Modifikationen kommen, wie in Kapitel 1 dargestellt, sowohl endogene Prozesse wie die mitochondriale Atmungskette als auch exogene Faktoren, insbesondere Sonnenlicht, in Betracht. Beide möglichen Einflüsse auf die Entstehung des malignen Melanoms sollten in dieser Arbeit untersucht werden.

Da bisher nicht bekannt war, ob reaktive Sauerstoffspezies aus den Mitochondrien überhaupt zum Zellkern gelangen und dort die DNA schädigen können, sollte dieser Aspekt im Rahmen der vorliegenden Arbeit überprüft werden. Dabei waren zwei Vorgehensweisen zu testen: Zum einen sollte die Anzahl reaktiver Sauerstoffspezies gesenkt, zum anderen drastisch erhöht werden. Dabei war jeweils die Zahl reaktiver Sauerstoffspezies aus den Mitochondrien und die Anzahl oxidativer DNA-Modifikationen zu bestimmen.

Weiterhin sollte der genotoxische Effekt von sichtbarem Licht als wichtigster exogener Quelle reaktiver Sauerstoffspezies für Hautzellen untersucht werden. Dazu sollten Melanomzellen und Hautfibroblasten eines Patienten nach zwei unterschiedlichen Protokollen geschädigt werden: einerseits durch eine chronische, andererseits durch mehrfache Bestrahlung mit Licht (Halogenlampe, 1000 W). Als Messparameter war die Anzahl der jeweils induzierten oxidativen DNA-Modifikationen zu quantifizieren. Um die Bedeutung der verschiedenen Wellenlängenbereiche des Sonnenlichts für die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen näher zu bestimmen, sollte bei einem Teil der Bestrahlungen zusätzlich Kantenfiltern eingesetzt werden, die nur Licht oberhalb einer bestimmten Wellenlänge (in diesem Fall $> 395 \text{ nm}$) passieren lassen.

Dies erlaubt die selektive Identifizierung von phototoxischen Ereignissen auf DNA-Ebene außerhalb des UV-Bereichs und die Abgrenzung zu UV-B- bzw. UV-A-induzierten Schäden.

Die zellulären Chromophore, die an der Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Sonnenlicht beteiligt sind, konnten in bisherigen Studien nicht ausreichend charakterisiert werden. Sowohl die Cryptochrome 1 und 2 als auch Protoporphyrin IX stehen im Verdacht, als endogene Photosensibilisatoren an der Licht-induzierten Generierung oxidativer DNA-Modifikationen beteiligt zu sein. Daher sollte mit defizienten Zellsystemen getestet werden, wie sich die Abwesenheit der Cryptochrome 1 und 2 bzw. von Protoporphyrin IX auf die Suszeptibilität von Zellen gegenüber sichtbarem Licht auswirkt.

Im Fall einer Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch endogene oder exogene ROS sollte auch untersucht werden, ob durch diese Schädigung Mikrokerne induziert werden. Mikrokerne sind definiert als Abspaltungen, die bei der Teilung von Zellkernen entstehen, und stellen ein Maß zur Identifikation einer klastogenen bzw. aneuploiden Schädigung von Zellen dar.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Analysenwaage	AG245, max. 210 g (Mettler Toledo, Schweiz)
Autoklav	Tecnoclav 50 6.0, bzw. 2.0 (Fedegari Autoklav, SPA, Albuzzo, Italien)
Blotting-Apparatur (<i>Western-Blot</i>)	BioRad, Hercules, CA, USA
Brutschrank Zellkultur	CO ₂ -Inkubator BB16, BB6060 O ₂ und Hera-Cell (Heraeus Instruments, Hanau)
Computer	Microstar, AMD Duron, 1.4 GHz, Windows XP und Power Macintosh 8200/120 bzw. 7200/90
Coulter Counter	Modell N Industry (Coulter Electronics, Luton, Großbritannien)
Destillationsapparatur	Destamat® (Heraeus, Hanau)
DNA-Gel-Auswertung	Molecular Analyst® (V 2.1, 1995, BioRad, Hercules, CA, USA)
DNA-Gel-Vermessung	BioRad Gel Doc 1000 (BioRad, Hercules, CA, USA)
Elektrophorese-Kammer (vertikal) (<i>Cleavage-Assay, Western-Blot</i>)	BioRad, Hercules, CA, USA
Fluoreszenz-Mikroskop	Eclipse E400, Nikon, Düsseldorf
Fluorimeter	TKO 100, DNA Fluorimeter (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA)
Folienschweißgerät	Typ 255 (Fa. Schott)
Fraktionssammler	Ultrac 2070 II (Pharmacia/LKB, Uppsala, Schweden) und MM10, Neolab 4 mit Zeitnehmer SM 999 (Neolab, Heidelberg)
Gefrierschrank (-20°C)	KG 3666-23 (Liebherr)
Gefrierschrank (-70°C)	Colora UF 85-300S (Colora, Lorch)
Halogenlampe, 1000 W	Osram SLG 1000-Studio (Osram, München) mit Flecta Halogen Mini-Brenner (Reflekta)
Heißluftsterilisator	WTC Binder, Tuttlingen
Heizblock	Thermoblock-Thermostat (Gebr. Liebisch, Bielefeld)
Homogenisator	Potter S (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen)
Kamera	Leica DC 200 (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim), Polaroid (Polaroid Corp., Cambridge, Mass., USA)

Kryobehälter (Zellen)	Flüssigstickstoffcontainer TW 750 RS (Taylor Wharton, Theodore, AL, USA)
Kühlschränke	KG 3666-32 (Liebherr)
Lichtintensitätsmessgerät	Luxmeter 110 (PCR Krochmann GmbH, Berlin) mit geeichtem Fotoelement GaP
Lichtmikroskop	Telaval 31 (Zeiss, Oberkochen)
Magnetrührer	Ikamag RET-G (Ika-Werk, Janke&Kunkel GmbH & Co KG, Staufen im Breisgau)
Mikrowelle	Micromat 175 Z (AEG) und Dimension 4 (Panasonic Service, Wiesbaden)
Multipette	Eppendorf GmbH, Hamburg
OptoMed Pulslampe	DermoDyne (FM10/06), OptoMed Gruppe, Berlin/Wildau
OptoMed cw-Lampe	CW01, OptoMed Gruppe, Berlin/Wildau
Peristaltik-Pumpe	ISM 759, 20 Kanäle, mit Schläuchen (Ismatec Laboratoriumstechnik, Schweiz)
pH-Meter	PHM 62 (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark)
Phospho-Imager	Storm (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA)
Pipetten	Pipetman P20, P100, P 200, P 1000, P 5000, P 10000 (Gilson, Frankreich)
Pipettierhilfe	Pipetus-akku® (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)
Pumpe	Desaga, Heidelberg, Deutschland
Rotoren für Kühlzentrifuge	SS-34, GS-3 (Sorvall, New.t.on, Conn., USA)
Schüttelbäder	heizbar bis 100°C (Köttermann GmbH & Co., Uetze-Hänigsen)
Schüttelinkubator (Zellen)	Typ Certomat (R+H, B. Braun, Melsungen, Deutschland)
Spannungsgerät (Protein-, DNA-Gele)	Power PAC-3000 (BioRad, Hercules, CA, USA)
Spectralphotometer	Hitachi U-2000 (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)
Sterile Werkbank	LaminAir® HB2472 und HB 2448 (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
Tischschüttler	GFL 3015 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel)
Trockenschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Tropfentrichter (Cytospin)	Shandon Cytoclip (Shandon. Pittsburg, USA)
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 (Bandelin Electronic, Berlin)
Ultraschallstab	Sonoplus Homogenisator HD 70 mit Sonotrode MS 73 und HF-Generator GM 70, 70 W, 20 kHz (Bachofer, Reutlingen)
Ultraschall-Homogenisator	Vibracell 72408 (BioBlock Scientific)
Ultrazentrifuge	Optima LE-80K und Optima™ TL (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA)

Ultrazentrifugen-Rotoren	Ti 60, VTi 50 (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA)
UV-B Lampe	Philips TL20W/12 RS (Philips Licht, Hamburg), in Fassung Regiolux ILF-k (Regiolux, Königsberg)
UV/VIS Photometer	Ultraspec II, LKB-Biochrom (Biochrom, Cambridge, England)
Vortexer	Vortex Genie 2, Model G-560E (Scientific Industries, INC, Bohemia, NY, USA)
Waage	PB 3002, Delta Range, max. 3100 g (Mettler Toledo, Schweiz)
Wasserbad (heizbar bis 100°C)	Köttermann Type 3042 (Köttermann GmbH & Co, Uetze-Hänigsen)
Wasserbad	Haake K, Haake LH mit Kältethermostat Haake F3 (Haake, Karlsruhe)
Wasserbad	Haake Fisons W19 mit Thermostat Haake D8 (Haake, Karlsruhe)
Zählkammer (Zellen)	Neubauer Kammer (Marienfeld, Deutschland)
Zentrifugen	Hettich Universal/K2S, Hettich Micro Rapid (Hettich, Tuttlingen), Biofuge 28RS und Sigma 3K-2 (Heraeus Instruments GmbH, Osterode am Harz)
Zytozentrifuge	Cytospin 3 (Shandon, Astmoor, England)

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Blotting-Membran (<i>Western-Blot</i>)	Hybond C-PVDF-Membran (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, UK)
Deckgläser	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Einmalspritzen (Plastik)	2 ml PRIMO (Codan Medical ApS, Roedby, Dänemark), 5 ml/10 ml Quadroject Plus (Dispomed WITT oHG, Gelnhausen-Hailer)
Filter (Alkalische Elution)	Isopore™, Polycarbonat-Membran, 2 µm, Ø 25 mm (Millipore, Irland)
Filterhalter (Alkalische Elution)	Swinnex SX 2500 (Millipore, Holstein, Frankreich)
Filterpapier und Faltenfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Film (<i>Western-Blot</i>)	Kodak Biomax ligt-1, ML, 13x18 cm Sigma, Z 37,039-80 50 pc (Eaton Kodak Comp., Rochester, NY, USA)
Fluoreszenzküvetten	Elkay Ultra-Vu (Elkay Products, Inc., Shrewsbury, MA, USA), Hellma 105251-QS (Hellma GmbH, Mühlheim)
Glasgeräte	Schott Spezialglas GmbH, Mainz

Glaspipetten (Zellkultur)	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Kantenfilter	Schott Spezialglas GmbH, Mainz
Kanülen, steril	21G x 1½, Nr. 2 (Dispomed WITT oHG, Gelnhausen-Hailer)
Kryo-Röhrchen, steril	Nunc Kryo, 1,5 ml (A/S Nunc, Roskilde, Dänemark)
Kultur-Röhrchen, steril	PP (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Multipettenaufsätze	Combitips 50 ml (Eppendorf AG, Hamburg)
Objektträger	geschnitten, mit Mattrand (Knittel Gläser)
Pasteurpipetten	Flint Glass (Chase Instruments Corp., Glen Falls, NY, USA)
Pipettenspitzen (Einweg)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen (Einweg)	5 ml, 10 ml (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Plastik-Reaktionsgefäße	500 µl, 1500 µl, 2000 µl (Eppendorf AG, Hamburg)
Spritzen (Alkalische Elution)	20cc-Syringe, Luerlock (Becton Dickinson & Co., Rutherford, USA)
Sterilfilter	Porengröße 0,22 µm (Schleicher & Schuell, Dassel)
Whatman-Papier (<i>Western-Blot</i>)	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen, steril	Greiner GmbH, Nürtingen
Zellkulturschaber, steril	A. Hartenstein GmbH, Würzburg
Zentrifugenröhrchen, Glas	Gorex-Röhrchen, 15 ml/50 ml (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Zentrifugenröhrchen, Plastik	15 ml, 50 ml (Greiner GmbH, Nürtingen)

4.1.3 Chemikalien und Reagenzien

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

Acrylamid/Bis (40 %, 19/1)	Roth, Karlsruhe
Acrylamid/Bis (40 %, 29/1)	Roth, Karlsruhe
Antimycin A	Sigma (St. Louis, MO, USA)
DL-Buthioninsulfoxim	Sigma Aldrich, Steinheim
Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP)	Sigma (St. Louis, MO, USA)
Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe (Rotiphorese Gel 30®)
Agarose (Typ I, low EEO)	Sigma Aldrich, Steinheim
Aktivkohle	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Bisbenzimid (Hoechst Nr. 33258)	Sigma Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Steinheim
tert.-Butylhydroperoxid	Sigma Aldrich, Steinheim

(tBuOOH, 1 M)	
Calciumchlorid x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Chloroform	Roth, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G,	Sigma Aldrich, Steinheim (C.I. Nr. 42655)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich, Steinheim
DMEM high Glucose Medium	PAA, Cölbe
DMEM low Glucose Medium	PAA, Cölbe
DMEM-Medium, Phenolrot-frei	Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich, Steinheim
DTNB, Ellmann's Reagenz (5,5'-Dithio-(2-nitrobenzoesäure))	Serva, Heidelberg
Eindeckmittel EDL-2	Linaris, Bettingen am Main
EDTA (Tetramethylethylendiamin)	Merck, Darmstadt
Eichlösungen Puffer (pH 5, 7, 8, 10, 11)	Sigma Aldrich, Steinheim
Entwicklungsbad (<i>Western</i>)	Kodak, X-Ray Developer LX 24 (Eastman Kodak Comp., Rochester, NY, USA)
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Fixierbad	Kodak, X-Ray Fixer A 4 (Eastman Kodak Comp., Rochester, NY, USA)
D-Glucose x 1 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
L-Glutamin 200 mM	PAA, Cölbe
Glutathion, reduziert (Glu-Cys-Gly)	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycerol	VWR International GmbH, Darmstadt
Glycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Ham's F12 Kulturmedium	PAA, Cölbe
Hydroethidin (2,7-Diamino-10-ethyl-9-phenyl- 9,10-Dihydrophenanthridin)	Molecular Probes Inc., (Eugene, OR, USA)
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kälberserum, fetales	PAA, Cölbe
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Kaliumhydrogenphosphat x 3 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Methanol, Roti®solv (HPLC gradient grade)	Roth, Karlsruhe
NADPH, Tetranatriumsalz	Boehringer, Mannheim
Natriumacetat	Merck, Darmstadt

Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat x 1 H ₂ O	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Oligomycin	Sigma (St. Louis, MO, USA)
PBS Dulbecco, Instamed-Pulver	Biochrom KG, Berlin
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAA, Cölbe
Phenol (Roti®-phenol)	Roth, Karlsruhe
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma Aldrich, Steinheim
Ponceau Rouge S	Sigma Aldrich, Steinheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim
Ro 19-8022 [R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H- benzo[a]chinolizin-1-yl)-carbonyl]- 2-pyrrolidin-methanol]	Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Salzsäure 25%, 37%	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure 96%	Merck, Darmstadt
TBE, 10X	Gibco Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Tetraethylammoniumhydroxid (TEAH)	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	BioRad, Hercules, CA, USA
Trichloressigsäure (TCA)	Serva, Heidelberg
TRIS-Base (Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan)	Sigma Aldrich, Steinheim
Tris-HCl	Sigma Aldrich, Steinheim
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypanblau-Lösung 0,4%ig	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin /EDTA-Lösung	PAA, Cölbe
Tween® 20	BioRad, Hercules, CA, USA
<i>Western Blocking-Reagent</i>	WBR 1921673, Boehringer, Mannheim
<i>Western Detection Kit</i>	BM <i>Chemiluminescence Kit</i> , Boehringer, Mannheim

4.1.4 Proteine (Marker, Enzyme, Antikörper)

Antipain	Sigma Aldrich, Steinheim (Lagerung in Aliquots bei - 20 °C)
----------	--

Anti- <i>Rabbit</i> -Antikörper I	Cyanine(Cy2)-gelabelter Antirabbit-(IgG)-Ziegenantikörper (Jackson Immuno Research, Muntlucon, Frankreich)
Anti- <i>Rabbit</i> -Antikörper II	Horserradish peroxidase-gelabelter Antirabbit-(IgG)-Ziegenantikörper (Jackson Immuno Research, Muntlucon, Frankreich)
Aprotinin	Sigma Aldrich, Steinheim (Lagerung in Aliquots bei -20 °C)
DNAse I (Rinder-Bauchspeicheldrüse)	Sigma Aldrich, Steinheim
T4-Endonuklease V (<i>E. coli</i>)	Präparation nach <i>Nakabeppu et al.</i> (Nakabeppu, 1982), modifiziert durch <i>Pflaum</i> (Pflaum, 1996), hergestellt durch M. Pflaum bzw. C. Flohr und I. Schultz (Mainz)
T4-Polynukleotidkinase Fpg	9 u/µl, New Englands Biolab GmbH, Frankfurt/Main (Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase), Rohextrakt hergestellt nach Boiteux et al. (Boiteux, 1990), von M. Pflaum bzw. M. Osterod (Mainz)
Glutathionreduktase	600 U/ml (Boehringer, Mannheim)
Leupeptin, Trifluoracetat	Sigma Aldrich, Steinheim (Lagerung in Aliquots bei -20 °C)
Ogg1-Antikörper	monoklonaler Kaninchen-Antikörper, hergestellt durch S. Boiteux (CEA, Département de Radiobiologie et Radiopathologie, Fontenay-aux-Roses, Frankreich)
Ogg1-Protein (rein)	(8-oxoG-DNA-Glykosylase/AP-Lyase), aus <i>Drosophila melanogaster</i> , zur Verfügung gestellt von S. Boiteux (CEA, Département de Radiobiologie et Radiopathologie, Fontenay-aux-Roses, Frankreich) Konzentration: 400 µg/ml
Proteinase K	lyophilisiert, aus <i>Tritirachium albidum</i> (Roth, Karlsruhe)
Protein-Längenstandard für <i>Western-Blot</i>	Biolabs, New England

4.1.5 Oligonukleotide

34mer-Oligonukleotid	Eurogentec (Seraing, Belgien); Sequenz: 5'GCTTCATCGTTATT-(8oxoG)-ATGACCTGGTG-GATACCG-3'
komplementäres Oligonukleotid	Sigma-Aldrich, Steinheim

4.1.6 Verwendete Zelllinien

AS52 CHO-Zelle (*chinese hamster ovary*, Ovarienzelllinie des chinesischen Hamsters)

Primäre Melanomzellen und Fibroblasten aus Patienten mit Malignem Melanom:

Patient 1 (Alter: 58, männlich): M8,99 (Melanomzelle, Hautfilia (Brust)), F8,99 (Hautfibroblast)

Patient 2 (Alter: 35, weiblich): M111/01 (primäre Melanomzelle (Oberschenkel), Clark Level IV, Breslow 2,3 mm), FH55/01 (Hautfibroblast)

Patient 3 (Alter: 46, weiblich): M2/02 (Melanomzelle, Metastase (Lymphknoten)), FH20/02 (Hautfibroblast)

Die Zellen wurden von Beate Volkmer und Rüdiger Greinert (Dermatologisches Zentrum, Buxtehude) aus Operationsmaterial isoliert und zur Verfügung gestellt.

Primäre Hautfibroblasten aus gesunden Spendern:

Patient 13 (= P13): Alter des Patienten: 86 Jahre

Patient 30 (= P30): Alter des Patienten: 28 Jahre

Patient 35 (= P35): Alter des Patienten: 66 Jahre

Patient 36 (= P36): Alter des Patienten: 65 Jahre

Patient 37 (= P37): Alter des Patienten: 63 Jahre

Patient 45 (= P45): Alter des Patienten: 67 Jahre

Patient 100 (= P100): Alter des Patienten: 91 Jahre

Die Zellen wurden von Violeta Serra und Thomas von Zglinicki (Institut für Pathologie, Charité, Humboldt-Universität, Berlin) durch Hautbiopsie auf der Innenseite des linken Unterarms isoliert und zur Verfügung gestellt. Von der gleichen Arbeitsgruppe wurden auch folgende Zellen bereitgestellt:

BJpar humane Vorhautfibroblastenzelllinie

BJ5te humane Vorhautfibroblasten, aus BJpar gewonnen durch Transfektion mit der RNA-Komponente der menschlichen Telomerase

MRC-5 humane Lungenfibroblasten

Zur Untersuchung der Auswirkung mitochondrialer ROS auf die Integrität der Kern-DNA wurden folgende Zellen von Rudolf J. Wiesner (Institut für Vegetative Physiologie, Köln) zur Verfügung gestellt:

HeLa humane Cervix-Karzinomzelle

HeLa $\rho 0$ HeLa-Zelllinie, aus der durch Inkubation mit Ethidiumbromid die mitochondriale DNA entfernt wurde

HeEB1 HeLa $\rho 0$ -Zelllinie, bei der durch Fusion mit humanen Blutplättchen die mitochondriale DNA wieder eingefügt wurde

143B humane Osteosarkomzelllinie

143B $\rho 0$ 143B-Zelllinie, aus der durch Inkubation mit Ethidiumbromid die mitochondriale DNA entfernt wurde

Um die Beteiligung von cry-Proteinen an der durch sichtbares Licht vermittelten Induktion oxidativer Basenmodifikationen zu testen, wurden diese Zelllinien von Gijsbertus T.J. van der Horst (Department of Cell Biology and Genetics, Erasmus-Universität Rotterdam, Niederlande) bereitgestellt:

cry wt immortalisierte Mausembryofibroblasten

cry k.o. cry1- und *cry2-*defiziente, immortalisierte Mausembryofibroblasten

4.1.7 Hergestellte Lösungen und Puffer

4.1.7.1 Zellkultur

PBSCMF (10X)	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g NaHPO ₄ x 2 H ₂ O ad 1 l mit H ₂ O _{dest}
PBSCMF (1X, autoklaviert)	100 ml PBSCMF (10 X) ad 1 l mit H ₂ O _{dest}
Kulturmedium für Melanomzellen und Hautfibroblasten (Buxtehude)	RPMI 10 % FCS 1 % Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml) 5 % L-Glutamin
Kulturmedium für Fibroblasten (Berlin) und BJ5te/BJpar/MRC-5	DMEM low Glucose 10 % FCS 5 % L-Glutamin 1 % Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml)
Kulturmedium für cry-Zellen	DMEM high Glucose/Ham's F12 im Verhältnis 3:1 10 % FCS 1 % Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml)
Kulturmedium für HeLa/HeLa ρ0/HeEB1	DMEM high Glucose 10 % FCS 1 % Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml) 50 µg/ml Uridin 1 mM Natriumpyruvat
Kulturmedium für 143B/143B ρ0	DMEM high Glucose 5 % FCS 1 % Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml)

	50 µg/ml Uridin
	1 mM Natriumpyruvat
Kulturmedium für AS52	Ham's F12
	5 % FCS
	1 % Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 µg/ml)

4.1.7.2 *Schädigung der Zellen*

Antimycin A-Stammlösung, 4,74 mM	20,5 mg in 8,2 ml Ethanol absolut (, -20 °C)
Antimycin A-Vorverdünnung, 4,74 µM	1:1000-Verdünnung der Stammlösung (4,74 mM) in Ethanol absolut (-20 °C)
tert.-Butylhydroperoxid-Vorverdünnung, (0,1 M; frisch herstellen)	50 µl tBuOOH-Lösung (1 M) zu 450 µl FCS-freiem Medium pipettieren
CCCP-Stammlösung, 14,67 mM	31,0 mg in 10,33 ml DMSO (-20 °C)
CCCP-Vorverdünnung, 1,467 mM	1:10-Verdünnung der Stammlösung (14,67 mM) in DMSO (-20 °C)
Oligomycin-Stammlösung, 0,5 mg/ml	5 mg in 10 µl DMSO (-20 °C)
Oligomycin-Vorverdünnung, 50 µg/ml	1:10-Verdünnung der Stammlösung (0,5 mg/ml) in DMSO (-20 °C)
Ro 19-8022-Stammlösung	40 µM in Ethanol absolut (-20 °C)

4.1.7.3 *Herstellung von Zellpellets und Zellextrakten*

AAL-Mix (sterilfiltriert)	je 25 mg/ml Antipain/Aprotinin/Leupeptin in H ₂ O _{dest} (-20 °C)
Lysepuffer/AAL	20 mM TRIS-HCl (Tris-Base einwiegen, pH mit HCl auf 8,0 einstellen) 250 mM NaCl 1 mM EDTA AAL-Mix (1:10000, v/v)

4.1.7.4 *Glutathion-Depletion*

tert.-Buthioninsulfoximin-Stammlösung (10 mM, frisch angesetzt)	33,5 mg in 15 ml Vollmedium lösen, gut vortexen
tert.-Buthioninsulfoximin-Vorverdünnung (1 mM, frisch angesetzt, sterilfiltriert)	1:10-Verdünnung der Stammlösung (10 mM) in Vollmedium

4.1.7.8 Alkalische Elution

PBSCMF (10X)	80 g NaCl 2 g KCl 11,5 g NaHPO ₄ x 2 H ₂ O ad 1 l mit H ₂ O _{dest}
PBSCMF (1X, autoklaviert)	100 ml PBSCMF (10 X) ad 1 l mit H ₂ O _{dest}
BE ₁ -Puffer (pH 7,5; autoklaviert)	100 mM NaCl 20 mM Tris-HCl 1 mM Na ₂ EDTA
BE ₁ /BSA-Puffer (pH 7,5; frisch angesetzt)	26 ml BE1-Puffer 13 mg Rinderserumalbumin (BSA)
BE ₁₅ -Puffer (pH 7,5, autoklaviert)	20 mM Tris-HCl 75 mM KCl 15 mM Na ₂ EDTA
BE ₁₅ /BSA-Puffer (pH 7,5, frisch angesetzt)	20 ml BE15/BSA-Puffer 10 mg Rinderserumalbumin (BSA)
Lysepuffer (pH 10)	100 mM Glycin 20 mM Na ₂ EDTA 2 % SDS
Lysepuffer/Proteinase K (frisch angesetzt)	100 ml Lysepuffer 40 mg Proteinase K
Waschpuffer (pH 10,0; autoklaviert)	20 mM Na ₂ EDTA
Elutionspuffer (pH 12,15)	20 mM EDTA (5,84 g EDTA, 900 ml H ₂ O _{dest} , pH-Einstellung mit TEAH, ad 1 l mit H ₂ O _{dest})
Bisbenzimid (Hoechst No. 33258) -Stammlösung	0,15 mM in H ₂ O _{dest} (Aliquots bei -20 °C)
Phosphatpuffer (pH 6; autoklaviert)	0,1 M Na ₂ HPO ₄

Phosphatpuffer (pH 7,2; autoklaviert)	0,1 M Na ₂ HPO ₄
Phosphatpuffer (pH 7,2)/Bisbenzimid (frisch und lichtgeschützt angesetzt)	1 % (v/v) Bisbenzimid-Stammlösung in Phosphatpuffer (pH 7,2)

4.1.7.9 Cleavage-Assay

Mercaptoethanol (10 X)	1 µl Mercaptoethanol, 14 M 144 µl H ₂ O _{dest}
Tris-HCl, 1 M, pH 7,6	121,1 g Tris-Base pH mit HCl auf 7,6 einstellen ad 1 l mit H ₂ O _{dest}
PNK-Puffer (10 X)	0,5 ml Tris-HCl, 1 M (pH 7,6) 0,1 ml MgCl ₂ , 1 M 2 µl EDTA, 0,5 M ad 1 ml mit H ₂ O _{dest}
Chloroform/Ethanol (1:1)	10 ml Ethanol 10 ml Chloroform mischen, 20 ml TE-Puffer (pH 8,0) hinzufügen, gut schütteln, nach dem Trennen der Phasen die untere verwenden
TE-Puffer, pH 8,0	10 mM Tris-Base pH mit HCl auf 8,0 einstellen 1 mM EDTA (pH 8,0)
EDTA, 0,5 M, pH 8,0	186,1 g Na ₂ -EDTA x 2 H ₂ O in 800 ml H ₂ O lösen mit NaOH (ca. 20 g Pellets) auf pH 8,0 einstellen
NaCl, 5 M	29,22 g NaCl ad 100 ml mit H ₂ O _{dest}
SDS, 10%	10 g Sodiumdodecylsulfat in wenig H ₂ O _{dest} lösen, dann auf 100 ml auffüllen
Lysepuffer ohne NaCl	20 mM TRIS-Base einwiegen, pH mit HCl auf 8,0 einstellen 1 mM EDTA

Oligonukleotid-Lösung	0,2 µl Oligonukleotid (25 fmol) 9,8 µl Lysepuffer ohne NaCl
Stopp-Puffer	110 µl TBE (10X) 100 µl Xylencyanol 1%ig 100 µl Bromphenolblau 800 µl deionisiertes Formamid 90 %
Polyacrylamid-Gelmix	10 ml TBE (10X) 42 g Harnstoff 50 ml Acrylamid-Lösung (40 %, 19/1) <i>Herstellung:</i> Harnstoff durch Erwärmen im Wasserbad lösen, mit Bidest auf 100 ml auffüllen, filtrieren. Bei 4 °C vier Wochen lang verwendbar.
Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung (10 %)	10 % (m/v) in H ₂ O _{dest} (bei 4 °C vier Wochen lang verwendbar)
Polyacrylamid-Trenngel (12,5 %)	6 ml Polyacrylamid-Mix 60 µl APS (10%) 6 µl TEMED
TBE-Puffer (1X)	100 ml TBE-Puffer (10X) ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest}
<i>4.1.7.10 Western-Blot</i>	
SDS, 10%	10 g Sodiumdodecylsulfat in wenig H ₂ O _{dest} lösen, dann auf 100 ml auffüllen
Elektrophorese-Puffer (10X)	30 g Tris-Base 144 g Glycin ad 1 l mit H ₂ O _{dest}
Elektrophorese-Puffer (1X)	50 ml Elektrophorese-Puffer (10X) 5 ml SDS (10 %) ad 0,5 l mit H ₂ O _{dest}
Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung (10 %)	10 % (m/v) in H ₂ O _{dest} (bei 4 °C vier Wochen lang verwendbar)

Ladepuffer (2 X)	1,25 ml <i>Upper-Tris-Puffer</i> (0,5 M) 1 ml Glycerol 1 ml SDS (10 %) 100 µl β-Mercaptoethanol 100 µl Bromphenolblau ad 5 ml mit H ₂ O _{dest} (500 µl-Aliquots, -20 °C)
PBS-Puffer	9,55 g Instamed PBS-Pulver ad 1 l mit H ₂ O _{dest}
PBST	1 ml Tween® 20 ad 1 l mit PBS-Puffer
Transfer-Puffer	3 g Tris-Base 14,4 g Glycin 15 ml EtOH absolut ad 1 l mit H ₂ O _{dest} (4 °C)
<i>Lower-Tris-Puffer</i> , 1,5 M	18,2 g Tris-Base pH mit ca. 6 ml HCl (8 N) auf 8,8 einstellen 4 ml SDS (10 %) ad 100 ml mit H ₂ O _{dest}
<i>Upper-Tris-Puffer</i> , 0,5 M	3,03 g Tris-Base pH mit ca. 4,1 ml HCl (8 N) auf 6,8 einstellen 2 ml SDS (10 %) ad 50 ml mit H ₂ O _{dest}
<i>Running Gel-Mix</i>	12,5 ml <i>Lower-Tris-Puffer</i> 15,6 ml Acrylamid/Bis (40 %, 29/1) 21,9 ml H ₂ O _{dest}
<i>Running Gel</i> (pro Gel)	6 ml <i>Running Gel-Mix</i> 60 µl APS (10 %) 6 µl TEMED
<i>Stacking Gel-Mix</i>	12,5 ml <i>Upper-Tris-Puffer</i> 7,5 ml Acrylamid/Bis (40 %, 29/1) 30 ml H ₂ O _{dest}
<i>Stacking Gel</i> (pro Gel)	2 ml <i>Stacking Gel-Mix</i> 20 µl APS (10 %) 2 µl TEMED

Ponceau Rouge S-Lösung	1 g Ponceau Rouge S 3% Trichloressigsäure (TCA) ad 500 ml mit H ₂ O _{dest}
Ogg1-Verdünnung, 400 ng/ml	1:1000-Verdünnung der Ogg1-Proteinlösung (400 µg/ml)
Antikörperlösung 1 (frisch hergestellt)	10 ml PBST-Puffer 10 µl <i>Western Blocking-Reagent</i> 4 µl Anti-Ogg1-Antikörper
Antikörperlösung 2 (frisch hergestellt)	10 ml PBST-Puffer 10 µl <i>Western Blocking-Reagent</i> 0,5 µl <i>Anti-Rabbit</i> -Antikörper
4.1.7.11 Mikroerntest	
Bisbenzimid (Hoechst No. 33258) -Stammlösung	0,15 mM in H ₂ O _{dest} (Aliquots bei -20 °C)
PBSCMF (10X)	80 g NaCl 2 g KCl 1,5 g NaHPO ₄ x 2 H ₂ O ad 1 l mit H ₂ O _{dest}
PBSCMF (1X, autoklaviert)	100 ml PBSCMF (10 X) ad 1 l mit H ₂ O _{dest}
PBSCMF/Bisbenzimid	1 ml Bisbenzimid-Stammlösung ad 80 ml mit H ₂ O _{dest} (4 °C)

4.2 Methoden

4.2.1 Pflege der Zellen

4.2.1.1 Allgemeine Zellpflege

Sämtliche Arbeiten mit Zellen werden in einer Laminar-Flow-Box (Sterilwerkbank) unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Zur Kultivierung werden die Zellen in

Kulturflaschen mit Filter bei 37 °C, 5 % CO₂ und 99 % Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank aufbewahrt. Abhängig von ihrer Verdopplungszeit werden die Zellen frühestens jeden zweiten Tag, spätestens jedoch alle vier Wochen, in neue Kulturflaschen überführt. Dazu wird zunächst das alte Medium aus der Kulturflasche entfernt und die Zellen werden mit 10 ml PBSCMF gewaschen. Anschließend inkubiert man die Zellen für 0,5-5 min mit 1-2 ml Trypsin/EDTA-Lösung, wobei das Trypsin die kovalenten Bindungen zwischen den Zellen und dem Boden der Kulturflasche spaltet. Bei den sich schlecht ablösenden primären Hautfibroblasten wird zusätzlich 30 s bei 37 °C (5 % CO₂, 99 % Luftfeuchtigkeit) im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich die Zellen durch leichtes Abklopfen des Flaschenbodens von diesem lösen, wird der Prozeß mittels Lichtmikroskop kontrolliert. Danach werden die Zellen in 5-10 ml Kulturmedium resuspendiert und durch Auf- und Abpipettieren mit einer 5 ml-Pipette vereinzelt. Das im Medium enthaltene FCS inaktiviert dabei die Enzymaktivität des Trypsins. Um die Zellzahl zu bestimmen, wird eine mit Isoton II (physiologische Kochsalzlösung) 1:50 verdünnte Zellsuspension im Coulter CounterTM gezählt. Zur Durchführung der Experimente werden Zellen verwendet, die noch nicht konfluent sind, sondern sich in der Wachstumsphase befinden. Um einer Veränderung der Zellen während der Kulturphase vorzubeugen, wurden alle Zellen maximal 40 Passagen lang kultiviert, danach wurden kryokonservierte Zellen neu aufgetaut.

4.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zellen können über einen Zeitraum von mehreren Jahren in flüssigem Stickstoff kryokonserviert werden. Dazu löst man die Zellen wie im vorigen Abschnitt beschrieben ab und zentrifugiert die resuspendierte Zellsuspension in einer auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge bei 1000 g für 5 min ab. Nach Abdekantieren des Überstandes wird das Zellpellet in vorgekühltem Medium, dem zuvor 10 % DMSO zugesetzt wurde, aufgenommen. Die Zelldichte sollte dabei 2-8 Mio. Zellen/ml betragen. In Aliquots von 1 ml pipettiert man die Suspension in beschriftete, bei -20 °C vorgekühlte Kryoröhrchen und lagert diese sofort für zwei Stunden bei -20 °C. Anschließend werden die Röhrchen über Nacht bei -70 °C aufbewahrt, bevor sie in den Stickstofftank überführt werden.

Zum Auftauen von Zellen wird das Kryoröhrchen kurz im 37 °C warmen Wasserbad geschwenkt, bis sich die Suspension vom Rand des Röhrchens löst. Sofort danach wird der Inhalt in ein steriles, mit 10 ml warmem Medium gefülltes 50 ml-Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur zentrifugiert (1000 g, 5 min). Der Überstand wird abdekantiert, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt. Nach einer 24-stündigen Lagerung im Brutschrank wird das Medium gewechselt oder gegebenenfalls werden die Zellen wie oben beschrieben

abgelöst und in eine größere Flasche überführt. Nach dem Auftauen von Zellen werden diese mindestens über 2 Passagen kultiviert, bis mit der Durchführung von Experimenten begonnen wird.

4.2.2 Schädigung der Zellen

4.2.2.1 *Bestrahlung mit sichtbarem Licht*

Zunächst wird eine Wanne mit Eis vorbereitet, dessen Oberfläche geglättet wird. Die Wanne wird auf einen Schüttler unter die Halogenlampe (1000 W im Bereich von 400-800 nm) gestellt. Der Abstand von der Unterkante der Halogenlampe zur Eisschicht wird auf 33 cm fixiert. Aus einer Zellkulturflasche mit mindestens 4 Mio. adhären Zellen wird zunächst das Medium entfernt. Danach werden die Zellen mit kaltem PBSCMF gewaschen. Der Rest an Flüssigkeit wird mit einer 2 ml-Pipette abgenommen und genau 5 ml (25 cm²-Kulturflaschen) bzw. 10 ml (75 cm²-Kulturflasche) bzw. 20 ml (175 cm²-Kulturflasche) an kaltem PBSCMF dazu pipettiert. Die Flasche wird in einer geschlossenen Styroporkiste mit Eis zur Lampe transportiert, in die vorbereitete Eiswanne gelegt und mit weiteren Eisstückchen umschlossen, sodass nur noch die Oberseite frei ist. Danach wird diese Seite der Kulturflasche mit einem Papiertuch gesäubert und die Lampe eingeschaltet. Während der Bestrahlung, die zwischen 10-60 min dauert und einer Energiedosis von 225-1350 kJ/m² entspricht, wird die Eiswanne mit der Kulturflasche sanft geschüttelt. Nach der Schädigung werden die Zellen in einer geschlossenen Eiskiste zurück transportiert. Der PBSCMF-Puffer wird entfernt. Falls eine sofortige Aufarbeitung folgt, werden die Zellen wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben abtrypsinisiert. Sollen die Zellen mehrfach bestrahlt werden bzw. den induzierten Schaden reparieren (siehe auch Kapitel 4.2.10) oder Mikrokerne ausbilden (vgl. Kapitel 4.2.13), werden sie zunächst in frischem Medium im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5 % CO₂, 99 % Luftfeuchtigkeit). Zur Mehrfachbestrahlung wurden die Zellen zwei bis vier Mal für 20 min bestrahlt (Abstand: 2 h), dazwischen lag eine Regenerationsphase von 100 min.

4.2.2.2 *Bestrahlung mit sichtbarem Licht durch einen Kantenfilter*

Da das Spektrum der Halogenlampe einen geringen Anteil an Licht mit einer Wellenlänge < 400 nm enthält, wurde für einige Bestrahlungsexperimente zwischen Halogenlampe und den Zellen ein Kantenfilter angebracht. Dazu wurde ein mit Aluminiumfolie verkleideter, lichtundurchlässiger Deckel aus Hartplastik auf der Eiswanne angebracht, in dessen Mitte eine Vertiefung in der Größe des Filters (14x14 cm) eingelassen war. Zur Bestrahlung wurde ein 395 nm-Filter, der für Licht

unterhalb dieser Wellenlänge undurchlässig ist, in diese Vorrichtung eingesetzt und die Zellen dadurch bestrahlt. Ein entsprechender Kontrollansatz wurde nur durch den Filterhalter (ohne Filter) bestrahlt. Für diesen Versuch können ausschließlich Kulturflaschen mit maximal 75 cm² Fläche verwendet werden, da bei größeren Flaschen keine gleichmäßige Ausleuchtung der Zellen gewährleistet werden kann.

4.2.2.3 Bestrahlung mit sichtbarem Licht und Ro 19-8022

Aus der Ro 19-8022-Stammlösung wird eine Verdünnung von 50 nM in PBSCMF hergestellt. Zur Schädigung von adhärennten Zellen in einer 75 cm² großen Flasche werden diese zunächst mit kaltem PBSCMF gewaschen, anschließend pipettiert man 10 ml der 50 nM Ro 19-8022-Lösung zu den Zellen. Die Bestrahlung wird mit sichtbarem Licht (Halogenlampe 1000 W) für 10 min durchgeführt. Der Abstand zwischen Lampe und Zellen beträgt dabei 38 cm. Unter diesen Bedingungen entspricht die Bestrahlung einer Energiedosis von 166 kJ/m² im Bereich von 400-800 nm. Anschließend werden die Zellen erneut zweimal mit PBSCMF gewaschen, um noch vorhandene Ro 19-8022-Substanz zu entfernen.

