

**Einfluß endogener und exogener Faktoren
auf Bildung und Reparatur
oxidativer DNA-Schäden**

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

"DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN"

am Fachbereich Chemie und Pharmazie

der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von

Hanns-Christian Mahler

geb. in Wiesbaden

Mainz 1999

Jahr der mündlichen Prüfung: 2000

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom November 1996 bis August 1999 am Institut für Pharmazie des Fachbereichs Chemie und Pharmazie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz unter der Leitung von Prof. Dr. B. Epe angefertigt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernd Epe für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des interessanten Themas, die außerordentliche, mehr als nur wissenschaftliche Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit, seine Anregungen, die stete Diskussionsbereitschaft, Fürsorglichkeit und Hilfe.

Herrn Prof. Dr. W. Adam und Herrn Dr. C. Saha-Möller danke ich für die freundliche Bereitstellung von BCBT. Herrn Prof. B. Kaina (Institut für Toxikologie, Universität Mainz) und Frau Prof. M. Garmyn (University Hospital Leuven, Belgien) danke ich für die großzügige Überlassung von Säugerzellen.

Ich danke Frau Dr. Inge Eckert, Frau Lydia Neu, Herrn Dr. Michael Pflaum und Frau Ina Schulz für die freundlich gewährte, unerläßliche wissenschaftliche und nicht-wissenschaftliche Hilfe.

Den Herren der Werkstatt, der Materialverwaltung und des Photolabors des Instituts für Pharmazie, insbesondere Herrn Schott und Herrn Zeller möchte ich für die prompte Hilfe bei mehr als nur technischen Dingen danken.

Für die unermüdliche Beschaffung von Literatur danke ich Herrn Dipl. Chem. Thomas Colnot. Für die Durchsicht des Manuskriptes danke ich Frau Apothekerin Nicole Phoa und Herrn Heinz Mahler.

Großen Dank schulde ich dem gesamten AK Epe, namentlich Bernd Epe, Daniel Ballmaier, Inge Eckert, Stephan Hollenbach, Marie Isabel Homburg, Christopher Kielbassa, Lydia Neu, Marcel Osterod, Karin Pauly, Michael Pflaum, Nicole Phoa, Dorothea Scherer, Ina Schulz und Olaf Will.

Ich danke meinen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	4
2.1	Reaktive Sauerstoffspezies	5
2.1.1	Endogene Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies.....	6
2.1.2	Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies unter dem Einfluß von Fremdstoffen	9
2.1.2.1	Photosensibilisatoren	9
2.1.2.2	Ro 19-8022.....	11
2.1.2.3	Gyrasehemmer	12
2.1.2.4	BCBT	15
2.1.2.5	UV-Licht	15
2.2	Oxidative Basenmodifikationen.....	16
2.3	Antioxidantien	19
2.3.1	Nicht-enzymatische Antioxidantien.....	19
2.3.2	Enzymatische Antioxidantien	20
2.4	DNA-Reparatur.....	23
2.4.1	Direkte Reparatur (Schadensreversion)	23
2.4.2	Basen-Exzisions-Reparatur (BER)	23
2.4.3	Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER).....	26
2.5	Biologische Konsequenzen oxidativer DNA-Schäden.....	26
2.5.1	Das Tumorsuppressorgen p53.....	27
2.6	Zielsetzung	31
3	Material und Methoden.....	32
3.1	Materialien.....	32
3.1.1	Geräte	32
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	33
3.1.3	Chemikalien	34
3.1.4	Antikörper	37
3.1.5	DNA.....	37
3.1.6	Enzyme.	37
3.1.7	Zelllinien	38
3.1.8	Bakterienstämme.....	38
3.1.9	Puffer, Lösungen, Medien.....	39
3.1.9.1	Modifizierung der PM2-DNA und des pSV2- <i>gpt</i> -Plasmids	39
3.1.9.2	Enzyminkubation der PM2-DNA und des pSV2- <i>gpt</i> -Plasmids.....	39
3.1.9.3	Agarosegelelektrophorese der PM2-DNA und des pSV2- <i>gpt</i> -Plasmids.....	40
3.1.9.4	Plasmidtransformation	40
3.1.9.4.1	Präparation kompetenter Bakterien (<i>E. coli</i> DT-2)	40

3.1.9.4.2	Modifikation des pSV2- <i>gpt</i> Plasmids	41
3.1.9.4.3	Transformation	41
3.1.9.4.4	pSV2- <i>gpt</i> Plasmidisolierung	41
3.1.9.4.5	Plattenmedien	42
3.1.9.5	Puffer und Medien für die Zellkultur	43
3.1.9.6	Alkalische Elution und Zelltoxizitätsversuche	44
3.1.9.6.1	Filterelution der DNA	44
3.1.9.6.2	Fluorimetrische Bestimmung der DNA-Menge	45
3.1.9.7	HPLC-Analytik	45
3.1.9.7.1	Schädigung der DNA	45
3.1.9.7.2	Enzymatische Hydrolyse der DNA	45
3.1.9.7.3	HPLC-Trennung	46
3.1.9.8	Puffer zur enzymatischen Bestimmung von intrazellulärem Glutathion	46
3.1.9.9	Puffer zur Bestimmung von Mikrokernen in AS52-Zellen	46
3.1.9.10	Immunoblotting	47
3.1.9.10.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	47
3.1.9.10.2	Färbung von Proteingelen mit Coomassie Brilliant Blue	48
3.1.9.10.3	Proteinbestimmung	48
3.1.9.10.4	Western-Blotting mit anschließender Antikörperfärbung	49
3.2	Methoden	50
3.2.1	DNA-Schadensanalyse <i>in vitro</i> an PM2 DNA und am Plasmid pSV2- <i>gpt</i>	50
3.2.1.1	Prinzip des DNA Relaxationsassays	50
3.2.1.2	Modifizierungen von PM2 DNA und Plasmid pSV2- <i>gpt</i>	51
3.2.1.2.1	Schädigung von PM2 DNA und Plasmid pSV2- <i>gpt</i> durch NDPO ₂ in D ₂ O-Puffer	52
3.2.1.2.2	Schädigung von PM2 DNA und Plasmid pSV2- <i>gpt</i> durch BCBT und UV-A-Licht (360 nm)	52
3.2.1.2.3	Schädigung von PM2 DNA durch Ofloxacin + UV-A-Licht (360 nm)	52
3.2.1.2.4	Schädigung von PM2 DNA durch Norfloxacin + UV-A-Licht (360 nm)	53
3.2.1.2.5	Schädigung von PM2 DNA durch Riboflavin + sichtbares Licht	53
3.2.1.3	Inkubation der PM2 DNA und Plasmid pSV2- <i>gpt</i> mit Reparaturenendonukleasen	53
3.2.1.4	Agarose-Gelelektrophorese der PM2 DNA und des Plasmids pSV2- <i>gpt</i>	54
3.2.1.5	Auswertung der Agarosegele	54
3.2.2	Plasmidtransformation	55
3.2.2.1	Prinzip der Methode	55
3.2.2.2	Herstellung kompetenter Bakterien (<i>E. coli</i> DT-2)	58
3.2.2.3	Herstellung von Nährmedium-Platten (Hart-Agar)	58
3.2.2.4	Modifizierung des Plasmid pSV2- <i>gpt</i>	58
3.2.2.5	Transformation	59
3.2.2.6	Ausstreichen auf Agar-Platten und Auswertung	59
3.2.2.7	Plasmidisolierung aus Bakterien	60
3.2.2.8	DNA-Sequenzanalyse	61
3.2.3	Zellkultur	61
3.2.3.1	Allgemeine Arbeitstechniken in der Zellkultur	61
3.2.3.2	Kryokonservierung von Säugerzellen	61
3.2.3.3	AS 52-Zelllinie	62
3.2.3.4	A253-Zelllinie	63
3.2.3.5	A253CW14G-Zelllinie	63

3.2.3.6	A253CW16G-Zelllinie.....	64
3.2.3.7	Primäre Mausfibroblasten	64
3.2.3.8	HaCaT-Zelllinie	64
3.2.3.9	HeLa-Zelllinie	65
3.2.4	Alkalische Elution.....	65
3.2.4.1	Prinzip der Methode.....	65
3.2.4.2	Versuchsaufbau.....	67
3.2.4.3	Behandlung der Zellen für die alkalische Elution.....	67
3.2.4.3.1	Schädigung mit Ro 19-8022 und sichtbarem Licht.....	68
3.2.4.3.2	Schädigung mit sichtbarem Licht.....	68
3.2.4.3.3	Schädigung mit UV-B-Strahlung	68
3.2.4.3.4	Schädigung mit BCBT + UV-A-Licht (360 nm).....	69
3.2.4.3.5	Schädigung mit Ofloxacin + UV-A-Licht (360 nm)	69
3.2.4.3.6	Schädigung mit Norfloxacin + UV-A-Licht (360 nm).....	70
3.2.4.3.7	Schädigung mit Wasserstoffperoxid	70
3.2.4.3.8	Schädigung mit Kaliumbromat	70
3.2.4.3.9	Behandlung mit BSO.....	70
3.2.4.3.10	Behandlung mit Natriumselenit.....	71
3.2.4.3.11	Behandlung mit Ebselen.....	71
3.2.4.3.12	Bestimmung der Steady-State-Spiegel	71
3.2.4.3.13	Bestimmung der DNA-Reparatur in Säugerzellen	71
3.2.4.4	Zelllyse, Inkubation mit Endonukleasen, Elution der DNA	72
3.2.4.5	Fluorimetrische Bestimmung der DNA	73
3.2.4.6	Auswertung der alkalischen Elution	73
3.2.4.7	Alkalische Schnell-Elution	75
3.2.5	Zelltoxizitätstests	75
3.2.5.1	Plating efficiency	75
3.2.5.2	Cloning efficiency.....	76
3.2.6	Mikrokerntest.....	76
3.2.6.1	Prinzip der Methode.....	76
3.2.6.2	Mikrokerninduktion in Kulturzellen.....	77
3.2.7	HPLC-Analyse von 8-oxodG in DNA	78
3.2.7.1	Schädigung von pSV2- <i>gpt</i> - und PM2 DNA	78
3.2.7.1.1	Schädigung durch NDPO ₂ in D ₂ O-Puffer	78
3.2.7.1.2	Schädigung durch BCBT + UV-A-Licht (360 nm).....	78
3.2.7.2	Enzymatische DNA-Totalhydrolyse	78
3.2.7.3	HPLC-Auftrennung.....	79
3.2.7.4	Auswertung der HPLC.....	79
3.2.8	Photometrische GSH-Bestimmung, modifiziert nach Ellman	80
3.2.9	Immunoblotting in primären Mausfibroblasten und A253-, A253CW14G- und A253CW16G-Zellen.....	81
3.2.9.1	Vorbereitung der Proben.....	81
3.2.9.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) von Proteinen	82
3.2.9.2.1	Prinzip der Methode.....	82
3.2.9.2.2	Durchführung der Methode	82
3.2.9.3	Western-Blotting und Immundetektion.....	83

4	Ergebnisse	85
4.1	Steady-State-Spiegel oxidativer DNA-Modifikationen in Säugerzellen.....	85
4.1.1	Quantifizierung Fpg- und T4 Endonuklease V-sensitiver Modifikationen in zellulärer DNA durch Alkalische Elution	85
4.1.2	Bestimmung des Steady-State-Spiegel oxidativer DNA-Modifikationen in verschiedenen Säugerzellen	87
4.2	Einfluß des intrazellulären Glutathion-Spiegels auf oxidative DNA-Schäden in Säugerzellen.....	88
4.2.1	Einfluß der GSH-Depletion auf Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen.....	88
4.2.2	Einfluß der GSH-Depletion auf den Gehalt an Gesamt-Glutathion.....	89
4.2.3	Toxizität der Behandlung mit BSO.....	90
4.2.4	Einfluß der GSH-Depletion auf die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Ro 19-8022 + Licht	91
4.2.5	Einfluß der GSH-Depletion auf die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch sichtbares Licht	91
4.2.6	Einfluß der GSH-Depletion auf die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Breitband-UV-B-Licht	92
4.3	Einfluß von Selen auf oxidative DNA-Schäden und Mikrokerne in Säugerzellen.....	94
4.3.1	Einfluß von Natriumselenit auf Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen.....	94
4.3.2	Einfluß von Natriumselenit auf den Gehalt an Gesamt-Glutathion	95
4.3.3	Toxizität der Behandlung mit Natriumselenit.....	95
4.3.4	Einfluß von Ebselen auf Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen.....	96
4.3.5	Einfluß von Ebselen auf den Gehalt an Gesamt-Glutathion	97
4.3.6	Toxizität der Behandlung mit Ebselen.....	97
4.3.7	Einfluß von Natriumselenit und Ebselen auf die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Ro 19-8022 + Licht	98
4.3.8	Einfluß von Natriumselenit und Ebselen auf die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch sichtbares Licht	99
4.3.9	Einfluß von Natriumselenit und Ebselen auf die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Breitband-UV-B-Licht	101
4.3.10	Einfluß von Natriumselenit und Ebselen auf die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Kaliumbromat	102
4.3.11	Einfluß von Natriumselenit und Ebselen auf die Toxizität exogener Agentien.....	104
4.3.12	Einfluß von Natriumselenit und Ebselen auf die Induktion von Mikrokerneln durch Ro 19-8022 + Licht.....	105
4.3.13	Einfluß von Natriumselenit und Ebselen auf die Induktion von Mikrokerneln durch Kaliumbromat	108
4.3.14	Einfluß von Natriumselenit und Ebselen auf die Induktion von Mikrokerneln durch H ₂ O ₂	110

4.4	Einfluß des p53-Genprodukts auf DNA-Schäden und DNA-Reparatur in
	Säugerzellen.....	112
4.4.1	Einfluß der Expression von p53 auf Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen.....	112
4.4.2	Einfluß der Expression von p53 auf den Gehalt an Gesamt-Glutathion.....	114
4.4.3	Einfluß der Expression von p53 auf die Toxizität von Ro 19-8022	115
4.4.4	Einfluß der Expression von p53 auf die Mikrokerninduzierbarkeit durch Ro 19-8022 + Licht.....	116
4.4.5	Einfluß der Expression von p53 auf die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Ro 19-8022 + Licht	116
4.4.6	Einfluß der Expression von p53 auf die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Breitband-UV-B-Licht	118
4.4.7	Einfluß der Expression von p53 auf die Reparatur induzierter oxidativer DNA-Modifikationen.....	118
4.4.8	Einfluß der Expression von p53 auf die Reparatur induzierter Pyrimidindimere....	120
4.4.9	Immunoblotting - Nachweis der p53-Expression in A253CW14G-Zellen.....	123
4.5	Untersuchung der durch Alkoxy-Radikale-induzierten DNA-Schäden 124
4.5.1	Charakterisierung von Modifikationen in zellfreier DNA	125
4.5.1.1	Zellfreie Entstehung von DNA-Modifikationen durch BCBT + UV-A	125
4.5.1.2	Einfluß von Quenchern auf die Schädigung zellfreier DNA	126
4.5.1.3	Einfluß von Quenchern auf die Schädigung zellfreier DNA durch Riboflavin	128
4.5.2	Nachweis von 8-oxodG in PM2 nach Schädigung mit BCBT durch HPLC	130
4.5.3	Charakterisierung von Modifikationen in zellulärer DNA durch Alkalische Elution.....	132
4.5.4	Untersuchung der Mutagenität und Toxizität von BCBT	133
4.5.4.1	Zellfreie Entstehung von DNA-Schäden durch BCBT in Plasmid pSV2- <i>gpt</i>	133
4.5.4.2	Transformationsrate und Mutagenität von BCBT.....	134
4.5.4.3	Sequenzanalyse der durch BCBT induzierten <i>gpt</i> -Mutanten	135
4.5.4.4	Untersuchung der Mutagenität und Toxizität von NDPO ₂	137
4.5.4.5	Sequenzanalyse der durch NDPO ₂ induzierten <i>gpt</i> -Mutanten	139
4.6	Untersuchung der durch Norfloxacin und Ofloxacin-induzierten	
	DNA-Schäden	140
4.6.1	Untersuchungen an zellfreier DNA.....	140
4.6.1.1	Zellfreie Entstehung von DNA-Modifikationen durch Norfloxacin und Ofloxacin + UV-A	140
4.6.1.2	Einfluß von Quenchern auf die Schädigung zellfreier DNA	144
4.6.1.3	Nachweis von 8-oxodG in PM2 nach Schädigung mit Ofloxacin durch HPLC.....	147
4.6.2	Charakterisierung von Modifikationen in zellulärer DNA durch Alkalische Elution.....	148
4.6.2.1	Entstehung von DNA-Modifikationen durch Norfloxacin und Ofloxacin + UV-A in Zellen	148

5	Diskussion	150
5.1	Steady-State-Spiegel oxidativer DNA-Schäden.....	150
5.2	Bildung oxidativer DNA-Schäden	151
5.2.1	DNA-Schäden und Mutationen durch Alkoxy-Radikale	151
5.2.2	DNA-Schäden durch Gyrasehemmer	155
5.3	Einfluß bestimmter Antioxidantien auf oxidative DNA-Schäden	158
5.3.1	Einfluß von intrazellulärem Glutathion	158
5.3.2	Einfluß von Selen.....	162
5.4	Einfluß bestimmter Gene auf oxidative DNA-Schäden und DNA-Reparatur .	165
5.4.1	Einfluß des p53 Tumorsuppressorgens auf oxidative DNA-Schäden und Basenexzisionsreparatur?.....	165
6	Abkürzungen	168
7	Literatur.....	171

1 Zusammenfassung

Für die Krebsentstehung sind nach heutigen Vorstellungen Mutationen in bestimmten Genen somatischer Zellen verantwortlich, die ihrerseits durch chemische Modifikationen der DNA (DNA-Schäden) verursacht werden. Von besonderem Interesse als DNA-schädigende Agentien sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die endogen - wie z.B. in der Lipidperoxidation oder mitochondrialen Atmungskette - oder exogen - z.B. durch Arzneimittel oder andere aus der Umwelt stammende Chemikalien - gebildet werden können. Dem Schutz der DNA vor dieser Schädigung und ihren Folgen dienen antioxidative Systeme und DNA-Reparatur, deren Effizienz von verschiedenen Genen der Zelle abhängig ist. Zu den Antioxidantien zählen beispielsweise das Tripeptid Glutathion und das Selen-enthaltende Enzym Glutathionperoxidase. Als Ausdruck des Fließgleichgewichts zwischen Bildung und Reparatur findet man in allen Zellen ein gewisses Ausmaß oxidativer DNA-Schäden (Steady-State-Spiegel). Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses bestimmter Faktoren auf die Bildung, Inhibierung (antioxidative Wirkung) und Reparatur oxidativer DNA-Schäden.

Als Beispiel für exogene Stoffe, die zur Bildung oxidativer DNA-Schäden führen, wurden die Gyrasehemmer Ofloxacin und Norfloxacin und deren Bestrahlung mit UV-360 untersucht. Unter Verwendung spezifischer DNA-Reparaturenukleasen als Sonden (Fpg-Protein, Endonuklease III, Endonuklease IV, Exonuklease III, T4 Endonuklease V) wurden spezifisch DNA-Modifikationen an zellfreier DNA mit Hilfe eines Relaxationsassays quantifiziert und in einem sog. DNA-Schadensprofil dargestellt. Der Vergleich mit Schadensprofilen bereits bekannter reaktiver Sauerstoffspezies zeigte, daß es sich im Falle des Ofloxacins bei der ultimal mit der DNA reagierenden reaktiven Spezies um Hydroxylradikale handelt, während durch Norfloxacin Singulett-Sauerstoff entsteht. Durch Zusatz verschiedener Antioxidantien konnte diese Ergebnisse bestätigt werden. Der Einfluß des Enzyms Superoxiddismutase bei der Schädigung mit Ofloxacin, läßt darauf schließen, daß durch Bestrahlung des Ofloxacins zunächst Superoxid generiert wird, welches durch metall-katalysierte Fenton-Reaktion zu Hydroxylradikalen reagiert. Die daraus u.a. entstehende Basenmodifikation 8-Hydroxyguanin (8-oxoG) wurde in zellfreier DNA mittels HPLC nachgewiesen. Die Induktion von DNA-Schäden in AS52 (CHO-Zellen) wurde mit der Methode der Alkalischen Elution vermessen. Die in zellulärer DNA erstellten Schadensprofile entsprechen den Schadensprofilen in zellfreier DNA, so daß angenommen werden kann, daß die Schädigung in Zellen analog der zellfreien Schädigung erfolgt.

Im Gegensatz zu Hydroxylradikalen ist über die DNA-Schäden und Mutationen durch Alkoxy-Radikale, die endogen bei der Lipidperoxidation entstehen, nicht bekannt. Die Bildung oxidativer DNA-Schäden durch Alkoxy-Radikale wurde daher mit Hilfe der Substanz BCBT ([4-[(*tert*-Butyldioxy)carbonyl]benzyl]-triethylammoniumchlorid) an

zellfreier DNA untersucht. In dem durch Bestrahlung mit UV-360 in Anwesenheit von BCBT gemessenen Schadensprofil war die Zahl der Fpg-sensitiven Basenmodifikationen um ein Vielfaches höher als die Zahl von Einzelstrangbrüchen, AP-Läsionen (die durch alle Reparaturenendonukleasen erkannt werden) und 5,6-Dihydropyrimidinen (durch Endonuklease III erkannt). Die Bestimmung von 8-oxoG in zellfreier DNA mittels HPLC zeigte, daß es sich bei $83 \pm 18\%$ der Fpg-sensitiven Basenmodifikationen um 8-oxoG handelt. Der Vergleich des Einflusses der Zusätze *tert*-Butanol und Natriumazid auf die Schädigung mit BCBT mit anderen reaktiven Spezies zeigt klar, daß die Schädigung hier über Alkoxy-Radikale verläuft. Die Analyse und Sequenzierung der durch BCBT induzierten Mutanten zeigte, daß vorwiegend GC→TA Transversionen gebildet werden, die auf 8-oxoG zurückzuführen sind. Es zeigte sich, daß die Substanz BCBT nach Bestrahlung mit UV-360, selektiver als alle bisher untersuchten reaktiven Sauerstoffspezies, an zellfreier DNA die Basenmodifikation 8-oxoG zu induzieren vermag.

Auf der Ebene der Antioxidantien wurde der Einfluß des zelleigenen Glutathions untersucht. Durch Blockierung der *de-novo*-Synthese durch Zusatz von BSO (L-Buthionin-SR-sulfoximin) konnte der zelluläre Gehalt an reduziertem Glutathion (GSH) bis auf Null reduziert wird. Mit der Depletion des Glutathion-Gehalts ging eine Erhöhung des Steady-State-Spiegels in den untersuchten AS52 Zellen einher. Insbesondere durch Inkubation der GSH-depletierten Zellen bei einer Temperatur von 41°C konnte der Steady-State-Spiegel um das 2,7fache erhöht werden. Die Bedeutung von Glutathion als zelleigenes Antioxidans wurde auch für exogene DNA-schädigende Agentien deutlich: Die Depletion des Glutathions bedingte eine signifikante Zunahme Fpg-sensitiver, oxidativer Basenmodifikationen bei der Schädigung mit sichtbarem Licht und mit UV-B-Strahlung.

Selen ist ein wichtiges Spurenelement und u.a. Bestandteil von Glutathionperoxidasen (GPx). Um die Bedeutung von Selen bei der oxidativer DNA-Modifikationen bzw. deren Inhibierung zu untersuchen, wurden Natriumselenit und das Glutathionperoxidase-Mimetikum Ebselen eingesetzt. Nach Behandlung der Zellen mit diesen Substanzen wurden mit Hilfe der Alkalischen Elution in AS52-Zellen Steady-State-Spiegel oxidativer Basenmodifikation quantifiziert. Die Behandlung mit Natriumselenit zeigte zunächst keinen Effekt auf den Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver Basenmodifikationen und Einzelstrangbrüche, während ab einer Konzentration von 50 µM eine Erhöhung des Steady-State-Spiegels auftritt, bedingt durch einen prooxidativen Effekt des Natriumselenits. Parallel mit der oxidativen Schädigung der DNA ist eine Erhöhung des zellulären Gehalts an Glutathion feststellbar, die vermutlich eine Gegenregulation der Zelle darstellt, um die prooxidative Wirkung des Selenits zu kompensieren. Ebselen bedingte in Konzentrationen bis 200 µM keine Erhöhung des Steady-State-Spiegels oder des Gehalts an reduziertem Glutathion. Sowohl Natriumselenit als auch Ebselen wurden nachfolgend hinsichtlich Beeinflussung exogen induzierter DNA-Schäden durch Kaliumbromat, Ro 19-8022 + Licht, sichtbares Licht und UV-B-Strahlung untersucht. Es zeigte sich, daß beide Substanzen in der Lage sind, die durch sichtbares Licht und

UV-B-Strahlung induzierten Einzelstrangbrüche zu reduzieren. Die durch Schädigung mit den Agentien Kaliumbromat, Ro 19-8022 + Licht und Wasserstoffperoxid entstehenden Mikrokerne waren ebenso durch 0,1 und 1 μM Natriumselenit und durch 20 bzw. 200 μM Ebselen reduzierbar.

Der Einfluß des Tumorsuppressorgens p53 auf die Prozessierung von DNA-Schäden wurde anhand zweier Zellpaare untersucht. Bei dem ersten Paar handelte es sich um A253-Zellen, die einen Defekt im p53-Gen aufweisen, und die daraus durch Transfektion mit p53 erhaltenen A253CW14G-Zellen. Zwischen den beiden Zelllinien zeigte sich weder ein signifikanter, auf p53 zurückzuführender Unterschied im Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver Modifikationen und Einzelstrangbrüchen (SSB), noch im GSH-Gehalt oder dem Ausmaß an Basenmodifikationen nach Schädigung mit Ro 19-8022 oder UV-B-Strahlung. Die Reparatur Fpg-sensitiver Modifikationen nach Schädigung mit Ro 19-8022 + Licht erfolgte in beiden Zelllinien mit annähernd gleicher Kinetik und wies eine Halbwertszeit der induzierten Modifikationen von ca. 2 h auf. Die Reparatur durch UV-B-Strahlung induzierter Cyclobutanpyrimidindimere verlief ebenso in dem untersuchten Zellpaar mit gleicher Geschwindigkeit. Die Halbwertszeit dieser Modifikationen betrug ca. 8 h. Als zweites Zellpaar zur Untersuchung des Einflusses des p53-Gens auf oxidative DNA-Schäden wurden Fibroblasten von p53-defizienten („p53-knock-out“) und „wild-typ“ Mäusen untersucht. Auch bei diesem Zellpaar sind Glutathion-Gehalt und die Steady-State-Spiegel oxidativer DNA-Modifikationen gleich. Durch Ro 19-8022 + Licht wurden oxidative DNA-Läsionen in gleichem Ausmaß induziert. Die Reparatur der durch Ro 19-8022 + Licht induzierten, oxidativen Modifikationen verläuft in beiden Zellen mit gleicher Geschwindigkeit und mit der gleichen Halbwertszeit von ca. 2 h. Die Reparatur von Pyrimidindimeren nach UV-B-Bestrahlung erfolgte mit einer langsameren Halbwertszeit von 8 h, jedoch völlig gleich in beiden Zellen. Aus diesen Ergebnissen ist zu folgern, daß das p53 Gen keinen Einfluß auf die Reparatur Fpg-sensitiver Basenmodifikationen oder UV-B-induzierter DNA-Schäden hat.

2 Einleitung

Krebs steht nach Herz- und Kreislauferkrankungen in der Statistik der Todesursachen weltweit an zweiter Stelle. Jeder Dritte in den Industrienationen erkrankt an Krebs und jeder Fünfte stirbt daran. In der Bundesrepublik Deutschland betrug die Zahl der an bösartigen Neubildungen Verstorbenen 210.053 (**Statistisches Bundesamt, 1997**). Die Krebsmortalität steigt trotz Bemühungen in der Krebstherapie und wird im Jahr 2000 die führende Todesursache in den USA vor Herz- und Kreislaufleiden sein (**Dekant und Vamvakas, 1994**).

Für die Krebsentstehung sind nach heutigen Vorstellungen Mutationen in bestimmten Genen somatischer Zellen - Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen wie z.B. p53 (siehe Kap. 2.4.1) - verantwortlich. Mutationen werden ihrerseits durch chemische Modifikationen der DNA (DNA-Schäden) (siehe Kap. 2.3) verursacht. Für die Entstehung und Beeinflussung von DNA-Schäden spielen sowohl körpereigene (endogene), als auch durch äußere Noxen hervorgerufene (exogene) Faktoren eine wichtige Rolle. Von besonderer Relevanz als DNA-schädigende Agentien sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (siehe Kap. 2.1), die endogen - wie z.B. in der Lipidperoxidation oder mitochondrialen Atmungskette - oder exogen - z.B. durch Arzneimittel oder andere aus der Umwelt stammende Chemikalien - gebildet werden können. Als Ausdruck des Fließgleichgewichts zwischen Bildung und DNA-Reparatur findet man in allen Zellen ein gewisses Ausmaß oxidativer DNA-Schäden (Steady-State-Spiegel) (**Pflaum et al., 1998**). Die Prämutagenität von 8-Hydroxyguanin, einem der wichtigsten oxidativen DNA-Schäden, ist bekannt (**Shibutani et al., 1991**).

Hydroxylradikale (HO^{\bullet}) und Alkoxy-Radikale (RO^{\bullet}) können endogen oder exogen gebildet werden und zur Schädigung von DNA führen. Im Gegensatz zu Hydroxylradikalen ist über die DNA-Schäden und Mutationen durch Alkoxy-Radikale, die bei Lipidperoxidation entstehen können, nichts bekannt.

Eine exogene Quelle von reaktiven Sauerstoffspezies können Arzneistoffe wie Ofloxacin und Norfloxacin darstellen. Neuere Untersuchungen zu Fluororchinolonecarbonsäure-Antibiotika (Gyrasehemmer) zeigen, daß die Applikation verschiedener therapeutisch genutzter Verbindungen bei Mäusen die Entstehung von Hautkrebs bedingt.

Dem Schutz der DNA vor einer oxidativen Schädigung und ihren Folgen dienen antioxidative Systeme (siehe Kap. 2.5) und DNA-Reparatur (siehe Kap. 2.6), deren Effizienz von verschiedenen Genen der Zelle abhängig ist. Zu den Antioxidantien zählen beispielsweise das Tripeptid Glutathion und das Selen-enhaltende Enzym Glutathionperoxidase. Glutathion ist einer der wesentlichen physiologischen Radikalfänger. Dessen Bedeutung für die Entstehung bzw. den vermittelten Schutz vor oxidativen DNA-Schäden ist jedoch relativ wenig bekannt.

Selenmangel wird mit einer erhöhten Tumorinzidenz in Verbindung gebracht. Die Beeinflussung oxidativer DNA-Schäden durch verschiedene Selenverbindungen wie Natriumselenit und Ebselen ist bisher unzureichend erforscht.

Unter den Genen, die die Reparatur oxidativer DNA-Schäden beeinflussen können ist das Tumorsuppressorgen p53 zu erwähnen. Es liegen kontroverse Angaben über die Beteiligung bei der Nukleotidexzisionsreparatur vor. Über die Beteiligung des Gens p53 bei der Basenexzisionsreparatur ist noch nichts bekannt.

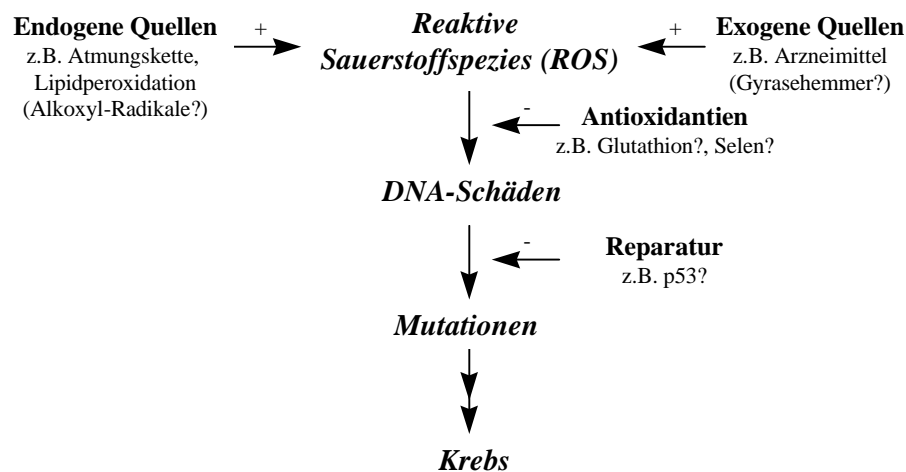


Abb. 2.1 Bildung, Beeinflussung und Auswirkung oxidativer DNA-Schäden

In der vorliegenden Arbeit sollte die zellfreie und zelluläre Entstehung von oxidativen DNA-Schäden, deren Beeinflussung durch Antioxidantien und der Einfluß bestimmter Gene auf die Prozessierung von DNA-Schäden (DNA-Reparatur) untersucht werden (siehe **Abb. 2.1**). Die Ergebnisse sollen Aufschluß über die Mechanismen der Bildung oxidativer DNA-Schäden, den Einfluß möglicher Schutzsubstanzen wie Glutathion und Selen und die Beteiligung des Gens p53 bei der DNA-Reparatur geben.

2.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind als DNA-schädigende Agentien von großer Wichtigkeit. ROS entstehen kontinuierlich endogen, z.B. in der Lipidperoxidation oder mitochondrialen Atmungskette, oder exogen, z.B. durch Arzneimittel oder andere aus der Umwelt stammende Chemikalien. In der mitochondrialen Atmungskette allein werden ca. 95% des vom Mensch aufgenommenen Sauerstoff umgesetzt (**Gutteridge et al., 1985**).

Zu den ROS gehören Superoxid ($O_2^{\bullet-}$), Singulett-Sauerstoff (1O_2), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Alkoxy-Radikale (RO^{\bullet}) und die reaktivste Spezies, das Hydroxylradikal (HO^{\bullet}). In **Tab. 2.1** sind verschiedene reaktiver Sauerstoffspezies in der Reihenfolge abnehmender Reaktivität aufgeführt.

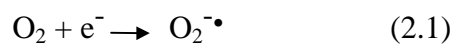
Tab. 2.1 Reaktive Sauerstoffspezies in der Reihenfolge abnehmender Reaktivität (nach Markant et al., 1995)

Formel	Bezeichnung
HO•	Hydroxyl
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
HO ₂ •	Perhydroxyl
O ₂ ⁻ •	Superoxid
RO•	R-Oxyl z.B. Alkoxyl
ROO•	R-Dioylal z.B. Alkyldioal (Hydroperoxyl)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOCl	Hypochlorige Säure
NO•	Stickstoffmonoxid

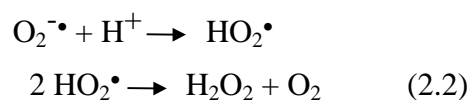
2.1.1 Endogene Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies werden endogen im Organismus im Rahmen des normalen Metabolismus durch sequentielle monovalente Reaktionen aus molekularem Sauerstoff gebildet.

Superoxid (O₂⁻•) entsteht bei der mitochondrialen Atmung. Das Radikal wird aus molekularem Sauerstoff durch Aufnahme eines Elektrons gebildet (**Gleichung 2.1**). Zu den wichtigsten Enzymen, die Superoxid-Radikale generieren, gehören Oxidasen (Xanthin-, NADPH, D-Aminosäure- Cytochrom-c- und Aldehyd-Oxidase) sowie die Lipoxygenase, Cyclooxygenasen und Flavin-Dehydrogenase (**Fridovich, 1983**). Die bakterizide Aktivität von Leukozyten und Makrophagen durch den „respiratory burst“ wird durch Superoxid-Radikale vermittelt (**Rosen et al., 1995; Babior, 1978**). Autoxidations-Reaktionen, z.B. von Glutathion, stellen ebenfalls eine endogene Quelle für O₂⁻• dar.



Unter physiologischen Bedingungen liegt Superoxid als relativ stabiles Anion vor, welches biologische Membranen nicht durchdringen kann. Das O₂⁻•-Radikal unterliegt in wässriger Lösung bei physiologischem pH einer spontanen Dismutation zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff (siehe **Gleichung 2.2**) mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Die Geschwindigkeit der Reaktion wird durch das Enzym Superoxiddismutase um den Faktor 9 erhöht (**Markant et al., 1995**).



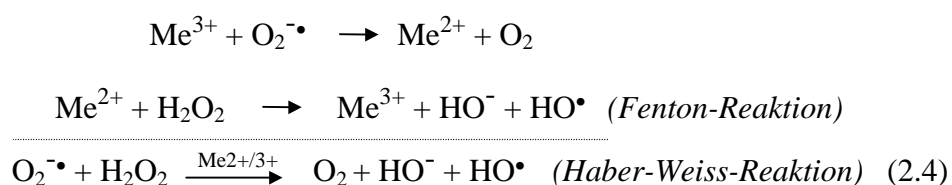
Superoxid kann nur indirekt mit DNA reagieren. Die durch metallkatalysierte *Haber-Weiss-Reaktion* gebildeten Hydroxylradikale (**Halliwell & Aruoma, 1991**, siehe **Gleichung 2.4**) sind maßgeblich für die Schädigung der DNA verantwortlich.

Wasserstoffperoxid kann durch spezifische, peroxisomal lokalisierte Oxidasen, wie die D-Amino-, Harnsäure- und Glykolat-Oxidasen (**Southorn & Powis, 1988**) gebildet werden. Die Verbindung zeichnet sich durch eine relativ hohe Stabilität aus und ist in der Lage, Zellmembranen zu durchdringen (**Halliwell & Gutteridge, 1985**). Die Toxizität von Wasserstoffperoxid ist auf die Oxidation von SH-Gruppen sowie auf die bei der metallkatalysierten Haber-Weiss-Reaktion entstehenden Hydroxylradikale zurückzuführen. Wichtige zelluläre Schutzfaktoren sind H_2O_2 -abbauende Enzyme (Peroxidasen und Katalasen, siehe 2.5.2). Das Hämprotein Myeloperoxidase setzt H_2O_2 mit Halogeniden zu unterhalogenigen Säuren (z.B. HOCl) um. Reaktive Folgeprodukte des Hypochlorids sind elementares Chlor, Chloramine und Singulett-Sauerstoff (**Allen et al., 1972**). Für Wasserstoffperoxid und Superoxid-Radikale sind mutagene Wirkungen erwiesen (**Phillips et al., 1984; Sturrock & Nunn, 1978**).

Das *Hydroxyl-Radikal* (HO^\bullet) ist das reaktionsfreudigste Sauerstoffradikal in biologischen Systemen. Es finden Reaktionen mit Lipiden, Proteinen, Kohlehydraten und Nukleinsäuren der DNA statt (**Halliwell & Gutteridge, 1985; Southorn & Powis, 1988**; siehe **Gleichung 2.3**). Wegen des kurzen mittleren Diffusionsweges des Hydroxylradikals (<2 nm) (**Saran & Bors, 1989**) finden Entstehung und Folgereaktionen in unmittelbarer Nähe statt.

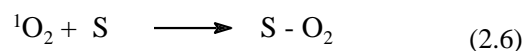
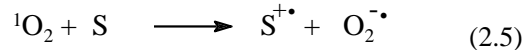


Endogen entsteht das HO^\bullet -Radikal durch Eisen- oder Kupfer-katalysierte *Haber-Weiss-Reaktion* des Superoxid-Radikals mit Wasserstoffperoxid (**Sutton & Winterbourn, 1989; Brewer & Yuzbasiyan-Gurkan, 1992; Aruoma et al., 1991; Abello et al., 1994**; siehe **Gleichung 2.4**). Wasserstoffperoxid und das Superoxid-Radikal führen *per se* nicht zu Modifikationen von DNA (**Aruoma et al., 1989; Epe, 1995**). Die Entstehung des Hydroxylradikals ist *in vivo* primär von der Verfügbarkeit und der Lokalisation der redoxaktiven Metallionen abhängig, die zur Katalyse notwendig sind (**Aust et al., 1985; Fraga et al., 1991; Ursini et al., 1985**).



Singulett-Sauerstoff ($^1\Delta_g$ oder 1O_2) wird in biologischen Systemen (1) durch Lichtanregung oder (2) durch chemische Anregung von Sauerstoff im Grundzustand (Tripletzustand, 3O_2) gebildet. Bei (1) wird ein Photosensibilisator elektronisch angeregt und überträgt dann seine Energie im Tripletzustand auf Sauerstoff (vgl. Kap. 2.2). Als Photosensibilisatoren können verschiedene zelluläre Bestandteile (Flavine und Porphyrine), Farbstoffe (wie Acridine, Methyleneblau oder Neutralrot) und andere biologisch aktive Substanzen (Phentiazine, Tetracycline, Thiazide) in der Zelle wirken (**Epe, 1993**). Im zweiten Fall, der chemischen Anregung, ist keine Aktivierung durch Licht notwendig (**Adam & Cilento, 1983**) und 1O_2 kann durch den Zerfall von Endoperoxiden, Dioxetanen und durch verschiedene andere Reaktionen entstehen (**Wasserman & Murray, 1979; Di Mascio et al., 1989; Foote & Clennan, 1995**).

1O_2 reagiert mit einer Vielzahl von biologischen Substraten (**Piette, 1991; Epe, 1991; Sies & Menck, 1992; Sies, 1993; Wagner et al., 1993**). Aufgrund seiner im Vergleich zu den reaktiveren Hydroxylradikalen größeren Halbwertszeit kann im Cytosol gebildeter Singulett-Sauerstoff in den Zellkern eindringen (mittlerer Diffusionsweg 1-2 μm) und die DNA schädigen. Im Gewebe besitzt Singulett-Sauerstoff eine Halbwertszeit von weniger als 0,5 μs (**Patterson et al., 1990**). Bei der Reaktion mit Makromolekülen wie DNA, Proteinen und Lipiden entstehen über Elektronenübertragungsreaktionen und perizyklische Adduktbildungen als Reaktionsprodukte Substratradikale und Superoxid (**Gleichung 2.5**) oder Substratperoxide (**Gleichung 2.6**).



Zu den endogen gebildeten ROS zählen auch *Produkte organischer Hydroperoxide*, die unter dem Einfluß von Übergangsmetall-Ionen (Fe^{2+} , Cu^+) aus ungesättigten Fettsäuren in Lipidmembranen (**Schieberle & Grosch, 1981; Chan, 1987**), durch photochemische Zersetzung von Hydroperoxiden bei der Autoxidation ungesättigter Fettsäuren (**Dix & Aikens, 1993; Fujita & Fujimoto, 1992**) oder durch Cyclooxygenase- oder Lipoxygenase-katalysierte Reaktionen entstehen. Es werden zunächst Alkyl- (R^{\bullet}), Peroxyl- (ROO^{\bullet}) oder Alkoxy-Radikale (RO^{\bullet}) gebildet, die durch radikalische Kettenreaktionen mit Olefinen (RH) neue Radikale generieren (**Gleichungen 2.7 bis 2.9**) (**Halliwell & Gutteridge, 1985**). Ein exponentieller Anstieg der Bildung von Radikalen wird durch Kettenverzweigungen bedingt. Der Abbruch der Radikalkettenreaktion durch Kombination von Alkyl- und/oder Peroxylradikalen ist unter Bildung von stabilen Produkten möglich. Alkoxy-Radikale scheinen eine wichtige Rolle in zellulären Prozessen zu spielen (**Greenley & Davies, 1992; Davies, 1989**) und tragen zur Entstehung von DNA-Schäden bei (**Ames et al., 1982; Vaca et al., 1988**). Es gibt Hinweise auf deren Beteiligung bei der Entstehung UV-induzierter Tumor (**Jurkiewicz & Buettner, 1996**) und bei der tumor-promovierenden Wirkung von Peroxiden (**Greenley & Davies, 1994**).



Sekundärprodukte der Fettoxidation durch ROS sind Ketone und Aldehyde, insbesondere der bei der Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren gebildete Malondialdehyd. Andere Folgeprodukte oxidiertes Fettsäuren sind Furanderivate sowie Alkane und Alkene. Singulett-sauerstoff kann über 1,2-Dioxetane als Intermediate triplett-angeregte Carbonylverbindungen bilden (Wassermann & Murray, 1979), die ihrerseits durch Energieübertragungsreaktionen die Bildung von ROS induzieren (Faljoni, et al., 1978; Adam & Cilento, 1983).

2.1.2 Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies unter dem Einfluß von Fremdstoffen

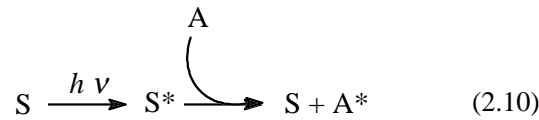
Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies kann auch durch exogene Quellen erfolgen. Durch Absorption von Strahlung angeregte Moleküle (Photosensibilisatoren), wie Ro 19-8022 oder die Gyrasehemmer Ofloxacin und Norfloxacin oder auch durch UV-induzierte Abspaltung von Radikalen wie durch Bestrahlung von BCBT ([4-[(*tert*-Butyldioxy)carbonyl]benzyl]-triethylammoniumchlorid). Durch direkte Absorption von Strahlungsenergie durch DNA kann die Schädigung jedoch auch ohne Beteiligung reaktiver Sauerstoffradikale erfolgen.

2.1.2.1 Photosensibilisatoren

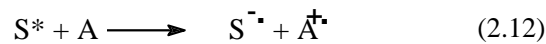
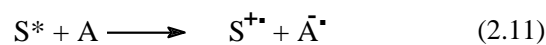
Sichtbares Licht kann aufgrund seines geringen Energieinhalts DNA nicht direkt schädigen. Bestimmte Moleküle sind in der Lage, Energie aus dem Spektrum des sichtbaren oder ultravioletten Spektrums zu absorbieren. Dadurch gelangt ein Elektron unter Spinerhalt in einen höheren Energiezustand. Die aufgenommene Energie kann in Form von Fluoreszenz abgegeben werden oder das Elektron kann unter Spinumkehr (durch Systemübergang, „intersystem crossing“) in den Triplettzustand gelangen und die Energie in Form von Phosphoreszenz abgeben. Im Singulett- und Triplettzustand angeregte Moleküle (Photosensibilisatoren) können auch mit geeigneten Molekülen reagieren (Photosensibilisierung). Photosensibilisierungsreaktionen verlaufen jedoch wegen der längeren Lebensdauer der im Triplett-Zustand angeregten Moleküle meist über Triplett-Zustände (1 ms bis mehrere Minuten), selten über Singulett-Zustände. Als Photosensibilisator bezeichnet man streng genommen nur Moleküle, die als Katalysator wirken. Zu den endogenen Photosensibilisatoren zählen Porphyrine, Melanine, Flavine, NADH, NADPH, Nukleoside und Tryptophan.

Die direkten Reaktionen zwischen Photosensibilisatoren und Substraten sind in drei Klassen einteilbar und werden als *Typ-I-Reaktionen* bezeichnet:

- 1. Energieübertragung:** Die Energie des angeregten Photosensibilisators (S^*) wird auf ein Akzeptormolekül (A) übertragen, der Photosensibilisator kehrt in den Grundzustand zurück.



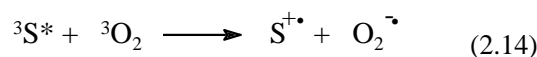
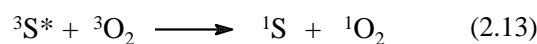
- 2. Ein-Elektronen- oder Wasserstoff-Übertragung:** Der angeregte Photosensibilisator oxidiert oder reduziert das Akzeptormolekül.



- 3. Adduktbildung:** Der angeregte Photosensibilisator bindet kovalent an das Akzeptormolekül.

Durch mechanische Stöße mit sog. Quenchern kann die Energie des Photosensibilisators verbraucht werden, ohne daß es zu einer Reaktion mit einem Akzeptormolekül, wie z.B. der DNA kommt.

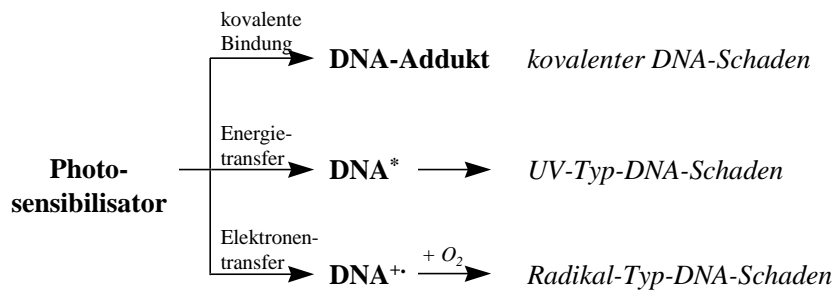
Bei der *Typ-II-Reaktion* (photodynamische Reaktion) handelt es sich um eine indirekte Reaktion des Photosensibilisators mit dem Akzeptormolekül. Die Energie wird zunächst vom Photosensibilisator auf molekularen Sauerstoff (3O_2) übertragen, was entweder zu Singulett-Sauerstoff (1O_2) oder im Falle eines oxidierbaren Sensibilisators durch Ein-Elektronen-Transfer zum Superoxid $O_2^{\dot{-}}$ führt (Foote, 1968; Gollnick, 1968; Laustriat, 1986; Piette et al., 1986; Cadet et al., 1986; Kochevar & Dunn, 1990; Cadet & Vigny, 1990). Zur Generierung von Singulett-Sauerstoff genügt bereits die Energie einer im roten Bereich des sichtbaren Bereichs absorbierenden Verbindung, da nur 92 kJ/mol zur Anregung benötigt werden. Die ultimale mit DNA, Proteinen oder anderen Zielstrukturen reagierende Spezies ist dann der reaktive Sauerstoff. Der phototoxische Effekt von Riboflavin (Vitamin B₂) beruht auf einer Typ-II-Reaktion über Superoxid (Korycka-Dahl & Richardson, 1980) und Singulett-Sauerstoff (Joshi, 1985). In Gegenwart von Licht und Sauerstoff wirkt Riboflavin in Zellkulturen toxisch und mutagen (Bradley & Sharkey, 1977) und erzeugt vorwiegend oxidative Basenmodifikationen (Pflaum, 1996).



Mögliche Mechanismen der Schädigung von DNA durch Photosensibilisatoren sind in **Abb. 2.2** zusammengefasst.

Die Schädigung antioxidativer Enzyme oder Systeme, wie z.B. das Glutathion kann durch erhöhte oxidative Belastung auch zu DNA-Schädigung führen (**Halliwell & Aruoma, 1991**).