4.2.2.4 Bestrahlung mit den OptoMed-Lampen (gepulstes und kontinuierliches Licht)

Die Puls Lampe sollte schon ca. eine Stunde vor Gebrauch mit dem Netzstecker an die Steckdose angeschlossen sein. In einigen Vorversuchen wurde zunächst bei Raumtemperatur bestrahlt. Als sich zeigte, dass sich der Puffer in den Zellkulturflaschen sowohl durch Bestrahlung mit gepulstem als auch mit kontinuierlichem Licht bis zu 32 °C erwärmte, wurde das Protokoll geändert. Die in dieser Arbeit gezeigten Versuche wurden im Kälteraum bei 4 °C durchgeführt.

Die Zellen werden zunächst abtrypsiniert und bei 4 °C zentrifugiert (1200 g, 5 min). Nach Abgießen des Überstandes wird das Zellpellet in 5 ml kaltem PBSCMF-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Erneut wird die überstehende Flüssigkeit abdekantiert und das Pellet in 5 ml PBSCMF aufgenommen. Nun wird die Zellzahl bestimmt und ein Volumen entsprechend einer Zellzahl von 3,3 Mio. in vorbereitete kleine Kulturflaschen (25 cm²) pipettiert. In allen Flaschen wird das Volumen mit PBSCMF-Puffer auf 5 ml ergänzt. Die Flaschen (auch die Kulturflasche mit dem unbehandelten Ansatz) werden auf Eis in einer verschlossenen Box zum Kälteraum gebracht. Als erstes werden die Bestrahlungen mit der DermoDyne-Puls Lampe (FM10/06) durchgeführt. Dazu wird eine zu bestrahlende Kulturflasche aus dem Eis entnommen, abgetrocknet und auf die Bestrahlungsfläche gelegt. Für die folgenden Schritte muss eine Strahlenschutzbrille getragen werden. Die Lampe wird eingeschaltet und gibt Lichtpulse von sich, die Emission beträgt dabei 35 mW/cm²

(spektralradiometrisch vermessen, zwischen 400-500 nm; persönliche Mitteilung von J.H. Wilkens, Berlin). Nach einer Bestrahlungsdauer von 1:48/3:36/7:12/10:48 min (entsprechend einer Dosis von 37,8/75,6/151,2/226,8 kJ/m²) wird die Flasche wieder zurück auf Eis gestellt. Nachdem alle Bestrahlungen mit der Pulslampe beendet sind, wird die kontinuierlich emittierende OptoMed-Lampe eingeschaltet. Die Vorbrenndauer muss mindestens eine halbe Minute betragen, da erst nach dieser Zeit die volle Strahlungsstärke der Lampe erreicht ist. Nun wird eine zu bestrahlende Flasche der Eis-Box entnommen und abgetrocknet (dieser Schritt ist vor dem Bestrahlungsraum durchzuführen). Die Flasche wird sofort nach Betreten des Kälteraums auf die Bestrahlungsfläche der Lampe gelegt und ein Timer eingeschaltet. Mit der kontinuierlich emittierenden OptoMed-Lampe (cw-Lampe CW01, Emission: 41 mW/cm²; persönliche Mitteilung von J.H. Wilkens, Berlin) wurden die Zellen 1:32/3:04/6:08/9:12 min lang bestrahlt, entsprechend einer Dosis von 37,8/75,6/151,2/226,8 kJ/m². Nach der Bestrahlung wird die Flasche entfernt, die Lampe bleibt eingeschaltet, wenn noch weitere Ansätze bestrahlt werden müssen. Sobald alle Ansätze bestrahlt sind, werden die Flaschen in der Eisbox zur vorbereiteten Anlage der Alkalischen Elution gebracht. Die Zellsuspensionen in den einzelnen Kulturflaschen werden mit einer Pipette resuspendiert, dann verteilt man die Flüssigkeit einer Flasche (5 ml, entspricht 3,3 Mio. Zellen) auf drei Spuren zu je ca. 1 Mio. Zellen (1,667 ml/Spur). Die weitere Vorgehensweise ist unter Kapitel 4.2.9 beschrieben.

4.2.2.5 *Inkubation mit mitochondrialen Giften*

Um das Ausmaß der in den Mitochondrien gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies zu variieren, werden Zellen mit mitochondrialen Giften inkubiert. Dafür wird nach zwei verschiedenen Protokollen vorgegangen: Einerseits werden Zellen in Suspension unter Schütteln inkubiert, andererseits werden adhärenente Zellen behandelt.

Für die Inkubation von Suspensionszellen werden die Zellen zunächst wie in Kapitel 4.2.1.1 beschrieben abtrypsiniert und gezählt. Anschließend werden die Zellen durch Zentrifugation bei 1000 g (4 °C, 5 min) pelletiert und in 5 ml warmem Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wird auf die verschiedenen Ansätze aufgeteilt und mit Medium bis auf eine Zellkonzentration von 0,5 Mio./ml ergänzt. Man setzt 4,22 µl/ml einer 4,74-mikromolaren Lösung Antimycin A, oder 2,24 µl/ml einer Oligomycin-Lösung von 50 µg/ml, und/oder 3,41 µl/ml einer 1,47-millimolaren Lösung an CCCP zu.

Bei der Behandlung adhärenenter Zellen mit mitochondrialen Giften wird bei sechs Zellkulturflaschen (75 cm²) mit je mindestens 4 Mio. Zellen das Kulturmedium entfernt und durch genau 10 ml neues Medium ersetzt. Dazu pipettiert man 42,2 µl

einer 4,74-mikromolaren Lösung Antimycin A, oder 20 µl einer Oligomycin-Verdünnung (50 µg/ml), und/oder 34,1 µl einer 1,47-millimolaren Lösung an CCCP. Zur Bestimmung des Glutathion-Gehaltes wurde die Zellen in 175 cm²-großen Flaschen kultiviert und in einem Volumen von 20 ml geschädigt. Entsprechend wurde die Menge zugesetzter mitochondrialer Gifte verdoppelt.

Die Endkonzentration der eingesetzten Verbindungen beträgt sowohl bei der Schädigung von adhärenenten als auch von Suspensionszellen 20 nM Antimycin A, 125 µM Oligomycin und 5 µM CCCP.

4.2.2.6 Inkubation mit tert.-Butylhydroperoxid

Aus einer Kulturflasche (75 cm²) mit adhärenenten Zellen wird das Medium entfernt. Die Zellen werden einmal mit 10 ml zimmerwarmem PBSCMF gewaschen. Anschließend wird genau 10 ml neues, FCS-freies Medium (vorgewärmt auf 37 °C) in die Flasche pipettiert. Dazu pipettiert man die benötigte Menge der 0,1 M-Vorverdünnung an tBuOOH (z.B. 10 µl bei einer erwünschten Endkonzentration von 100 µM) und inkubiert für 15 min bei 37 °C im Brutschrank (5 % CO₂). Nach der Inkubation wird die Lösung aus der Kulturflasche entfernt, die Zellen werden noch zweimal mit PBSCMF gewaschen und danach wie gewohnt abtrypsiniert.

4.2.3 Herstellung von Zellpellets

Zur Messung der Ogg1-Aktivität in Zellextrakten und zur Isolierung der mitochondrialen DNA aus Zellen ist es zunächst erforderlich, eine ausreichende Menge an Zellen zu pelletieren. Dazu trypsiniert man mehrere dicht bewachsene Zellkulturflaschen ab, zählt die Zellen mittels Coulter CounterTM und zentrifugiert die Lösungen für 10 min bei 1200 g (4 °C) ab. Anschließend nimmt man die Pellets in je 5 ml kaltem PBSCMF auf, vereinigt gegebenenfalls die Suspensionen und zentrifugiert erneut. Nun resuspendiert man in 1 ml kaltem PBSCMF, überführt die Lösung in 2 ml-Reaktionsgefäße und zentrifugiert nochmals unter gleichen Bedingungen. Zuletzt wird der Überstand mit einer 1 ml-Kolbenhubpipette entfernt, das trockene Pellet kann bei -70 bis -80 °C über mehrere Monate aufbewahrt werden.

4.2.4 Herstellung von Zellextrakten

Aus mindestens 10 Mio. Zellen wird ein Pellet hergestellt (siehe Kapitel 4.2.3). Aus diesem wird ein zellulärer Extrakt gewonnen, indem man das Pellet zunächst in 100-300 µl Lysepuffer/AAL aufnimmt, sodass die Zellkonzentration 100 Mio. Zellen/ml

beträgt. Danach zerstört man die Zellen auf Eis mittels eines Ultraschall-Homogenisators (Zeit: 0:00:08, Puls in: 1:00, Puls off: 9:00, Amplitude: 20 %). Das Zell-Lysat wird nun bei 85000 g für 45 min zentrifugiert (Optima™ TL Ultrazentrifuge, 4 °C), um Zellwand- und Organellenbestandteile abzutrennen. Der Überstand wird in ein neues 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und stets gekühlt. Zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes wird ein Bradford-Test mit 1-5 µl des Extraktes durchgeführt, dabei wird gleichzeitig eine Kalibriergerade mit Lösungen von Rinderserumalbumin (2 bis 6 µg/ml) erstellt. Der Enzymextrakt lässt sich zur Messung der Ogg1-Aktivität bis zu einer Woche bei 4 °C aufbewahren, zur Quantifizierung des Ogg1-Gehaltes mittels *Western-Blot* bis zu 3 Wochen bei der gleichen Temperatur.

4.2.5 Depletion von Glutathion

Zur Depletion von Glutathion in Zellen werden die Zellen mit Buthioninsulfoximin (BSO) inkubiert. Dazu verdünnt man zunächst die BSO-Stammlösung mit Kulturmedium zu einer 1 mM-Lösung. Diese Verdünnung wird zu den Zellen in die Kulturflasche gegeben, nachdem zuerst das alte Kulturmedium entfernt wurde. Die Inkubation wird im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂, 99 % Luftfeuchtigkeit für 24 Stunden durchgeführt. Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBSCMF gewaschen, um BSO vollständig zu entfernen.

4.2.6 Fluorimetrische Bestimmung reaktiver Sauerstoffspezies

Pro Ansatz werden 2,5 Mio. Zellen benötigt, Die Zellen werden wie gewohnt abtrypsinisiert und 5 min bei 1200 g abzentrifugiert. Danach werden die Zellen in 5-10 ml Phenolrot- und FCS-freiem Medium aufgenommen und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird nochmals wiederholt, davor werden die Zellen gezählt. Nach dem zweiten Waschen der Zellen wird der Überstand entfernt und das Pellet in soviel Phenolrot- und FCS-freiem Medium aufgenommen, dass die Endkonzentration 2,5 Mio. Zellen/ 5 ml beträgt. Zur Behandlung mit den mitochondrialen Giften werden stattdessen die entsprechenden Mengen an Oligomycin bzw. CCCP zugefügt (siehe 4.2.2.5) danach die Endkonzentration eingestellt. Dieser Ansätze werden bei 37 °C für 10 min inkubiert und dabei gelegentlich geschwenkt. Der Ansatz ohne mitochondriale Gifte wird auf analoge Weise inkubiert. Danach werden die Zellen nochmals abzentrifugiert, der Überstand wird abpipettiert, und die Pellets werden in 95 µl des jeweils gleichen Überstandes resuspendiert, sodass die Testsubstanzen nach wie vor anwesend sind. Direkt vor der Messung werden pro Ansatz 5 µl der Hydroethidin-Lösung (100 µM) zupipettiert. Zur fluorimetrischen Messung wird zunächst ein Null-Abgleich mit Phenolrot- und FCS-freiem Medium durchgeführt ($\lambda_{Ex} = 480 \text{ nm}$, $\lambda_{Em} = 620 \text{ nm}$). Anschließend werden die Proben bei der gleichen

Wellenlänge mehrfach vermessen, dabei liegt zwischen den einzelnen Messungen ein Abstand von 4 min, in denen die Ansätze im 37 °C-Wasserbad unter Ausschluss von Licht inkubiert werden.

4.2.7 Messung des zellulären Protoporphyrin IX-Gehaltes

Um den Gehalt von Zellen an Protoporphyrin IX zu bestimmen, wurde nach einer modifizierten Methode von Hanania et al. (Hanania, 1992) bzw. Malik et al. (Malik, 1989) gearbeitet.

Zur Gewinnung eines Zellextraktes wird zunächst eine 175 cm² große Zellkulturflasche mit mindestens 20 Millionen Zellen abtrypsiniert. Nach Resuspendierung in Medium werden die Zellen bei 1000 g und 4 °C zehn Minuten lang abzentrifugiert. Danach wird der Überstand abdekantiert, die Zellen in 5 ml PBSCMF (4 °C) resuspendiert und nochmals zentrifugiert. Nach erneuter Aufnahme des Pellets in 5 ml PBSCMF (4 °C) zählt man die Zellen und zentrifugiert ein weiteres Mal. Der Überstand wird wiederum verworfen, die Zellen in Methylierungslösung aufgenommen, sodass die Endkonzentration 0,1 Mio. Zellen/µl beträgt. Die Suspension wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 30 min im Ultraschallbad behandelt. Anschließend zentrifugiert man 10 min bei 12000 g. Zur Bestimmung der Fluoreszenz überführt man 50 µl des Überstands in eine Fluoreszenzküvette und bestimmt die Fluoreszenz bei einer Anregung von 406 nm als Emission bei 604 nm. Parallel dazu wird eine Kalibriergerade erstellt mit frisch hergestellten Protoporphyrin IX-Lösungen (0-0,75 µM), aus der die Konzentration der Zellprobe an dieser Substanz abgelesen werden kann.

4.2.8 Enzymatische Quantifizierung des Glutathion-Gehaltes

Prinzip

Die verwendete Methode zur Bestimmung des gesamten Glutathions der Zelle wird von Griffith in dem Buch „*Methods of enzymatic analysis*“ (Griffith, 1985) beschrieben. Als Detektionsreagenz wird dabei 5,5'-Dithio-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, *Ellman's Reagenz*) verwendet, welches mit Thiolgruppen unter Bildung von 5'-Thio-(2-nitrobenzoesäure) (TNB) reagiert, wie in der ersten Zeile der Reaktionsgleichung (Abbildung 12) gezeigt wird. Dabei entsteht oxidiertes Glutathion (GSSG), das durch das Enzym Glutathionreduktase unter NADPH/H⁺-Verbrauch reduziert wird. Reduziertes Glutathion (GSH) kann nun erneut mit DTNB reagieren.



Abbildung 12: Reaktionsgleichungen zur Bestimmung von Glutathion mit DTNB-Reagenz (Griffith, 1985).

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

Durchführung

Eine Flasche (175 cm²) mit mindestens 10 Mio. Zellen wird abtrypsiniert, die Zellen werden in 10 ml Medium resuspendiert. Nach Zentrifugation bei 4 °C (1200 g, 10 min) wird der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml PBSCMF aufgenommen. Danach werden die Zellen wiederum zentrifugiert und in genau 5 ml PBSCMF resuspendiert. Anschließend bestimmt man die Zellzahl und zentrifugiert ein letztes Mal. Das Pellet wird entsprechend einer Zelldichte von 10 Mio. Zellen/ml in eisgekühltem TCA-Puffer aufgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Lyse der Zellen mit dem Ultraschall-Homogenisator (35 W, 3x20 Impulse, 10 kHz) zentrifugiert man die festen Zellbestandteile ab (4 °C, 10 min, 10000 g). Je nach erwarteter Glutathion-Konzentration werden 10-40 µl des Überstandes photometrisch vermessen. Dazu pipettiert man 700 µl Phosphat/NADPH-Lösung, 100 µl DTNB-Reagenz, und 10-40 µl Probelösung in eine Plastikkuvette (ad 1000 µl mit H₂O_{dest}). Nach jedem Pipettierschritt wird die Lösung durch Rühren mit der Pipettenspitze vermischt. Abschließend werden 2 µl Glutathionreduktase-Lösung hinzugefügt, danach wird sofort sowie alle 30 s für die nächsten zwei Minuten die Absorption bei 412 nm bestimmt. Zur Quantifizierung des Glutathions wird mit 5-40 µl einer 0,1 mM GSH-Lösung kalibriert.

4.2.9 Alkalischen Elution

Prinzip

Mit Hilfe der Alkalischen Elution lassen sich Einzelstrangbrüche, DNA-DNA- und DNA-Protein-Quervernetzungen in der DNA von Zellen quantitativ nachweisen. Durch Zugabe von Reparaturenzymen mit Glykosylase- und Endonuklease-Funktion lassen sich auch DNA-Modifikationen detektieren, die durch das Enzym zunächst entfernt werden. Anschließend setzt das Reparaturenzym an die Stelle der

entstandenen AP-Läsion einen Strangbruch, sodass im Ansatz mit Reparaturenzym zusätzliche Strangbrüche erscheinen. Die von *Kohn et al.* (Kohn, 1976) entwickelte Methode der Alkalischen Elution besitzt eine Empfindlichkeit von 1 Läsion/ 10^7 bp und ist somit besser zum Nachweis modifizierter DNA-Basen geeignet als vergleichbare Methoden, wie beispielsweise die HPLC/ECD-Analyse. Der Ablauf der Alkalischen Elution ist in Abbildung 13 schematisch dargestellt.

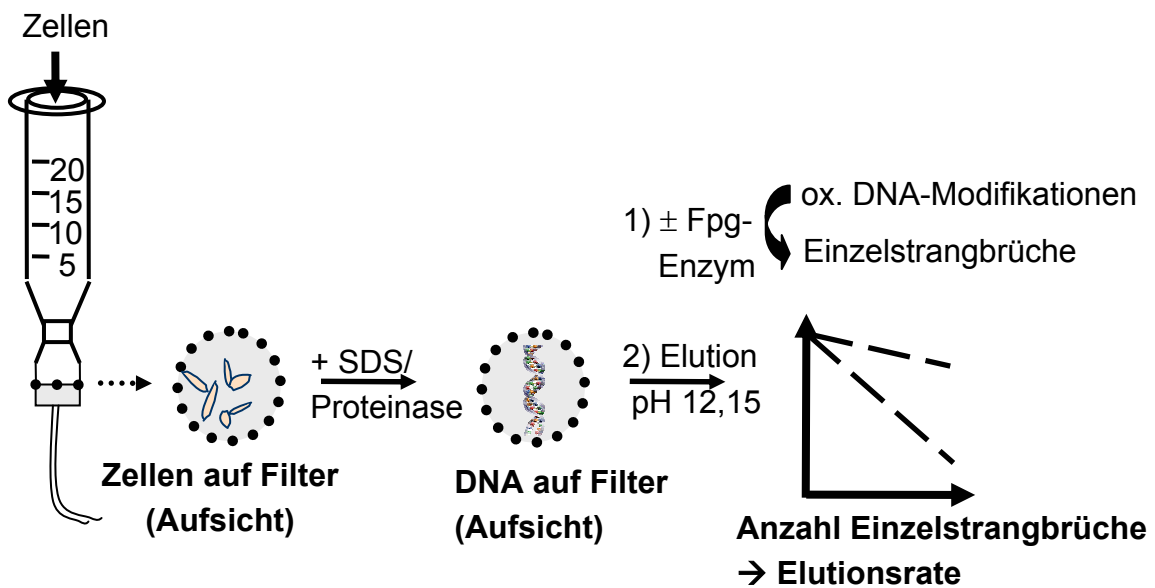


Abbildung 13: Prinzip der Alkalischen Elution.

Im ersten Schritt wird dabei eine Zellsuspension, die 1 Mio. Zellen enthält, durch eine Spritze auf einen Polycarbonatfilter aufgetragen. Bei 25 °C wird über 90 min eine Lyse der Zellen mit SDS- und Proteinase K-haltigem Puffer durchgeführt, sodass sich anschließend nur noch DNA auf dem Filter befindet. Nach dem Wegwaschen des Lysepuffers wird gegebenenfalls eine einstündige Inkubation mit DNA-Reparatur-Endonukleasen durchgeführt. Dabei werden DNA-Modifikationen durch die Enzyme erkannt und entfernt, es entsteht zunächst eine abasische Stelle (AP-Läsion). Im nächsten Schritt schneidet die Endonuklease das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA ein, sodass sich nun ein Einzelstrangbruch an der Stelle befindet, an der ursprünglich die DNA-Modifikation war. Das Erkennungsspektrum der verwendeten Reparatur-Endonukleasen ist in Tabelle 2 gezeigt.

Tabelle 2: Erkennungsspektrum von DNA-Modifikationen durch Reparatur-Endonukleasen.

Reparatur-Endonuklease	Basenmodifikationen
Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg)	7,8-Dihydro-8-oxoguanin, Formamido-Pyrimidine bzw. -Purine (= Fapy), abasische Stellen
T4 Endonuklease V	Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD), abasische Stellen

Abschließend wird nochmals gespült und die DNA wird mit einem alkalischen Elutionspuffer (pH 12,15) fraktioniert eluiert. Dabei geht die doppelsträngige DNA durch den alkalischen pH-Wert in die einzelsträngige Form über. Abhängig von ihrer Größe werden lange DNA-Fragmente, die wenig Einzelstrangbrüche enthalten, langsamer eluiert als kurzsträngige, stark geschädigte DNA-Bruchstücke. Die gesammelten Fraktionen werden zunächst neutralisiert, wobei sich die Einzelstränge der DNA wieder zu Doppelsträngen zusammenfinden. Der anschließend dazu pipettierte Fluoreszenzfarbstoff interkaliert in die DNA und lässt sich fluorimetrisch bestimmen. Aus dem Anteil der DNA in den einzelnen Fraktionen errechnet sich die Elutionsrate, die proportional dem Gehalt an Einzelstrangbrüchen ist. Dabei wird als Berechnungsgrundlage eine mit γ -Strahlung geschädigte Probe zugrunde gelegt (6 Gy erzeugen einen Einzelstrangbruch/ 10^6 bp) (Kohn, 1976).

Versuchsaufbau

Für jeden Ansatz wird an eine 25 ml-Einwegspritze (ohne Kolben) ein Filterhalter angebracht. Dieser lässt sich aufschrauben, auf dem unteren Teil wird ein Frittenboden befestigt, auf den schließlich der Polycarbonatfilter aufgelegt wird. Die Zellsuspension und alle verwendeten Lösungen werden von oben in die Einwegspritze pipettiert. Mit Hilfe einer Peristaltik-Mehrkanalpumpe wird die Flüssigkeit durch Spritze, Filterhalter und Filter über einen Dialyseschlauch in ein Abfallgefäß gepumpt. Im letzten Schritt, bei der Elution der DNA, wird anstelle des Abfallbehälters ein Fraktionssammler installiert, der an die Pumpe angeschlossen ist.

Durchführung

Die Frittenböden und die Polycarbonatfilter (Durchmesser der Poren: 2 μ m) werden mit $H_2O_{dest.}$ gespült wie im vorigen Absatz beschrieben in den Filterhalter eingebaut, der danach luftblasenfrei mit $H_2O_{dest.}$ befüllt wird. Ein Wasserbad wird so befestigt, dass die Filterhalter ganz eintauchen. Die Temperatur wird auf 4 °C eingestellt, um eine Reparatur der DNA-Schäden während des Auftragens der Zellen auszu-schließen. Nun werden die Zellen aufgearbeitet und als Zellsuspension aufgetragen (1 Mio. Zellen pro Filter, in einem Volumen von 1-5 ml). Zum Wegspülen von Mediumresten wird mit zweimal 5 ml kaltem PBSCMF gewaschen, gegen Ende des zweiten Spülvorgangs wird die Temperatur des Wasserbades auf 25 °C erhöht. Mit

der anschließenden Lyse der Zellen kann erst begonnen werden, sobald die Temperatur 15 °C erreicht hat, da das im Lysepuffer enthaltene SDS bei niedrigeren Temperaturen ausfallen würde. Nach Durchpumpen von 2 ml Lysepuffer bei maximaler Geschwindigkeit werden 5 ml Lysepuffer mit Proteinase K innerhalb von 90 min durch das System gesaugt. Nach der Lyse wird sieben Mal mit BE₁-Puffer gespült, beim Auftragen dieses Puffers mit der Multipette werden gleichzeitig die Wände der Spritze gereinigt. Während des Spülvorganges wird die Temperatur für die Enzyminkubation auf 37 °C erhöht. Zur Inkubation mit Fpg- bzw. T4 Endo V-Enzym werden jeweils 2 ml der frisch hergestellten Enzymverdünnungen aufgetragen. Die Spuren, in denen die Einzelstrangbrüche ohne Enzymzugabe quantifiziert werden sollen, werden mit 2 ml BE₁-Puffer befüllt. Der erste Milliliter der Lösung wird bei maximaler Geschwindigkeit durchgepumpt, der zweite innerhalb einer Stunde. Tabelle 3 zeigt die eingesetzten Enzymkonzentrationen.

Tabelle 3: *Verwendete Konzentrationen an Fpg- und T4 Endo V-Enzym.*

Reparatur- Endonuklease	Puffer	Enzymkonzentration Stammlösung	Endkonzentration an Enzym
Fpg-Rohextrakt bis Versuch HS-102AE	BE ₁ /BSA	1,3 mg/ml	1 µg/ml
Fpg-Rohextrakt ab Versuch HS-103AE	BE ₁ /BSA	690 µg/ml	1 µg/ml
T4 Endo V bis Versuch HS-191AE	BE ₁₅ /BSA	50 µg/ml	100 ng/ml
T4 Endo V ab Versuch HS-192AE	BE ₁₅ /BSA	3,36 mg/ml	1,12 µg/ml

Um die Reste der Enzyme zu entfernen, werden alle Spuren zweimal mit 5 ml BE₁-Puffer gespült, danach mit 4 ml Waschpuffer. Dabei wird die Temperatur des Wasserbades auf 25 °C eingestellt. Danach füllt man die Einwegspritzen mit 25 ml Elutionspuffer und eluiert mit einer Pumpgeschwindigkeit von 1,9 ml/h über 12 h. Durch den Fraktionswechsel, der alle zwei Stunden stattfindet, erhält man aus jeder Spur 6 Fraktionen mit je ca. 3,8 ml pro Reagenzglas. Der Überstand an Elutionspuffer, der sich nach der Elution noch auf den Filtern befindet, wird in die sechste Fraktion gepumpt. Zur Auswertung werden zunächst die Filterhalter auseinander gebaut. Dabei vereinigt man Fritte und Filter mit der sechsten Fraktion der jeweiligen Spur in einem Coulter CounterTM-Zählköcher und inkubiert unter Schütteln für 2 Stunden bei 60 °C. Dadurch bringt man die auf dem Filter verbliebene DNA in Lösung. Nach der Inkubation wird eine den anderen Fraktionsvolumina entsprechende Menge (3,8 ml) der Lösung entnommen und wie diese aufgearbeitet. Jedes Reagenzglas mit DNA-Lösung wird mit einer dem Fraktionsvolumen entsprechenden Menge (3,8 ml) an Phosphatpuffer I (pH 6, Raumtemperatur) versetzt. Nach einer

Inkubationszeit von 15 min bei Raumtemperatur ist der Neutralisierungsprozess beendet. Nun wird das gleiche Volumen an Phosphatpuffer II (pH 7,2)/Bisbenzimid (1,5 µM) zugesetzt und erneut 15 min unter Ausschluss von Licht bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Messung der Bisbenzimid-Fluoreszenz in den einzelnen Ansätzen werden 2,7 ml der Lösung in eine Quarzküvette überführt und nach einer Anregung bei 360 nm die Emission bei 450 nm bestimmt. Das Fluorimeter wird dazu zuvor mit einer Blindprobe aus je 3,8 ml Elutionspuffer, Phosphatpuffer I, Phosphatpuffer II/Bisbenzimid (1,5 µM) auf Null eingestellt. Weiterhin werden die Fraktionen einer Elutionsspur ohne DNA mit vermessen und die Fluoreszenz-Intensitäten dieser einzelnen Fraktionen von den jeweiligen Spuren mit DNA subtrahiert. Der Berechnung der Einzelstrangbrüche in den jeweiligen Spuren liegt zugrunde, dass sich die Summe der Fluoreszenzeinheiten aller Fraktionen einer Spur proportional zur Gesamtmenge an DNA dieses Ansatzes verhält. Wird die DNA-Menge der einzelnen Fraktionen halblogarithmisch gegen den Zeitverlauf aufgetragen, ergibt sich daraus eine Gerade, deren Steigung proportional zur Anzahl Einzelstrangbrüche zunimmt. Aus einer Kalibrierung unserer Elutionsanlage mit γ -bestrahlten Zellen lässt sich folgende Geradengleichung ableiten, mit der sich die absolute Anzahl Einzelstrangbrüche (SSB) errechnen lässt (Epe, 1993):

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

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

4.2.10 Reparatur von DNA-Modifikationen

Die Versuchsansätze, die zur Reparatur bestimmt sind, müssen eine bestimmte Zeit vor der Aufarbeitung geschädigt werden (z.B. vier Stunden für einen 4 h-Reparaturwert). Danach werden sie in Vollmedium im Brutschrank aufbewahrt (37 °C, 5 % CO₂). Zusätzlich zu diesen Ansätzen und der Kontrolle mit den ungeschädigten Zellen wird eine weitere Flasche mit Zellen vorbereitet. Diese wird direkt vor der Aufarbeitung (zum Zeitpunkt $t=0$) geschädigt. Nach Durchführung der Alkalischen Elution wird die Anzahl induzierter DNA-Modifikationen im geschädigten Ansatz ohne Reparatur ($t=0$) mit 100 % Schaden gleichgesetzt. Die Restschäden in den Ansätzen, bei denen Reparatur stattgefunden hat, werden prozentual dazu berechnet. Bei langen Reparaturzeiten (in der Regel ≥ 8 h), während denen eine Teilung der Zellen stattfinden kann, muss die dadurch entstehende Verdünnung des DNA-Schadens berücksichtigt werden. Dies geschieht mit Hilfe des so genannten Proliferationsfaktors. Um diesen zu bestimmen, wird für jede lange Reparaturzeit eine zusätzliche Flasche mit der gleichen Anzahl Zellen angesetzt. Während nun der zur Reparatur bestimmte Ansatz geschädigt wird, arbeitet man die zugehörige zusätzliche Flasche auf und quantifiziert in dieser die Zellzahl (N_1). Sobald der Reparatur-Ansatz aufgearbeitet wird, bestimmt man auch hier die Zahl der Zellen (N_2). Der Prolifera-

tionsfaktor (PF) errechnet sich aus dem Quotienten von N_2/N_1 . Für den Fall, dass sich durchschnittlich alle Zellen einmal geteilt haben, wäre $PF = 2,0$. Ein Proliferationsfaktor von eins würde bedeuten, dass keine Teilung stattgefunden hat. Ist $PF < 1$, war die Behandlung cytotoxisch, es sind mehr Zellen abgestorben als durch Teilung der verbleibenden Zellen kompensiert werden konnte. Unter diesen Umständen muss abgewogen werden, ob eine weitere Berechnung noch sinnvoll ist. Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich Versuche verwendet, bei denen der Proliferationsfaktor größer als 0,8 war. Der errechnete Proliferationsfaktor wird mit dem Restschaden multipliziert und das gemessene Ergebnis auf diese Weise korrigiert.

4.2.11 Bestimmung der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität mittels *Cleavage-Assay*

Prinzip

Um zu überprüfen, inwieweit eine Zelle dazu in der Lage ist, oxidative Basenmodifikationen wie 8-oxoG in der DNA zu erkennen und zu reparieren, bietet sich ein *Cleavage Assay* an. Dabei wird mit einem 34mer-Oligonukleotid gearbeitet, das als Substrat ein einzelnes 8-oxoG aufweist. Inkubiert man aus Zellen gewonnene Proteinextrakte mit dem Oligonukleotid, und besitzen diese Extrakte eine funktionierende 8-oxoG-Glykosylase, wird 8-oxoG entfernt, und man erhält ein kürzeres Oligonukleotid. Im vertikalen, 20 %igen Acrylamid-Gel lassen sich die beide Oligonukleotid-Formen (geschnitten und nicht geschnitten) durch unterschiedliches Wanderungsverhalten im elektrischen Feld voneinander auftrennen. Zur Detektion und Quantifizierung wird das Oligonukleotid vor dem Versuch mit ^{32}P -Labelling markiert.

Durchführung

Der *Cleavage Assay* wurde durchgeführt wie bei *Vidal et al.* (Vidal, 2001) beschrieben. Zunächst wird das 34mer-Oligonukleotid radioaktiv markiert. Dazu werden 2 μl des Oligonukleotids (10 pmol/ μl) in einem 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 8 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$, 5 μl ^{32}P -ATP (50 μCi), 4 μl Mercaptoethanol (10 X), 4 μl PNK-Puffer (10 X), 15 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ und 1 μl T4-PNK-Kinase (9 u/ μl) während einer Stunde im 37 °C-Wasserbad inkubiert. Direkt danach wird das markierte Oligonukleotid aufgereinigt, um überschüssiges ^{32}P -ATP zu entfernen. Hierfür fügt man 10 μl Glycogen, 150 μl TE-Puffer, 55 μl NaCl (5 M), 20 μl SDS (10 %) und 300 μl Chloroform/Ethanol (1:1) hinzu und durchmischt die Lösung eine Minute auf einem Vortex-Gerät. Anschließend stellt man die Mischung 2 min auf Eis. Danach zentrifugiert man das Reaktionsgefäß bei 4 °C und 12000 g für 2 min. Zum wässrigen Überstand gibt man 5 μl Acrylamid (0,25 %) und 1 ml Ethanol, vortext kurz und zentrifugiert für 30 min

unter den gleichen Bedingungen, um die DNA auszufällen. Nun wird der Überstand vorsichtig entfernt und die Oligonukleotide getrocknet, indem man das Reaktionsgefäß mit offenem Deckel unter dem Abzug eines Radioaktiv-Labors für 1-2 Stunden stehen lässt. Das trockene Pellet wird in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und gut gevortext. Zur anschließenden Hybridisierung mit einem komplementären Oligonukleotid werden 5 µl des markierten, 8-oxoG-haltigen Stranges (Annahme: enthält noch ca. 1 pmol/µl) mit 2,5 µl des Komplementärstranges (1 nM/µl) und 15 µl TE-Puffer für 15 min im Heizblock (90 °C) inkubiert. Danach wird die Lösung langsam abgekühlt, zunächst auf Raumtemperatur, dann auf Eis, schließlich auf -20 °C. Die Herstellung der Zellpellets bzw. der daraus gewonnenen Zellextrakte ist in den Kapiteln 4.2.3 und 4.2.4 beschrieben.

Zur Messung der 8-oxoG-Cleavage-Aktivität der Zellextrakte wird bis zu 4 µl des Extraktes (Proteingehalt: 2-20 µg) mit 10 µl Oligonukleotid-Lösung (25 fmol) vermengt und mit Lysepuffer/AAL auf 14 µl aufgefüllt. Als Negativkontrolle werden nur 4 µl Lysepuffer/AAL mit dem Oligonukleotid inkubiert, bei der Positivkontrolle werden 0,5 µl Ogg1-Lösung (0,5 mg/ml) und 3,5 µl Lysepuffer/AAL eingesetzt. Die Ansätze werden bei 37 °C für 20-60 min im Wasserbad inkubiert. Bei Proben mit unbekannter Ogg1-Konzentration empfiehlt sich eine Messreihe mit Inkubationszeiten von 20-60 min. Während der Inkubation kann das Polyacrylamid-Gel gegossen werden. Dazu pipettiert man zu 6 ml des Polyacrylamid-Mixes 60 µl APS (10 %) und 6 µl TEMED. Nach kurzem Schwenken wird die Lösung in die vorbereitete Gelkammer gegossen und der Kamm angebracht. Das Aushärten des Gels dauert etwa 20 min. Nach der Inkubation der Oligonukleotide mit den Zellextrakten wird in jeden Ansatz 4 µl Stopp-Puffer zupipettiert, kurz gevortext und herunterzentrifugiert. Anschließend werden die Reaktionsgefäße 5 min lang bei 95 °C im Heizblock erhitzt, um die DNA zu denaturieren. Danach werden die Ansätze einige Minuten auf Eis aufbewahrt. Ist das Gel ausgehärtet, werden die Kämmen entfernt und die Geltaschen mit entmineralisiertem Wasser ausgespült. Der Gelträger wird in die Kammer eingespannt und diese wird mit TBE-Puffer (1X) aufgefüllt. Nach Aufbringen der Proben legt man für 40 min eine Spannung von 400 V an. Zur Detektion der Oligonukleotide wird ein Film mit dem Gel in einer entsprechenden Belichtungskassette mindestens 45 min lang exponiert. Danach entnimmt man den Film und scannt mit Hilfe eines Storm Phospho-Imagers ab. Aus dem Intensitätsverhältnis der Bande des intakten 34-mer-Oligonukleotids zu der des geschnittenen 16-mers wird die Cleavage-Aktivität des Extraktes berechnet.

4.2.12 *Western-Blot* mit Ogg1-Antikörper

Prinzip

Mittels *Western-Blot* kann man überprüfen, ob ein Zellextrakt ein bestimmtes Protein (in diesem Fall Ogg1-Protein) enthält. Dazu werden die Proteine des Extrakts zunächst mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Anschließend werden sie durch Anlegen einer Spannung auf eine Membran transferiert („geblottet“). Auf dieser Membran lassen sich die Proteine über eine immunologische Reaktion mit den entsprechenden Antikörpern nachweisen.

Durchführung

Zunächst werden analog der Beschreibung in den Kapitel 4.2.3 bzw. 4.2.4 Zellpellets und daraus Zellextrakte hergestellt. Für die elektrophoretische Auftrennung der Proteine wird zunächst ein *Running* Gel nach der Anleitung in Kapitel 4.1.7.10 gemischt und in den vorbereiteten Gel-Gießstand gegossen. Sobald das Gel ausgehärtet ist, werden die Zutaten für das *Stacking* Gel (Kapitel 4.1.7.10) vermengt und die Mischung auf das ausgehärtete *Running* Gel gegeben. Vor dem Aushärten muss noch der Kamm angebracht werden. Während das Gel aushärtet, werden die Proben vorbereitet. Bis zu 10 µl des zu untersuchenden Proteinextrakts mit umgerechnet maximal 50 µg Gesamtprotein werden in ein Reaktionsgefäß vorgelegt. Dazu werden 10 µl des Ladepuffers (2 X) pipettiert und gegebenenfalls mit destilliertem Wasser zu einem Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Für die Positivprobe mit Ogg1-Protein werden 4 ng eingesetzt, die in 10 µl von Ogg1-Verdünnung (400 ng/ml) enthalten sind, und mit 10 µl Ladepuffer (2 X) versetzt. Zusätzlich werden ein Ansatz mit Protein-Längenstandard (8 µl) und eine Negativkontrolle (10 µl dest. Wasser plus 10 µl Ladepuffer (2 X)) vorbereitet. Alle Proben werden für 5 min bei 95 °C denaturiert (danach nicht auf Eis stellen!). Nach dem Auftragen der Proben auf das Gel legt man für 1 Stunde und 15 Minuten eine Spannung von 250 V an. Kurz vor Ende der Elektrophorese bereitet man die Whatman-Papiere (vier Stück, vorgeschritten auf eine Größe von 7x10 cm) und die Membran vor, indem man sie in einem Gefäß mit Transfer-Puffer für 10 min bei 4 °C aufbewahrt. Die Membran sollte nur mit behandschuhten Fingern angefasst werden. Sobald die Elektrophorese beendet ist, wird das Gel entnommen und die rechte untere Ecke abgetrennt. Danach wird das Gel ebenfalls in einem anderen Gefäß mit Transfer-Puffer 5 min im Kühlschrank inkubiert. Nun wird der Transfer-„Sandwich“ gebildet, dabei ist darauf zu achten, dass zwischen den einzelnen Schichten, insbesondere zwischen Gel und Membran, keine Blasen auftreten. In eine Schale mit Transfer-Puffer werden zunächst zwei Whatman-Papiere gelegt, darauf das Gel. Darüber legt man die Membran, die an der gleichen Ecke wie das Gel eingeschnitten wird. Schließlich werden die restlichen beiden Whatman-Papiere oben auf den Stapel geschichtet. Der ganze „Sandwich“ wird so in eine Blotting-Apparatur zwischen die Elektroden eingebracht, dass das Gel näher zur Anode, die Membran

näher zur Kathode ist. Die Blotting-Kammer wird mit kaltem Transfer-Puffer befüllt und in einen Kälteraum gestellt. Es wird über eine Stunde eine Strömstärke von 250 mA angelegt. Durch die angelagerten SDS-Moleküle besitzen die Proteine eine negative Ladung und wandern zur Kathode. Dabei werden sie vom Gel auf die Membran transferiert. Nach dem Blot wird die Membran mit Ponceau Rouge S einige Minuten unter Schwenken angefärbt, um den Transfer der Proteine zu überprüfen. Zur Entfärbung wird die Membran anschließend mit entmineralisiertem Wasser gewaschen. Um die Proteine auf der Membran zu fixieren, wird sie mit Blockierungslösung (5 ml *Western Blocking-Reagent* in 45 ml PBST) behandelt (entweder eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C). Danach wird die Membran gewaschen, indem sie dreimal mit ca. 10 ml PBST unter leichtem Schwenken für 5 min bei Raumtemperatur aufbewahrt wird. Zur Behandlung mit dem Antikörper wird zunächst die Antikörperlösung I hergestellt und die Membran darin zwei Stunden bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert (es kann auch über Nacht bei 4 °C inkubiert werden). Anschließend wird wiederum mit PBST gewaschen, und zwar zweimal für 5 min und danach dreimal für 15 min (bei Raumtemperatur unter Schütteln). Nun wird die Antikörperlösung II angesetzt und zur Membran gegeben, die darin eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken aufbewahrt wird. Danach wird unter den gleichen Bedingungen dreimal für 15 min und zweimal für 5 min mit PBST gewaschen. Zum Sichtbarmachen der Immunreaktion wird das *Western Detection Kit* gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wird die Membran auf eine Zellophan-Folie in eine Belichtungskassette gelegt. In ein mit Alufolie eingewickelttes Röhrchen werden 2 ml der Lösung A und 20 µl der Lösung B pipettiert. Danach wird das Röhrchen schnell verschlossen, kurz geschwenkt und die Mischung auf die Membran gegeben. Nach genau einer Minute wird das überschüssige Reagenz mittels Abtropfen auf ein Papiertuch entfernt, die Membran zügig und blasenfrei mit Zellophanfolie bedeckt und mit Klebeband in der Kassette fixiert. Nun muss die Kassette sofort geschlossen werden, um Lichteinfall zu vermeiden. In einer Dunkelkammer wird ein Film zur Belichtung in die Kassette gelegt und nach 5-30 min wieder entnommen. Es können auch mehrere Filme hintereinander mit unterschiedlichen Expositionszeiten belichtet werden. Anschließend wird der belichtete Film für ca. 2 min in ein Entwicklungsbad gelegt, danach für eine halbe Minute in entmineralisiertes Wasser und zum Schluss für mehrere Minuten in ein Fixierbad. Nach gutem Abspülen unter fließendem entmineralisiertem Wasser wird der Film zum Trocknen aufgehängt.

4.2.13 Quantifizierung von Mikrokernen

Prinzip

Mikrokerne sind definiert als Abspaltungen von Zellkernen. Diese Bruchteile des Kerns können entweder ganze Chromosomen oder Chromosomenfragmente

enthalten. Substanzen, die zur Abspaltung von ganzen Chromosomen führen, bezeichnet man als „aneugen“, während Stoffe, die chromosomenbrechende Wirkung zeigen, auch „klastogen“ genannt werden. Quantitative Mikrokern-Testsysteme erlauben daher eine Abschätzung des gentoxischen Potentials von Agenzien (Romagna, 1993). Voraussetzung für die Bildung eines Mikrokernes ist die Teilung der Zelle. Daher wartet man nach der Inkubation mit der zu untersuchenden Testsubstanz eine so genannte *Recovery*-Phase ab, in der die Zellen proliferieren und Mikrokern ausbilden. Zur quantitativen Auswertung wird die Anzahl Mikrokern ausgezählt und auf die Anzahl Zellkerne bezogen. In der Regel wird bei *in vitro*-Testsystemen ein Stichprobenumfang von 1000-2000 doppelkernigen Zellen pro Ansatz analysiert (Romagna, 1993).

Durchführung

In eine kleine Zellkulturflasche (25 cm²) werden mindestens 24 Stunden vor dem Versuch 300.000-500.000 Zellen ausgesät. Die genaue Zahl ist abhängig von der Zellgröße, es muss noch ausreichend Platz für eine Verdopplung vorhanden sein. Nach der Schädigung der Zellen unter sterilen Bedingungen am folgenden Tag wird frisches Medium in die Kulturflasche gegeben und diese während der *Recovery*-Phase im Brutschrank aufbewahrt (5 % CO₂, 37 °C). Die Dauer der *Recovery*-Phase richtet sich nach der Verdopplungszeit der Zellen, die zuvor bestimmt werden muss. Im Fall der M8,99-Melanomzellen wurde ein *Recovery*-Zeit von 24 Stunden eingehalten, bei den F8,99-Hautfibroblasten dauerte sie 48 h. Nach der Verdopplungsphase wird die Cytospin-Zellzentrifuge mit beschrifteten Objektträgern, Filterkärtchen und Trichtern bestückt, und die Zellen werden wie gewohnt mittels Trypsin abgelöst und in Medium aufgenommen. Man pipettiert etwa 5 Tropfen der Zellsuspension in jeden Trichter und schleudert die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 1000 rpm, *high accel*) auf die Objektträger. Auf diese Weise stellt man 6 Objektträger pro Ansatz her, die nach der Zentrifugation sofort in auf -20 °C vorgekühlte Fixierkammern mit Methanol gestellt werden. Nach mindestens einer Stunde Fixierung in Methanol können die Zellkerne angefärbt werden. Dazu inkubiert man die Objektträger für etwa 30 s in einer Färbekammer mit PBSCMF/Bisbenzimid-Lösung. Anschließend taucht man sie mit Hilfe einer Pinzette für jeweils 1-2 min in zwei PBSCMF-Waschlösungen. Das überschüssige PBSCMF wird nach kurzem Abtropfen mittels Papiertuch entfernt, dabei ist darauf zu achten, dass die aufgeschleuderten Zellen nicht berührt werden. Nun wird 10 µl einer Eindecklösung auf die Zellen pipettiert und ein Deckgläschen möglichst luftblasenfrei darüber gelegt. Bei der anschließenden Betrachtung im Mikroskop sind Kerne und Mikrokern blau eingefärbt, durch Interkalation des Bisbenzimid in die DNA. Pro Ansatz werden drei Objektträger mit ca. 1000-2000 Zellkernen sowie die dazugehörigen Mikrokern ausgezählt. Bei einem Versuch mit sechs Ansätzen würden beispielsweise 18 Objektträger mit 18.000-36.000 Zellkernen gezählt. Die Ergebnisse der drei Zählungen pro Ansatz werden gemittelt. Aus den Mittelwerten von drei unabhängig

durchgeführten Versuchen wird wiederum ein Mittelwert mit Standardabweichung berechnet. In Abbildung 14 ist eine typische Aufnahme von Zellkernen mit Mikrokern (Pfeil) gezeigt.

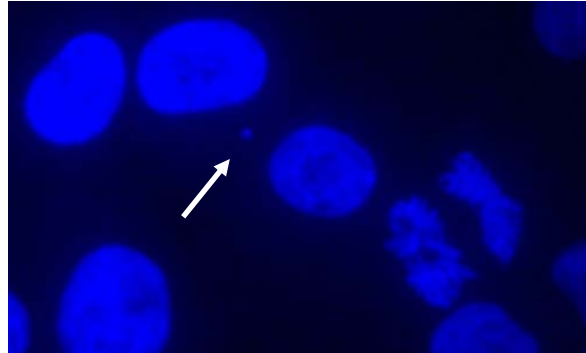


Abbildung 14: Zellkerne mit Mikrokern in M8,99-Melanomzellen. Die DNA wurden wie oben im Text beschrieben mit Bisbenzimid-Lösung (Hoechst No. 33258) angefärbt.

4.2.14 Statistische Auswertung

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

5 ERGEBNISSE

5.1 Suszeptibilität von Melanomzellen gegenüber der Induktion oxidativer DNA-Modifikationen

Für die Untersuchung der Entstehung des malignen Melanoms ist es von Interesse, ob Melanomzellen bzw. gesunde Hautzellen von Melanompatienten eine erhöhte Suszeptibilität für die oxidative DNA-Schädigung aufweisen. Dazu sollten folgende Parameter untersucht werden:

- a) die Anzahl oxidativer DNA-Modifikationen in unbehandelten Zellen,
- b) die Zahl der durch eine einmalige Dosis an sichtbarem Licht (Halogenlampe, 675 kJ/m^2) zusätzlich induzierten oxidativen DNA-Modifikationen und
- c) die Reparaturgeschwindigkeit Licht-induzierter oxidativer DNA-Schäden

5.1.1 Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen

Zunächst wurde der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen in Melanomzellen und Hautfibroblasten von Melanompatienten untersucht. Auf diese Weise lassen sich einerseits Unterschiede der Anzahl oxidativer DNA-Schäden zwischen unterschiedlichen Zellsorten des gleichen Patienten (*intraindividuelle* Unterschiede) bestimmen. Zum anderen kann man auch *interindividuelle* Schwankungen der oxidativen DNA-Modifikationen messen, indem man die Ergebnisse unterschiedlicher Patienten für die gleiche Zellsorte vergleicht.

Für die Versuche wurden Melanomzellen und Fibroblasten von drei verschiedenen Melanompatienten mit der Alkalischen Elution vermessen. Dabei wurde zur Detektion oxidativer DNA-Modifikationen Fpg-Enzym eingesetzt. Fpg erkennt diese DNA-Schäden und entfernt sie unter Hinterlassung eines Einzelstrangbruchs. Die Zahl der Fpg-induzierter Strangbrüche kann durch die Alkalische Elution der DNA bestimmt werden, da geschädigte DNA mit Einzelstrangbrüchen (*single strand breaks, ssb*) schneller eluiert wird (zur genauen Durchführung vgl. Kapitel 4.2.9). In keinem der drei Zellpaare ergab sich ein Unterschied zwischen den Hintergrundspiegeln oxidativer DNA-Modifikationen in Melanomzellen und Fibroblasten (Abbildung 15). Tendenziell besitzen die Fibroblasten einen höheren Hintergrundspiegel an oxidativen DNA-Schäden, der Unterschied ist jedoch nicht signifikant.

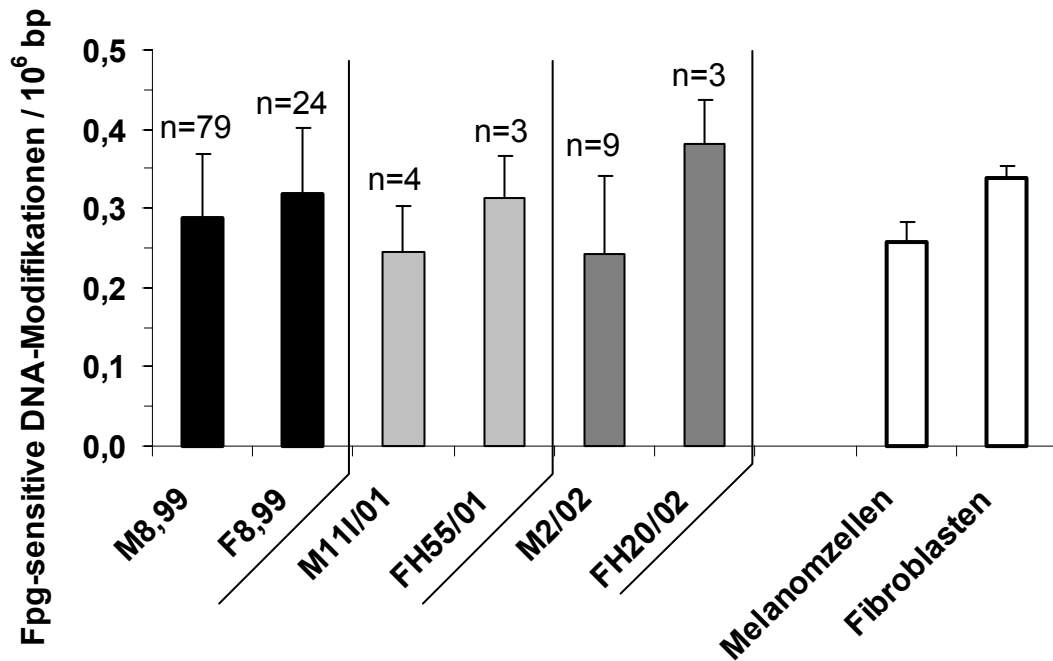


Abbildung 15: Hintergrundpiegel Fpg-sensitiver oxidativer DNA-Modifikationen in Melanomzellen (M) und Hautfibroblasten (F) aus drei verschiedenen Melanompatienten. Zellen des gleichen Patienten sind in derselben Farbe dargestellt. Die durchsichtigen Balken rechts in der Grafik sind die berechneten Mittelwerte aus den Melanomzellen (M8,99; M11/01; M2/02) bzw. Fibroblasten (F8,99; FH55/01; FH20/02).

Es existieren also weder intra- noch interindividuelle signifikante Unterschiede zwischen den Hintergrundspiegeln oxidativer DNA-Modifikationen in Melanomzellen und Fibroblasten der drei Melanompatienten. Es ist aber denkbar, dass sich die Hautzellen von an malignem Melanom erkrankten Menschen von denen gesunder Probanden hinsichtlich ihrer Anzahl an oxidativen DNA-Modifikationen unterscheiden. Um festzustellen, ob Hautfibroblasten von Melanompatienten mehr oxidative DNA-Schäden besitzen als Fibroblasten von gesunden Probanden, wurden primäre Hautfibroblasten von sieben Patienten mit der Alkalischen Elution analysiert. Die Mittelwerte sind in Abbildung 16 gezeigt.

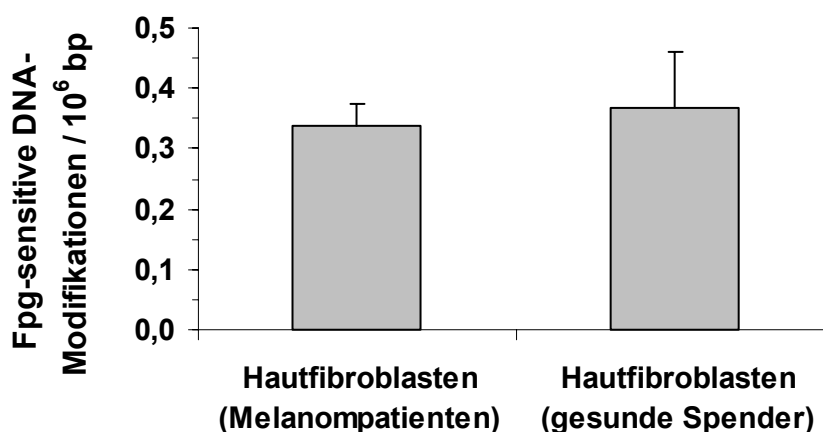


Abbildung 16: Oxidative DNA-Modifikationen in Hautfibroblasten von Melanompatienten (Daten aus Abbildung 15) und gesunden Spendern (Mittelwert aus 7 Probanden (jeweils n=3)).

Die Mittelwerte der gemessenen Hautfibroblasten aus Melanompatienten und gesunden Spendern sind nahezu identisch. Da die Probanden unterschiedlich alt waren, wurde auch untersucht, ob dieser Parameter einen Einfluss auf das Ergebnis besitzt. Der Zusammenhang zwischen der Anzahl oxidativer DNA-Modifikationen in humanen Hautfibroblasten und dem Alter der Spender ist in Abbildung 17 dargestellt.

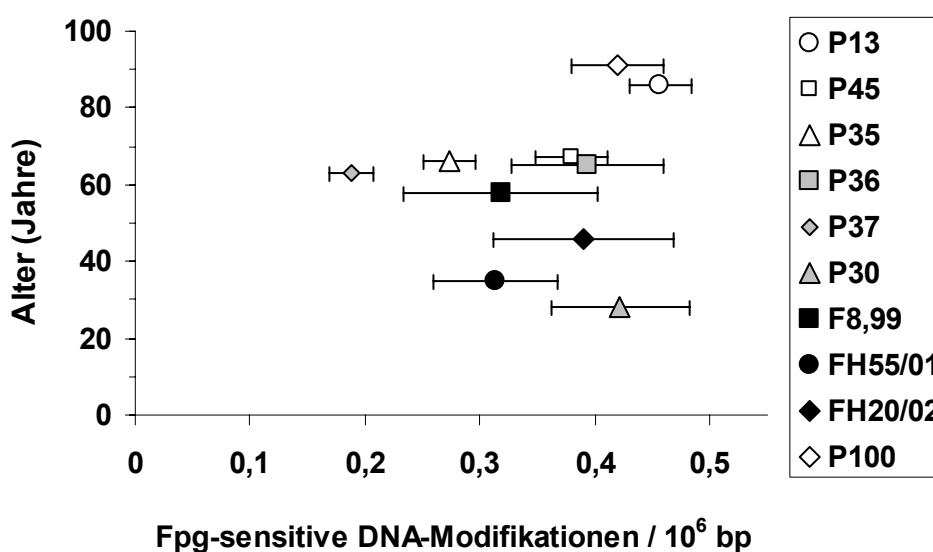


Abbildung 17: Abhängigkeit der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen vom Alter, Messung in Hautfibroblasten. Fibroblasten von Melanompatienten sind schwarz dargestellt. Die Daten für die Hautfibroblasten aus Melanomzellen sind aus Abbildung 15 übernommen.

Es zeigte sich, dass die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen in Hautfibroblasten unabhängig von Alter und der Erkrankung am malignen Melanom variieren. Dies spricht dafür, dass in den Melanompatienten hinsichtlich des Hintergrundspiegels dieser Schäden keine Anomalie vorliegt, das heißt das

Gleichgewicht zwischen Bildung und Entfernung dieser Modifikationen nicht gestört ist.

Da im Rahmen dieser Arbeit die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen von 24 verschiedenen Zellen vermessen wurden, ist eine Gegenüberstellung der Daten interessant, um mögliche Abhängigkeiten dieser DNA-Schäden zwischen Zellen unterschiedlicher Gewebe und Herkunft aufdecken zu können. Besonders aufschlussreich könnte der Vergleich zwischen Hautzellen und anderen Geweben sein. Tabelle 4 zeigt die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen in den untersuchten Säugerzellen.

Tabelle 4: Übersicht über die Hintergrundspiegel Fpg-sensitiver Läsionen in den untersuchten Säugerzellen (gemessen mit der Alkalischen Elution). Die Werte sind nach zunehmendem Schadensausmaß sortiert. Zellen von Melanompatienten sind grau unterlegt, diese Daten wurden bereits in Abbildung 15 gezeigt. Die Daten für die Hautfibroblasten gesunder Spender wurden aus Abbildung 17 übernommen.

Zellname	Herkunftsorganismus	Zellart	Anzahl der Messungen	Fpg-sensitive DNA-Modifikationen / 10^6 bp
HeEB1	Mensch	Cervixkarzinomzellen	4	$0,18 \pm 0,03$
P37	Mensch	Primäre Hautfibroblasten	3	$0,18 \pm 0,02$
HeLa wt	Mensch	Cervixkarzinomzellen	24	$0,19 \pm 0,06$
BJpar	Mensch	Primäre Vorhautfibroblasten	3	$0,20 \pm 0,08$
HeLa $\rho 0$	Mensch	Cervixkarzinomzellen	7	$0,20 \pm 0,05$
143B wt	Mensch	Osteosarkomzellen	4	$0,20 \pm 0,08$
143B $\rho 0$	Mensch	Osteosarkomzellen	3	$0,22 \pm 0,04$
BJ5te	Mensch	Primäre Vorhautfibroblasten, Telomerase-transfiziert	11	$0,23 \pm 0,07$
M11I/01	Mensch	Primäre Melanomzellen	4	$0,25 \pm 0,06$
CRY wt	Maus	Embryofibroblasten	7	$0,26 \pm 0,09$
M2/02	Mensch	Primäre Melanomzellen	9	$0,27 \pm 0,13$
CRY k.o.	Maus	Embryofibroblasten	7	$0,28 \pm 0,12$
M8,99	Mensch	Primäre Melanomzellen	79	$0,29 \pm 0,08$
AS52	Chinesischer Hamster	Ovariienzelllinie	19	$0,31 \pm 0,08$
FH55/01	Mensch	Primäre Hautfibroblasten	3	$0,31 \pm 0,05$
P35	Mensch	Primäre Hautfibroblasten	3	$0,31 \pm 0,11$
F8,99	Mensch	Primäre Hautfibroblasten	24	$0,32 \pm 0,08$
MRC-5	Mensch	Lungenfibroblasten	14	$0,32 \pm 0,09$
P45	Mensch	Primäre Hautfibroblasten	4	$0,38 \pm 0,03$

FH20/02	Mensch	Primäre Hautfibroblasten	3	0,38 ± 0,06
P36	Mensch	Primäre Hautfibroblasten	3	0,39 ± 0,02
P100	Mensch	Primäre Hautfibroblasten	3	0,42 ± 0,04
P30	Mensch	Primäre Hautfibroblasten	3	0,42 ± 0,04
P13	Mensch	Primäre Hautfibroblasten	3	0,46 ± 0,03

Zwischen den Hintergrundspiegeln der Zellen besteht eine Variationsbreite von 0,18-0,46 Fpg-sensitive DNA-Modifikationen / 10^6 bp. Die niedrigsten Werte sind bei den Cervixkarzinom- und Osteosarkomzellen zu finden, sowie bei den Vorhautfibroblasten. Die drei untersuchten Nagerzelllinien sind im mittleren Bereich eingeordnet, ebenso die Melanomzellen. Schäden von 0,38 Fpg-sensitiven Modifikationen / 10^6 bp und darüber wurden nur bei menschlichen primären Hautfibroblasten gemessen. Insgesamt fällt auf, dass die Zahl oxidativer DNA-Modifikationen in primären Hautfibroblasten am stärksten variiert. Hier gibt es erhebliche, signifikante ($p < 0,05$) Unterschiede zwischen den einzelnen Spendern.

5.1.2 Suszeptibilität von Melanomzellen gegenüber sichtbarem Licht

Zusätzlich zur Messung des Hintergrundspiegels oxidativer DNA-Modifikationen, der ein Gleichgewicht zwischen Entstehung und Beseitigung endogen induzierter ROS widerspiegelt, war es auch von Interesse, die Sensitivität von Melanomzellen und Hautfibroblasten gegenüber einer exogenen Induktion reaktiver Sauerstoffspezies zu testen. Als Quelle exogener Schädigung liegt es nahe, auf eine Bestrahlung mit Licht zurückzugreifen, da durch Strahlen besonders im sichtbaren Bereich des Sonnenspektrums oxidative Modifikationen in der DNA induziert werden und eine ständige Exposition der Hautzellen gegenüber sichtbarem Licht besteht. Melanomzellen und Fibroblasten der drei gleichen Spender wurden daher mit einer einmaligen Dosis (675 kJ/m^2) an sichtbarem Licht (Halogenlampe, 1000 W) bestrahlt und danach gemäß dem Protokoll für die Alkalische Elution (siehe Kapitel 4.2.9) aufgearbeitet (Abbildung 18).

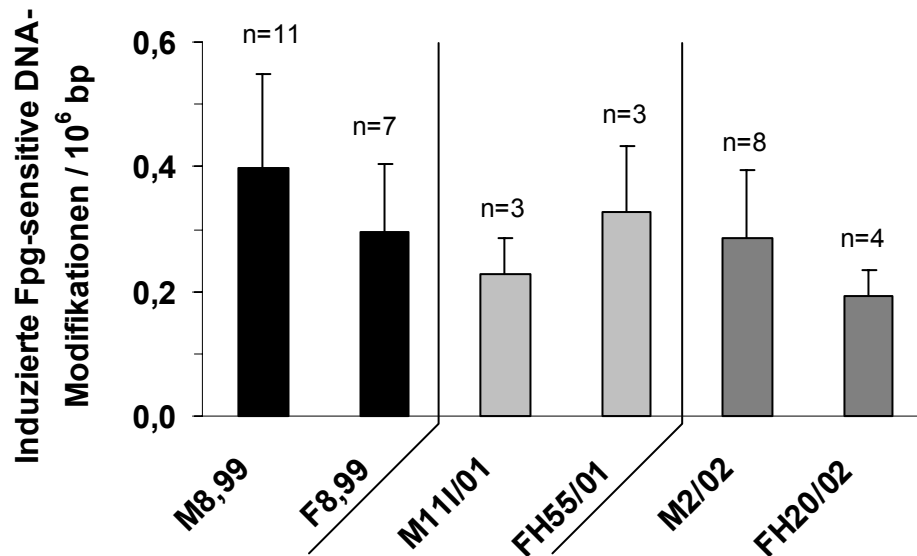


Abbildung 18: Sensitivität von Melanomzellen (M) und Fibroblasten (F) des jeweils gleichen Spenders gegenüber einer einmaligen Bestrahlung mit sichtbarem Licht. Die Bestrahlung wurde wie in Kapitel 4.2.2.1 beschrieben durchgeführt. Es wurde über 30 min lang bestrahlt, dies entspricht einer Dosis von 675 kJ/m². Zellen des gleichen Patienten sind in derselben Farbe dargestellt.

Das sich aus diesen Messungen ergebende Bild war uneinheitlich. Während bei zwei Patienten die Melanomzellen sensitiver auf die Bestrahlung reagierten, wurde in einem Fall im Hautfibroblast ein höherer Schaden induziert. Statistisch gesehen gab es weder einen signifikanten Unterschied zwischen den Zellen des gleichen Patienten, noch zwischen dem Mittelwert von Melanomzellen und Fibroblasten (nicht gezeigt). Eine einmaligen Bestrahlung mit einer moderaten Dosis an sichtbarem Licht (675 kJ/m²) induziert demnach etwa gleich viele oxidative DNA-Modifikationen (ca. $0,288 \pm 0,073/10^6$ bp) in Melanomzellen und Fibroblasten.

5.1.3 Reparatur oxidativer DNA-Schäden

Die Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen sollte in dieser Arbeit im Hinblick auf zwei Aspekte untersucht werden. Einerseits war es von Interesse, die Reparaturkapazitäten von Melanomzellen und Hautfibroblasten zu untersuchen. Variationen in der Reparaturkapazität zwischen Melanomzellen und Fibroblasten des gleichen Spenders oder zwischen Zellen von Melanompatienten und gesunden Probanden könnten darauf hinweisen, dass Störungen der Beseitigung oxidativer DNA-Modifikationen ursächlich an der Entstehung des malignen Melanoms beteiligt sind. Die Ergebnisse zur Reparaturkapazität von Melanomzellen und Hautfibroblasten sind im Unterkapitel 5.1.3.2 dargestellt. Weiterhin war es interessant, die Reparaturkapazität oxidativer DNA-Modifikationen in Zellen zu messen, deren Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden sich signifikant voneinander unterscheiden. Da man

den Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen als Gleichgewicht zwischen Bildung und Reparatur dieser Läsionen versteht, liegt die Vermutung nahe, dass bei Zellen mit einem hohen Hintergrundspiegel entweder die endogene bzw. exogene ROS-Produktion erhöht oder die antioxidative Kapazität bzw. die Reparaturkapazität verringert ist. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, ob ein höherer Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen auf eine verringerte Reparatur dieser DNA-Schäden zurückzuführen ist. Die Ergebnisse dazu sind im Unterkapitel 5.1.3.1 gezeigt.

5.1.3.1 Reparaturkapazität von Zellen mit signifikant verschiedenen Spiegeln oxidativer DNA-Modifikationen

Am Beispiel der Fibroblastenzellen MRC-5 und BJ5te, deren Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen sich signifikant ($p < 0,01$) unterscheiden (siehe Kapitel 5.1.1), wurde die Reparaturkapazität überprüft. Dazu wurden beide Zellen mit sichtbarem Licht (Halogenlampe, 1000 W) in Anwesenheit des Photosensibilisators Ro 19-8022 geschädigt. Der exogene Photosensibilisator wurde zusätzlich zu den in den Zellen vorhandenen Chromophoren eingesetzt, um eine ausreichend hohe Induktion oxidativer DNA-Modifikationen zu gewährleisten, die für die Untersuchung der Reparaturkapazität Bedingung ist. In beiden Zellen war der induzierte Schaden annähernd gleich groß (Abbildung 19).

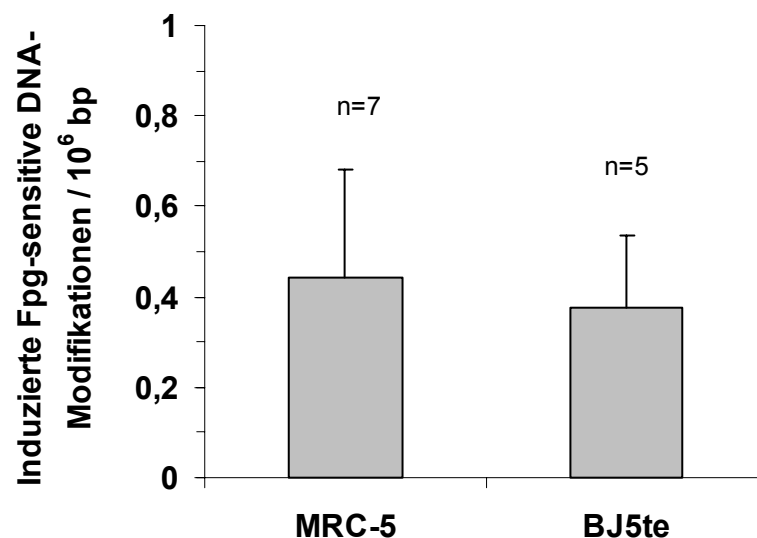


Abbildung 19: Induktion von Fpg-sensitiven oxidativen DNA-Modifikationen in BJ5te- und MRC5-Zellen durch den Photosensibilisator Ro 19-8022 und Licht. Die Bestrahlungsbedingungen sind in Kapitel 4.2.2.3 erklärt.

Wie in Abbildung 20 gezeigt, tendieren die BJ5te-Zellen, die einen niedrigeren Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen besitzen, zu einer etwas besseren Reparatur als die MRC-5-Zellen. Die Unterschiede der Reparatur oxidativer DNA-Schäden nach 4 bzw. 16 Stunden sind jedoch nicht signifikant.

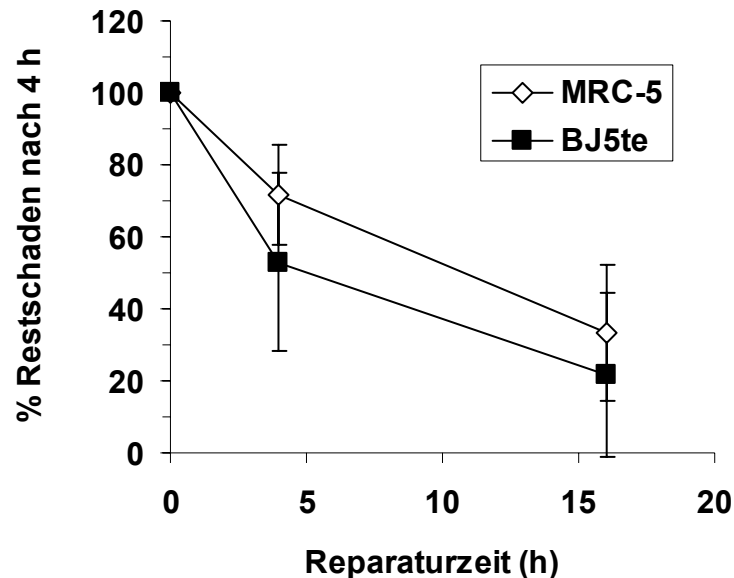


Abbildung 20: Reparatur Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen nach Induktion dieser Schäden mit sichtbarem Licht und dem Photosensibilisator Ro 19-8022. Bei der Schädigung der Zellen wurde wie in Abbildung 19 vorgegangen. Zur Reparatur der DNA-Modifikationen wurden die Zellen 4 bzw. 16 Stunden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) aufbewahrt. Da sich die Zellen innerhalb von 16 Stunden verdoppeln können, wurde ein Proliferationsfaktor (MRC-5: 0,99±0,17; BJ5te: 0,95±0,05) miteinbezogen, um die Verdünnung des induzierten Schadens auszugleichen. Die Anzahl der Versuche war n=3-5.

Im Fall der MRC-5- und BJ5te-Zellen konnten die unterschiedlich hohen Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen nicht auf einen Kapazitätsunterschied der DNA-Reparatur zurückgeführt werden. Möglicherweise tragen Unterschiede in der Produktion an ROS bzw. ihrer Beseitigung durch Antioxidantien zur Entstehung der verschieden hohen Spiegel an oxidativen DNA-Modifikationen bei.

5.1.3.2 Reparaturkapazität von Melanomzellen und Hautfibroblasten

Um die Reparaturkapazität in Melanomzellen und Hautfibroblasten von drei Patienten zu überprüfen, wurden in den Zellen zunächst durch sichtbares Licht oxidative DNA-Modifikationen induziert. Nach 4 Stunden Reparaturzeit wurde der vorhandene Restschaden bestimmt (Abbildung 21).

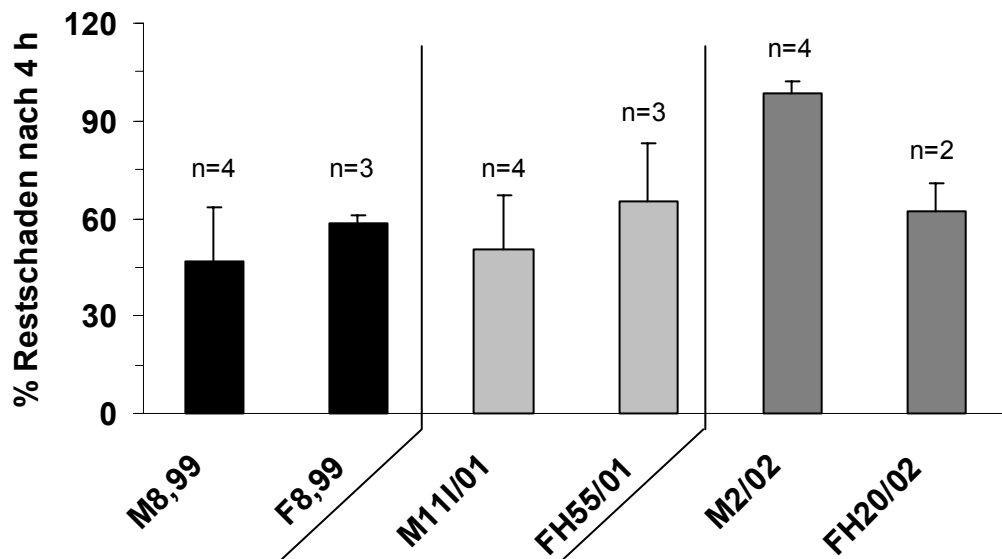


Abbildung 21: Reparatur Fpg-sensitiver oxidativer DNA-Modifikationen in Melanomzellen (M) und Hautfibroblasten (F). Nach einer einmaligen Bestrahlung (vgl. Abbildung 18) wurden die Zellen 4 Stunden in vorgewärmtem Vollmedium bei 37 °C (5 % CO₂, Brutschrank) inkubiert. Zellen des gleichen Patienten sind in derselben Farbe dargestellt. Im Fall der FH20/02-Zellen ist der Stichprobenumfang nur n = 2, sodass kein vergleichender T-Test zwischen diesen Zellen und den Melanomzellen des gleichen Spenders berechnet werden konnte.

Bei fünf von sechs Zellen betrug der prozentuale Anteil des Restschadens nach 4 Stunden Reparatur noch 47-65 % des Ausgangswertes. Auffällig war jedoch, dass in der Melanomzelle M2/02 während dieser Zeit überhaupt keine Reparatur stattzufinden schien, auch nach vier Stunden waren noch 98 ± 4 % des induzierten Schadens vorhanden. Um beobachten zu können, ob die DNA-Schäden zu einem späteren Zeitpunkt repariert werden, wurde in diesen Zellen eine Reparaturkinetik mit drei Zeitpunkten (4/16/24 h) gemessen. Ein Vergleich mit der Reparaturkinetik der Hautfibroblasten (FH20/02) des gleichen Patienten wäre interessant gewesen, konnte aufgrund des sehr langsamen Zellwachstums der FH20/02-Zellen (die Verdopplungszeit betrug mehrere Wochen) jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Anhand des Restschadens nach 4 Stunden zeichnet sich jedoch ab, dass die FH20/02-Fibroblasten eine ähnliche Reparaturkinetik aufweisen wie ein weiteres Zellpaar (M8,99/F8,99), bei dem die Kinetik der Reparatur (nach 2/4/6 h) ebenfalls bestimmt wurde (Abbildung 22).

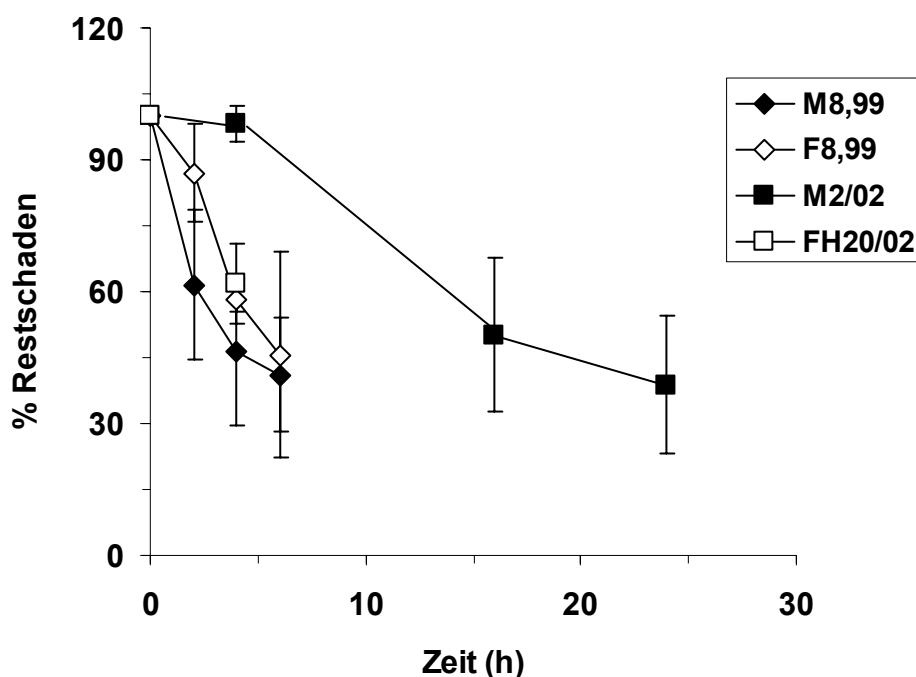


Abbildung 22: Reparaturkinetik Fpg-sensitiver Läsionen in Melanomzellen (schwarz) und Hautfibroblasten (weiß). Bei Zellen desselben Patienten besitzen die Symbole die gleiche Form. Die Schädigungs- und Reparaturbedingungen entsprechen jenen in Abbildung 21. Aus Abbildung 21 wurden auch die Ergebnisse für den Restschaden nach 4 Stunden übernommen. Bei den M2/02-Zellen wurden die Werte bei längeren Reparaturzeiten (16 und 24 Stunden) für die Proliferation der Zellen korrigiert.

Die Reparaturkinetiken zeigen einen deutlich verlangsamte Reparatur der M2/02-Melanomzellen gegenüber den anderen drei vermessenen Zellen. Zwischen den Zellen M8,99 und F8,99, die vom gleichen Patienten stammen, war kein signifikanter Unterschied messbar.

Um die Ursache der verzögerten Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen in M2/02-Zellen zu ermitteln, wurde zunächst überprüft, ob diese Zellen eine geringere 8-oxoG-Glykosylasen-Aktivität besitzen. Wie in der Einleitung (Kapitel 2.5.2) bereits beschrieben, führt ein Fehlen des zuständigen Ogg1-Enzyms in *ogg1-knockout*-Zellen zu einer ähnlich verlangsamten Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen, wie sie in den M2/02-Melanomzellen sehen war. Für den Test wurde ein 8-oxoG-Cleavage Assay angewendet, bei dem ein ^{32}P -markiertes Oligonukleotid, das ein 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG) gegenüber einem Cytosin an Position 16 enthielt, mit dem Extrakt der zu untersuchenden Zellen inkubiert wurde. Enthält der Zellextrakt ausreichend 8-oxoG-Glykosylasen-Aktivität, wird das Oligonukleotid eingeschnitten und man erhält ein 16mer als Produkt. Der Cleavage Assay wurde mit dem Extrakt der drei Melanomzellen, sowie dem Extrakt von F8,99-Fibroblasten und HeLa wt-Zellen durchgeführt (Abbildung 23).