Typ I-Reaktionen



Indirekte DNA-Modifikationen

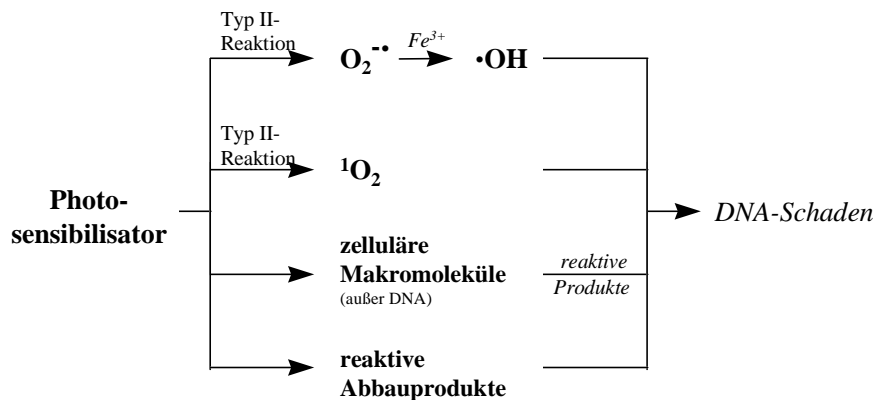


Abb. 2.2 Zelluläre Mechanismen der DNA-Schädigung durch Photosensibilisatoren

2.1.2.2 Ro 19-8022

Die Verbindung [R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl)carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol, genannt Ro 19-8022 (**Abb. 2.3**), dient als Photosensibilisator zur experimentellen Generierung von Singulett-Sauerstoff. Ro 19-8022 wurde als partieller Agonist am Benzodiazepin-Rezeptor von der Firma Hoffmann-La-Roche entwickelt (**Facklam et al., 1992; Facklam et al., 1992a; Mehta & Shank, 1995**). Es handelt sich um ein tricyclisches Chinolizinon-Derivat mit starker antikonvulsiver und anxiolytischer Aktivität, welches jedoch nur geringe sedative oder die Motorik beeinflussende Wirkungen zu besitzen scheint (**Jenck et al., 1992**). Die vorklinischen, pharmakologischen Studien zeigten eine bessere tranquillisierende Wirksamkeit des Ro 19-8022 im Vergleich zu Alprazolam (Tafil[®]). Wegen der photomutagenen und DNA-schädigenden Eigenschaften dieser Verbindung wurde von der Weiterentwicklung zum Arzneistoff Abstand genommen.

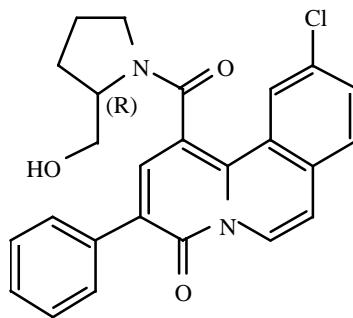


Abb. 2.3 Strukturformel von Ro 19-8022 ([R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo-[a]chinolizin-1-yl)carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol).

Es wurde gezeigt, daß die Bestrahlung von Ro 19-8022 mit sichtbarem Licht (400-800 nm) mit zellfreier PM2 Plasmid-DNA (**Hegler & Epe, 1994**) und zellulärer DNA (**Will, 1995; Will et al., 1999a**) zu DNA-Schäden, überwiegend zur Bildung der Basenmodifikation 8-Hydroxyguanin führt (**Will et al., 1999a**). Direkte Einzelstrangbrüche, AP-Läsionen und 5,6-Dihydropyrimidin-Derivate werden nur in geringem Ausmaß gebildet. Durch Versuche in D₂O-Puffer wurde gezeigt, daß bei der Schädigung mit Ro 19-8022 und sichtbarem Licht Singulett-Sauerstoff (¹O₂) als ultimal mit der DNA-reagierende Spezies entsteht (**Will, 1995**). Ro 19-8022 wirkt auch akut phototoxisch. Das Absorptionsmaximum von Ro 19-8022 liegt bei 425 nm mit weiteren Maxima bei 315 und 250 nm.

2.1.2.3 Gyrasehemmer

Neuere Ergebnisse haben den Verdacht auf photokanzerogene Wirkung von Gyrasehemmern erhärtet, da *in vivo* das Auftreten von Tumoren der Haut sowohl mit phototoxischen (**Johnson et al. 1997**) als auch subphototoxischen UV-A-Licht gezeigt werden konnte (**Mäkinen et al., 1997; Klecak et al., 1997; Food and Drug Administration, 1993**). Als Ursache der phototoxischen Hautreaktionen und photogenotoxischer Folgeerscheinungen wurde die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies diskutiert (**Robertson et al., 1991; Saniabadi et al., 1996; Wagai & Tawara, 1991, 1991a und 1992**).

Die Gyrasehemmer, Chinoloncarbonsäuren-Derivate, wirken durch Wechselwirkung mit der Gyrase, einer bakteriellen DNA-Topoisomerase vom Typ II, bakterizid. Die Wechselwirkung der Gyrasehemmer mit menschlicher Topoisomerase II ist 1000-2400fach schlechter als die mit bakterieller Gyrase (**Sanders, 1992**). Der bakterizide Effekt der Chinoloncarbonsäuren wird durch Bindung an die DNA vermittelt.

Zu den neueren Gyrasehemmern zählt die Verbindung *Norfloxacin* (Barazan[®], siehe **Abb. 2.4**), die gegen die meisten gramnegativen Stäbchen inklusive *Pseudomonas aeruginosa* wirkt und zur Behandlung von Harnwegsinfektionen indiziert ist (**Neu, 1990**). Die Dosierung beträgt zweimal täglich 400 mg über 7-10 Tage (**Mutschler, 1991**).

Die Abwandlungsprodukte von Norfloxacin, insbesondere der Wirkstoff *Ofloxacin* (Tarivid[®]), zeichnen sich durch eine stärkere Wirkung und ein breites Wirkungsspektrum aus, das neben gramnegativen Erregern (inklusive *Pseudomonas*- und *Salmonella*-Spezies) auch grampositive

Keime umfaßt. Ofloxacin ist außer bei Infektionen der Harnwege auch bei bakteriellen Infektionen anderer Organe (Atemwege, Bauchraum, Haut und Weichteile) indiziert. Die übliche Dosierung für Ofloxacin bei Harnwegsinfektionen beträgt zweimal täglich 250 mg, bei schweren Infektionen zweimal täglich 200-400 mg.

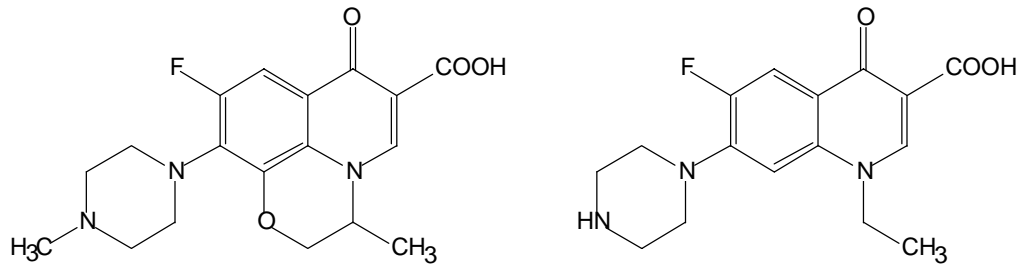


Abb. 2.4 Strukturformel der Fluorochinolincarbonsäure-Derivate *Ofloxacin* (links) und *Norfloxacin* (rechts)

Während der Behandlung mit Chinolincarbonsäuren treten bei etwa 4 bis 20% der Patienten unerwünschte Wirkungen auf (Smith, 1987). Bei etwa 1% der Patienten können nach Gabe von Fluorochinolonen Hautreaktionen, wie zum Beispiel Erythem, Pruritus oder Urtikaria, beobachtet werden (Stahlmann & Lode, 1998). Von besonderem Interesse sind phototoxische Effekte („gesteigerter Sonnenbrand“ nicht-immunologischer Ursache mit Hautrötung, Bläschenbildung und Schälen der Haut), deren Aktionsspektrum ein Maximum im UV-A-Bereich des Spektrums hat (Ferguson & Johnson, 1991). Insbesondere für Ofloxacin und Norfloxacin sind photoinduzierte Effekte beschrieben (Jensen et al., 1987; Junst & Mohr, 1987; Ferguson & Johnson, 1993). Phototoxische Reaktionen nach Bestrahlung mit UV-A (30 J/cm^2) wurden *in vivo* gezeigt (Horio et al., 1994), wobei Ofloxacin eine stärkere phototoxische Potenz zu besitzen scheint als Norfloxacin. Während der Therapie mit diesen Arzneistoffen sollten Patienten direkte Sonnenlichtexposition vermeiden (Przybilla et al., 1990; Stahlmann & Lode, 1998a).

Die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies durch verschiedene Gyrasehemmer wurde beschrieben. Die Ergebnisse sind jedoch zum Teil widersprüchlich. Das phototoxische Potential der Antibiotika scheint mit der Menge der produzierten Sauerstoffradikale zu korrelieren (Wagai & Tawara, 1992a). Umezawa et al. zeigen 1997, daß Ofloxacin und andere untersuchte Chinolincarbonsäuren photodynamisch $^1\text{O}_2$ produzieren und DNA-Strangbrüche zu generieren vermögen. Andere Autoren beschreiben, daß neben der Entstehung von $^1\text{O}_2$ Radikale - also nicht Singulett-Sauerstoff - die hauptsächliche Ursache für genotoxische Wirkungen sind (Fujita & Matsuo, 1994). Die Entstehung von Superoxid, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikalen durch Chinolone (u.a. Ofloxacin) durch UV-A-Bestrahlung zeigen Wagai & Tawara (1992). Ein Einfluß von Katalase, Dimethylthioharnstoff und anderer Antioxidantien auf Phototoxizität und Photogenotoxizität wurde beschrieben (Wagai & Tawara, 1991, 1991a); der Einfluß bestimmter Zusätze auf die Entstehung von Radikalen durch die Bestrahlung einer Lösung von Ofloxacin läßt auf die Entstehung der Radikale durch metallkatalysierte *Haber-Weiss*-Reaktion schließen (Wagai &

Tawara, 1992a). Eine Arbeitsgruppe konnte jedoch antioxidative Eigenschaften des Ofloxacin auf durch menschliche Neutrophile gebildete Sauerstoffradikale nachweisen und spricht der Verbindung sogar eine anti-inflammatorische Wirkung zu (**Akamatsu et al., 1996**).

Die Bildung von Singulett-Sauerstoff in einer UV-bestrahlten Lösung von Norfloxacin ist pH-abhängig, bedingt durch Quenchen der reaktiven Spezies durch die protonierte und deprotonierte Form des Norfloxacin. Das Maximum der $^1\text{O}_2$ -Generierung ist bei pH 8-9 (**Bilski et al., 1996**). Besonders bei dem physiologischen pH-Wert 7,4 scheint so die Entstehung von Singulett-Sauerstoff durch Norfloxacin und UV-Strahlung wahrscheinlich.

Gyrasehemmer können auch zelluläre Makromoleküle wie DNA in Säugerzellen schädigen: Norfloxacin verursacht *in vivo* in Ratten nach oraler Gabe DNA-Schäden in Leber und Niere (**Pino et al., 1991**). Es konnten Effekte im Comet Assay nach Bestrahlung von V79-Zellen mit 37 kJ/m^2 UV-A gezeigt werden (**Reavy et al., 1997; Chételat et al., 1996**). Für Ofloxacin wurde nach UV-Bestrahlung eine membranschädigende Wirkung durch Lipidperoxidation nachgewiesen (**Wada et al., 1994**). Gyrasehemmer zeigten *in vitro* einen Einfluß auf die Reparatur Röntgen- oder UV-Strahlen-induzierter DNA-Schäden (**Tempel & Ignatius, 1992**). Bei der Untersuchung von SCE („Schwester-Chromatid-Austauschraten“) zeigte sich *in vitro* keine Erhöhung, *in vivo* aber leichte Effekte mit Ofloxacin nach UV-Bestrahlung (**Kullich et al., 1988**). Sowohl Norfloxacin als auch Ofloxacin zeigten in hohen, nicht-therapeutischen Konzentrationen, nach Bestrahlung mit UV-Licht einen Einfluß auf UDS („Unscheduled DNA Repair“) in Hepatocyten (**McQueen et al., 1991**). Eine inhibierende Wirkung der 4-Chinolone auf Proliferation und DNA-Synthese wird angenommen (**Lawrence et al., 1993; Seay et al., 1996; Sanders, 1992**). Für Norfloxacin und Ofloxacin wurde eine SOS „error-prone“ (mutagene) Reparatur gezeigt (**Howard et al., 1993**).

Studien auf zelluläre Mutagenität von Ofloxacin unter Bestrahlung waren negativ, bzw. das mutagene Potential sehr niedrig (**Stahlmann, 1990; Mayer, 1987**). Die Mutagenität im *Salmonella typhimurium*-Test gilt als erwiesen (**Clerch et al., 1992; Gocke, 1991; Chételat et al., 1996; Albertini et al., 1995; Anderson & Berger, 1994; Ferguson & Baguley, 1994; Fort, 1992**).

Die Befunde, daß Chinoloncarbonsäure-Antibiotika mit UV-Licht sowohl phototoxische als auch photogenotoxische und sogar photokarzinogene Effekte in Mausmodellen zeigen, wirft die Frage auf, ob Photokarzinogenität auch beim Menschen auftritt und ob die Arzneimittelsicherheit dieser Arzneistoffe damit noch gewährleistet ist.

2.1.2.4 BCBT

Als photochemische, exogene Quelle der Entstehung von *tert*-Butoxyl-Radikalen wurde neuerlich der wasserlösliche Benzoesäure-Perester BCBT ([4-[(*tert*-Butyldioxy)carbonyl]benzyl]-triethylammoniumchlorid) (**Abb. 2.5**) beschrieben (**Adam et al., 1998**). Der strukturell verwandte Methylester, MCBT ([4-[Methoxycarbonyl]benzyl]-triethylammoniumchlorid) ist hingegen photochemisch inert. BCBT spaltet durch Bestrahlung mit UV-Licht *tert*-Butoxy-Radikale ab.

Unter physiologischen Bedingungen werden Alkoxy-Radikale, ähnlich den Hydroxylradikalen, durch Metall-katalysierte Zersetzung von Hydroperoxiden gebildet. Auch die photolytische Zersetzung von Hydroperoxiden, die aus der Autoxidation ungesättigter Fettsäuren stammen, tragen zur Generierung von Alkoxy-Radikalen bei (**Dix & Aikens, 1993; Fujita & Fujimoto, 1992**). Im Gegensatz zu Hydroxylradikalen ist über das genotoxische Potential der Alkoxy-Radikale aber noch relativ wenig bekannt. (**Adam et al., 1998; Breen & Murphy, 1995**) und deshalb Gegenstand dieser Untersuchungen.

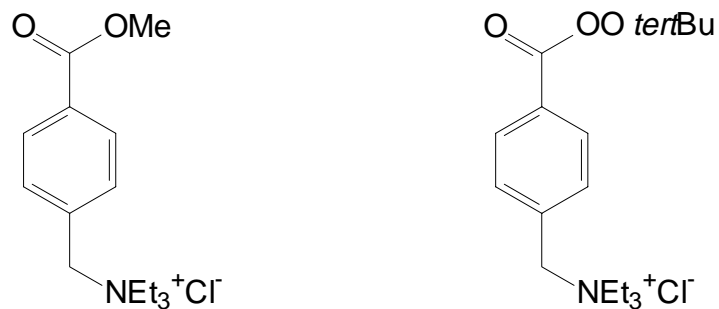


Abb. 2.5 Strukturformel der Verbindungen MCBT (links) und BCBT (rechts)

2.1.2.5 UV-Licht

Eine weitere exogene Quelle zur Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies - aber auch der direkten Schädigung der DNA - stellt UV-Strahlung dar. Die UV-Strahlung ist eine kurzwellige, energiereiche, elektromagnetische Strahlung im Wellenlängenbereich von 100 bis 400 nm. Bei ungefähr 5% des einfallenden Sonnenlichts handelt es sich um UV-Strahlung, mit den wirksamen Bestandteilen UV-A (320-400 nm) und UV-B (280-320 nm). UV-Strahlung ist die wesentliche Ursache der Entstehung von Hautalterung und Hautkrebs beim Menschen (**Findlay, 1928; Longestretth et al., 1991; Urbach, 1982; Henriksen et al., 1990; Concar, 1992**). Vermutlich sind für die meisten der UV-induzierten biologischen Effekte DNA-Schäden und daraus resultierende Mutationen verantwortlich.

DNA und RNA besitzen absorbierende Chromophore mit einem Absorptionsmaximum bei ca. 260-265 nm. **Trosko et al** fanden **1965** erstmals Cyclobutanpyrimidindimere in UV-bestrahlter Säugerzell-DNA. Die Entstehung der DNA-Schäden und das Ausmaß und Verhältnis der verschiedenen DNA-Basenmodifikationen ist von der Wellenlänge der

induzierenden Strahlung abhängig (**Ananthaswamy & Perceall, 1990; Tyrrell & Keyse, 1990**). Kurzwellige UV-Strahlung im Bereich bis etwa 320 nm (UV-B und UV-C) induziert DNA-Schäden durch direkte Anregung der DNA. Vorherrschende Produkte sind Cyclobutanpyrimidindimere (**Mitchell et al., 1991**), die durch [2+2]-Cycloaddition der photochemisch reaktiven 5,6-Doppelbindung benachbarter Pyrimidinbasen entstehen (**Friedberg, 1985**) und Pyrimidin-(6-4)-Photoprodukte (**Lippke et al., 1981; Sancar & Rupp, 1983**). Daß UV-Strahlung auch zur Radikalbildung in biologischen Geweben führen kann, ist bekannt. UV-B-Strahlung kann freie Radikale bilden, die zur Entstehung oxidativer DNA-Basenmodifikationen führen (**Kielbassa, 1996; Kielbassa et al., 1997**) und z.B. für UV-B-bedingte Hautschäden verantwortlich sein könnten (**Thody et al., 1991**). UV-induzierte reaktive Sauerstoffspezies tragen zur photoinduzierten Alterung und Photokarzinogenese bei (**Scharffetter-Kochanek et al., 1997**).

Im langwelligen UV-A-Bereich absorbiert die DNA nur schwach. Die Modifizierung der DNA-Basen erfolgt hier vermutlich unter Beteiligung endogener Photosensibilisatoren wie Porphyrine und Flavine direkt (nach Absorption der Strahlung unter Energie- oder Elektronentransfer mit der DNA, *Typ-I*-Reaktion) oder indirekt (durch Energie- oder Elektronenübertragung auf molekularen Sauerstoff über die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, *Typ-II*-Reaktion). Die Entstehung von Singulett-Sauerstoff und Superoxid (welches in der metall-katalysierten *Haber-Weiss*-Reaktion zu Hydroxylradikalen reagiert) tragen zur Entstehung oxidativer Basenmodifikationen wie 8-Hydroxyguanin (8-oxoG) bei (**Kvam & Tyrrell, 1997; Cadet et al., 1997**). Die UV-A-vermittelte Induktion der Expression bestimmter Gene beruht auch auf der Produktion von Singulett-Sauerstoff (**Grether-Beck et al., 1997**).

Im sichtbaren Bereich (oberhalb 400 nm) des Lichts können keine Cyclobutanpyrimidindimere nachgewiesen werden. Die Bildung oxidativer Basenmodifikationen, die von Fpg-Protein erkannt werden (siehe auch Kap. 2.3 und 2.6.1) findet durch Absorption endogener Photosensibilisatoren und Generierung von ROS statt und besitzt ein Maximum zwischen 400 und 450 nm (**Kielbassa, 1996; Kielbassa et al., 1997**).

Sowohl UV-B-Strahlung, sichtbares Licht als auch die Bestrahlung von Photosensibilisatoren mit sichtbarem Licht oder UV-Strahlung kann zur experimentellen Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies eingesetzt werden und zu DNA-Modifikationen führen.

2.2 Oxidative Basenmodifikationen

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) können zu chemischen Modifikationen der DNA (DNA-Schäden) führen. Zu den über 100 verschiedenen Modifikationen, die unter zellfreien Bedingungen identifiziert werden konnten (**von Sonntag, 1987; Dizdaroglu, 1992**) gehören Einzel- und Doppelstrangbrüche (**Ciulla et al., 1989; Epe et al., 1988, Sies, 1986**), basenfreie Stellen (AP-Läsionen, apurinische und apyrimidinische Läsionen) bzw. alkalilabile Läsionen (**Piette et al., 1981; OhUigin et al., 1987**) und oxidierte Basen (**Epe & Hegler, 1994; Epe et al., 1993a; Boiteux et al., 1992; Floyd et al., 1990; Schneider et al., 1990**).

In zellulärer DNA konnten oxidierte Basen neben Einzelstrangbrüchen und DNA-Protein-Quervernetzungen nachgewiesen werden (**Blazek & Hariharan, 1984; Ben-Hur et al., 1987; Ramakrishnan et al., 1988; Uggla & Sundell-Bergman, 1990**). Einige chemische Strukturen der durch Sauerstoffradikale induzierten DNA-Modifikationen sind in **Abb. 2.6** dargestellt.

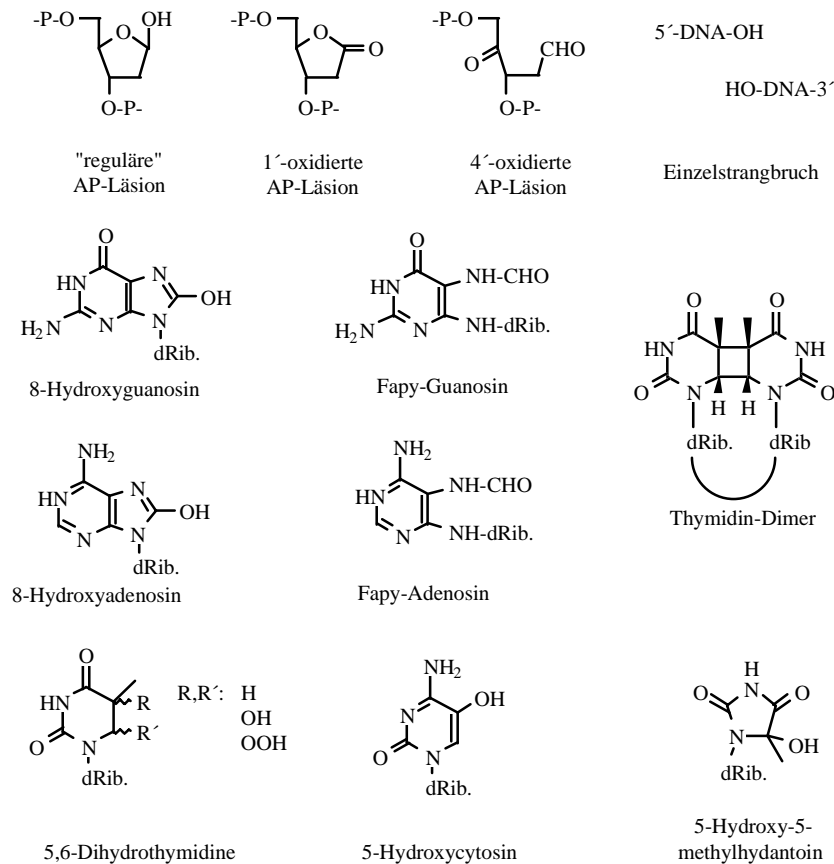


Abb. 2.6 Chemische Strukturen verschiedener DNA-Modifikationen, die durch reaktive Sauerstoffspezies entstehen

Die wichtigste und am häufigsten entstehende Purinmodifikation ist 8-Hydroxyguanin (7,8-Dihydro-8-oxoguanin, 8-oxoG), die in einer Keto-Enol-tautomeren Form vorliegt. Guanin besitzt das geringste Oxidationspotential und ist deshalb die am leichtesten oxidativ modifizierbare Base (**Hüttermann, 1982**). 8-Hydroxyguanin entsteht durch Reaktion von Guanin-Basen mit Hydroxylradikalen, Singulett-Sauerstoff oder angeregten Photosensibilisatoren endogener (z.B. Riboflavin) oder exogener Herkunft (z.B. Ro 19-8022) (**Epe, 1991; Epe et al., 1988, 1993d; Will et al., 1999a**). Viele Photosensibilisatoren, die vorwiegend im sichtbaren Bereich des Lichts absorbieren, modifizieren fast ausschließlich Guanin (**Piette et al., 1981; Cadet & Téoule, 1978; Lee & Rodgers, 1987; Kawanishi et al., 1986**). **Rétel et al. (1993)** untersuchten die durch reaktive Sauerstoffspezies induzierten Mutationen in Bakteriophagen- und Plasmid-DNA. Aus oxidativen DNA-Schäden entstehen vorwiegend Punktmutationen. Das Auftreten von Deletions- und Insertionsmutationen ist hingegen gering. Die Modifikation 8-oxoG besitzt ein prämutagenes Potential, da sie außer mit Cytosin auch mit Adenin paart (8-oxoG : A), was bei ausbleibender DNA-Reparatur

(siehe Kap. 2.5) nach zweifacher Replikation eine Punktmutation, genauer gesagt eine GC → TA Transversion, zur Folge hat (**Shibutani et al., 1991**). Nicht-repariertes 8-oxoG bewirkt GC→TA Transversionen in Bakterien (**Wood et al., 1990, Moriya et al., 1991, Cheng et al., 1992**) und Säugerzellen (**Klein et al., 1992, Moriya, 1993**). Die Einwirkung von Singulett-Sauerstoff auf DNA beispielsweise erzeugt vorwiegend 8-oxoG und GC→TA Punktmutationen (**Epe, 1991; Rétel et al., 1993, McBride et al., 1992**). Die Hydroxylierung des aus dem Nukleotidpool stammenden Triphosphats dGTP an Position 8 führt zur Bildung von 8-oxodGTP, welches mit Adenin fehlpaaert und eine AT→CG Transversion verursachen kann.

Durch Reaktion von Hydroxylradikalen mit DNA entsteht in geringerem Ausmaß auch 8-Hydroxyadenin (8-oxoA) sowie -durch Öffnung des Imidazolringes- Formamidopyrimidine (Fapy-Modifikationen; Fapy-Guanin und Fapy-Adenin) (**Fuciarelli et al., 1990; Dizdaroglu, 1992; Dizdaroglu et al., 1993**). Die Mutagenität von 8-oxoA ist im Vergleich zu 8-oxoG wesentlich geringer (**Wood et al., 1992**). Formamidopyrimidine blockieren die DNA-Synthese und besitzen keinerlei mutagenes Potential (**Tudek et al., 1992**). **Kamiya et al. (1995)** vermuten 2-oxoA als Ursache für AT→TA Transitionen. Als Produkte der Reaktion von isoliertem Guanosin und Photosensibilisatoren konnten die Verbindungen 2,5-Diamino-4-oxo-imidazol und 2,2,4-Triamino-oxazolin-5-on, die vermutlich durch *Typ I*-Reaktion entstehen, identifiziert werden (**Ravanat et al., 1992**).

Zu den oxidativen Modifikationen der Pyrimidine gehören 5,6-Dihydropyrimidin-Derivate wie Thyminglykole und Cytosinhydrate und Fragmentierungsprodukte (z.B. 5-Hydroxy-5-methylhydantoin) (**Breimer & Lindahl, 1985**). Thyminglykol blockieren wie Formamidopyrimidine die DNA-Replikation und haben daher einen stark cytotoxischen Effekt. (**Laval et al., 1998; Ide et al., 1985, Clark & Beardsley, 1987, Evans et al., 1993**). In der Leber und Niere von Ratten wurden hohe Konzentration von 5-Hydroxycytidin gefunden (**Wagner et al., 1992**). 5-Hydroxycytidin kann auch direkt aus Cytosinglycolen durch Abspaltung von Wasser entstehen. Unter zellfreien Bedingungen wird abhängig vom Sequenzkontext sowohl Adenin als auch Cytosin gegenüber 8-Hydroxycytosin eingebaut (**Purmal et al., 1994**). 5-Hydroxycytosin verursacht GC→AT Transversionen.

Reguläre AP-Läsionen, also basenfreie Stellen, entstehen durch Hydrolyse der *N*-glykosidischen Bindung. Oxidierte AP-Läsionen entstehen durch oxidativen Angriff an C1', C2' oder C4' des Zuckers. AP-Läsionen blockieren die DNA-Replikation, besitzen jedoch ein prämutagenes Potential. Es existieren konkrete Hinweise dazu, daß bei der Replikation von Shuttle-Vektoren in Säugerzellen gegenüber AP-Läsionen Guanin eingebaut werden kann (**Neto et al., 1992; Klinedinst & Drinkwater, 1992**). Bakterien mit induzierter SOS-Reparatur bauen gegenüber AP-Läsionen meist Adenin ein (**Loeb & Preston, 1986; Lawrence et al., 1990**). Das Auftreten von Deletionen ist ebenso durch spontane oder enzymatische Umwandlung der basenfreien Stellen in Strangbrüche möglich.

Durch Dimerisierung benachbarter Pyrimidinbasen ([2+2] Cycloaddition der 5,6-Doppelbindungen) entsteht der Hauptteil der UV-induzierten DNA-Modifikationen (siehe Kap. 2.2.5). Doppelstrangbrüche der DNA sind stark toxisch und mutagen.

2.3 Antioxidantien

Alle aeroben Zellen stehen unter dem Zwang, Verteidigungssysteme gegen oxidative Schäden zu entwickeln und aufrechtzuerhalten. Dabei werden reaktive Sauerstoffspezies oder deren Derivate auf verschiedenen Stufen ihrer Entstehung oder ihrer Reaktion mit zellulären Makromolekülen gehemmt oder blockiert. Zu den vorliegenden Mechanismus zählt beispielsweise das Abfangen radikalischer Spezies, die Eliminierung von Peroxiden, die Unterbrechung bereits ablaufender Kettenreaktionen und das Quenchen von $^1\text{O}_2$.

2.3.1 Nicht-enzymatische Antioxidantien

GLUTATHION (GSH)

Glutathion ist einer der wesentlichen physiologischen Radikalfänger (**Turrens et al., 1986**). GSH ist ein Tripeptid aus Glycin, Cystein und Glutamat (γ -glutamyl-cysteinylglycin) und wirkt im Organismus als zelluläres Redoxsystem (siehe **Gleichung 2.15**). Die zelluläre Konzentration des reduzierten Glutathions liegt bei 2 bis 4 mM und ist für den Erhalt der Sulfhydrylgruppen der zellulären Enzyme und Proteine notwendig (**Christie & Costa, 1984**). Die Funktion von GSH wird maßgeblich durch die SH-Gruppe des Cysteinyrestes bestimmt, die als Elektronendonator und damit als Antioxidans wirkt. Die antioxidative Funktion des GSH konnte *in vitro* (**Abel & de Ruiter, 1989**) und *in vitro* mit hepatotoxischen Substanzen (**Anundi et al., 1979; Chubatsu et al., 1992; Ochi et al., 1988**) nachgewiesen werden. Es wurde postuliert, daß ein GSH-Defizit *per se* zu hepatotoxischen Reaktionen, insbesondere zu einer gesteigerten Lipidperoxidation führen kann (**Anundi et al., 1979; Siegers et al., 1982**).



Die **Gleichungen 2.16 bis 2.19** zeigen die Reaktionen von reduziertem Glutathion (GSH) mit Radikalen (nach **Siems et al., 1996**). **2.16** zeigt die Bildung eines Thiyl-Radikals durch H-Abstraktion. Die Elektronenabgabe kann auch auf GSSG erfolgen und wird in **Gleichung 2.17** gezeigt. Die Reaktion des Thiyl-Radikals mit Sauerstoff erfolgt zu Peroxysulphenyl (**2.18**). Die Reaktion dieses Radikals mit GSH zu GSSG und Superoxid stellt eine endogene Quelle für $\text{O}_2^{\cdot-}$ dar (**2.19**).



Die Synthese von Glutathion erfolgt in zwei Schritten unter Beteiligung der Enzyme γ -Glutamylcystein-Synthetase und GSH-Synthetase. Das geschwindigkeitsbestimmende Substrat ist Cystein. Die Verbindung Buthionin-DL-sulfoximin (BSO) bewirkt die Hemmung

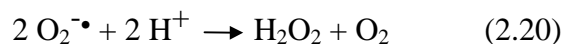
der GSH-Synthetase und damit die Hemmung der Produktion von reduziertem Glutathion (GSH). Durch Depletion von GSH durch DL-Buthionin-(S,R)-sulfoximin (BSO) und nachfolgende DNA-Schädigung zeigt sich ein Wechsel der Art des Zelltods von Apoptose zu Nekrose (**Fernandes & Cotter, 1994**). Die Inkubation mit BSO löst aber nicht selbst den programmierten Zelltod aus, so daß eine Beteiligung anderer Thiole als Glutathion bei der Apoptose angenommen werden muß (**Sato et al., 1995**).

Der Abbau von GSH erfolgt extrazellulär durch das Enzym γ -Glutamylpeptidase und durch Dipeptidasen. GSH wird dazu aktiv in den extrazellulären Raum transportiert.

2.3.2 Enzymatische Antioxidantien

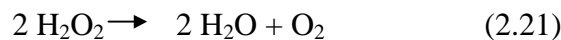
SUPEROXIDDISMUTASE (SOD)

Superoxid-Dismutase katalysiert die Entgiftung des reaktionsfähigen $O_2^{\cdot-}$ -Radikals, indem sie die spontane Dismutation bei physiologischem pH um den Faktor 9 erhöht (**Fridovich, 1983**). Dabei entsteht Wasserstoffperoxid und Sauerstoff (siehe **Gleichung 2.20**). Die weiterführende Bildung des Hydroxyl-Radikals über die metallkatalysierte Haber-Weiss-Reaktion wird so unterbunden. Bei der SOD handelt es sich um ein *in vitro* durch Xenobiotika induzierbares Enzym (**Fridovich, 1983**).



KATALASE

Das Hämprotein Katalase, das im tierischen Organismus meist partikelgebunden in den Peroxisomen vorliegt, reguliert neben der Glutathionperoxidase die intrazelluläre H_2O_2 -Konzentration durch Katalyse der Disproportionierung zu Wasser und Sauerstoff (**Chance et al., 1979; Freeman, 1984**; siehe **Gleichung 2.21**).

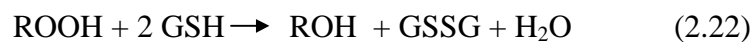


GLUTATHIONPEROXIDASE (GPx)

Glutathionperoxidase, die 1957 von Mills entdeckt wurde, kommt in Mitochondrien und im Zytosol vor und spielt eine wichtige Rolle beim Schutz der Zelle vor freien Radikalen, insbesondere bei der Lipidperoxidation. Die mitochondriale und cytosolische GPx sind für den Erhalt der strukturellen und funktionellen Integrität wichtig (**Flohe, 1980**). Die Aktivität der GPx wird durch exogene und endogene Faktoren beeinflusst. Die Enzyme der GPx-Familie katalysieren die Reduktion von zelltoxischen Wasserstoffperoxiden und Lipidhydroperoxiden zu Wasser und dem korrespondierenden Alkohol, verbunden mit einer Oxidation des reduzierten Glutathions (siehe **Gleichung 2.22, Epp et al., 1983**). Neben Wasserstoffperoxid und Hydroperoxiden von freien Fettsäuren können aber auch Nukleotid- und

Steroidhydroperoxide als Substrat in einer hydrophilen Mikroumgebung dienen (**Chow, 1979; Grossmann & Wendel, 1983**). Mit Ausnahme der Phospholipid-Hydroperoxid-Glutathionperoxidase, einem Monomer, bestehen alle Enzyme der GPx Familie aus 4 identischen Untereinheiten (je Monomer mit einer Molekülmasse von 22-23 kDa). Das Enzym nutzt Glutathion (GSH) als Elektronendonator um die reduzierte Form des Selenocystein wieder zu regenerieren (**Ursini et al., 1995**). Die Glutathion-Reduktase (GR) ist für die Regenerierung des verbrauchten Glutathion mittels NADPH verantwortlich. Die Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase sorgt über den oxidativen Pentosephosphatweg für die Bereitstellung der benötigten Reduktionsäquivalente NADPH.

Neben der selenabhängigen GPx, konnte auch eine selenunabhängige GPx nachgewiesen werden, die jedoch nur Hydroperoxide metabolisiert (**Flohe, 1980**).



Die Glutathionperoxidase tritt in Eukaryonten in Form eines *Selenoproteins* auf (**Rotruck et al., 1973; Burk, 1990; Sunde, 1990**). Jede Untereinheit enthält ein Molekül Selenocystein im aktiven Zentrum des Enzyms, das an der Elektronenübertragung auf das Peroxid-Substrat teilnimmt und durch den Prozess oxidiert wird (siehe **Abb. 2.7**). Die Aktivität der selenabhängigen Glutathionperoxidasen hängt vom Selen-Status ab (**Medina et al., 1983**).

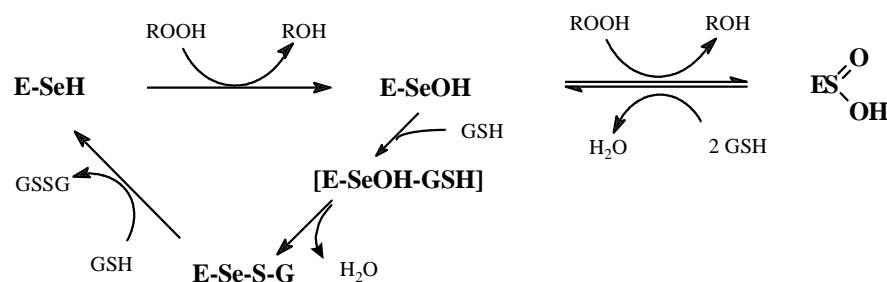


Abb. 2.7 Hypothetischer Mechanismus der Hydroperoxidreaktion durch die Glutathionperoxidase (modifiziert nach **Evans & Halliwell, 1994**).

GSH/GSSG = reduziertes/oxidiertes Glutathion,
 ROOH = Hydroperoxid,
 ROH = Alkohol,
 E-SeH = reduzierte GPx,
 E-SeOH = hydroxylierte GPx,
 E-Se-S-G = Sulfo-Selenid-Form der GPx,
 E-S-OOH = hypothetische Selensäure-Form

Eine tumorprotektive Wirkung von Selen oder Selen-angereicherter Knoblauch-Extrakte wurde in Studien für bestimmte Arten von Tumoren gezeigt (**Blot, 1993; Yu et al., 1991; Fleet, 1997; Ip et al., 1992, Ip & Lisk, 1994, 1994a, 1995**) (so werden z.B. eine Korrelation zwischen Hauttumoren und dem Selengehalt in der Diät durch **Pence et al. (1994)** gefunden). Die Befunde sind jedoch umstritten.

Der durchschnittliche tägliche Bedarf an Selen beträgt ca. 50 bis 200 µg. Pathologische Veränderungen durch Selenmangel sind bei Tieren an Auge, Haut, Herzmuskel, Hoden, Leber, Pankreas und Skelettmuskel zu beobachten, beim Mensch sind Herzmuskel und Skelettmuskel stark betroffen (**Behne & Kyriakopoulos, 1995; Foster & Sumar, 1997**). Als oberer sicherer Bereich für die Zufuhr von Selen gelten 400 µg pro Tag (**Yang & Zhou, 1994**), wobei Intoxikationen (Selenosis) in China ab 3000 µg pro Tag beobachtet wurden (**Schmidt & Bayer, 1988**). Anzeichen einer zu hohen Selenaufnahme sind der knoblauchartige Geruch der Atemluft, Müdigkeit, gastrointestinale Störungen, später Haarausfall, brüchige Nägel und Einschränkung der Reproduktionsfähigkeit. **Leibovitz et al.** berichten **1990**, daß ein alimentärer Selenmangel *in vivo* und *in vitro* die GPx-Aktivität reduziert, was mit der Entstehung radikalbedingter Schäden assoziiert sein soll. Zuverlässige Daten zu der DNA-schädigenden oder -protektiven Wirkung von Selenverbindungen fehlen jedoch.

Direkt mit Selenmangel in Verbindung gebracht werden die in China auftretende Keshan-Krankheit, eine endemisch vorkommende dilatative Kardiomyopathie, und die Kashin-Beck-Krankheit, eine Variante der dystrophischen Osteoarthrose und Spondyloarthrose. Anhand der Keshan-Krankheit wurde ein Minimalbedarf von 16 µg Selen pro Tag für die Frau und 19 µg für den Mann ermittelt (**Yang, 1989**). Als Supplement bei Selenmangelzuständen in der Veterinär- und Humanmedizin dient das wasserlösliche Salz der selenigen Säure (Selenite, Oxidationsstufe +4) (**Schmidt & Bayer, 1988**). Die Ausscheidung von Selenit erfolgt primär über den Urin in Form des Trimethylselenium-Ions. Selen verzögert die Zellmitose in Abhängigkeit intrazellulärer GSH-Spiegel, was den inhibierenden Einfluß des Selens bei der Propagation von Krebs zu erklären vermag (**Ip, 1985**). Die Wachstumshemmung von Zellen durch Selen ist auf Zytotoxizität und die Hemmung von DNA-Synthese - ohne die Lebensfähigkeit der Zelle zu beeinflussen - zurückzuführen (**Nano et al., 1989**). Die Metabolisierung von Selenit führt zu Selenodiglutathion (SDG), das einen stärkeren Inhibitor des Zellwachstums darstellt als Selenit selbst. SDG induziert p53 Protein in Zellen, die wt-p53 Protein enthalten (**Lanfear et al., 1994**). Die Inhibition scheint zum Teil aber über einen p53-unabhängigen Mechanismus zu verlaufen. Selen bedingt auch die Transkription anderer Gene, wie z.B. dem GADD (**Kaeck et al., 1997**), was die Wirkung von Selen auf Wachstumshemmung und Zelltod erklären könnte.

Von einigen Selenverbindungen wird vermutet, daß sie die DNA-Reparatur in isolierten Rattenleber-Zellsystem und im Ames' Salmonella Assay induzieren (**Russell et al., 1980; Lawson & Birt, 1983**). Ein Einfluß von Selenit auf die Reparatur von Methylmethansulfonat (MMS)-, UV- oder Bleomycin-induzierten DNA-Schäden ist in menschlichen Fibroblasten jedoch nicht nachweisbar (**Snyder, 1987**).

Die Organoselenverbindung Ebselen (2-Phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-on) besitzt eine Aktivität als Glutathionperoxidase-Mimetikum (**Sies, 1992; Müller et al., 1984; Wendel et al., 1984**). Die Verbindung katalysiert die Reduktion von Hydroperoxiden unter Verbrauch von Thiol-Äquivalenten (Glutathion, N-Acetylcystein (**Cotgreave et al., 1987**), Dihydrolipoat (**Cotgreave et al., 1992**) oder Dithioerythritol (**Müller et al., 1985**)). Das Spektrum der

Substrate reicht von Wasserstoffperoxid und kleinen organischen Hydroperoxiden bis zu membrangebundenen Phospholipid- und Cholesterol-Hydroperoxiden (Sies, 1994). Die geringe Toxizität von Ebselen in Tierversuchen läßt sich dadurch erklären, daß das in der Verbindung enthaltene Selen nicht bioverfügbar ist (Wendel et al., 1984). Dies läßt die Supplementation mit Ebselen bei Selenmangelkrankungen nicht zu. Die Anwendung als antiinflammatorischer Wirkstoff wird diskutiert (Parnham et al., 1991).

2.4 DNA-Reparatur

Reparatursysteme dienen der Reorganisation („Reparatur“) von Schadstellen und der Entfernung geschädigter Moleküle aus dem Metabolismus nach bereits vollzogener Schadenssetzung. Die Bedeutsamkeit der Reparatur defekter Nukleotide oder Basen verdeutlichen Krankheiten, dem ein solcher DNA-Reparaturdefekt zugrunde liegt. Patienten, die an der Krankheit „*Xeroderma pigmentosum*“ erkrankt sind, zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber UV-Strahlen und sterben oft schon in jungen Jahren an Hautkrebs. Die DNA-Reparatur läßt sich in direkte Reparatur (Schadensumkehr, Photoreaktivierung durch Photolyasen oder adaptive Response), die Basenexzisionsreparatur (BER), die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und die Mismatch-Reparatur gliedern.

2.4.1 Direkte Reparatur (Schadensreversion)

Zu den Enzymen, die in der Lage sind DNA-Schäden direkt zu revertieren, gehört die Photolyase. Durch UV-Strahlung entstandene Cyclobutanpyrimidin-Dimere werden hierbei durch Spaltung des Cyclobutanrings unter Beteiligung von FADH₂ wieder in ihre Monomeren überführt.

2.4.2 Basen-Exzisions-Reparatur (BER)

Die meisten oxidierten Purin- und Pyrimidinbasen werden durch die Basenexzisionsreparatur repariert. Sie korrigiert den spezifischen Schaden an einer Base. Der erste Schritt ist durch eine spezifische DNA-Glykosylase vermittelt. Diese entfernt den DNA-Schaden durch Hydrolyse der *N*-glykosidischen Bindung zwischen der modifizierten Base und der Desoxyribose. Die entstehende AP-Läsion wird durch Einschnitt der AP-Endonuklease an der 3' oder 5'-Seite in einen Einzelstrangbruch überführt. Durch DNA-Polymerase und DNA-Ligase wird der Strangbruch mit der komplementären, intakten Base aufgefüllt und geschlossen. Die bisher bekannten Reparaturenukleasen besitzen im allgemeinen sowohl eine Glykosylase- als auch AP-Endonuklease-Funktion und sind für die Erkennung spezifischer Basenmodifikationen und deren Umwandlung in einen Einzelstrangbruch verantwortlich (Wallace, 1988). DNA-Einzelstrangbrüche werden relativ schnell in einem zweiphasigen Prozess repariert (Churchill et al., 1991).

Man unterscheidet zwei Arten der BER: „Short-patch“-Reparatur, bei der nur ein Nukleotid ersetzt wird und „long patch“-Reparatur, bei der die Lücke mehrerer Nukleotide aufgefüllt wird.

In **Tabelle 2.3** sind die Erkennungsspektren der in dieser Arbeit als „Sonde“ zur Erkennung und Quantifizierung oxidativer DNA-Schäden unter zellulären und zellfreien Bedingungen (**Epe et al., 1993a; Epe & Hegler, 1994**) verwendeten Reparaturenendonukleasen dargestellt (nach **Friedberg, 1985; Wallace, 1988; Lindahl, 1990; Boiteux, 1993; Tchou et al., 1994; Häring et al., 1994; Demple & Harrison, 1994; Hatahet et al., 1994**).

Tab. 2.3 Erkennungsspektren der hier verwendeten Reparaturenendonukleasen.

	Fpg-Protein	Endo-nuklease III	Endo-nuklease IV	T4-Endo-nuklease V	Exo-nuklease III
AP-Läsionen					
normal	+	+	+	+	+
1'-oxidiert	-	-	+	-	+
4'-oxidiert	+	+	+	+	(+) ¹
Basenmodifikationen					
8-Hydroxyguanin	+	-	-	-	-
Fapy-Guanin	+	-	-	-	-
Fapy-Adenin	+	-	-	-	-
5,6-Dihydropyrimidine	-	+	-	-	-
Cyclobutandimere	-	-	-	+	-

¹Erkennung bei sehr hohen Enzymkonzentrationen (200 U/ml).

Die *Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase* (Fpg-Protein, MutM) aus *E. coli* ist ein globuläres Monomer aus 269 Aminosäuren mit einer Molekülmasse von 30.2 kD (**Boiteux et al., 1990**) und einem isoelektrischen Punkt von 8.6. Das Protein enthält ein Zink-Atom pro Molekül. Das Fpg-Protein erkennt Formamidopyrimidine (Fapy-Guanin- und Adenin), ringgeöffnete Imidazole, basenfreie Stellen (AP-Läsionen) sowie 8-Hydroxyguanin in der *anti*-Konformation (**Boiteux et al., 1992**). Die Glykosylase schneidet 8-oxoG aus 8-oxoG:C-Paaren, nicht aber aus 8-oxoG:A-Paaren, die durch einen Falscheinbau von Adenin gegenüber 8-oxoG während der DNA-Replikation entstanden sind (**Michaels et al., 1992**). Neben der DNA-Glykosylase-Aktivität besitzt das Fpg-Enzym eine AP-Endonuklease-Aktivität, die die DNA an basenfreien Stellen (AP-Läsionen) durch β - δ Elimination einschneidet (**Bailly et al., 1989**) und eine dPRase-Aktivität, die einen 5'-terminalen Schnitt der Deoxyribose-Phosphat-Kette verursacht (**Graves et al., 1992**). Das COOH-terminale Ende des Fpg Proteins enthält

ein Zink-Finger-Motiv, das für DNA-Bindung und enzymatische Aktivität des Fpg-Proteins essentiell ist (O'Connor et al., 1993). Für die Aktivität des Enzyms sind die ersten 73 Aminosäuren des N-Terminus entscheidend. Für die Aktivität der N-Glykosylasen mit AP-Lyase-Aktivität wurde ein Mechanismus vorgeschlagen, der zu der Bildung von Schiff'schen Basen zwischen Enzym und Substrat-DNA als Intermediate führt (Tchou & Grollmann, 1995). Fpg-analoge Proteine wurden in Hefe und im Menschen (hOGG1) identifiziert (Boiteux & Radicella, 1999).

Bei *Endonuklease III* (Nth Protein) handelt es sich um ein eisenabhängiges, monomeres Enzym aus *E. coli* mit einer Molekülmasse von 23.4 kDa (Asahara et al., 1989). Es besitzt DNA-Glykosylase- („Thyminglykol-DNA-Glykosylase“) und AP-Endonuklease-Aktivität (Demple & Linn, 1980; Breimer & Lindahl, 1985, 1985a). Das Protein erkennt oxidierte ringgesättigte, ringkontrahierte und ringfragmentierte Pyrimidine, die nicht mehr planar sind (Boiteux, 1993), wie z.B. Alloxan, Harnstoff, Dihydrothymidin, cis- und trans-Thyminglycol, 5-Hydroxy-5'-methylhydantoin, Methyl-tartronyl-harnstoff, 6-Hydroxy-5,6-dihydrothymin (Breimer & Lindahl, 1984, 1985), modifizierte Cytosine wie Cytosinglycol (Dizdaroglu et al., 1993) und Cytosin- und Uracilhydrate (Boorstein et al., 1989). Endo III benötigt keine zweiwertigen Kationen und ist EDTA-resistent (Radman, 1976; Gates & Linn, 1977). Zwei weitere *E. coli* DNA Glykosylasen, Endo VIII und Endo IX zeigen funktionelle Homologie mit Endo III (Wallace et al., 1988). Gene oder cDNA, die homologe Proteine der Endo III kodieren, wurden in *S. cerevisia* (NTG1) (Eide et al., 1996) und dem Mensch (hNTH) (Hilbert et al., 1997; Aspinwall et al., 1997) identifiziert.

Bei *Endonuklease IV* handelt es sich um eine EDTA-resistente AP-Endonuklease mit 3'-Phosphatase und 3'-Phosphoglykoaldehyd-Diesterase Aktivität (Levin et al., 1988). Das Enzym aus *E. coli* wird durch das *nfo* Gen kodiert und ist ein 30 kDa großes Monomer. Es ist durch oxidativen Streß induzierbar (Chan & Weiss, 1987). Homologe Proteine sind in *S. cerevisia* (APN1) und dem Mensch (APE) identifiziert worden.