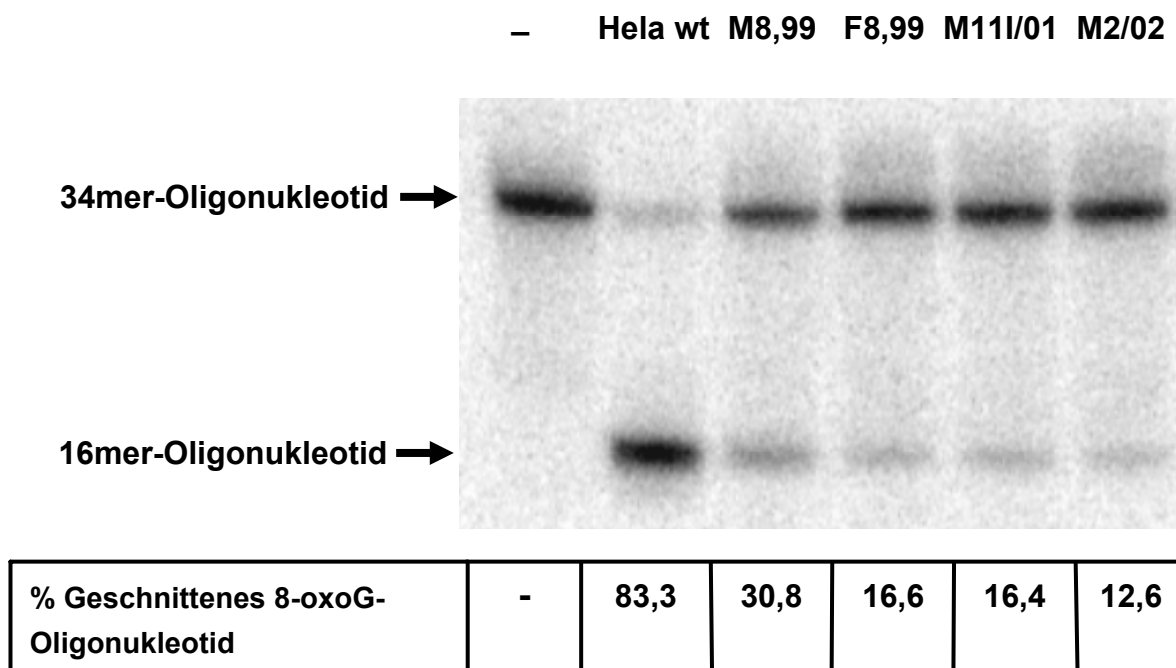


Abbildung 23: 8-oxoG-Cleavage-Kapazität von Melanomzellen und Fibroblasten. Die eingesetzte Zellextraktmenge entsprach 17,8 µg Gesamtprotein, die Inkubationszeit war 30 min. Eine genaue Durchführung ist unter Kapitel 4.2.11 beschrieben.

Überraschenderweise besaßen alle humanen Hautzellen, nicht nur die Melanomzelle M2/02, eine niedrigere 8-oxoG-Cleavage-Kapazität als die als Kontrolle mitgeführte humane HeLa wt-Cervixkarzinomzelle. Wegen der schwachen Aktivität sind die Unterschiede zwischen den Melanomzellen nur ungenau bestimmbar. Die Aktivität in der Reparatur-defekten M2/02-Zelle ist entsprechend dieser Messung aber am geringsten.

Bei dem in Abbildung 23 gezeigten Versuch wurde mit 17,8 µg die maximale Menge an Protein eingesetzt, um einen Effekt zu erzielen (normalerweise sind 2-5 µg ausreichend). Da die Cleavage-Aktivität in den Hautzellen dennoch sehr gering war, wurde der Versuch noch zweimal mit längeren Inkubationszeiten (40 und 60 Minuten) durchgeführt (Abbildung 24).

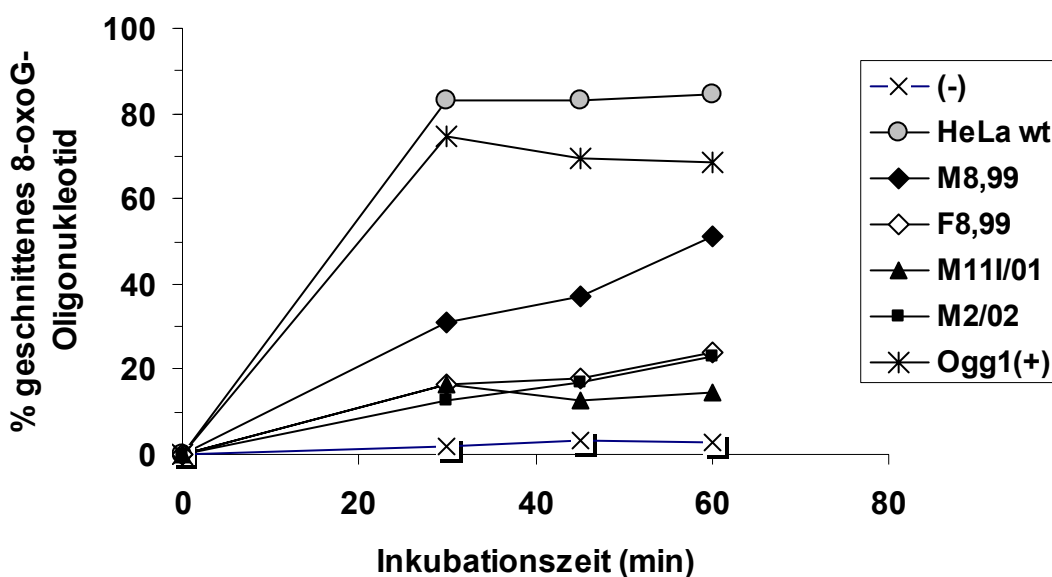


Abbildung 24: 8-oxoG-Cleavage-Kapazität von Melanomzellen und Fibroblasten nach unterschiedlichen Inkubationszeiten (30-60 min). Die Durchführung ist unter Kapitel 4.2.11 beschrieben, bei den Versuche wurde mit jeweils 17,8 µg Gesamtprotein gearbeitet.

Dadurch, dass die Zellextrakte sich in ihrer 8-oxoG-Glykosylaseaktivität extrem voneinander unterschieden, konnten keine geeignete Bedingungen für den *Cleavage*-Assay gefunden werden, in denen die Aktivität von mehr bzw. weniger aktiven Zellextrakten gleichermaßen beobachtet werden konnte. Da das Hauptaugenmerk auf dem Vergleich der Melanomzellen und Fibroblasten liegen sollte, war es Ziel, den Bereich niedriger Aktivität bestmöglich aufzuschlüsseln. Daher wurde in Kauf genommen, dass der 8-oxoG-Cleavage-Wert für die HeLa-Zellen und die Positivkontrolle (Ogg1 (+)) bereits nach 30 min Inkubationszeit eine Sättigung bei ca. 80 % erreicht. Diese Werte wurde daher vermutlich zu niedrig bestimmt. Der prozentuale Anteil an geschnittenem 8-oxoG-Oligonukleotid nimmt bei den M8,99-Zellen linear mit der Zeit zu, bei den F8,99- und M2/02- Hautzellextrakten ist ebenfalls ein leichter Anstieg erkennbar. Im Fall der M111/01-Melanomzelle war keine Zunahme des *Cleavage*-Produktes zu erkennen, was auf einen Aktivitätsverlust bei der Aufarbeitung/Aufbewahrung hindeutet.

In Abbildung 25 wurde versucht, die Ergebnisse der *Cleavage*-Aktivität aus Abbildung 23 und der Reparatur Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen (siehe Abbildung 21) bei der Alkalischen Elution miteinander zu korrelieren. Dabei wurden die Ergebnisse der HeLa wt- und M111/01-Zellen nicht berücksichtigt, da hier die 8-oxoG-Glykosylaseaktivität im *Cleavage*-Assay nicht zuverlässig bestimmt werden konnte.

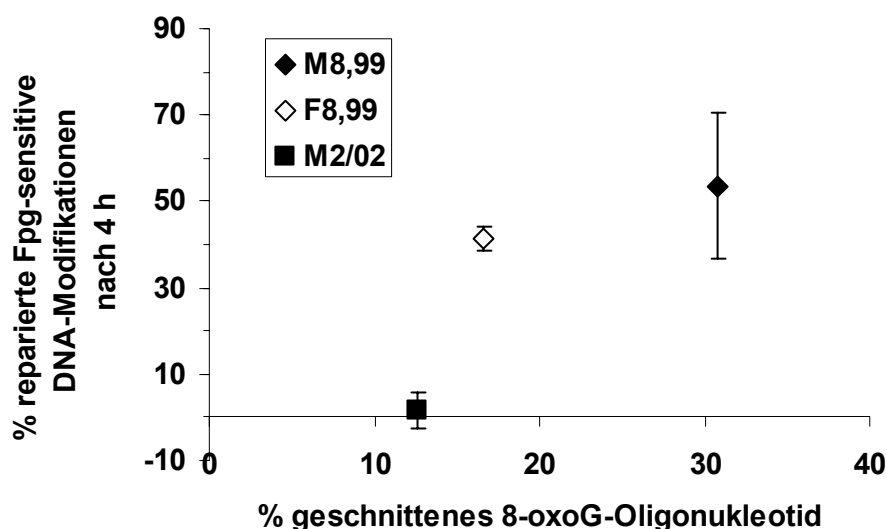


Abbildung 25: Korrelation zwischen der 8-oxoG-Cleavage-Kapazität von Zellextrakten und der Fähigkeit zur Reparatur oxidativer (gemessen als Fpg-sensitiver) DNA-Modifikationen (Daten und Behandlungsbedingungen wurden aus Abbildung 22 und Abbildung 23 übernommen).

Es scheint prinzipiell ein Zusammenhang zu bestehen zwischen der 8-oxoG-Cleavage-Aktivität der Zellen und ihrer Fähigkeit, (Fpg-sensitiver) oxidative DNA-Modifikationen zu reparieren. Diese Korrelation ist jedoch nicht signifikant, wie die Regressionsberechnung einer Geraden durch den Nullpunkt zeigt (Geradengleichung: $y = 1,71x$; Bestimmtheitsmaß: $R^2 = 0,61$).

Um festzustellen, ob die Ursache der Reparaturdefizienz und der verminderten Cleavage-Aktivität in M2/02-Zellen auf ein Fehlen des Ogg1-Proteins zurückzuführen ist, wurde mit den gleichen Zellextrakten ein immunologischer Nachweis von Ogg1-Protein (*Western-Blot*) durchgeführt (Abbildung 26).

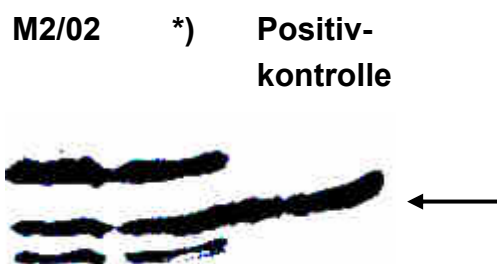


Abbildung 26: *Western-Blot* mit Antikörpern gegen humanes Ogg1-Enzym. Die Positivkontrolle enthielt 4 ng humanes Ogg1-Protein, die Zellextrakte 44,5 µg Gesamtprotein. Der mit Stern *) gekennzeichnete Ansatz waren ein Extrakt aus FH20/02-Fibroblasten. Im nachhinein stellte sich jedoch heraus, dass die Zellen zu diesem Zeitpunkt vermutlich mit Melanomzellen (M2/02) überwuchert waren, die offenbar bereits während der Isolierung in die Fibroblastenzelllinie geraten waren (B. Volkmer, Buxtehude; persönliche Mitteilung).

Der *Western-Blot* zeigte eine deutliche Bande auf dem Niveau des Ogg1-Proteins (Pfeil). Darüber hinaus wurden mit dem Ogg1-Antikörper zwei weitere Banden im Zellextrakt detektiert, die vermutlich ein modifiziertes (phosphoryliertes) Ogg1-Protein bzw. ein Degradationsprodukt darstellen.

Insgesamt wurde bei einer von drei untersuchten Melanomzellen, der M2/02-Zelle, eine Reparaturdefizienz für oxidative DNA-Modifikationen in der Alkalischen Elution beobachtet. Wie durch einen immunologischen Nachweis gezeigt werden konnte, produzieren die M2/02-Melanomzellen noch Ogg1-Protein, dieses scheint allerdings keine bzw. nur eine sehr geringe *Cleavage*-Aktivität für 8-oxoG zu besitzen.

5.2 Auswirkung endogener mitochondrialer ROS auf die Anzahl oxidativer DNA-Modifikationen

Oxidative DNA-Modifikationen können nicht nur exogen (z.B. durch Bestrahlung mit Licht) induziert werden, sondern werden auch durch endogene Prozesse erzeugt (vgl. Kapitel 2.2 und 2.3). Da Zellen permanent endogenem oxidativem Stress ausgesetzt sind, sollte zunächst untersucht werden, welchen Einfluss die endogene Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auf die Anzahl oxidativer DNA-Modifikationen im Zellkern besitzt. Mitochondrien als Hauptquelle endogener ROS stehen besonders unter Verdacht, die Zahl oxidativer DNA-Modifikationen im Kern zu beeinflussen. Um diese Hypothese zu überprüfen, bieten sich daher Strategien an, welche die ROS-Produktion der mitochondrialen Atmungskette hemmen bzw. verstärken.

5.2.1 Hemmung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in Mitochondrien

Als Modell zur Absenkung der Anzahl mitochondrialer ROS wurde das $\rho 0$ -System verwendet. $\rho 0$ -Zellen haben keine mitochondriale DNA (mtDNA) mehr, sodass sie nur noch eine rudimentäre Atmungskette besitzen, die nicht mehr dazu in der Lage ist, Energie über den Prozess der Oxidativen Phosphorylierung (OxPhos) zu gewinnen (King, 1996). Sie sind ausschließlich zur Energiegewinnung über die Glykolyse fähig und benötigen ein Medium, das mit Uridin und Pyruvat angereichert ist.

Da $\rho 0$ -Zellen nicht mehr über einen aeroben Stoffwechsel verfügen, würde man erwarten, dass diese Zellen im Vergleich zu Wildtyp (wt)-Zellen weniger reaktive Sauerstoffspezies produzieren. Um dies zu überprüfen, wurde die Anzahl ROS in

HeLa wt- und HeLa $\rho 0$ -Zellen gemessen. Dazu wurde ein Assay eingesetzt, dessen Prinzip auf der Oxidation von Hydroethidin zum Ethidium-Salz durch reaktive Sauerstoffspezies beruht (zur genauen Durchführung siehe Kapitel 4.2.6). Die Entstehung des fluoreszierenden Oxidationsprodukts lässt sich im Fluorimeter zeitabhängig verfolgen (Abbildung 27).

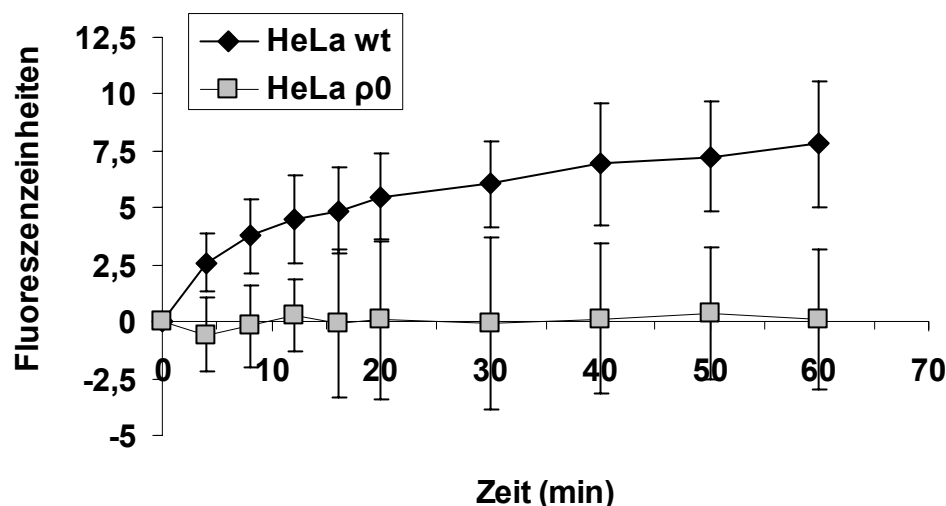


Abbildung 27: Reaktive Sauerstoffspezies in HeLa wt- ($n=10$) und $\rho 0$ -Zellen ($n=6$), fluorimetrisch bestimmt mit Hydroethidin. Pro Ansatz wurden 10^6 Zellen in FCS-freiem Medium mit $5 \mu\text{M}$ Hydroethidin bei 37°C inkubiert. Die Fluoreszenz direkt nach Zugabe des Hydroethidins (Zeitpunkt $t = 0$) wurde jeweils subtrahiert.

Der Messverlauf zeigte bis zum 30 min-Zeitpunkt eine stetige Zunahme der Fluoreszenz in HeLa wt-Zellen, dann tritt offenbar eine Sättigung ein. In HeLa $\rho 0$ -Zellen war über die gesamte Zeitdauer keine Zunahme der Fluoreszenz zu beobachten. Mit diesem Test konnte also gezeigt werden, dass HeLa $\rho 0$ -Zellen kaum reaktive Sauerstoffspezies produzieren, im Gegensatz zu HeLa Wildtyp-Zellen.

Unabhängig von diesem fluorimetrischen Nachweis wurde die Bildung von ROS in HeLa wt und HeLa $\rho 0$ -Zellen von unseren Kooperationspartnern (R. Wiesner, D. Spitkovsky; Köln) mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Dabei kam zusätzlich eine dritte Zelllinie zum Einsatz, nämlich so genannte HeEB1-Zellen, die aus $\rho 0$ -Zellen durch Wiederbefüllung mit mitochondrialer DNA hergestellt wurden (King, 1989). Die Ergebnisse dieser durchflusszytometrischen Messung mit Hydroethidin (Abbildung 28) bestätigen den Befund von Abbildung 27.

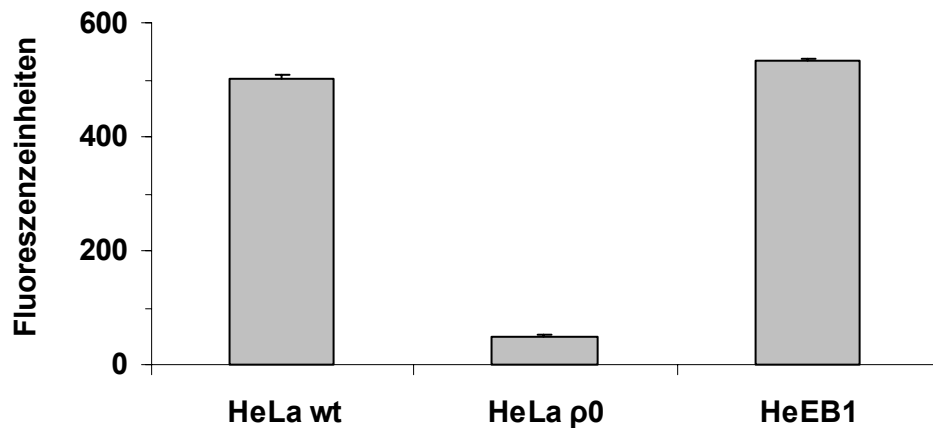


Abbildung 28: Reaktive Sauerstoffspezies in HeLa-, HeLa $\rho 0$ -, HeEB1-Zellen, gemessen mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von Hydroethidin. Die Versuche wurden von Dmitry Spitkovsky (Köln) durchgeführt. Die Zellen (0,5 Mio./ml) wurden mit 5 μ M Hydroethidin für 20 min bei 37 °C inkubiert.

Zusätzlich wurde die Anzahl reaktiver Sauerstoffspezies in HeLa wt-, HeLa $\rho 0$ - und HeEB1-Zellen von D. Spitkovsky durch Oxidation von 5-(und-6-)-chloromethyl-2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (CM-H₂DCFDA) zu Fluorescein quantifiziert (Abbildung 29).

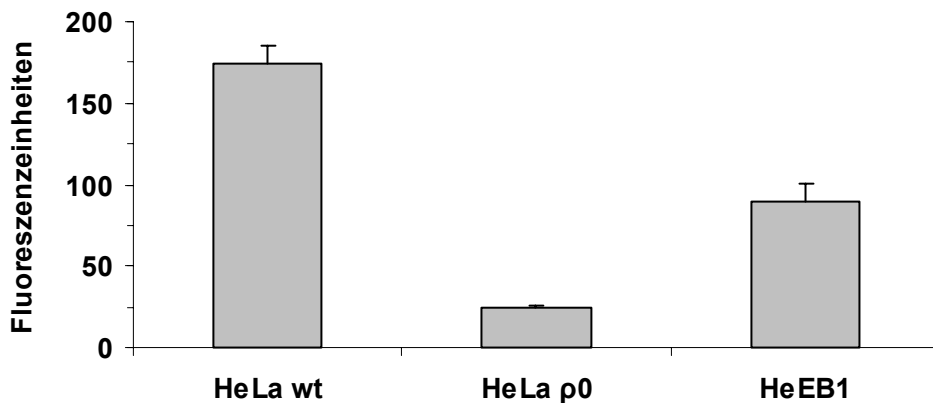


Abbildung 29: Reaktive Sauerstoffspezies in HeLa-, HeLa $\rho 0$ -, HeEB1-Zellen, gemessen mittels CM-H₂DCFDA und Durchflusszytometrie. Die Versuche wurden analog den Angaben in Abbildung 28 durchgeführt, wobei mit 10 μ M CM-H₂DCFDA für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurde.

Bei der durchflusszytometrischen Messung mit CM-H₂DCFDA zeigten die $\rho 0$ -Zellen ebenfalls einen drastisch verringerten Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies. Überraschenderweise war auch in HeEB1-Zellen die Anzahl ROS wesentlich niedriger als in HeLa wt-Zellen. Da beide Zellen (HeEB1 und HeLa wt) über mitochondriale DNA und damit über eine intakte Atmungskette verfügen, sollte die

durch Oxidation von CM-H₂DCFDA verursachte Fluoreszenz theoretisch in beiden Fällen vergleichbar hoch sein.

Um zu verifizieren, dass die verminderte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in ρ 0-Zellen nicht einfach mit einer Abnahme der Anzahl Mitochondrien zusammenhängt, wurde von Dimitry Spitkovsky (Köln) eine weitere durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Dabei wurde Nonylacrindinorange (NAO) als Cardiolipin-spezifischer Farbstoff eingesetzt. Diese Messung spiegelt die Gesamtmasse der mitochondrialen inneren Membranen und damit die Anzahl Mitochondrien der Zellen wieder. Es konnte bestätigt werden, dass HeLa ρ 0-Zellen die gleiche Zahl Mitochondrien besitzen wie HeLa wt- und HeEB1-Zellen (Abbildung 30).

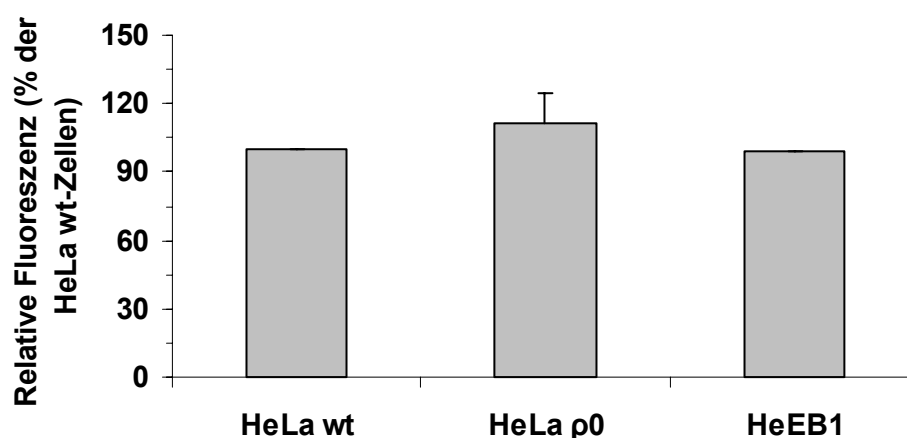


Abbildung 30: Relative Fluoreszenz nach Behandlung mit NAO, gemessen im Durchflusszytometer. Jeweils 0,5 Mio. Zellen/ml wurden von D. Spitkovsky (Köln) mit 0,04 μ M NAO angefärbt und vermessen.

Das Fehlen der aeroben Atmung bei ρ 0-Zellen bewirkt nach den gezeigten Ergebnissen (Abbildung 27, Abbildung 28, Abbildung 29) eine Abnahme des Spiegels reaktiver Sauerstoffspezies. Es stellt sich die Frage, ob die geringere ROS-Produktion auch mit einem verminderten oxidativen DNA-Schaden einhergeht. Ein Argument dafür, dass dies zutreffen könnte, liefert die Existenz eines relativ hohen Hintergrundspiegels oxidativer DNA-Modifikationen in Säugerzellen (siehe auch Kapitel 2.4.1). Da man diesen Spiegel bisher in allen untersuchten Zellarten unterschiedlicher Herkunft nachweisen konnte, muss er auf die endogene ROS-Produktion zurückzuführen sein. Wenn die Mitochondrien als Hauptquelle endogener reaktiver Sauerstoffspezies einen Einfluss auf den Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen im Zellkern haben, sollte man in ρ 0-Zellen weniger dieser Schäden finden als in HeLa wt- oder HeEB1-Zellen. Um die Anzahl oxidativer DNA-Modifikationen zu messen, wurden alle drei Zellarten mit Fpg-Enzym in der Alkalischen Elution untersucht (genaue Durchführung in Kapitel 4.2.9). Zusätzlich zu

den HeLa-Zellen wurden 143B-Osteosarkomzellen (wt und $\rho 0$) vermessen (Abbildung 31). Bei diesen hatte die durchflusszytometrische Analyse von D. Spitkovsky (Köln) ebenfalls eine signifikant geringere Menge reaktiver Sauerstoffspezies in den $\rho 0$ -Zellen ergeben (persönliche Mitteilung, Daten nicht gezeigt).

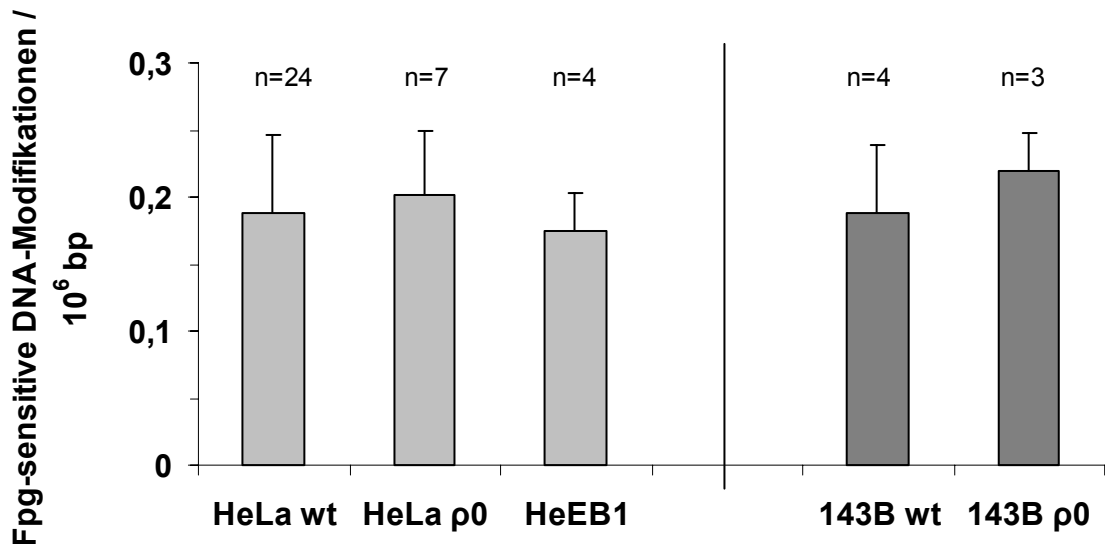


Abbildung 31: Hintergrundspiegel Fpg-sensitiver Basenmodifikationen in Wildtyp (wt), mtDNA-defizienten ($\rho 0$) und mit mitochondrialer DNA wiederbefüllten (HeEB1) Zellen.

In beiden Zellsystemen war kein Unterschied des Hintergrundspiegels oxidativer DNA-Modifikationen zwischen $\rho 0$ -, Wildtyp- und HeEB1-Zellen festzustellen. Obwohl $\rho 0$ -Zellen durch ihre defekte Atmungskette wesentlich weniger reaktive Sauerstoffspezies in den Mitochondrien produzieren, besitzen sie dennoch keinen niedrigeren Spiegel an oxidativen Basenmodifikationen.

Um zu überprüfen, ob HeLa wt-, HeLa $\rho 0$ - und HeEB1-Zellen prinzipiell gleichermaßen sensitiv gegenüber exogenem oxidativen Stress reagieren, wurden alle drei Zelllinien mit einer einmaligen Dosis (450 kJ/m^2) an sichtbarem Licht bestrahlt und die dadurch induzierten oxidativen DNA-Modifikationen quantifiziert (Abbildung 32). Dabei bestätigte sich, dass alle drei Zelllinien gegenüber in der ganzen Zelle induzierten ROS gleich sensitiv reagierten, also durch die Bestrahlung gleiche Mengen oxidativer DNA-Modifikationen entstehen. Die Ähnlichkeit der Hintergrundspiegel oxidativer Modifikationen der DNA kann demnach nicht darauf zurückzuführen sein, dass HeLa $\rho 0$ -Zellen über ein geringeres bzw. HeLa wt-/HeEB1-Zellen über ein höheres antioxidatives Abwehrpotential verfügen. Die Ähnlichkeit des Antioxidantien-Status zwischen HeLa wt- und HeLa $\rho 0$ -Zellen konnte weiterhin von Anne Bravard für Mangan-abhängige Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase und Glutathion gezeigt werden (A. Bravard, Fontenay-aux-Roses, Frankreich; persönliche Mitteilung).

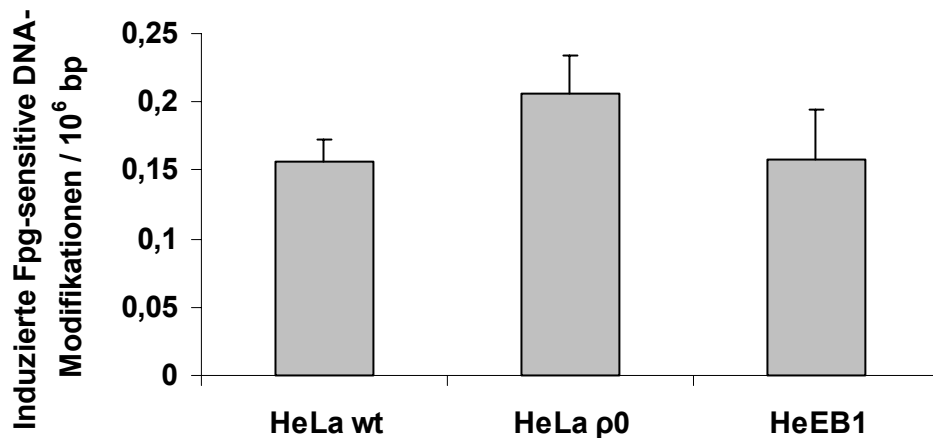


Abbildung 32: Induktion von Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen in HeLa wt-, HeLa $\rho 0$ - und HeEB1-Zellen. Die Bestrahlung mit einer 1000 W-Halogenlampe wurde analog Kapitel 4.2.2.1 für 20 min durchgeführt ($n=3-4$). Dies entspricht einer Dosis von 450 kJ/m^2 . Der Unterschied zwischen HeLa $\rho 0$ -Zellen und HeLa wt-Zellen bzw. HeEB1-Zellen ist nicht signifikant ($p < 0,05$).

Eine weitere Erklärung für den im Vergleich zur geringen Anzahl reaktiver Sauerstoffspezies hohen Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden in $\rho 0$ -Zellen wäre ein Defekt in der Reparatur dieser Schäden. Nach dieser These würden zwar weniger ROS in $\rho 0$ -Zellen gebildet werden, aber die daraus entstehenden DNA-Modifikationen würden kaum repariert werden, sodass der Gleichgewichtsspiegel dieser Zellen auf dem Niveau der stark ROS-produzierenden HeLa wt- bzw. HeEB1-Zellen läge. Um die Reparaturkapazität der drei Zellen vergleichen zu können, wurde aus jeder Zellsorte ein Zellextrakt hergestellt, in dem die Aktivität des Reparaturproteins Ogg1 mittels *Cleavage*-Assay bestimmt wurde (Abbildung 33).

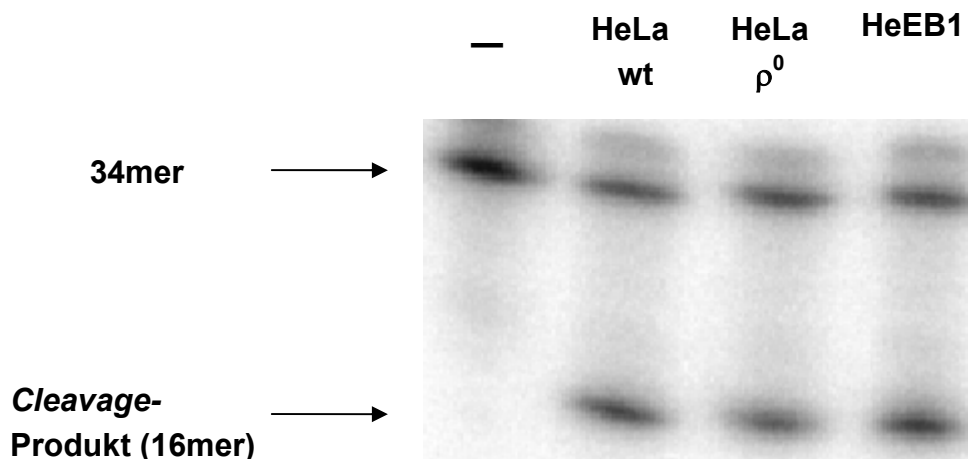


Abbildung 33: Cleavage-Assay mit Zellextrakten von HeLa Wildtyp (wt)-, HeLa ρ^0 - und HeEB1-Zellen. Die Inkubationszeit betrug 30 min, es wurde pro Spur eine Zellextraktmenge von 2,84 μg Gesamtprotein/ μl eingesetzt (siehe Kapitel 4.2.11).

Wie anhand des Gelfotos bereits ersichtlich ist, unterschieden sich die Zellextrakte nicht in ihrer Fähigkeit, die modifizierte DNA-Base 8-oxoG in einem Oligonukleotid zu erkennen und die DNA an dieser Stelle einzuschneiden. Darüber hinaus wurde das Verhältnis des Cleavage-Produkts (16mer) zum 34mer-Edukt auch quantifiziert. Diese Versuche wurden als Kinetik mit zwei unabhängig voneinander hergestellten Zellextrakten von HeLa ρ^0 - und HeEB1-Zellen durchgeführt, dabei wurde die Inkubationszeit variiert. Es war kein Reparaturdefekt von HeLa ρ^0 im Vergleich zu HeEB1-Kontrolle zu beobachten (Abbildung 34).

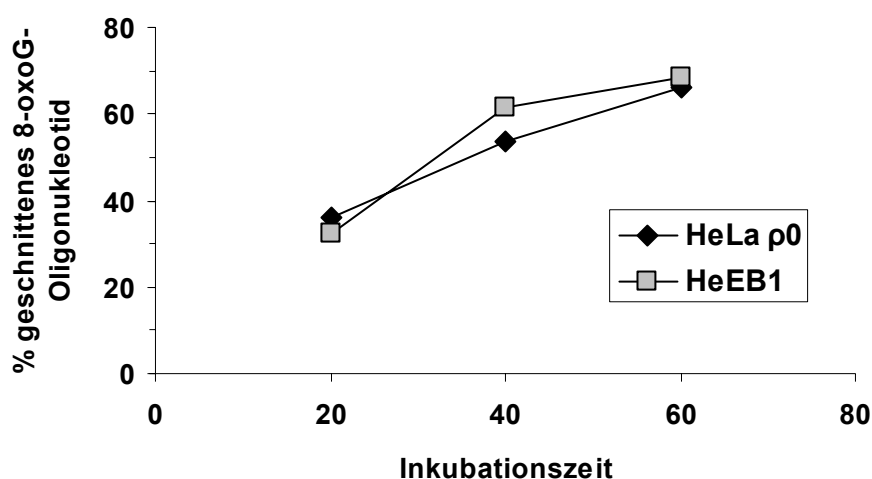


Abbildung 34: Cleavage-Aktivität von HeEB1- und HeLa ρ^0 -Zellextrakten. Für die Versuche wurde jeweils eine Zellextraktmenge entsprechend 5,68 μg Gesamtprotein/ μl eingesetzt. Eine genaue Beschreibung der Versuchsdurchführung und Quantifizierung ist in Kapitel 4.2.11 gegeben.

HeLa ρ^0 -Zellen reagieren auf die Induktion von oxidativem Stress nicht sensitiver mit der Bildung von oxidativen DNA-Modifikationen als Kontrollzellen, sie besitzen auch keine verminderte Reparaturkapazität diese DNA-Schäden. Da in diesen Bereichen also keine Störung vorliegt, kommt der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen bei ρ^0 -Zellen vermutlich auf die gleiche Weise zustande wie in den wt- oder HeEB1-Zellen. In ρ^0 -Zellen ist die mitochondriale ROS-Produktion durch das Fehlen der Atmungskette erheblich eingeschränkt, dennoch wirkt sich dies nicht verringern auf den Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen aus. Daraus kann geschlossen werden, dass in Mitochondrien gebildete reaktive Sauerstoffspezies unter normalen physiologischen Bedingungen keine DNA-Modifikationen im Zellkern induzieren.

5.2.2 Stimulation der mitochondrialen ROS-Produktion

Eine interessante Frage war, ob sich eine (pathologische) Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies in den Mitochondrien auf den Spiegel oxidativer DNA-Modifikationen im Zellkern auswirken würde. In der Literatur wird berichtet, dass verschiedene mitochondriale Gifte die ROS-Produktion in isolierten Mitochondrien stimulieren (Votyakova, 2001; Liu, 2002). In dieser Arbeit wurde auf drei mitochondriale Inhibitoren zurückgegriffen, welche die Atmungskette an unterschiedlichen Stellen angreifen (eine ausführliche Beschreibung der Funktion der Atmungskette ist in Kapitel 2.2.1 zu finden). Zum einen wurde Antimycin A eingesetzt, das die Elektronenübertragung bei Komplex III der Atmungskette blockiert. Weiterhin wurde Oligomycin eingesetzt, ein Inhibitor der ATP-Synthase, sowie die Substanz Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP), ein Entkoppler des inneren Membranpotentials. Bei dem Einsatz der mitochondrialen Gifte wurden Konzentrationen angewendet, nach denen die Überlebensrate der Zellen (gemessen durch Propidiumiodid-Ausschluss) gemäß den Toxizitätsmessungen von Dimitry Spitkovsky mindestens 98 % betrug (D. Spitkovsky, Köln; persönliche Mitteilung).

Wie in Abbildung 35 ersichtlich, wirkte sich die Inkubation mit verschiedenen mitochondrialen Giften bzw. ihren Kombinationen unterschiedlich auf die Anzahl ROS (fluorimetrische Messung der Oxidation von Hydroethidin) aus.

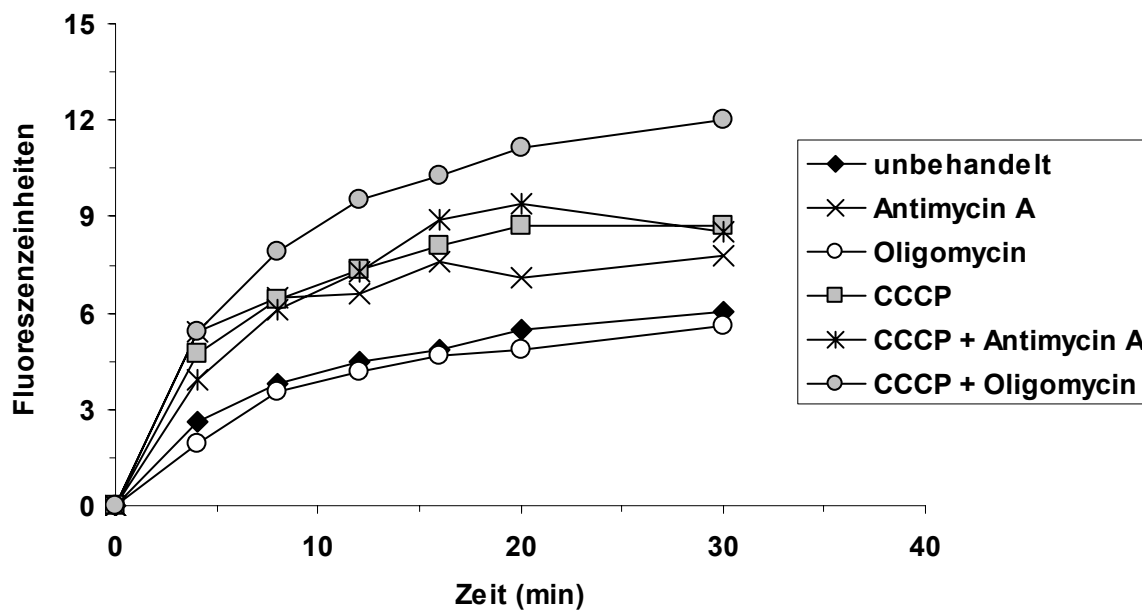


Abbildung 35: Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach Behandlung von HeLa wt-Zellen mit mitochondrialen Giften, fluorimetrisch bestimmt als HE-Oxidation. Die Durchführung ist in Kapitel 4.2.6 beschrieben. Die Anzahl der Versuche war im Fall der unbehandelten Zellen $n=10$, bei Inkubation mit CCCP bzw. CCCP+Oligomycin $n=5$, bei Oligomycin-Behandlung $n=3$ und bei Gabe von Antimycin A bzw. Antimycin A+CCCP $n=1$. Die Werte für die unbehandelten Zellen wurden aus Abbildung 27 übernommen.