Das aus dem Bakteriophagen T4 stammende Enzym *T4 Endonuklease V* hat ein Molekulargewicht von 16 kDa. Es besitzt Glykosylase- und AP-Endonuklease-Funktion, die voneinander unabhängig sind (Nakabeppu & Sekiguchi, 1982). T4 Endonuklease V erkennt spezifisch Cyclobutandimere (Gallagher & Duker, 1986). Als ersten Schritt bei der Basenexzisionsreparatur wird die glykosidische Bindung eines der beiden Pyrimidinreste des Cyclobutan-pyrimidindimer-Photoproduktes gespalten, um anschließend die Phosphoesterbindung zwischen den Nukleotiden des Dimers durch AP-endonukleatische Aktivität zu prozessieren. Es entstehen 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphoryl-Enden auf der 3'-Seite der AP-Läsion (Nakabeppu & Sekiguchi, 1982).

Die *Exonuklease III* aus *E. coli* ist ein globuläres, monomeres Enzym, kodiert vom *xth* Gen. Es besitzt ein Molekulargewicht von 28 kDa (Weiss, 1976). Exo III besitzt als einzige Endonuklease keine Glykosylasefunktion. Neben ihrer AP-Endonukleasefunktion besitzt sie eine 3'→5'-Exonuklease- und 3'-Phosphataseaktivität (Richardson et al., 1964; 1964a). Das Enzym spaltet die Desoxyribose-Phosphat-Bindung an oxidierten AP-Läsionen. Es ist auch an einzelsträngiger DNA aktiv und sensitiv gegenüber EDTA (Rogers & Weiss, 1980).

2.4.3 Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)

Das Nukleotid-Exzisions-Reparatur-System dient der Reparatur einer großen Anzahl verschiedener DNA-Läsionen, einschließlich Photoprodukten wie (5-5,6-6)-Cyclobutanpyrimidindimere, (6-4)-Pyrimidin-Pyrimidon-Produkte, DNA-Crosslinks und vieler chemisch-induzierter kanzerogener Läsionen (Cleaver et al., 1995; Sancar, 1994) und den „Bulky Adducts“ (van Houten et al., 1988). Die von NER prozessierten DNA-Schäden reichen von den nur eine geringe Änderung in der helikalen Struktur der DNA verursachenden Läsionen (z.B. Dimere) bis zu stark Helix-verändernden und destabilisierenden Läsionen (z.B. (6-4) Photoprodukte) (Mitchell & Nairn, 1989).

Das uvrABC-System bewirkt die Nukleotidexzision in *E. coli*, während beim Mensch 16 Enzyme, u.a. der aus mehreren Untereinheiten aufgebaute Transkriptionsfaktor TFIIH, beteiligt sind. Der Ausfall der Nukleotidexzisionsreparatur beim Mensch verursacht z.B. die Krankheit *Xeroderma pigmentosum*. (Friedberg, 1985).

Die Enzyme der Nukleotidexzision wirken in einem Komplex. Sie entfernen die Läsion durch beidseitigen Einschnitt und Entfernung eines Oligonukleotids aus dem DNA-Strang (12-13 bp bei *E. coli* und 25-30 bp beim Säuger). Anschließend wird die Lücke durch DNA-Polymerase und Ligase wieder aufgefüllt und geschlossen. An der Reparatursynthese sind PCNA (proliferating-cell nuclear antigen) und die Polymerasen Pol δ und Pol ϵ beteiligt, die an Enden von DNA binden, um Reparatursynthese zu initiieren.

In aktiven Bereichen der DNA, d.h. in aktiv transkribierten Genen, findet eine bevorzugte Reparatur geschädigter DNA statt, die sogenannte transkriptionsgekoppelte Reparatur.

2.5 Biologische Konsequenzen oxidativer DNA-Schäden

Für die Krebsentstehung sind nach heutigen Vorstellungen Mutationen in bestimmten Genen somatischer Zellen (Tumorsuppressorgenen, Protoonkogenen), die ihrerseits durch DNA-Schäden z.B. als Folge der Einwirkung reaktiver Sauerstoffspezies auf DNA, verursacht werden, maßgeblich (Ames, 1983, Cerutti, 1985, Tyrrell et al., 1987, Tyrrell et al., 1990, Moan & Peak, 1989, Wells & Han, 1984, Jones et al., 1987). Die Schädigung der DNA durch reaktive Sauerstoffspezies wird für Alterung, Arthritis und Arteriosklerose verantwortlich gemacht (Marx, 1987). „Oxidativer Stress“ kann bei Entzündungsprozessen, Enzymdefekten, Vitaminmangel, Strahlenbelastung und der Einwirkung von Xenobiotika auftreten (Sies, 1986).

Die Akkumulation von 8-oxoG in durch oxidative Agentien induzierten Tumoren wurde beschrieben (Wang et al., 1995; Ogawa et al., 1995). Reaktive Sauerstoffspezies tragen durch Entstehung von DNA-Schäden und Mutationen zur *Initiation* bei, besitzen aber auch eine *tumorpromovierende* Wirkung. Auf die durch DNA-Modifikationen entstehenden Mutationen wurde bereits in Kapitel 2.2 eingegangen.

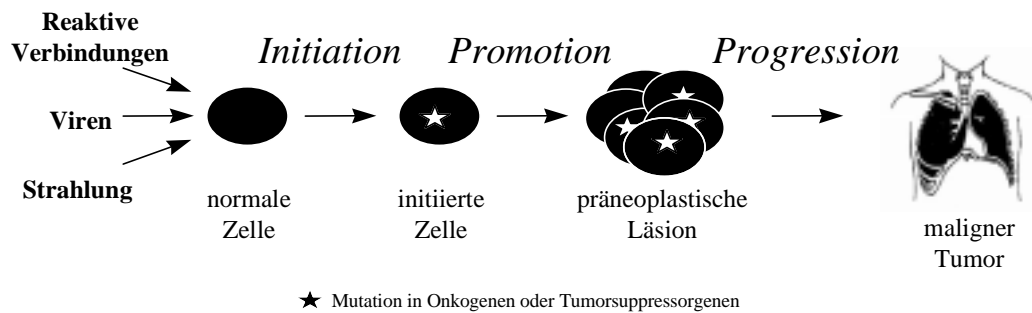


Abb. 2.8 Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese (modifiziert nach **Neumann, 1992** und **Loft & Poulsen, 1996**)

Bei der *Initiation* wird die Zelle durch eine oder mehrere Mutationen als Folge von DNA-Schäden, die durch chemisch-biologische oder physikalische Prozesse entstehen, für weitere Mutationen prädisponiert. Die Zellen weisen keine neoplastischen Charakteristika auf. Insbesondere die Mutation von Genen, die für die Kontrolle der Proliferation entscheidend sind - Tumorsuppressorgene und Protoonkogene - spielt eine wichtige Rolle bei der Initiation. Die Aktivierung von Onkogenen (*Ha-ras* und *K-ras*) durch 8-oxoG in Säugerzellen wurde beobachtet (**Shibutani et al., 1991; Higinbotham et al., 1992; Kamiya et al., 1992; Cheng et al., 1992**). Bei der *Tumorpromotion* wird die Proliferationsrate initiiert Zellen erhöht. In der letzten Phase, der *Progression*, findet der Übergang zum malignen Tumor statt.

2.5.1 Das Tumorsuppressorgen p53

Das Tumorsuppressorgen p53 wird auch als „Guardian of the genome“ bezeichnet (**Lane, 1992**). Defekte im p53-Gen, Mutationen oder viral bedingte Inaktivierungen (z.B. durch das SV40-, Hepatitis B- und HPV-Virus), sind in somatischen Zellen häufig und kommen bei bis zu 50% aller menschlicher Krebserkrankungen, 70% aller Kolonkarzinomen, 30-50% der Mammakarzinome und nahezu allen kleinzelligen Bronchialkarzinomen vor (**Bennet et al., 1993; Bornkessel, 1995**). In menschlichen Tumoren der Haut (Plattenepithelkarzinomen (SCC), Basalzellkarzinomen (BCC) und aktinischen Keratosen) treten Mutationen im *ras* Onkogen und im p53 Tumorsuppressorgen frühzeitig auf (**Ananthaswamy & Perceall, 1990; Brash et al., 1991; Ziegler et al., 1993; Rady et al., 1992; Perceall et al., 1991; Moles et al., 1993; Nataray et al., 1995; Li et al., 1995; Boukamp et al., 1995**). Zu den häufigsten Mutationen im p53-Gen bei menschlichen Tumoren, insbesondere Bronchialkarzinom, gehören GC→TA Transversionen (**Hollstein et al., 1991; Harris & Hollstein, 1993**), die charakteristisch für die Basenmodifikation 8-oxoG sind (**Shibutani et al., 1991**). Keimbahnmutationen des p53-Gens kommen ausgesprochen selten vor. Die betroffenen Patienten erkranken an dem autosomal-dominant vererbten *Li-Fraumeni-Syndrom*, das durch die frühzeitige Entwicklung von Mammakarzinomen und anderen Tumoren gekennzeichnet ist. Mäuse mit Defekten im p53-Gen („p53-knock-out-Mäuse“) weisen ebenso eine frühe Tumorentwicklung auf (**Donehower et al., 1992**). Einige p53-Mutanten besitzen eine dominant-negative Wirkung auf wildtyp-p53.

Das nukleäre Phosphoprotein p53 besteht aus 393 Aminosäuren. Die relative Molekülmasse beträgt etwa 53 kDA. Das p53-Gen ist auf Chromosom 17p13 lokalisiert.

Das p53-Protein nimmt in der Zelle verschiedene Aufgaben wahr. Es erkennt DNA-Schäden in Gensequenzen und bindet an diese. Um unkontrollierte Zellteilungen zu verhindern, kann p53 die Zellteilung in der G1-Phase des Zellzyklus anhalten (**Kuerbitz et al., 1992**), wahrscheinlich um der Zelle die Reparatur geschädigter DNA vor der Zellteilung zu ermöglichen, und den programmierten Zelltod (Apoptose) -abhängig von Art und Ausmaß des DNA-Schadens, Gewebetyp und physiologischen Bedingungen- einleiten (**Duke et al., 1997; Hartwell & Kastan, 1994; Haffner & Oren, 1995; Wertz & Hanley, 1996**). p53 wird daher auch als „stress-responsive gene“ bezeichnet. Die Apoptose und die Arretierung des Zellzyklus können jedoch auch p53-unabhängig auftreten. Es liegen Hinweise auf die Beteiligung von p53 bei der DNA-Reparatur, insbesondere der Nukleotidexzisionsreparatur vor. Die Rolle von p53 bei der DNA-Basenexzisionsreparatur ist aber bisher nicht erforscht.

Das Protein p53 wird in sich teilenden Zellen sehr schwach exprimiert und ist analytisch nicht detektierbar. Im Gegensatz zum intakten (wild-typ) Protein, dessen Halbwertszeit nur 5 bis 20 Minuten beträgt, ist das mutierte Protein wesentlich stabiler (**Bornkessel, 1995**). **Maltzman & Czyzyck (1984)** zeigten als erste, daß die Halbwertszeit des p53 Proteins nach Bestrahlung mit UV-Licht zunimmt. Durch posttranslationale Stabilisierung (**Maltzman & Czyzyck, 1984; Berg et al., 1996**) kommt es zur Akkumulation des p53-Proteins (**Healy et al., 1994; Hall et al., 1993; Campbell et al., 1993**). Von mehreren Autoren wurde gezeigt, daß p53 durch eine Reihe verschiedener DNA-schädigender Agentien induzierbar ist (**El-Deiry et al., 1993; Harper et al., 1993; Xiong et al., 1993; Serrano et al., 1993; Kastan et al., 1991; Kuerbitz et al., 1992**), wie z.B. ultraviolette Strahlung (**Liu & Pelling, 1995**), Methylmethansulfonat (MMS) (**Zhan et al., 1993**) und Doppelstrangbruch-induzierende Agentien (**Fritsche et al., 1993**). p53 soll auch durch oxidativen Streß induzierbar sein (**Kinscherf et al., 1998**) und der Redoxstatus der Zelle soll für die Aktivierung von p53-Protein eine Rolle spielen (**Hainaut & Milner, 1993; Cerrutti et al., 1993; Fornace, 1993**).

Abb. 2.8 zeigt schematisch die Wirkungen von p53. Das wt (wild-typ)-p53-Protein vermag an DNA zu binden und wirkt als Transkriptionsfaktor. Die Aktivierung der Sequenz-spezifischen DNA-Bindung erfolgt durch DNA-Stücke, die durch Einzelstrangbrüche (SSB) entstehen (**Jayaraman & Prives, 1995**). Die von p53 aktivierten Gene BAX/BCL2 beeinflussen maßgeblich die Apoptose. p53 bedingt die Expression des Proteins GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage-inducible Protein 45) und p21 (WAF1, CIP1, SDI1) (**El-Deiry et al., 1993; Harper et al., 1993; Xiong et al., 1993; Serrano et al., 1993; Liu & Pelling, 1995**). p21 bewirkt das Anhalten des Zellzyklus durch Inhibierung der Komplexe aus Cyclinen und CdK (Cyclin-dependent kinases) (**Hunter, 1993; Xiong et al., 1993; Waldman et al., 1995**), die für das Fortschreiten des Zellzyklus durch Phosphorylierung von RB von Bedeutung sind. Das durch p53 induzierte Protein MDM2 stellt einen endogenen Inhibitor der Funktion von p53 dar (**Wu et al., 1993; Wu & Levine 1997; Chen et al., 1995, 1996; Perry et al., 1993**).

und ist für die Degradation und damit die Regulation des p53-Proteins verantwortlich (**Lane & Hall, 1997; Kubbutat et al., 1997; Haupt et al., 1997**).

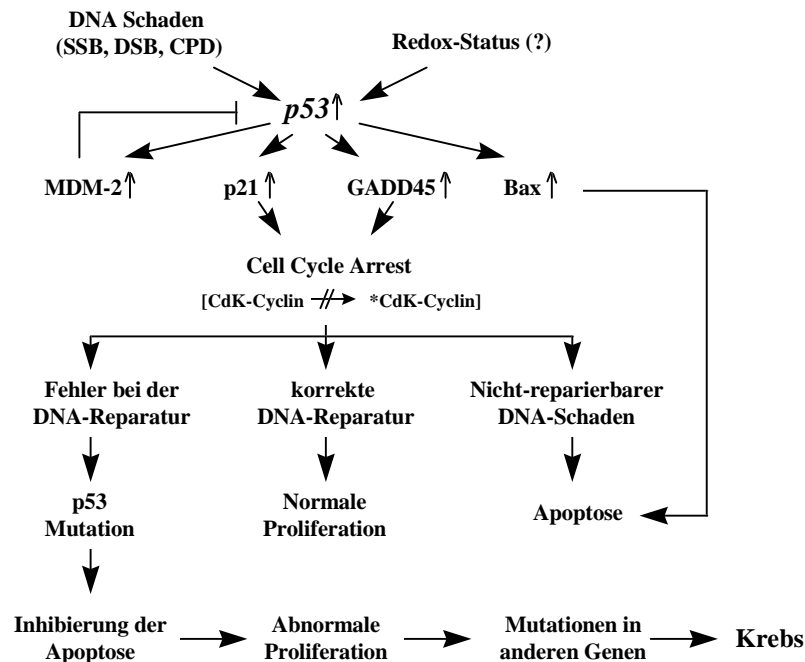


Abb. 2.9 Schematische Darstellung einiger zellulärer und molekularer Ereignisse in der Photokarzinogenese in Zusammenhang mit p53 (modifiziert nach **Black et al., 1997** und **Hartwell & Kastan, 1994**).

Eine Reihe von Ergebnissen zeigen, daß p53 nicht nur durch Arretierung des Zellzyklus eine ungestörte Reparatur von DNA-Schäden ermöglicht (siehe **Abb. 2.9**), sondern direkt die Reparaturprozesse beeinflussen kann. In der Literatur wird die Rolle von p53 bei der Nukleotidexzisionsreparatur beschrieben. So wird von einer reduzierten Reparatur UV-induzierter Cyclobutanpyrimidindimere in p53-defizienten *Li-Fraumeni* Syndrom-Zellen berichtet (**Ford et al., 1995; Wang et al., 1995a; McKay et al., 1997**). Radioimmunologische Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* an transgener Haut von Mäusen mit mutiertem p53 (m-p53) zeigen eine reduzierte Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden, während die Apoptose jedoch nicht beeinträchtigt ist (**Li et al., 1996**). Die Induktion von p53 verringert die UV-induzierte Mutagenität (**Yuan et al., 1995**). Die globale DNA-Reparatur UV-induzierter Cyclobutanpyrimidindimere ist in p53-mutierten Zellen und Zellen mit HPV-Viren inaktiviertem p53 im Vergleich zu m/wt-p53 Zellen reduziert (**Smith et al., 1995; Ford et al., 1997, 1998**). Die transkriptionsgekoppelte Reparatur ist, wie bei *Xeroderma pigmentosum C* und *E* Zellen, nicht betroffen (**Ford & Hanawalt, 1995, 1997, 1998**). Die Regulation des p48-Gens, welches für die Bindung an UV-geschädigte DNA bei der globalen DNA-Reparatur verantwortlich ist, erfolgt durch p53 (**Hwang et al., 1999**). p21-defiziente Zellen besitzen einen Defekt bei der Reparatur UV- oder Cisplatin-geschädigter DNA, die durch Komplementierung mit intaktem p21 wieder gesteigert werden konnte (**McDonald et**

al., 1996). Durch Induktion von p21 konnte die zelluläre Reparaturkapazität von UV-geschädigten Reporterplasmiden gesteigert werden (Sheikh et al., 1997). GADD45 soll *in vitro* die DNA-Exzisions-Reparatur stimulieren (Smith et al., 1994) bzw. dessen Inaktivierung eine verringerte Reparatur bewirken (Smith et al., 1996). Diese Ergebnisse wurden jedoch von Kazantsev & Sancar (1995) und Kearsley et al. (1995) widerlegt.

p53 Protein bindet an zahlreiche Proteine, von denen einige eine Rolle bei der DNA-Reparatur und Transkription spielen (Sanchez & Elledge, 1995), wie z.B. ERCC/XPB, XPD und CSA, die Proteine der Nukleotidexzisionsreparatur darstellen (Wang et al., 1994, 1995a; Xiao et al., 1994) und bei der präferentiellen Reparatur transkribierter Gene bedeutsam sind (Hanawalt, 1994). p53 bindet an den Promotor von PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), einem Protein, daß für DNA-Replikation und -Reparatur benötigt wird. Auch GADD45 bindet an PCNA (Morris et al., 1996). Die Interaktion von p21 mit PCNA (Flores-Rozas et al., 1994) inhibiert dessen Funktion bei DNA-Replikation, nicht aber bei der Nukleotidexzisionsreparatur (Pan et al., 1995; Li et al., 1994; Shivij et al., 1994). Eine intrinsische 3'-5' Exonuklease-Aktivität des p53, die möglicherweise bei Prozessen wie Vermeidung oder Prozessierung von DNA-Schäden während DNA-Reparatur und -Replikation beteiligt ist, wird angenommen (Deppert et al., 1998). Die Bindung von p53 an das an der DNA-Mismatch-Reparatur beteiligte Protein MSH2 *in vitro* wurde beschrieben (Scherer et al., 1996). Die Induktion der O⁶-Alkylguanin-DNA-alkyltransferase und der O⁶-Methylguanin-DNA-methyltransferase ist p53-abhängig (Grombacher et al., 1998; Rafferty et al., 1996; Harris et al., 1996). Ein weiterer Hinweis auf die direkte Beteiligung von p53 bei DNA-Reparaturprozessen ist der Befund, daß p53 an die Enden einzelsträngiger DNA bindet und DNA-Renaturierung und Strangtransfer katalysiert (Oberosler et al., 1993; Bakalkin et al., 1994).

Andererseits wird von anderen Autoren gezeigt, daß die DNA-Reparatur UV-induzierter Schäden in p53-knockout-Mäusen und normalen embryonischen Fibroblasten (Ishizaki et al., 1994) und p53-defekten ES-Zellen (Prost et al., 1998) mit der gleichen Geschwindigkeit verläuft. Die UV-induzierte Reparatur soll in p53-überproduzierenden Zellen im Vergleich zu SAOS2-Zellen mit gleicher Geschwindigkeit verlaufen (Yagi et al., 1998)

Die Bedeutung bei der Prozessierung oxidativer DNA-Schäden durch Basenexzisionsreparatur ist noch unklar.

2.6 Zielsetzung

Gegenstand der Arbeit ist die Untersuchung einiger Faktoren, die die Bildung und Reparatur oxidativer DNA-Schäden beeinflussen können. Dazu gehören die Arzneistoffe Ofloxacin und Norfloxacin, die Alkoxy-Radikale generierende Verbindung BCBT ([4-[(*tert*-Butyldioxy)carbonyl]benzyl]-triethylammoniumchlorid), das Antioxidans Glutathion, Selenverbindungen und das Gen p53.

Als Beispiele für die exogene Bildung oxidativer DNA-Schäden wurden die Gyrasehemmer Ofloxacin und Norfloxacin nach Bestrahlung mit UV-360 untersucht. Unter Verwendung spezifischer DNA-Reparaturenukleasen als Sonden sollten DNA-Modifikationen an zellfreier und zellulärer DNA mit Hilfe eines Relaxationsassays und einer modifizierten Technik der Alkalischen Elution untersucht werden. Dazu sollten durch die Bestimmung von DNA-Strangbrüchen, AP-Läsionen und Endonuklease-sensitiven Basenmodifikationen zelluläre Schadensprofile gemessen werden. Der Vergleich mit Schadensprofilen, die durch bekannte DNA-Schädigungsmechanismen erstellt wurden, sollte Aussagen über den Schadensmechanismus der Verbindungen ermöglichen.

Die Bildung oxidativer DNA-Schäden durch Alkoxy-Radikale sollte mit Hilfe der Verbindung BCBT an zellfreier DNA untersucht werden. Die Bestimmung verschiedener Basenmodifikationen und Erstellung des DNA-Schadensprofils sollte Aufschluß über die DNA-Schädigung durch Alkoxy-Radikale liefern. Mittels HPLC-Analyse sollten weiterhin die Art von durch Alkoxy-Radikale entstandenen Basenmodifikationen identifiziert werden. Die Ermittlung von Mutationsrate und Identifizierung von durch Alkoxy-Radikalen bedingten Mutationen soll Aussagen über deren mutagenes Potential ermöglichen.

Die Untersuchungen zu dem endogenen Antioxidans Glutathion (GSH) sollten durch Vorbehandlung mit BSO, das die Depletion des Glutathions bedingt, erfolgen. Mit Hilfe der Alkalischen Elution sollten der Einfluß auf den endogen in Zellen vorhandenen Steady-State-Spiegel und auf die durch verschiedene Schädigungen induzierte DNA-Modifikationen untersucht werden.

Der Einfluß von den Selenverbindungen Natriumselenit und Ebselen auf Steady-State-Spiegel, Glutathion-Gehalt und Suszeptibilität der Zellen gegenüber verschiedenen exogenen Agentien sollte in Säugerzellkulturen ermittelt werden. Die Wirkung der Selenverbindungen auf die Genotoxizität verschiedener Agentien sollte mit Hilfe der Bestimmung von Mikrokernraten bestimmt werden.

Die Beeinflussung der DNA-Reparatur oxidativer DNA-Schäden durch das Tumorsuppressorgen p53 sollte mit Hilfe von Säugerzellen erfolgen. Der Vergleich von Steady-State-Spiegel, dem Ausmaß und der Reparaturgeschwindigkeit induzierter oxidativer DNA-Schäden durch exogene Agentien sollte die Beteiligung des Gens p53 bei der Basenexzisionsreparatur untersuchen.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Geräte

Autoklav	Tecnoclav 50 (Tecnorama, Italien)
Brutschrank (Bakterienkultur)	Heraeus B 6200 (Heraeus, Hanau)
Brutschrank (Zellkultur)	Heraeus B 5060 EK/CO ₂ (Heraeus, Hanau)
Computer (HPLC)	Power Macintosh 8200/120
Coulter Counter	Modell N Industry (Coulter Electronics, Luton, Großbritannien)
DNA-Gel-Vermessung	BioRad Gel Doc 1000 (BioRad, Hercules, CA, USA)
DNA-Gel-Auswertung	Molecular Analyst (V 2.1, 1995, BioRad, Hercules, CA, USA)
Fluoreszenz-Mikroskop	(Zeiss, Oberkochen) Filter 46 63 01-9901
Fluoreszenzphotometer	Kontron FM 25 (Kontron AG, Zürich, Schweiz)
Fraktionssammler	2070 Ultrorac II (Pharmacia/LKB, Uppsala, Schweden)
Gefrierschrank (-70°C)	Colora UF 85-300S (Colora, Lorch)
Gelapparatur für DNA-Agarosegele	Mechanikwerkstatt, Institut für Toxikologie, Universität Würzburg
Gelapparatur für SDS-Proteingele	(BioRad, Hercules, CA, USA)
Halogenlampe, 1000 Watt	Osram SLG 1000-Studio (Osram, München)
HPLC-Anlage	mit Flecta Halogen Mini-Brenner, 1000 Watt (Reflekta)
HPLC-Auswerteprogramm	Kontron Analytic (Kontron AG, Zürich, Schweiz)
	Power Chrom Software V2.0.2 (AD Instruments, Castle Hill, Australien) Power Chrom Interface und Power Macintosh Computer
HPLC-Mischkammer	M 800 (Kontron AG, Zürich, Schweiz)
HPLC-Probenaufgabesystem	Rheodyne 7125 (Cotati, Kalifornien, USA)
HPLC-Pumpen	HPLC Compact Pump, Modell 2250 (Bischoff, Leonberg)
HPLC-Säulen	SC-04 (125 x 4.0 mm), Prontosil 120-3, ODSAQ 3.0 µM Korngröße (Bischoff Leonberg)
HPLC-Detektoren	UV-Detektor: Kontron UV-Spektrophotometer Uvikon 730 LC (Kontron AG, Zürich, Schweiz) Elektrochemischer Detektor: Coulochem II mit Meßzelle Model 5011 High Sensitivity Analytical Cell (ESA, Chelmsford, MA, USA)
HPLC-Vorsäule	PC ODS-Hypersil 0446 1805, 5 µm (Bischoff, Leonberg)
Kühlzentrifuge	Sorvall Superspeed RC2-B (Sorvall, Conn. USA)
Kryobehälter (Zellen)	Flüssigstickstoffcontainer TW 750 RS (Taylor Wharton, Theodore, AL, USA)
Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen

Mehrkanalpumpen	Ismatec IPN 16 und IPN 24 (Ismatec, Zürich, Schweiz)
pH-Meter	PHM 62 (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark), WTW pH530 (wiss. techn. Werkstätten, Weilheim)
Pipetten	Pipetman P 20, P 200, P 1000, P 5000 (Gilson, Frankreich)
Plattengießgerät mit Doppel- Peristaltikpumpe	Tecnomet (Integra Biosciences, Fernwald)
Quecksilberdampf-Lampe für Fluoreszenzmikroskop	HBO Quecksilberdampf Kurzbogenlampe, (Osram, München)
Rotoren für Kühlzentrifuge	SS-34, GS-3)Sorvall, Newton, Conn. USA)
Schüttelapparatur	GFL No. 3015 (GFL, Burgwedel)
Schüttelinkubator (Bakterien)	Schüttelmaschine Modell 25A digi (Edmund Bühler, Bodelshausen)
Semidry-Blotgerät	Trans-Blot-SD (Biorad, München)
Spannungsquellen (Elektrophorese)	Consort E425 (Consort pvba, Turnhout, Belgien)
Sterile Werkbank	Laminar Air Flow, Gelaire BH 26 (Flow Laboratories GmbH, Meckenheim)
Tropfentrichter (Cytospin)	Shandon Cytoclip (Shandon, Pittsburg, USA)
Ultraschallbad	RK 100 (Bandelin electronic, Berlin)
Ultraschalldesintegrator	Sonoplus Homogenisator HD 70 mit Sonotrode MS 73 und (Sonifier) HF-Generator GM 70 (70 W, 20 kHz) (Bachofer, Reutlingen)
UV-B-Lampe	Philips TL20W/12 RS (Philips Licht, Hamburg), in Fassung Regiolux ILF-k (Regiolux, Königsberg)
UV-C (360 nm)	Osram HQV, 360 nm, 125 W
UV/VIS-Dosimeter	Luxmeter 110 mit geeichtem GaP-Photoelement (PRC Krochmann, Berlin)
UV/VIS-Photometer	LKB Biochrom Ultrospec 2 (Pharmacia/LKB, Uppsala, Schweden); Hitachi U-2000 (Hitachi Co. Japan)
Zentrifugen	Hettich Mikro Rapid/K, Hettich Universal/K2S (Hettich, Tuttlingen), Heraeus Sepatech Biofuge 28 RS (Heraeus, Hanau), Ultrazentrifuge Optima LP-80K (Beckmann Instruments, Palo Alto, CA, USA)
Zytozentrifuge	Cytospin 3 (Shandon, Astmoor, England)

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

Blottingpapier (Westernblot)	Schleicher & Schuell, Dassel
Deckgläschen	Knittel Gläser
Dialyseschläuche	Spectra Por (Spectrum Medical Ind., Los Angeles, CD, USA)
Filterpapier und Faltenfilter	Schleicher & Schuell, Dassel
Filter (Alkalische Elution)	Polycarbonat-Membran, 2 µm, Ø: 25 mm (Nucleopore, Cambridge, USA)
Filterhalter (Alkalische Elution)	Swinnex SX 2500 (Millipore, Holstein, Frankreich)
Filterpapier und Faltenfilter	(Schleicher & Schüll, Dassel)

Fluoreszenzküvetten	Elkay Ultra-Vu (Elkay Products, Inc., Shrewsbury MA, USA); Hellma 105251-QS, Schichtdicke 3 mm (Hellma GmbH, Mühlheim)
Kryoröhrchen	Nunc Kryo, 1,5 ml (A/S Nunc, Roskilde, Dänemark)
Lochfilter	Shandon Filter Cards (Schleicher & Schüll, Dassel)
Membranfilter für HPLC-Puffer	HA-Filter, 0.45 µm (Millipore, Holstein, Frankreich)
Objektträger	Labcraft, DFF 76x26 mm (Richardson Supply Comp. Ltd., London, England)
Plastikmaterialien	(Eppendorf, Hamburg und Greiner, Nürtingen)
Spritzen (Alkalische Elution)	20cc-Syringe, Luerlok (Becton Dickinson & Co., Rutherford, USA)
Sterilfilter	Porengröße 0.22 µm (Schleicher & Schuell, Dassel)
Transfermembran (Westernblot)	Nitrozellulose, Optitran, NC (Schleicher & Schuell, Dassel)
Whatmanpapier (Westernblot)	(Schleicher & Schuell, Dassel)
Zellkulturflaschen	(Greiner GmbH, Nürtingen)

3.1.3 Chemikalien

Acridinorange, C.I. Nr. 46005	Serva, Heidelberg
Acrylamid/Bisacrylamid	
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Agarose Type I: low EEO	Sigma Chemie, Deisenhofen
Aktivkohle	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat	Serva, Heidelberg
Ampicillin	Serva, Heidelberg
Bacto-Trypton, Bacto-Hefeextrakt	Difco, Detroit, Mich. USA
BCBT	Organische Chemie, Universität Würzburg
Bisbenzimid Trihydrochlorid (Hoechst No. 33258)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Bromphenolblau, Natriumsalz	Serva, Heidelberg
BSA (Bovine Serum Albumine)	Serva, Heidelberg
Buthionin-DL-sulfoximin (BSO)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Coomassie Brilliant Blue G, C.I. Nr. 42655	Sigma Chemie, Deisenhofen
D ₂ O (99.8 % D)	Sigma Chemie, Taufkirchen
Dithioerythritol (DTE)	Serva, Heidelberg
DMSO	Sigma Chemie, Deisenhofen
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Ebselen (2-phenyl-1,2-benzoisoselen azol-3(H)-on)	Sigma Chemie, Deisenhofen
EDTA	Fluka, Buchs, Schweiz

Eindecklösung EDL-2 für Fluoreszenzfärbungen	Linaris, Bettingen
Ellman's Reagenz (5,5'-Dithiobis- (2-nitro-benzoessäure))	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Baker, Deventer, Niederlande
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendinitrilotetraessigsäure	Fluka, Buchs, Schweiz
Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat (Na-EDTA)	Merck, Darmstadt
Färbetabletten, BCIP/NBT-Tabletten (Sigma Fast™)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Geneticin (G418)	Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Glutathion, reduzierte Form (γ -Glu-Cys-Gly)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Glycerin, wasserfrei	Merck, Darmstadt
Glycin	Serva, Heidelberg
Ham's F12-Medium	Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Hefeextrakt	Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe
8-Hydroxyguanin (2-Amino-6,8-dihydroxypurin)	Aldrich, Steinheim
Igepal CA-630 [<i>tert</i> -Octylphenoxy poly(oxythylene) ethanol]	Sigma Chemie, Deisenhofen
Isobutanol	Merck, Darmstadt
Isoton-II-Lösung	Coulter, Krefeld
Kälberserum, fötal (FCS)	Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Sigma Chemie, Deisenhofen
Kaliumdihydrogenphosphat di-Kaliumhydrogenphosphat, Trihydrat	Merck, Darmstadt
di-Kaliumoxalat, Monohydrat	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid, Hexahydrat	Merck, Darmstadt
Markerproteine Sigma	
SDS-7 Dalton Mark VII-L für SDS-Gelelektrophorese	Sigma Chemie, Deisenhofen
MCBT	Organische Chemie, Universität Würzburg
McCoy's 5A Medium	Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe
MEM-Medium	Sigma Chemie, Deisenhofen
Methanol	Baker, Deventer, Niederlande
Methanol, LiChrosolv	Merck, Darmstadt
NADPH, Tetranatriumsalz, ca. 98%	Boehringer Mannheim
Natriumacetat, Trihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat, Monohydrat	Merck, Darmstadt

Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat, Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumselenit	Sigma Chemie, Deisenhofen
Norfloxacin (1-Ethyl-6-fluoro-1,4- dihydro-4-oxo-7-[1-piperazinyl]-3- chinolincarboxylsäure)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Ofloxacin	Sigma Chemie, Deisenhofen
PEG 3000 (Polyethylenglykol)	Serva, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Polyoxylethylensorbitanmonolaurat (Tween 20)	Sigma Chemie, Deisenhofen
Ponceau S	Sigma Chemie, Deisenhofen
Riboflavin	Sigma Chemie, Deisenhofen
Rinderserumalbumin (BSA) Ro 19-8022	Serva, Heidelberg
[R]-1-[(Chloro-4-oxo-3phenyl- 4H-benzo[a]chinolizin-1-yl-carbonyl)- 2-pyrrolidinmethanol	Fa. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Salzsäure 25%, 37%	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure, 96%	Merck, Darmstadt
Tetraethylammoniumhydroxid (TEAH)	Fluka, Buchs, Schweiz
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
6-Thioguanin (2-Amino-6-mercapto- purin)	Fluka, Buchs, Schweiz
Thymidin	Sigma Chemie, Deisenhofen
Trichloressigsäure	Serva, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Serva, Heidelberg
Trockenmilchpulver	Instant-Magermilchpulver, Neufarm (De-Van-Ge Gesundkost GmbH, Lüneburg)
Trypsin/EDTA-Lösung	Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Trypton (Caseinhydrolysat)	Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe

Die Chemikalien wurden - soweit erhältlich - in p.a.-Qualität verwendet.

BCBT und MCBT wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. W. Adam, Organische Chemie der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

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

3.1.4 Antikörper

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

3.1.5 DNA

- PM2 DNA: DNA des Bakteriophagen PM2, Präparation nach **Salditt et al. (1972)** durch I. Schulz, Mainz
- pSV2-*gpt*-Plasmid: Präparation durch I. Schulz

3.1.6 Enzyme

- Alkalische Phosphatase: EC 3.1.3.1, aus Rinder-Darmschleimhaut (Sigma Chemie, Deisenhofen)
- DNase I: aus Rinder-Bauschspeicheldrüse (Serva, Heidelberg)
- Phosphodiesterase II (Milz-Exonuklease, 3'-Exonuklease, *Spleen Exonuclease*): aus Rinder-Milz (Sigma Chemie, Deisenhofen)
- Phosphodiesterase I (5'-Exonuklease, *Snake venom Exonuclease*): EC 3.1.4.1, aus *Crotalus Atrox* Schlangengift (Sigma Chemie, Deisenhofen)
- Exonuklease III aus *Escherichia coli* BE257/pSGR 3 (Boehringer, Mannheim)
- Endonuklease III (zur Verfügung gestellt von R.P. Cunningham, State University of New York at Albany, Albany N.Y., USA, sowie S. Boiteux, Institute Gustave Roussy, Villejuif, Frankreich)
- Endonuklease IV (J. Levin, B. Demple, Harvard University Cambridge, USA)
- T4-Endonuklease V: aus *E. coli* A32480/DEN V, Präparation nach **Nakabeppu et al. (1982)**, modifiziert durch **Pflaum (1996)** und hergestellt durch M. Pflaum, Mainz
- Fpg-Protein (Formamidopyrimidin-Glycosylase, zur Verfügung gestellt von S. Boiteux, Institute Gustave Roussy, Villejuif, Frankreich) und hergestellt von Will, Mainz
- Proteinase K, lyophilisiert, 27 mAnson U/mg, aus *Tritirachium album* (Roth, Karlsruhe)
- Katalase (CAT) aus Rinderleber, ca. 65000 U/mg Protein, Suspension (Serva, Heidelberg)
- Superoxiddismutase (SOD, EC 1.15.1.1) aus Rinder-Erythrozyten, lyophilisiert, 3000 U/mg (Sigma Chemie, Deisenhofen)

- Glutathion-Reduktase (GR) aus Hefe, 600 U/ml (Boehringer Mannheim)
- Leupeptin, Trifluoroacetat-Salz, Stammlösung aliquotiert bei -20°C gelagert, Sigma Chemie, Deisenhofen
- Antipain, Stammlösung aliquotiert bei -20°C gelagert, Sigma Chemie, Deisenhofen
- Aprotinin, Stammlösung aliquotiert bei -20°C gelagert, Sigma Chemie, Deisenhofen

3.1.7 Zelllinien

- AS 52 (Ovarienzelllinie des Chinesischen Hamsters): erhalten von W.J. Caspary, Laboratory of Environmental Carcinogenesis and Mutagenesis, Research Triangle Park, North Carolina, USA
- Primärkulturen von Fibroblasten von p53 -/- (knockout)-Mäusen (Klon 2) und p53 wildtyp +/+ Mäusen (No.1 und 3): zur Verfügung gestellt von B. Kaina, Institut für Toxikologie der Universität Mainz
- A253 (menschliche Epidermalkarzinomzellen): zur Verfügung gestellt von M. Garmyn, Laboratorium voor Experimentele Geneeskunde en Endocrinologie, Leuven, Niederlande
- A253CW14G Klon 1 und 2: zur Verfügung gestellt von M. Garmyn, Laboratorium voor Experimentele Geneeskunde en Endocrinologie, Leuven, Niederlande
- A253CW16G: zur Verfügung gestellt von M. Garmyn, Laboratorium voor Experimentele Geneeskunde en Endocrinologie, Leuven, Niederlande
- HaCaT: spontan immortalisierte menschliche Keratinozyten-Zelllinie, erhalten von N.E. Fusenig, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg
- HeLa: menschliche Zervixkarzinomzelllinien, erhalten von A. Hartwig (Universität Karlsruhe)

3.1.8 Bakterienstämme

- *Escherichia coli* DT-2 (*gpt*⁻): zur Verfügung gestellt von Eugenia Dogliotti, Istituto Superiore di Sanità, Rom, Italien
- *Escherichia coli* „sure-strain“ (Träger des pSV2-*gpt* Plasmids): zur Verfügung gestellt von William J. Caspary, Cancer Genetics Group, Laboratory of Environmental Carcinogenesis and Mutagenesis, Research Triangle Park, NC, USA

3.1.9 Puffer, Lösungen, Medien

3.1.9.1 Modifizierung der PM2-DNA und des pSV2-*gpt*-Plasmids

Phosphatpuffer PP (I/2) (autoklaviert)	5 mM KH ₂ PO ₄ 50 mM NaCl	pH 7.4
-------------------------------------------	----------------------------------------------------	--------

Phosphatpuffer PP in D ₂ O	5 mM KH ₂ PO ₄ 50 mM NaCl	pD 7.4
---------------------------------------	----------------------------------------------------	--------

Zur Einstellung des pD-Wertes wird mit dem pH-Meter auf den Meßwert 7.0 justiert (Srere et al., 1961).

BE1-Puffer (autoklaviert)	20 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 1 mM Na ₂ -EDTA	pH 7.5
------------------------------	-------------------------------------------------------------	--------

Fällungslösung	125 mM Na-Acetat in EtOH absolut	
----------------	-------------------------------------	--

BCBT-Stammlsg.	in H ₂ O _{dest}	
----------------	-------------------------------------	--

MCBT-Stammlsg.	in H ₂ O _{dest}	
----------------	-------------------------------------	--

Norfloxacin-Stammlsg.	in 0.5 N NaOH-Lösung	
-----------------------	----------------------	--

Ofloxacin-Stammlsg.	in H ₂ O _{dest}	
---------------------	-------------------------------------	--

Riboflavin-Stammlsg.	150 µM in Phosphatpuffer PP	
----------------------	-----------------------------	--

3.1.9.2 Enzyminkubation der PM2-DNA und des pSV2-*gpt*-Plasmids

Ethanol 70%	70% Ethanol (v/v) in H ₂ O _{dest}	
-------------	-------------------------------------------------------	--

BE1(15)-Puffer (autoklaviert)	20 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 1(15) mM Na ₂ -EDTA	pH 7.5
----------------------------------	-----------------------------------------------------------------	--------

BE1/BSA-Puffer (autoklaviert)	20 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 1 mM Na ₂ -EDTA 0.1 g/l BSA	pH 7.5
----------------------------------	----------------------------------------------------------------------------	--------

BE15/BSA-Puffer modifiziert (autoklaviert)	20 mM Tris/HCl 75 mM KCl 15 mM Na ₂ -EDTA 0.1 g/l BSA	pH 7.5
TC-Puffer (autoklaviert)	50 mM Tris/HCl 25 mM CaCl ₂ 0.1 g/l BSA	pH 8.0
Stoppuffer	40 mM Tris/HCl 5 mM Na-Acetat 20 mM EDTA 0.05% Bromphenolblau 70% Glycerin 4% SDS	pH 7.8

3.1.9.3 Agarosegelelektrophorese der PM2-DNA und des pSV2-gpt-Plasmids

PM2-Puffer (10fach)	400 mM Tris/HCl 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA	pH 7.8
Der pH-Wert wird mit 2N H ₂ SO ₄ eingestellt.		
Ethidiumbromid-Stammlsg.	1 g/l H ₂ O _{dest}	

3.1.9.4 Plasmidtransformation

3.1.9.4.1 Präparation kompetenter Bakterien (*E. coli* DT-2)

LB-Medium (Luria-Bertani) (autoklaviert)	10 g Bacto-Trypton (Pepton) 5 g Bacto-Hefeextrakt 10 g NaCl mit H ₂ O _{dest} ad 1000 ml wird am selben Tag autoklaviert.	pH 7.0
TSB (Transformationspuffer) (sterilfiltriert) frisch anzusetzen	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 10 g NaCl 100 g PEG 3000 50 ml DMSO 4.93 g MgSO ₄ · 7 H ₂ O mit H ₂ O _{dest} ad 1000 ml + 15% Glycerin	pH 6.1

3.1.9.4.2 Modifikation des pSV2-gpt Plasmids

Phosphatpuffer PP (autoklaviert)	5 mM Kaliumphosphat 50 mM NaCl	pH 7.4
Fällungslösung	125 mM Na-Acetat in EtOH absolut	
TE-Puffer (autoklaviert)	10 mM Tris/HCl 1 mM Na ₂ -EDTA	pH 8.0

3.1.9.4.3 Transformation

TSB (Transformationspuffer) (sterilfiltriert) frisch anzusetzen	10 g Bacto-Trypton 5 g Bacto-Hefeextrakt 10 g NaCl 100 g PEG 3000 50 ml DMSO 4.93 g MgSO ₄ · 7 H ₂ O mit H ₂ O _{dest} ad 1000 ml	pH 6.1
KCM-Puffer (autoklaviert)	500 mM KCl 150 mM CaCl ₂ · 2 H ₂ O 250 mM MgCl ₂ · 6 H ₂ O	
Aqua bidest. (autoklaviert)		

3.1.9.4.4 pSV2-gpt Plasmidisolierung

Bakterienkulturmedium (autoklaviert)	LB-Medium (Luria-Bertani): 10 g Bacto-Trypton (Pepton) pH 7.0 5 g Bacto-Hefeextrakt 10 g NaCl ad 1 l H ₂ O _{dest}
am gleichen Tag autoklaviert; dem abgekühlten Medium zusetzen:	100 µg/ml Ampicillin
Ampicillin-Stammlsg. (sterilfiltrieren, Lagerung: -20°C, lichtgeschützt)	100 mg/ml Na-Ampicillin in H ₂ O _{dest}

3.1.9.4.5 Plattenmedien

LB-Plattenmedium (autoklaviert)	10 g Bacto-Trypton (Pepton) 5 g Bacto-Hefeextrakt 10 g NaCl 15 g Bacto Agar mit H ₂ O _{dest} ad 1000 ml wird am selben Tag autoklaviert.	pH 7.0
------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------

M9 _{Amp} -Plattenmedium (minimal salt-Medium zur Bestimmung der Transformationsrate)	15 g Bacto Agar 0.1 mM CaCl ₂ (2 ml einer 0.1 M Lösung) mit H ₂ O _{dest} ad 900 ml autoklavieren.	pH 7.0
-----------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------

Nach Abkühlung auf ca. 50°C werden folgende Lösungen zugegeben:

- 50 ml M9-Salze (20x, autoklaviert)
- 2 ml MgSO₄ · 7 H₂O (1 M, autoklaviert)
- 15 ml Bacto-Trypton (10 mg/ml,
sterilfiltriert)
- 4 ml Thiamin (10 mg/ml, sterilfiltriert)
- 10 ml Glucose (20 Gew.%, autoklaviert)
- 2 ml Ampicillin (25 mg/ml, sterilfiltriert,
= 100 µg/ml Amp)

M9 _{Amp/6Tg} -Plattenmedium (Selektionsmedium zur Bestimmung der Mutationsrate 6-Thioguanin-resistenter Bakterien)	15 g Bacto Agar 0.1 mM CaCl ₂ (2 ml einer 0.1 M Lösung) mit H ₂ O _{dest} ad 900 ml autoklavieren.	pH 7.0
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------

Nach Abkühlung auf ca. 50°C werden folgende Lösungen zugegeben:

- 50 ml M9-Salze (20x, autoklaviert)
- 2 ml MgSO₄ · 7 H₂O (1 M, autoklaviert)
- 15 ml Bacto-Trypton (10 mg/ml,
sterilfiltriert)
- 4 ml Thiamin (10 mg/ml, sterilfiltriert)
- 10 ml Glucose (20 Gew.%, autoklaviert)
- 2 ml Ampicillin (25 mg/ml, sterilfiltriert)
- 2 ml 6-Thioguanin (10 mg/ml in 0.1 N
NaOH, sterilfiltriert, = 20 µg/ml 6Tg)

M9-Salze (20x) (autoklaviert)	170 g Na ₂ HPO ₄ · H ₂ O 60 g KH ₂ PO ₄ 10 g NaCl 20 g NH ₄ Cl mit H ₂ O _{dest} ad 1000 ml autoklavieren.	pH 7.0
----------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------

Topagar (autoklaviert)	14 g/l Bacto-Agar 5 g/l NaCl	
---------------------------	---------------------------------	--

3.1.9.5 Puffer und Medien für die Zellkultur

PBSCMF (10fach) (autoklaviert)	80 g NaCl 2 g NaCl 11.5 g Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 2 g KH ₂ PO ₄ mit H ₂ O _{dest} ad 1000 ml	
-----------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

PBSCMF (autoklaviert)	10% PBSCMF(10fach) in H ₂ O _{dest}	pH 7.4
--------------------------	-----------------------------------------------------------	--------

Trypsin/EDTA	0.5 g/l Trypsin 0.2 g/l EDTA in modifizierter Puck´s Salzlsg. A	
--------------	-----------------------------------------------------------------------	--

Kulturmedium für HaCaT	Dulbecco´s Modified Eagle Medium 20 ml 200 mM Glutamin 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml)	
------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

Kulturmedium für HeLa	MEM 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml)	
-----------------------	-------------------------------------------------------------------------	--

Kulturmedium für AS 52 (Routinemedium)	Ham´s F12 5% FCS 1% Penicillin/Streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml)	pH 7.4
-------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------	--------

Kulturmedium für A253 und Transfektanten A253CW14G und A253CW16G	Mc Coy´s 5A 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml)	
------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------	--

Kulturmedium für primäre Mausfibroblasten p53 -/- und p53 wt +/+	Dulbecco's Modified Eagle Medium 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin (100 U/ml, 100 µg/ml)
------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------

3.1.9.6 Alkalische Elution und Zelltoxizitätsversuche

3.1.9.6.1 Filterelution der DNA

PBSCMF (10fach) (autoklaviert)	80 g NaCl 2 g NaCl 11.5 g Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 2 g KH ₂ PO ₄ mit H ₂ O _{dest} ad 1000 ml	pH 7.4
BE1(15)-Puffer (autoklaviert)	20 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 1(15) mM EDTA	pH 7.5
BE1/BSA-Puffer (autoklaviert)	20 mM Tris/HCl 100 mM NaCl 1 mM EDTA 0.1 g/l BSA	pH 7.5
BE15/BSA-Puffer modifiziert (autoklaviert)	20 mM Tris/HCl 75 mM KCl 15 mM EDTA 0.1 g/l BSA	pH 7.5
TC-Puffer mit BSA (autoklaviert)	50 mM Tris/HCl 25 mM CaCl ₂ 0.5 g/l BSA	pH 8.0
Lysepuffer	100 mM Glycin 20 mM EDTA 2% SDS	pH 10.0
Lysepuffer/Proteinase K	100 mM Glycin 20 mM EDTA 2% SDS 500 mg/l Proteinase K	pH 10.0
Waschpuffer (autoklaviert)	20 mM EDTA pH-Wert mit 2 N NaOH einstellen	pH 10.0
Elutionspuffer	20 mM H ₄ EDTA Der pH-Wert wird mit TEAH eingestellt.	pH 12.1

3.1.9.6.2 Fluorimetrische Bestimmung der DNA-Menge

DNA-Standard	50 mg/l Kalbsthymus-DNA in BE1-Puffer	
Bisbenzimid Hoechst No. 33258 Stammlsg. Die Stammlsg. wird aliquotiert bei -20°C gelagert.	0.15 mM in H ₂ O _{dest}	
Phosphatpuffer I (autoklaviert)	0.1 M Na ₂ HPO ₄	pH 6.0
Phosphatpuffer II/Bisbenzimid (autoklaviert)	0.1 M Na ₂ HPO ₄ 1% (v/v) Bisbenzimid Hoechst No. 33258-Stammlsg.	pH 7.2

Die Hoechst No. 33258-Stammlsg. wird dem autoklavierten Phosphatpuffer erst unmittelbar vor Gebrauch in einer Braunglasflasche zugesetzt.

3.1.9.7 HPLC-Analytik**3.1.9.7.1 Schädigung der DNA**

DNA-Standard	10 µg/ml PM2 DNA in Phosphatpuffer PP	
Phosphatpuffer PP (I/2) (autoklaviert)	5 mM Kaliumphosphat 50 mM NaCl	pH 7.4
Fällungslösung	125 mM Na-Acetat in EtOH absolut	

3.1.9.7.2 Enzymatische Hydrolyse der DNA

DNA-Verdau	Tris/Mg-Puffer Alkalische Phosphatase (500 mU / 50 µg DNA) DNAse I (10 U/50 µg DNA) Phosphodiesterase II (0.5 mU / 50 µg DNA) Phosphodiesterase I (25 mU / 50 µg DNA)	pH 8.5
------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------

3.1.9.7.3 HPLC-Trennung

HPLC-Laufpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ 5 Vol% Methanol absolut	pH 5.1
Thymidin- Stammlösung	1 nmol/μl	
Guanosin- Stammlösung	1 nmol/μl	
8-OH-dG-Stammlösung	5.0 pmol/μl	

3.1.9.8 Puffer zur enzymatischen Bestimmung von intrazellulärem Glutathion

TCA-Puffer	5 ml 20%iger Trichloressigsäure 40 μl 0.5 M EDTA 2 ml 1N HCl mit H ₂ O _{dest} ad 60 ml	
Phosphat/EDTA-Lösung	3.99 g Na ₂ HPO ₄ 0.43 g NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O 0.59 g Na ₂ -EDTA mit H ₂ O _{dest} ad 250 ml	pH 7.5
NADPH-Lösung	26.6 mg Na ₄ NADPH mit Phosphat/EDTA-Lösung ad 100 ml (2 Wochen bei 4°C haltbar)	
DTNB-Lösung	23.8 mg DTNB mit Phosphat/EDTA-Lösung ad 10 ml (2 Wochen bei 4°C haltbar)	
Glutathion Reduktase-Lösung (GR, 200 U/ml)	(2 Wochen bei 4°C haltbar)	
Glutathion-Standardlösung, 20 mM	30.73 mg reduziertes Glutathion (GSH) mit H ₂ O _{dest} ad 5 ml	

3.1.9.9 Puffer zur Bestimmung von Mikrokernen in AS52-Zellen

Sørensen-Puffer	33 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 34 mM KH ₂ PO ₄	pH 6,8
Acridinorange-Stammlsg. Lagerung: lichtgeschützt bei 4°C	1 mg/ml in H ₂ O _{dest}	

Färbelösung	67,5 ml Sørensen-Puffer 4,5 ml Acridinorange-Stammlösung
PBSCMF (autoklaviert)	8 g NaCl 0,2 g KCl 0,575 g Na ₂ HPO ₄ • 2 H ₂ O 0,2 g KH ₂ PO ₄ mit H ₂ O _{bidest} ad 1000 ml
Bisbenzimid, Nr. 33258 Stammlsg. Lagerung: lichtgeschützt bei 4°C	1 mg/ml in DMSO
Färbelösung	99,5 ml PBSCMF 0,5 ml Bisbenzimid-Stammlösung

3.1.9.10 Immunoblotting

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

Farbreagenz (Proteinbestimmung)	Biorad-Farbstoffkonzentrat
SDS-Auftragepuffer (2x)	100 mM Tris pH 6.8 4% SDS 0.2% Bromphenolblau 20% Glycerin 100 mM DTE
DTE wird unmittelbar vor Gebrauch zugesetzt.	
Protein-Längenstandard, -20°C	Sigma SDS-7 Dalton Mark VII-L für SDS-Gelelektrophorese, gelöst in 1x SDS-Auftragepuffer 3.5 mg/1.5 ml
Tris-Puffer I	1.5 M Tris pH 8.8 Der pH-Wert wird mit 5 M HCl eingestellt.
Tris-Puffer II	1 M Tris pH 6.8 Der pH-Wert wird mit 25% HCl eingestellt.
SDS-Lösung	10% in H ₂ O _{dest}
Ammoniumpersulfat-Lsg.	10% (m/v) in H ₂ O _{dest} Die Lösung ist bei 4°C 7 Tage haltbar.

Kammerpuffer	25 mM Tris 250 mM Glycin 0.1% SDS	pH 8.3
Gelzusammensetzung Trenngel, 12%	2.5 ml H ₂ O _{bidest} 3.0 ml Acrylamid/Bisacrylamid 1.87 ml Tris-Puffer I (1.5 M Tris, pH 8.8) 75 µl SDS, 10% (v/v) 3 µl TEMED 75 µl Ammoniumpersulfat-Lösung 10%	
Trenngel, 15%	1.75 ml H ₂ O _{bidest} 3.75 ml Acrylamid/Bisacrylamid 1.87 ml Tris-Puffer I (1.5 M Tris, pH 8.8) 75 µl SDS, 10% (v/v) 3 µl TEMED 75 µl Ammoniumpersulfat-Lösung 10%	
Sammelgel	1.7 ml H ₂ O _{bidest} 425 µl Acrylamid/Bisacrylamid 315 µl Tris-Puffer II (1 M Tris, pH 6.8) 25 µl SDS, 10% (v/v) 2.5 µl TEMED 25 µl Ammoniumpersulfat-Lösung 10%	

3.1.9.10.2 Färbung von Proteingelen mit Coomassie Brilliant Blue

Färbelösung	500 mg Coomassie Brilliant Blue G 180 ml MeOH/H ₂ O (1:1 v/v) 20 ml Eisessig Die Lösung wird vor Gebrauch filtriert.
Entfärbelösung	180 ml MeOH/H ₂ O (1:1 v/v) 20 ml Eisessig

3.1.9.10.3 Proteinbestimmung

Farbreagenz	Biorad-Farbstoffkonzentrat (Cat.-Nr. 500-0006)
-------------	---------------------------------------------------

3.1.9.10.4 Western-Blotting mit anschließender Antikörperfärbung

Transferpuffer (Tourbin) (autoklaviert)	3.03 g Tris 14.44 g Glycin 20% Methanol mit H ₂ O _{bidest} ad 1000 ml	pH 8.3
TBS-T	1.21 g Tris 4.0 g NaCl mit H ₂ O _{bidest} ad 500 ml nach Einstellen des pH-Wertes zugeben: 0.5 ml Tween 20 (0.1 %)	pH 7.6
Ponceau-S-Färbepuffer	1 g Ponceau S 3% TCA mit H ₂ O _{bidest} ad 500 ml	
Magermilchsuspension	10 % Magermilchpulver in TBST-Puffer	
Lysepuffer für Zellen	150 mM NaCl 50 mM Tris/HCl 5 mM Na ₂ EDTA 1% Igepal 10 µg/ml Leupeptin 10 µg/ml Aprotinin 1 µg/ml Antipain	

3.2 Methoden

3.2.1 DNA-Schadensanalyse *in vitro* an PM2 DNA und am Plasmid pSV2-*gpt*

3.2.1.1 Prinzip des DNA Relaxationsassays

Die DNA des Bakteriophagen PM2 ($1 \cdot 10^4$ bp) liegt in einer superhelikalen Form vor (**Salditt et al., 1972**). Wird in der superhelikalen Struktur der PM2 DNA ein Einzelstrangbruch des Zucker-Phosphat-Grundgerüsts induziert, so relaxiert sich das Molekül durch Übergang in die offene Form. Ein Doppelstrangbruch bewirkt Linearisierung der DNA. Der Assay nutzt aus, daß beide Formen der DNA, die superhelikale und die offene Form, mittels einer Agarosegelelektrophorese aufgrund unterschiedlicher Wanderungsgeschwindigkeiten im elektrischen Feld getrennt und nachfolgend durch Fluoreszenzmessung quantifiziert werden können. Die relaxierte DNA läuft auf dem Gel hinter der kompakteren, superhelikalen Form. Aus dem Verhältnis des durch einen Einzelstrangbruch relaxierten Anteils und des noch in superhelikaler Form vorliegenden Anteils der DNA läßt sich die Zahl der Einzelstrangbrüche bestimmen. Der Assay ist auch mit pSV2-*gpt* DNA durchführbar, die eine Größe von ca. 5200 bp aufweist. Das Prinzip des Relaxationsassays ist in **Abb. 3.1** dargestellt.

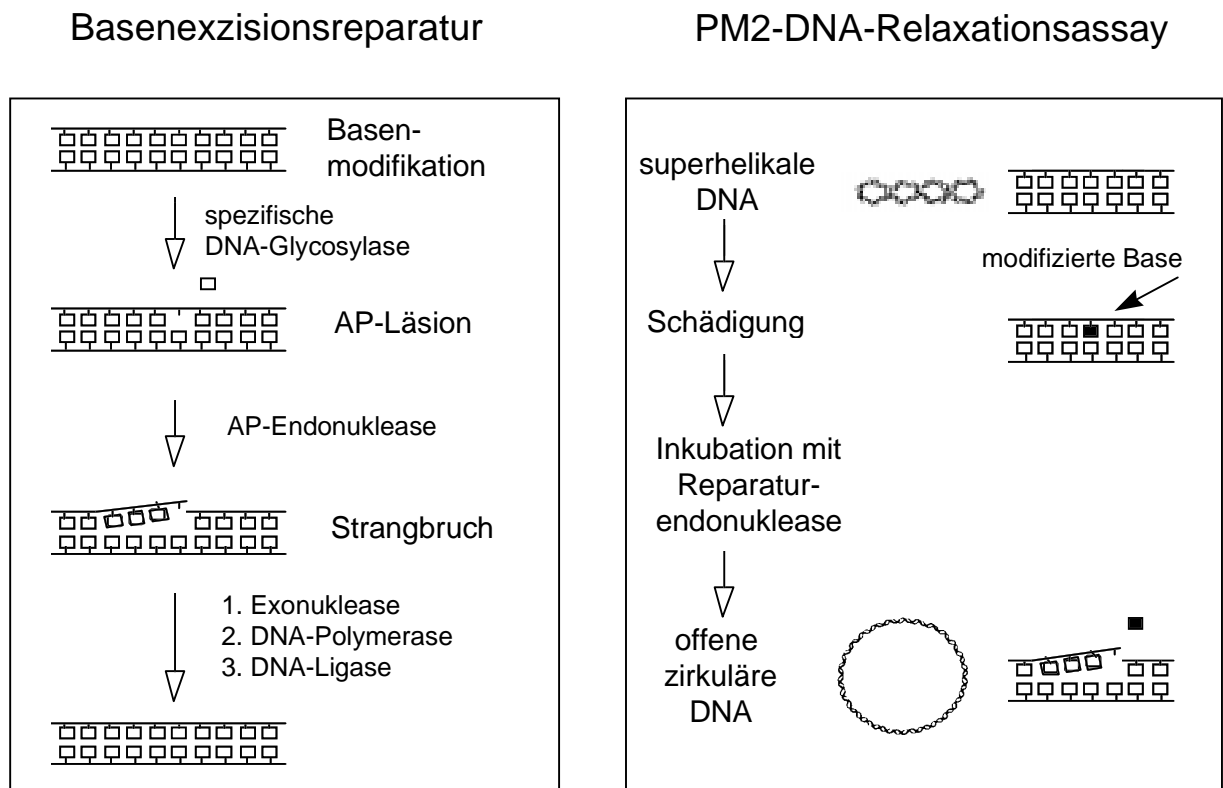


Abb. 3.1 Prinzip des DNA Relaxationsassays und Vergleich mit der Basenexzisionsreparatur

Durch Inkubation der DNA mit bifunktionellen DNA-Reparaturenukleasen werden zunächst durch die Glycosylase-Funktion der Enzyme spezifische Basenmodifikationen entfernt und durch die AP-Endonuklease-Funktion zusätzliche Einzelstrangbrüche erzeugt. Auf diese Weise lassen sich ebenso Endonuklease-sensitive DNA-Modifikationen nachweisen (Epe et al. 1988, 1993d).

Durch Einsatz verschiedener Reparaturenukleasen lassen sich daher Rückschlüsse auf Art und Ausmaß unterschiedlicher DNA-Basenmodifikationen ziehen. Durch verschiedene Reparaturenukleasen erkannte DNA-Modifikationen werden in sog. DNA-Schadensprofilen dargestellt, die zeigen, in welchem Maß verschiedene DNA-Basenmodifikationen durch bestimmte Substanzen gebildet werden. Die charakteristischen Schadensprofile können daher als „Fingerabdruck“ der ultimal mit der DNA reagierenden Spezies angesehen werden.

3.2.1.2 Modifizierungen von PM2 DNA und Plasmid pSV2-gpt

Die Modifizierung der nach Salditt et al. (1972) isolierten superhelikalen PM2-DNA oder des aus *E. coli* „super strain“ gewonnenen Plasmids pSV2-gpt wird in Phosphatpuffer PP (I½) durchgeführt. Die Schädigung erfolgt, wenn nichts anderes angegeben ist, in Eppendorfgefäßen. Die DNA-Konzentration während der Schädigung beträgt 0.01 µg/µl, die benötigte Menge für eine Probe 0.2 µg. Geschädigte oder auch ungeschädigte (Kontroll-)DNA werden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit dem 2.5fachen Volumen Fällungsreagenz versetzt und gemischt. Nach 30 min bei -20°C wird 15 min bei 4°C mit 12000 g zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und das Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Flüssigkeitsreste werden mit einem Papiertuch aufgesaugt. Anschließend wird die DNA in einer Konzentration von 0.2 µg/20 µl mit Puffer wieder in Lösung gebracht. Die Art des Puffers richtet sich nach der für die Detektion der DNA-Modifikationen vorgesehenen Reparaturenuklease und ist **Tabelle 3.1** zu entnehmen. Auf die gleiche Weise wird die als Kontrolle dienende ungeschädigte DNA behandelt. Bis zur Messung kann die DNA in Lösung bei -70°C aufbewahrt werden.

Tab. 3.1 Arbeitspuffer verschiedener Reparaturenukleasen

Reparaturenuklease	Puffer
Fpg-Protein	BE1/BSA-Puffer
Exonuklease III	TC/BSA-Puffer
Endonuklease III	BE1/BSA-Puffer
T4 Endonuklease V	BE15/BSA-Puffer, modifiziert

3.2.1.2.1 Schädigung von PM2 DNA und Plasmid pSV2-*gpt* durch NDPO₂ in D₂O-Puffer

Die Modifizierung mit 0-40 mM NDPO₂ wird in Phosphatpuffer PP in D₂O im Wasserbad bei 37°C für 120 min unter Lichtausschluß durchgeführt. Nach der Schädigung wird zentrifugiert und die Proben nach 3.2.1.3 weiterbehandelt.

3.2.1.2.2 Schädigung von PM2 DNA und Plasmid pSV2-*gpt* durch BCBT und UV-A-Licht (360 nm)

Eine frisch angesetzte Stammlösung von 10 mM BCBT in H₂O_{bidest} wird der in Phosphatpuffer PP in Lösung befindlichen DNA bis zu einer Konzentration von 0-2 mM zugesetzt. Direkt nach der Zugabe werden die Proben in Eppendorfgläsern mit geöffnetem Deckel bei 0°C in einem Abstand von 10 cm für 7.5 min mit UV-A-Licht (360 nm) bestrahlt (6.75 kJ/m²). Nach der Schädigung wird zentrifugiert und die Proben nach 3.2.1.3 weiterbehandelt. Die Schädigung mit der korrespondierenden Methylesterverbindung, MCBT, erfolgt analog.

Als UV-A-Quelle dient die HQV 125 Glühbirne von Osram, deren Hauptemission bei 360 nm liegt und deren Strahlungsquelle in **Abb. 3.2** dargestellt ist. Der Energiefluß des UV-A-Lichts beträgt unter den genannten Bedingungen 15 Jm⁻²s⁻¹.

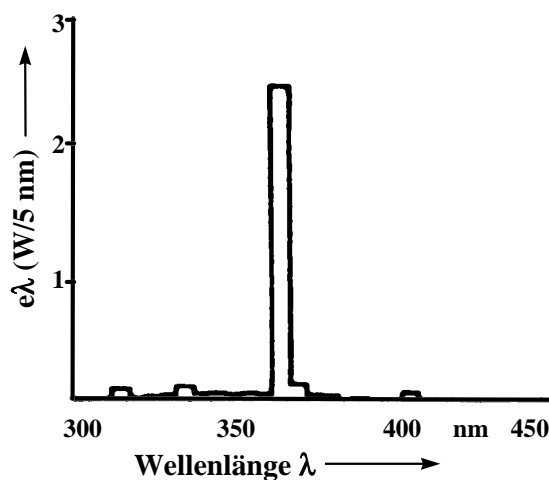


Abb. 3.2 Spektrale Strahlungsverteilung Osram HQV 125

3.2.1.2.3 Schädigung von PM2 DNA durch Ofloxacin + UV-A-Licht (360 nm)

Dem Reaktionsansatz wird DNA, Phosphatpuffer PP und Stammlösung von 1 mM Ofloxacin in Phosphatpuffer PP bis zu Konzentrationen von 0-100 µM zugesetzt. Direkt nach der Zugabe werden die Proben in Eppendorfgläsern mit geöffnetem Deckel im Wasserbad bei 20°C in einem Abstand von 10 cm für 0-45 min mit UV-A-Licht (360 nm) bestrahlt (0-40,5 kJ/m²). Nach der Schädigung wird zentrifugiert und die Proben nach 3.2.1.3 weiterbehandelt.

3.2.1.2.4 Schädigung von PM2 DNA durch Norfloxacin + UV-A-Licht (360 nm)

Der Lösung von DNA in Phosphatpuffer PP wird eine Stammlösung von 1 mM Norfloxacin in 0.05 M NaOH-Lösung bis zu einer Konzentrationen von 0-100 μM zugesetzt. Direkt nach der Zugabe werden die Proben in Eppendorfgefäßen mit geöffnetem Deckel in einem Abstand von 10 cm für 0 - 90 min mit UV-A-Licht (360 nm) im Wasserbad bei einer Temperatur von 20°C bestrahlt (0 - 81 kJ/m^2). Nach der Schädigung wird zentrifugiert und die Proben nach 3.2.1.3 weiterbehandelt.

3.2.1.2.5 Schädigung von PM2 DNA durch Riboflavin + sichtbares Licht

Zur Modifizierung durch Riboflavin + sichtbares Licht wird die in Phosphatpuffer PP vorverdünnte PM2 DNA (0.03 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) mit dem doppelten Volumen Riboflavin-Stammlsg. (150 μM in Phosphatpuffer PP) gemischt. Die Konzentration beträgt 30 μM Riboflavin. Die Belichtung wird mit einer 1000 Watt-Halogenlampe im Abstand von 50 cm bei 0°C durchgeführt. Die Belichtungszeit beträgt 30 s, entsprechend 11.25 kJ/m^2 (im Bereich 400-800 nm). Zur Vermeidung von unkontrollierter Anregung des Farbstoffes wird die Belichtung und die nachfolgende DNA-Fällung im Dunkeln durchgeführt (siehe auch **Epe et al., 1993c**).

3.2.1.3 Inkubation der PM2 DNA und Plasmid pSV2-gpt mit Reparaturoendonukleasen

20 μl der Lösung von DNA in 3.2.1.2 aufgeführten Arbeitspuffern werden auf Eis mit 10 μl der im entsprechenden Puffer vorverdünnten Reparaturoendonuklease versetzt und gemischt. Bei DNA-Schadensbestimmungen im Sättigungsbereich der Reparaturoendonukleasen werden die in **Tabelle 3.2** angegebenen Enzymkonzentrationen eingesetzt.

Tab. 3.2 Konzentrationen der Reparaturoendonukleasen für PM2 DNA-Schadensbestimmungen im Sättigungsbereich

Reparaturoendonuklease	Enzymkonzentration
Fpg-Protein	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Exonuklease III	200 U/ml
Endonuklease III	10 ng/ml
Endonuklease IV	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
T4 Endonuklease V	30 ng/ml

Die Inkubation erfolgt 30 min im Wasserbad bei 37°C. Die Reaktion wird durch Zugabe von 10 μl SDS-haltigem Auftragepuffer gestoppt. Zur Bestimmung der direkt durch das schädigende Agens erzeugten Einzelstrangbrüche wird die DNA in BE1/BSA-Puffer aufgenommen, jedoch findet keine nachfolgende Inkubation mit einem DNA-Reparaturenzym statt. Nach der Inkubation werden die Proben direkt auf ein vorbereitetes Agarosegel aufgetragen.

3.2.1.4 Agarose-Gelelektrophorese der PM2 DNA und des Plasmids pSV2-gpt

Die Trennung der superhelikalen, linearen und relaxierten Form der DNA erfolgt mittels einer Horizontal-Agarosegelelektrophorese (Sambrook et al. 1989) in einem 0.8%igem Agarosegel. Zur Herstellung des Gels werden 9 ml PM2-Puffer (10fach konzentriert) mit 81 ml H₂O_{bidest} verdünnt und nach Zusatz von 720 mg Agarose bis zum vollständigen Lösen zum Sieden erhitzt. Verdampftes Wasser wird ergänzt. Die auf 70°C abgekühlte Agaroselösung wird in die vorbereitete, mit Kämmen versehene Flachbett-Gelapparatur gegossen. Nach dem Ausbilden des Gels wird der Kammerpuffer zugesetzt und die Kämmen vorsichtig herausgezogen. In eine Tasche des Elektrophoresegels wird die gesamte Menge (40 µl) eines Reaktionsansatzes pipettiert. Die Trennung erfolgt bei 80 V für 1.5 bis 2 Stunden. Danach wird das Gel zur Färbung in Ethidiumbromidlösung (0.5 mg/l H₂O) mindestens 60 min bei Raumtemperatur auf einem Schüttelpult bewegt. Alternativ kann die Färbung des Gels auch über Nacht bei 4°C erfolgen.

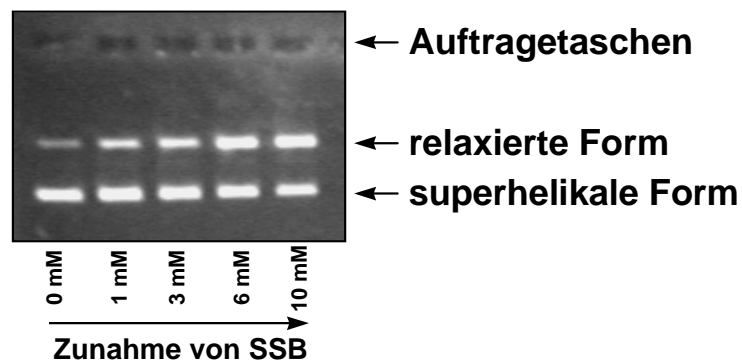


Abb. 3.3 Beispiel eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels (Schädigung mit MMS [0-10 mM], freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. Pflaum. Die Anzahl der Einzelstrangbrüche steigt mit zunehmender Konzentration (von links nach rechts).

3.2.1.5 Auswertung der Agarosegele

Nach beendeter Färbung wird das Gel 1 min gewässert und auf einem UV-Lichttisch (312 nm) mit einer CCD-Kamera und der Auswertesoftware MolecularAnalyst[®] im Computer (Macintosh) digital erfaßt. Die quantitative Bestimmung des jeweiligen Anteils an superhelikaler, relaxierter und linearer DNA am gesamten DNA-Gehalt wird durch Vermessung der jeweiligen Banden im Computer mit MolecularAnalyst[®] durchgeführt. Dabei wird für jede Spur auf dem Gel die Fluoreszenz des in die DNA eingelagerten Ethidiumbromids in Abhängigkeit der Laufstrecke der DNA bestimmt. Aus der Integration der Fluoreszenzsignale für superhelikale und relaxierte DNA berechnet sich die Anzahl der Einzelstrangbrüche pro DNA-Molekül. Unter Voraussetzung einer zufälligen Verteilung (Poisson-Verteilung) der Strangbrüche wird die Zahl der Einzelstrangbrüche nach **Formel 3.1** berechnet (Lloyd et al., 1978). Diese Berechnung berücksichtigt den Umstand, daß nur der

erste Einzelstrangbruch in einem Molekül erfaßt wird, nicht aber weitere Einzelstrangbrüche, da sie die Form der bereits relaxierten DNA nicht weiter beeinflussen. Die Meßwerte geben die Anzahl der DNA-Einzelstrangbrüche pro DNA-Molekül an, also Modifikationen pro 10^4 Basenpaaren (bp) für PM2 DNA und Modifikationen pro 5200 bp für pSV2-*gpt* Plasmid.

$$\text{ssb}_g = -\ln \frac{1.42 \cdot I}{1.42 \cdot I + II} \quad (3.1)$$

- ssb_g : Gesamtzahl der Einzelstrangbrüche
 1.42 : Korrekturfaktor für geringere Interkalation von Ethidiumbromid in superhelikale DNA
 I : Integral unter der Fläche der superhelikalen DNA
 II : Integral unter der Fläche der relaxierten DNA

Gemessen werden sowohl direkt durch die Schädigung entstandenen DNA-Einzelstrangbrüche als auch durch die Einwirkung der Reparaturenukleasen gebildete Einzelstrangbrüche. Zur Berechnung der Endonuklease-sensitiven Läsionen wird die Anzahl der ohne Reparaturenukleasen erhaltenen direkten Strangbrüche von der Gesamtzahl der Einzelstrangbrüche nach **Gleichung 3.2** subtrahiert.

$$\text{ess} = \text{ssb}_g - \text{ssb}_d \quad (3.2)$$

- ess: Endonuklease-sensitive Läsionen
 ssb_d: direkte Einzelstrangbrüche

Da selbst ungeschädigte (Kontroll-)DNA nach ihrer Gewinnung bereits zu ca. 5% in relaxierter Form vorliegt und Reparaturenzyme auch eine unspezifische Aktivität besitzen, müssen die Meßwerte der geschädigten Proben um entsprechende Meßwerte der ungeschädigten DNA (ssb und ess) korrigiert werden, um die tatsächlich durch das Agens erzeugten DNA-Schäden zu erhalten. Diese Nettowerte sind in den entsprechenden Graphiken angegeben, falls nichts anderes vermerkt ist.

3.2.2 Plasmidtransformation

3.2.2.1 Prinzip der Methode

Bakterien können als Empfängerzellen für freie, im Inkubationsmedium gelöste DNA dienen (Transformation). Dabei kann es sich z.B. um zirkuläre Plasmid-DNA oder auch kleinere einzel- oder doppelsträngige DNA-Stücke handeln. Aufgenommene DNA kann sich u.U. auch in der Wirtszelle replizieren, z.B. Plasmid-DNA, deren Replikationsstartpunkt von der Zelle erkannt wird. Damit die Bakterien Fremd-DNA aufzunehmen vermögen, müssen sie jedoch

durch eine Vorbehandlung diese Fähigkeit erlangen, d.h. die Bakterien müssen kompetent gemacht werden. Die kompetenten Bakterien werden dann mit dem einzuschleusenden Plasmid gemischt. Die transformierten Bakterien, die durch Aufnahme der Fremd-DNA veränderte Eigenschaften zeigen, können durch Zusätze zum Plattenmedium selektiert werden.

Durch Verwendung des Bakterienstamms *E. coli* DT-2 und des Plasmids pSV2-*gpt* lassen sich Mutationen des *gpt*-Gens untersuchen (Ashman & Davidson, 1984; Richardson et al., 1987; Palombo & Dogliotti, 1989). *E. coli* DT-2 werden durch Ampicillin wesentlich in ihrem Wachstum beeinträchtigt. Bei dem Plasmid pSV2-*gpt* handelt es sich um eine 5.2 kbp große, zirkuläre DNA, auf der ein *amp^r*-Genabschnitt liegt, der durch Transkription des intakten Gens die Expression einer β -Lactamase bedingt und damit Ampicillinresistenz verleiht. Des weiteren enthält das Plasmid eine Kopie des bakteriellen *gpt*-Gens, das für das Enzym Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (XGPRT) codiert, welches ein Enzym des Reservestoffwechsels der Purinsynthese darstellt (siehe Abb. 3.4). Bei dem Enzym XGPRT handelt es sich um das bakterielle Analogon des Enzyms Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPRT) aus Säugerzellen. Das durch das *gpt*-Gen kodierte Enzym katalysiert die Umsetzung von Xanthin und Guanin mit 5-Phosphoribosyl-1-diphosphat unter Abspaltung von Diphosphat zu den entsprechenden Nucleotidmonophosphaten, wobei XMP einen Prekursor von GMP darstellt. Analog ist es auch dazu fähig, das Purin-Analogon 6-Thioguanin (6Tg) zu 6-Thioguanosin-monophosphat umzuwandeln. Nach Bildung des entsprechenden 6Tg-Triphosphates kommt es bei Synthese der DNA und RNA zu dessen Einbau und damit zu einer Behinderung der Protein- und DNA-Synthese, zur Stoffwechselvergiftung und Wachstumshemmung der Bakterien. Der *E. coli* Stamm DT-2 besitzt keine intakte Kopie des *gpt*-Gens (*gpt*⁻) und kann deshalb in 6-Thioguanin-haltigem Medium überleben. Die vom Genprodukt des *gpt*-Gens wahrgenommenen Aufgaben können durch andere Stoffwechselwege erfüllt werden, so daß *E. coli* DT-2 dennoch lebensfähig sind.

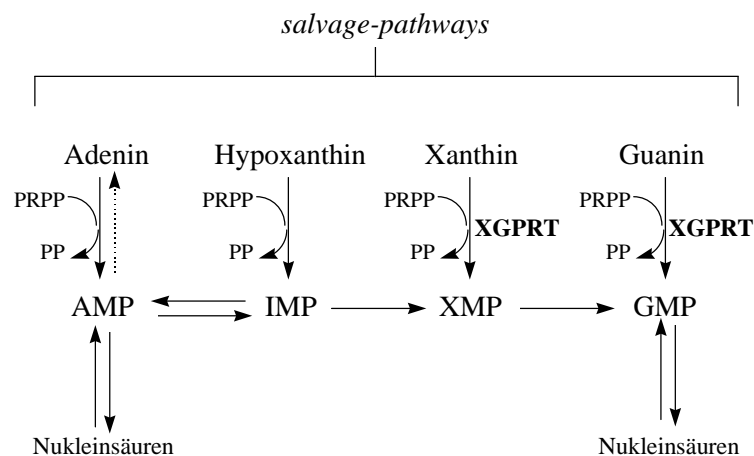


Abb. 3.4 Vereinfachte Darstellung des Purinstoffwechsels (nach Mulligan & Berg, 1981). Senkrechte Pfeile kennzeichnen die Wiederverwertungsreaktionen. PRPP = 5-Phosphoribosyl-1-diphosphat, PP=Disphosphat

Das bakterielle *gpt*-Gen wurde kloniert und ist in dem Genom des Plasmids pSV2-*gpt* integriert. Das *E. coli* Xanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase-Gen (*gpt*) steht unter Kontrolle des SV40 Promotors (P_{Σ}), lokalisiert im SV40 Origin (SV40 *ori*), dem SV40 small T Intron und der SV40 Polyadenylation-Stelle (polyA, AAAA) (Sambrook et al., 1989a).

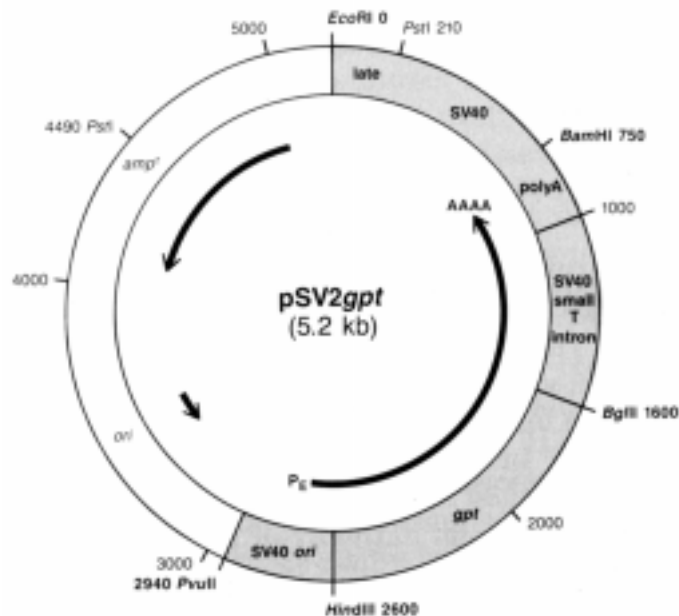


Abb. 3.5 Schematische Darstellung des Plasmids pSV2-*gpt*.

Durch Aufnahme des Plasmids pSV2-*gpt* in die Bakterien und Expression des intakten XGPRT-Enzyms erlangen die *gpt*-defizienten Bakterien die Fähigkeit auf Ampicillin-haltigem Medium zu wachsen und auch 6Tg zu metabolisieren, was das Wachstum der Bakterien stark beeinträchtigt oder sogar zu deren Absterben führt. Wenn jedoch im *gpt*-Gen des Plasmids vor der Transformation eine oder mehrere DNA-Modifikationen vorhanden sind, die bei der Replikation in den Bakterien als Mutationen fixiert werden, ist das Genprodukt u.U. inaktiv oder wird - beim Auftreten von Deletionen - gar nicht gebildet. Dieser XGPRT-negative Phänotyp, vorausgesetzt es kommt durch die Mutation zu einer verminderten oder komplett ausgeschalteten Aktivität des Enzyms, kann auf Ampicillin- und 6Tg-haltigem Medium selektiert werden (Tindall et al., 1984, 1986, 1989). Nicht-transformierte Bakterien und auch transformierte Bakterien mit intaktem *gpt*-Gen des Plasmids sterben jedoch auf diesen Platten ab. Durch Ermittlung der Mutanten- und Transformantenzahl läßt sich die Mutationsfrequenz ermitteln. Durch Ausplattieren einzelner Kolonien transformierter Bakterien mit mutiertem *gpt*-Gen, Isolierung deren DNA und Analyse der DNA-Sequenz lassen sich Aussagen über die Art der bestehenden Mutation machen.

3.2.2.2 Herstellung kompetenter Bakterien (*E. coli* DT-2)

250 ml LB-Medium (ohne Ampicillin) werden in einem 1 l Schikanekolben mit *E. coli* DT-2 beimpft. Die Bakterien werden bis zu einer optischen Dichte von 0.3-0.6 bei 600 nm im Schüttelinkubator bei 37°C und 200 U/min kultiviert. Die nun in der exponentiellen Wachstumsphase befindlichen Bakterien werden 10 min bei 5000 rpm unter Kühlung bei 4°C (Sorvallzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Bakterienpellet vorsichtig in 25 ml TSB-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 15% Glycerin wird die Suspension zu je 300 µl aliquotiert und mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Bakterien können bei -70°C mehrere Monate gelagert werden. Vor der weiteren Verwendung wird der Titer der Bakteriensuspension durch Ausstreichen von 100 µl einer Mischung der Bakterien mit nicht-ampicillinhaltigem LB-Medium im Verhältnis 1 : 10⁷ bestimmt.

3.2.2.3 Herstellung von Nährmedium-Platten (Hart-Agar)

Um dem Medium eine feste Konsistenz zu verleihen, werden zusätzlich zu den Flüssigmediumbestandteilen vor dem Autoklavieren 15 g/l Bacto Agar (Bottom Agar) zugesetzt. Danach läßt man das Medium auf 50°C abkühlen. Nicht autoklavierbare Mediumbestandteile werden sterilfiltriert zugesetzt und die Platten nachfolgend mit dem Plattengießgerät hergestellt. Nach der Aushärtung des Mediums werden die Platten umgedreht, um Kondenswasserbildung zu vermeiden. Sie können bis zu einem Tag verwendet oder bei 4°C zur späteren Verwendung aufbewahrt werden.

Für das Testsystem werden verschiedene Plattenarten benötigt: LB-Medium für die Bakterientiterbestimmung, M9-minimal-salt-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (M9_{Amp}) zur Ermittlung der Transformationsrate und M9-minimal-salt-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin und 20 µg/ml (120 µM) 6-Thioguanin (M9_{Amp/6TG}) zur Ermittlung der Mutationsrate.

3.2.2.4 Modifizierung des Plasmid pSV2-gpt

Die Schädigung des Plasmids pSV2-gpt erfolgt analog der Schädigung von PM2-DNA (siehe 3.2.1.2). Da eine Mutation jedoch ein relativ seltenes Ereignis darstellt, ist das Ausmaß der Schädigung der Plasmid-DNA jedoch um ein Vielfaches, ca. 10-50fach höher. Die geschädigte Plasmid-DNA kann im beschriebenen Testsystem zur Analyse von Mutationen eingesetzt werden und zur Bestimmung von 8oxoG durch HPLC/ECD dienen. Die Konzentrationsbestimmung des geschädigten Plasmids erfolgt durch Messung der Fluoreszenz nach Färbung eines DNA-Gelelektrophorese-Gels mit Ethidiumbromid. Es wird ein definiertes Volumen des Plasmid-DNA-Lösung aufgetragen, das theoretisch 0.1 µg Plasmid entspricht. Der Vergleich erfolgt mit einem Standard von 0.2 µg PM2 DNA.

3.2.2.5 Transformation

Die nach Zugabe von 15% Glycerin in Stickstoff schockgefrorene und bei -70°C gelagerte Bakteriensuspension wird für 1 bis maximal 2 Stunden bei 0°C aufgetaut. Jede Probe wird in einem dreifachen Ansatz bestimmt. Zur Transformation pipettiert man in folgender Reihenfolge in ein Eppendorf Reaktionsgefäß 20 μl KCM-Puffer, 70 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, 10 μl der gewünschten DNA und 100 μl der kompetenten Bakteriensuspension. Nach vorsichtigem Mischen inkubiert man 20 min auf Eis und nachfolgend 10 min bei Raumtemperatur. Nach Beendigung der Inkubation wird 1 ml vorgewärmtes LB-Medium zugesetzt und 50 min bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Zu dieser Zeit findet die Expression der aus dem *Amp*-Gen gebildeten Penicillinase statt, die die Ampicillin-Resistenz verleiht.

Die eingesetzte DNA kann vor der Transformation modifiziert (siehe 3.2.2.4) werden oder auch unmodifiziert eingesetzt werden (Kontrolle). Die DNA-Menge soll mindestens 10 pg, optimalerweise 10 ng pro Ansatz betragen, so daß die eingesetzte Konzentration idealerweise 10 ng/10 μl beträgt.

3.2.2.6 Ausstreichen auf Agar-Platten und Auswertung

Nach Transformation des Vektors pSV2-*gpt* in *E. coli* DT-2 (*gpt*⁻) werden Mutanten im *gpt*-Gen in Ampicillin- und 6-Thioguanin-haltigem M9-Minimalmedium selektiert. Dazu werden 500 μl der kompetenten Bakterien in einem großen Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 2 ml der Lösung von Ampicillin- und Thioguanin-haltigem Medium gemischt und ausplattiert. Transformanten, d.h. Bakterien, die das Plasmid erfolgreich aufgenommen haben, werden auf Ampicillin-haltigem Medium selektiert. Man mischt hierzu 20 bzw. 50 μl (abhängig von der Kompetenz und DNA-Menge) mit 2 ml Ampicillin-haltigen Medium in Eppendorf-Reaktionsgefäßen. Das Ausplattieren der Bakteriensuspension erfolgt durch gleichmäßiges, rasches Schwenken der Platten bis zur Erhärtung des Topagars. Man inkubiert die Platten im Brutschrank für ca. 24 h bei 37°C auf dem Deckel liegend. Die Zahl der gebildeten Kolonien wird anschließend mit Hilfe eines Zählstiftes bestimmt. Alle Proben werden dreifach bestimmt. Die Zahl der pro μg Plasmid transformierten Bakterien ist die Transformationsrate. Zu deren Berechnung wird durch 20 bzw. 50 μl (je nach eingesetzter Bakterienmenge) dividiert, mit 1200 multipliziert (entsprechend der Größe des Ansatzes) und zur Umrechnung von 10 ng Plasmid auf 1 μg mit 100 multipliziert. Die Berechnung der pro μg Plasmid mutierten Bakterien, die Mutationsrate, erfolgt analog durch Division mit 500 (μl der eingesetzten Bakterien), Multiplikation mit 1200 (Ansatzgröße in μl) und Multiplikation mit 100 (Umrechnung auf 1 μg Plasmid). Der Quotient der bestimmten Transformanten und Mutanten pro μg Plasmid ergibt nun entsprechend **Gleichung 3.3** die Mutationsfrequenz.

$$\text{Mutationsfrequenz} = \frac{\text{Mutanten} / \mu\text{g Plasmid}}{\text{Transformanten} / \mu\text{g Plasmid}} \quad (3.3)$$

Die Mutantenklone können nun einzeln ausgestrichen und vermehrt werden. Hierzu wird von jedem Ansatz ein Klon gepickt. Untersucht werden induzierte und auch spontane Mutanten. Nach Isolierung der DNA durch Minipräparation kann durch Sequenzierung die Art und Position der Mutation bestimmt werden. Im Agarosegel können nach gelektrophoretischer Bestimmung auch Deletions- oder Insertionsmutanten erkannt werden.

3.2.2.7 Plasmidisolierung aus Bakterien

Die Isolierung der Plasmide aus Bakterien erfolgt mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kits[®] (QIAGEN GmbH, Hilden). Das Prinzip der Methode beruht auf der alkalischen Lyse bakterieller Zellen durch Adsorption von DNA an Silikat in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Zunächst erfolgt die Präparation und Reinigung bakterieller Lysate. Dazu wird das Bakterienpellet in 250 µl Puffer P1, dem vorher RNase-Lösung A zugegeben wurde, aufgenommen. Nach Resuspension sollen keine Zellhaufen mehr sichtbar sein. Nach Zugabe von 250 µl Puffer P2 wird das Reaktionsgefäß 4-6 mal (maximal 5 min) gedreht, um eine gute Durchmischung zu erreichen. Nach Zugabe von 350 µl Puffer N3 wird das Gefäß erneut 4-6mal leicht durchgemischt. Nach dem Stehenlassen für ca. 5 min erscheint die Lösung „bewölkt“. Man zentrifugiert für 10 min bei 13000 U/min zur Trennung von chromosomaler DNA und festen Zellbestandteilen. Es erfolgt die Adsorption der DNA an der QIAprep Membran der Säule, die selektiv Plasmid-DNA in hochkonzentrierten Salzlösungen adsorbiert. In Puffern niedriger Salzkonzentration wird die DNA eluiert. RNA, zelluläre Proteine und Metabolite, wie auch Endonukleasen, werden nicht adsorbiert und schnell ausgewaschen. Der Überstand des Zentrifugats wird durch Dekantieren oder Pipettieren nun auf die QIAprep-Säule aufgegeben und für 30-60 sec zentrifugiert. Das Zentrifugat wird verworfen. Durch Waschen mit 500 µl Puffer PB und erneutem Zentrifugieren für 30-60 sec werden Spuren von Nukleasen entfernt. Das Zentrifugat wird verworfen. Das Waschen mit 750 µl Puffer PE, dem vor Verwendung Ethanol (96-100%) zugesetzt wurde, erfolgt wiederum durch Zentrifugation für 30-60 sec. Das Zentrifugat wird verworfen und nach weiterer Zentrifugation für 1 min werden letzte Reste des Waschpuffers entfernt. Die QIAprep Säule wird nun in ein sauberes 1.5 ml Reaktionsgefäß plaziert. Durch Zugabe von 50 µl des Puffers EB (10 mM Tris-Cl, pH 8.5) oder H₂O_{bidest} in die Mitte der Säule erfolgt die Elution der Plasmid-DNA durch Stehenlassen für 1 min und nachfolgende Zentrifugation für 1 min bei 13000 U/min.

Zur Bestimmung der Konzentration der mittels dieser Isolierung gewonnenen DNA erfolgt durch Messung der Fluoreszenz eines Agarosegels nach Färbung mit Ethidiumbromid und Vergleich zu der Fluoreszenz einer definierten Menge an PM2 DNA. Man vermischt dazu 5 µl der durch die Plasmidisolierung gewonnenen 50 µl DNA-Lösung, der man vor Trennung auf dem Agarosegel noch 15 µl H₂O_{bidest} zugibt.

3.2.2.8 DNA-Sequenzanalyse

Zur Analyse der Mutationen im *gpt*-Locus von in *E. coli* DT-2 transformierten Plasmiden werden 6-Thioguanin-resistente Mutantenkolonien gepickt und mit diesen erneut 6-Thioguanin-haltiges Medium beimpft. Nach Plasmidisolierung (siehe 3.2.2.7) erfolgt die Sequenzierung der hochgereinigten Plasmid-DNA durch die Firma GENterprise™ (Gesellschaft für Genanalyse und Biotechnologie mbH, Mainz) durch nichtradioaktive DNA-Sequenzierung mittels vier mit unterschiedlichen Flueoreszenzfarbstoffen gekoppelten Didesoxynukleotiden (Dye-Terminator™) in Kombination mit dNTPs mit dem 20-er Primer rev 3 (5'-CCAGAATACTTACTGGAAAC-3') an der Startposition 538 (vom Startcodon des *gpt*-Gens gezählt). Durch Vergleich der so ermittelten Sequenz mit der Sequenz der Wildtyp-DNA kann man phänotypisch in Erscheinung getretene Mutationen der Sequenz des *gpt*-Gens leicht ermitteln.

3.2.3 Zellkultur

3.2.3.1 Allgemeine Arbeitstechniken in der Zellkultur

Das Arbeiten mit Zellkulturen erfolgt prinzipiell unter sterilen Bedingungen in einer Laminar-Flow-Sterilwerkbank. Alle Zellen werden - falls nicht anders angegeben - bei 37°C, 5% CO₂ und 99% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Passagierung der Zellen erfolgt je nach deren Verdopplungszeit. Es werden immer vorkonfluente Zellen, d.h. Zellen, die sich noch in ihrer exponentiellen Wachstumsphase befinden, verwendet. Zur Passagierung werden festwachsende Zellen durch Abnehmen des Nährmediums, zweimaligem Waschen mit PBSCMF, Inkubation mit Trypsin/EDTA-Lösung und nachfolgendem kräftigen Aufklopfen in Suspension gebracht. Die Inkubation mit Trypsin/EDTA-Lösung wird beendet, wenn sich die Zellen abrunden. Die so in Suspension gebrachten Zellen werden mit frischem, kaltem Kulturmedium resuspendiert und durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit der Pipette vereinzelt. Das im Nährmedium enthaltene fötale Kälberserum (FCS) inaktiviert hierbei die Wirkung des Trypsins. Die Zellzahlbestimmung erfolgt mit Hilfe eines Coulter Counter Zählgerätes in Isoton II Lösung in einer Verdünnung von 1:50. Zur weiteren Kultivierung werden die Zellen ca. 1:5 mit Kulturmedium verdünnt.

3.2.3.2 Kryokonservierung von Säugerzellen

Die bereits abgelösten und suspendierten Zellen werden zentrifugiert. Es erfolgt eine Resuspendierung in eisgekühltem Kulturmedium mit 10% (v/v) DMSO und es werden jeweils 1.8 ml in einer Zelldichte von $1-10 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Kryoröhrchen pipettiert. Die Röhrchen werden zunächst 2 Stunden bei -20°C gekühlt, dann über Nacht bei -70°C aufbewahrt und anschließend in flüssigem Stickstoff (-196°C) gelagert.

Zur Reaktivierung der Zellen werden diese in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellsuspension wird in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Kulturmedium überführt und 5 min bei 140 g zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und das Pellet wird in 5 ml Kulturmedium aufgenommen und in eine kleine Zellkulturflasche (25 cm²) überführt. Die Inkubation erfolgt im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt. Nach 24 h wird ein Mediumwechsel durchgeführt, um Abbauprodukte und die durch die Lagerung und das Auftauen entstandenen Zellfragmente zu entfernen.

3.2.3.3 AS 52-Zelllinie

Die aus Ovarien des syrischen Hamsters stammende und adhärent wachsende Zelllinie AS 52 wird bei 37°C und 5% CO₂ in Ham's F12 Medium kultiviert, supplementiert mit 5% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung (Hsie et al., 1975; Tindall et al., 1984, 1989). Die Zelllinie stammt von der CHO-K1-BH4-Zelllinie ab, in der die einzige Kopie des hemizygoten Säugergens *hpvt* (auf dem X-Chromosom) mutiert wurde. Durch stabile Transformation mit dem pSV2-*gpt* Vektor wurde eine Kopie des analogen bakteriellen *gpt*-Gens (*Ecogpt*), welches für die Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (XPRT bzw. XGPRT) codiert, eingeführt (Mulligan & Berg, 1980).

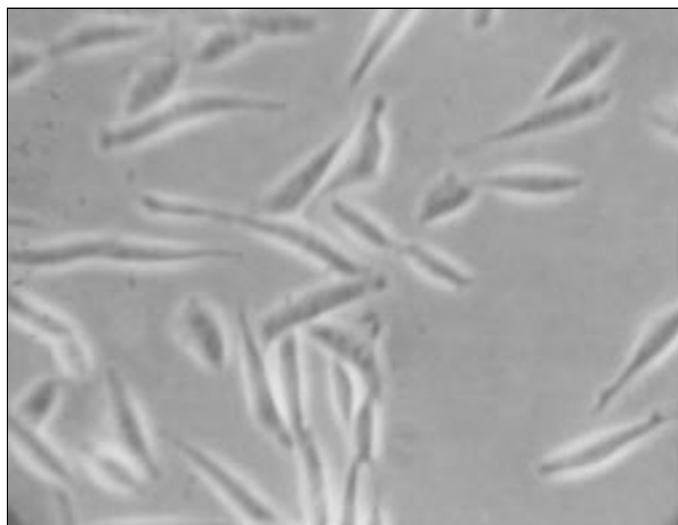


Abb. 3.6 Mikroskopische Aufnahme von AS52-Zellen (500fache Vergrößerung)

Die Passagierung erfolgt wie unter 3.2.3.1 beschrieben, jedoch darf die Einwirkzeit der Trypsin/EDTA-Lsg. 60 s nicht überschreiten. Die Verdopplungszeit beträgt 14-16 h.

3.2.3.4 A253-Zelllinie

Bei der Zelllinie A253 (American Type Culture Collection) handelt es sich um humane Tumorzellen eines Plattenepithelkarzinoms („squamous cell carcinoma“, SCC) der Kopf- und Nacken-Region. Im Genom ist ein Allel des p53-Gens deletiert, es wird aber keine p53-mRNA exprimiert, obwohl das andere Allel intakt ist, so daß wahrscheinlich ein Defekt in der regulatorischen Region des Gens vorliegt (**Reiss et al., 1992**). A253-Zellen wachsen als Monolayer mit flacher, pflastersteinartiger epithelialer Morphologie (**Kibbey et al., 1992**). Die Zellen werden in McCoy's 5A-Medium kultiviert, dem 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin-Lösung zugesetzt wurden. Die Einwirkzeit der Trypsin/EDTA-Lösung ist ca. 10 min. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 16-20 h.