Während die Inkubation mit Oligomycin allein keine Bildung von ROS über das Ausmaß in unbehandelten Zellen hinaus induzierte, bewirkten sowohl Antimycin als auch CCCP eine Zunahme der reaktiven Sauerstoffspezies. Die Kombination von Antimycin A und CCCP verursachte keinen zusätzlichen ROS-Anstieg über den Effekt von CCCP hinaus. Dagegen zeigte sich nach Kombination von Oligomycin mit CCCP der deutlichste Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies.

Parallel zu dieser Messung reaktiver Sauerstoffspezies wurde von unseren Kooperationspartnern in Köln ein analoges Experiment durchgeführt. Hier wurde die Anzahl ROS mittels Durchflusszytometrie in HeLa wt-, HeLa $\rho 0$ - und HeEB1-Zellen bestimmt (Abbildung 36).

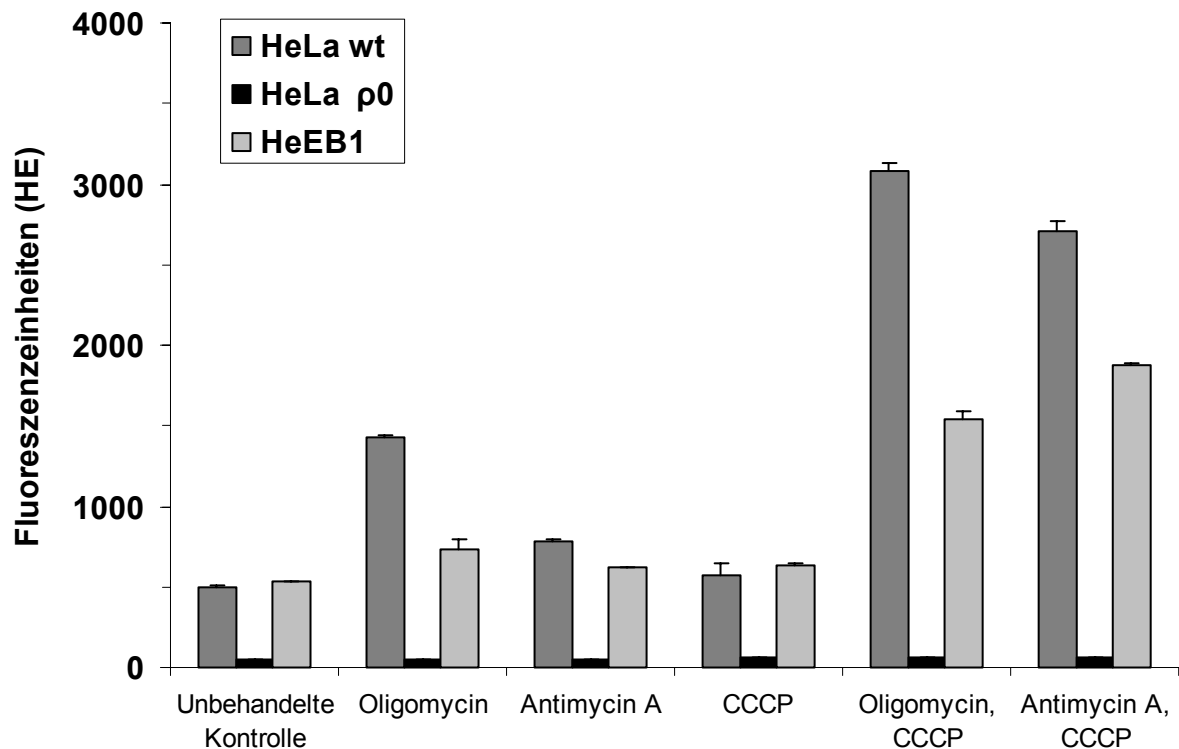


Abbildung 36: Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in HeLa-, HeLa $\rho 0$ -, HeEB1-Zellen nach Inkubation mit mitochondrialen Giften (zur Durchführung vgl. Abbildung 28). Die Versuche wurden von Dimitry Spitkovsky durchgeführt. Zur Behandlung mit den mitochondrialen Giften wurden die Zellen 10 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Konzentrationen der Substanzen sind in Kapitel 4.2.2.5 angegeben.

Da HeLa $\rho 0$ -Zellen nicht über eine funktionierende Elektronentransportkette verfügen, stellte sich hier durch die mitochondrialen Gifte erwartungsgemäß keine Induktion reaktiver Sauerstoffspezies ein. In den Versuchsreihen mit HeLa wt- bzw. HeEB1-Zellen zeigte sich, dass insbesondere die Kombinationen von CCCP mit Oligomycin bzw. CCCP mit Antimycin A einen Anstieg reaktiver Sauerstoffspezies hervorriefen. Auffällig war weiterhin, dass in HeEB1-Zellen, die als zweite Kontrolle bei den Versuchen mitgeführt wurden, der erzielte Effekte stets unter dem der HeLa wt-Zellen blieb. Dies deutet darauf hin, dass durch die Wiedereinführung der mitochondrialen DNA in HeEB1-Zellen die Atmungskette nicht vollständig wiederhergestellt werden konnte, oder dass die HeEB1-Zelllinie aus einer Mischung von $\rho 0$ - und wt-Zellen besteht. Es war überraschend, dass in HeLa wt-Zellen durch Oligomycin allein bereits ein Effekt erzielt wurde, durch Antimycin A bzw. CCCP allein jedoch nicht. Beide Kombinationen der mitochondrialen Gifte waren effektiver in ihrer Wirkung als die Einzelkomponenten.

Die um ein Mehrfaches erhöhten Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies sollten sich auch in einer erhöhten Generierung oxidativer DNA-Modifikationen niederschlagen,

falls in Mitochondrien induzierte ROS bis zum Zellkern vordringen. Um dies zu überprüfen, wurden zunächst HeLa wt-Zellen in einer Zelldichte von 0,5 Mio./ml in Suspension nach dem für Abbildung 36 beschriebenen Protokoll mit mitochondrialen Giften behandelt (10 min, 37 °C, unter Schütteln). Als sich hier keine Induktion zusätzlicher oxidativer DNA-Schäden zeigte (ohne Abbildung), wurden die Inkubationsbedingungen verändert, die Zellen wurden nun festwachsend für zwei Stunden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) inkubiert. Auch in diesem Fall war kein Anstieg oxidativer DNA-Modifikationen zu beobachten (Abbildung 37). Ein mehrfacher Anstieg mitochondrialer reaktiver Sauerstoffspezies ging demnach weder mit einer Zunahme an Einzelstrangbrüchen noch mit einem Anstieg oxidativer Basenmodifikationen der DNA einher.

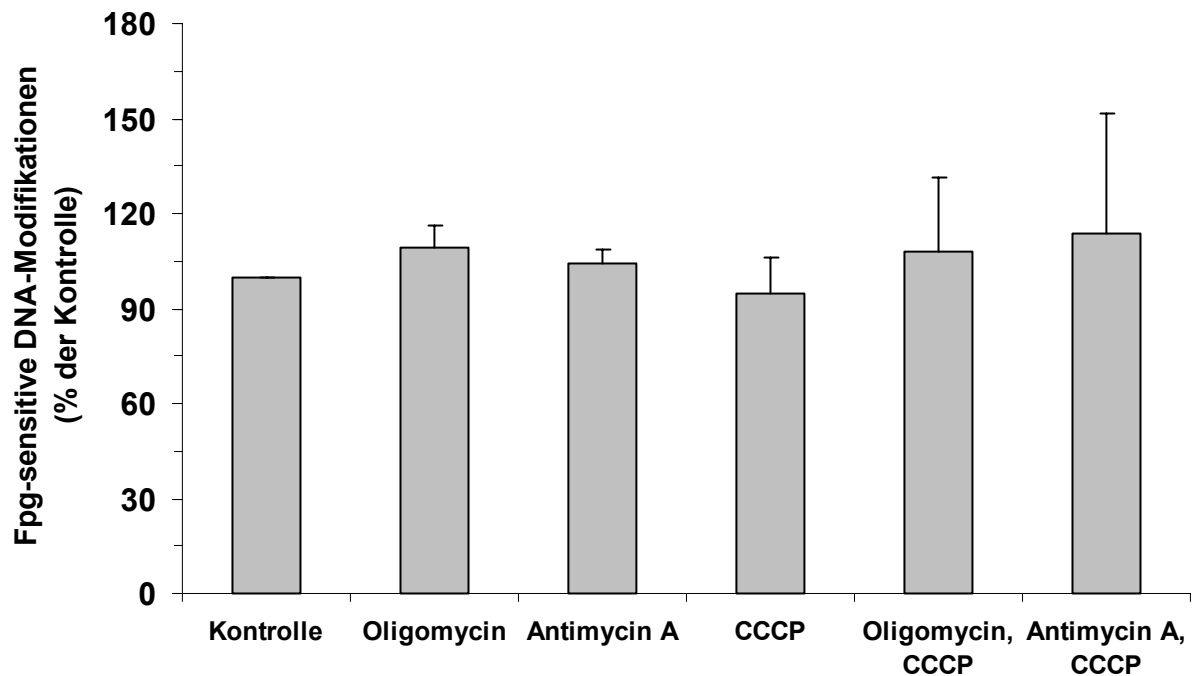


Abbildung 37: Induktion von DNA-Modifikationen in HeLa wt-Zellen nach Inkubation mit mitochondrialen Giften (n=3). Die Bedingungen der Inkubation sind in Kapitel 4.2.2.5 beschrieben.

Eine Erklärung für die fehlende Wirkung der mitochondrialen Gifte auf die oxidativen DNA-Schäden im Zellkern könnte darin liegen, dass cytosolische Antioxidantien wie Glutathion ausreichend in der Lage sind, die reaktiven Sauerstoffspezies aus den Mitochondrien abzufangen und so deren Vordringen zur nukleären DNA zu verhindern. Aus diesem Grund wurde der Gehalt an Glutathion in unbehandelten und mit mitochondrialen Giften inkubierten HeLa wt-Zellen bestimmt (Tabelle 5, mittlere Spalte). Hier zeigte sich, dass der Glutathion-Gehalt behandelter Zellen sich nicht signifikant von dem unbehandelter Kontrollzellen unterschied. Der Wert für

unbehandelte HeLa wt-Zellen (16,15 nmol GSH/10⁶ Zellen) stimmt sehr gut mit dem Ergebnis von Anne Bravard überein, deren Messung einen Glutathion-Gehalt von 16,3 nmol/10⁶ Zellen lieferte (A. Bravard; Fontenay-aux-Roses, Frankreich; persönliche Mitteilung).

Tabelle 5: *Glutathion (GSH)-Gehalte in HeLa wt-Zellen vor und nach Behandlung mit Buthioninsulfoximin (BSO). Die Bestimmung des GSH-Gehaltes wurde nach der in Kapitel 4.2.8 beschriebenen Vorgehensweise durchgeführt (n=3).*

Ansatz	GSH-Gehalt vor Depletion (nmol/10⁶ Zellen)	GSH-Gehalt nach Depletion (nmol/10⁶ Zellen) (BSO, 1 mM, 24 h, 37 °C)
Ohne mitochondriale Gifte	16,2 ± 4,0	0,9 ± 0,2
Antimycin A	13,3 ± 1,7	0,8 ± 0,1
Oligomycin	17,0 ± 2,2	0,9 ± 0,1
CCCP	13,3 ± 1,8	0,5 ± 0,1
Antimycin A, CCCP	10,7 ± 3,8	0,5 ± 0,2
Oligomycin, CCCP	12,6 ± 3,1	0,5 ± 0,3

Darüber hinaus war es interessant zu untersuchen, ob nach einer Absenkung der Glutathionspiegel die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch mitochondriale Inhibitoren nachweisbar sein würde. Zu diesem Zweck wurden HeLa wt-Zellen durch 24-stündige Behandlung mit Buthioninsulfoximin zunächst Glutathion-depletiert und schließlich mit mitochondrialen Giften behandelt. Buthioninsulfoximin ist ein selektiver, irreversibler Inhibitor der γ -Glutamylcystein-Synthetase (GCS), einem Enzym, das den ersten Schritt der Glutathion-Synthese katalysiert (Griffith, 1979). Die Ansätze wurden nach der Behandlung aufgeteilt, in einer Hälfte wurde der Glutathion-Gehalt gemessen, um die Abwesenheit dieses Antioxidans zu verifizieren. Die andere Hälfte des jeweiligen Ansatzes wurde dazu verwendet, um mittels Alkalischer Elution die Anzahl oxidativer Basenmodifikationen zu bestimmen. Die Depletion an Glutathion war in allen Fällen erfolgreich (Tabelle 5, rechte Spalte). Dennoch war selbst bei einem Mangel an diesem Antioxidans, der die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch ROS begünstigen sollte, keine Zunahme dieser DNA-Schäden zu detektieren (Abbildung 38).

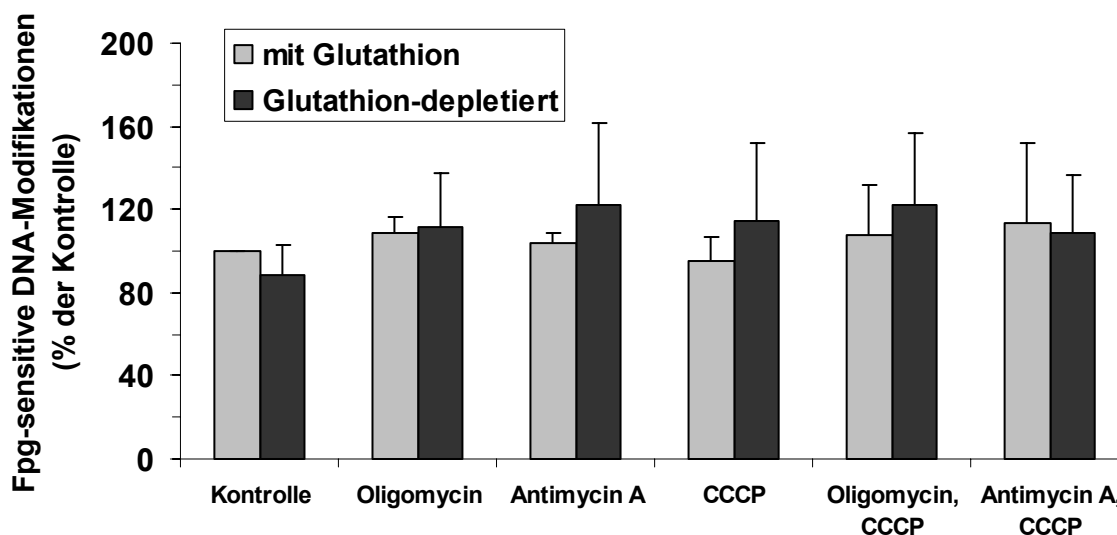


Abbildung 38: DNA-Schäden in HeLa-Zellen nach Depletion von Glutathion mit Buthioninsulfoximin (BSO) und anschließender Behandlung mit mitochondrialen Giften ($n=5$). Die Durchführung ist in Kapitel 4.2.5 bzw. Kapitel 4.2.2.5 beschrieben. Aus Abbildung 37 wurden die Daten für die nur mit Giften der Atmungskette behandelten Ansätze übernommen.

Aus diesem Ergebnis kann man schließen, dass selbst große Mengen an mitochondrial produzierten reaktiven Sauerstoffspezies auch nach Depletion von Glutathion, einem wichtigen Antioxidans der Zelle, keine oxidativen DNA-Modifikationen im Zellkern induzieren können. Ein interessanter Nebenfund aus den gezeigten Versuchen war, dass sich die eintägige Depletion von Glutathion weder auf die Anzahl oxidativer DNA-Modifikationen noch auf die Zahl der Einzelstrangbrüche im Zellkern auswirkt (Abbildung 39).

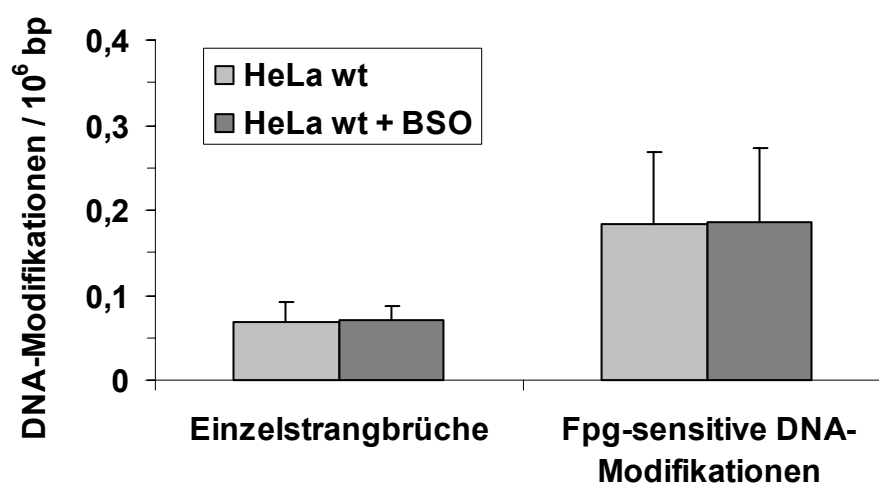


Abbildung 39: Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive DNA-Modifikationen in HeLa wt-Zellen mit und ohne Glutathion-Depletion durch Buthioninsulfoximin (BSO) ($n=7$).

Selbst nach Verlängerung der Glutathion-Depletion auf drei Tage war keine Induktion von DNA-Schäden durch endogene reaktive Sauerstoffspezies zu beobachten (ohne Abbildung).

Nachdem die Zahl induzierter DNA-Modifikationen durch Erhöhung der mitochondrialen ROS-Produktion auch bei gleichzeitiger Glutathion-Depletion nicht ansteigt, war es interessant zu testen, ob eine Depletion an diesem Antioxidans sich auf die Zahl dieser DNA-Schäden nach ROS-Induktion in der gesamte Zelle auswirken würde. Dazu wurden BSO-behandelte bzw. unbehandelte HeLa wt-Zellen mit sichtbarem Licht (Halogenlampe, 1000 W) bestrahlt (Abbildung 40).

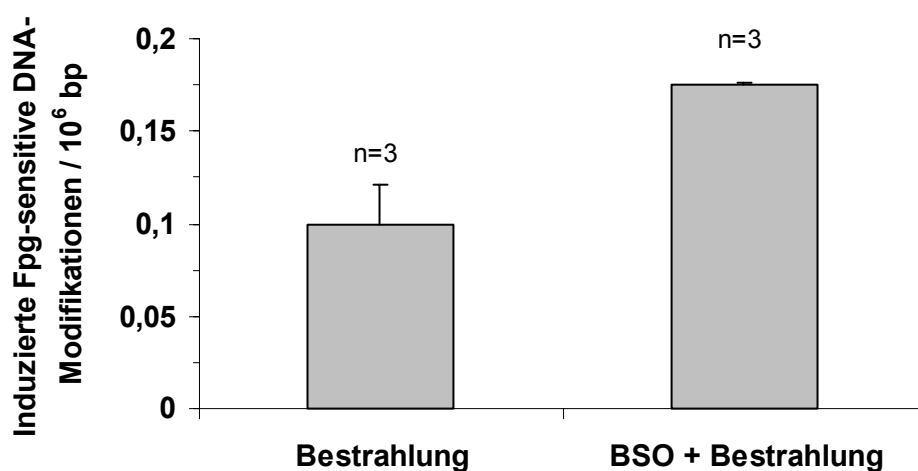


Abbildung 40: Induzierte Fpg-sensitive DNA-Modifikationen in BSO-behandelten bzw. unbehandelten HeLa wt-Zellen nach Bestrahlung mit Licht. Die genauen Protokolle sind in Kapitel 4.2.2.1 (Bestrahlung mit der Halogenlampe; 450 kJ/m^2) bzw. in Kapitel 4.2.5 (Depletion von Glutathion durch BSO) beschrieben. Es besteht ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen den beiden Messreihen.

Wie in Abbildung 40 gezeigt werden konnte, werden in Abwesenheit von Glutathion signifikant ($p < 0,05$) mehr oxidative DNA-Modifikationen durch Bestrahlung mit Licht induziert. Dies zeigt die Bedeutung von Glutathion für die Verhinderung von oxidativen DNA-Schäden durch exogen induzierte ROS. Im Fall der endogenen ROS aus Mitochondrien konnte keine Schutzfunktion dieses Antioxidans für die nukleäre DNA festgestellt werden.

Insgesamt lässt sich durch die Stimulation der mitochondrialen Atmungskette zwar die Anzahl hier gebildeter reaktiver Sauerstoffspezies erhöhen, besonders durch den Einsatz einer Kombination der mitochondrialen Gifte CCCP/Oligomycin. Diese erhöhte mitochondriale ROS-Produktion führt jedoch nicht zu einem Anstieg oxidativer DNA-Modifikationen oder Einzelstrangbrüchen in diesen Zellen, selbst bei Depletion von Glutathion, einem wichtigen zellulären Antioxidans.

Grundsätzlich konnte durch Hemmung bzw. Verstärkung der endogenen mitochondrialen ROS-Produktion nicht die Anzahl oxidativer DNA-Modifikationen im Zellkern verändert werden.

5.3 Exogene Induktion von oxidativen DNA-Modifikationen durch sichtbares Licht

5.3.1 Identifikation von zellulären Molekülen als Photosensibilisatoren

Um die Sensitivität von Melanomzellen gegenüber sichtbarem Licht einschätzen zu können, ist es hilfreich, die Konzentration zellulärer Moleküle zu kennen, die bei der Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Licht als Photosensibilisatoren wirken. Wie bereits im Einleitungskapitel 2.3.3 beschrieben, konnten diese zelleigenen Moleküle bisher noch nicht identifiziert werden, der genaue Mechanismus des Photosensibilisierungsprozesses ist ebenfalls unbekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Rolle zweier endogener Chromophore untersucht, die als Photosensibilisatoren infrage kommen könnten: Protoporphyrine und Cryptochrome.

5.3.1.1 Protoporphyrin IX

Um die Beteiligung von Protoporphyrin IX (PPIX) an der Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Licht zu untersuchen, bietet sich an, auf ein PPIX-defizientes Zellmodell zurückzugreifen. In Zellen, die über Mutationen oder Deletionen der mitochondrialen DNA (mtDNA) verfügen, ist oft der Häm-Syntheseweg über Protoporphyrin IX gestört (vgl. Kapitel 2.3.3.2). Daher lag die Vermutung nahe, dass bei HeLa $\rho 0$ -Zellen, die keine mtDNA mehr besitzen, dieser Syntheseweg ebenfalls einer Störung unterliegt. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Protoporphyrin IX-Gehalte von HeLa wt-, HeLa $\rho 0$ - und HeEB1-Zellen fluorimetrisch quantifiziert (Abbildung 41).

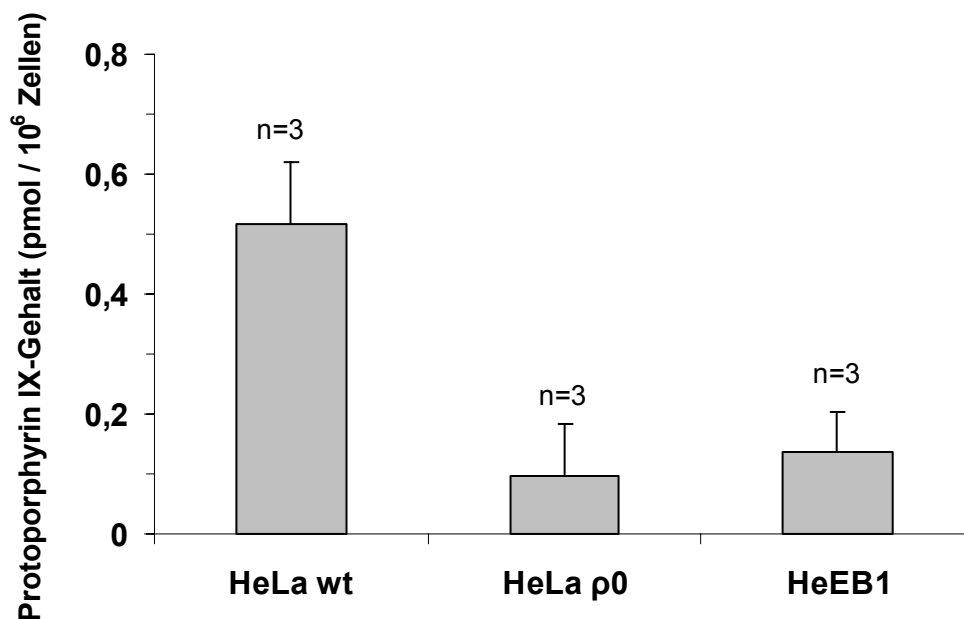


Abbildung 41: Fluorimetrisch bestimmte Protoporphyrin IX-Gehalte in HeLa wt-, HeLa ρ0- und HeEB1-Zellen. Ein genaues Protokoll der Versuche ist in Kapitel 4.2.7 aufgeführt.

Tatsächlich zeigte sich, dass diese Zellen eine wesentlich geringere Konzentration an Protoporphyrin IX besitzen als HeLa wt-Zellen, aus denen sie ursprünglich generiert wurden. Die Rekonstitution der HeLa ρ0-Zellen mit mitochondrialer DNA bewirkt offenbar nur die teilweise Wiederherstellung der PPIX-Synthese, wie man anhand der niedrigen PPIX-Spiegel in den HeEB1-Zellen erkennen kann.

Die in Abbildung 41 gemessene Fluoreszenz wurde bei einer bestimmten Emissions- ($\lambda = 604$) bzw. Extinktionswellenlänge ($\lambda = 406$ nm) bestimmt. Um sicherzugehen, dass es sich bei dem aus Zellen isolierten fluoreszierenden Extrakt um Porphyrin handelt, wurde von HeLa wt- und HeEB1-Zellen ein Excitationspektrum aufgenommen. Wie in Abbildung 42 gezeigt, stimmten diese Spektren weitgehend mit dem Spektrum von reinem Protoporphyrin IX (0,1 μ M) überein.

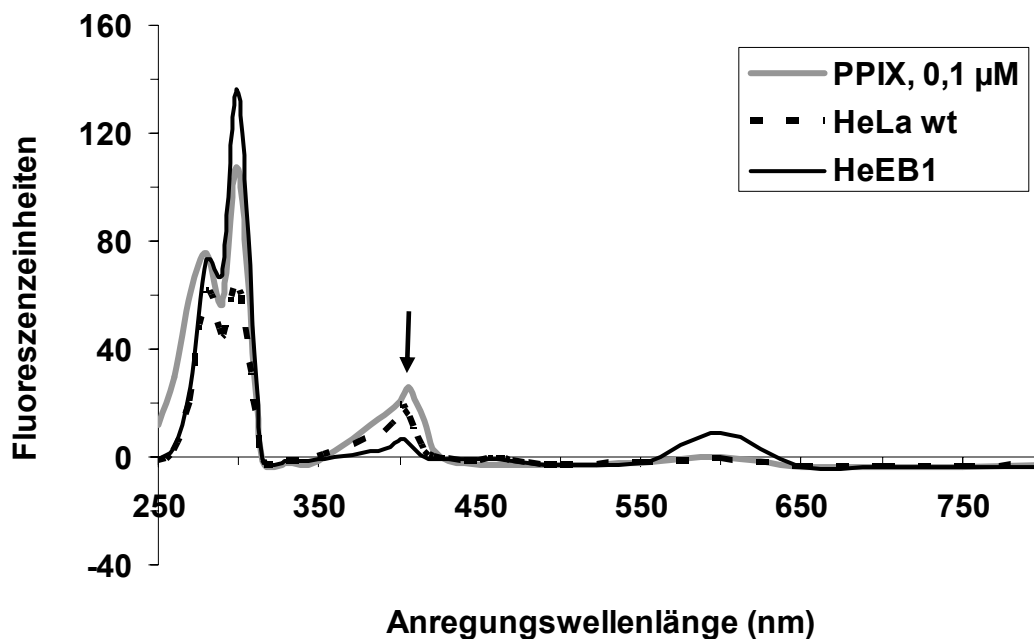


Abbildung 42: Excitationsspektren von Protoporphyrin IX-Lösung (PPIX, 0,1 μM), HeLa wt- und HeEB1-Zellextrakten (jeweils 0,1 Mio. Zellen/ μl). Für die Messung des Spektrums wurde bei konstanter Emission von 604 nm die Anregungswellenlänge variiert. Der schwarze Pfeil zeigt die Anregung bei $\lambda = 406 \text{ nm}$, bei der die Protoporphyrin IX-Fluoreszenz ein relatives Maximum besitzt. Diese Bedingungen (Emission = 604 nm, Extinktion = 406 nm) wurden zur quantitativen Bestimmung des PPIX-Gehaltes (vgl. Abbildung 41) in Zellextrakten herangezogen.

Die unterschiedlichen PPIX-Gehalte in HeLa wt-, HeLa $\rho 0$ - und HeEB1-Zellen erlauben es, die Bedeutung der Porphyrine beim Photosensibilisierungsprozess durch sichtbares Licht zu bestimmen. Es bietet sich nun an, die Sensitivität der Zellen gegenüber sichtbarem Licht zu testen. Bei einer tragenden Rollen der Porphyrine als endogene Photosensibilisatoren würde man erwarten, dass sich in HeLa $\rho 0$ - bzw. HeEB1-Zellen, die einen wesentlich geringeren PPIX-Gehalt besitzen, weniger oxidative DNA-Modifikationen induzieren lassen als in HeLa wt-Zellen. Wie bereits in Abbildung 32 (Kapitel 5.2.1) gezeigt, war das Ausmaß induzierter Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen nach einmaliger Bestrahlung von 20 min jedoch unabhängig vom PPIX-Gehalt in allen Zellen gleich groß. Offenbar ist Protoporphyrin IX nicht wesentlich beteiligt an der Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch sichtbares Licht.

Ein Ausschlusskriterium dafür, dass Protoporphyrin IX der gesuchte zelluläre Photosensibilisator ist, wäre ein fehlender *Photobleaching*-Effekt bei der Bestrahlung mit Licht. Um dies zu überprüfen, wurde der PPIX-Gehalt in HeLa wt-, HeLa $\rho 0$ - und HeEB1-Zellen vor und nach Bestrahlung mit Licht bestimmt (Abbildung 43).

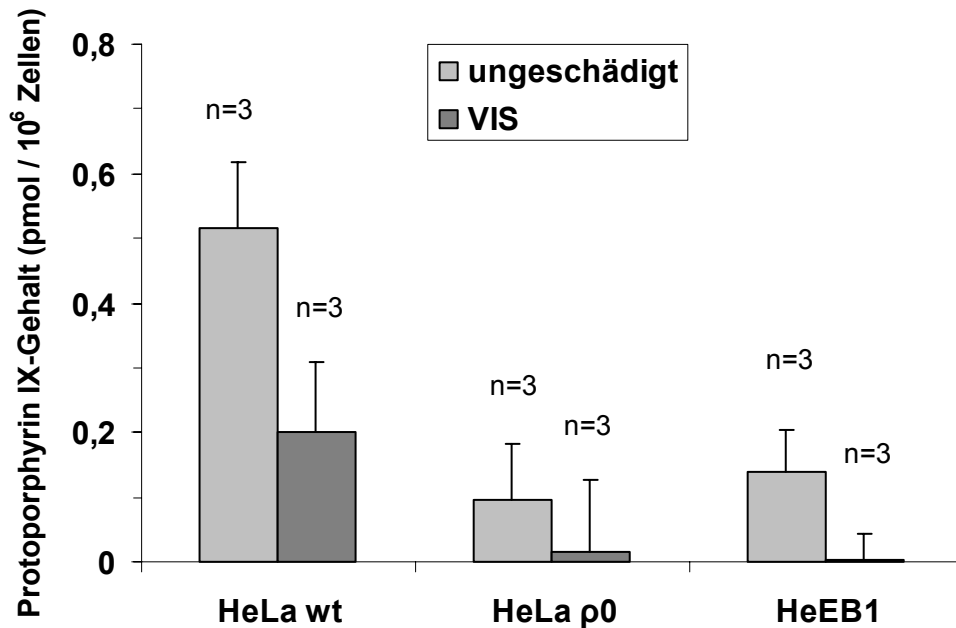


Abbildung 43: Protoporphyrin IX-Gehalt in unbehandelten und bestrahlten Zellen. Die Bestrahlungsbedingungen sind in Kapitel 4.2.2.1 beschrieben (20 min Bestrahlung entspricht 450 kJ/m² im Bereich von 400-800 nm). Die Porphyringehalte der unbehandelten Zellen wurden aus Abbildung 42 übernommen.

Nach der zwanzigminütigen Bestrahlung mit sichtbarem Licht war eine signifikante ($p < 0,05$) Abnahme des PPIX-Gehaltes in HeLa wt-Zellen zu beobachten. In HeLa p0- und HeEB1-Zellen war die Abnahme nicht signifikant nachweisbar, da der PPIX-Gehalt dieser Zellen bereits vor der Bestrahlung sehr niedrig war. Der gemessene *Photobleaching*-Effekt von zellulärem Protoporphyrin IX reicht jedoch nicht aus, um von einer Beteiligung des PPIX an der Induktion von oxidativen DNA-Modifikationen durch sichtbares Licht zu sprechen, da viele Moleküle ein *Photobleaching* nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht zeigen, aber keine DNA-Schäden induzieren.

5.3.1.2 Cryptochrome

Um die Fähigkeit der Cryptochrome zu testen, in Gegenwart von sichtbarem Licht oxidativen DNA-Schaden zu verursachen, wurden *cry1/cry2*-Doppelknockout-Mausembryofibroblasten (*cry* k.o.-Zellen) untersucht. Dabei war zunächst von Interesse, ob *cry* k.o.-Zellen durch die Abwesenheit der beiden Proteine einen niedrigeren Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen besitzen (Abbildung 44).

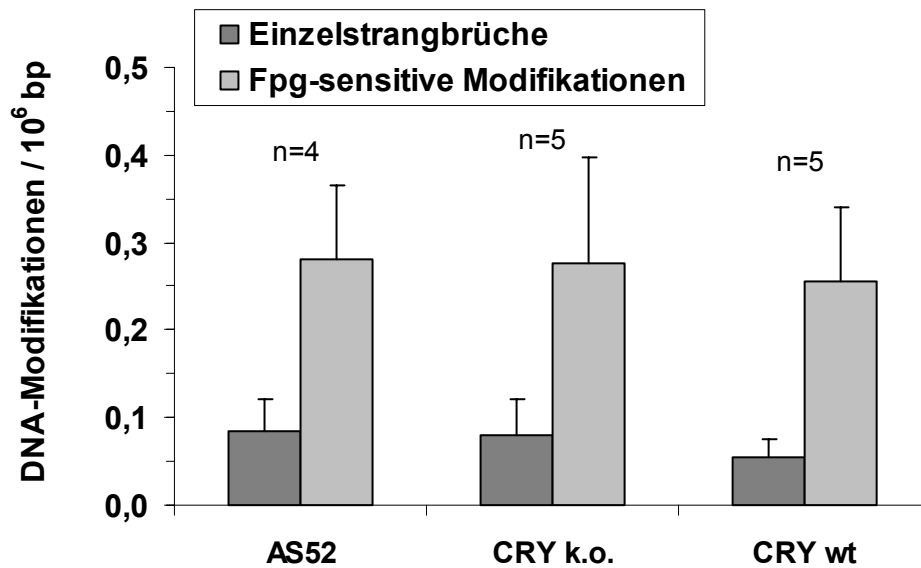


Abbildung 44: Hintergrundspiegel an oxidativen DNA-Modifikationen in *cry wt*-, *cry k.o.*- und AS52-Zellen, gemessen mit Fpg-Protein in der Alkalischen Elution. Die Daten wurden aus Tabelle 4 übernommen.

Die Hintergrundspiegel an oxidativen DNA-Schäden in beiden Mausembryofibroblasten (Wildtyp und *knockout*) unterschieden sich weder voneinander, noch von den als Kontrolle mitgeführten AS52-Zellen.

Daraufhin wurde untersucht, ob die Suszeptibilität von *cry k.o.*-Mausembryofibroblasten gegenüber einer Induktion von oxidativen DNA-Modifikationen nach einer Bestrahlung mit sichtbarem Licht verringert ist (Abbildung 45). Ein solcher Befund würde darauf hinweisen, dass Cryptochrome als endogene Photosensibilisatoren an der Induktion von oxidativen Modifikationen durch sichtbares Licht beteiligt sind.

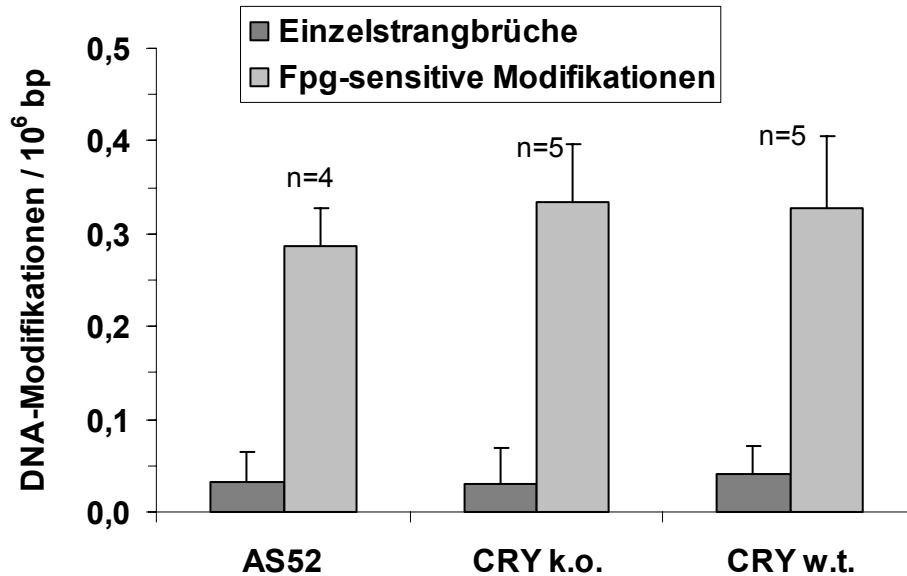


Abbildung 45: Suszeptibilität von *cry wt*-, *cry k.o.*- und AS52-Zellen gegenüber der Induktion Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen nach einer einmaligen Bestrahlung. Die Durchführung ist in Kapitel 4.2.2.1 beschrieben, die Bestrahlungsdosis betrug 450 kJ/m^2 (zwischen 400-800 nm).

Auch hier ergab sich kein Unterschied zu den Wildtyp-Zellen oder den AS52-Zellen, die als Kontrolle mitgeführt wurden. Offenbar leisten Cry-Proteine keinen Beitrag als Photosensibilisatoren zur Licht-induzierten Generierung oxidativer DNA-Modifikationen.

5.3.2 Dauerbestrahlung

Ein Charakteristikum der dauerhaften Bestrahlung von Zellen mit sichtbarem Licht ist die bereits in Kapitel 2.3.3 beschriebene Sättigung oxidativer DNA-Modifikationen. Allerdings wurden derartige chronische Bestrahlungsexperimente bisher noch nicht mit Melanomzellen durchgeführt, sodass sich die Frage stellte, ob der beobachtete Sättigungseffekt auch hier auftreten würde. Um dies zu überprüfen, wurden primäre M8,99-Melanomzellen und F8,99-Hautfibroblasten des gleichen Patienten 0-60 min bestrahlt (Abbildung 46). Dabei wurde zunächst in einem Vorversuch sichergestellt, dass die Temperatur während dieser Zeitspanne nicht ansteigt, sodass ausgeschlossen werden kann, dass eine eventuelle Schadenszunahme auf Temperatureffekte zurückzuführen ist (nicht gezeigt).