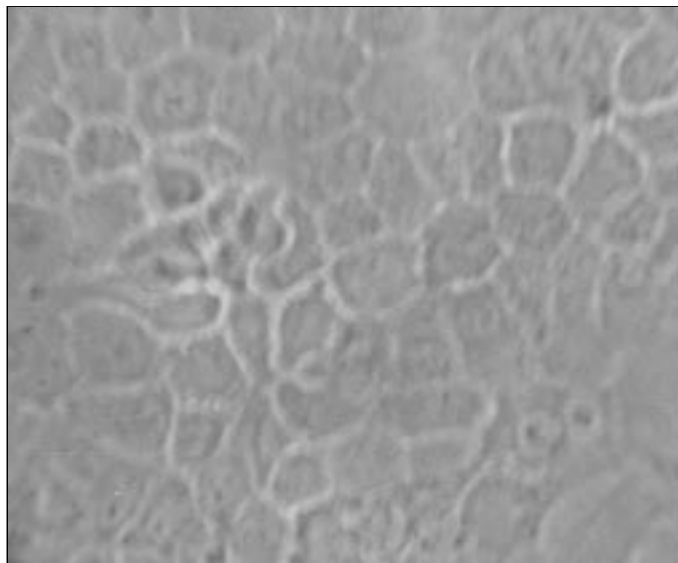


Abb. 3.7 Mikroskopische Aufnahme von A253-Zellen (200fache Vergrößerung)

3.2.3.5 A253CW14G-Zelllinie

Die Klone 1 und 2 der Zelllinie A253CW14G wurden durch retroviral-bedingte Transformation von A253-Zellen mit humaner wt-p53 DNA hergestellt (**Courtois et al., 1997**).

Die virale Helferzelllinie („packaging cell line“) CW14G wurde von **Courtois et al. (1997)** in DMEM mit Zusatz von 10% FCS und Antibiotika kultiviert. Sie stammt aus NIH3T3-Zellen und produziert replikations-defekte rekombinante retrovirale Partikel, die für menschliche wt-p53 cDNA und das Neomycin-Resistenzgen kodieren. Die Infektion der A253-Zellen mit dieser viralen Packzelllinie erfolgt durch **Courtois et al. (1997)** nach einem Protokoll von **Woodworth et al. (1993)**. Nach Selektion mit G418 exprimieren 30-70% der entstandenen A253CW14G das wt-p53-Protein stabil und zeigen nach Injektion *in vivo* in nackten Mäusen reduzierte Tumorigenität, einen erhöhten Differenzierungsstatus und sind in der Lage den

Zellzyklus in der G1-Phase (im Gegensatz zu den p53-negativen A253-Zellen) anzuhalten und Induktion von WAF1/CIP1/p21 zu bewirken (**Courtois et al., 1997**).

Die Wiederherstellung p53-abhängiger Mechanismen in diesen Zellen zeigte aber nur geringen Einfluß auf die Wachstumsrate.

Die Zellen besitzen eine vergleichbare Morphologie wie A253-Zellen und werden analog kultiviert und passagiert. Ihre Verdopplungszeit beträgt ca. 20 h.

Obwohl die Transformation mit Retroviren stabile Transformanten hervorbrachte, wurden die Experimente nur bis zu Passage 8 durchgeführt.

3.2.3.6 A253CW16G-Zelllinie

Die Zelllinie A253CW16G wurde ebenfalls durch Transformation von A253-Zellen mit viralen Helferzellen CW14G hergestellt, jedoch wurden sie nur mit dem reinen Vektor (ohne p53-Gen) transformiert (**Courtois et al., 1997**). A253CW16G-Zellen sind demnach nicht in der Lage, das Protein p53 zu exprimieren. Die Zellen besitzen eine vergleichbare Morphologie wie A253-Zellen und werden analog kultiviert und passagiert. Ihre Verdopplungszeit beträgt ca. 16-20 h.

3.2.3.7 Primäre Mausfibroblasten

Die verwendeten primären Fibroblasten wurden von **Kaina et al.** aus Mäusen präpariert. Die primären Fibroblasten stammen aus p53-„wild-typ“-Mäusen (p53 +/+), deren Zellen das p53-Protein in seinem wild-typ exprimieren. Zellen aus p53-„knock-out“-Mäusen, die durch ein frühes Auftreten von Tumoren gekennzeichnet sind und in deren p53-Gen eine Insertion vorliegt und die demnach das p53-Protein nicht exprimieren, wurden ebenfalls verwendet.

Kultiviert werden die Zellen in DMEM, supplementiert mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin-Lsg. bei 37°C und 5% CO₂. Nach spätestens 3-4 Passagen sollen die Zellen nicht mehr für Untersuchungen eingesetzt werden.

3.2.3.8 HaCaT-Zelllinie

Bei HaCaT-Zellen handelt es sich um spontan immortalisierte, hyperproliferierende menschliche Keratinozyten. Die Zellen exprimieren mutiertes p53 Tumorsuppressor-Protein (**Herzinger et al., 1995**). Sie wachsen als Monolayerkultur in DMEM, supplementiert mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin-Lsg. bei 37°C und 5% CO₂ (**Boukamp et al., 1988**). Um die Differenzierungsfähigkeit der Gesamtkultur zu erhalten, werden HaCaT-Zellen früher Passagen frühestens 3 bis 4 Tage nach Erreichen des konfluenten Stadiums passagiert. Für die Passagierung wird das Medium von der Kultur abgesaugt, durch 10 ml (für die 250-ml-Zellkulturflasche) 0.05% EDTA-Lsg. in PBSCMF ersetzt und 10 bis 20 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die EDTA-Lsg. entfernt, durch eine Mischung von Trypsin und EDTA (0.5 g/l bzw. 0.2 g/l modifizierte Puck's Salzlösung A) ersetzt und bei 37°C weitere 5

bis 8 min inkubiert. Die Trypsinaktivität wird durch Zugabe von serumhaltigem Medium gestoppt, die Zellen vollständig vereinzelt, die Zellzahl bestimmt und die Suspension auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Für die routinemäßige Passagierung empfiehlt sich eine 10fache Verdünnung. Der Mediumwechsel erfolgt nach 24 h und danach zweimal pro Woche.

3.2.3.9 HeLa-Zelllinie

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um humane epitheloide Zervixadenokarzinom-Zellen (**Gey et al., 1952**). Sie werden in MEM-Medium mit 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung bei 37°C und 5 % CO₂ als Monolayer kultiviert. Zur Passagierung werden die Zellen nach Absaugen des Mediums mit PBSCMF gewaschen und bei 37°C für 1-2 min mit Trypsin/EDTA-Lösung behandelt. Durch Zugabe des FCS-haltigen Mediums wird das Trypsin inaktiviert und die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abziehen der Pipette vereinzelt. Die Ausgangszellzahl der neuen Passage soll 1000 Zellen/ml nicht unterschreiten. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 24 Stunden.

3.2.4 Alkalische Elution

3.2.4.1 Prinzip der Methode

Mit Hilfe der Alkalischen Elution können *in vitro* in zellulärer DNA zufällig verteilte Einzelstrangbrüche, aber auch DNA-DNA- und DNA-Protein-Quervernetzungen quantifiziert werden (nach **Kohn et al., 1973, 1976**). In einer modifizierten Form der alkalischen Elution werden neben DNA-Einzelstrangbrüchen auch DNA-Basenmodifikationen quantifiziert. Dazu wird die auf dem Filter isolierte DNA vor der Elution mit bestimmten Reparaturenucleasen, die als Sonden eingesetzt werden, inkubiert. Spezifische DNA-Modifikationen werden dabei von Reparaturenzymen erkannt und die DNA an diesen Stellen eingeschnitten. Ursprüngliche Basenmodifikationen werden damit als zusätzliche Einzelstrangbrüche sichtbar. Die Nachweisgrenze für DNA-Einzelstrangbrüche beträgt ca. 0.5 Läsionen pro 10⁷ Basenpaare (bp). Damit stellt die Alkalische Elution ein weitaus sensitiveres Verfahren als beispielsweise der mit zellfreier DNA durchgeführte Relaxationsassay oder auch die Detektion durch HPLC/ECD dar, deren Nachweisgrenze etwa bei einem Einzelstrangbruch pro 10⁵ Basenpaaren liegt.

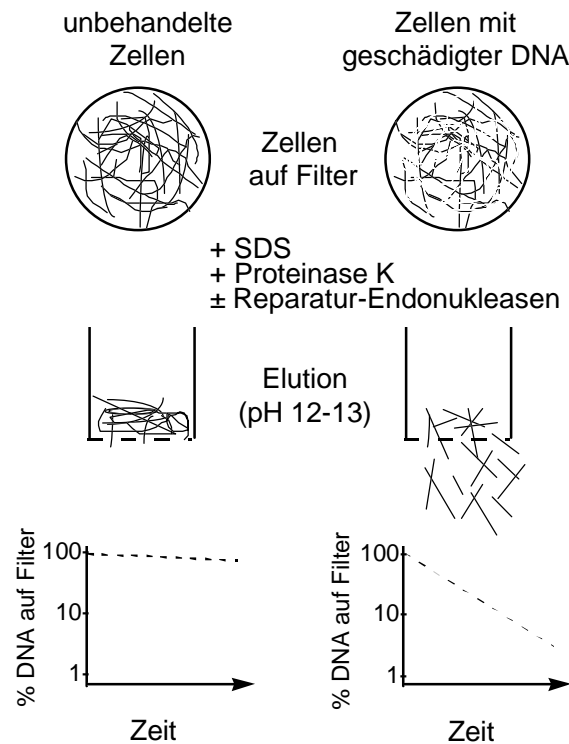


Abb. 3.8 Prinzip der Alkalischen Elution

Bei der Alkalischen Elution werden die zu untersuchenden Zellen als Suspension auf das Filter gebracht und mit einem Detergenz (Lysepuffer) lysiert. Dabei wird der Hauptanteil des zellulären Proteins und der RNA vom Filter gewaschen. Die DNA bleibt in Doppelstrangform auf dem Filter zurück. Nach gründlichem Waschen der DNA zur Beseitigung von Resten des Lysepuffers kann nun die Inkubation mit Reparaturenukleasen erfolgen, wenn man verschiedene DNA-Modifikationen quantifiziert, oder auch ausbleiben, wenn man nur Einzelstrangbrüche der DNA ermitteln möchte. Nun erfolgt eine Behandlung mit Proteinase K, um gebundenes Protein abzubauen. Danach wird eine alkalische Lösung mit pH 12.1 durch das Filter gepumpt, die die Denaturierung der doppelsträngigen DNA in die Einzelstrangform zur Folge hat. Je nach Anzahl der DNA-Einzelstrangbrüche entstehen DNA-Einzelstränge unterschiedlicher Länge, deren Durchtritt durch das Filter mechanisch beeinflusst wird: Ein relativ langer DNA-Einzelstrang braucht mehr Zeit als ein kurzer, um sich so anzuordnen, daß er durch eine einzige Pore des Filters paßt. Kürzere Stränge eluieren somit früher als längere Stränge (siehe **Abbildung 3.8**). Die eluierende DNA wird fraktioniert aufgefangen und nach Neutralisation die Konzentration der DNA in den Fraktionen und der Anteil der DNA, die auf dem Filter zurückgeblieben ist, mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Bisbenzimid) fluorimetrisch bestimmt. Daraus wird die Elutionsrate der DNA errechnet, die proportional zum Gehalt an Einzelstrangbrüchen und alkalilabilen Läsionen ist. Die Elution mit γ -Strahlung geschädigter DNA dient als Standard der Methode, wobei 6 Gy eine Läsion pro 10^6 Basenpaaren erzeugen (**Kohn et al., 1976**).

3.2.4.2 Versuchsaufbau

Abbildung 3.9 zeigt den schematischen Aufbau der Anlage zur alkalischen Elution mit Vorratsbehälter, Filter, peristaltischer Pumpe und Fraktionensammler. Die Polycarbonatfilter liegen luftblasenfrei auf einem Frittenboden in der Filterhalterung, die mit einem 25 ml-fassenden Vorratsbehälter verbunden ist. Das Filtersystem taucht in ein temperierbares Wasserbad ein. Der Abfluß des Filtersystems ist durch einen Dialyseschlauch über eine peristaltische Mehrkanalpumpe, die mit dem Fraktionensammler verbunden ist. Die Durchflußgeschwindigkeit wird dabei durch die Fließgeschwindigkeit der Peristaltikpumpe bestimmt. Zellsuspension, Puffer und Enzymlösungen werden über den Vorratsbehälter dem System zugeführt.

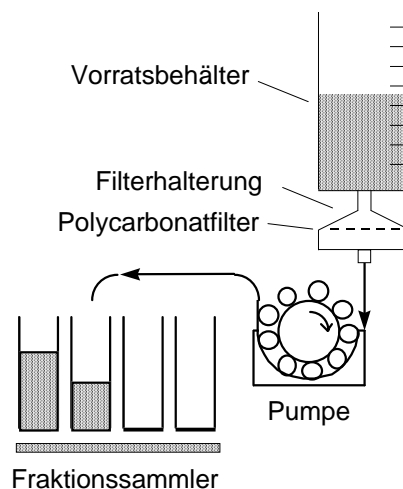


Abb. 3.9 Schematischer Aufbau der Anlage zur alkalischen Elution mit Vorratsbehälter, Filter, peristaltischer Pumpe und Fraktionensammler.

3.2.4.3 Behandlung der Zellen für die alkalische Elution

Zur Verhinderung der Reparatur während der Schädigung gebildeter DNA-Einzelstrangbrüche und Endonuklease-sensitiver Läsionen wird die Schädigung der Zellen, wenn nicht anders beschrieben, bei 0°C in PBSCMF durchgeführt. Vor der Schädigung wird das Nährmedium abgesaugt und die Zellen werden zweifach mit PBSCMF gewaschen. Es werden Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Adhärent wachsende Zellen befinden sich dabei im vorkonfluenten Stadium und werden erst nach der Schädigung in Suspension gebracht. Je $1 \cdot 10^6$ Zellen werden nachfolgend bei 4°C auf die Filter der Alkalischen Elution aufgetragen und bei 20°C lysiert. Die Belichtung der Zellen in An- und Abwesenheit von exogenen Photosensibilisatoren wird mit einer 1000 Watt-Halogenlampe oder UV-A-Lampe mit Maximum bei 360 nm in Zellkulturflaschen mit 24 cm² Grundfläche in einem Eisbad durchgeführt.

3.2.4.3.1 Schädigung mit Ro 19-8022 und sichtbarem Licht

Man inkubiert zur Schädigung die am Boden der Zellkulturflasche festwachsenden Zellen nach Absaugen des Mediums und zweifachem Waschen mit PBSCMF mit einer Lösung von Ro 19-8022 in 10 ml PBSCMF und belichtet 10 min bei 0°C mit einer Halogenlampe (1000 W) in einem Abstand von 38 cm (166 kJ/m^2 im Bereich 400-800 nm). Durch Variation der Belichtungszeit und der Bestrahlungsdistanz werden entsprechend höhere Lichtdosen erreicht. Nach der Bestrahlung wird die schädigende Lösung rasch abgezogen und zweimal mit je 10 ml 4°C kaltem PBSCMF gewaschen. Durch Zugabe von 1.5 ml Trypsin/EDTA-Lösung bei Raumtemperatur und kräftiges Aufklopfen der Zellkulturflasche, werden die adhärenen Zellen in Suspension gebracht. Zu der Zellsuspension wird nun 5 ml kaltes (4°C) Nährmedium mit FCS zu der Suspension gegeben und so das Trypsin inaktiviert. Die Zelldichte der Suspension wird durch Messung mit dem Coulter-Counter bestimmt.

3.2.4.3.2 Schädigung mit sichtbarem Licht

Zur Schädigung mit sichtbarem Licht wird ein 1000 W Tageslichthalogenstrahler (400 bis 800 nm) verwendet. Die Belichtung der Zellen erfolgt auf Eis bei 0°C mit 450 kJ/m^2 (33 cm, 20 min) in PBSCMF. Anschließend werden die Zellen trypsiniert, resuspendiert und auf die Filter der Alkalischen Elution aufgetragen.

3.2.4.3.3 Schädigung mit UV-B-Strahlung

Als Strahlungsquelle für Breitband UV-B dient eine Philipps TL 20 W/12 RS Leuchtstoffröhre, deren Emmisionsbreite den gesamten UV-B-Bereich abdeckt. Die Hauptemission liegt bei 306 nm. Die Lampe wird mindestens 10 min vor der Schädigung der Zellen eingeschaltet. Zur Bestrahlung der in Zellkulturflaschen befindlichen, adhärenen Zellen mit 1.1 kJ/m^2 (Distanz: 50 cm, Bestrahlungszeit: 14 min) und auch einer geringeren Dosis von 6.5 J/m^2 (Distanz: 50 cm, Bestrahlungszeit: 5 s) werden die Zellen vor Bestrahlung mit 10 ml PBSCMF überschichtet. Da das Polystyrol des Zellkulturflaschenmaterial einen Teil der Strahlung absorbiert, gelten alle Dosisangaben für den Teil der Strahlung, der tatsächlich auf die Zellen trifft. Nach der Schädigung trypsiniert man die Zellen, resuspendiert sie in Kulturmedium und trägt sie auf die Filter der Alkalischen Elution auf.

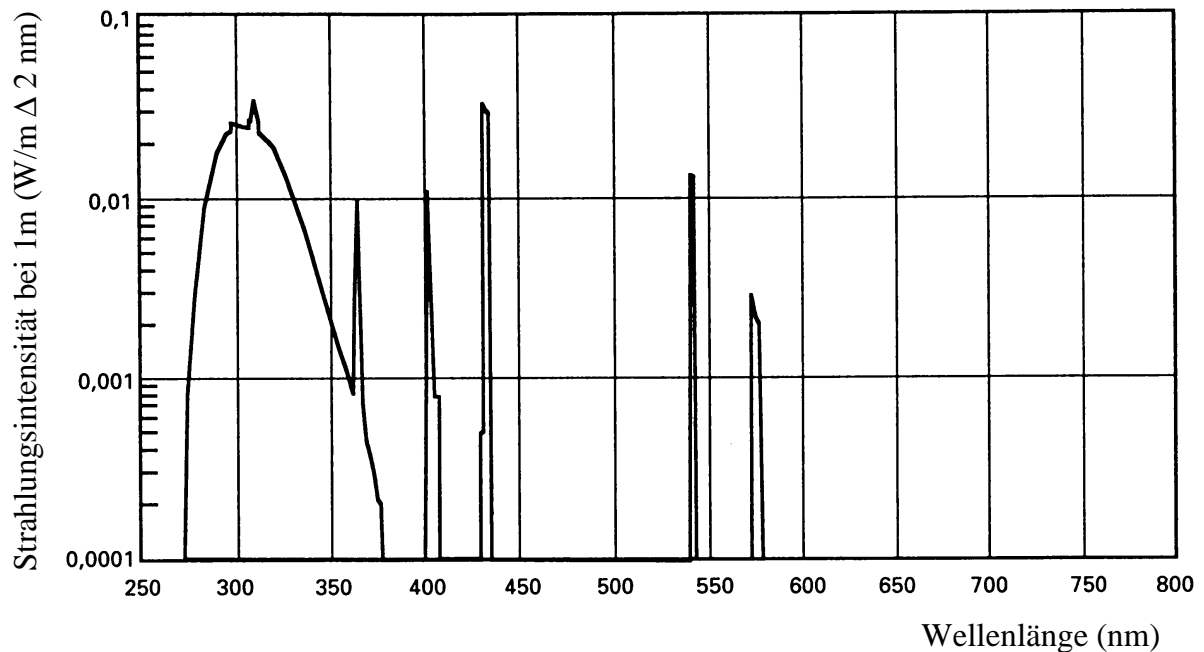


Abb. 3.10 Spektrale Strahlungsverteilung der Philips TL 20 W/12 RS

3.2.4.3.4 Schädigung mit BCBT + UV-A-Licht (360 nm)

Man inkubiert zur Schädigung die adhärennten Zellen mit einer 0-2 mM Lösung von BCBT in 10 ml PBSCMF und belichtet 0-10 min bei 0°C mit einer UV-A-Lampe mit Hauptemission bei 360 nm in einem Abstand von 10 cm (maximal 9 kJ/m²). Nach der Bestrahlung wird die schädigende Lösung ohne Zeitverzug entfernt und die Zellen zweimal mit je 10 ml kaltem PBSCMF (4°C) gewaschen. Nach dem Abtrypsinieren werden die Zellen nach Zugabe von Nährmedium mit FCS in Suspension gebracht. Die Zelldichte der Suspension wird durch Messung mit dem Coulter-Counter bestimmt.

3.2.4.3.5 Schädigung mit Ofloxacin + UV-A-Licht (360 nm)

Man inkubiert zur Schädigung die adhärennten Zellen mit einer Lösung von 0-100 μM Ofloxacin (Stammlösung in Phosphatpuffer PP) in PBSCMF. Die Bestrahlung erfolgt mit UV-A-Licht (360 nm) in großen Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit geöffnetem Deckel für 0 und 10 min in einem Abstand von 10 cm bei 0°C (0 bzw. 9 kJ/m²). Nach der Schädigung werden die Zellen mit der Methode der Alkalischen Elution untersucht.

3.2.4.3.6 Schädigung mit Norfloxacin + UV-A-Licht (360 nm)

Man inkubiert zur Schädigung die adhärenen Zellen mit einer Lösung von 0-100 μM Norfloxacin (Stammlösung in 0.05 N NaOH-Lösung) in PBSCMF. Es erfolgt Bestrahlung mit UV-A-Licht (360 nm) in großen Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit geöffnetem Deckel für 0 und 20 min in einem Abstand von 10 cm bei 0°C (0 bzw. 18 kJ/m^2). Nach der Schädigung werden die Zellen auf die Alkalische Elution aufgetragen.

3.2.4.3.7 Schädigung mit Wasserstoffperoxid

Adhärenente Zellen werden mit frisch angesetztem und steril filtriertem H_2O_2 in einer Konzentration von 1-6 mM in PBSCMF gemischt und 20 min bei 0°C inkubiert. Nach Abgießen und zweimaligem Waschen, werden die Zellen abtrypsiniert und Nährmedium mit FCS zugegeben. Die Zellen stehen in Suspension für die weitere Untersuchung zur Verfügung.

3.2.4.3.8 Schädigung mit Kaliumbromat

Eine frisch angesetzte Lösung von 1-15 mM Kaliumbromat in PBSCMF wird steril filtriert. Adhärenente Zellen werden mit 10 ml dieser Lösung für 15 min bei 37°C/5% CO_2 (im Brutschrank) inkubiert. Nach der Inkubation wird die Lösung abgesaugt und die Zellen zweifach vorsichtig mit kaltem PBSCMF gewaschen. Die Zellen werden nun abtrypsiniert.

3.2.4.3.9 Behandlung mit BSO

L-Buthionin-SR-sulfoximin (BSO, S-n-Butyl-homocystein-sulfoximin) ist ein potenter Inhibitor der γ -Glutamylcystein-Synthetase und bewirkt die Depletion von Glutathion (GSH) (Griffith & Meister, 1979). Zur Untersuchung der Auswirkung einer Depletion von Glutathion in Säugierzellen, wird eine frisch hergestellte und steril filtrierte Lösung von 1 mM BSO (in Nährmedium mit FCS) auf adhärenente Zellen aufgegeben. Man inkubiert 24 h im Brutschrank (37°C/5% CO_2) (Issels et al., 1985). Nach Beendigung der Inkubation wird die Lösung abgesaugt, verworfen und die Zellen zweifach mit kaltem PBSCMF gewaschen. Sie stehen zur weiteren Behandlung (z.B. Schädigung) zur Verfügung. Die Bestimmung der Steady-State-Spiegel oxidativer DNA-Modifikationen erfolgt unmittelbar nach dem Waschen der Zellen.

3.2.4.3.10 Behandlung mit Natriumselenit

Die Vorinkubation mit der anorganischen Selenoverbindung Natriumselenit findet vor der weiteren Behandlung bzw. Schädigung der Zellen statt. Eine steril filtrierte Lösung von 1 mM Natriumselenit (in Nährmedium mit FCS) wird auf mit 10 ml PBSCMF gewaschene adhärenente Zellen aufgegeben. Die Inkubation findet für 48 h im Brutschrank (37°C/5% CO₂) statt. Nach Beendigung der Inkubation wird die Lösung abgesaugt, verworfen und die Zellen zweifach mit PBSCMF gewaschen. Die Bestimmung der Steady-State-Spiegel erfolgt unmittelbar nach dem Waschen der Zellen.

3.2.4.3.11 Behandlung mit Ebselen

Ebselen, 2-Phenyl-1,2-benzisoselenazol-3(2H)-on, besitzt eine Aktivität als Glutathionperoxidase-Mimetikum (Müller et al., 1984; Wendel et al., 1984).

Eine steril filtrierte Lösung von 1 mM Ebselen (in Nährmedium mit FCS) wird auf mit 10 ml PBSCMF gewaschene adhärenente Zellen aufgegeben. Die Inkubation findet für 4 h im Brutschrank (37°C/5% CO₂) statt. Nach Beendigung der Inkubation wird die Lösung abgesaugt, verworfen und die Zellen zweifach mit PBSCMF gewaschen. Die Bestimmung der Steady-State-Spiegel erfolgt unmittelbar nach dem Waschen der Zellen. Nach Inkubation mit Ebselen kann auch eine Schädigung der Zellen folgen.

3.2.4.3.12 Bestimmung der Steady-State-Spiegel

Die Bestimmung von DNA-Modifikationen in ungeschädigten Säugerzellen erfolgt direkt nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBSCMF, Abtrypsinieren und Resuspendieren in Kulturmedium. Anschließend werden die Zellen in Kulturmedium auf die Filter der Alkalischen Elution aufgetragen.

3.2.4.3.13 Bestimmung der DNA-Reparatur in Säugerzellen

Nach Schädigung der Zellen und nachfolgenden zweifachem Waschen mit PBSCMF werden die noch adhärenente Zellen mit Nährmedium überschichtet und je nach Reparaturzeit (1-24 h) im Brutschrank (37°C/5% CO₂) inkubiert. Ungeschädigte Kontrollzellen und Zellen, die nicht reparieren sollen, werden im Eisbad bei 0°C aufbewahrt. Nach Beendigung der Reparaturzeit einzelner Proben wurden diese aus dem Brutschrank genommen und ebenfalls bei 0°C im Eisbad aufbewahrt, um die Reparatur zu diesem Zeitpunkt zu beenden.

3.2.4.4 Zellyse, Inkubation mit Endonukleasen, Elution der DNA

Polycarbonatfilter mit Durchmesser 25 mm und Porengröße 2 μm werden mit sterilem $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ angefeuchtet, in Swinnex-Filterhalter (Durchmesser 25 mm) eingespannt und luftblasenfrei mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gefüllt. Es wird zweimal mit je 2.5 ml PBSCMF gewaschen. Die Filterhalter werden über Schläuche mit der Mehrkanalpumpe verbunden und in einem temperierbaren Wasserbad inkubiert. Jeweils $1 \cdot 10^6$ geschädigte Zellen bzw. ungeschädigte Zellen (Kontrolle) werden über eine als Vorratsbehälter mit dem Filterhalter verschraubte 25ml-Einmalspritzenaußenhülle mit Luer-Lock-Anschluß bei 4°C mit maximaler Pumpgeschwindigkeit (80 ml/h) auf die Filter aufgebracht. Nach zweimaligem Waschen mit jeweils 2.5 ml eiskaltem PBSCMF werden bei 15-16°C 2 ml Lysepuffer mit maximaler Pumpgeschwindigkeit und bei 25°C 5 ml Lysepuffer mit 5 ml/h zur Zellyse durch die Filter gepumpt. Anschließend werden Reste des in der Filtereinrichtung verbliebenen Lysepuffers mit insgesamt 25 ml BE1-Puffer bei maximaler Pumpleistung entfernt. Zur Inkubation der auf den Filtern verbliebenen DNA mit Reparaturenendonukleasen wird die Temperatur des Wasserbades auf 37°C erhöht und jeweils 2 ml der Enzymlösungen unter den in **Tabelle 3.3** angegebenen Bedingungen zugesetzt. Zur Bestimmung von Einzelstrangbrüchen der DNA werden statt der Enzymlösung 2 ml BE1-Puffer ohne Zusatz von Endonukleasen eingesetzt. 0.5 ml der Enzym- bzw. Pufferlösungen wird mit einer Geschwindigkeit von 80 ml/h durch die Filter gepumpt, anschließend wird die Pumpenleistung auf 1 ml/h reduziert und 1 h lang gepumpt. Nach beendeter Enzyminkubation werden die Filter zweifach mit je 5 ml BE1-Puffer bei maximaler Geschwindigkeit gespült. In einem zweiten Lyseschritt wird die DNA bei 25°C zunächst mit 1.5 ml Lysepuffer/Proteinase K mit 80 ml/h, anschließend mit 2 ml Lysepuffer/Proteinase K mit 3 ml/h behandelt und mit insgesamt 25 ml BE1-Puffer und 4.5 ml Waschpuffer bei 80 ml/h gespült.

Tab. 3.3 Arbeitspuffer und Konzentrationen der Reparaturenendonukleasen für DNA-Schadensbestimmungen in Säugierzellen mit der alkalischen Elution

Reparaturenendonuklease	Arbeitspuffer	Enzymkonzentration
Fpg-Protein	BE1/BSA-Puffer	1 $\mu\text{g/ml}$
Fpg-Proteinrohextrakt	BE1/BSA-Puffer	700 ng/ml
Exonuklease III	TC/BSA-Puffer	100 U/ml
Endonuklease III	BE1/BSA-Puffer	10 ng/ml
Endonuklease IV	BE1/BSA-Puffer	1 $\mu\text{g/ml}$
T4 Endonuklease V	BE15/BSA-Puffer, modif.	30 ng/ml

Zur Elution der DNA werden 25 ml Elutionspuffer pH 12.1 in den Vorratsbehälter gefüllt. Bei 25°C und einer Elutionsgeschwindigkeit von 2.15 ml/h findet nach jeweils 2 Stunden ein Fraktionswechsel statt. Nach 10 h wird die Elution abgebrochen, die Filter aus den Filterhaltern entnommen und je mit der letzten Fraktion 2 h bei 60°C im Wasserbad geschüttelt, um die auf dem Filter zurückgebliebene DNA-Menge in Lösung zu bringen.

3.2.4.5 Fluorimetrische Bestimmung der DNA

Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes in den 5 Fraktionen wird jede Fraktion mit dem gleichen Volumen (4.3 ml) Phosphatpuffer I neutralisiert. Nach 15 min wird das gleiche Volumen (4.3 ml) Phosphatpuffer II/Bisbenzimid 33258 zugesetzt, durchmischt und 15 min bis zur fluorimetrischen Messung unter Lichtausschluß gelagert. Die Messung erfolgt durch Anregung des Bisbenzimid 33258-DNA-Komplexes bei 360 nm und Bestimmung der Emission bei 450 nm. Als Blindwert dient eine Mischung aus Elutionspuffer, Phosphatpuffer I und Phosphatpuffer II/Bisbenzimid 33258 in gleichen Volumenanteilen.

Der absolute DNA-Gehalt der Fraktionen und des Filters wird durch Vermessung einer Standardlösung aus 10 µg Kalbsthymus-DNA in 4.3 ml Elutionspuffer errechnet. Dazu werden 200 µl DNA-Standardlösung mit Elutionspuffer auf ein Volumen von 4.3 ml ergänzt und die Fluoreszenz unter den oben genannten Bedingungen bestimmt.

3.2.4.6 Auswertung der alkalischen Elution

Die Gesamtmenge der DNA in einer Probe nach 10 h Elutionsdauer ist die Summe der DNA-Menge der 5 Fraktionen (DNA_i) und des Filterwertes (DNA_F), man berechnet sie nach **Gleichung 3.4 (Pflaum 1996)**.

$$DNA_{i,F} = F \cdot V \quad (3.4)$$

- $DNA_{i,F}$: DNA-Gehalt der Fraktion i bzw. des Filters, in willkürlichen Einheiten
 F : relative Fluoreszenz der DNA-Lösung bei Anregungswellenlänge 360 nm und Emissionswellenlänge 450 nm
 V : Volumen der Filterfraktionen (4.3 ml) bzw. der in Lösung gebrachten DNA des Filters in ml

Mit **Gleichung 3.5** kann man nun den auf dem Filter verbliebenen Anteil der DNA (rel. DNA_n (%)) im Vergleich zur Gesamtmenge an DNA nach Elution der Fraktion n (n= 1 bis 5) bestimmen.

Bei graphischer Darstellung des DNA-Gehaltes des Filters in Abhängigkeit der Elutionsdauer verläuft die Elutionslinie im halblogarithmischen Maßstab idealerweise als Gerade. Voraussetzung dafür ist eine zufällige Verteilung der Läsionen in der DNA.

$$\text{rel. DNA}_n(\%) = \left(1 - \frac{\sum_{i=1}^n \text{DNA}_i}{\sum_{i=1}^5 \text{DNA}_i + \text{DNA}_F} \right) \cdot 100 \quad (3.5)$$

DNA_i : DNA-Gehalt der Fraktion i
 DNA_F : DNA-Gehalt des Filters nach der Elutionszeit 10h
 $\text{rel. DNA}_n(\%)$: DNA-Gehalt des Filters nach der Elution der n -ten Fraktion

Abbildung 3.11 zeigt die graphische Darstellung des Elutionsverhaltens der DNA von L1210-Mäuse-Leukämie-Zellen, die mit γ -Strahlung der Dosis 3 Gy behandelt wurden (**Pflaum 1996**).

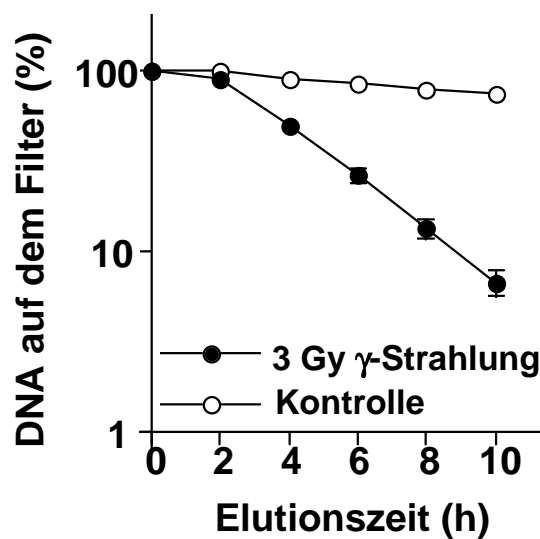


Abb. 3.11 Verlauf der alkalischen Elution von L1210-Maus-Leukämie-Zellen, geschädigt mit 3 Gy γ -Strahlung im Vergleich zur Kontrolle nach **Pflaum (1996)**.

Die Schädigung durch γ -Strahlung stellt einen Referenzschaden für die Bestimmung von DNA-Läsionen (direkte Einzelstrangbrüche und Endonuklease-sensitive Basenmodifikationen) mit der alkalischen Elution dar (**Kohn et al. 1976, Epe et al 1993, Pflaum 1996**). Nach **Kohn et al. (1973)** entstehen in L1210-Zellen $0.90 \cdot 10^{-9}$ Einzelstrangbrüche pro Nukleotid und rad (1 Gy = 100 rad). Die Differenz aus der Steigung der geschädigten und ungeschädigten Zellen im linearen Bereich des Elutionsverlaufs entspricht demnach einer Rate von 0.54 Einzelstrangbrüchen pro 10^6 Basenpaare.

Pflaum (1996) errechnete eine Steigung von $-0.251/2h$, entsprechend einer Strangbruchfrequenz von $0.54 \text{ ssb}/10^6 \text{ bp}$. Aus dieser Beziehung leitet sich **Gleichung 3.6** ab.

$$-\frac{1}{2h} = 2.2 \text{ ssb} / 10^6 \text{ bp} \quad (3.6)$$

Gleichung 3.6 wird zur Quantifizierung von DNA-Einzelstrangbrüchen und Endonuklease-sensitiven DNA-Modifikationen durch andere Schädigungsarten in Säugerzellen herangezogen.

3.2.4.7 Alkalische Schnell-Elution

Da die Alkalische Elution nur zur Quantifizierung von DNA-Schäden bis ca. 1.5 Strangbrüchen pro 10^6 bp nutzbar ist, wurde die normale Alkalische Elutionstechnik modifiziert, um auch größere Schäden der Bestimmung zugänglich zu machen. Durch Beschleunigung der Elutionsgeschwindigkeit im letzten Schritt auf 30.7 ml/h und eine Abnahme der Gesamtelutionszeit von 10 h auf 45 min erreicht man eine Abnahme der Sensitivität und Erhöhung des maximal detektierbaren DNA-Schadens. Alle 9 min findet ein Wechsel der Fraktionen statt, d.h. das Volumen der Fraktionen bleibt gleich.

Zur Auswertung dient auch die Schädigung durch γ -Strahlung (**Kohn et al. 1976, Epe et al. 1993**). **Ballmaier (1997)** ermittelte bei Bestrahlung von je 10^6 L1210-Zellen in Kulturmedium mit einer Cs137-Quelle (5.0-30.0 Gy) bei 0°C folgende Gleichung, mit der sich der Ausmaß des DNA-Schadens in Säugerzellen mit der schnellen Variante der Alkalischen Elution errechnen läßt:

$$-\frac{1}{2h} = 8.7 \text{ ssb} / 10^6 \text{ bp} \quad (3.7)$$

3.2.5 Zelltoxizitätstests

3.2.5.1 Plating efficiency

Zur Beurteilung der akuttoxischen Wirkung einer nach 3.2.4.3 durchgeführten Schädigung von adhärent wachsenden Säugerzellen werden die Zellen nach Schädigung unter sterilen Bedingungen bei genau bekannter und für alle Behandlungen identischer Zellzahl ($0.5 \cdot 10^6$ Zellen) im Vergleich zu ungeschädigten Zellen in je drei kleine Zellkulturflaschen ausgesät und mit Routinemedium kultiviert. Nach 48 h werden die Zellen gewaschen, trypsiniert und die Zelldichte bestimmt. Ungeschädigte Zellen zeichnen sich durch exponentielles Wachstum aus, bei geschädigten Zellen hingegen wird das exponentielle Wachstum erst nach einer Phase verzögerten Wachstums einsetzen, deren Dauer von der Stärke der Schädigung abhängt. Aus den Meßwerten der Zelldichte im Bereich des exponentiellen Wachstums wird eine Regressionsfunktion (Exponentialfunktion) berechnet. Der Schnittpunkt der Exponentialfunktion mit der Abszisse gibt die Zahl der teilungsfähigen Zellen bei Inkubationsbeginn (t_0) an. Als Maß für die toxische Wirkung der Behandlung wird der Quotient aus der Anzahl der teilungsfähigen Zellen nach Schädigung und der Anzahl der teilungsfähigen unbehandelten Zellen nach **Gleichung 3.8** bestimmt. Die Zellzahl der Kontrollzellen wird dabei gleich 100% definiert.

$$\text{überlebende Zellen (\%)} = \left(\frac{C_{\text{beh. Zellen}, t_0}}{C_{\text{Kontrolle}, t_0}} \right) \cdot 100 \quad (3.8)$$

$C_{\text{beh. Zellen}, t_0}$: Zelldichte der teilungsfähigen behandelten Zellen zum Zeitpunkt t_0
 $C_{\text{kontrolle}, t_0}$: Zelldichte der teilungsfähigen unbehandelten Zellen zum Zeitpunkt t_0

3.2.5.2 Cloning efficiency

Die adhärennten Zellen werden nach Schädigung abtrypsiniert und in Suspension gebracht. Unter sterilen Bedingungen und in identischer Zellzahl (500 Zellen) werden geschädigte und ungeschädigte Zellen in Petrischalen ausgesät und mit Routinemedium inkubiert. Für jede Probe kultiviert man 3 Petrischalen und inkubiert für 8 Tage erschütterungsfrei im Brutschrank ($37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$). Nach 8 Tagen wird das Medium entfernt, die Schalen vorsichtig mit 0.9%iger NaCl-Lösung gewaschen und die Zellkolonien für 15 min mit eiskaltem Methanol fixiert. Zur Anfärbung der Zellen behandelt man für 15 min mit Giemsa-Farbstofflösung, wäscht dann vorsichtig mit Wasser und nochmals mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$. Nach dem Trocknen der Platten kann man die Zellkolonien auszählen. Die Kolonienzahl der unbehandelten Zellen wird als 100% (maximale Überlebensrate) definiert. Kolonienzahlen geschädigter Proben werden auf diese 100% bezogen.

3.2.6 Mikrokerntest

3.2.6.1 Prinzip der Methode

Im Mikrokerntest wird der Einschluß chromosomaler Fragmente oder vollständiger Chromosomen in eine eigene, vom Hauptkern getrennte Kernmembran mikroskopisch quantifiziert. Mikrokerne kommen in den Zellen verschiedenster Gewebe und Organismen spontan vor, jedoch ist ihre Häufigkeit unter bestimmten Umständen erhöht, wie z.B. durch Einfluß bestimmter Xenobiotika oder bei Tumoren und sie können aus Chromosomenbrüchen resultieren. Sie werden als Maß für die Chromosomenschädigung angesehen.

Zur Bestimmung der Mikrokernfrequenz werden in Suspension gebrachte Zellen mit einer Zytocentrifuge auf Objektträger aufgebracht und die Präparate mindestens eine Stunde in Methanol bei -20°C fixiert. Nach Färbung der Präparate mit Fluoreszenzfarbstoffen wie Bisbenzimid Nr. 33258 oder auch Acridinorange und zweimaligem Waschen mit PBSCMF erfolgt die mikroskopische Auswertung. Erfasst werden dabei nur Strukturen, die eine geringere Größe als ca. 25% des Hauptkerns besitzen, deutlich getrennt vom Kern vorliegen und eine vergleichbare Färbung aufweisen.

3.2.6.2 Mikrokerninduktion in Kulturzellen

Nach Schädigung der adhärennten Zellen (siehe 3.2.4.3) werden die Zellen unter sterilen Bedingungen weiterkultiviert. Nach 24 Stunden werden die Zellen abgelöst und ein Tropfen mit Hilfe einer Zytocentrifuge in einer Zelldichte von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml auf einen Objektträger 4 min bei 1000 rpm aufgeschleudert. Für jede Probe werden 3 Objektträger präpariert. Man fixiert die aufgeschleuderten Zellen für mindestens 1 h in -20°C kaltem Methanol. In einer anderen Variante kultiviert man die Zellen (A253) nach der Schädigung, wie unter 3.2.4.3 beschrieben, unter sterilen Bedingungen weiter. Jedoch läßt man sie nun auf zuvor gereinigten und sterilisierten Deckgläsern in Petrischalen festwachsen. Nach einer Inkubationszeit von 24 h werden die Zellen ebenfalls bei -20°C in Methanol fixiert.

Zur Anfärbung der Zellen verwendet man einen Fluoreszenzfarbstoff, wie z.B. Acridinorange oder Bisbenzimid Nr. 33258. Ungefärbte, aber fixierte Zellpräparate können im gekühlten Methanol für längere Zeit aufbewahrt werden. Die Färbung der Zellen mit Acridinorange wird wegen des schnellen Ausbleichens der Acridinorange-Lösung erst unmittelbar vor der mikroskopischen Bestimmung des Anteils an Mikrokernen durchgeführt. Dazu werden die Objektträger bei Raumtemperatur und Dunkelheit 10 min in die Färbelösung aus 62.5 mg/l Acridinorange in Sørensen-Puffer gestellt und anschließend mit Sørensen-Puffer 15 min im Dunklen gewaschen. Der pufferbedeckte Objektträger wird sofort mit einem Deckglas eingedeckt und ausgewertet. Dazu werden im Fluoreszenz-Mikroskop mit Anregungsfilter 450 bis 490 nm pro Behandlungsart Mikrokernfrequenzen von drei Objektträgern untersucht.

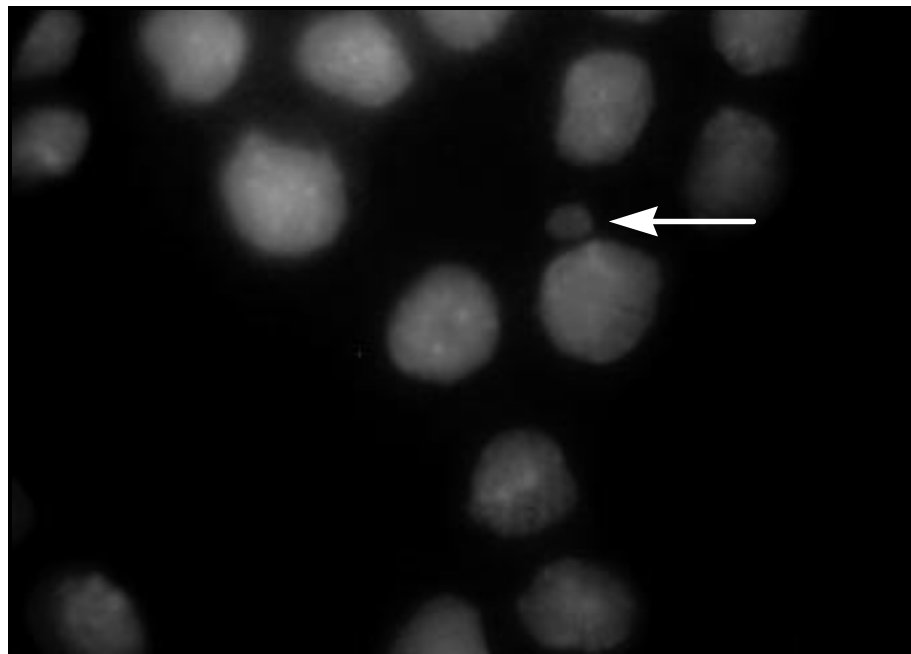


Abb. 3.12 Mikroskopische Aufnahme von AS52-Zellen mit Mikrokern (Pfeil). Die Färbung der DNA wurde mit Bisbenzimid Nr. 33258 durchgeführt.

Bei dieser Färbemethode erscheint die DNA im Zellkern und in den Mikrokernen als intensiv gelbgrüne Fläche, das umgebende Cytoplasma ist leuchtend rot gefärbt. Bei der Färbung mit Bisbenzimid ist nur die DNA blaßblau gefärbt und das Cytoplasma nicht sichtbar. Man untersucht jeweils 2000 Zellen auf die Anwesenheit von Mikrokernen.

3.2.7 HPLC-Analyse von 8-oxodG in DNA

Der Nachweis von 8-Hydroxy-desoxyguanosin erfolgt hier nach enzymatischer Totalhydrolyse der zu untersuchenden DNA. Eingesetzt werden pSV2-*gpt* und PM2 DNA.

3.2.7.1 Schädigung von pSV2-*gpt*- und PM2 DNA

3.2.7.1.1 Schädigung durch NDPO₂ in D₂O-Puffer

10 µg/ml PM2 DNA oder auch pSV2-*gpt* werden in 200 µl D₂O-Phosphatpuffer PP mit 0-40 mM NDPO₂ für 2 h bei 37°C unter Lichtausschluß im Wasserbad inkubiert. Nach abgeschlossener Schädigung wird das 2.5fache Volumen an Fällungspuffer hinzugegeben und zur Fällung der DNA die Proben für 30 min bei -20°C gelagert. Nach Zentrifugation der DNA für 10 min bei 12000 g und 4°C wird der Überstand entfernt und das Pellet in 100 µl TM-Puffer aufgenommen.

3.2.7.1.2 Schädigung durch BCBT + UV-A-Licht (360 nm)

10 µg/ml PM2 DNA oder auch pSV2-*gpt* werden in 200 µl Phosphatpuffer PP (I/2) mit 0-4 mM einer wäßrigen, frisch angesetzten Lösung von BCBT 7.5 min mit UV-A-Licht (360 nm) bestrahlt (6.75 kJ/m²). Die weitere Behandlung der Proben entspricht 3.2.7.1.1.

3.2.7.2 Enzymatische DNA-Totalhydrolyse

Die in TC-Puffer pH 8.0 aufgenommene DNA wird im folgenden mit DNase I (10 U/50 µg DNA), Alkalischer Phosphatase (500 mU/50 µg DNA), Phosphodiesterase II (*Spleen Exonuclease*, 0.5 mU/50 µg DNA) und Phosphodiesterase I (*Snake venom Exonuclease*, 25.0 mU/50 µg DNA) 2h im Wasserbad bei 37°C inkubiert (**Richter et al., 1988**; modifiziert nach **Harris et al., 1994**). Die DNA wird in einem Schritt gespalten. Das Hydrolysat wird im folgenden mittels HPLC/ECD untersucht.

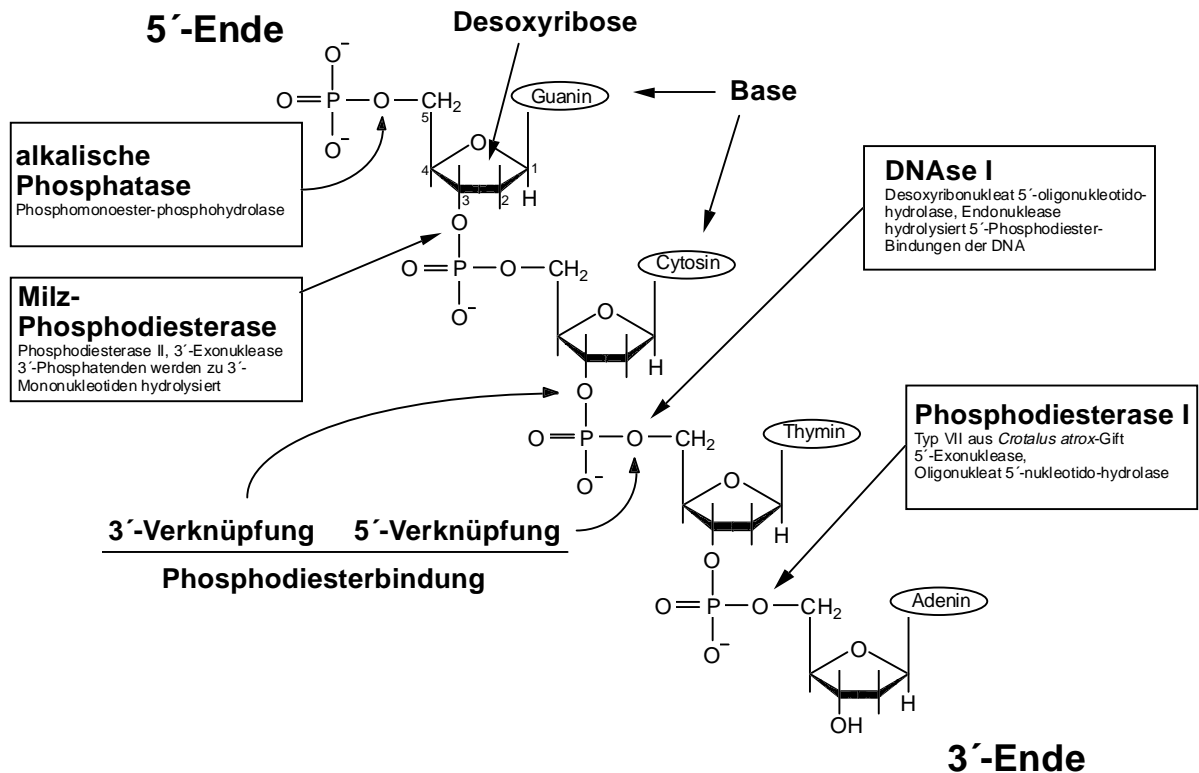


Abb. 3.13 Schematische Darstellung der enzymatischen Totalhydrolyse der DNA

3.2.7.3 HPLC-Auftrennung

Die Auftrennung der Proben erfolgt über eine RP-18-Säule (250 • 4 mm, 5 µm Korngröße) mit einer ODF Hypersil Vorsäule.