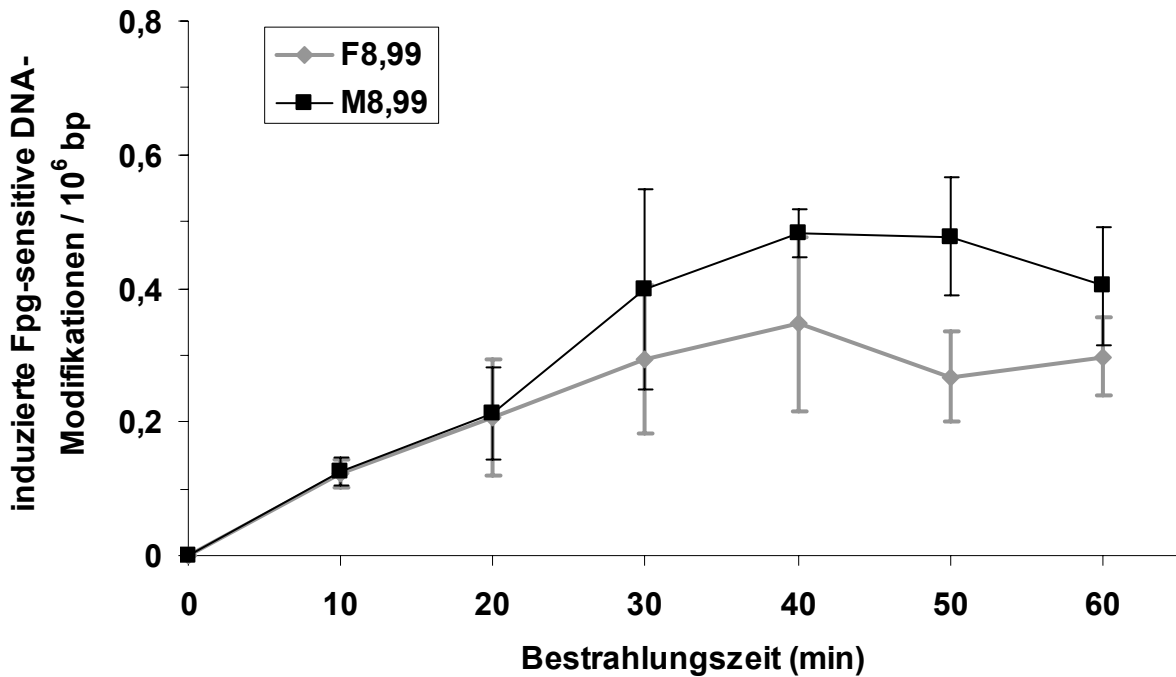


Abbildung 46: Fpg-sensitive oxidative DNA-Modifikationen nach chronischer Bestrahlung in M8,99-Melanomzellen und F8,99-Hautfibroblasten des gleichen Patienten. Die Durchführung ist in Kapitel 4.2.2.1 erklärt. Jeder Datenpunkt zeigt den Mittelwert aus 3-23 Versuchen (Ausnahme: Der Wert nach zehnminütiger Bestrahlung der F8,99-Zellen wurde aus $n=2$ Versuchen errechnet). Eine Bestrahlung von 10-60 min entspricht einer Energiedosis von 225-1350 kJ/m² zwischen 400-800 nm.

Wie in Abbildung 46 gezeigt, war eine Sättigung der Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen bei längeren Bestrahlungszeiten zu beobachten. Im Fall der Melanomzellen stiegen die DNA-Schäden noch bis zu 40 min an, während zwischen den 20- und 40- bzw. 50-min-Messwerten bei den Hautfibroblasten kein statistisch signifikanter Unterschied besteht. Aufgrund hoher Standardabweichungen bei einzelnen Messwerten besteht im Vergleich zwischen F8,99- und M8,99-Zellen nur beim 50 min-Wert eine signifikante ($p < 0,05$) Differenz, sodass unter Vorbehalt von einem möglichen Suszeptibilitätsunterschied der beider Zelllinien bei chronischer Bestrahlung gesprochen werden kann.

5.3.3 Mehrfachbestrahlung unter Regenerierung der endogenen Photosensibilisatoren

5.3.3.1 Bestrahlung im Abstand von zwölf Stunden

Die Sättigung oxidativer DNA-Modifikationen bei längerer Bestrahlung mit Licht erlaubte es bisher nicht, weitere gentoxische Konsequenzen dieser Behandlung, wie die Bildung von Mikrokernen oder Mutationen, zu untersuchen. Daher war es Ziel zu überprüfen, ob dieser Sättigungseffekt in Melanomzellen umgangen werden kann.

Dazu wurden die M8,99-Zellen im Abstand von 12 Stunden für jeweils 20 min mehrfach bestrahlt (insgesamt vier Bestrahlungen, Abbildung 47).

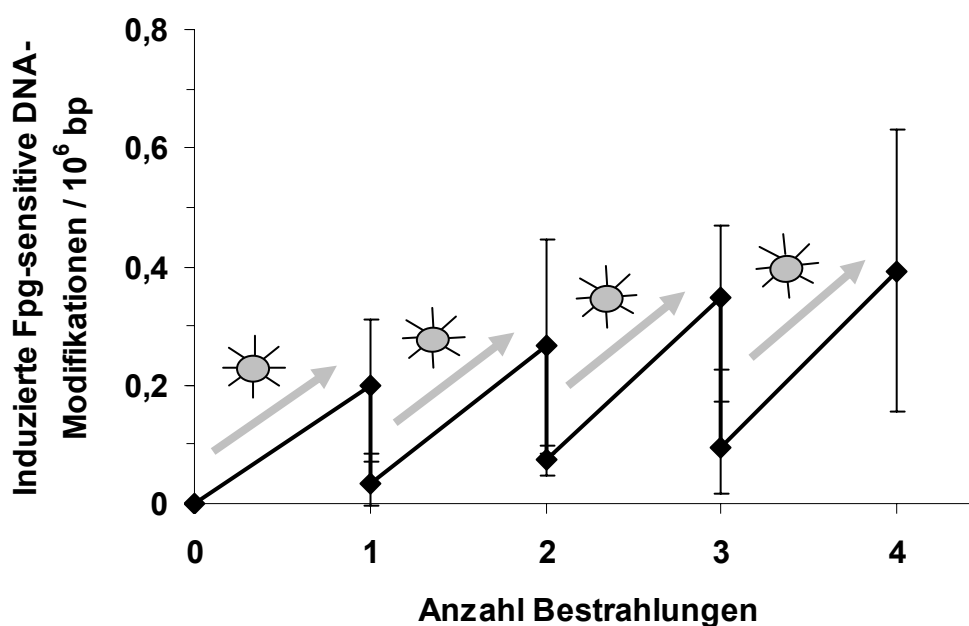


Abbildung 47: Induktion Fpg-sensitiver oxidativer DNA-Modifikationen durch Mehrfachbestrahlung in M8,99-Melanomzellen mit sichtbarem Licht. Die Zellen wurden bis zu viermal im Abstand von 12 Stunden bestrahlt ($n=3-4$, zur Durchführung siehe Kapitel 4.2.2.1), jede Bestrahlungsdosis entsprach dabei 450 kJ/m^2 (20 min) zwischen 400-800 nm. Zwischen den einzelnen Bestrahlungen wurden die Zellen für 11 h 40 min in Vollmedium im Brutschrank (37°C , 5% CO_2) aufbewahrt. Ein Teil der Zellen wurde direkt nach der Bestrahlung aufgearbeitet, der andere Teil nach den Ruhephasen. Der Hintergrundspiegel vor der ersten Bestrahlung wurde jeweils abgezogen.

Die Ergebnisse (Abbildung 47) zeigen, dass bei jeder Bestrahlung der gleiche Schaden induziert wurde. Dies bedeutet, dass sich die daran beteiligten endogenen Chromophore innerhalb der Ruhephase von 11 Stunden und 40 Minuten regeneriert haben müssen. Weiterhin zeigen die Daten, dass in dieser Zeit ein Großteil der induzierten Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen von der Zelle repariert wird. Ein kleiner Restschaden scheint jedoch zu akkumulieren, sodass insgesamt trotz Reparaturphasen ein leichter Anstieg der DNA-Modifikationen zu beobachten ist. Das Reparaturverhalten der Zelle ist unabhängig von der Anzahl der Mehrfachbestrahlungen, wie Abbildung 48 verdeutlicht, das heißt, es gibt weder eine Adaptation im Sinne einer effizienteren Beseitigung der Schäden, noch ein Nachlassen der Reparatur, etwa durch Schädigung des Reparatursystems.

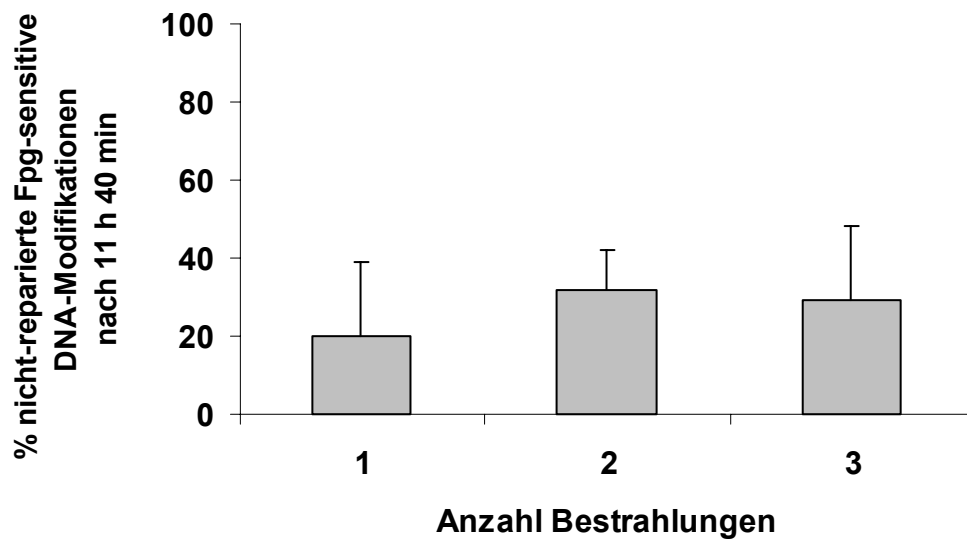


Abbildung 48: Reparatur Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen in M8,99-Melanomzellen nach Mehrfachbestrahlung mit sichtbarem Licht. Gezeigt ist der Anteil nicht reparierter Läsionen, der nach der in Abbildung 47 beschriebenen Bestrahlungsbehandlung und Reparatur von 11 h 40 min gemessen wurde.

5.3.3.2 Bestrahlung im Abstand von zwei Stunden

Bei der Mehrfachbestrahlung im Abstand von zwölf Stunden konnte möglicherweise keine Reparaturadaptation beobachtet werden, weil ein Großteil der Schäden nach 11 Stunden und 40 Minuten bereits repariert waren. Aus dem gleichen Grund konnte es nach diesem Protokoll auch nicht zu einer messbaren Akkumulation von oxidativen DNA-Modifikationen kommen. Daher wurden die gleichen Versuche nochmals mit einer Ruhephase von zwei Stunden nach jeder Schadensinduktion durchgeführt (Abbildung 49).

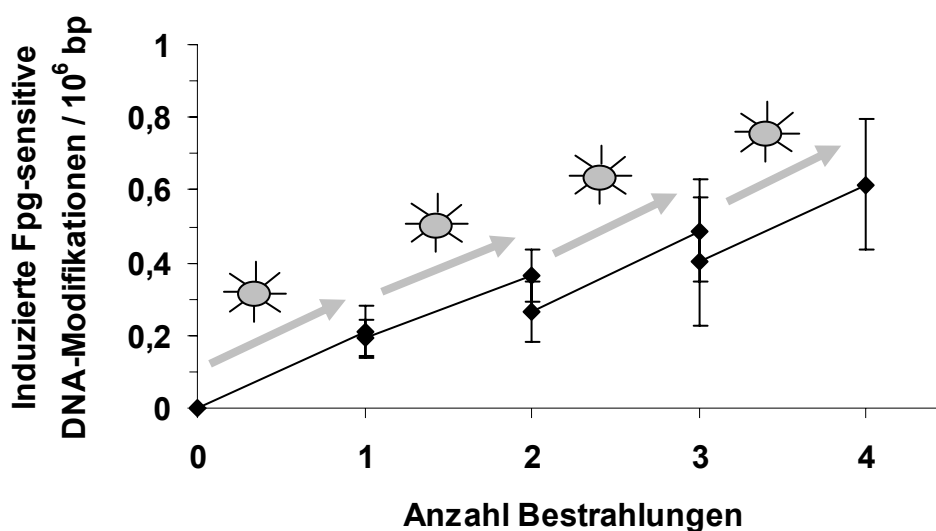


Abbildung 49: Fpg-sensitive oxidative DNA-Modifikationen nach Mehrfachbestrahlung von M8,99-Melanomzellen im Abstand von zwei Stunden. Die Zellen wurden im Abstand von zwei Stunden für jeweils 20 min bestrahlt (entspricht je 450 kJ/m^2 , genaues Protokoll unter Kapitel 4.2.2.1) und in den Ruhephasen für 1 h 40 min in Vollmedium im Brutschrank (37°C , 5 % CO_2) inkubiert. Die Anzahl der Versuche war $n=5-8$.

Bei jeder Bestrahlungsphase wurde in den M8,99-Zellen jeweils das gleiche Ausmaß an Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen induziert werden (ca. $0,2/10^6$ bp). Dies spricht für eine Regeneration der endogenen, als Photosensibilisatoren wirkenden Chromophore innerhalb der zwei Stunden Ruhephase.

Zum besseren Vergleich zwischen chronischer und mehrfacher Bestrahlung wurden die Daten der Mehrfachbestrahlung umgerechnet, sodass die Reparatur in den Ruhephasen unberücksichtigt bleibt. In Abbildung 50 gezeigt ist so die kumulative Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Mehrfachbestrahlung verglichen mit der Induktion durch chronische Bestrahlung. Bei einer Bestrahlungszeit von zwanzig Minuten sind beide Werte wie erwartet identisch, denn diese Zeit entspricht ja einer Bestrahlungsphase bei der Mehrfachbehandlung. Danach steigen beide Kurven an, nehmen jedoch einen anderen Verlauf. Im Fall der Dauerbestrahlung stellt sich zwischen 30-40 min eine Sättigung ein, während die bei der Mehrfachinduktion erreichten Schadenswerte stetig zunehmen.

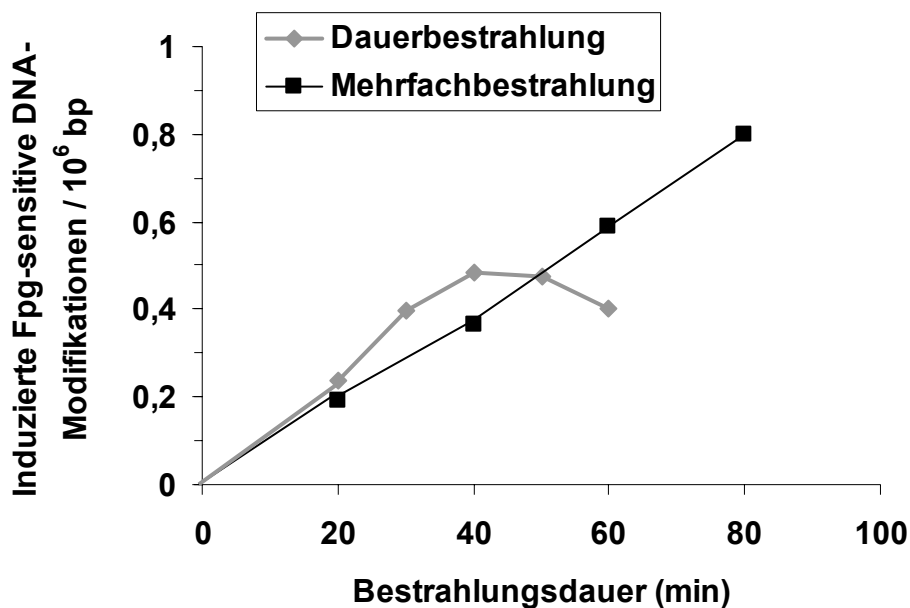


Abbildung 50: Vergleich der kumulativen Zahl Fpg-sensitiver oxidativer DNA-Modifikationen nach Mehrfach- und Dauerbestrahlung in M8,99-Melanomzellen. Die Daten wurden aus den in Abbildung 47 und Abbildung 49 dargestellten Versuchen entnommen.

Um eine mögliche Adaptation des zellulären Reparatursystems bei der Mehrfachbestrahlung im Abstand von zwei Stunden zu erkennen, wurde der prozentuale Anteil der nach dieser Zeit nicht reparierten DNA-Modifikationen berechnet (Abbildung 51).

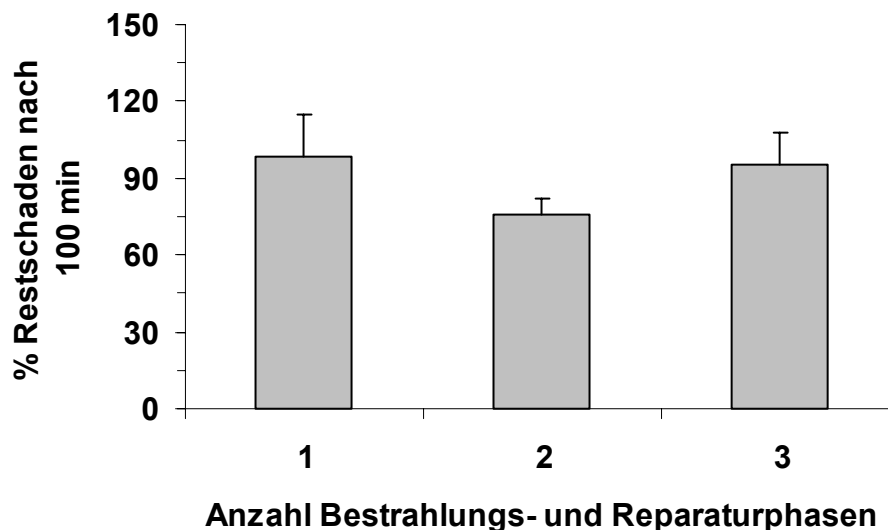


Abbildung 51: Reparatur Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen nach Mehrfachbestrahlung in M8,99-Melanomzellen. Der Anteil nicht-reparierter oxidativer DNA-Modifikationen jeweils 100 min nach einer Bestrahlung wurde aus den in Abbildung 49 gezeigten Messwerten berechnet.

Der nach 100 min noch verbleibende Restschaden schwankt zwischen 76-98 %, die Unterschiede der Reparatur nach ein-, zwei- und dreimaliger Bestrahlung sind jedoch nicht signifikant. Die Ergebnisse zeigen, dass es keine Adaptation der Reparatur im Sinne einer effizienteren Schadensbeseitigung gibt.

Insgesamt konnten unter den realitätsnahen Bedingungen der Mehrfachbestrahlung stetig oxidative DNA-Modifikationen induziert werden, ein Sättigungseffekt dieser Schäden, wie bei der chronischen Bestrahlung mit der gleichen Dosis zu sehen, blieb aus. Weiterhin konnte durch Mehrfachbestrahlung von Melanomzellen mit zwischenzeitlichen Ruhephasen von 100 min gezeigt werden, dass es nach Induktion oxidativer DNA-Modifikationen nicht zu einer Adaptation der Reparatur dieser Schäden kommt. Diese Befunde zeigen, dass das Risiko der Induktion oxidativer DNA-Modifikationen bisher unterschätzt wurde.

5.3.4 Induktion von DNA-Modifikationen durch gepulstes Licht (400-500 nm)

Nachdem dauerhafte Bestrahlung in Melanomzellen zu einer Sättigung der Anzahl oxidativer DNA-Modifikationen führte, Mehrfachbestrahlung jedoch nicht, war es interessant, den Effekt von gepulster Strahlung zu bestimmen. Es wurden bereits klinische Versuche an Freiwilligen durchgeführt, in denen sich gepulstes Licht als effizienter gegen Hautekzeme/Haarausfall erwies als die gleiche Dosis kontinuierlicher Bestrahlung (J.H. Wilkens, Fa. OptoMed, Berlin; persönliche Mitteilung). Die Ursache dieses Effektes ist bisher nicht bekannt, er könnte jedoch auf unterschiedliche hohe Induktion oxidativer DNA-Schäden durch gepulstes verglichen mit kontinuierlichem Licht zurückzuführen sein.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurden zwei Flaschen mit M8,99-Zellen mit unterschiedlichen Lampen der Firma OptoMed (Berlin) bestrahlt und danach die induzierten Fpg-sensitiven oxidativen DNA-Modifikationen in der Alkalischen Elution bestimmt. Bei einer der OptoMed-Lampen handelte es sich dabei um ein Modell, das Licht der Wellenlänge von 400-500 nm kontinuierlich emittiert. Die zweite Lampe emittierte das gleiche Spektrum, jedoch in kurzen, gepulsten Lichtblitzen. In Abbildung 52 sind die Ergebnisse dieser Bestrahlungen gezeigt.

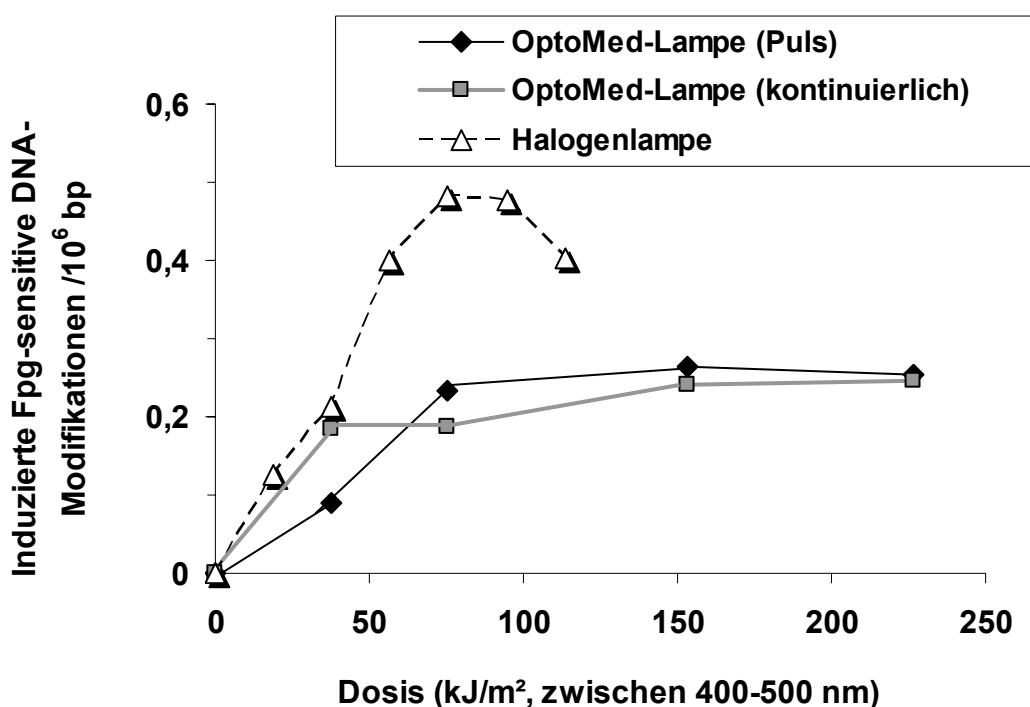


Abbildung 52: Anzahl Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen nach Bestrahlung von M8,99-Zellen mit kontinuierlichem und gepulstem Licht, verglichen mit der Bestrahlung durch die Halogenlampe. Die Daten für die Bestrahlung mit der Halogenlampe sind aus Abbildung 46 entnommen, die Dosis wurde umgerechnet für die Emission von Licht zwischen 400-500 nm. Zur Bestrahlung mit den OptoMed-Lampen (Anzahl der Versuche $n=2-3$) wurde bei 4 °C im Kühlraum gearbeitet, um eine Erwärmung zu vermeiden. Eine Bestrahlung auf Eis war aus technischen Gründen nicht möglich, erzielt aber (bei Bestrahlung mit der Halogenlampe) auch nur einen Kühlungseffekt der Zellen von maximal 3,5 °C (Daten nicht gezeigt). Eine genaue Beschreibung zur Bestrahlung mit den OptoMed-Lampen findet sich in Kapitel 4.2.2.4.

Zwischen der Pulslampe und der kontinuierlich strahlenden Lampe gab es keinen Unterschied hinsichtlich der Induktion oxidativer DNA-Modifikationen in M8,99-Zellen. Das bedeutet, dass im Fall der Puls- und der kontinuierlich emittierenden Lampe der Photosensibilisator gleichermaßen durch *Photobleaching*-Effekte „verbraucht“ wird. Im Gegensatz zur Bestrahlung mit der Halogenlampe erreichten die induzierten Werte schon bei der Hälfte ($0,24/10^6$ bp) eine Sättigung. Wahrscheinlich ist die höhere Induzierbarkeit durch Bestrahlung mit der Halogenlampe darauf zurückzuführen, dass diese Lampe noch Licht anderer Wellenlänge (außerhalb von 400-500 nm) emittiert, das durch weitere endogene Chromophore absorbiert wird und über diesen Mechanismus die DNA schädigt.

Durch die Sättigung bei relativ niedrigen Werten induzierter oxidativer DNA-Modifikationen ist die Bestrahlung mit den OptoMed-Lampen ungeeignet zur Bestimmung weiterführender gentoxischer Konsequenzen, wie der Bildung von Mikrokernen.

5.3.5 Suszeptibilität von Melanomzellen gegenüber der Induktion von Mikrokernen

Neben der Anzahl oxidativer DNA-Modifikationen, die in dieser Arbeit durch Fpg-Protein in der Alkalischen Elution detektiert wurden, war es interessant, das Maß aneugener bzw. klastogener Schädigung in Melanomzellen nach Bestrahlung mit Licht zu quantifizieren. Dazu wurde die Anzahl Mikrokern bestimmt. Wie bereits im Methodenteil (Kapitel 4.2.13) beschrieben, handelt es sich bei Mikrokernen um abgespaltene Chromosomen bzw. Chromosomenbruchstücke, die durch klastogene bzw. aneugene Behandlung hervorgerufen und bei der Kernteilung sichtbar werden (Romagna, 1993). Im Rahmen dieser Dissertation sollte der Mikrokerntest dazu genutzt werden, um gentoxische Konsequenzen der Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Melanomzellen aufzuzeigen.

5.3.5.1 Mikrokern in Melanomzellen und Hautfibroblasten nach Mehrfachbestrahlung mit sichtbarem Licht

Die Anzahl Licht-induzierter Mikrokern sollte in M8,99-Melanomzellen und Hautfibroblasten des gleichen Melanompatienten gemessen werden, um die Suszeptibilität unterschiedlicher Zellsorten vergleichen zu können. Dazu wurde zunächst die Anzahl der Mikrokern in unbehandelten M8,99- und F8,99-Zellen nach Anfärbung der DNA mit Bisbenzimid (Hoechst No. 33258) im Fluoreszenz-Mikroskop ausgezählt. Hier war auffällig, dass die Melanomzelle einen wesentlich höheren Untergrundspiegel an Mikrokern besaß (Abbildung 53). Bisher in unserem Arbeitskreis bestimmte Mikrokernraten (zum Beispiel 16 Mikrokern/2000 Kerne in unbehandelten L1210-Maus-Leukämie-Zellen (Pflaum, 1996)) entsprachen eher dem in den Hautfibroblasten gemessenem Ergebnis. Der in Abbildung 53 gezeigte Befund deutet auf eine größere genomische Instabilität der M8,99-Zellen hin, was auch in dem stärker beschädigten Aussehen der Zellkerne im Fluoreszenz-Mikroskop zum Ausdruck kommt.

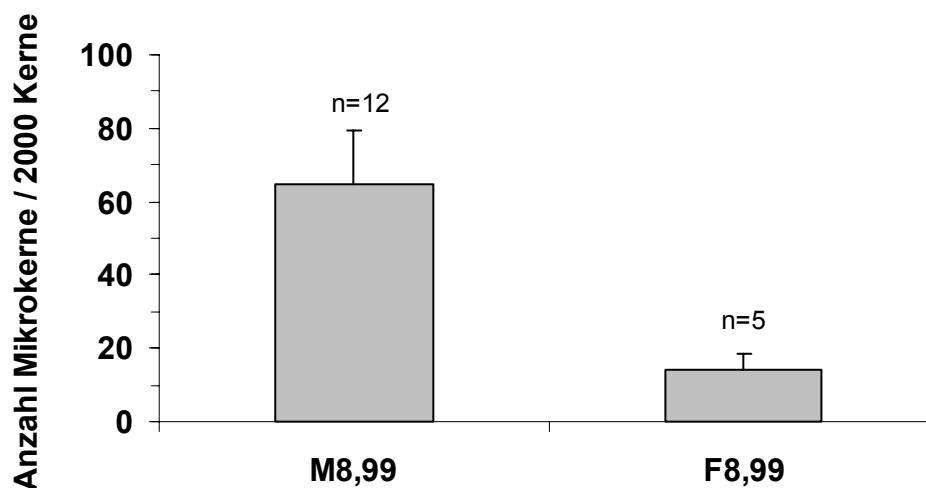


Abbildung 53: Häufigkeit von Mikrokernen in unbehandelten M8,99-Melanomzellen und F8,99-Hautfibroblasten. Das genaue Protokoll ist in Kapitel 4.2.13 beschrieben. Der Unterschied zwischen den beiden Zelltypen ist signifikant ($p < 0,01$).

Um klastogene/aneugene Effekte durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht detektieren zu können, wurden beide Zellen ein- bis viermal bestrahlt, danach wurde die Anzahl Mikrokerne quantifiziert (Abbildung 54).

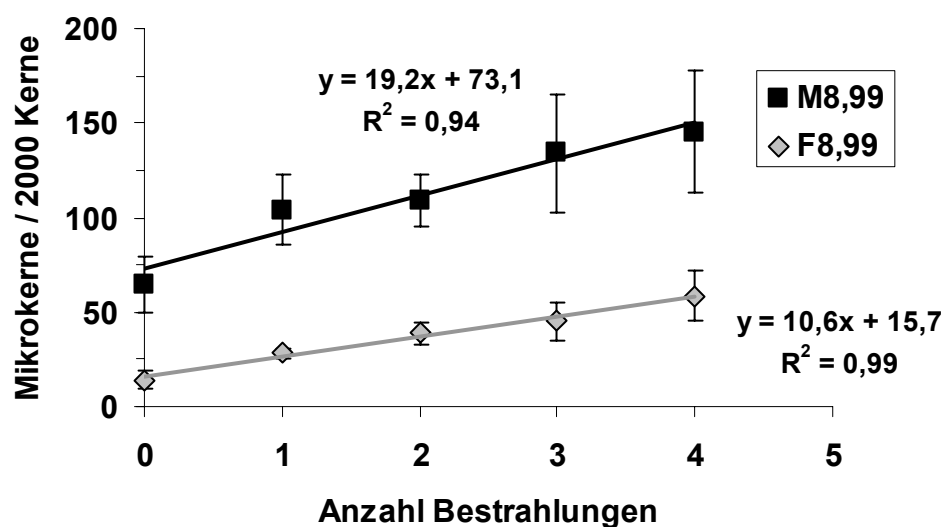


Abbildung 54: Induktion von Mikrokernen in M8,99-Melanomzellen und F8,99-Fibroblasten durch Mehrfachbestrahlung mit der Halogenlampe. Die Bestrahlung wurde im Abstand von zwei Stunden durchgeführt, analog den in Abbildung 49 beschriebenen Bedingungen. Jeder Datenpunkt zeigt einen Mittelwert aus 3-12 unabhängigen Versuchen.

Sowohl bei den M8,99- als auch bei den F8,99-Zellen ist eine lineare Zunahme der Anzahl Mikrokerne nach Bestrahlung zu beobachten. Die Regressionsgerade der M8,99-Zellen besitzt eine Steigung von 19,2, die der F8,99-Zellen ist nur etwa halb so hoch. Dieser Befund bedeutet, dass M8,99-Zellen bezüglich der Entwicklung von

Mikrokernen sensitiver auf die Bestrahlung mit Licht reagieren als die Fibroblasten aus dem gleichen Patienten.

5.3.5.2 DNA-Modifikationen und Mikrokerne nach Bestrahlung durch einen Kantenfilter

Die Zunahme oxidativer Modifikationen durch Mehrfachbestrahlung (Abbildung 49) ging also mit gentoxischen Konsequenzen, der Induktion von Mikrokernen (Abbildung 54), einher. Da die für die Bestrahlungen verwendete Halogenlampe auch einen geringen Anteil UV-Licht emittiert, kann die Anzahl induzierter Mikrokerne nicht nur auf die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen zurückgeführt werden. Weitere DNA-Schäden, die vermutlich durch die Bestrahlung induziert werden und die für die Mikrokernbildung verantwortlich sein könnten, sind Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD) und Einzelstrangbrüche. Um Wellenlängen im UV-Bereich auszuschließen und so die Induktion von CPD zu verhindern, wurden im folgenden Kantenfilter eingesetzt, die nur für Strahlung mit einer Wellenlänge von $\lambda > 395$ nm durchlässig sind. Der Kantenfilter wurde dabei in eine Halterung eingepasst, die aus lichtundurchlässigem Kunststoff bestand. Eine Kontrollflasche mit Zellen wurde durch die Halterung allein, ohne den Filter, bestrahlt. Um zu verifizieren, dass bei Bestrahlung mit Kantenfilter keine UV-B-Strahlung zu den Zellen durchdringt, wurden die T4 Endo V-sensitiven Modifikationen mitbestimmt. Dieses Enzym erkennt durch UV-Licht induzierte Cyclobutan-Pyrimidindimere, und entfernt diese unter Hinterlassung eines Einzelstrangbruches (analog dem Mechanismus der 8-oxoG-Entfernung durch Fpg-Protein). Die Ergebnisse dieser Bestrahlung sind in Abbildung 55 gezeigt.

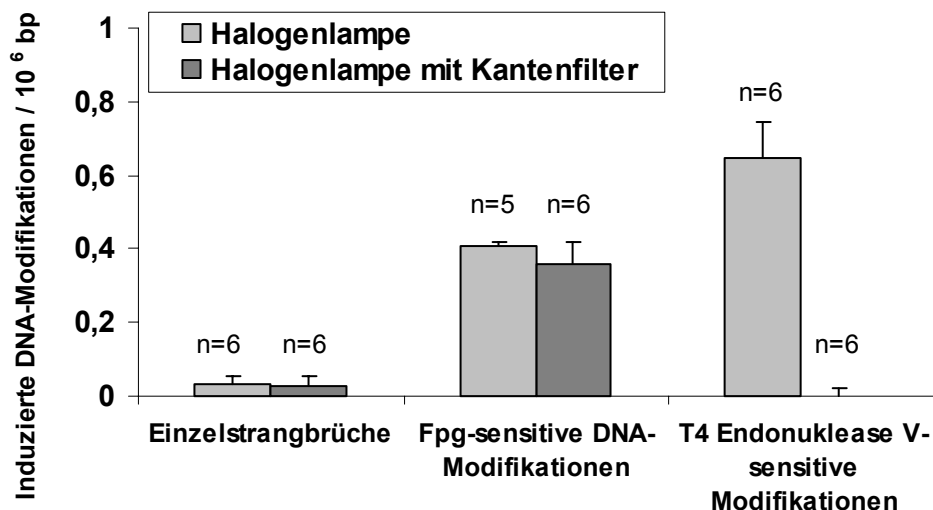


Abbildung 55: Induzierte Fpg-sensitive DNA-Modifikationen nach viermaliger Bestrahlung durch eine Halterung mit und ohne Kantenfilter, der nur für Strahlung > 395 nm durchlässig ist. Die Durchführung ist unter Kapitel 4.2.2.2 näher beschrieben. Zwischen den einzelnen Bestrahlungen (je 20 min) lag eine Ruhezeit von je 1 h 40 min, während der die Zellen in Vollmedium im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂) aufbewahrt wurden.

In diesen Versuchen wurde deutlich, dass die Halogenlampe ohne Kantenfilter noch eine hohe Anzahl an T4 Endo V-sensitiven DNA-Modifikationen verursacht. Bei Verwendung des 395 nm-Kantenfilters werden keine solchen DNA-Schäden mehr induziert. Weiterhin lässt die Abbildung die Schlussfolgerung zu, dass nahezu alle induzierten Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen durch Licht einer Wellenlänge > 395 nm induziert werden, da sich ihre Zahl durch die Verwendung des Kantenfilters nicht oder nur sehr wenig verringert. Im Vergleich zur Mehrfachbestrahlung ohne Kantenfilter und ohne Halterung (Abbildung 49) wurde bei Bestrahlung durch den Filterhalter bzw. durch Filterhalter plus Filter weniger Schäden induziert. Dieser Effekt deutet darauf hin, dass ein Teil der in Abbildung 49 induzierten Schäden auf durch das Eis reflektierte Streulicht zurückzuführen ist und die bei den Zellen ankommende Dosis der Lichtbestrahlung in Abbildung 55 reduziert (kleiner als 450 kJ/m² je Bestrahlung) ist.

Unter den gleichen Bestrahlungsbedingungen wie in Abbildung 55 wurde ein Mikrokerntest durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass durch die Bestrahlung durch den Filterhalter allein nicht nur (wie dort gezeigt) die Anzahl Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen erheblich abnimmt. Auch die Anzahl induzierter Mikrokerne geht zurück, sodass die Quantifizierung der induzierten Mikrokerne mit und ohne Kantenfilter nur noch in M8,99-Zellen, und nicht mehr zusätzlich in F8,99-Fibroblasten, sinnvoll erschien (Abbildung 56).

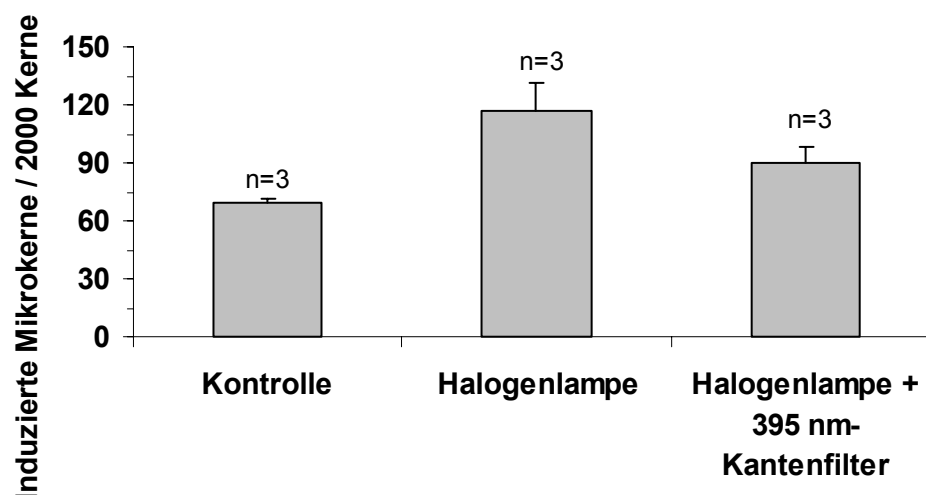


Abbildung 56: Induktion von Mikrokernen nach viermaliger Bestrahlung von M8,99-Melanomzellen durch eine Halterung mit und ohne Kantenfilter, der nur für Strahlung > 395 nm durchlässig ist. Die Bestrahlungsbedingungen waren identisch mit denen von Abbildung 55. Eine Beschreibung des Mikrokerntests ist in Kapitel 4.2.13 gegeben.

Der Einsatz des Kantenfilters beschränkt die Anzahl induzierter Mikrokerne in M8,99-Melanomzellen, der Wert ist jedoch signifikant ($p < 0,05$) verschieden von der unbehandelten Kontrolle. Damit werden auch im sichtbaren Bereich der Lampe (oberhalb von 395 nm) eindeutig Mikrokerne induziert. Diese Mikrokerne können nicht ursächlich auf Cyclobutan-Pyrimidindimere zurückzuführen sein, da diese oberhalb von 395 nm nicht mehr induziert werden (siehe Abbildung 55). Dagegen werden in diesem Spektralbereich noch wenige Einzelstrangbrüche erzeugt.

5.3.5.3 Mikrokerne durch Einzelstrangbrüche

Um zu überprüfen, ob und in welchem Ausmaß die Induktion von Einzelstrangbrüchen (*single strand breaks*, ssb) eine Mikrokernbildung nach sich zieht, wurden M8,99-Zellen mit tert.-Butylhydroperoxid (tBuOOH) geschädigt. Diese Substanz ist ein klassischer Strangbruchinduktor, führt aber nicht zur Bildung von oxidativen DNA-Modifikationen wie 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG) (Latour, 1995; Guidarelli, 1997). Aus diesem Grund eignet sich tBuOOH gut, um den Zusammenhang zwischen Einzelstrangbrüchen und Mikrokernen ohne störenden Einfluss oxidativer DNA-Modifikationen näher zu bestimmen.

Zunächst wurde dazu eine Abhängigkeit der Konzentration an tBuOOH für die Induktion von Einzelstrangbrüchen in M8,99-Melanomzellen gemessen (Abbildung 57).

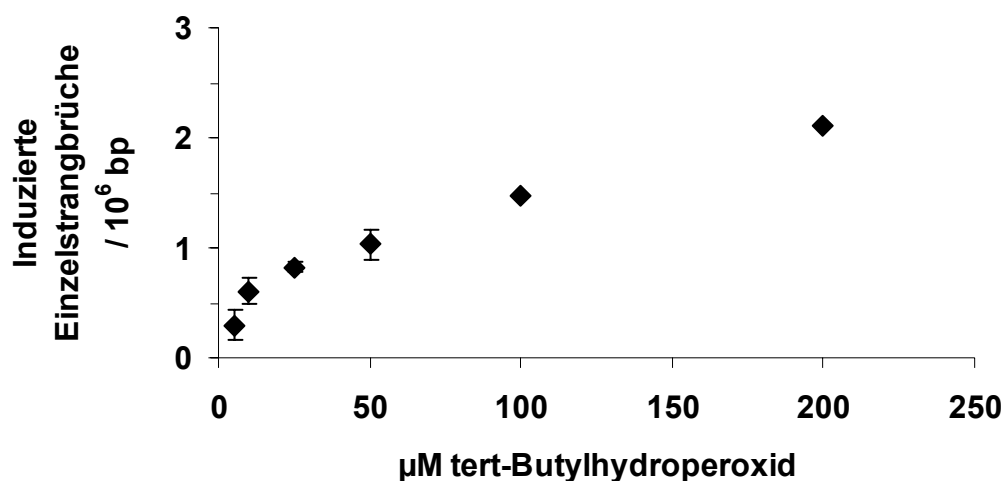


Abbildung 57: Induktion von Einzelstrangbrüchen in M8,99-Melanomzellen durch tert.-Butylhydroperoxid. Die Versuchsbeschreibung ist unter Kapitel 4.2.2.6 gezeigt.