Als mobile Phase dient ein 5 % (vol/vol) Methanol enthaltender Phosphatpuffer (50 mM, pH 5.1) bei einer Flußrate von 1 ml/min. Die Proben werden bei Raumtemperatur injiziert und der Verlauf der Trennung über 12 Minuten durch Messung der Absorption durch einen UV-Detektor (290 nm) und ECD-Detektor mit coulometrischer Meßzelle (300 mM und 2nA, Voroxidation mit 100 mM) und angeschlossenem Computer und Auswerteprogramm (Power Chrom) verfolgt.

3.2.7.4 Auswertung der HPLC

Die Identifizierung und Quantifizierung des 8-oxodG erfolgt über das Produkt aus Peakhöhe und Halbwertsbreite im Vergleich zum Elutionspeak und der Retentionszeit einer Standardlösung mit bekanntem 8-oxodG-Gehalt. Die Anzahl 8-oxoG pro 10^6 bp berechnet sich nach **Gleichung 3.9**. Zur Bestimmung der Menge lysierter DNA dient der Vergleich der mittels UV-Detektor quantifizierten Menge an Guanosin und Thymin. Das T/G-Verhältnis für DNA des Plasmids pSV2-*gpt* beträgt 0,74.

$$C_{8\text{-oxoG}} = \frac{A_{\text{Probe}} \cdot n_{\text{Std.}} \cdot MW_{\text{bp}}}{A_{\text{Std.}} \cdot m_{\text{DNA}}} \quad (3.9)$$

$C_{8\text{-oxoG}}$: Anzahl 8-oxoG pro 10^6 bp
A_{Probe}	: Fläche des Probenpeaks (mm^2)
$A_{\text{Std.}}$: Fläche des Peaks des 8-oxoG-Standards (mm^2)
$n_{\text{Std.}}$: Stoffmenge des injizierten 8-oxoG-Standards (pmol)
m_{DNA}	: Menge an hydrolysiertes DNA pro injiziertem Ansatz (μg)
MW_{bp}	: Molekulargewicht eines Basenpaares (g/mol)

$$\frac{T}{G} = \frac{A_{\text{Thymidin}} / A_{\text{Guanosin}}}{n_{\text{Thymidin}} / n_{\text{Guanosin}}} \quad (3.10)$$

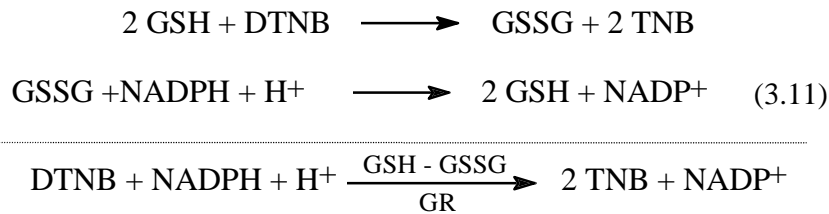
T / G	: Verhältnis von AT- zu CG-Basen
A_{Thymidin}	: Fläche des Thymidin-Peaks (mm^2)
A_{Guanosin}	: Fläche des Guanosin-Peaks (mm^2)
n_{Thymidin}	: Stoffmenge des injizierten Thymidin-Standards (pmol)
n_{Guanosin}	: Stoffmenge des injizierten Guanosin -Standards (pmol)

3.2.8 Photometrische GSH-Bestimmung, modifiziert nach Ellman

Den intrazellulären Gehalt an Gesamt-Glutathion ($[\text{GSH}] + 2 \times [\text{GSSG}]$) bestimmt man kolorimetrisch durch die enzymatische Bestimmung nach **Griffith (1985)**. Die Bestimmung ist angelehnt an die Methode von **Owens & Belcher (1965)**. Nach Absaugen des Mediums von in der logarithmischen Wachstumsphase befindlichen Zellen werden diese zweifach mit 10 ml PBSCMF gewaschen, trypsiniert und in 4°C kaltem PBSCMF aufgenommen und zentrifugiert (150 g, 8 min, 4°C). Das Zellpellet wird nun in TCA-Puffer mit einer Zelldichte von 10^7 Zellen/ml aufgenommen. Die auf Eis aufbewahrten Zellen werden anschließend mit Hilfe eines Ultraschall-Homogenisators (35 W, 3×20 Impulse, 12000 U/min) lysiert. Man entfernt feste Zellbestandteile durch Zentrifugation bei 2°C für 10 min bei 12000 U/min. Der Überstand wird in ein sauberes Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Man vermischt nun 10-40 μl durch Zugabe von 700 μl NADPH-Puffer, 100 μl DTNB-Farbstofflösung (*Ellman's Reagens*) und $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ bis zu einem Gesamtvolumen von 1.0 ml. Nach Zugabe von 5 μl einer Lösung von GSH-Reduktase wird durch Auf- und Abziehen der Pipette gemischt. Man mißt die Änderung der Absorption bei 412 nm gegen Luft in Abhängigkeit von der Zeit ($\Delta A / \Delta t$ [in min]). Der Gesamtgehalt an Glutathion wird mit Hilfe einer Eichgeraden bestimmt. Die Ermittlung der Eichgeraden erfolgt vor jeder Messung mit 10-40 μl der frisch hergestellten GSH-Standardlösung (Bestimmung von 1-4 nmol GSH) ebenfalls durch Bestimmung von $\Delta A / \Delta t$ [in min].

Dem Assay liegen folgende Reaktionen zugrunde:



GSH reagiert nicht-enzymatisch mit DTNB zu GSSG und 2-Nitro-5-Thiobenzoessäure (TNB). GSSG wird enzymatisch durch NADPH und Glutathion-Reduktase (GR) zu GSH reduziert, welches wiederum reagieren kann. Die Konzentrationen an DTNB, NADPH und GR werden so gewählt, daß die Reaktionsgeschwindigkeit linear proportional zur Konzentration des Gesamt-Glutathions ist. Die Bildung von TNB wird spektrophotometrisch bei 412 nm vermessen und der Assay kalibriert.

3.2.9 Immunoblotting in primären Mausfibroblasten und A253-, A253CW14G- und A253CW16G-Zellen

3.2.9.1 Vorbereitung der Proben

Das Kulturmedium der in einer großen Zellkulturflasche (250 cm²) vorhandenen, subkonfluenten, adhärenen Zellkultur wird zunächst abgesaugt. Die Zellen werden zweifach mit 10 ml PBSCMF gewaschen. Mit Hilfe eines Gummischabers werden die Zellen vorsichtig vom Plastikboden der Zellkulturflasche gelöst. Durch Zugabe von 250-500 µl Lysepuffer, dem vorher die Proteinaseinhibitoren Leupeptin (10 µg/ml), Antipain (1 µg/ml) und Aprotinin (10 µg/ml) zugesetzt wurden, entsteht eine Zellsuspension, die in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt wird. Durch mehrfaches Auf- und Absaugen mit einer Pipette werden die Zellen vereinzelt und durch die im Lysepuffer vorhandenen oberflächenaktiven Substanzen lysiert. Die Proben werden immer auf Eis gelagert. Es folgt eine Zentrifugation der Proben bei 4°C für 2-3 min bei 12000 U/min. Der Überstand wird zur Bestimmung des Proteingehalts und Western-Blot-Analyse verwendet.

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration des Zellysats erfolgt unter Verwendung von Biorad-Farbreakenzlösung bei Messung bei 595 nm unter Kalibrierung mit Rinderserumalbumin.

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

3.2.9.2.1 Prinzip der Methode

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit ihrer Größe. Zur Dissoziation der Proteine wird vor dem Auftragen auf das Gel das anionische Detergenz SDS in Verbindung mit einem Reduktionsmittel und hoher Temperatur verwendet. Die denaturierten Proteine binden das SDS und erhalten dadurch eine negative Ladung. Da die Menge an gebundenem SDS proportional zum Molekulargewicht des Proteins und unabhängig von der Aminosäuresequenz ist, wandern die SDS-Protein-Komplexe in Abhängigkeit von der Größe des Proteins durch das Gel. Durch Verwendung von Markern mit bekanntem Molekulargewicht ist eine Abschätzung der Molekülgröße der zu untersuchenden Proteine möglich.

Durch Anlegen einer Spannung bewegen sich die Komplexe aus SDS und Protein der aufgetragenen Proteinmischung entlang einer wandernden pH- und Ionenstärke-Grenze. Eine verbesserte Auflösung wird dadurch erreicht, daß sich die Komplexe zunächst an den Grenzschicht zwischen Auftrage- und Trenngel anreichern. Chloridionen aus der Probe und dem Auftragegel bilden zunächst die Front der wandernden Grenze. Glycin-Moleküle stellen das Ende der sich durch das Gel bewegenden Substanzen dar. Die Ablegung der Proteine auf der Oberfläche des Trenngels erfolgt dazwischen, im Bereich niedriger Leitfähigkeit und eines steilen Spannungsgradienten. Durch Ionisierung des Glycins im Trenngel, bedingt durch den höheren pH-Wert, wandern die Glycinionen durch die abgelagerten Protein unmittelbar hinter den Chloridionen durch das Trenngel. Die SDS-Protein-Komplexe bewegen sich nun unabhängig von der vorauslaufenden Grenzschicht in einem Bereich gleicher Spannung und gleichen pH-Wertes und werden durch den Siebeffekt des Trenngels nach ihrer Größe aufgetrennt.

3.2.9.2.2 Durchführung der Methode

Die Glasplatten mit den Spacern werden in die Apparatur eingespannt und der untere Spalt wird mit Separationsgel verschlossen. Dazu werden bei Verwendung eines Trenngels mit 15%igem Polyacrylamidanteil, entsprechend einem linearen Trennbereich von 12 bis 43 kDa, die folgenden Lösungen in der angegebenen Reihenfolge gemischt (nach jeder Zugabe wird sorgfältig durchmischt): 3.5 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$, 7.5 ml 30%iger Acrylamidmix (Rotiporese[®] Gel 30), 3.75 ml 1.5 M Tris pH 8.8, 150 µl SDS (10%ig), 150 µl Ammoniumpersulfat (10%ig, frisch hergestellt) und 6 µl TEMED. Nach der letzten Zugabe wird das Gemisch in die Kammer gegossen. Es wird vorsichtig mit Isobutanol überschichtet Die Polymerisation ist nach circa 30-45 min abgeschlossen. Ein flüssiger Überstand aus nicht polymerisiertem Acrylamid wird mit Hilfe eines saugfähigen Papierfilters entfernt. Zur Herstellung des Auftragegels werden 3.4 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ mit 850 µl 30%igem Acrylamidmix (Rotiporese[®] Gel 30), 630 µl 1 M Tris pH 6.8, 50 µl 10% SDS, 50 µl 10% Ammoniumpersulfat und

5 µl TEMED gemischt. Die Lösung wird in den Spalt zwischen den beiden Glasplatten, über das bereits ausgehärtete Trenngel gegossen. Es wird nur bis ca. 1 cm unterhalb der Zähne des Kammes aufgefüllt. Nach 30 min ist die Polymerisation beendet und der Kamm wird vorsichtig entfernt. Anschließend wird Kammerpuffer in die obere und untere Kammer gefüllt.

Vor dem Auftragen auf das Gel wird die im SDS-Auftragepuffer gelöste Probe mit den Proteinen im Heizblock 3 min bei 100°C denaturiert, ebenso eine Probe, die Markerproteine mit bekannten Molekulargewichten enthält. Jeweils eine Tasche wird mit 28 µl der denaturierten Proteinproben, die ungefähr 20-30 µg Gesamtprotein entsprechen, gefüllt. Es werden auch verschiedene Verdünnungen der Probe aufgetragen (1:1, 1:2 und 1:4). Die elektrophoretische Trennung erfolgt in der Minigel-Appartur mit einer konstanten Spannung von 200 V für ca. 45-60 min. Wenn die Farbstofffront das Ende des Trenngels erreicht hat, ist die Trennung beendet.

Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran (Western Blot, siehe 3.2.9.3), wird das Gel zur Färbung der Proteine 4 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Schüttelpult in Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung bewegt. Anschließend wird die Färbelösung durch Entfärbelösung ersetzt und diese innerhalb von 18 bis 24 Stunden mehrmals ausgetauscht. Das Gel wird auf einem Lichttisch mit Hilfe einer digitalen Kamera, Computer und Bildanalyseprogramm (Molecular Analyst[®]) photographiert.

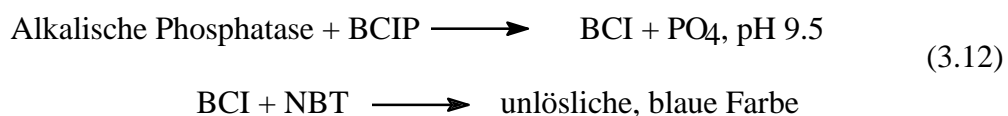
3.2.9.3 Western-Blotting und Immundetektion

Burnette (1981) und **Towbin et al, (1979)** stellten erstmals eine Technik vor, bei der elektrophoretisch getrennte Proteine aus einem Trenngel auf einen Trägerfilter, z.B. aus Nitrocellulose, übertragen wurden. Die Membran wurde im Anschluß an den Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen das gesuchte Protein inkubiert, welcher mit Hilfe eines gegen diesen Antikörper gerichteten spezifischen monoklonalen Antikörper detektiert werden kann. Der zweite Antikörper führt im alkalischen pH-Bereich zu einer auf der Membran beobachtbaren Farbreaktion.

Zur Durchführung wird die Membran aus Cellulosenitrat auf exakte Größe des Trenngels zugeschnitten und in kühlem Transferpuffer ca. 15-30 min durch langsames Eintauchen im Winkel von 45° in Tourbin-Puffer equilibriert. Dabei ist auf eine komplette Befeuchtung des Gels und die Vermeidung von Luftbläschen zu achten. Nun werden in folgender Reihenfolge auf die Anodenelektrode der Semidry-Blot-Appartur 2 Lagen equilibriertes Whatman-Blottingpapier, die befeuchtete Membran, das ungefärbte, befeuchtete Trenngel der SDS-Gelelektrophorese und 2 Lagen equilibriertes Blottingpapier aufgeschichtet. Dabei ist darauf zu achten, daß nach jeder Lage sorgfältig alle Luftbläschen mit einer über das Papier gerollten Pipette zu entfernen sind. Die umliegende Flüssigkeit wird entfernt und vorsichtig die Kathode auf den Sandwich gelegt und das Gerät mit dem Deckel verschlossen. Der Transfer der Proteine aus dem Gel in die Nitrocellulose-Membran erfolgt nun für ca. 30 min bei 15 V (entsprechend einer Gelgröße von ca. 7×8 cm). Nach dem Transfer wird die Kathoden-

elektrode vorsichtig entfernt und die oberen Schichten des Blottingpapiers entfernt. Blot und Gel werden entnommen und das Gel mit Coomassie Brilliant Blue-Färbelösung (siehe 3.2.9.2.2) gefärbt und photographiert. Der Blot kann zur Überprüfung des Transfers für ca. 1 min mit Ponceau-S-Färbung reversibel gefärbt und dann gründlich mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ oder TBS-T-Puffer entfärbt werden. Es kann nun direkt die Immunodetektion erfolgen oder die Membran kann, eingeschweißt in Plastikfolie, für einige Monate bei -20°C gelagert werden.

Die Membran wird zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen zunächst mit 5% Trockenmilch (in TBS-T Puffer) für 1 h auf dem Schüttelpult bewegt. Es wird einfach für 15 min und zweifach je 5 min mit TBS-T Puffer gewaschen. Es folgt die Inkubation mit dem 1. Antikörper, der gegen das gesuchte Protein, das Protein p53, gerichtet ist. Als 1. Antikörper dient der gereinigte Mouse Monoclonal Antibody, p53 Tumor Suppressor Protein Ab-3 (Clone BP53-12, Neomarkers Laboratory, Freemont, CA, USA) in einer Konzentration von 1:1000 (in 5% Trockenmilch in TBST). Der Antikörper erkennt das humane p53-Protein und reagiert sowohl mit der mutant- als auch wild-typ-Form unter denaturierenden und nicht-denaturierenden Bedingungen. Das Epitop liegt im N-Terminus (aa 20-25) des p53 Onkoproteins. Man inkubiert luftblasenfrei in einer eingeschweißten Plastikfolie für 1 h auf dem Schüttelpult. Erneut wird einmal 15 min und zweifach je 5 min mit TBS-T Puffer gewaschen. Es folgt die Inkubation mit dem 2. Antikörper, der gegen den 1. Antikörper gerichtet ist. Eingesetzt wird eine 1:5000fache Verdünnung von Goat-anti-Mouse IgG (konjugiert mit Alkalischer Phosphatase, Kriegaard & Perry Laboratories Inc, Gaithersburg, MD, USA) in 5% Trockenmilch. Man wäscht nachfolgend wieder einmal für 15 min und zweifach je 5 min mit TBS-T Puffer. Die Detektion erfolgt nach Inkubation mit dem 2. Antikörper mittels einer Alkalischen-Phosphatase-Reaktion durch Zugabe einer Färbelösung (BCIP/NBT-Tablette (5-Brom-4-chlor-indolyl-phosphat/Nitroblautetrazoliumsalz), gelöst in 10 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$). Folgende Reaktionen laufen ab:



Die Nitrozellulosemembran wird unter Lichtausschluß solange in der Färbelösung inkubiert, bis die spezifisch angefärbten, blau-violett erscheinenden Proteinbanden deutlich zu erkennen sind. Die gefärbte Membran wird auf einem Lichttisch photographiert.

4 Ergebnisse

4.1 Steady-State-Spiegel oxidativer DNA-Modifikationen in Säugerzellen

Wie in der Einleitung (Kap. 2.1) findet man in allen Zellen als Ausdruck des Fließgleichgewichts zwischen Bildung und Reparatur gewisses Ausmaß oxidativer DNA-Schäden (Steady-State-Spiegel), für deren Entstehung endogen vorhandene reaktive Sauerstoffspezies (ROS) (siehe Kap. 2.1) von großer Bedeutung sind. Die Bestimmung der Steady-State-Spiegel kann mit Hilfe von Reparaturenukleasen erfolgen, die als Sonden zur Erkennung spezifischer DNA-Modifikationen dienen.

4.1.1 Quantifizierung Fpg- und T4 Endonuklease V-sensitiver Modifikationen in zellulärer DNA durch Alkalische Elution

Mit Hilfe der Alkalischen Elution (siehe Kap. 3.2.4) sollten die in verschiedenen Zellen vorhandenen Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver DNA-Schäden, also von DNA-Modifikationen, die von Fpg-Protein erkannt werden (siehe Kap. 2.4.3), untersucht werden. Zur Bestimmung Fpg-sensitiver Modifikationen in zellulärer DNA wurde im folgenden ein Proteinrohextrakt des Fpg-Proteins, der von **Will (1999)** hergestellt wurde, eingesetzt. Die Bestimmung der Enzymaktivität des Fpg-Proteins und der Sättigungsbereich der Erkennung von Basenmodifikationen durch Fpg-Protein erfolgt in AS52-Zellen nach Schädigung mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022 und sichtbarem Licht (siehe Kap. 3.2.4.3.1). Zur Quantifizierung des DNA-Schadens wurden verschiedene Konzentrationen der Fpg-Präparation verwendet. Nach **Abbildung 4.1** ist von einer Sättigung der Enzymreaktion und damit einer vollständigen Erkennung induzierter Läsionen bei einer Konzentration von 0.5 bis 1 µg/ml auszugehen. Über 1 µg/ml treten verstärkt Einzelstrangbrüche auf, bedingt durch unspezifische Endonuklease-Aktivität (Daten nicht gezeigt). Die Messung des induzierten Schadens durch hochgereinigtes Fpg-Protein ergab gleiche Werte für das durch den Photosensibilisator induzierte Schadensausmaß.

Abbildung 4.2 zeigt die lineare Zunahme von DNA-Schäden, nämlich der mit Hilfe der Alkalischen Elution gemessenen Einzelstrangbrüche und T4 Endonuklease V-sensitiven Modifikationen, nach Bestrahlung mit UV-B-Licht (siehe Kap. 3.2.4.3.3) durch Zellkulturflaschen aus Polystyrol. Das Plastikmaterial absorbiert dabei die UV-C-Strahlung vollständig.

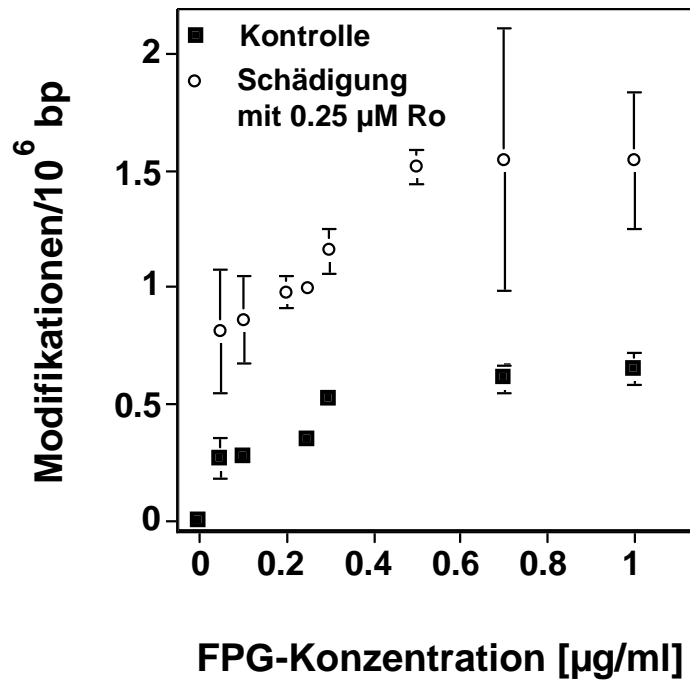


Abb. 4.1 Erkennung von mit durch 0.25 µM Ro 19-8022 und 166 kJ/m² sichtbarem Licht induzierten DNA-Modifikationen mit verschiedenen Konzentrationen des Fpg-Rohextraktes mit Hilfe der Alkalischen Schnell-elutionstechnik. Dargestellt sind Kontrollwerte in AS52 und Endonuklease-sensitive Modifikationen, die um die Anzahl der Einzelstrangbrüche korrigiert wurden (ESS). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3-4 Bestimmungen ± S.D.

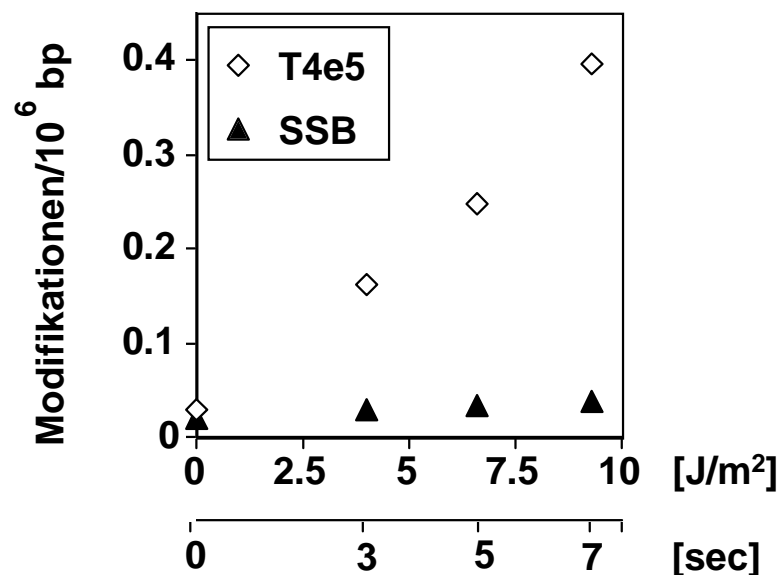


Abb. 4.2 Induktion von Einzelstrangbrüchen und T4 Endonuklease V-sensitiven Modifikationen in AS52-Zellen nach Bestrahlung mit 0-9.2 kJ/m² UV-B-Licht mit Hilfe der Alkalischen Elutionstechnik.

4.1.2 Bestimmung des Steady-State-Spiegel oxidativer DNA-Modifikationen in verschiedenen Säugerzellen

Wie bereits beschrieben, sind in allen Zellen Steady-State-Spiegel oxidativer DNA-Schäden durch verschiedene Bestimmungsmethoden, wie HPLC/ECD, GC/MS, ^{32}P -Postlabeling, Einzelzellgelelektrophorese („Comet-Assay“, SCGE), Alkaline unwinding, Nick-Translation und Alkalische Elution, nachweisbar (Kasai et al., 1986, Nackerdien et al. 1992, Collins et al., 1993, Devanaboyaina and Gupta 1996, Pflaum et al. 1997, Kasai et al. 1997, Helbock et al. 1998). Die Bestimmung der Steady-State-Spiegel in verschiedenen Zelllinien erfolgte in dieser Arbeit mit Hilfe der Alkalischen Elution in Kombination mit verschiedenen, als Sonden eingesetzten DNA-Reparaturenendonukleasen (siehe 3.2.4). Durch verschiedene Reparaturenendonukleasen erkannte DNA-Modifikationen werden in sog. DNA-Schadensprofilen dargestellt.

Abbildung 4.3 zeigt ein zelluläres Schadensprofil ungeschädigter, vorkonfluenter AS52-Zellen. Fpg-sensitive Modifikationen dominieren das Schadensprofil unbehandelter AS52-Zellen, während Endonuklease III-, T4-Endonuklease-V-, Endonuklease IV- und Exonuklease III-sensitive Läsionen in sehr geringer, aber nahezu gleicher Anzahl vorliegen. Nach den bisher bekannten Erkennungsspektren dieser Enzyme handelt es sich bei den Fpg-sensitiven Modifikationen um 8-Hydroxyguanin oder Fapy-Guanin, bei den durch Endo III, T4 Endo V, Endo IV und Exo III erkannten DNA-Basenmodifikationen um AP-Läsionen. Einzelstrangbrüche treten ebenfalls in geringer Zahl auf.

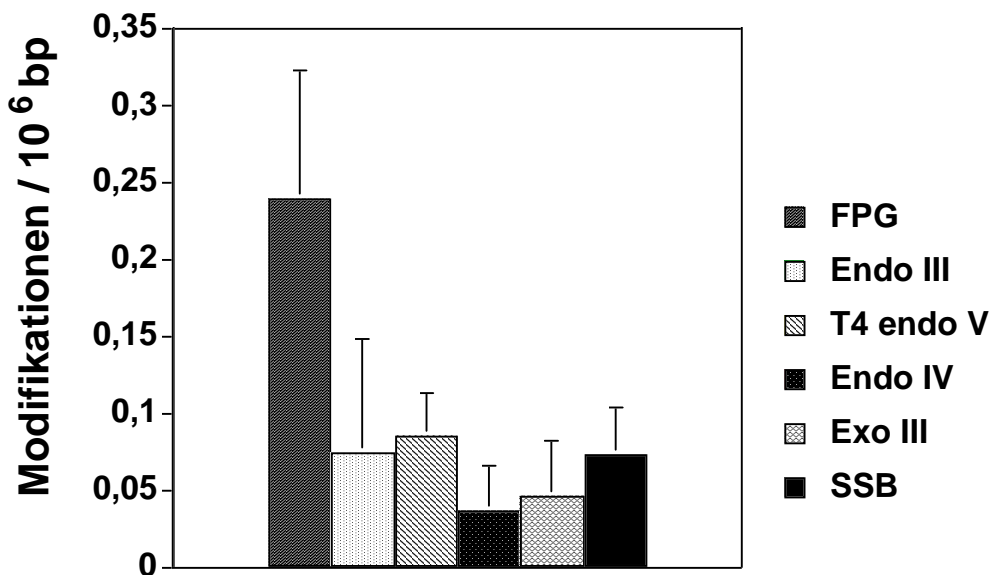


Abb. 4.3 Steady-State-Spiegel von verschiedenen Endonuklease-sensitiven DNA-Modifikationen und DNA-Einzelstrangbrüchen in unbehandelten AS52-Zellen. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Alkalischen Elution. Die eingesetzten Enzymkonzentrationen sind in Tab. 3.3 aufgeführt. Dargestellt sind Endonuklease-sensitive Modifikationen, die um die Anzahl der Einzelstrangbrüche korrigiert wurden (ESS). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2-7 Bestimmungen \pm S.D.

Tabelle 4.1 zeigt die Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen in verschiedenen Zelllinien. Die Anzahl der bestimmten oxidativen, Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen schwankt zwischen 0.13 und 0.29 pro 10^6 bp.

Tab. 4.1 Anzahl an Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen in verschiedenen, unbehandelten Säugerzellen unterschiedlicher Herkunft, bestimmt durch Alkalische Elution. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus mindestens 4 unabhängigen Bestimmungen \pm S.D.

Zelllinie	Fpg-sensitive Modifikationen pro 10^6 bp	Zellart
AS52	0.24 ± 0.08	CHO-Zellen
A252	0.24 ± 0.06	humane Spinaliom-Zellen
A253CW14G, Klon 1	0.15 ± 0.04	humane Spinaliom-Zellen, transfiziert mit hp53-cDNA
A253CW14G, Klon 2	0.24 ± 0.08	humane Spinaliom-Zellen, transfiziert mit hp53-cDNA
A253CW16G	0.25 ± 0.08	humane Spinaliom-Zellen, v.o. transfiziert
HaCaT	0.15 ± 0.06	humane Keratinozyten
HeLa	0.13 ± 0.01	humane Zervixkarzinomzellen

4.2 Einfluß des intrazellulären Glutathion-Spiegels auf oxidative DNA-Schäden in Säugerzellen

Die wichtigste Rolle unter den zellulären nichtenzymatischen Antioxidantien spielt Glutathion (GSH) und seine Thiol-Vorstufen (**Meister & Anderson, 1983; Meister, 1985**). Im folgenden wird der Einfluß einer Veränderung des GSH-Spiegels durch Präinkubation mit einem Inhibitor der GSH-*de novo*-Synthese, BSO, auf oxidative DNA-Schäden untersucht.

4.2.1 Einfluß der GSH-Depletion auf Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen

Zur Untersuchung des Einflusses der Glutathion-Depletion wurden zunächst Steady-State-Spiegel ermittelt. Wie **Abbildung 4.4** zeigt, wird durch eine 24stündige Präinkubation mit 1 mM BSO (siehe 3.2.4.3.9) der Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen im Vergleich zu unbeeinflussten AS52-Zellen bei 37°C signifikant ($p < 0.005$) von 0.2 auf ca. 0.3 Fpg-sensitive Läsionen pro 10^6 bp erhöht. Dies entspricht einer Steigerung um etwa 50%. Während eine Inkubation bei 40°C noch keine meßbaren Auswirkungen auf den Steady-State-Spiegel hat, erhöht die Kultivierung der Zellen bei 41°C den Steady-State-Spiegel oxidativer, Fpg-sensitiver Läsionen signifikant ($p < 0.005$) um ca. 50%. Findet die Inkubation mit 1 mM BSO bei 41°C statt, erhöht sich der Steady-State-Spiegel auf ca. 0.55 Fpg-sensitive Modifikationen pro 10^6 bp, also im Vergleich zu dem Wert unbeeinflusster Zellen bei 37°C um das ca 2,7fache (statistisch signifikant, $p < 0.005$). Interessanterweise stellt man bei der

Bestimmung Fpg-sensitiver Modifikationen von bei 41°C inkubierten Zellen, nach einer „Erholungsphase“ von 4 h bei 37°C, fest, daß diese weiterhin einen signifikant erhöhten ($p < 0.025$) Steady-State-Spiegel aufweisen.

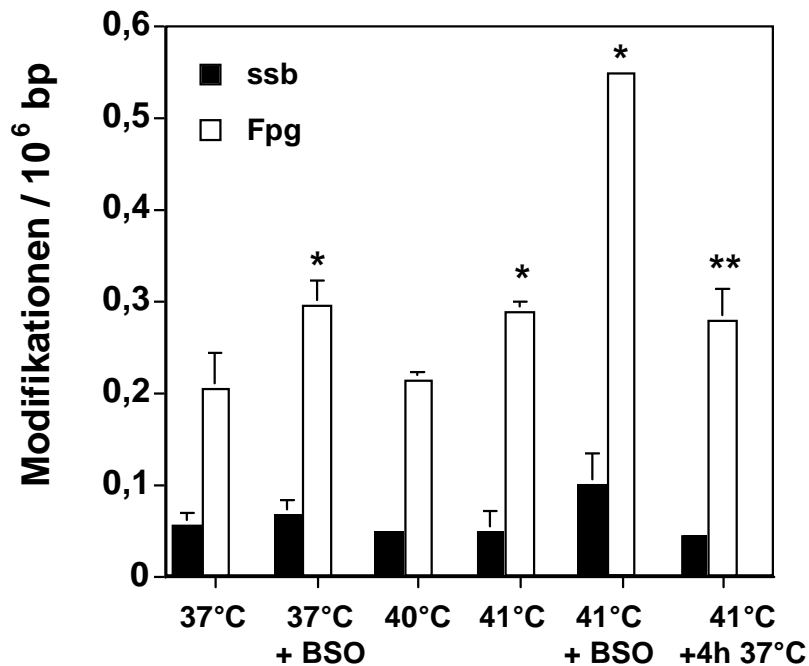


Abb. 4.4 Einfluß von BSO und Temperaturerhöhung (40°C, 41°C) auf den Steady-State-Spiegel in AS52-Zellen. Die Inkubation bei 40°C bzw. 41°C erfolgte für 16 h. Die Präinkubation mit 1mM BSO erfolgte für 24h. Dargestellt sind Endonuklease-sensitive Modifikationen, die um die Anzahl der Einzelstrangbrüche korrigiert wurden (ESS). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2-9 Bestimmungen \pm S.D. (* $p < 0.005$ gegenüber den Kontrollzellen; ** $p < 0.025$ gegenüber den Kontrollzellen bei 37°C, siehe Text)

4.2.2 Einfluß der GSH-Depletion auf den Gehalt an Gesamt-Glutathion

Abbildung 4.5 zeigt die Abnahme des Gesamt-Glutathion-Spiegels (Summe der reduzierten und oxidierten Form; $[GSH] + 2 \times [GSSG]$) unter dem Einfluß von BSO. Durch Präinkubation mit 300 μ M BSO bei 37°C für die Dauer von 24 h sinkt der intrazelluläre Gehalt an Gesamt-Glutathion um ca. 86% von ca. 5.6 nmol Gesamt-Glutathion pro 10⁶ Zellen (Kontrolle) auf 0.86 nmol pro 10⁶ Zellen. Die Präinkubation mit 1 mM BSO für den gleichen Zeitraum bewirkte eine Senkung um 95% auf ca. 0.3 nmol/10⁶ Zellen. Die Inkubation mit 1 mM BSO bei 41°C senkt den Glutathion-Gehalt auf nahezu Null (0.007 nmol/10⁶ Zellen).

Den **Abbildungen 4.4** und **4.5** ist zu entnehmen, daß der Gehalt an intrazellulärem Glutathion in gleichem Maße abnimmt, wie der Steady-State-Spiegel in BSO-präinkubierten Zellen zunimmt. Der Effekt verstärkt sich durch Inkubation bei erhöhten Temperaturen (40°C und 41°C), die eine verstärkte endogene oxidative Belastung darstellen.

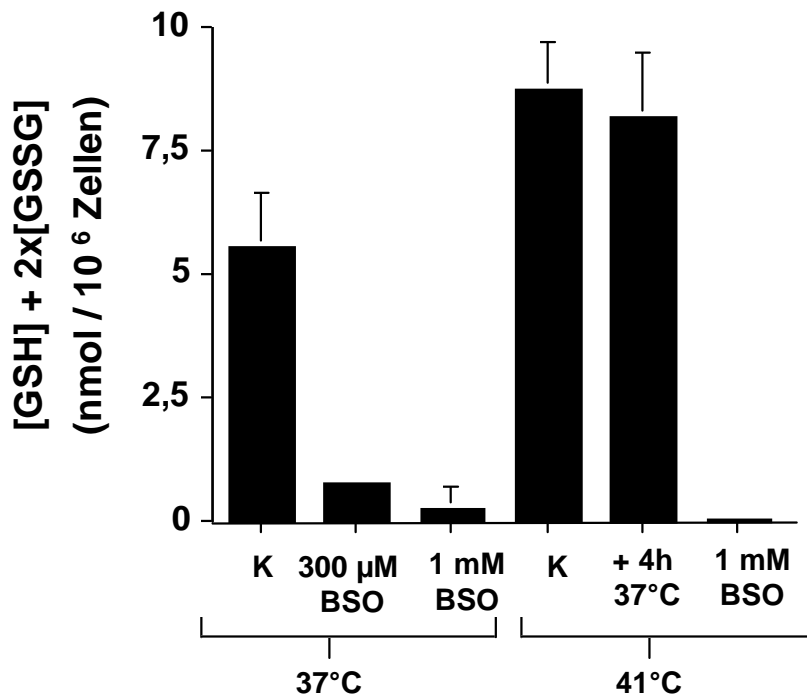


Abb. 4.5 Einfluß von BSO und Temperaturerhöhung (41°C) auf den Gehalt an Gesamt-Glutathion in AS52-Zellen. Die Inkubation bei 41°C erfolgt für 16 h. * BSO-Präinkubation (1mM) für 24h. Enzymatische Bestimmung, nach **Griffith, 1985** (siehe 3.2.8). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2-5 Bestimmungen \pm S.D.

4.2.3 Toxizität der Behandlung mit BSO

Tabelle 4.2 zeigt den Einfluß der Präinkubation mit BSO auf die Vermehrungsfähigkeit von AS52-Zellen („plating efficiency“, siehe 3.2.5.1). Die Inkubation mit BSO bei 37°C scheint keinen toxischen Effekt auf die Zellen auszuüben, während bei 41°C bereits ca. 50% der Zellen ihre Teilungsfähigkeit verlieren. Die Präinkubation mit BSO bei einer erhöhten Temperatur von 41°C reduziert die Zahl wachstumsfähiger Zellen auf 37%. Die „plating efficiency“ unbehandelter Kontrollzellen, die bei 37°C kultiviert werden, wird als 100% definiert.

Tab. 4.2 Toxizität („Plating efficiency“) der Inkubation von AS52 bei 41°C und Toxizität des BSO. * Die „plating efficiency“ von Kontrollzellen bei 37°C wird als 100% definiert.

Inkubation	Überlebende Zellen
37°C	100 \pm 0 % *
37°C + BSO	93.1 \pm 15.3 %
41°C	50.7 \pm 11.6 %
41°C + BSO	36.6 \pm 19.6 %

4.2.4 Einfluß der GSH-Depletion auf die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Ro 19-8022 + Licht

Ro 19-8022 induziert nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht (Halogenlampe) durch Generierung von Singulett-Sauerstoff die Bildung oxidativer, Fpg-sensitiver DNA-Modifikation in hohem und die Bildung von Einzelstrangbrüchen in geringerem Ausmaß (Will et al., 1999a). Um den Einfluß der Glutathion-Depletion (vgl. Kap. 3.2.4.3.9) auf die Empfindlichkeit gegenüber der Schädigung mit dem Photosensibilisator zu bestimmen, wurden die Zellen 24 h lang mit 1 mM BSO im Brutschrank bei 37°C vorinkubiert. Kontrollzellen werden analog, jedoch ohne Zusatz von BSO zum Medium inkubiert. Anschließend werde in Abwesenheit von BSO mit Ro 19-8022 und Licht geschädigt.

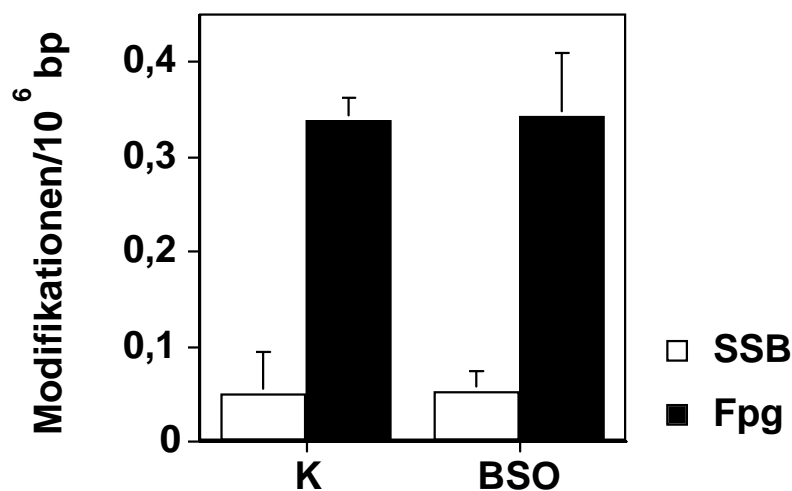


Abb. 4.6 Einfluß einer Präinkubation mit 1 mM BSO (24h, 37°C) auf die Induzierbarkeit von DNA-Schäden durch 50 nM Ro 19-8022 + sichtbares Licht (166 kJ/m²) in AS52-Zellen. K gibt die Induzierbarkeit in AS52-Zellen ohne Präinkubation mit BSO an. Die Kontrollwerte ungeschädigter Zellen (mit und ohne Präinkubation mit BSO) wurden abgezogen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 5 Bestimmungen \pm S.D.

Wie aus **Abbildung 4.6** ersichtlich entsteht durch die Schädigung ein DNA-Schaden von 0.05 ± 0.04 Einzelstrangbrüchen und 0.34 ± 0.02 Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen pro 10^6 bp mit und ohne Präinkubation mit BSO. Die GSH-Depletion scheint also keinen Einfluß auf das Ausmaß der durch Ro 19-8022 induzierten Schäden zu besitzen.

4.2.5 Einfluß der GSH-Depletion auf die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch sichtbares Licht

Auch sichtbares Licht alleine ist in der Lage oxidative DNA-Schäden zu induzieren (Pflaum et al., 1994). Vermutlich werden die dabei entstehenden Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen über Sauerstoff-vermittelte Typ I und II-Photooxidationsprozesse gebildet. Im folgenden wurde getestet, ob eine Depletion von Gesamt-Glutathion einen Einfluß auf die Suszeptibilität von AS52-Zellen gegenüber einer Schädigung mit sichtbarem Licht (450 kJ/m²) hat.

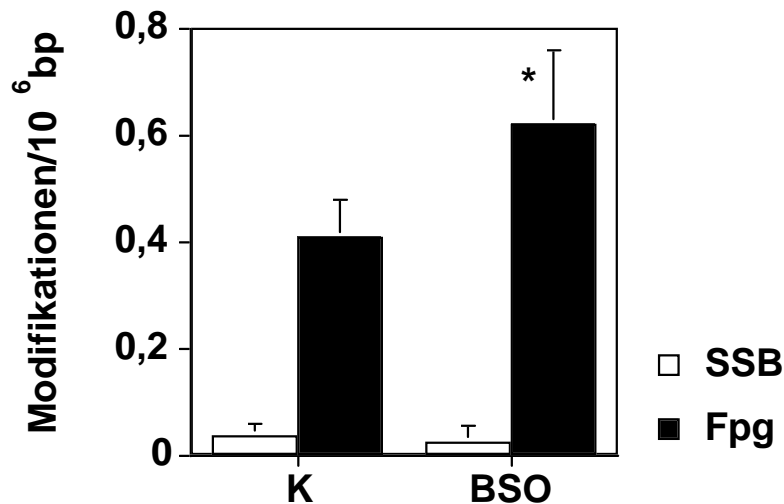


Abb. 4.7 Einfluß einer Präinkubation mit 1 mM BSO (24h, 37°C) auf die Induzierbarkeit von DNA-Schäden durch sichtbares Licht (450 kJ/m²) in AS52-Zellen. K gibt die Induzierbarkeit in AS52-Zellen ohne Präinkubation mit BSO an. Die Kontrollwerte ungeschädigter Zellen (mit und ohne Präinkubation mit BSO) wurden abgezogen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 5 Bestimmungen ± S.D. (*p<0.05 gegenüber den Kontrollzellen)

Die Zellen wurden analog 4.2.2 mit 1 mM BSO im Brutschrank vorinkubiert. Kontrollzellen wurden ohne Zusatz von BSO zum Medium inkubiert. Die Schädigung erfolgte in Abwesenheit von BSO mit sichtbarem Licht (siehe Kap. 3.2.4.3.2).

Man kann erkennen, daß die durch sichtbares Licht induzierten Fpg-sensitiven Modifikationen in GSH-depletierten Zellen im Vergleich zu nicht vorbehandelten Zellen signifikant (p<0.05) um ca. 50% erhöht sind. Ein Einfluß der Präinkubation mit BSO auf die Generierung von Einzelstrangbrüchen durch sichtbares Licht ist dagegen nicht zu messen.

4.2.6 Einfluß der GSH-Depletion auf die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Breitband-UV-B-Licht

Wie in der Einleitung bereits beschrieben (siehe Kap. 2.1.2.5) kann UV-B-Strahlung Cyclobutanpyrimidindimere und auch freie Radikale bilden, die zur Entstehung oxidativer DNA-Basenmodifikationen führen (Kielbassa, 1996; Kielbassa et al., 1997). Die Bildung Fpg-sensitiver Läsionen erfolgt hierbei vermutlich durch direkte Anregung des Guanin.

Die Zellen wurden 24 h lang mit 1 mM BSO im Brutschrank bei 37°C vorinkubiert. Kontrollzellen wurden wiederum ohne Zusatz von BSO zum Medium inkubiert. Anschließend bestrahlt man in Abwesenheit von BSO mit 6.55 J/m² Breitband-UV-B-Licht (siehe 3.2.4.3.3). Die durch Bestrahlung mit UV-B-Licht entstehenden Pyrimidindimere können in der Alkalischen Elution durch die Reparaturenendonuklease T4 Endonuklease V erkannt werden. Wie die in **Abb. 4.8** dargestellten Ergebnisse zeigen, hat die GSH-Depletion keinen Einfluß auf die Entstehung T4 EndoV-sensitiver Modifikationen durch 6.55 J/m² UV-B-Licht.

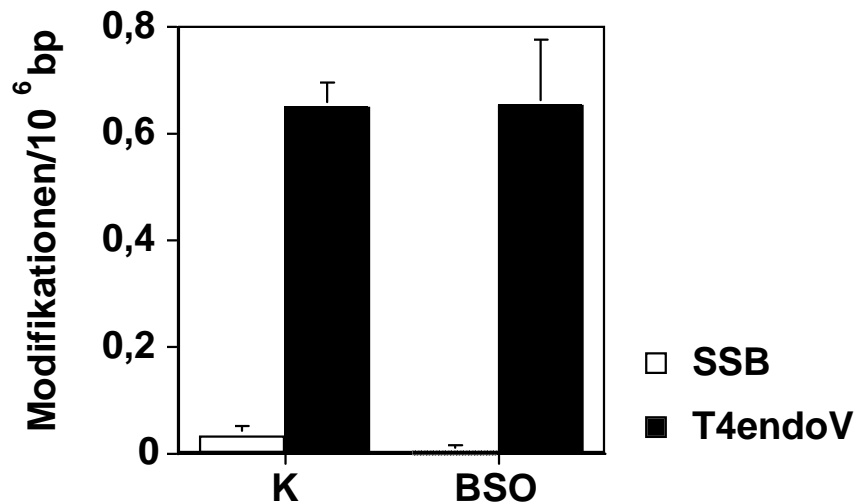


Abb. 4.8 Einfluß einer Präinkubation mit 1 mM BSO (24h, 37°C) auf die Induzierbarkeit von DNA-Schäden durch UV-B-Strahlung (6.55 J/m^2) in AS52-Zellen. K gibt die Induzierbarkeit in AS52-Zellen ohne Präinkubation mit BSO an. Die Kontrollwerte ungeschädigter Zellen (mit und ohne Präinkubation mit BSO) wurden abgezogen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 4 Bestimmungen \pm S.D.

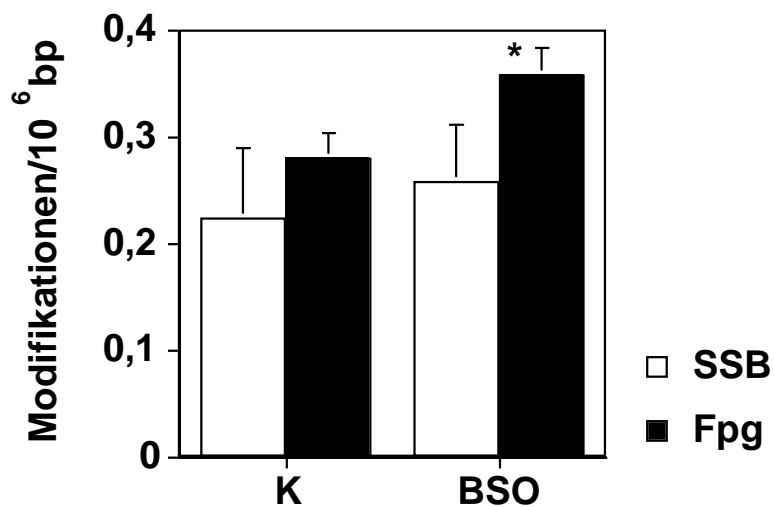


Abb. 4.9 Einfluß einer Präinkubation mit 1 mM BSO (24h, 37°C) auf die Induzierbarkeit von DNA-Schäden durch UV-B-Strahlung (1.1 kJ/m^2) in AS52-Zellen. K gibt die Induzierbarkeit in AS52-Zellen ohne Präinkubation mit BSO an. Die Kontrollwerte ungeschädigter Zellen (mit und ohne Präinkubation mit BSO) wurden abgezogen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 4 Bestimmungen \pm S.D. (* $p < 0.05$ gegenüber den Kontrollzellen)

Abb. 4.9 zeigt die durch 1.1 kJ/m^2 UV-B entstandenen Fpg-sensitiven Modifikationen und Einzelstrangbrüche. Beide Läsionen entstehen ungefähr im Verhältnis 5:3 (Fpg-sensitive Läsionen : Einzelstrangbrüche). Entstandene T4 Endo V-sensitive Läsionen entziehen sich der Meßbarkeit. Zellen, die mit 1 mM BSO für 24 h vorinkubiert werden, zeigen ein um ca. 15% singifikant ($p < 0.025$) erhöhtes Maß an Einzelstrangbrüchen und eine 30%ige Erhöhung der Fpg-sensitiven Modifikationen.