Überraschenderweise reagierten die Melanomzellen wesentlich sensitiver auf die Behandlung mit tBuOOH als andere Zellen, die in unserem Arbeitskreises bisher untersucht wurden. Ein typischer Wert für Schadensinduktion mit 100 µM tBuOOH liegt bei 0,18 ssb/10⁶ bp (gemessen in immortalisierten Mausfibroblasten) (Phoa, 2002). Durch identische Behandlung wurde in M8,99-Zellen fast die zehnfache Anzahl an Einzelstrangbrüchen induziert. Dabei ist der tatsächliche Wert wahrscheinlich höher, da die Alkalische Elution in diesen hohen Bereichen (> 1 ssb/10⁶ bp) keine zuverlässige Quantifizierung der Schäden mehr erlaubt.

Um die durch tBuOOH induzierten Mikrokerne zu bestimmen, wurden die Konzentrationen bis zu 50 µM verwendet, da in diesem Bereich sowohl die Quantifizierung der Einzelstrangbrüche als auch die der Mikrokerne verlässlich war. Die Daten sind in Abbildung 58 als Korrelation zu den tBuOOH-induzierten Einzelstrangbrüchen dargestellt.

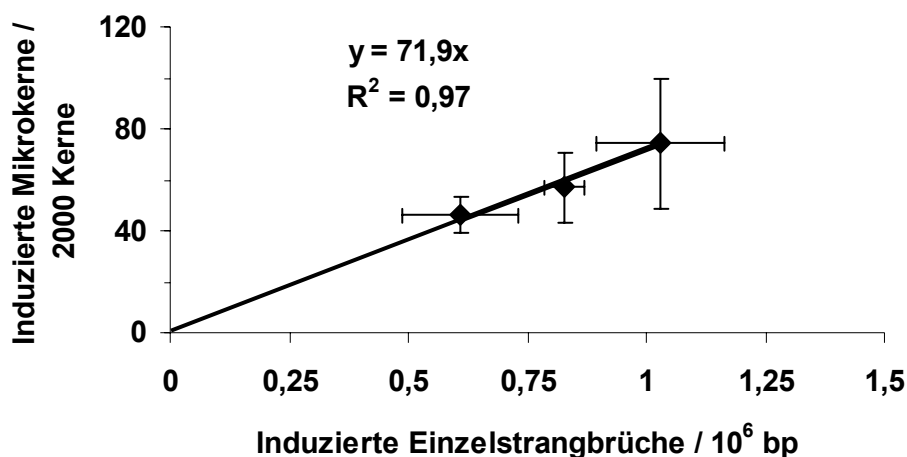


Abbildung 58: Korrelation zwischen durch *tBuOOH*-induzierten Einzelstrangbrüchen und Mikrokernen. Die Schädigung wurde wie in Kapitel 4.2.2.6 beschrieben durchgeführt, das Protokoll zur Quantifizierung von Mikrokernen ist unter Kapitel 4.2.13 aufgeführt. Aus Abbildung 57 sind die Daten zur Einzelstrangbruch-Induktion entnommen. Die Anzahl der Versuche war $n=3$.

Aus der durch den Ursprung verlaufenden Regressionsgerade lässt sich errechnen, dass die Entstehung eines Einzelstrangbruch pro einer Million Basenpaare mit der von 72 Mikrokernen/2000 Kerne verbunden ist.

Die durch Licht mit einer Wellenlänge > 395 nm induzierten Mikrokern können also auf Fpg-sensitive DNA-Modifikationen oder Einzelstrangbrüche zurückgeführt werden, nicht jedoch auf Cyclobutan-Pyrimidindimere.

6 DISKUSSION

6.1 Suszeptibilität der Hautzellen von Melanompatienten gegenüber der Induktion oxidativer DNA-Modifikationen

Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen oxidativen DNA-Modifikationen und der Entstehung des malignen Melanoms aufzuklären. Dazu wurde zunächst überprüft, ob Melanomzellen bzw. Hautfibroblasten des gleichen Melanompatienten unterschiedlich empfindlich gegenüber der Bildung und Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen reagieren. Als Messparameter wurden der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen, ihre Induzierbarkeit durch sichtbares Licht sowie die Reparatur dieser DNA-Schäden berücksichtigt. Die oxidativen DNA-Modifikationen wurden jeweils als Fpg-sensitive Modifikationen bei der Alkalischen Elution detektiert. Weiterhin wurde die Zahl Licht-induzierter Mikrokerns als Indikator für mutagene Folgen der oxidativen DNA-Schädigung bestimmt. In Tabelle 6 sind die Befunde dieser Untersuchungen zusammengefasst.

Tabelle 6: Zusammenstellung der Ergebnisse für den Vergleich der Suszeptibilität von Melanomzellen und Hautfibroblasten des gleichen Patienten gegenüber der Induktion und Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen. Ein negativer Befund bedeutet, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen Melanomzellen und Hautfibroblasten bestehen.

Parameter	Anzahl untersuchter Patienten-Zellpaare	Befund	Verweis
Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen	3	Negativ	Abbildung 15, Abbildung 16, Tabelle 4
Einmalige Bestrahlung mit Licht	3	Negativ	Abbildung 18
Chronische Bestrahlung mit Licht	1	Positiv für einen Zeitpunkt	Abbildung 46
Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen	3	Positiv für ein Zellpaar	Abbildung 21, Abbildung 22
Induktion von Mikrokernen durch mehrfache Bestrahlung mit Licht	1	Positiv für ein Zellpaar	Abbildung 54

Einige der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse deuten darauf hin, dass Melanomzellen von an malignem Melanom erkrankten Patienten sensibler auf die oxidative DNA-Modifizierung reagieren als Hautfibroblasten des gleichen Spenders.

Bei chronischer Bestrahlung von 50 min (Dosis: 1125 kJ/m² zwischen 400-800 nm) konnten in M8,99-Melanomzellen signifikant mehr oxidative DNA-Modifikationen induziert werden als bei den F8,99-Hautfibroblasten des gleichen Patienten (Kapitel 5.3.2, Abbildung 46). Bei beiden Zellen stellte sich eine Sättigung oxidativer DNA-Schäden ein, die nach Lichtbestrahlung schon in anderen Zellen beobachtet wurde und vermutlich auch ein *Photobleaching* der schadensvermittelnden zellulären Photosensibilisatoren zurückzuführen ist (Kielbassa, 1997; Pflaum, 1998). Dabei war auch auffällig, dass die in dieser Arbeit beobachtete Sättigung an induzierten Fpg-sensitiven Läsionen in Melanomzellen bei höheren Lichtdosen eintrat als bei der von Christopher Kielbassa durchgeführten chronischen Schädigung von AS52-Zellen unter analogen Bedingungen (Kielbassa, 1997). Während sich der Schaden der Melanomzellen wie in Abbildung 46 gezeigt um 0,45 Fpg-sensitive Modifikationen/10⁶ bp einpendelt, beobachteten *Kielbassa et al.* für die AS52-Zellen schon bei ca. 0,3/10⁶ bp eine Sättigung. Ein Grund dafür, dass die M8,99-Melanomzellen auf eine chronische Bestrahlung sensitiver mit der Bildung von oxidativen DNA-Modifikationen reagieren als die F8,99-Hautfibroblasten bzw. die AS52-Zellen, könnte in einer höheren Konzentration zellulärer, Licht-absorbierender Moleküle der M8,99-Zellen liegen. Möglicherweise spielen hier die von gesunden Melanozyten bzw. Melanomkrebszellen produzierten Melanine als zelluläre Photosensibilisatoren eine Rolle. Weiteres zur Identifizierung von am Photosensibilisierungsprozess beteiligten endogenen Molekülen wird in Kapitel 6.4 beschrieben.

Ein weiterer Hinweis darauf, dass oxidative DNA-Modifikationen für die Entstehung des malignen Melanoms eine Rolle spielen könnten, ist die verlangsamte Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen in M2/02-Melanomzellen (gezeigt in Kapitel 5.1.3.2). Die verzögerte Beseitigung dieser Schäden führte in M2/02-Zellen jedoch nicht zu einem Anstieg des Hintergrundspiegels oxidativer DNA-Modifikationen (Abbildung 15). Es kann ausgeschlossen werden, dass dieses Ausbleiben eines Effekts auf den Hintergrundspiegel durch eine bessere antioxidative Kapazität der M2/02-Zellen gegenüber anderen Hautzellen bedingt ist, da alle untersuchten Zellen gleich sensitiv auf eine einmalige Bestrahlung mit Licht reagierten. Möglicherweise produzieren M2/02-Zellen aber weniger endogene ROS und besitzen daher trotz Reparatur-Defekt einen verhältnismäßig niedrigen Spiegel oxidativer DNA-Modifikationen. Nach einer Induktion zusätzlicher oxidativer DNA-Modifikationen durch Licht brauchen die M2/02-Zellen jedoch verglichen mit den Hautfibroblasten des gleichen Patienten die vierfache Zeit, um die Zahl der induzierten DNA-Schäden auf die Hälfte zu reduzieren (16 Stunden statt 4 h, siehe Abbildung 22). Eine starke Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch endogene oder exogene reaktive Sauerstoffspezies birgt für reparaturdefiziente Zellen ein höheres Risiko für Mutationen und damit für eine maligne Entartung.

Zur Bestimmung der Ursache für die Reparaturdefizienz in M2/02-Melanomzellen konnten in dieser Arbeit erste Ergebnisse erzielt werden. Das Ogg1-Protein, das den ersten Schritt der Beseitigung von 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG) durchführt, ist in Zellextrakten von M2/02-Zellen noch vorhanden, wie durch immunologische Detektion im *Western-Blot* gezeigt werden konnte (Abbildung 26). Im *Cleavage-Assay* mit einem 8-oxoG-haltigen Oligonukleotid konnte gezeigt werden, dass das vorhandene Ogg1-Protein keine oder nur eine sehr stark eingeschränkte *Cleavage*-Aktivität für diese oxidative DNA-Modifikation besitzt (Abbildung 23, Abbildung 24, Abbildung 25). Die geringe nachweisbare *Cleavage*-Kapazität, die man bei M2/02-Zellen findet, könnte auch durch unspezifische Nukleasen hervorgerufen werden und spricht nicht zwingend für eine 8-oxoG-Erkennung durch das Ogg1-Protein. Bei der Untersuchung der Hautzellextrakte fiel auf, dass alle untersuchten Melanomzellen und Hautfibroblasten verglichen mit HeLa wt-Zellen eine erheblich eingeschränkte 8-oxoG-*Cleavage*-Aktivität besitzen. Eine verminderte Aktivität von Hautzellextrakten für das Einschneiden des 8-oxoG-Oligonukleotids wurde bereits in von S. Boiteux *et al.* beobachtet (S. Boiteux, Fontenay-aux-Roses, Frankreich; persönliche Mitteilung). In der Reparatur-defizienten M2/02-Melanomzelle war der Effekt jedoch am stärksten ausgeprägt. Der Grund für die verringerte Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen in der Alkalischen Elution und der niedrigen *Cleavage*-Kapazität für 8-oxoG der M2/02-Zellen liegt möglicherweise in einer Mutation des *ogg1*-Gens. Dies soll in nächster Zeit in unserer Arbeitsgruppe mittels Sequenzierung von *ogg1*-cDNA aus M2/02-Zellen überprüft werden. Mutationen im *ogg1*-Gen wurden bereits in Tumoren beim Menschen gefunden und haben in diesen Geweben möglicherweise zur Tumorentstehung beigetragen (Chevillard, 1998).

Ein weiteres Indiz für eine höhere Suszeptibilität von Melanomzellen gegenüber der Induktion oxidativer DNA-Modifikationen ergab sich aus der Zahl Licht-induzierter Mikrokerne in diesen Zellen. Bei viermaliger Bestrahlung im Abstand von zwei Stunden steigt die Zahl induzierter Mikrokerne in M8,99-Melanomzellen stärker an als in den F8,99-Hautfibroblasten des gleichen Patienten. Die größere Anfälligkeit der Melanomzellen für klastogene bzw. aneugene Ereignisse kann allerdings nicht uneingeschränkt auf oxidative DNA-Modifikationen zurückgeführt werden, da die bei der Bestrahlung eingesetzte Lampe auch einen geringen Teil UV-B-Licht emittiert, das Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD) erzeugt. Nach den Ergebnissen von Emri *et al.*, die die Anzahl der Mikrokerne nach Bestrahlung mit UV-B-Licht bzw. mit einer γ -Strahlungsquelle bestimmt haben, zeigen Fibroblasten einen steileren Anstieg induzierter Mikrokerne als gesunde Melanozyten des gleichen Spenders (Emri, 2000). Es wäre interessant zu untersuchen, ob gesunde Melanozyten nach Behandlung mit sichtbarem Licht weniger sensitiv mit der Induktion von oxidativen DNA-Modifikationen und Mikrokernen reagieren als Melanomkrebszellen des gleichen Spenders. Dies würde darauf hinweisen, dass die maligne Entartung der

Melanozyten mit einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber oxidativer DNA-Schädigung und damit verbunden mit einer erhöhten genomischen Instabilität einhergeht.

6.2 Interindividuelle Schwankungen des Hintergrundspiegels oxidativer DNA-Modifikationen in gesunden Hautfibroblasten

Neben Hautfibroblasten von Melanompatienten wurde im Rahmen dieser Arbeit auch Hautfibroblasten gesunder Spender untersucht. Zwischen den Fibroblasten gesunder Probanden und denen von Melanompatienten ergab sich kein Unterschied hinsichtlich des Hintergrundspiegels oxidativer DNA-Modifikationen (Abbildung 16). Interessanterweise waren die Hintergrundspiegel der Hautfibroblasten gesunder Spender zum Teil signifikant voneinander verschieden (Tabelle 4), sodass sich hier anbot, diesen Effekt näher zu überprüfen. Da der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen einem Gleichgewicht zwischen Bildung und Eliminierung dieser Schäden entspricht, besteht Interesse daran, endogene Faktoren ausfindig zu machen, die dieses Gleichgewicht beeinflussen und daher zur Kanzerogenese beitragen. In Zellen mit signifikant höheren Hintergrundspiegeln an oxidativen DNA-Modifikationen könnte die antioxidative Abwehr oder die Reparatur dieser DNA-Schäden beeinträchtigt sein.

Um zu testen, ob Differenzen im Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen auf eine unterschiedliche Reparaturkapazität der Zellen zurückzuführen ist, wurde die Reparatur oxidativer DNA-Schäden nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht und dem Photosensibilisator Ro 19-8022 in zwei humanen Fibroblasten (MRC-5 und BJ5te) untersucht. In den eingesetzten MRC-5-Zellen, die einen signifikant höheren ($p < 0,01$) Hintergrundspiegel an oxidativen DNA-Modifikationen besitzen als BJ5te-Zellen, war die Reparatur zwar tendenziell, aber nicht signifikant verlangsamt (Abbildung 20). Hier wäre es interessant, einen 8-oxoG-Cleavage-Assay mit beiden Zellen durchzuführen, um zu sehen, ob der erste Schritt der Reparatur von 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG) in MRC-5-Zellen beeinträchtigt ist.

Eine weitere Erklärung für die unterschiedlich hohen Hintergrundspiegel wären verschieden hohe antioxidative Kapazitäten der Zellen. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass der Verzehr von Kiwifrüchten zu einer Verbesserung der antioxidativen Abwehr und einem Rückgang der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden führt (Collins, 2003). Tatsächlich zeigte sich in Versuchen von Violeta Serra, dass BJ5te-Zellen sowohl unter normalen als auch unter Hyperoxie-Bedingungen eine dreifach höhere antioxidative Kapazität besitzen als MRC-5-Zellen

(V. Serra, Berlin; persönliche Mitteilung). Dieser protektive Effekt durch Antioxidantien müsste auch die Zahl exogen induzierter ROS eindämmen und damit die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen verringern. In dieser Arbeit war jedoch nach Bestrahlung mit Licht (Halogenlampe, 1000 W) und dem Photosensibilisator Ro 19-8022 kein signifikanter Unterschied der Höhe dieser DNA-Schäden zwischen MRC-5- und BJ5te-Zellen festzustellen (Abbildung 19). Der Grund für den höheren Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen in MRC-5-Zellen kann daher nicht endgültig benannt werden. Sowohl eine schlechtere antioxidative Abwehr als auch eine verlangsamte Reparatur oxidativer Modifikationen könnte dazu beitragen.

Beide Schutzmechanismen der Zelle, die antioxidative Abwehr und die Basenexzisionsreparatur, stehen im Verdacht, sich mit zunehmendem Alter zu verschlechtern (Ghatak, 1996; Bohr, 2002; Chen, 2003; Van der Loo, 2003) und könnten daher ein altersbedingtes Ansteigen oxidativer DNA-Modifikationen im Zellkern begünstigen. Ein altersabhängiger Anstieg dieser DNA-Schäden konnte in einer vorangegangenen Publikation unseres Arbeitskreises bereits für frisch isolierten Maushepatozyten nachgewiesen werden, allerdings nur bei reparaturdefizienten Tieren, in denen das *ogg1*-Gen, das für die Exzision von 8-oxoG verantwortlich ist, ausgeschaltet worden war, und nur in den Lebern dieser Mäuse (Osterod, 2001). Auch in anderen Publikationen wurde berichtet, dass eine Alterszunahme unter normalen physiologischen Bedingungen beim Tier nicht mit dem Anstieg oxidativer DNA-Modifikationen im Zellkern einherzugehen scheint. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass die Anzahl dieser Schäden in der mitochondrialen DNA (mtDNA) zunehmen könnte, wie es bereits am Tiermodell beobachtet werden konnte (Hudson, 1998). Ein Anstieg oxidativer Basenmodifikationen in der mtDNA kann mit den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Methoden nicht erfasst werden. Die unterschiedliche Höhe der oxidativen DNA-Modifikationen im Zellkern gesunder Hautfibroblasten korrelierte in dieser Arbeit nicht mit dem Alter der Patienten (Abbildung 17). Der Befund, dass eine Alterszunahme unter normalen physiologischen Bedingungen nicht mit dem Anstieg oxidativer DNA-Modifikationen im Zellkern einhergeht, konnte somit für primäre Hautfibroblasten von Menschen verschiedenen Alters (28-91 Jahre) bestätigt werden. Als nächstes wäre es interessant, die mitochondrialen oxidativen DNA-Schäden der untersuchten Hautfibroblasten zu bestimmen und diese mit dem Alter der Spender zu korrelieren.

6.3 Einfluss der mitochondrialen ROS-Produktion auf die Anzahl oxidativer DNA-Modifikationen im Zellkern

In dieser Arbeit konnte durch einen fluorimetrischen Assay gezeigt werden, dass ein Fehlen der mitochondrialen DNA (mtDNA) in HeLa ρ 0-Zellen mit einer stark

verringerten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies der Atmungskette einhergeht (Abbildung 27). Diese Befunde wurden durch durchflusszytometrische Versuche mit diesem und einem weiteren $\rho 0$ -Zellsystem von einer kooperierenden Arbeitsgruppe bestätigt (Abbildung 28, Abbildung 29). Der Grund für den niedrigeren Spiegel reaktiver Sauerstoffspezies in $\rho 0$ -Zellen liegt sehr wahrscheinlich in der nur noch rudimentär vorhandenen mitochondrialen Atmungskette dieser Zellen, die nicht mehr in der Lage ist, den mitochondrialen Prozess der oxidativen Phosphorylierung aufrechtzuerhalten (King, 1989). Unter normalen physiologischen Bedingungen wird in der mitochondrialen Atmungskette als Nebenprodukt Superoxid erzeugt (Guidot DM, 1993; Skulachev, 1999), welches im weiteren Verlauf zu Wasserstoffperoxid bzw. Hydroxylradikalen metabolisiert werden kann. Dieser Ablauf kann in mtDNA-depletierten $\rho 0$ -Zellen offenbar nicht mehr stattfinden. Insgesamt konnte also gezeigt werden, dass ein Großteil der endogen produzierten ROS tatsächlich von der mitochondrialen Atmungskette gebildet werden. Mitochondrien sind offenbar die wichtigste Quelle endogener reaktiver Sauerstoffspezies in der Zelle.

HeEB1-Zellen, die durch Wiederbefüllung von $\rho 0$ -Zellen mit mitochondrialer DNA (mtDNA) hergestellt worden waren (King, 1989), sollten die gleiche Anzahl reaktiver Sauerstoffspezies produzieren wie HeLa wt-Zellen. Bei Verwendung von Hydroethidin als Indikator für die Anzahl ROS wurden in HeLa wt- und HeEB1-Zellen wie erwartet die gleiche Anzahl Fluoreszenzeinheiten gemessen. In den durchflusszytometrischen Assays unserer Kooperationspartner zeigten die HeEB1-Zellen überraschenderweise nach Inkubation mit dem ROS-Indikator 5-(und-6-)chloromethyl-2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (CM-H₂DCFDA) eine niedrigere Fluoreszenz als Wildtyp-Zellen (Abbildung 29). Eine Erklärung für diese Diskrepanz liefern die Ergebnisse von *Ohashi et al.*, nach denen die Oxidation von Dichlorodihydrofluorescein (DCFH) nicht nur von der Anwesenheit reaktiver Sauerstoffspezies, sondern auch vom Häm-Gehalt der Zelle abhängig ist (Ohashi, 2002). Wie in Kapitel 5.3.1.1 gezeigt, besitzen HeEB1- verglichen mit HeLa wt-Zellen tatsächlich weniger Protoporphyrin IX, einer Vorstufe des Häm (Abbildung 41). Das Verhältnis der gemessenen Protoporphyrin IX-Mengen in HeLa wt-, HeLa $\rho 0$ - und HeEB1-Zellen spiegelt ungefähr das der gemessenen CM-H₂DCFDA-Fluoreszenzeinheiten wieder. Bei beiden Fluoreszenz-Farbstoffen, Hydroethidin und H₂-DCFDA-Derivaten, besteht noch Unklarheit darüber, ob sie spezifisch für bestimmte reaktive Sauerstoffspezies sind. Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass H₂-DCFDA-Derivate eher mit H₂O₂ reagieren (Gniadecki, 2000), während Hydroethidin möglicherweise spezifisch für Superoxidradikalanionen ist (Bindokas, 1996).

Obwohl die $\rho 0$ -Zellen kaum noch endogene reaktive Sauerstoffspezies produzieren, besitzen sie keinen niedrigeren Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen verglichen mit Wildtyp- bzw. mtDNA-wiederbefüllten HeEB1-Zellen (Abbildung 31). Es lag keine erhöhte Sensitivität der $\rho 0$ -Zellen gegenüber oxidativem Stress vor

(Abbildung 32), noch besaßen diese Zellen verglichen mit der Kontrolle eine geringere Reparaturkapazität (Abbildung 33, Abbildung 34). Die Ergebnisse zeigen daher, dass die endogene ROS-Produktion in den Mitochondrien zumindest unter physiologisch normalen Bedingungen keine oxidativen Modifikationen in der nukleären DNA bewirkt und daher nicht für den Hintergrundspiegel dieser Schäden im Zellkern verantwortlich ist. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen von *Lopez-Torres et al.* überein (Lopez-Torres, 2002), die durch dauerhafte Kalorienrestriktion bei Ratten zwar eine Abnahme der mitochondrialen H_2O_2 -Produktion um 47 % erreichten, aber auf DNA- Ebene keine Veränderung der Anzahl oxidativer DNA-Schäden beobachteten.

Um zu überprüfen, ob erhöhte Konzentrationen mitochondrialer ROS zusätzliche oxidative DNA-Schäden in der nukleären DNA induzieren können, wurde die ROS-Produktion in HeLa wt-, HeLa $\rho 0$ - und HeEB1-Zellen mit mitochondrialen Giften stimuliert (Abbildung 35, Abbildung 36). Während sich in HeLa wt- und HeEB1-Zellen die Produktion mitochondrialer ROS zum Teil sehr stark induzieren ließ, blieb in $\rho 0$ -Zellen dieser Effekt völlig aus (Abbildung 36). Diese Messungen stimmen mit dem Ergebnis von *Enomoto et al.* überein, die zeigen konnten, dass sich in $\rho 0$ -Zellen die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (gemessen durch Oxidation des Farbstoffes CM- H_2 DCFDA) durch Hypoxie wesentlich schlechter stimulieren lässt als in $\rho 0$ -Zellen, die mit mitochondrialer DNA wiederbefüllt worden waren (Enomoto, 2002). Die erfolgreiche Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in Mitochondrien von HeLa wt- und HeEB1-Zellen durch mitochondriale Gifte unterstreicht die tragende Rolle der Atmungskette für die endogene ROS-Produktion. Durch die beiden unterschiedlichen Detektionsmethoden (Fluorimetrie, siehe Abbildung 35, und Durchflusszytometrie, in Abbildung 36 gezeigt) für Hydroethidin-Oxidation durch ROS ergaben sich jedoch unterschiedliche Ergebnisse nach Inkubation mit verschiedenen mitochondrialen Giften. Während sich Oligomycin allein im fluorimetrischen Assay nicht stimulierend auf die mitochondriale ROS-Produktion auswirkte, war bei der durchflusszytometrischen Messung in HeLa wt-Zellen ein signifikanter Effekt zu erkennen. In der Literatur gibt es widersprüchliche Angaben darüber, ob Oligomycin dazu in der Lage ist, die Produktion von ROS aus der Atmungskette zu stimulieren. Die Blockierung der ATP-Synthase durch Oligomycin sollte die Reduktion von Sauerstoff zu Superoxidradikalen begünstigen (Boveris, 1973). Allerdings konnten *Gniadecki et al.* nach Gabe von Oligomycin allein keinen Anstieg der Fluoreszenz von oxidiertem Carboxy- H_2 DCFDA in Keratinozyten feststellen (Gniadecki, 2000). Beide Assays für die Detektion von ROS zeigten einen sehr schwachen ROS-induzierenden Effekt durch Antimycin A. Dieses mitochondriale Gift verhindert den Elektronentransport von Cytochrom b_{562} zu Ubichinon. Dabei liegt die Blockierungsstelle vermutlich in der Atmungskette hinter der Stelle der Superoxid-Produktion von Komplex III (Turrens, 1985; Nohl, 1986). Daher würde man Anwesenheit von Antimycin A eine Ansammlung von überschüssigen Elektronen erwarten, die Sauerstoff zum Superoxid

reduzieren. Einen Anstieg des Gehaltes an Wasserstoffperoxid, das aus Superoxid unter Katalyse von Superoxiddismutase gebildet werden kann, wurde nach Inkubation mit Antimycin A in isolierten Mitochondrien und in Zellen bereits beobachtet (zusammengefasst in (Li, 1999)). Die Gabe von Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon (CCCP) bewirkt in Zellen eine mitochondriale Entkopplung und dadurch eine Verstärkung des Elektronenflusses. Für Cyanobakterien wurde bereits eine erhöhte Bildung von H_2O_2 nach CCCP-Inkubation nachgewiesen (Elstner, 1990). Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen mit CCCP war nur nach fluorimetrischer Detektion, nicht nach Messung mit dem Durchflusszytometer, ein Anstieg der ROS erkennbar. Durch die Inkubation mit der Kombination aus CCCP und Antimycin A würde man eine stärkere Ansammlung überschüssiger Elektronen und daher eine erhöhte Superoxidbildung erwarten. Im fluorimetrischen Versuch war kein Anstieg über die ROS-Induktion durch CCCP allein zu verzeichnen. Dagegen zeigte die durchflusszytometrische Messung einen sehr starken Effekt nach Gabe dieser beiden mitochondrialen Gifte. Dies wird durch Resultate von *Li et al.* bestätigt, nach denen die Kombination von Antimycin A mit dem Entkoppler Carbonylcyanid-p-(Trifluoromethoxy)phenylhydrazon (FCCP) die H_2O_2 -Produktion isolierter Mitochondrien signifikant erhöht, auch über das Maß des durch Antimycin A bzw. FCCP allein induzierten H_2O_2 -Anstiegs hinaus (Li, 1999). Für die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Testsysteme bezüglich der Induktion von ROS nach Gabe von Oligomycin, Antimycin A, CCCP und Antimycin A/CCCP konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Erklärung gefunden werden. Da die Literaturergebnisse teilweise mit den fluorimetrischen, teilweise mit den durchflusszytometrischen Daten übereinstimmen, kann nicht grundsätzlich gesagt werden, dass eines der verwendeten Messsysteme unzuverlässig ist. In beiden Testsystemen, dem fluorimetrischen und dem durchflusszytometrischen, wurde übereinstimmend die stärkste Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Gabe einer Kombination aus CCCP und Oligomycin nachgewiesen. Nach den Daten der durchflusszytometrischen Messung stieg die Anzahl ROS innerhalb von 10 min um das sechsfache, im fluorimetrischen Assay war nach dieser Zeit ein 2,5-facher Anstieg zu sehen.

Weder die Inkubation mit Oligomycin, Antimycin A und CCCP allein noch die Kombination von Antimycin A bzw. Oligomycin mit CCCP konnte in HeLa wt-Zellen einen Anstieg nukleärer oxidativer DNA-Modifikationen bewirken (Abbildung 37). Die Stimulation der mitochondrialen ROS-Produktion nimmt also keinen oder nur einen sehr geringen Einfluss auf den Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen im Zellkern.

Insgesamt zeigte also weder die Verminderung der mitochondrialen ROS-Produktion durch Fehlen der mitochondrialen DNA (mtDNA), noch die Induktion reaktiver Sauerstoffspezies nach Eingriff in die Atmungskette einen Effekt auf den Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen im Zellkern. Diese Ergebnisse

verdeutlichen, dass die Auswirkung der mitochondrialen ROS-Produktion auf die Integrität des Genoms bisher überschätzt wurde. Gründe für die ausbleibende genotoxische Wirkung auf Ebene des Zellkerns liegen einerseits in der geringen Wahrscheinlichkeit, dass mitochondriale ROS die genomische DNA erreichen. Dazu trägt sowohl die Kurzlebigkeit der ROS und die durch Diffusion zurückzulegende Entfernung zur nukleären DNA (nDNA) bei, als auch die kompakte Struktur der genomischen DNA, die sie für schädigende Agenzien schwer zugänglich macht. Es ist daher wahrscheinlicher, dass die reaktiven Sauerstoffspezies mit anderen Molekülen, zum Beispiel jenen der antioxidativen Abwehr der Zelle, abreagieren. Der Befund, dass nach Glutathion-Depletion und gleichzeitiger ROS-Induktion keine Zunahme der oxidativen DNA-Modifikationen im Zellkern zu messen war (Abbildung 38), deutet darauf hin, dass die reaktiven Sauerstoffspezies selbst bei Fehlen dieses Antioxidans nicht bis zur nukleären DNA vordringen. Die ROS reagieren bei GSH-Depletion wohl in erster Linie mit weiteren Bestandteilen der antioxidativen Abwehr, wie der mitochondrialen Superoxiddismutase bzw. der Katalase, ab. Sollten darüber hinaus Reaktionen mit anderen Molekülen stattfinden, die zu deren Schädigung führen, wären hier hauptsächlich die mtDNA sowie mitochondriale Proteine und Lipide betroffen.

Produkte der ROS-induzierten Lipidperoxidation (beispielsweise Malondialdehyd) sind dazu in der Lage, die nukleäre DNA zu modifizieren. Dabei entstehen so genannte Ethenoaddukte der DNA, die sich in Versuchen mit Ratten als karzinogen erwiesen haben (Marnett, 2000). Eine andere Arbeitsgruppe hat bereits gezeigt, dass die Depletion von Glutathion durch Gabe von Buthioninsulfoximin in der Leber behandelte Ratten zum Anstieg von Propanoaddukten der DNA führt (Nath, 1997). Diese Literaturergebnisse zeigen, dass die endogene ROS-Produktion auf indirektem Weg, nämlich über die Oxidation von Lipiden, DNA-Modifikationen verursachen und damit zur Kanzerogenese beitragen können. Anknüpfend an diese Arbeit wäre es von Interesse, die Auswirkung einer Stimulierung der mitochondrialen ROS-Produktion durch mitochondriale Gifte auf die Induktion von Ethenoaddukten in der nukleären DNA zu überprüfen.

Weiterhin wäre es interessant, die Auswirkung reaktiver Sauerstoffspezies auf der Ebene der mtDNA zu verfolgen. Eine solche Auswirkung mitochondrialer ROS auf die oxidativen Schäden der mtDNA wurde bereits von *Lopez-Torres et al.* beobachtet. Diese Gruppe konnte zeigen, dass sich nach Eindämmung der mitochondrialen H₂O₂-Produktion um die Hälfte auch der oxidativen DNA-Schäden in mtDNA halbiert (Lopez-Torres, 2002). Für die in dieser Arbeit gezeigten Versuche bedeutet das umgekehrt, dass es nach Stimulation der mitochondrialen ROS-Produktion durch die Gabe von mitochondrialen Giften möglicherweise zu einem Anstieg oxidativer DNA-Modifikationen in der mtDNA kam, da diese den ROS direkter ausgesetzt und weniger geschützt ist als die nDNA. Oxidative Schäden der

mtDNA können mit der Methode der Alkalischen Elution allerdings nicht erfasst werden, da die mtDNA bereits während des Lyseschrittes durch die Filterporen läuft. Ein geeigneter Assay wäre von *Hegler et al.* beschriebene Relaxationsassay für mitochondriale DNA (Hegler, 1993).

Da die mitochondriale Atmungskette als Hauptproduzent endogener ROS nicht für den Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen im Zellkern verantwortlich ist, muss es weitere endogene ROS-Quellen geben, die den DNA-Schaden verursachen. Hier kommen eine Reihe von Enzymen infrage, die Sauerstoff metabolisieren und sich in Nachbarschaft zur nukleären DNA befinden. Beispiele sind Lipoxygenasen und Xanthinoxidasen, sowie Cytochrome, die in der Zellkernmembran lokalisiert sind. Besonders interessant ist auch die Betrachtung von NADPH-Oxidasen (NOX) als verantwortliche ROS-Quelle für den Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen. NOX kommen nicht nur in phagozytotischen Zellen vor, wo sie durch Produktion von Superoxid an der mikrobiellen Abwehr beteiligt sind, verschiedene Formen der NADPH-Oxidasen wurden auch in anderen Geweben und in Tumorzellen gefunden (Suh, 1999; Cheng, 2001). Hier besteht ihre Funktion offenbar in der über ROS gesteuerten Wachstumskontrolle der Zellen: Eine Überexpression des *mox1*-Gens, das für eine homologe Sequenz der katalytischen Untereinheit der NOX kodiert, führt zu onkogenen Veränderungen in nicht-phagozytotischen Zellen (Suh, 1999). Diese Befunde unterstreichen eine mögliche Bedeutung der NADPH-Oxidasen für die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen im Zellkern und für eine sich daraus ergebende „spontane“ Kanzerogenese. In dieser Arbeit erzielte Ergebnisse sprechen jedoch gegen einen Einfluss von NOX auf den Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen. Da NADPH-Oxidasen Häm als prosthetische Gruppe enthalten, ist von HeLa $\rho 0$ -Zellen, die kein Protoporphyrin IX und daher kein Häm produzieren (Abbildung 43), ein Aktivitätsverlust für die NOX zu erwarten. In einigen Publikationen wurde schon berichtet, dass bereits eine Modifikation am Häm die ROS-Produktion der NADPH-Oxidasen stark einschränken kann (Doussiere, 1999; Biberstine-Kinkade, 2001). Wenn eine NADPH-Oxidase für den Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen verantwortlich wäre, würde man daher in HeLa $\rho 0$ -Zellen eine geringere Menge oxidativer DNA-Schäden im Kern erwarten. Tatsächlich haben HeLa $\rho 0$ -Zellen jedoch wie gezeigt einen gleich hohen Spiegel dieser DNA-Modifikationen verglichen mit Wildtyp- und HeEB1-Zellen. Um zu überprüfen, ob das HeLa-Zellsystem geeignet ist, eine Aussage über die Rolle der NOX für den Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden im Zellkern zu treffen, müsste jedoch noch verifiziert werden, dass HeLa wt-, $\rho 0$ - und HeEB1-Zellen tatsächlich NADPH-Oxidasen exprimieren. Da bereits gezeigt werden konnte, dass NADPH-Oxidase 5 in Uterus-Gewebe von Erwachsenen gebildet wird (Cheng, 2001), ist es denkbar, dass HeLa wt-Zellen, die aus dem Gebärmutterhals stammen, ebenfalls dieses Enzym produzieren.

6.4 Charakterisierung endogener Photosensibilisatoren

Es ist bekannt, dass die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen ein relatives Maximum im sichtbaren Spektrum des Sonnenlichts zwischen 400-450 nm besitzt (Kielbassa, 1997). Sichtbares Licht kann nicht von die DNA direkt absorbiert werden, daher bedarf es zellulärer Chromophore, die Licht dieser Wellenlänge absorbieren, die Energie auf andere Moleküle (Sauerstoff, DNA) übertragen und so zur oxidativen Schädigung der DNA beitragen. Bisher konnten diese als Photosensibilisatoren wirkenden Chromophore nicht identifiziert werden. Infrage kommen Cryptochrome und Protoporphyrine, deren Rolle bei der Licht-induzierten Generierung von oxidativen DNA-Modifikationen im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte.

Die Abwesenheit von Cryptochrom-Proteinen (Cry1, Cry2) wirkte sich in den durchgeführten Experimenten weder auf den basalen Spiegel oxidativer DNA-Modifikationen, noch auf die Licht-induzierte Generierung dieser Schäden aus (Abbildung 44, Abbildung 45). Dies spricht dafür, dass andere endogene Chromophore hauptverantwortlich für die Schadensvermittlung sind. Es sollte sich dabei um Moleküle handeln, die in größeren Mengen als Cryptochrome in der Zelle vorkommen, aber die Eigenschaften der Fähigkeit zur Absorption im blauwelligen Bereich sowie die Nähe zum Zellkern ebenfalls besitzen. Es wäre denkbar, dass in einem unter Beteiligung von Cryptochromen verlaufenden Schädigungsmechanismus oxidative DNA-Schäden entstehen, aber nur in so geringem Maße, dass sie neben den durch andere endogene Chromophore induzierten Schäden nicht zu erfassen sind. Um festzustellen, ob Cryptochrome prinzipiell in der Lage sind, bei der Induktion von oxidativen DNA-Modifikationen durch sichtbares Licht als Photosensibilisatoren zu wirken, könnte man *cry1*- und *cry2*-überexprimierende Zellen konstruieren. Von diesen würde man erwarten, dass sie in Gegenwart von sichtbarem Licht eine höhere Induktion oxidativer DNA-Modifikationen zeigen.

Als endogene Photosensibilisatoren der Zelle kommen auch Porphyrine in Frage. In einer anderen Veröffentlichung unseres Arbeitskreises wurde bereits gezeigt, dass das Ausmaß der Licht-induzierten oxidativen DNA-Modifikationen mit dem Gehalt an Protoporphyrin IX (PPIX) korreliert (Pflaum, 1998). Für die Rolle von Porphyrinen als endogene Photosensibilisatoren spricht weiterhin, dass durch zwanzigminütige Bestrahlung von HeLa wt-Zellen mit sichtbarem Licht (Halogenlampe, 1000 W) der Gehalt an Protoporphyrin IX (PPIX) signifikant abnahm (Abbildung 43). Parallel zu diesem so genannten *Photobleaching*-Effekt des PPIX zeigte auch die Zahl induzierter oxidativer DNA-Schäden eine Sättigung (Abbildung 46). Allerdings kann aus dieser Korrelation nicht geschlossen werden, dass das *Photobleaching* des PPIX und die Sättigung der Anzahl induzierter DNA-Modifikationen kausal zusammenhängen. Zelluläre Chromophore können auch einem *Photobleaching* durch

Bestrahlung unterliegen, ohne zur DNA-Schädigung beizutragen. Ein weiterer Hinweis auf den Beitrag von PPIX als Photosensibilisator ergab sich aus den in dieser Arbeit durchgeführten Mehrfachbestrahlungen. Tatsächlich ließ sich durch viermalige Bestrahlung von Melanomzellen mit Licht (Halogenlampe, 1000 W) im Abstand von zwei Stunden jeweils die gleiche Menge an oxidativen DNA-Schäden induzieren (Abbildung 49). Eine Sättigung der induzierten Schäden wie bei der chronischen Bestrahlung konnte also umgangen werden. Für die als Photosensibilisatoren wirkenden zellulären Chromophore bedeutet dies, dass sie innerhalb der Pausen der Mehrfachbestrahlung (2 h) wieder regeneriert bzw. neu synthetisiert werden können, um erneut zur DNA-Schädigung beizutragen. Wie bereits gezeigt wurde, kann die Porphyrin-Synthese nach Gabe von 5-Aminolaevulinsäure innerhalb von 2,5 Stunden stattfinden (Pflaum, 1998). Diese Bedingung der Regenerierung bzw. Neusynthese binnen zwei Stunden könnte von den Porphyrinen also erfüllt werden.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, bewirkt die defekte Protoporphyrin IX-Synthese in HeLa $\rho 0$ -Zellen (Abbildung 41) aber offenbar keine geringere Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch sichtbares Licht (Abbildung 32). Eine Erklärung für diese Diskrepanz wäre, dass in HeLa $\rho 0$ -Zellen noch die Vorstufen des Protoporphyrin IX synthetisiert werden können, die zwar nicht durch die fluorimetrische PPIX-Messung erfasst werden, aber dennoch als Photosensibilisatoren zur Induktion oxidativer DNA-Schäden durch Licht beitragen. Um die Rolle der Porphyrine als endogene Photosensibilisatoren weiter zu erforschen, wäre es daher zunächst notwendig, den Anteil von unterschiedlichen Zwischenstufen des Häm-Synthesewegs zur Licht-induzierten Generierung oxidativer DNA-Modifikationen zu untersuchen.