4.3 Einfluß von Selen auf oxidative DNA-Schäden und Mikrokerne in Säugerzellen

Selen stellt eine Vorstufe zur Bildung Selen-abhängiger Glutathionperoxidasen dar, die für die Entgiftung von Peroxiden eine wichtige Rolle spielen (vgl. Kap. 2.3.2). Da die menschliche Nahrung in vielen Teilen der Welt einschließlich Deutschland zu wenig Selen enthält, um eine optimale Funktion der Glutathionperoxidase zu gewährleisten, sind die Auswirkungen einer Selendefizienz bzw. Supplementierung auf die oxidativen DNA-Schäden von großem Interesse. Da auch Zellkulturmedium in der Regel nur unzureichende Mengen Selen enthalten, ist es leicht möglich die Wirkung von Selen in Zellkultur zu untersuchen (Leist et al., 1996).

4.3.1 Einfluß von Natriumselenit auf Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen

Zunächst wurde die Wirkung der anorganischen Selen-Verbindung Natriumselenit auf die basalen Steady-State-Spiegel, intrazellulären Glutathion-Spiegel und die Teilungsfähigkeit in ansonsten unbehandelten AS52-Zellen untersucht. Die Vorinkubation mit Natriumselenit erfolgt für 48 h in mit FCS komplettierten Medium im Brutschrank (vgl. Kap. 3.2.4.3.10).

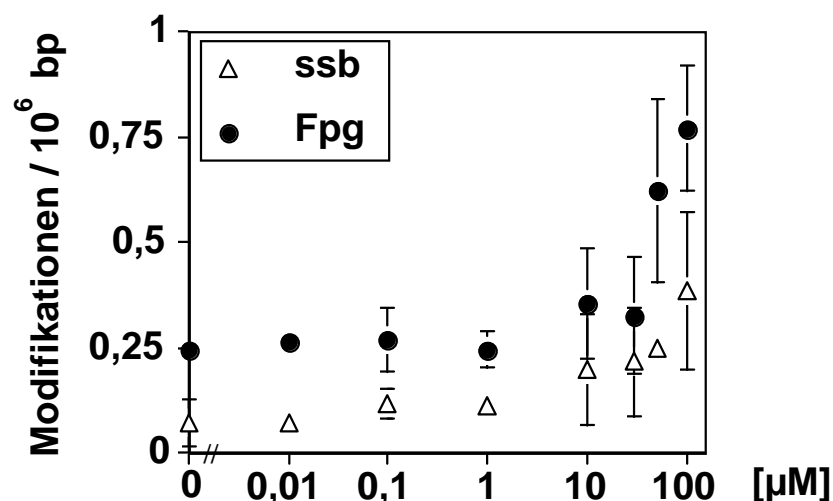


Abb. 4.10 Einfluß von Natriumselenit auf den Steady-State-Spiegel in AS52-Zellen. Die Präinkubation mit Natriumselenit erfolgte für 48 h im Brutschrank bei 37°C. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Alkalischen Elution. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2-5 Bestimmungen \pm S.D.

Abbildung 4.10 zeigt den Verlauf von Einzelstrangbrüchen (SSB) und Fpg-sensitiven Modifikationen in Abhängigkeit der Konzentration an Natriumselenit in AS52-Zellen. Man kann erkennen, daß sich bis zu einer Konzentration von 30 µM Natriumselenit keinerlei Effekte auf den Steady-State-Spiegel zeigen. Ab einer Konzentration von 50 µM ist der Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver Modifikationen und Einzelstrangbrüche in AS52-Zellen um das 3-5fache (Inkubation mit 100 µM Natriumselenit) erhöht. Dies deutet auf einen prooxidativen Effekt des Natriumselenit hin.

4.3.2 Einfluß von Natriumselenit auf den Gehalt an Gesamt-Glutathion

Ab einer Konzentration von 100 μM Natriumselenit zeigt sich gleichzeitig mit der Erhöhung des Steady-State-Spiegels Fpg-sensitiver Modifikationen eine Zunahme des Spiegels an Gesamt-Glutathion ($[\text{GSH}] + 2 \times [\text{GSSG}]$) um $210 \pm 14\%$ im Vergleich zur Kontrolle, die nicht mit Natriumselenit behandelt wurde (**Abbildung 4.11**).

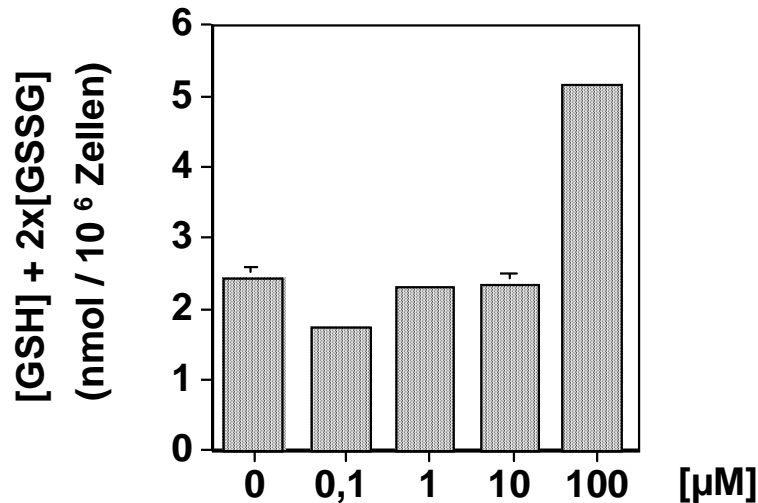


Abb. 4.11 Einfluß von Natriumselenit auf den Gehalt an Gesamt-Glutathion ($[\text{GSH}] + 2 \times [\text{GSSG}]$) in AS52-Zellen. Die Inkubation erfolgt für 48 h bei 37° . Enzymatische Bestimmung, nach **Griffith, 1985** (siehe 3.2.8). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen \pm S.D.

4.3.3 Toxizität der Behandlung mit Natriumselenit

In Abhängigkeit der Konzentration an Natriumselenit zeigt sich auch ein Effekt auf die Überlebensfähigkeit der Zellen. Bei einer Präinkubation mit 100 μM Natriumselenit überleben nur 14% der Zellen. Starke Effekte werden ab einer Konzentration von 30 μM Natriumselenit beobachtet.

Tab. 4.3 Toxizität („plating efficiency“) der Inkubation von AS52 mit Natriumselenit (48 h, 37°C). # Die „plating efficiency“ von Kontrollzellen bei 37°C wird als 100% definiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen \pm S.D.

Natriumselenit (μM)	Rel. Plating efficiency [%]
0	100 \pm 0 #
0.01	77 \pm 7
0.1	103 \pm 14
1	98 \pm 11
10	95 \pm 26
30	77 \pm 0
50	33 \pm 1
100	14 \pm 1

4.3.4 Einfluß von Ebselen auf Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen

Der Einfluß der Organoselenverbindung Ebselen, die eine Glutathionperoxidase-artige Wirkung besitzt (vgl. Kap. 2.3.2) auf die Steady-State-Spiegel, intrazelluläre Glutathion-Spiegel und die Teilungsfähigkeit in AS52-Zellen wird im folgenden gezeigt. Die Vorinkubation mit Ebselen erfolgt für 4 h in mit FCS komplettierten Medium im Brutschrank (vgl. Kap. 3.2.4.3.11).

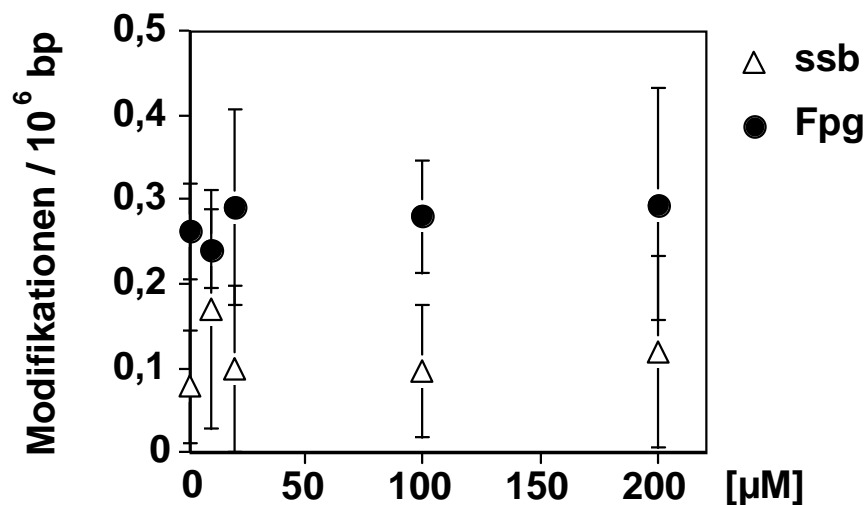


Abb. 4.12 Einfluß von Ebselen auf den Steady-State-Spiegel in AS52-Zellen. Die Vorinkubation mit Ebselen erfolgt für 4 h im Brutschrank bei 37°C. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Alkalischen Elution. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen \pm S.D.

In **Abbildung 4.12** ist der Verlauf von Einzelstrangbrüchen (SSB) und Fpg-sensitiven Modifikationen in Abhängigkeit der inkubierten Konzentration an Ebselen in AS52-Zellen dargestellt. Ebselen zeigt bis zu einer Konzentration von 200 μ M keine signifikanten Auswirkungen auf den Steady-State-Spiegel.

4.3.5 Einfluß von Ebselen auf den Gehalt an Gesamt-Glutathion

Wie aus **Abb. 4.13** erkennbar, verändert sich nach 4-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Ebselen der Spiegel an Gesamt-Glutathion ($[GSH]+2\times[GSSG]$) nicht.

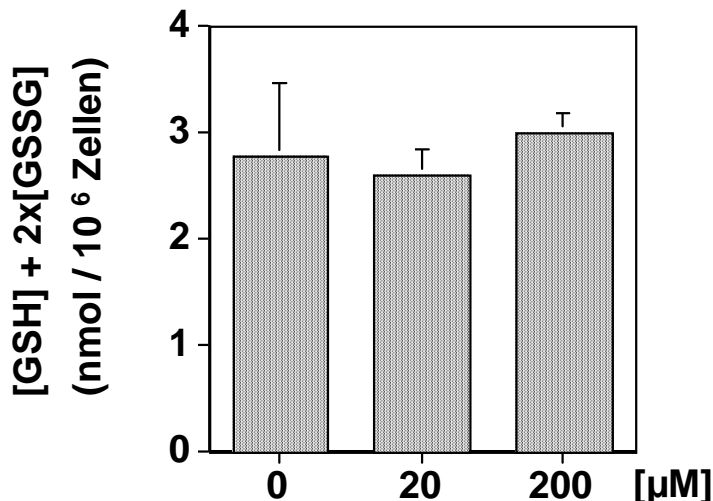


Abb. 4.13 Einfluß von Ebselen auf den Gehalt an Gesamt-Glutathion ($[GSH]+2\times[GSSG]$) in AS52-Zellen. Die Inkubation erfolgt für 4 h bei 37°C. Enzymatische Bestimmung, nach **Griffith, 1985** (siehe 3.2.8). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2-4 Bestimmungen \pm S.D.

4.3.6 Toxizität der Behandlung mit Ebselen

Tabelle 4.4 zeigt, daß auch die „plating efficiency“ als Maß für die Toxizität nach der Inkubation mit Ebselen kaum von der Kontrolle abweicht. Ebselen ist deshalb für AS52-Zellen bis zu einer Konzentration von 200 μ M als nicht-toxisch einzustufen.

Tab. 4.4 Toxizität („plating efficiency“) der Inkubation von AS52 mit Ebselen (4 h, 37°C). # Die „plating efficiency“ von Kontrollzellen bei 37°C wird als 100% definiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen \pm S.D.

Ebselen (μ M)	Rel. Plating efficiency [%]
0	100 \pm 0 *
10	113 \pm 19
20	105 \pm 6
100	122 \pm 11
200	118 \pm 20

4.3.7 Einfluß von Natriumselenit und Ebselen auf die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Ro 19-8022 + Licht

Nachdem in 4.3.1 und 4.3.2 der Einfluß von Natriumselenit und Ebselen auf den Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver Modifikationen und von Einzelstrangbrüchen gezeigt wurde, soll nachfolgend die Beeinflussung der Induktion Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen durch verschiedene Agentien dargestellt werden.

Als Modellsubstanz zur Induktion oxidativer Schäden diene zunächst der Photosensibilisator Ro 19-8022 und Bestrahlung mit sichtbarem Licht (siehe 3.2.4.3.2).

Die Zellen wurden im Falle des Natriumselenits für 48 h mit 0.1 bzw. 1 μM , im Falle des Ebselen für 4 h mit 20 bzw. 200 μM vorinkubiert (vgl. Kap. 3.2.4.3.10 und 3.2.4.3.11). Anschließend wurde bei Abwesenheit der Selenverbindungen mit Ro 19-8022 + Licht geschädigt (vgl. Kap. 3.2.4.3.1).

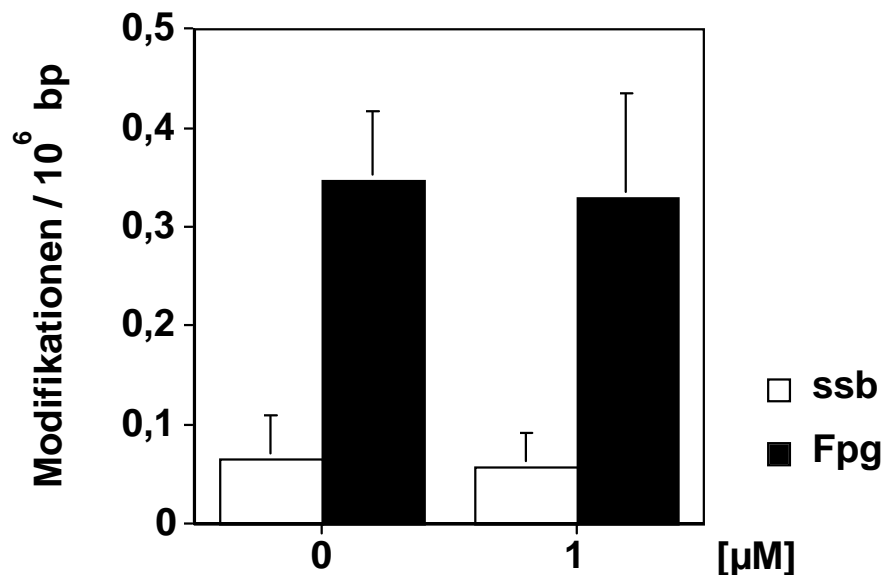


Abb. 4.14 Einfluß einer Präinkubation mit 1 μM Natriumselenit (48h, 37°C) auf die Induzierbarkeit von DNA-Schäden durch 100 nM Ro 19-8022 + sichtbares Licht (166 kJ/m^2) in AS52-Zellen. Die Kontrollwerte ungeschädigter Zellen (mit und ohne Präinkubation) wurden abgezogen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen \pm S.D.

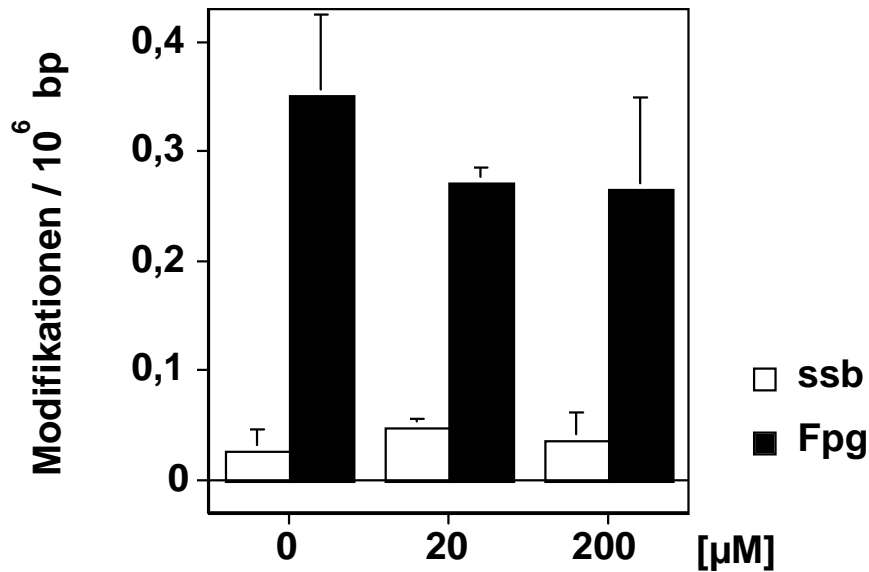


Abb. 4.15 Einfluß einer Präinkubation mit 20 und 200 µM Ebselen (4h, 37°C) auf die Induzierbarkeit von DNA-Schäden durch 100 nM Ro 19-8022 + sichtbares Licht (166 kJ/m²) in AS52-Zellen. Die Kontrollwerte ungeschädigter Zellen (mit und ohne Präinkubation) wurden abgezogen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen ± S.D.

Sowohl Natriumselenit (**Abb. 4.14**) als auch Ebselen (**Abb. 4.15**) vermögen nicht, durch Ro 19-8022 + Licht induzierte Fpg-sensitive Modifikationen oder Einzelstrangbrüche signifikant ($p > 0.05$) zu reduzieren.

4.3.8 Einfluß von Natriumselenit und Ebselen auf die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch sichtbares Licht

Der Einfluß von Natriumselenit und Ebselen auf die Induzierbarkeit oxidativer DNA-Schäden wurde auch mit sichtbarem Licht alleine untersucht.

Nach Vorinkubation mit Selenit oder Ebselen erfolgte die Schädigung mit sichtbarem Licht nach Kap. 3.2.4.3.2.

Die Ergebnisse (**Abb. 4.16** und **4.17**) zeigen, daß auch die Fpg-sensitiven Modifikationen, die durch sichtbares Licht in den AS52-Zellen induziert werden, durch Vorinkubation mit Natriumselenit oder Ebselen kaum beeinflusst werden. Die Einzelstrangbrüche, die jedoch nur in sehr kleiner Zahl gebildet werden, werden andererseits durch Vorinkubation mit Natriumselenit gesenkt. Rechnerisch ergibt sich eine „negative“ Zahl, bedingt durch eine geringere Anzahl an Einzelstrangbrüchen nach der Induktion mit sichtbarem Licht im Vergleich zu ungeschädigten Zellen, die mit Natriumselenit und Ebselen behandelt wurden. Die Senkung der Zahl induzierter Einzelstrangbrüche durch Ebselen ist tendenziell erkennbar. Man kann jedoch annehmen, daß die Bildung von Einzelstrangbrüchen durch sichtbares Licht nahezu komplett verhindert wird.

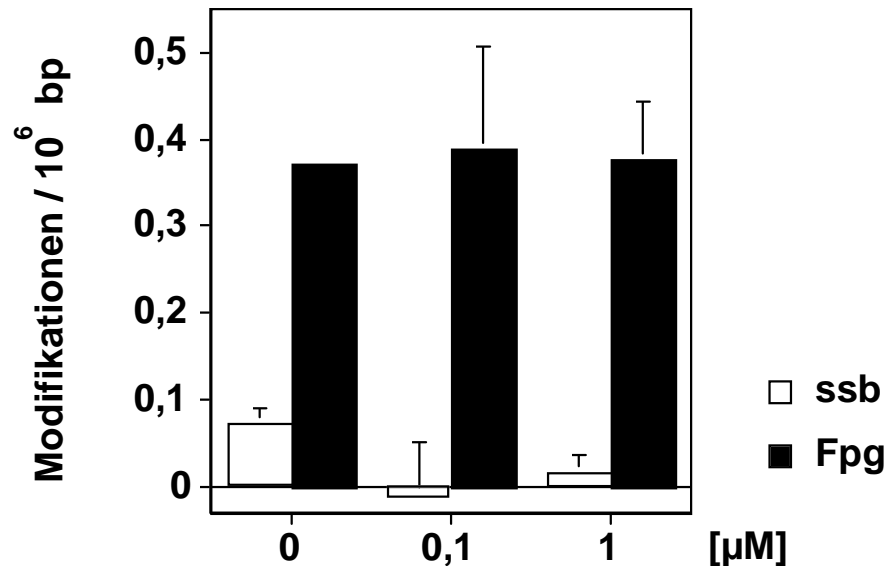


Abb. 4.16 Einfluß einer Präinkubation mit 0,1 und 1 µM Natriumselenit (48h, 37°C) auf die Induzierbarkeit von DNA-Schäden durch sichtbares Licht (450 kJ/m²) in AS52-Zellen. Die Kontrollwerte ungeschädigter Zellen (mit und ohne Präinkubation) wurden abgezogen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen ± S.D.

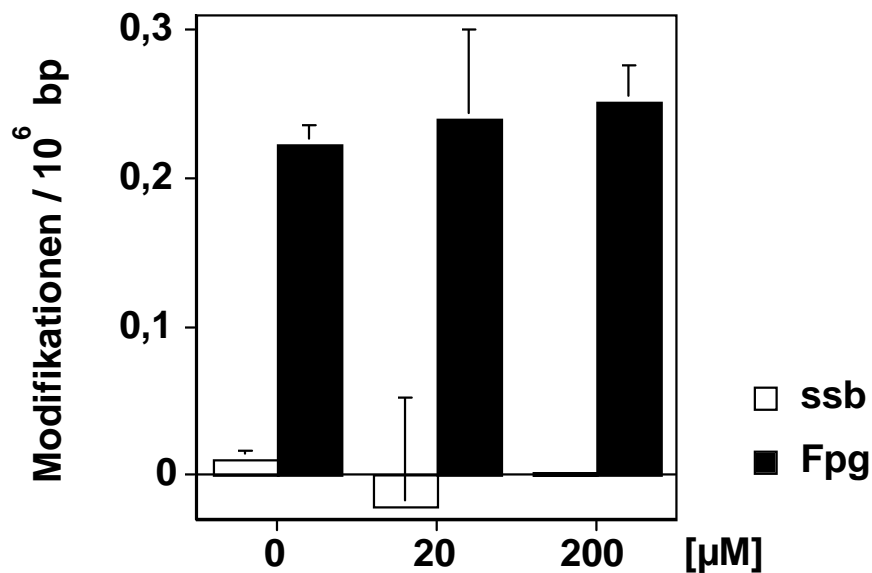


Abb. 4.17 Einfluß einer Präinkubation mit 20 und 200 µM Ebselen (4h, 37°C) auf die Induzierbarkeit von DNA-Schäden durch sichtbares Licht (450 kJ/m²) in AS52-Zellen. Die Kontrollwerte ungeschädigter Zellen (mit und ohne Präinkubation) wurden abgezogen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen ± S.D.

4.3.9 Einfluß von Natriumselenit und Ebselen auf die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Breitband-UV-B-Licht

Die Zellen wurden 48 h lang mit 0,1 bzw. 1 μM Natriumselenit oder 4 h mit 20 bzw. 200 μM Ebselen im Brutschrank bei 37°C vorinkubiert. Kontrollzellen wurden ohne Zusatz zum Nährmedium inkubiert. Anschließend bestrahlte man Breitband-UV-B-Licht (vgl. Kap. 3.2.4.3.3). Die Zahl induzierter T4-Endonuklease-V-sensitiver Modifikationen lag zu hoch für die Bestimmbarkeit mit Hilfe der Alkalischen Elution.

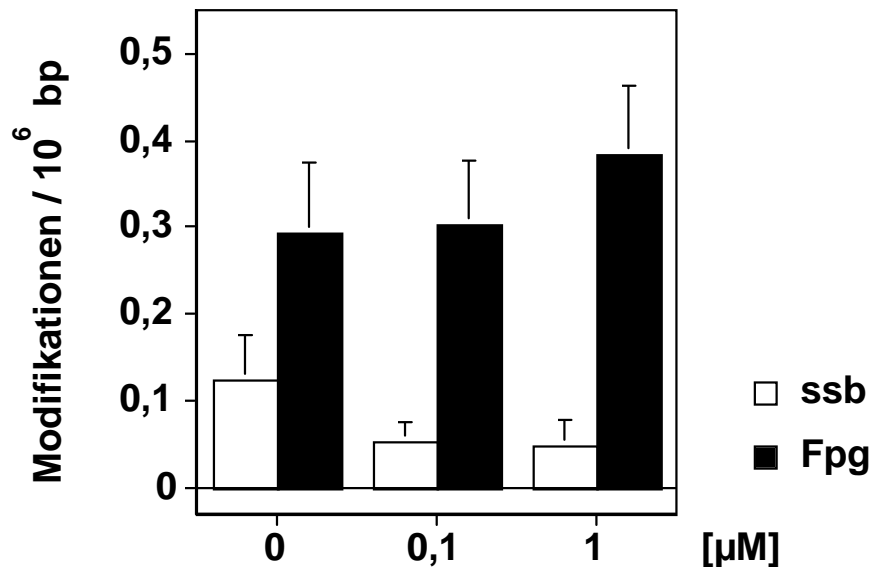


Abb. 4.18 Einfluß einer Präinkubation mit 0,1 und 1 μM Natriumselenit (48h, 37°C) auf die Induzierbarkeit von DNA-Schäden durch UV-B-Strahlung (1.1 kJ/m^2) in AS52-Zellen. Die Kontrollwerte ungeschädigter Zellen (mit und ohne Präinkubation) wurden abgezogen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen \pm S.D.

Abbildung 4.18 zeigt die durch 1.1 kJ/m^2 UV-B entstandenen Fpg-sensitiven Modifikationen und Einzelstrangbrüche. Mit 1 μM Natriumselenit vorinkubierte Zellen, zeigen eine leicht erniedrigte Bildung von Einzelstrangbrüchen, während die Zahl Fpg-sensitiver Modifikationen nahezu gleich bleibt. Auch Ebselen reduziert die Zahl durch UV-B-induzierter Einzelstrangbrüche (**Abbildung 4.19**), jedoch nur in einer Größenordnung von 25% (bei Vorinkubation mit 200 μM Ebselen). Die Senkung der Zahl induzierter Einzelstrangbrüche ist nicht signifikant. Die Zahl Fpg-sensitiver, oxidativer DNA-Modifikationen wurde nicht beeinflusst.

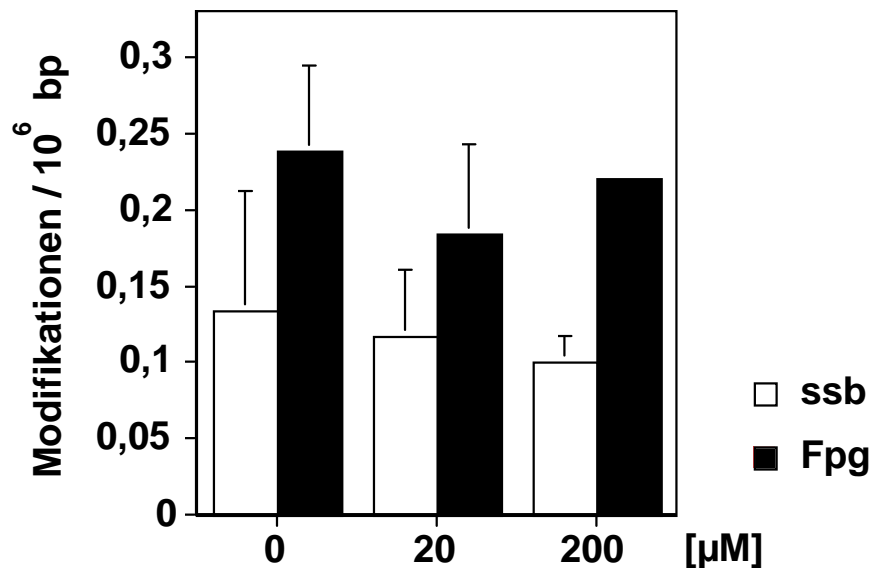


Abb. 4.19 Einfluß einer Präinkubation mit 20 und 200 µM Ebselen (4h, 37°C) auf die Induzierbarkeit von DNA-Schäden durch UV-B-Strahlung (1.1 kJ/m²) in AS52-Zellen. Die Kontrollwerte ungeschädigter Zellen (mit und ohne Präinkubation) wurden abgezogen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen ± S.D.

4.3.10 Einfluß von Natriumselenit und Ebselen auf die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Kaliumbromat

Durch Inkubation mit Kaliumbromat bei 37°C wird zelluläre DNA meßbar geschädigt. Zellfreie DNA wird aber nur in Anwesenheit von Glutathion geschädigt, so daß **Ballmaier et al. (1995)** als ultimales Agens der Schädigung mit Kaliumbromat das Brom-Radikal oder andere Zwischenstufen der Reduktion zu Bromid angenommen haben. Bei der Schädigung entstehen vorwiegend Fpg-sensitive Modifikationen, die durch HPLC/ECD zu ca. 70% als 8-oxoG identifiziert werden konnten (**Ballmaier et al., 1995**). Einzelstrangbrüche und AP-Läsionen entstehen sowohl zellfrei als auch in Zellen nur in geringem Ausmaß.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Schädigung von AS52-Zellen mit Kaliumbromat (vgl. Kap. 3.2.4.3.8) durch eine Vorinkubation mit Natriumselenit oder Ebselen beeinflusst werden kann.

Kaliumbromat induziert vorwiegend Fpg-sensitive Modifikationen, während Einzelstrangbrüche nur in geringer Zahl auftreten (siehe **Abb. 4.20** und **4.21**). Ebselen besaß auf die durch Kaliumbromat induzierten Fpg-sensitiven Modifikationen keinen Einfluß. Durch Natriumselenit zeigte sich ebenfalls kein Effekt auf die Empfindlichkeit von AS52-Zellen gegenüber Kaliumbromat. Ob ein Effekt auf die Beeinflussung von Einzelstrangbrüchen vorliegt, kann aufgrund der in geringer Anzahl durch Kaliumbromat induzierten SSB nicht eindeutig festgestellt werden.

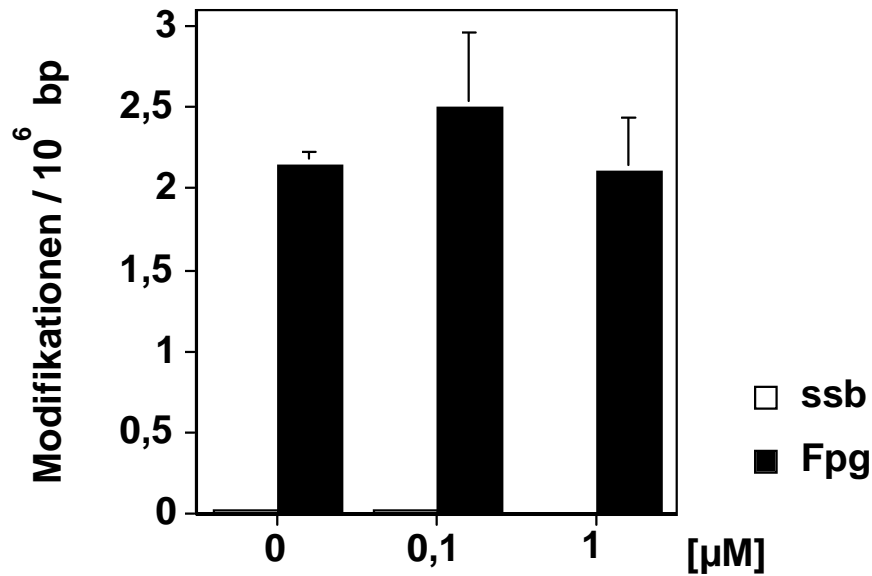


Abb. 4.20 Einfluß einer Präinkubation mit 0,1 und 1 µM Natriumselenit (48h, 37°C) auf die Induzierbarkeit von DNA-Schäden durch 15 mM Kaliumbromat in AS52-Zellen. Die Kontrollwerte ungeschädigter Zellen (mit und ohne Präinkubation) wurden abgezogen. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Alkalischen Schnell-Elution (siehe 3.2.4.7). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen \pm S.D.

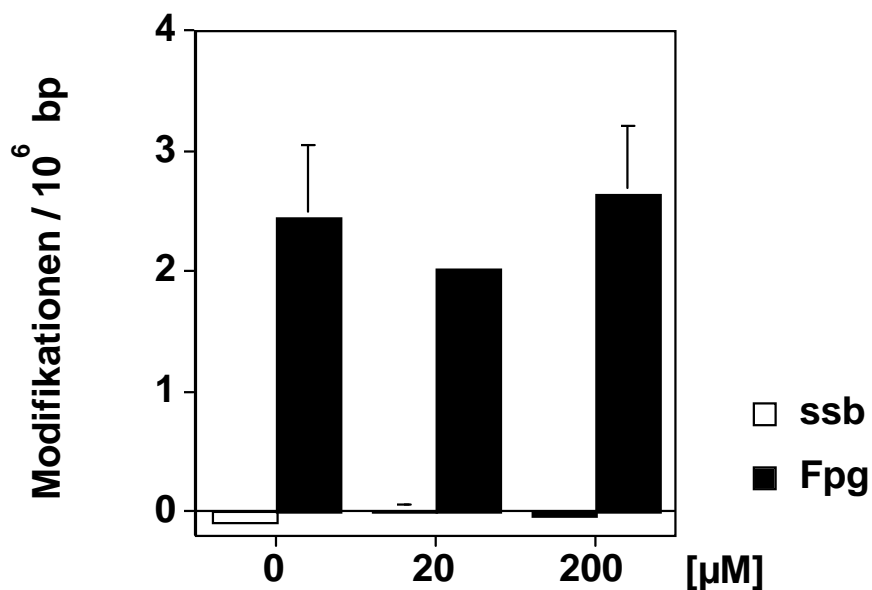


Abb. 4.21 Einfluß einer Präinkubation mit 20 und 200 µM Ebselen (4h, 37°C) auf die Induzierbarkeit von DNA-Schäden durch 15 mM Kaliumbromat in AS52-Zellen. Die Kontrollwerte ungeschädigter Zellen (mit und ohne Präinkubation) wurden abgezogen. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Alkalischen Schnell-Elution (siehe 3.2.4.7). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen \pm S.D.

4.3.11 Einfluß von Natriumselenit und Ebselen auf die Toxizität exogener Agentien

Die Toxizität der unter 4.4.3 beschriebenen Schädigungen wird in einem Test auf „cloning efficiency“ (siehe 3.2.5.2), d.h. die Fähigkeit der Kolonienbildung nach Schädigung und erneutem Ausplattieren auf Zellkulturplatten, untersucht. Vor der Schädigung werden die Zellen mit Natriumselenit oder Ebselen vorinkubiert, um so deren Einfluß auf die Toxizität bzw. das Überleben zu testen.

Tab. 4.5 Einfluß einer Präinkubation mit 0,1 und 1 μM Natriumselenit (48h, 37°C) auf die Toxizität („cloning efficiency“) von sichtbarem Licht (450 kJ/m^2) und UV-B (1.1 kJ/m^2) in AS52-Zellen. # Die „cloning efficiency“ von Kontrollzellen bei 37°C wird als 100% definiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen \pm S.D.

Natriumselenit [μM]	Kontrolle [%]	Sichtbares Licht [%]	UV-B [%]
0	100 \pm 0 #	67 \pm 6	19 \pm 1
0.1	100 \pm 0 #	85 \pm 21	40 \pm 33
1	100 \pm 0 #	101 \pm 5	26 \pm 10

Wie aus **Tabelle 4.5** zu ersehen ist, erhöht Natriumselenit in steigender Konzentration das Überleben von AS52-Zellen nach Schädigung mit sichtbarem Licht um ca. 35%. Die Toxizität einer Bestrahlung mit UV-B-Licht dagegen scheint nicht beeinflußt zu werden.

Tab. 4.6 Einfluß einer Präinkubation mit 20 und 20 μM Ebselen (4h, 37°C) auf die Toxizität („cloning efficiency“) von sichtbarem Licht (450 kJ/m^2) und UV-B (1.1 kJ/m^2) in AS52-Zellen. # Die „cloning efficiency“ von Kontrollzellen bei 37°C wird als 100% definiert. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen \pm S.D.

Ebselen [μM]	Kontrolle [%]	Sichtbares Licht [%]	UV-B [%]
0	100 \pm 0 #	68 \pm 3	18 \pm 10
20	100 \pm 0 #	105 \pm 9	28 \pm 20
200	100 \pm 0 #	109 \pm 34	21 \pm 11

Auch die Vorbehandlung mit Ebselen (**Tab. 4.6**) erhöht das Überleben der Zellen bei der Schädigung mit sichtbarem Licht um ca. 40%, während die Zelltoxizität durch UV-B-Strahlung nicht beeinflußt wird.

Tab. 4.7 Einfluß einer Präinkubation mit 20 und 20 μM Ebselen (4h, 37°C) auf die Toxizität („cloning efficiency“) von Kaliumbromat (15 mM), Wasserstoffperoxid (6 mM) und Ro 19-8022 (0.2 μM) + Licht (166 kJ/m^2) in AS52-Zellen. #Die „cloning efficiency“ von Kontrollzellen bei 37°C wird als 100% definiert.

Ebselen [μM]	Kontrolle [%]	Bromat [%]	H ₂ O ₂ [%]	Ro-19-8022 [%]
0	100 \pm 0 #	75 %	74 %	98 %
20	100 \pm 0 #	87 %	74 %	88 %
200	100 \pm 0 #	95 %	86 %	99 %

Während die Toxizität von Kaliumbromat verringert wird, hat Ebselen keinen Einfluß auf das Überleben der AS52-Zellen nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid oder Ro 19-8022 + Licht (siehe **Tab. 4.7**).

4.3.12 Einfluß von Natriumselenit und Ebselen auf die Induktion von Mikrokernen durch Ro 19-8022 + Licht

Die Induktion von Mikrokernen in AS52-Zellen und deren Beeinflussung durch Supplementation mit Selen ist Gegenstand dieses Kapitels. Die Zellen wurden mit Ebselen oder Natriumselenit vorinkubiert (vgl. Kap., 3.2.4.3.10 und 3.2.4.3.11). Nach der Schädigung mit Ro 19-8022 (vgl. Kap. 3.2.4.3.1) wurden die Zellen 24 Stunden (in Experimenten zur Bestimmung der Dosisabhängigkeit) bzw. 0 bis 48 Stunden (in Experimenten zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit) unter sterilen Bedingungen kultiviert.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Induktion von Mikrokernen durch Ro 19-8022 plus Licht sind in den **Abbildungen 4.22** und **4.23** dargestellt.

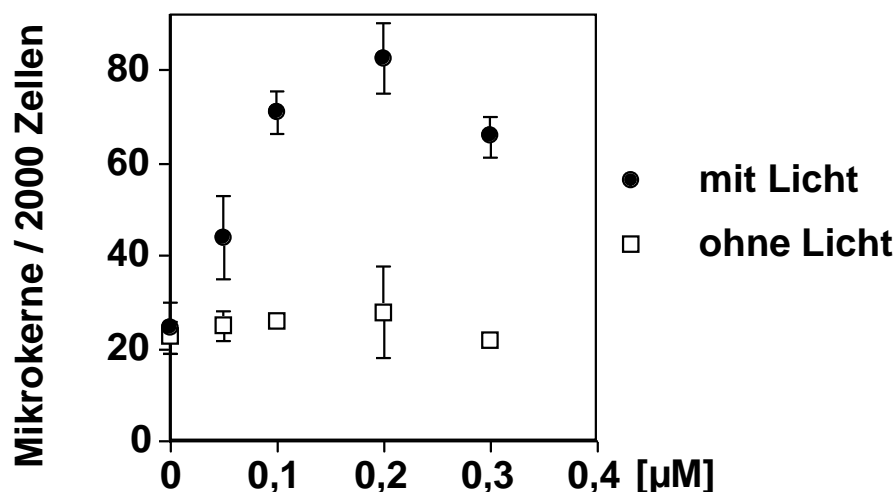


Abb. 4.22 Mikrokernelinduktion durch 0-0.3 μM Ro 19-8022 + Licht (166 kJ/m^2) 24 h nach der Schädigung in AS52-Zellen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von 3 Bestimmungen \pm S.D.

Ro 19-8022 induziert dosisabhängig nur bei Bestrahlung mit Licht Mikrokerne (**Abb. 4.22**). Das Maximum der Bildung von Mikrokerneln tritt bei einer Konzentration von $0.2 \mu\text{M}$ auf. Bei einer Konzentration von $0.3 \mu\text{M}$ überlagern zytotoxische Effekte bereits die genotoxischen Effekte des Photosensibilisators, weshalb eine Abnahme der Mikrokernelnfrequenz zu bemerken ist. Eine maximale Zahl von Mikrokerneln wird nach einer Postinkubationszeit von 24 Stunden erreicht (**Abb. 4.23**).

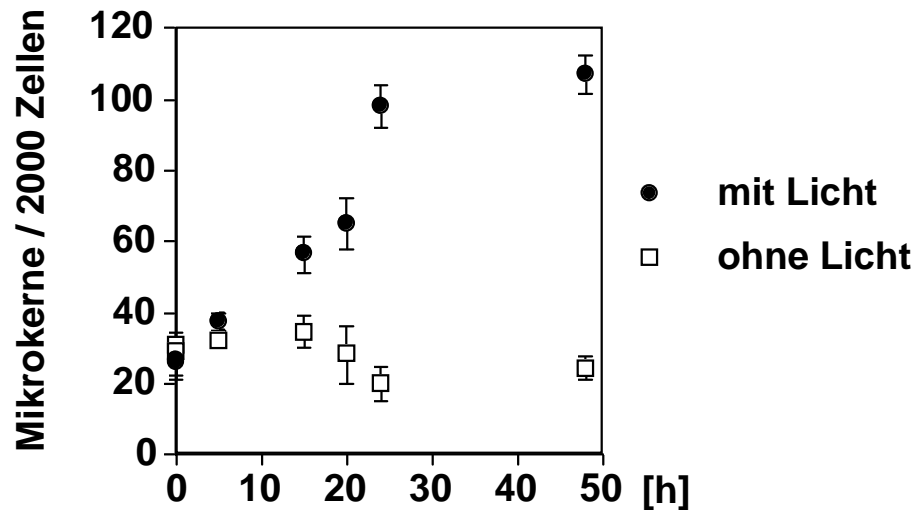


Abb. 4.23 Mikrokernelinduktion durch $0.2 \mu\text{M}$ Ro 19-8022 + Licht (166 kJ/m^2) in AS52-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von 3 Bestimmungen \pm S.D.

Bei 48stündiger Vorinkubation mit 0.1 bzw. $1 \mu\text{M}$ Natriumselenit wurden, wie aus **Abbildung 4.24** ersichtlich, sämtliche durch Ro 19-8022 + Licht induzierten Mikrokerne statistisch signifikant ($p < 0.005$) reduziert. Die Zahl der Mikrokerne in mit Ro 19-8022 geschädigten Zellen, die mit Selen supplementiert wurden, entspricht der Zahl der Mikrokerne in ungeschädigten Zellen.

Auch die 4-stündige Vorinkubation mit 20 bzw. $200 \mu\text{M}$ Ebselen zeigte einen signifikanten ($p < 0.005$) protektiven Effekt: die durch Ro 19-8022 plus Licht induzierte Mikrokernelnfrequenz läßt sich bis auf 20% (durch Vorinkubation mit $200 \mu\text{M}$ Ebselen) reduzieren (**Abb. 4.25**).

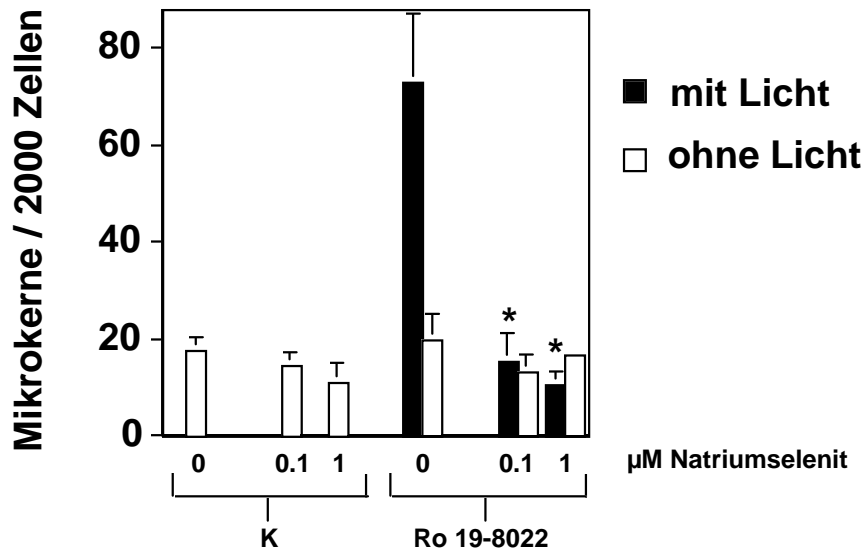


Abb. 4.24 Einfluß einer Präinkubation mit 0,1 und 1 µM Natriumselenit (48h, 37°C) auf die Induzierbarkeit von Mikrokernen durch 0.2 µM Ro 19-8022 + sichtbares Licht (166 kJ/m²) in AS52-Zellen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen ± S.D. (*p<0.05 gegenüber den geschädigten, nicht vorbehandelten Zellen, siehe Text)

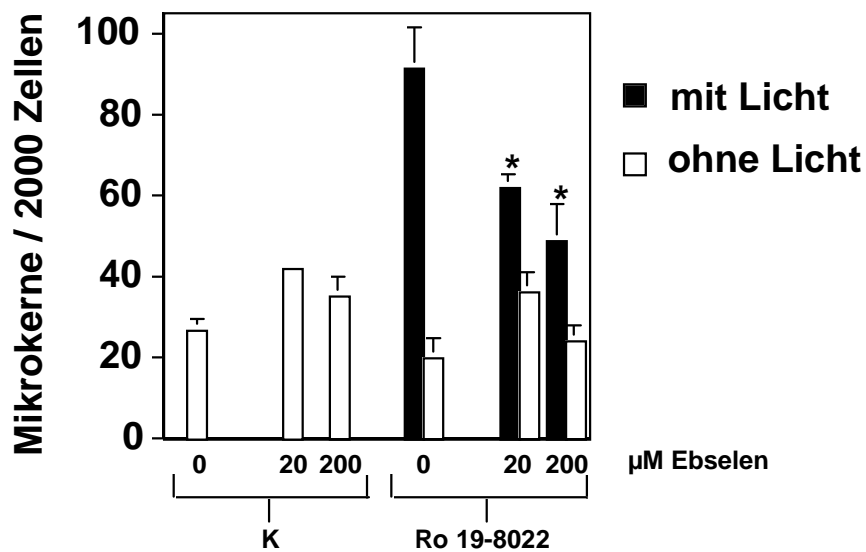


Abb. 4.25 Einfluß einer Präinkubation mit 20 und 200 µM Ebselen (4h, 37°C) auf die Induzierbarkeit von Mikrokernen durch 0.2 µM Ro 19-8022 + sichtbares Licht (166 kJ/m²) in AS52-Zellen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen ± S.D. (*p<0.05 gegenüber den geschädigten, nicht vorbehandelten Zellen, siehe Text)

4.3.13 Einfluß von Natriumselenit und Ebselen auf die Induktion von Mikrokernen durch Kaliumbromat

Die Zellen wurden 4 Stunden mit 20 bzw. 200 μM Ebselen oder 48 Stunden mit 0.1 bzw. 1 μM Natriumselenit vorinkubiert. Die Schädigung 0-15 mM Kaliumbromat erfolgte nach 3.2.4.3.8.

Auch Kaliumbromat induziert dosisabhängig Mikrokerne (Abb. 4.26). Die Mikrokernfrequenz steigt linear bis zur höchsten getesteten Konzentration von 15 mM. Bei den Untersuchungen zur Bestimmung zur Zeitabhängigkeit zeigt sich, daß eine Zunahme der Mikrokernfrequenz bei der Schädigung mit 5 mM Kaliumbromat nach ca. 20-24 h nicht mehr erfolgt (Abb. 4.27).

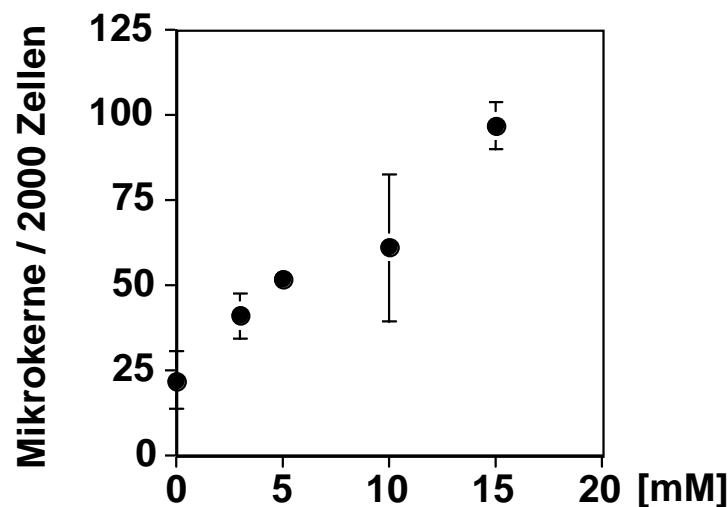


Abb. 4.26 Mikrokerninduktion durch 0-15 mM Kaliumbromat in AS52-Zellen 24 h nach der Schädigung. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von 3 Bestimmungen \pm S.D.

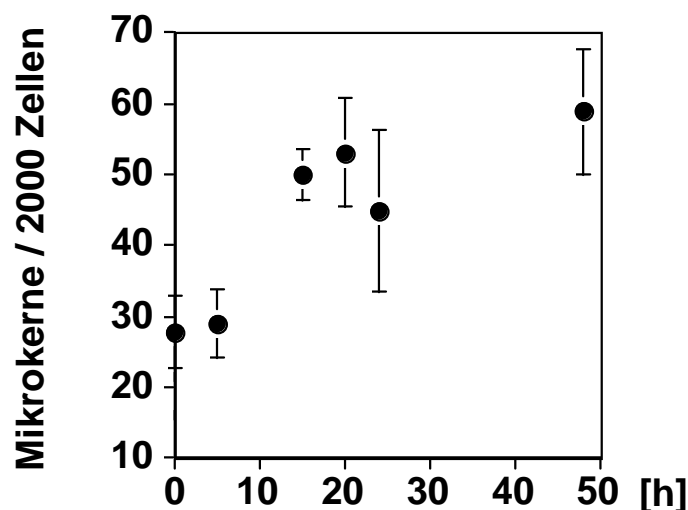


Abb. 4.27 Mikrokerninduktion durch 5 mM Kaliumbromat in AS52-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von 3 Bestimmungen \pm S.D.

Durch eine 48-stündige Vorinkubation mit Natriumselenit wurde die Zahl der durch Kaliumbromat induzierten Mikrokerne statistisch signifikant ($p < 0.01$) reduziert (**Abb. 4.28**). Auch durch Ebselen wurden die durch Kaliumbromat induzierten Mikrokerne bis auf 20-50% reduziert ($p < 0.005$) (**Abb. 4.29**).