Weiterhin wurde auch der Versuch unternommen, den PPIX-Gehalt in Melanomzellen zu bestimmen. Höhere zelluläre Konzentrationen dieser Chromophore könnten eine gesteigerte Suszeptibilität gegenüber der Induktion oxidativer DNA-Schäden durch Licht bewirken und so zur malignen Entartung beigetragen haben. Es stellte sich allerdings heraus, dass in Melanomzellen die Menge an Protoporphyrin IX nicht eindeutig bestimmt werden kann, da die gemessenen Werte sehr niedrig waren. Eine Erklärung hierfür liefern die Ergebnisse von *Ye et al.*, nach denen zelluläres Melanin zu einer Rotverschiebung des Absorptionsspektrums von Porphyrinen beiträgt (Ye, 2003). Der dabei beobachtete stark quenchende Effekt der Porphyrin-Emission ist durch die Komplexbildung der Porphyrine durch Melanine bedingt und kann als photoprotektive Wirkung der Melanine verstanden werden. Wahrscheinlich ist dieser Mechanismus auch dafür verantwortlich, dass die photodynamische Therapie (PDT) mit 5-Aminolaevulinsäure (5-ALA), einer Vorstufe der Porphyrinsynthese, bei Melanomen verglichen mit anderen Hauttumoren nur sehr geringen Erfolg zeigt (Ye, 2003). Ein weiterer interessanter Zusammenhang zwischen Melaninen und Porphyrinen geht aus einer Publikation von *Monfrecola et al.* hervor (Monfrecola,

2002). Hier wird berichtet, dass dermale Applikation von 5-ALA und zusätzliche einmalige Bestrahlung mit sichtbarem Licht (analog einer PDT) zu einer Aktivierung von Melanozyten und dadurch zur Hyperpigmentierung der Haut führt. Diese Aktivierung war zum einen in der Vergrößerung einzelner Melanozyten erkennbar, welche auch mit einer Größenzunahme und Verformung des Zellkerns einherging. Zum anderen wurden als Konsequenz auch Proteine exprimiert, die in der Regel von Melanomkrebszellen und dysplastischen Naevi gebildet werden (Monfrecola, 2002). Eine genaue Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Porphyrinen, Melaninen und der Induktion oxidativer DNA-Modifikationen nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht könnte daher hilfreich sein, um den Mechanismus der Entstehung des malignen Melanoms aufzuklären.

6.5 Gentoxizität von sichtbarem Licht

Bei den Expositionsexperimenten von Melanomzellen mit Licht zeigte sich, dass eine Mehrfachbestrahlung im Abstand von zwei oder zwölf Stunden zu kontinuierlicher Induktion oxidativer DNA-Modifikationen in Melanomzellen führt (Abbildung 47, Abbildung 49). Im Gegensatz dazu war bei der Dauerbestrahlung der gleichen Zellen und der Hautfibroblasten des gleichen Spenders jeweils eine Sättigung der Zahl induzierter DNA-Schäden zu beobachten (Abbildung 46). Insgesamt kam es also unter den realitätsnahen Bedingungen der Mehrfachbestrahlung zu einer höheren Induktion oxidativer DNA-Schäden als bei einer Einmalbestrahlung mit der Gesamtdosis. Die Ergebnisse stimmen mit epidemiologischen Beobachtung überein, dass zeitnahe wiederholte Expositionsschübe mit Sonnenlicht zur Melanom-Inzidenz stärker beitragen als eine chronische Lichtexposition (Heller, 2001). Da bei früheren Expositionsstudien an Zellen in der Regel kontinuierlich bestrahlt wurde, sind die daraus resultierenden gentoxischen Ereignisse bisher wahrscheinlich unterschätzt worden (Kielbassa, 1997; Pflaum, 1998).

Die Vorgehensweise bei der Mehrfachbestrahlung erlaubte es auch, zu überprüfen, ob oxidative DNA-Modifikationen mit zunehmender Bestrahlungsbehandlung besser repariert werden. Bei humanen Keratinozyten wurde eine solche Adaptation im Fall der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) nach Bestrahlung mit geringen UV-B-Dosen bereits beobachtet (Maeda, 2001). Darüber hinaus wurde in Prokaryoten schon früh eine so genannte *SOS response* beobachtet, die in stark geschädigten Zellen einerseits die NER von UV-B-induzierten Cyclobutan-Pyrimidindimeren und 6→4-Photoprodukten induziert und andererseits eine so genannte „*translesion synthesis*“ mit speziellen Polymerasen ermöglicht, die teilweise eine höhere Fehleranfälligkeit besitzen (Defais, 1989; Goodman, 2002; Yeiser, 2002). Für eine Reparaturadaptation oder eine *SOS response* bei der Basenexzisionsreparatur

(BER) oxidativer DNA-Modifikationen gibt es dagegen bisher keine Anhaltspunkte. Auch bei den Mehrfachbestrahlungen mit jeweils geringeren Dosen (450 kJ/m^2) an sichtbarem Licht im Rahmen dieser Arbeit kam es nach der zweiten oder dritten Behandlung nicht zu einer Beschleunigung der Reparatur der induzierten DNA-Modifikationen (Abbildung 51). Dieses Ergebnis unterstützt die These, dass die Basenexzisionsreparatur oxidativer DNA-Modifikationen in menschlichen Zellen keiner Adaptation unterliegt.

Da bei der Mehrfachbestrahlung während jeder Expositionsperiode die gleiche Anzahl oxidativer DNA-Modifikationen induziert wurde, scheint es ebenfalls keine Adaptation der antioxidativen Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies im Cytosol zu geben. Im Gegensatz dazu wurde ein solcher Adaptationseffekt für die mitochondriale Mangan-abhängige Superoxiddismutase (MnSOD) Dosis- und Zeit-abhängig nach Bestrahlung mit UV-A-Licht bereits gefunden (Poswig, 1999).

Parallel zur Induktion von oxidativen DNA-Modifikationen kam es bei der Mehrfachbestrahlung von Melanomzellen auch zu einem Anstieg der induzierten Mikrokerne (MK) (Abbildung 54). Selbst unter Ausschluss aller Anteile von UV-Licht durch Verwendung eines Kantenfilters (undurchlässig für $\lambda < 395 \text{ nm}$) werden bei der Mehrfachbestrahlung noch Mikrokerne erzeugt (Abbildung 56). Dies ist ein klarer Hinweis dafür, dass sichtbares Licht mit einer Wellenlänge $> 395 \text{ nm}$ zu genotoxischen Ereignissen in Säugerzellen, nämlich zur Abspaltung von Chromosomen bzw. Chromosomenbruchstücken aus dem Zellkern, führt.

Die mechanistischen Zusammenhänge zur Entstehung von Mikrokerneln sind bisher nicht verstanden. Da bei einer viermaligen Bestrahlung mit Licht mit $\lambda > 395 \text{ nm}$ keine Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD, gemessen als T4 Endonuklease V-sensitive Modifikationen) mehr entstehen (Abbildung 55), können die im sichtbaren Wellenlängenbereich induzierten Mikrokerne nicht auf diese DNA-Modifikationen zurückzuführen sein. Als DNA-Schäden, die durch Mehrfachbestrahlung mit 395 nm-Kantenfilter zu Mikrokerneln führen können, kommen noch die Einzelstrangbrüche und die oxidativen (gemessen als Fpg-sensitive) Modifikationen infrage (zusammengefasst in Tabelle 7).

Tabelle 7: Einfluss eines Kantenfilters („Cutoff“-Filter, Ausschluss von Licht < 395 nm) auf die Licht-induzierte Bildung von verschiedenen DNA-Modifikationen einerseits und die Mikrokernrate andererseits in M8,99 Melanomzellen. Die Daten sind aus Abbildung 55 bzw. Abbildung 56 entnommen. Es sind induzierte Werte angegeben, d.h. die Untergrundspiegel von DNA-Schäden bzw. Mikrokernen wurden subtrahiert.

Induzierte Schäden	Halogenlampe	Halogenlampe mit Cutoff-Filter ($\rightarrow \lambda > 395$ nm)
Einzelstrangbrüche / 10^6 bp	$0,033 \pm 0,024$	$0,026 \pm 0,028$
Fpg-sensitive Modifikationen / 10^6 bp	$0,406 \pm 0,013$	$0,360 \pm 0,061$
T4 Endonuklease V-sensitive Modifikationen / 10^6 bp	$0,647 \pm 0,10$	$0,001 \pm 0,02$
Mikrokerne / 2000 Kerne	$47,7 \pm 16,8$	$21,1 \pm 7,6$

Um zu quantifizieren, wie viele der durch sichtbares Licht > 395 nm induzierten Mikrokerne auf Einzelstrangbrüche und wie viele auf oxidative DNA-Modifikationen zurückzuführen sind, wurde in einer weiteren Versuchsreihe mit dem Einzelstrangbruch-Induktor tert.-Butylhydroperoxid (tBuOOH) die Korrelation zwischen Einzelstrangbrüchen und Mikrokernen näher untersucht. Nach der Regression (Abbildung 58) induziert ein Einzelstrangbruch/ 10^6 bp ca. 72 Mikrokerne/2000 Kerne. Auf Tabelle 7 übertragen bedeutet dies, dass die oberhalb von $\lambda = 395$ nm induzierten $\sim 0,026$ Einzelstrangbrüche/ 10^6 bp für etwa zwei Mikrokerne/2000 Kerne verantwortlich sind. Daher könnten die im sichtbaren Bereich (> 395 nm) erzeugten 0,36 Fpg-sensitive (oxidativen) DNA-Modifikationen/ 10^6 bp an der Entstehung der übrigen 19 Mikrokerne/2000 Kerne ursächlich beteiligt sein. Durch Verwendung des Kantenfilters bei der Mehrfachbestrahlung wird die Zahl induzierter Mikrokerne ungefähr halbiert. Dieser Rückgang der Mikrokerne um 27 MK/2000 Kerne ist fast ausschließlich auf Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD, durch T4 Endonuklease V detektiert) zurückzuführen. Abzüglich der durch Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Modifikationen induzierten Mikrokerne ergibt sich hier ein Wert von 24 Mikrokernen/2000 Kerne, bedingt durch 0,646 Cyclobutan-Pyrimidindimere. Danach wären CPD und oxidative DNA-Modifikationen vergleichbar effizient als Ursache von Mikrokernen. Diese Rechnung berücksichtigt jedoch nicht die schnelle Reparatur der Einzelstrangbrüche während der 100 min Bestrahlungspause. Die Halbwertszeit der induzierten Einzelstrangbrüche liegt im Bereich von Minuten (Flohr, 2003). Dagegen werden während der Pausen der Mehrfachbestrahlung durchschnittlich nur 11 % der oxidativen DNA-Modifikationen repariert (Abbildung 51). Für die Reparatur der CPD dürfte dieser Wert noch niedriger sein, da deren Halbwertszeit etwa 16 Stunden beträgt (Flohr, 2003). Insgesamt wurde durch die ursprüngliche

Rechnung der Einfluss der Einzelstrangbrüche auf die Mikrokerninduktion also eher unterschätzt. Selbst wenn man jedoch davon ausgeht, dass nach jeder außer der letzten Bestrahlung alle Einzelstrangbrüche repariert wurden, also in Wirklichkeit $4 \times 0,026$ Einzelstrangbrüche/ 10^6 bp induziert wurden, wäre nur ein Drittel der oberhalb von 395 nm induzierten Mikrokerne auf Einzelstrangbrüche, der Rest (13,6 Mikrokerne/2000 Kerne) auf oxidative DNA-Modifikationen zurückzuführen.

Um die Gentoxizität (gemessen als Mikrokerninduktion) der einzelnen DNA-Modifikationen miteinander vergleichen zu können, wurde umgerechnet, wie viele Einzelstrangbrüche, Cyclobutan-Pyrimidindimere oder oxidative Läsionen nötig sind, um einen Mikrokern/2000 Kerne zu erzeugen (Tabelle 8). Die Werte wurden unter der Annahme korrigiert, dass die Einzelstrangbruchreparatur innerhalb von 2 Stunden vollständig verläuft.

Tabelle 8: Klastogenes bzw. aneugenes Potential unterschiedlicher DNA-Modifikationen.

Ein Mikrokern/2000 Kerne ist zurückzuführen auf...
...0,014 Einzelstrangbrüche/ 10^6 bp oder
...0,026 oxidative DNA-Modifikationen/ 10^6 bp oder
...0,042 Cyclobutan-Pyrimidindimere/ 10^6 bp

Durch diese Umrechnung wird deutlich, dass oxidative DNA-Modifikationen, insbesondere Einzelstrangbrüche, wesentlich öfter klastogene bzw. aneugene Konsequenzen nach sich ziehen als Cyclobutan-Pyrimidindimere. Die Ergebnisse zeigen weiterhin, dass eine Mikrokernbildung am häufigsten auf die Induktion von Einzelstrangbrüchen folgt. Dies erscheint plausibel, da zur Entstehung der Mikrokerne in jedem Fall der Bruch gegenüberliegender DNA-Stränge erforderlich ist. Diese Voraussetzung ist bei Einzelstrangbrüchen zumindest für einen Strang bereits gegeben. Basenmodifikationen wie 8-oxoG oder Cyclobutan-Pyrimidindimere müssen dagegen zunächst über die Entfernung der veränderten Base zur AP-Läsion und danach durch Bruch des Zucker-Phosphats-Rückgrats zum Einzelstrangbruch prozessiert werden. Dies kann auch im Rahmen der Reparatur passieren, dabei spricht man von so genannten „Reparaturbrüchen“. Die These, dass Mikrokerne aus Reparaturbrüchen gebildet werden, wird von *Keulers et al.* vertreten, die zeigen konnten, dass Gabe von Nukleotiden den UV-B-induzierten klastogenen Effekt von Cyclobutan-Pyrimidindimeren reduziert (Keulers, 2000).

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die durch sichtbares Licht induzierten Mikrokerne mechanistisch wahrscheinlich auf Einzelstrangbrüche und oxidative DNA-Modifikationen, nicht jedoch auf Cyclobutan-Pyrimidindimere, zurückgeführt werden können.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aas, P.A., Otterlei, M., Falnes, P.O., Vagbo, C.B., Skorpen, F., Akbari, M., Sundheim, O., Bjoras, M., Slupphaug, G., Seeberg, E., Krokan, H.E.: Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature* 421 (2003) 859-863.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., and Drouin, J., Eperon, I.C., et al.: Sequence and organisation of the human mitochondrial genome. *Nature* 290 (1981) 457-465.
- Athar M., M.H., Elmets C.A., Zaim M.T., Lloyd J.R., Bickers D.R.: In situ evidence for the involvement of superoxide anions in cutaneous porphyrin photosensitization. *Biochem Biophys Res Commun* 151 (1988) 1054-1059.
- Audebert, M., Charbonnier, J. Baptiste, Boiteux, Serge, Radicella, Pablo: Mitochondrial targeting of human 8-oxoguanine DNA glycosylase is impaired by a somatic mutation found in kidney cancer. *DNA Repair* 1 (2002) 497-505.
- Auffret van der Kemp, P., Thomas, D., Barbey, R., DeOliveira, R., Boiteux, S.: Cloning and expression in *E. coli* of the Ogg1 gene of *S. cerevisiae* which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 5197-5202.
- Bandy, B., Davison, A.J.: Mitochondrial mutations may increase oxidative stress implications for carcinogenesis and aging. *Free Radic Biol Med* 8 (1990) 523-539.
- Becker, N., Wahrendorf, J.: *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland*, 3. ed. Springer Verlag, Berlin u.a., 2000.
- Beckmann, I.-A.: *Hautkrebs - ein Ratgeber für Betroffene, Angehörige und Interessierte*. Deutsche Krebshilfe e.V., Bonn, 2003.
- Berneburg, M., Grether-Beck, Susanne, Kürten, Viola, Ruzicka, Thomas, Briviba, Karlis, Sies, Helmut, Krutmann, Jean: Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 15345-15349.
- Bernstein, C., Bernstein, Harris, Payne, Claire M., Garewal, Harinder: DNA repair/pro-apoptotic dual-role preteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat. Res.* 511 (2002) 145-178.
- Bhaskar S., e.a.: Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutation Research* 509 (2002) 127-151.
- Biberstine-Kinkade, K.J., DeLeo, F.R., Epstein, R.I., LeRoy, B.A., Nauseef, W.M., Dinauer, M.C.: Heme-ligating histidines in flavocytochrome b(558):

- identification of specific histidines in gp91(phox). *J Biol Chem.* 276 (2001) 31105-31112.
- Bindokas, V.P., Jordan, J., Lee, C.C., Miller, R.J.: Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J. Neurosci.* 16 (1996) 1324-1336.
- Bohr, V.A.: Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radical Biology & Medicine* 32 (2002) 804-812.
- Bohr, V.A.a.D., Grigory L.: Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie* 81 (1999) 155-160.
- Boiteux, S., and Radicella, J.P.: The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 377 (2000) 1-8.
- Boiteux, S., O'Connor, T.R., Lederer, F., Gouyette, A., Laval, J.: Homogenous *Escherichia coli* Fpg protein. *J. Biol. Chem.* 265 (1990) 3916-3922.
- Boveris, A., Chance, B.: The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 134 (1973) 707-716.
- Brash, D.E., Rudolph, J.A., Simon, J.A., Lin, A., McKenna, G.J., Baden, H.P., Halperin, A.J., Ponten, J.: A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88 (1991) 10124-12128.
- Bruner, S.D., Norman, D.P.G., and Verdine, G.L.: Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature* 403 (2000) 859-866.
- Carr, A., Frei, B.: Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *Faseb J.* 13 (1999) 1007-1024.
- Chen, S.K., Hsieh, W.A., Tsai, M.H., Chen, C.C., Hong, A.I., Wei, Y.H., Chang, W.P.: Age-associated decrease of oxidative repair enzymes, human 8-oxoguanine DNA glycosylase (hOgg1), in human aging. *J. Radiat. Res.* 44 (2003) 31-35.
- Cheng, G., Cao, Z., Xu, X., van Meir, E.G., Lambeth, J.D.: Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5. *Gene* 269 (2001) 131-140.
- Chevillard, S., Radicella, J.P., Levalois, C., Lebeau, J., Poupon, M.-F., Oudard, S., Dutrillaux, B., and Boiteux, Serge: Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumors. *Oncogene* 16 (1998) 3083-3086.
- Collins, A.R.: Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* 21 (1999) 238-246.

- Collins, A.R., Cadet, J., Epe, B., Gedik, C.: Problems in the measurement of 8-oxoguanine in human DNA: Report of a workshop, DNA oxidation, held in Aberdeen, UK, 19-21 January, 1997. *Carcinogenesis* 18 (1997) 1833-1836.
- Collins, A.R., Duthie, S.J. and Dobson, V.L.: Direct enzymatic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14 (1993) 1733-1735.
- Collins, A.R., Harrington, Vikki, Drew, Janice, Melvin, Rachel: Nutritional modulation of DNA repair in a human intervention study. *Carcinogenesis* 24 (2003) 511-515.
- Cooper, G.M.: *The cell: a molecular approach*, second ed. ASM Press, Washington D.C., 2000.
- Croteau, D.L.e.a.: Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutation Research* 434 (1999) 137-148.
- Defais, M., Lesca, C., Monsarrat, B., Hanawalt, P.: Translesion synthesis is the main component of SOS repair in bacteriophage lambda DNA. *J Bacteriol.* 171 (1989) 4938-4944.
- Demple, B., DeMott, Michael S.: Dynamics and diversions in base excision repair of oxidized abasic lesions. *Oncogene* 21 (2002) 8926-8934.
- Diplock, A.D.: Involvement of free radicals in carcinogenesis and modulation by antioxidants. In: Eisenbrand, G. (Ed.), *Deutsche Forschungsgemeinschaft: Carcinogenic and anticarcinogenic factors in food*. Wiley VCH Verlag, 2000, pp. 256-267.
- Dizdaroglu, M.: Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat. Res.* 275 (1992) 331-342.
- Doussiere, J., Gaillard, Jacques, and Vignais, Pierre V.: The heme component of the neutrophil NADPH oxidase complex is a target for arylodonium compounds. *Biochemistry* 38 (1999) 3694-3703.
- Dzeja, P.P.e.a.: Energetic communication between mitochondria and nucleus directed by catalyzed phosphotransfer. *PNAS* 99 (2002) 10156-10161.
- Elstner, E.F.: *Der Sauerstoff: Biochemie, Biologie, Medizin*. B.I. Wissenschaftsverlag, Mannheim/Wien /Zürich, 1990.
- Elwood, J.M., Koh, H.K.: Etiology, epidemiology, risk factors, and public health issues of melanoma. *Curr Opin Oncol.* 6 (1994) 179-187.
- Emri, G., et al.: Low doses of UVB or UVA induce chromosomal aberrations in culture human skin. *J Invest Dermatol* 115 (2000) 435-440.
- Enomoto, N., Koshikawa, Nobuko, Gassmann, Max, Hayashi, Jun-Ichi, Takenaga, Keizo: Hypoxic induction of hypoxia-inducible factor-1alpha and oxygen-

- regulated gene expression in mitochondrial-depleted HeLa cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 297 (2002) 346-352.
- Epe, B.: DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 127 (1995) 223-249.
- Epe, B.: DNA damage induced by photosensitizers and other photoreactive compounds. In: B., A.O.I.a.H. (Ed.), *DNA and free radicals: techniques, mechanisms and applications*. OICA International, 1998, pp. 63-96.
- Epe, B., Pflaum, Michael, Boiteux, Serge: DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems. *Mutation Research* 299 (1993) 135-145.
- Flohr, C.: Untersuchungen zur Beeinflussung der Reparatur oxidativer DNA-Schäden durch Poly(ADP-Ribose)-Polymerase, AP-Endonuklease 1 und das Xeroderma pigmentosum A Protein, Institut für Pharmazie. Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, 2003.
- Gattermann, N.: From sideroblastic anemia to the role of mitochondrial DNA mutations in myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research* 24 (1999) 141-151.
- Ghatak, S., Ho, S.M.: Age-related changes in the activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation status in ventral and dorsolateral prostate lobes of noble rats. *Biochem Biophys Res Commun* 222 (1996) 362-367.
- Giglia-Mari, G., Sarasin, Alain: TP53 mutations in human skin cancer. *Human Mutation* 21 (2003) 217-228.
- Gniadecki, R., Thorn, T., Vicanova, J., Petersen, A., Wulf, H.C.: Role of mitochondria in ultraviolet-induced oxidative stress. *J Cell Biochem* 80 (2000) 216-222.
- Goodman, M.F.: Error-prone repair DNA polymerases in prokaryotes and eukaryotes. *Annu. Rev. Biochem.* 71 (2002) 17-50.
- Graziewicz, M.A., Day, Brian J., Copeland, William C.: The mitochondrial DNA polymerase as a target of oxidative damage. *Nucleic Acids Research* 30 (2002) 2817-2824.
- Griffith, O.W.: Glutathione and glutathione disulphide. In: Bernt, E., Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of enzymatic analysis*. VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1985, pp. 522-529.
- Griffith, O.W., Meister, A.: Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem.* 254 (1979) 7558-7560.
- Gros, L., Saparbaev, Murat K., Laval, Jacques: Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. *Oncogene* 21 (2002) 8905-8925.

- Guidarelli, A., Clementi, E., Brambilla, L., Cantoni, O.: Mechanism of the antimycin A-mediated enhancement of t-butylhydroperoxide-induced single-strand breakage in DNA. *Biochem J.* 328 (1997) 801-806.
- Guidot DM, M.J., Wright RM, Repine JE: Absence of electron transport (Rho 0 state) restores growth of a manganese-superoxide dismutase-deficient *Saccharomyces cerevisiae* in hyperoxia. Evidence for electron transport as a major source of superoxide generation in vivo. *J Biol Chem.* 268 (1993) 26699-26703.
- Halliwell, B.: Vitamin C and genomic stability. *Mutat. Res.* 475 (2001) 29-35.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.: Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine, some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* 246 (1986) 501-514.
- Hamilton, M.L., Zhong Mao, Guo, Fuller, Clinton D., Van Remmen, Holly, Ward, Walter F., Austad, Steven N., Troyer, Dean A., Thompson, Ian, Richardson, Arlan: A reliable assessment of 8-oxo-2-deoxyguanosine levels in nuclear and mitochondrial DNA using the sodium iodide method to isolate DNA. *Nucleic Acids Research* 29 (2001) 2117-2126.
- Hanania, J., Malik, Z.: The effect of EDTA and serum on endogenous porphyrin accumulation and photodynamic sensitization of human K592 leukemic cells. *Cancer Letters* 65 (1992) 127-131.
- Hegler, J., Bittner, D., Boiteux, S., Epe, B.: Quantification of oxidative DNA modifications in mitochondria. *Carcinogenesis* 14 (1993) 2309-2312.
- Helbock, H.J., Beckman, K.B., Shigenaga, M.K., Walter, P.B., Woodall, A.A., Yeo, H.C. and Ames, B.: DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 288-293.
- Heller, H.: Schutz des Menschen vor den Gefahren der UV-Strahlung in Solarien: Empfehlung der Strahlenschutzkommission einschließlich wissenschaftlicher Begründung. In: *Strahlenschutzkommission, I.d. (Ed.)*, 2001.
- Hildebrandt, H.: *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch*. Walter de Gruyter & Co., Berlin, 1998.
- Hudson, E.K., et al.: Age-associated change in mitochondrial DNA damage. *Free Radical Research* 29 (1998) 573-579.
- IARC: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Solar and ultraviolet radiation. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 55 (1992) 1-316.
- Jackson, A.L. et al.: The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer. *Mutation Research* 477 (2001) 7-21.
- Joenje, H.: Genetic toxicology of oxygen. *Mutat. Res.* 219 (1989) 193-208.

- Kasai, H.: Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat. Res.* 387 (1997) 147-163.
- Kennedy, J.C., Pottier, R.H.: Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 14 (1992) 275-292.
- Keulers, R.A.C., van Teylingen, Corrie M.M., Tates, Ad D.: Effects of deoxyribonucleosides and cell-stimulation on frequencies of ultraviolet-B-induced micronuclei in human peripheral blood lymphocytes. *Mutat. Res.* 459 (2000) 115-122.
- Kielbassa, C., et al.: Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis* 18 (1997) 811-816.
- King, M.P., Attardi, G.: Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 246 (1989) 500-503.
- King, M.P., Attardi, G.: Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA, *Methods in Enzymology*, 1996, pp. 304-313.
- Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T. and Barnes, D.E.: Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (1999) 13300-13305.
- Koh, H.K.: Cutaneous melanoma. *N Engl J Med.* 325 (1991) 171-182.
- Kohn, K.W., Erickson, L.C., Ewig, R.A.G., Friedman, C.A.: Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry* 15 (1976) 4629-4637.
- Krokan, H.E., Nilsen, Hilde, Skorpen, Frank, Otterlei, Marit, Slupphaug, Geir: Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Letters* 476 (2000) 73-77.
- Lange, H., Kispal, Gyula, Lill, Roland: Mechanism of Iron Transport to the Site of Heme Synthesis inside Yeast Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 18989-18996.
- Latour, I., Demoulin, J.B., Buc-Calderon, P.: Oxidative DNA damage by t-butyl hydrogenperoxide causes DNA single strand breaks which is not linked to cell lysis. A mechanistic study in freshly isolated rat hepatocytes. *FEBS Letters* 373 (1995) 443-447.
- Lee, H.-C., Yau-Huei, Wei: Mitochondrial alterations, cellular response to oxidative stress and defective proteins in aging. *Biogerontology* 2 (2001) 231-244.
- Leiter, L.M., Thatte, Hemant S., Okafor, Chukwuka, Marks, Peter W., Golan, David E., Bridges, Kenneth R.: Chloramphenicol-Induced Mitochondrial Dysfunction Is Associated With Decreased Transferrin Receptor Expression and Ferritin Synthesis in K562 Cells and Is Unrelated to IRE-IRP Interactions. *Journal of Cellular Physiology* 180 (1999) 334-344.

- Li, Y., Zhu, Hong, Trush, Michael A.: Detection of mitochondria-derived reactive oxygen species production by the chemilumigenic probes lucigenin and luminol. *Biochemica et Biophysica Acta* 1428 (1999) 1-12.
- Liu, Y., Fiskum, G., Schubert, D.: Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.* 80 (2002) 780-787.
- Loeb, L.A.: a mutator phenotype in cancer. *Cancer Research* 61 (2001) 3230-3239.
- Lopez-Torres, M., Gredilla, R., Sanz, A., Barja, G.: Influence of aging and long-term caloric restriction on oxygen radical generation and oxidative DNA-damage in rat liver mitochondria. *Free Radic Biol Med* 32 (2002) 882-889.
- Maeda, T., Chua, P.P., Chong, M.T., Sim, A.B., Nikaido, O., Tron, V.A.: Nucleotide excision repair genes are upregulated by low-dose artificial ultraviolet B: evidence of a photoprotective SOS response? *J Invest Dermatol.* 117 (2001) 1490-1497.
- Malik, Z., Ehrenberg, B., Faraggi, A.: Inactivation of erythrocytic, lymphocytic and myelocytic leukemic cells by photoexcitation of endogenous porphyrins. *J. Photochem. Photobiol. B: Photobiology* 4 (1989) 195-205.
- Mandavilli, B.S., Santos, Janine H., Van Houten, Bennett: Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat. Res. - Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis* 509 (2002) 127-151.
- Marnett, L.J.: Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21 (2000) 361-370.
- Mathews-Roth, M., Rosner, Bernard: Long-term treatment of erythropoietic porphyria with cysteine. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 18 (2002) 307-309.
- Meyskens, F.L.J., Farmer, Patrick, Fruehauf, John P.: Redox regulation in human melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res* 14 (2001a) 148-154.
- Meyskens, F.L.J., McNulty, Susan E., Buckmeier, Julie A., Tohidian, Nilou B., Spillane, Thomas J., Kahlon, Ravi S., Gonzalez, Rachel I.: Aberrant redox regulation in human metastatic melanoma cells compared to normal melanocytes. *Free Radic Biol Med* 31 (2001b) 799-808.
- Michaels, M.L., Cruz, C., Grollman, A.P., Miller, J.H.: Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidative damaged form of guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 7022-7025.
- Monfrecola, G., Procaccini, Enrico Maria, D'Onofrio, Donatella, Roberti, Giuseppe, Liuzzi, Raffaele, Staibano, Stefania, Manco, Alfredo, De Rosa, Gaetano, Santoianni, Pietro: Hyperpigmentation induced by topical 5-aminolaevulinic acid plus visible light. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 68 (2002) 147-155.
- Nakabeppu, Y., Yamashita, K., Sekiguchi, M.: Purification and characterization of normal and mutant forms of T4 endonuclease V. *J Biol Chem.* 257 (1982) 2556-2562.

- Nath, R.G., Ocando, J.E., Richie, J.P.Jr., Chung, F.L.: Effect of glutathione depletion on exocyclic adduct levels in the liver DNA of F344 rats. *Chem. Res. Toxicol.* 10 (1997) 1250-1253.
- Nilsen, H., Krokan, Hans E.: Base excision repair in a network of defence and tolerance. *Carcinogenesis* 22 (2001) 987-998.
- Nohl, H., Jordan, W.: The mitochondrial site of superoxide formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138 (1986) 533-539.
- Ohashi, T., Mizutani, A., Murakami, A., Kojo, S., Taketani, S.: Rapid oxidation of dichlorodihydrofluorescein with heme and heme proteins: formation of the fluorescein is independent of the generation of reactive oxygen species. *FEBS Letters* 511 (2002) 21-27.
- Orth, M., Schapira, A.H.: Mitochondria and degenerative disorders. *Am J Med Genet.* 106 (2001) 27-36.
- Osterod, M., Hollenbach, S., Hengstler, J.G., Barnes, D.E., Lindahl, T., Epe, B.: Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1) deficient mice. *Carcinogenesis* 22 (2001) 1459-1463.
- Osterod, M., Larson, E., Le Page, F., Hengstler, J.G., Van Der Horst, G.T., Boiteux, S., Klungland, A., Epe, B.: 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 (2002) 8232-8239.
- Pathak, M.A.: Ultraviolet radiation and the development of non-melanoma and melanoma skin cancer: clinical and experimental evidence. *Skin Pharmacol* 4 (1991) 85-94.
- Perl, S., Weimer, V., Gassen, H.G.: Das Gehirn - zwischen Perfektion und Katastrophe, *Biol. Unserer Zeit*, 2003, pp. 36-44.
- Pflaum, M.: Oxidative DNA-Modifikationen durch langwelliges UV-Licht und sichtbares Licht, Institut für Pharmazie. Universität Würzburg, Würzburg, 1996.
- Pflaum, M., Kielbassa, Christopher, Garmyn, Marjan, Epe, Bernd: Oxidative DNA damage induced by visible light in mammalian cells: extent, inhibition by antioxidants and genotoxic effects. *Mutation Research* 408 (1998) 137-146.
- Pflaum, M., Will, O., Epe, B.: Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis* 18 (1997) 2225-2231.
- Phoa, N.: Einfluss von Stickstoffmonoxid, Hydroxylradikalen und Peroxynitrit auf DNA-Schäden, DNA-Reparatur und Mutationen, Institut für Pharmazie. Johannes-Gutenberg-Universität, Mainz, 2002.
- Ponka, P.M.D.: Cell Biology of Heme. *The American Journal of the Medical Sciences* 318 (1999) 241 ff.

- Poswig, A., et al.: Adaptive antioxidant response of manganese-superoxide dismutase following repetitive UVA irradiation. *J Invest Dermatol* 112 (1999) 13-18.
- Radicella, J.P., Dhérin, C., Desmaze, C., Fox, M.S., Boiteux, S.: Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 8010-8015.
- Richter, C., Park, J.W., Ames, B.N.: Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 6465-6467.
- Romagna, F.: Mikrokerntestsyste. In: Fahrig, R. (Ed.), *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*. Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, 1993, pp. 290-298.
- Rötig, A., Colonna, M., Bennefont, J.P., Blanche, S., Fischer, A., Sudubray, J.M., Munnich, A.: Mitochondrial DNA deletion in Pearson's marrow/pancreas syndrome. *Lancet* 1 (1989) 902-903.
- Rötig, A., Cormier, V., Koll, F., Mize, C.E., Saudubray, J.M., Veerman, A., Pearson, H.A., Munnich, A.: Site-specific deletions of the mitochondrial genome in the Pearson marrow-pancreas syndrome. *Genomics* 10 (1991) 502-504.
- Sancar, A.: Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev* 103 (2003) 2203-2237.
- Sander, C.S., Hamm, F., Elsner, P., Thiele, J.J.: Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. *British Journal of Dermatology* 148 (2003) 913-922.
- Setlow, R.B., Grist, E., Thompson, K., Woodhead, A.D.: Wavelength effective in induction of malignant melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 6666-6670.
- Shevchuk, I., Chekulayev, V., Moan, J., Berg, K.: Effects of the inhibitors of energy metabolism, lonidamine and levamisole, on 5-aminolevulinic-acid-induced photochemotherapy. *Int J Cancer* 67 (1996) 791-799.
- Sies, H.: Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Ed Engl* 25 (1986) 1058-1071.
- Sies, H.: Zur Biochemie der Thiolgruppe: Bedeutung des Glutathions. *Naturwissenschaften* 76 (1989) 57-64.
- Skulachev, V.: Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Mol. Aspects Med.* 20 (1999) 139-184.
- Souza-Pinto, N.C., Eide, L., Hogue, B.A., Thybo, T., Stevnsner, T., Seeberg, E., Klungland, A., Bohr, V.A.: Repair of 8-oxodeoxyguanosine lesions in mitochondrial DNA depends on the oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) gene and 8-oxoguanine accumulates in the mitochondrial DNA of OGG1-defective mice. *Cancer Research* 61 (2001a) 5378-5381.

- Souza-Pinto, N.C., Hogue, B.A., Bohr, V.A.: DNA repair and aging in mouse liver: 8-oxoG glycosylase activity increase in mitochondrial but not in nuclear extracts. *Free Radical Biology & Medicine* 30 (2001b) 916-923.
- Stucki, M., Pascucci, B., Parlanti, E., Fortini, P., Wilson, S.H., Hubscher, U., Dogliotti, E.: *Oncogene* 17 (1998) 835-843.
- Sugimura, H., Kohno, T., Wakai, K., Nagura, K., Genka, K., Igarashi, H., Morris, B.J., Baba, S., Ohno, Y., Gao, C., Li, Z., Wang, J., Takezaki, T., Tajima, K., Varga, T., Sawaguchi, T., Lum, J.K., Martinson, J.J., Tsugane, S., Iwamasa, T., Shinmura, K., Yokota, J.: hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 8 (1999) 669-74.
- Suh, Y.A., Arnold, R.S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X., Sorescu, D., Chung, A.B., Griending, K.K., Lambeth, J.D.: Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature* 401 (1999) 79-82.
- Takao, M., Aburantani, H., Kobayashi, K., Yasui, A.: Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Research* 26 (1998) 2917-2922.
- Thomas, D., Scott, A.D., Barbey, R., Padula, M., and Boiteux, S.: Inactivation of OGG1 increases the incidence of GC->TA transversions in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for endogenous oxidative damage to DNA in eukaryotic cells. *Mol. Gen. Genet.* 254 (1997) 171-178.
- Thorslund, T., Sunesen, Morten, Bohr, Vilhelm A., Stevnsner. Tinna: Repair of 8-oxoG is slower in endogenous nuclear genes than in mitochondrial DNA and is without strand bias. *DNA Repair* 1 (2002) 261-273.
- Turrens, J.F., Alexandre, A., Lehninger, A.: Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 237 (1985) 408-414.
- Van der Horst, G.T.J., Muijtens, Manja, Kobayashi, Kumiko, Takano, Riya, Kanno, Shin-ichiro, Takao, Masashi, de Wit, Jan, Verkerk, Anton, Eker, Andre P.M., van Leenen, Dik, Buijs, Ruud, Bootsma, Dirk, Hoeijmakers, Jan H.J., Yasui, Akira: Mammalian Cry1 and Cry2 are essential for maintenance of circadian rhythms. *Nature* 398 (1999) 627-630.
- Van der Loo, B., Bachschmid, M., Spitzer, V., Brey, L., Ullrich, V., Luscher, T.F.: Decreased plasma and tissue levels of vitamin c in rat model of aging: implications for antioxidative defense. *Biochem Biophys Res Commun* 303 (2003) 483-487.
- Vetsch, W., Pugin, P., Miescher, P.A.: Sideroblastic anemia: clinical and hematological study on 57 patients. *Schweiz Med Wochenschr.* 109 (1979) 1398.
- Vidal, A.E., Hickson, Ian D., Boiteux, Serge, Radicella, J. Pablo: 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 Research* 29 (2001) 1285-1292.

- Votyakova, T.V., Reynolds, I.J.: Delta PsiM-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *Neurochem.* 79 (2001) 266-277.
- Wood, R.D., Mitchell, Michael, Sgouros, John, Lindahl, Thomas: Human DNA repair genes. *Science* 291 (2001) 1284-1289.
- Ye, T., Simon, John D., Sarna, Tadeusz: Ultrafast energy transfer from bound tetra(4-N,N,N,N-trimethylanilinium)porphyrin to synthetic dopa and cysteinyl-dopa melanins. *Photochem Photobiol.* 77 (2003) 1-4.
- Yeiser, B., Pepper, E.D., Goodman, M.F., Finkel, S.E.: SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 (2002) 8737-8741.
- Ziegler, A., et al.: Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *PNAS* 90 (1993) 4216-4220.