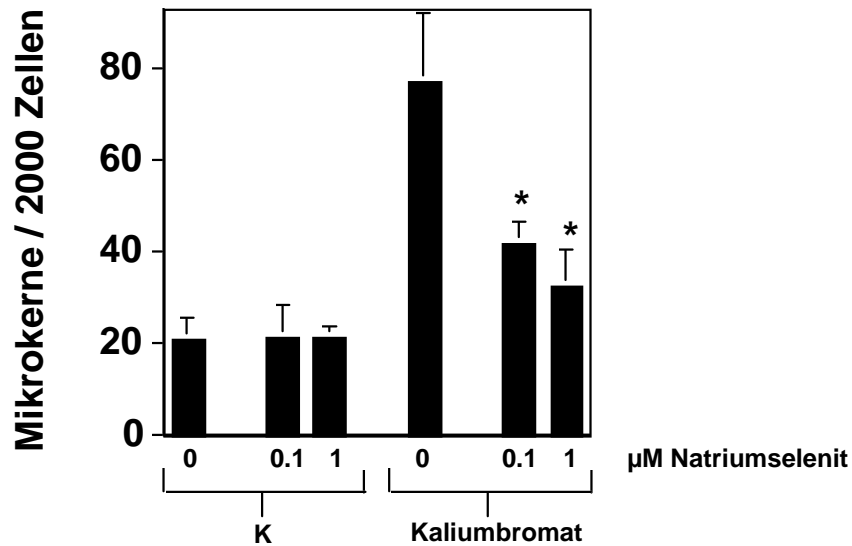


Abb. 4.28 Einfluß einer Präinkubation mit 0,1 und 1 μM Natriumselenit (48h, 37°C) auf die Induzierbarkeit von Mikrokerneln durch 15 mM Kaliumbromat in AS52-Zellen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen ± S.D. (* $p < 0.01$ gegenüber den geschädigten, nicht vorbehandelten Zellen, siehe Text)

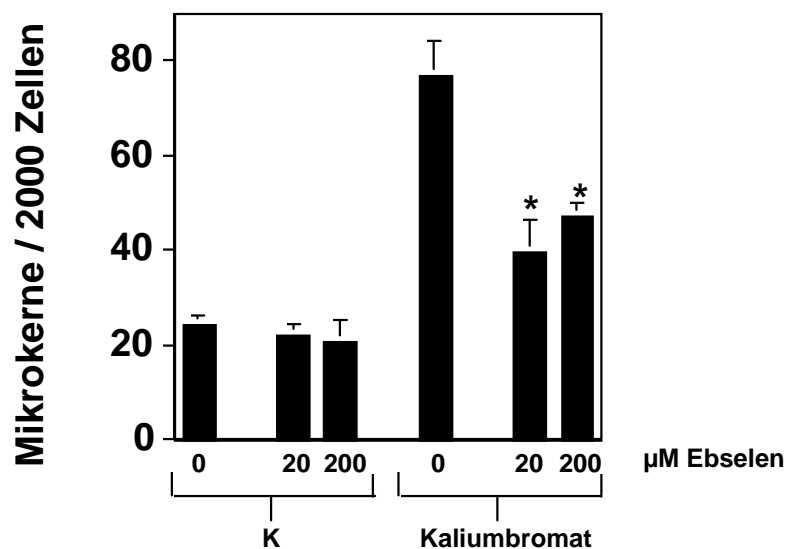


Abb.4.29 Einfluß einer Präinkubation mit 20 und 200 μM Ebselen (4h, 37°C) auf die Induzierbarkeit von Mikrokerneln durch 15 mM Kaliumbromat in AS52-Zellen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen ± S.D. (* $p < 0.05$ gegenüber den geschädigten, nicht vorbehandelten Zellen, siehe Text)

4.3.14 Einfluß von Natriumselenit und Ebselen auf die Induktion von Mikrokernen durch H_2O_2

Die Schädigung der mit Ebselen bzw. Natriumselenit vorinkubierten Zellen erfolgte mit 0 bis 6 mM H_2O_2 (vgl. Kap. 3.2.4.3.7). Nach Entfernung des H_2O_2 wurden die Zellen 24 Stunden (in Experimenten zur Bestimmung der Dosisabhängigkeit) bzw. 0 bis 48 Stunden (in Experimenten zur Bestimmung der Zeitabhängigkeit) unter sterilen Bedingungen kultiviert. Die Ergebnisse (Abb. 4.30 und 4.31) zeigen, daß Wasserstoffperoxid ebenfalls in der Lage ist, Mikrokern zu induzieren. Die Mikrokernfrequenz nimmt linear mit steigender Konzentration zu. Die Mikrokernfrequenz erreicht nach 24 h ein Maximum.

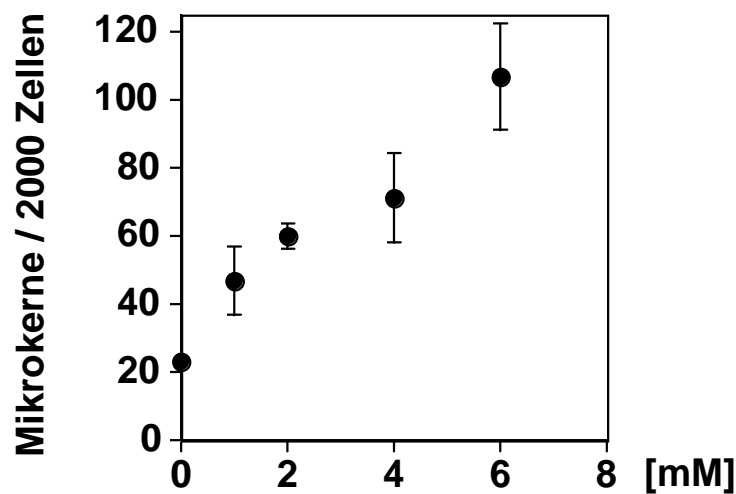


Abb. 4.30 Mikrokerninduktion durch 0-6 mM Wasserstoffperoxid in AS52-Zellen 24 h nach der Schädigung. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von 3 Bestimmungen \pm S.D.

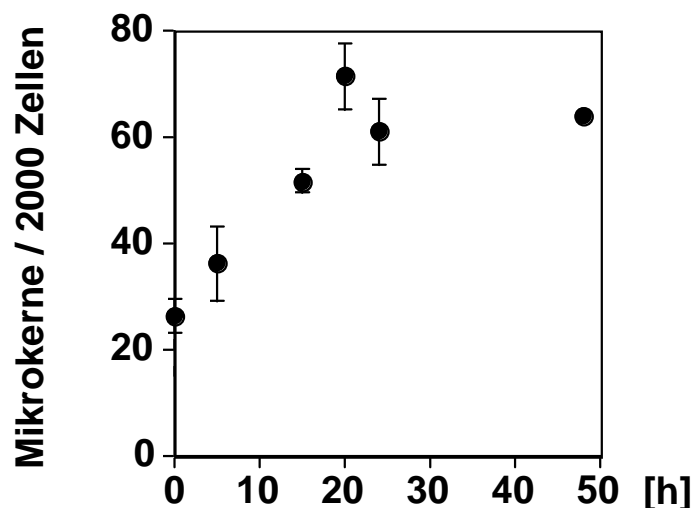


Abb. 4.31 Mikrokerninduktion durch 2 mM Wasserstoffperoxid in AS52-Zellen in Abhängigkeit von der Zeit. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von 3 Bestimmungen \pm S.D.

Ebenso wie bei der Induktion von Mikrokernen durch Kaliumbromat und den Photosensibilisator Ro 19-8022 plus Licht sind die durch Wasserstoffperoxid induzierten Mikrokern durch eine Vorinkubation mit Natriumselenit bzw. Ebselen beeinflussbar (siehe **Abb. 4.32** und **4.33**).

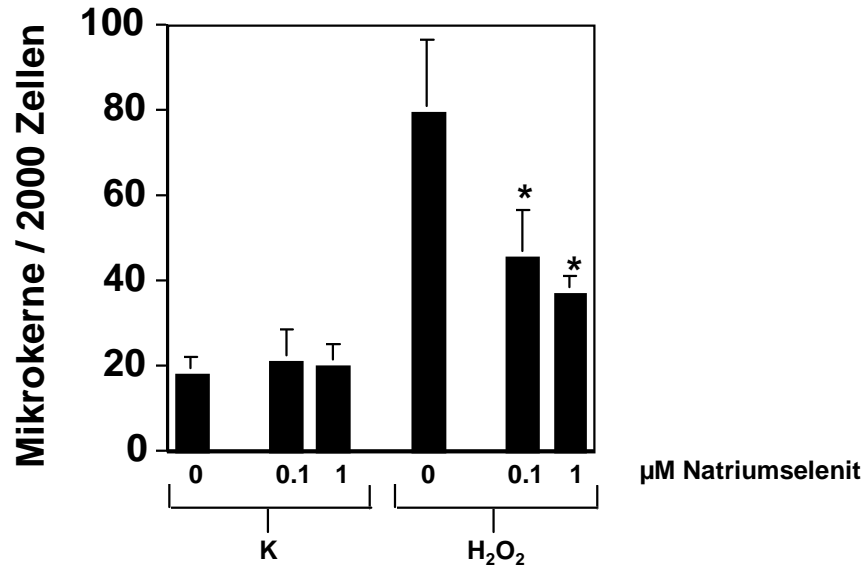


Abb. 4.32 Einfluß einer Präinkubation mit 0,1 und 1 µM Natriumselenit (48h, 37°C) auf die Induzierbarkeit von Mikrokernen durch 6 mM Wasserstoffperoxid in AS52-Zellen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen ± S.D. (*p<0.025 gegenüber den geschädigten, nicht vorbehandelten Zellen, siehe Text)

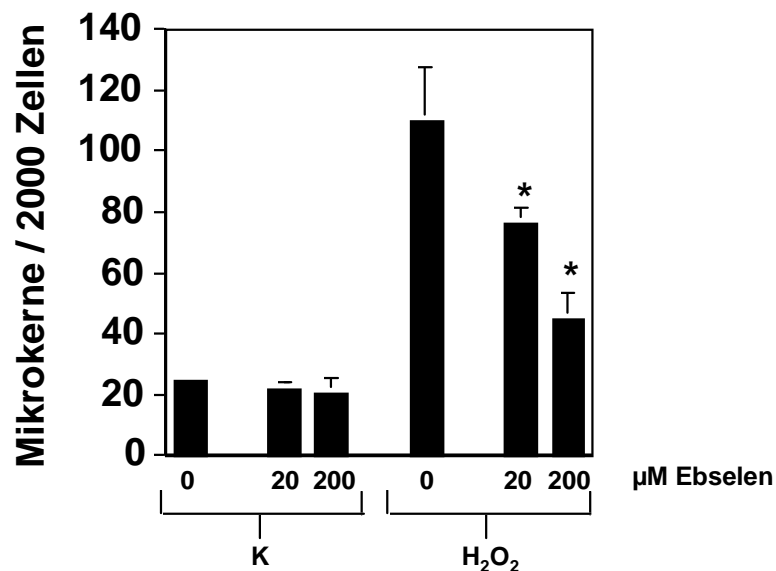


Abb. 4.33 Einfluß einer Präinkubation mit 20 und 200 µM Ebselen (4h, 37°C) auf die Induzierbarkeit von Mikrokernen durch 6 mM Wasserstoffperoxid in AS52-Zellen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen ± S.D. (*p<0.05 gegenüber den geschädigten, nicht vorbehandelten Zellen, siehe Text)

Die Vorinkubation mit 1 μM Natriumselenit bewirkt ebenso wie die Inkubation mit 200 μM Ebselen eine Reduktion auf ca. 30% der durch 6 mM Wasserstoffperoxid induzierten Mikrokerne. Die Reduzierung induzierter Mikrokerne durch 0.1 und 1 μM Natriumselenit ist im T-Test unabhängiger Variablen statistisch signifikant ($p < 0.025$ bzw. $p < 0.01$). Auch die Reduktion der Mikrokernfrequenz durch Ebselen ist statistisch gesichert ($p < 0.025$ für 20 μM Ebselen und $p < 0.005$ für 200 μM Ebselen).

Die Ergebnisse aus Kapitel 4.3 zeigen, daß die Selenverbindung Natriumselenit - im Gegensatz zu Ebselen - einen Einfluß auf den Steady-State-Spiegel oxidativer DNA-Schäden und den Glutathion-Gehalt in AS52-Zellen hat. Natriumselenit wirkt in höheren Konzentration prooxidativ. Beide Verbindungen sind in der Lage, die durch sichtbares Licht und UV-B-Strahlung induzierten DNA-Einzelstrangbrüchen und die durch verschiedene Agentien induzierten Mikrokerne zu reduzieren.

4.4 Einfluß des p53-Genprodukts auf DNA-Schäden und DNA-Reparatur in Säugerzellen

Um den Einfluß des Tumorsuppressorgens p53 auf oxidative DNA-Schäden zu untersuchen, wurden p53-defiziente und p53-profiziente Zellen auf Unterschiede hinsichtlich Steady-State-Spiegel oxidativer DNA-Schäden und Beeinflussung exogen durch UV-B-Strahlung und Ro 19-8022 induzierter DNA-Schäden untersucht. Die Beteiligung von p53 bei der Nukleotidexzisionsreparatur wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Die Beteiligung bei der Basenexzisionsreparatur ist bisher nicht erforscht und war deshalb Grundlage der folgenden Untersuchungen.

4.4.1 Einfluß der Expression von p53 auf Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen

Um den Einfluß des Proteins p53 auf die Steady-State-Spiegel oxidativer DNA-Modifikationen zu untersuchen, wurde die Anzahl Fpg-sensitiver Modifikationen und Einzelstrangbrüche in unbehandelten p53-defekten A253-Zellen bestimmt. Als Vergleich dienen mit p53-cDNA stabil transformierte A253CW14G- (Klon 1 und 2) und mit dem Leervektor transformierte („vector-only“-transformierte) A253CW16G-Zellen. In **Abbildung 4.34** sind die Steady-State-Spiegel genannter Zelllinien dargestellt. Der Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver Modifikationen ist in Klon 1 der p53-transformierten Zellen gesenkt. Steady-State-Spiegel in Kontrollzellen, „vector-only“-Kontrolle und Klon 2 der stabil mit p53 transformierten Zellen unterscheiden sich nicht signifikant.

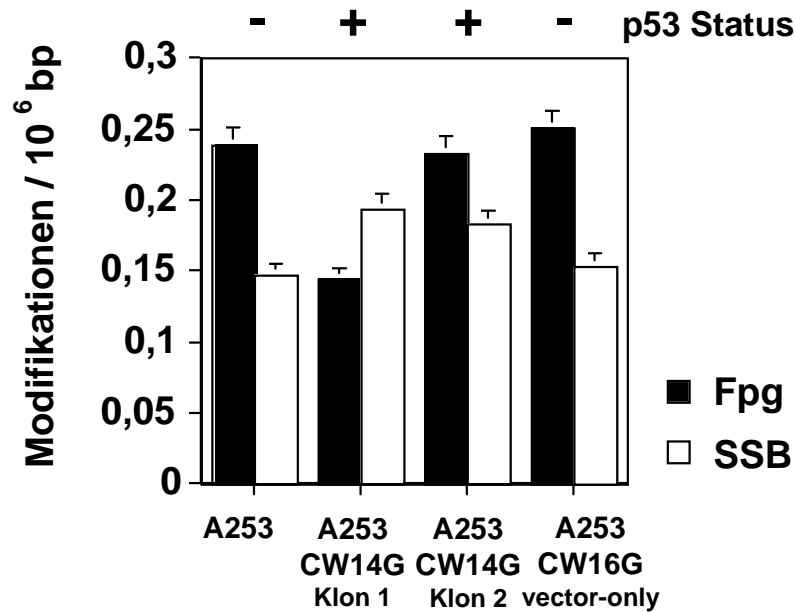


Abb. 4.34 Steady-State-Spiegel in unbehandelten A253-Zellen, „vector-only“-transformierten Zellen (A253CW16G) und entsprechenden p53-cDNA-transformierten Zellen (A253CW14G, Klon 1 und 2). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 5-14 Bestimmungen \pm S.D.

Um das Ergebnis für primäre Zellen, die „wild-typ“ p53 Protein unter normaler zellulärer Kontrolle bilden, zu überprüfen, wurden primäre Mausfibroblasten von p53-„wild-typ“- und p53-„knock-out“-Mäusen auf Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen untersucht. Auch hier entsprechen die gemessenen Steady-State-Spiegel einander, unabhängig vom p53-Status, so daß kein Einfluß der Expression von p53 Protein festzustellen ist (siehe **Abbildung 4.35**).

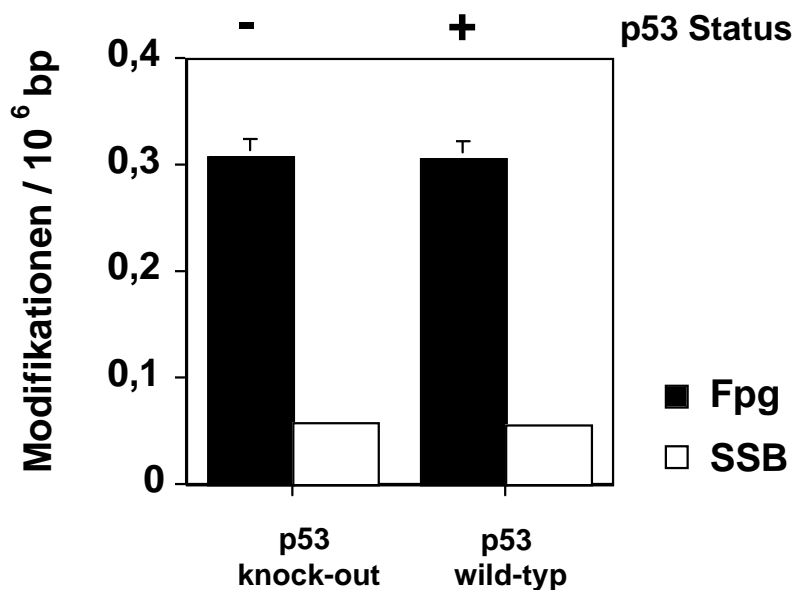


Abb. 4.35 Steady-State-Spiegel in unbehandelten primären Mausfibroblasten aus p53-knock-out- und p53-wild-typ-Mäusen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen \pm S.D.

4.4.2 Einfluß der Expression von p53 auf den Gehalt an Gesamt-Glutathion

Als eine mögliche Ursache für den Unterschied im Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver Modifikationen in Klon 1 der stabil transformierten A253CW14G-Zellen, wurde der intrazelluläre Gehalt an Gesamt-Glutathion in den verschiedenen Zelllinien bestimmt.

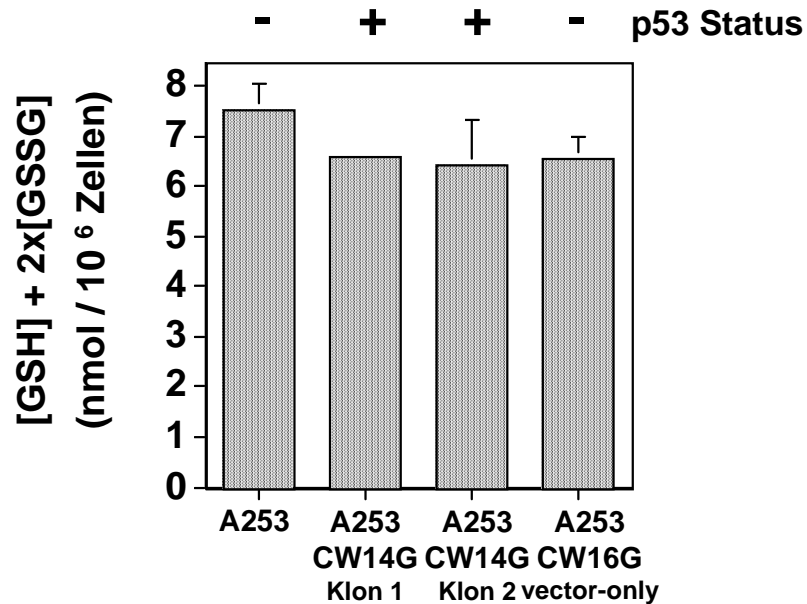


Abb. 4.36 Gehalt an Gesamt-Glutathion ([GSH]+2×[GSSG]) in unbehandelten A253-Zellen, „vector-only“-transformierten Zellen (A253CW16G) und p53-cDNA-transformierten Zellen (A253CW14G, Klon 1 und Klon 2). Enzymatische Bestimmung, nach **Griffith, 1985** (siehe 3.2.8). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3-4 Bestimmungen ± S.D.

Wie aus **Abbildung 4.36** ersichtlich, ist der enzymatisch bestimmte Gehalt an Gesamt-Glutathion (Summe der Konzentration der reduzierten und oxidierten Form; [GSH] + 2x[GSSG]) in den untersuchten Zelllinien etwa gleich. Die Fähigkeit zur Expression von p53 Protein hat demnach keine Auswirkung auf den GSH-Gehalt. Der aus **Abbildung 4.34** erkennbare geringere Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver Modifikationen in einem der p53-positiven Klone der Zelllinie A253CW14G ist weder durch die Expression von p53 noch durch eine Erhöhung der Menge an Gesamt-Glutathion in diesen Zellen zu erklären, sondern muß vielmehr andere Ursachen haben.

Abbildung 4.37 zeigt den Gehalt an Gesamt-Glutathion in den untersuchten primären Mausfibroblasten aus p53-Wildtyp- und p53-Knockout-Mäusen. Der im Gegensatz zu den untersuchten permanenten Zellen (siehe **Abb. 4.36**) bestehende, jedoch statistisch nicht signifikante ($p > 0.05$) Unterschied im GSH-Gehalt muß andere Gründe als das Vorhandensein bzw. Fehlen des p53-Gens haben.

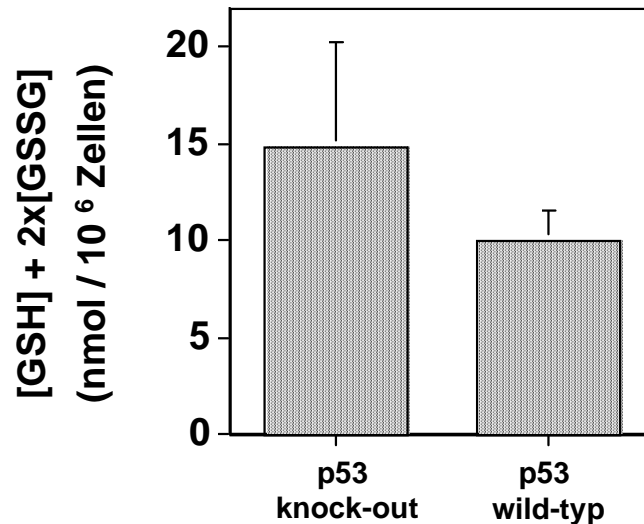


Abb. 4.37 Gehalt an Gesamt-Glutathion ([GSH]+2×[GSSG]) in unbehandelten primären Mousfibroblasten aus p53-knock-out- und p53-wild-typ-Mäusen. Enzymatische Bestimmung, nach **Griffith, 1985** (siehe 3.2.8). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2-3 Bestimmungen ± S.D.

4.4.3 Einfluß der Expression von p53 auf die Toxizität von Ro 19-8022

Tabelle 4.8 gibt den Anteil überlebender Zellen nach Schädigung mit Ro 19-8022 + Licht an. Die p53-überexprimierenden, transfizierten A253CW14G-Zellen reagierten sensibler auf die Schädigung, d.h. die Teilungsfähigkeit dieser Zellen ist in größerem Maße von der Schädigung betroffen. Dies ist möglicherweise durch verstärkte Apoptose dieser Zellen nach oxidativem Streß bedingt.

Tab. 4.8 Einfluß des p53-Status auf die Toxizität („cloning efficiency“) von Ro 19-8022 (50 bzw. 100 nM) + Licht (166 kJ/m²) in A253-Zellen, „vector-only“-transformierten Zellen (A253CW16G) und p53-cDNA-transformierten Zellen (A253CW14G, Klon 1). # Die „cloning efficiency“ von Kontrollzellen wird als 100% definiert.

Ro-19-8022 [nM]	Überleben der Zellen [%]		
	A253	A253CW14G, Klon 1	A253CW16G
0	100 #	100 #	100 #
50	94.9	72.9	100.7
100	137.5	63.2	87.1

4.4.4 Einfluß der Expression von p53 auf die Mikrokerninduzierbarkeit durch Ro 19-8022 + Licht

Der Photosensibilisator Ro 19-8022 erzeugt nach Bestrahlung Mikrokerninduktion (siehe 4.4.12). Die Mikrokerninduktion in A253 und entsprechenden hp53-cDNA-transformierten Zellen (A253CW14G, Klon 1) nach Schädigung mit dem Photosensibilisator wird nachfolgend dargestellt (**Abb. 4.38**). Es ist bemerkenswert, daß bereits in unbehandelten Zellen die Anzahl gefundener Mikrokerninduktion über 100 pro 2000 Zellen liegt. Im Vergleich dazu beträgt die Anzahl an Mikrokernen in unbehandelten AS52-Zellen ca. 20 pro 2000 Zellen.

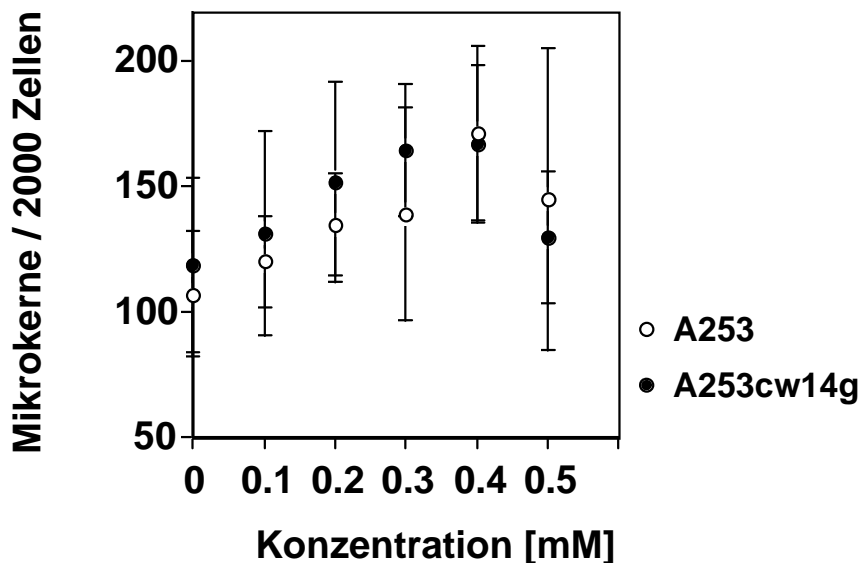


Abb. 4.38 Mikrokerninduktion durch 0-0.5 μ M Ro 19-8022 + Licht (166 kJ/m^2) in A253 und A253CW14G (Klon 1) -Zellen 24 h nach der Schädigung. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von 2-7 Bestimmungen \pm S.D.

Aus **Abbildung 4.38** geht weiter hervor, daß eine Induktion von Mikrokernen durch steigende Konzentration von Ro 19-8022 bis zu einer Konzentration von etwa $0.4 \mu\text{M}$ möglich ist. Bereits bei $0.5 \mu\text{M}$ verhindert wahrscheinlich die Toxizität die weitere Bildung von Mikrokernen, so daß insgesamt eine Abnahme der Mikrokernfrequenz zu beobachten ist.

4.4.5 Einfluß der Expression von p53 auf die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Ro 19-8022 + Licht

Hier soll nun der Einfluß des p53-Status auf die Suszeptibilität verschiedener Zellpaare gegenüber die Induktion oxidativer DNA-Schäden dargestellt werden. Die Schädigung erfolgte mit Ro 19-8022 (vgl. Kap. 3.2.4.3.1).

Sowohl in den A253-Zellen (**Abb. 4.39**) als auch in primären Mausfibroblasten (**Abb. 4.40**) ist die Induktion des DNA-Schadens durch Ro 19-8022 unabhängig vom p53-Status.

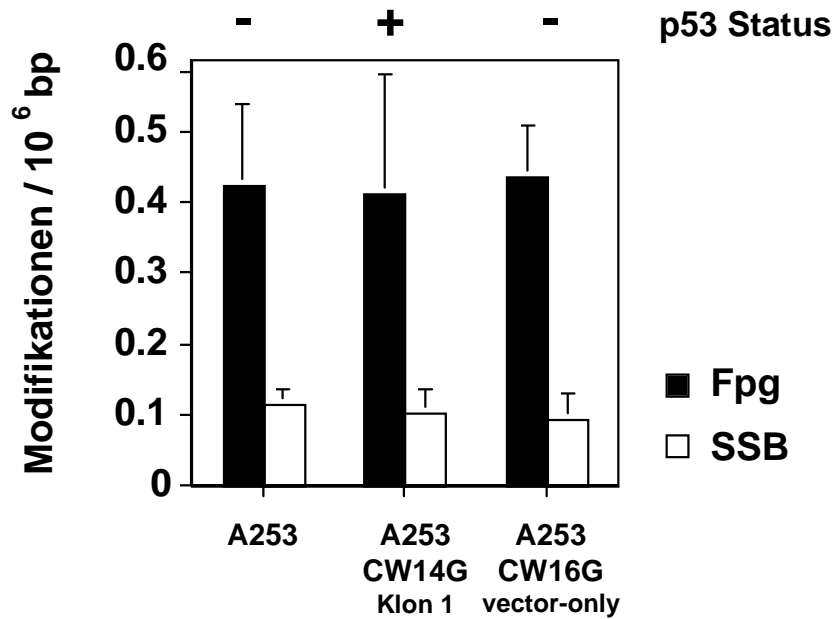


Abb. 4.39 Einfluß des p53-Status auf die Induzierbarkeit von DNA-Schäden durch 50 nM Ro 19-8022 + Licht (166 kJ/m²) in A253-Zellen, „vector-only“-transformierten Zellen (A253CW16G) und entsprechenden p53-cDNA-transformierten Zellen (A253CW14G, Klon 1). Die Kontrollwerte ungeschädigter Zellen wurden abgezogen. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Alkalischen Schnell-Elution (siehe 3.2.4.7). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3-7 Bestimmungen \pm S.D.

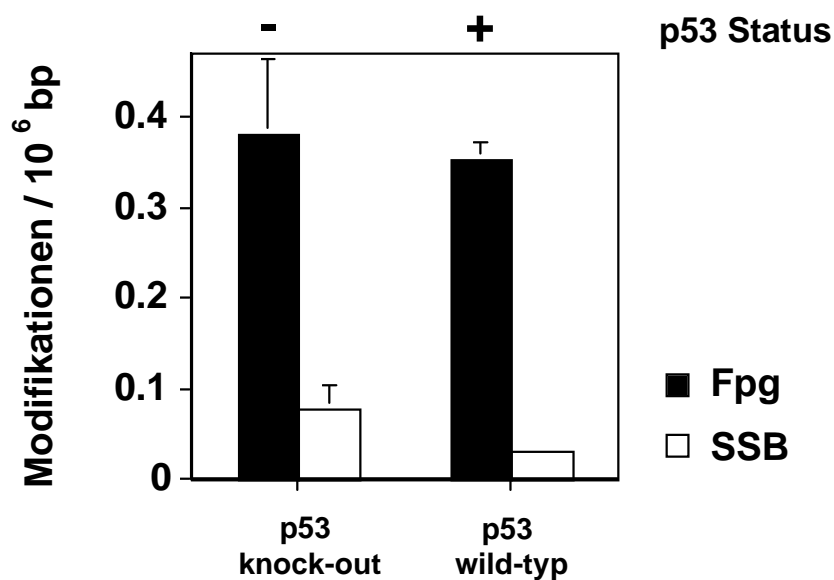


Abb. 4.40 Einfluß des p53-Status auf die Induzierbarkeit von DNA-Schäden durch 50 nM Ro 19-8022 + Licht (166 kJ/m²) in primären Mausfibroblasten aus p53-knock-out- und p53-wild-typ-Mäusen. Die Kontrollwerte ungeschädigter Zellen wurden abgezogen. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Alkalischen Schnell-Elution (siehe 3.2.4.7). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 4 Bestimmungen \pm S.D.

4.4.6 Einfluß der Expression von p53 auf die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Breitband-UV-B-Licht

Die Induktion T4 Endonuklease V-sensitiver DNA-Modifikationen (Cyclobutanpyrimidin-dimere, siehe 2.4.2) erfolgte durch Breitband UV-B-Licht (6.5 J/m^2). Die induzierten Läsionen werden mit Hilfe der Alkalischen Elution quantifiziert. **Abbildung 4.41** zeigt die nach der Schädigung gemessenen T4 EndoV-sensitiven Modifikationen. Beide Zelllinien bilden erwartungsgemäß bei der Schädigung mit UV-B-Licht die gleiche Anzahl T4 EndoV-sensitiver Modifikationen von ca. $0.3 \text{ pro } 10^6 \text{ bp}$. Das Ergebnis stimmt mit den in AS52-Zellen ermittelten Werten (siehe **Abb. 4.2**) überein.

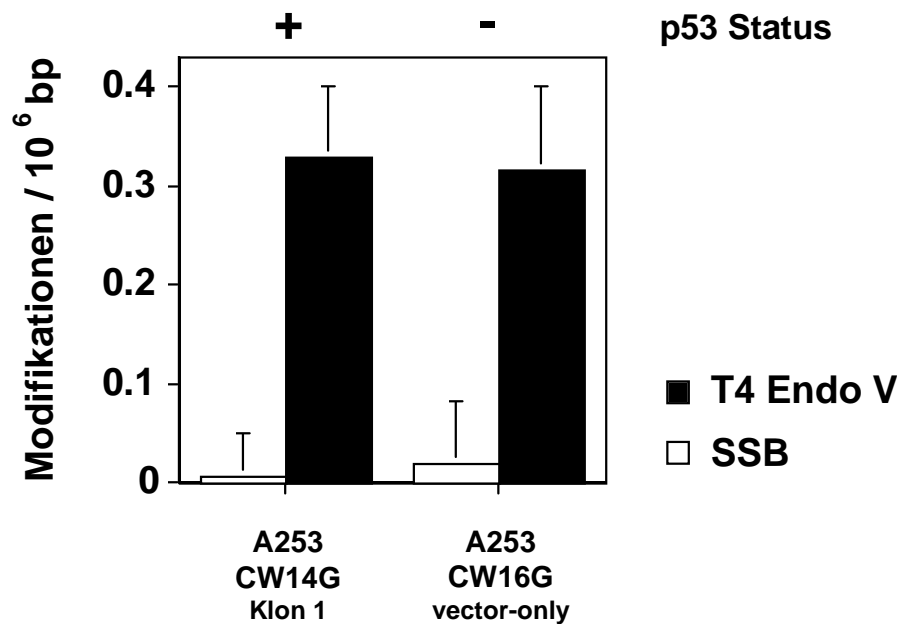


Abb. 4.41 Einfluß des p53-Status auf die Induzierbarkeit von DNA-Schäden durch UV-B-Licht (6.5 J/m^2) in „vector-only“-transformierten Zellen (A253CW16G) und p53-cDNA-transformierten Zellen (A253CW14G, Klon 1). Die Kontrollwerte ungeschädigter Zellen wurden abgezogen. Die Bestimmung erfolgte mit Hilfe der Alkalischen Schnell-Elution (siehe 3.2.4.7). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 6-7 Bestimmungen \pm S.D.

4.4.7 Einfluß der Expression von p53 auf die Reparatur induzierter oxidativer DNA-Modifikationen

Um die Auswirkungen des Defekts der Expression des Tumorsuppressorproteins p53 auf die Basenexzisionsreparatur zu untersuchen, wurden Reparaturkinetiken Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen bestimmt. Die durch den Photosensibilisator Ro 19-8022 + sichtbares Licht induzierten Schäden werden durch Alkalische Elution nach verschiedenen Reparaturzeiten quantifiziert. Der zu diesem Zeitpunkt noch vorhandene Schaden wurde zu den zum Zeitpunkt 0h gemessenen Fpg-sensitiven Modifikationen (ohne Reparatur) in Relation gesetzt.

Abbildung 4.42 zeigt den Verlauf der Zahl Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen in p53-defekten A253-Zellen und mit p53-cDNA transformierten (p53-positiven und stabil überexprimierenden) A253CW14G-Zellen in Abhängigkeit von der Reparaturzeit in Kulturmedium bei 37°C (vgl. Kap. 3.2.4.3.13). Die induzierten Fpg-sensitiven Modifikationen werden in beiden Zelllinien mit etwa der gleichen Geschwindigkeit repariert. Die Reparaturhalbwertszeit der Fpg-sensitiven Modifikationen ($t_{1/2 \text{ Fpg}}$) beträgt in beiden Zelllinien etwa 2 Stunden.

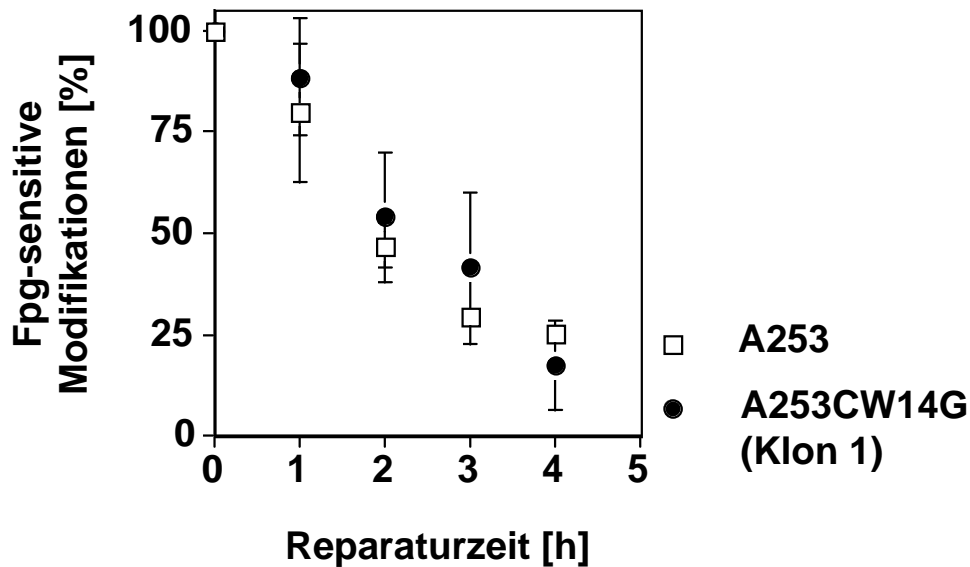


Abb. 4.42 Reparatur Fpg-sensitiver Basenmodifikationen nach Schädigung mit 50 nM Ro 19-8022 + Licht (166 kJ/m^2) in A253-Zellen und A253CW14G-Zellen (Klon 1). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3-4 Bestimmungen \pm S.D.

Die Bestimmung der Reparaturkinetik in primären Mausfibroblasten aus p53-knock-out- und p53-wild-typ-Mäusen zeigt **Abbildung 4.43**. Durch Ro 19-8022 + Licht induzierte Fpg-sensitive Modifikationen werden in (p53 +/+)- und (p53 -/-)-Zellen mit der gleichen Geschwindigkeit repariert. Auch bei diesen Zellen beträgt die Reparaturhalbwertszeit Fpg-sensitiver Modifikationen ($t_{1/2 \text{ Fpg}}$) in beiden Zelllinien etwa 2 bis 2½ Stunden.

Sowohl in permanenten, stabil p53 überexprimierenden Zellen, als auch in primären Zellen, bei denen p53 unter der normalen Kontrolle übergeordneter Gene steht, ist keine verbesserte Reparatur Fpg-sensitiver Modifikationen festzustellen.

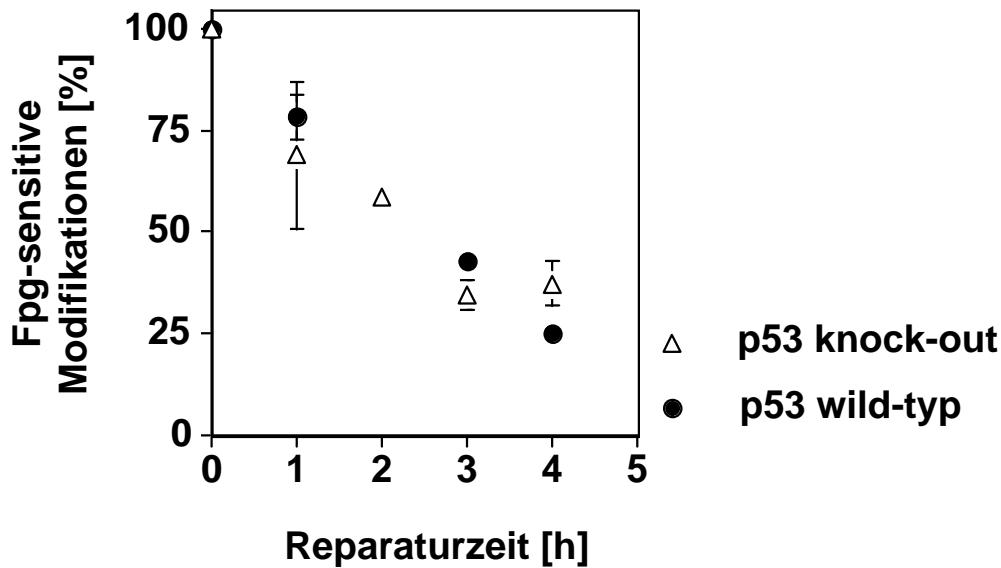


Abb. 4.43 Reparatur Fpg-sensitiver Basenmodifikationen nach Schädigung mit 50 nM Ro 19-8022 + Licht (166 kJ/m²) in primären Mausfibroblasten aus p53-knock-out- und p53-wild-typ-Mäusen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3-4 Bestimmungen \pm S.D.

4.4.8 Einfluß der Expression von p53 auf die Reparatur induzierter Pyrimidindimere

Die Bestimmung der Reparatur von Pyrimidindimeren (T4 Endo V-sensitiven Modifikationen) erfolgt analog 4.5.7 durch Messung der nach verschiedenen Reparaturzeiten mit Hilfe der Alkalischen Elution. Der nach der Reparaturzeit von 20h noch vorhandene Schaden wurde um die Schadensreduktion, die durch DNA-Replikation bedingt ist, korrigiert. Bei allen untersuchten Zellarten nimmt der noch vorhandene DNA-Schaden mit der Zeit ab (**Abb. 4.44**). Die Hälfte der T4 Endo V-sensitiven DNA-Modifikationen ist sowohl in p53-negativen A253-Zellen, als auch in den p53-korrigierten A253CW14G nach ca. 6 bis 7 Stunden repariert. Auch in den primären Mausfibroblasten beträgt die Halbwertszeit ca. 8h (**Abb. 4.45**). Die Reparatur T4 Endo V-sensitiver Modifikationen verläuft im Vergleich zu der Reparatur Fpg-sensitiver Modifikationen langsamer, die Expression von p53 hat keinen Einfluß.

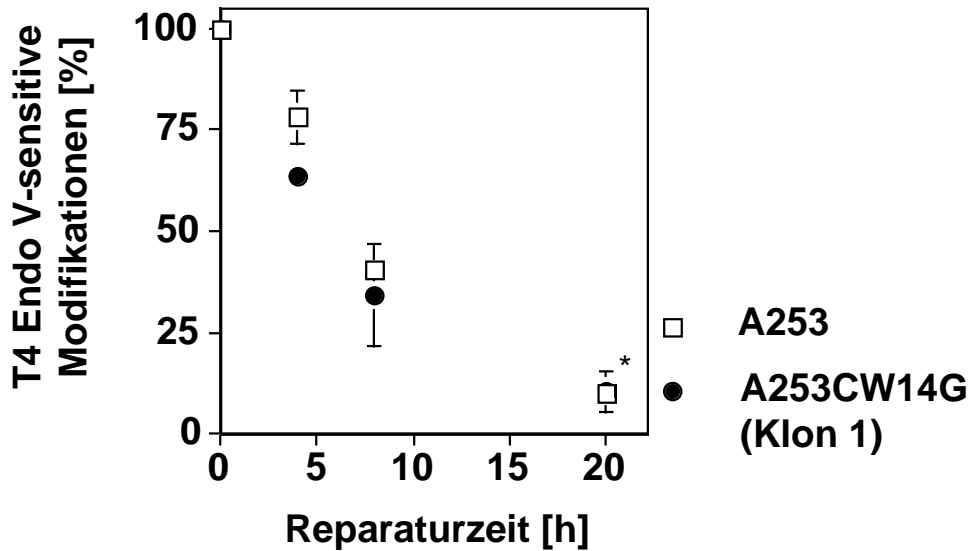


Abb. 4.44 Reparatur T4 Endo V-sensitiver Basenmodifikationen nach Schädigung mit UV-B-Licht (6.5 J/m^2) in A253-Zellen und p53-korrigierten A253CW14G (Klon 1). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen \pm S.D. *Zellteilung berücksichtigt.

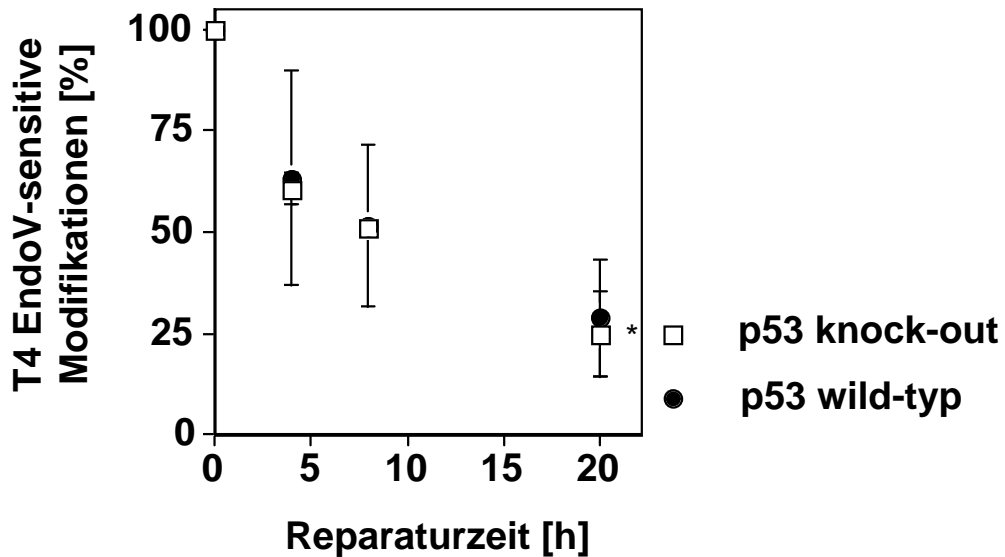


Abb. 4.45 Reparatur T4 Endo V-sensitiver Basenmodifikationen nach Schädigung mit UV-B-Licht (6.5 J/m^2) in primären Mausfibroblasten aus p53-knock-out- und p53-wild-typ-Mäusen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen \pm S.D. *Zellteilung berücksichtigt.

Um die Auswirkungen von p53 auf die Reparatur eines sehr viel höheren Schadens zu untersuchen, wurden A253-Zellen, „vector-only“-transformierte Zellen (A253CW16G) und entsprechende p53-cDNA-transformierten Zellen (A253CW14G, Klon 1) nach der Schädigung (177 J/m^2 UV-B-Licht) 24 Stunden zur Reparatur bei 37°C inkubiert. Die nach 24h noch vorhandenen T4 Endo V-sensitiven Modifikationen wurden mit Hilfe der schnellen Variante der Alkalischen Elution bestimmt. Der noch vorhandene Anteil an DNA-Schäden entspricht bei allen drei Zelllinien in etwa 15% der theoretisch nach Induktion mit 177 J/m^2 zu erwartenden 7.5 T4 Endo V-sensitiven Modifikationen pro 10^6 bp . Der Berechnung liegen die Ergebnisse aus **Abb. 4.2** zugrunde. Die absoluten Werte betragen in allen drei Fällen ungefähr eine Läsion pro 10^6 bp (siehe **Abbildung 4.46**).

Es ist also kein Unterschied in der Reparatur T4 Endo V-sensitiver Modifikationen in p53-defekten und p53-korrigierten Zellen nach Schädigung mit einer hohen Dosis UV-B festzustellen.

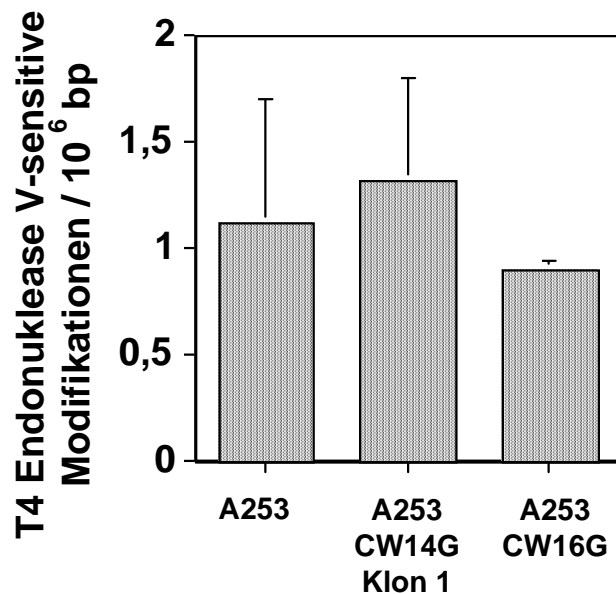


Abb. 4.46 Noch vorhandene T4 Endo V-sensitive Basenmodifikationen nach 24-stündiger Reparatur nach Schädigung mit UV-B-Licht (177 J/m^2) in p53-defekten A253-Zellen, p53-korrigierten A253CW14G (Klon 1) und vector-only-transformierten A253CW16G. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen \pm S.D. Die Zellteilung wurde berücksichtigt.

Sowohl in permanenten, stabil p53 überexprimierenden Zellen, als auch in primären Zellen, bei denen p53 unter der „normalen“ Kontrolle übergeordneter Gene steht, ist unter dem Einfluß keine verbesserte Reparatur UV-induzierter, T4 Endo V-sensitiver Modifikationen zu messen.

4.4.9 Immunoblotting - Nachweis der p53-Expression in A253CW14G-Zellen

A253-, A253CW16G- („vector-only“-Kontrolle) und mit hp53-cDNA transformierte A253CW14G-Zellen (Klon 1 und 2) wurden zur Proteinaufbereitung homogenisiert. Die Auftrennung der Proteine im Polyacrylamid-Gel erfolgt durch SDS-Proteingelelektrophorese (siehe **Abb. 4.47** und **4.49**). Anschließend werden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen („Western Blot“) und p53-Protein durch Antikörperreaktion nachgewiesen (siehe 3.2.9.3). Die Ergebnisse sind in den **Abbildungen 4.48** und **4.50** dargestellt. Da die Laufstrecke des SDS-Gels, dargestellt in **Abb. 4.47**, geringer als die des Gels aus **Abb. 4.49** ist, wird klar, warum keine gute Trennung des Proteingemischs des SDS-Gels in **Abb. 4.47** erreicht werden konnte. A253 und A253CW16G sind nicht in der Lage, das Protein p53 zu exprimieren, während die durch Transformation mit p53-cDNA erhaltenen Klone 1 (**Abb. 4.50**) und 2 (**Abb. 4.48**) der A253CW14G-Zellen p53 stabil exprimieren.

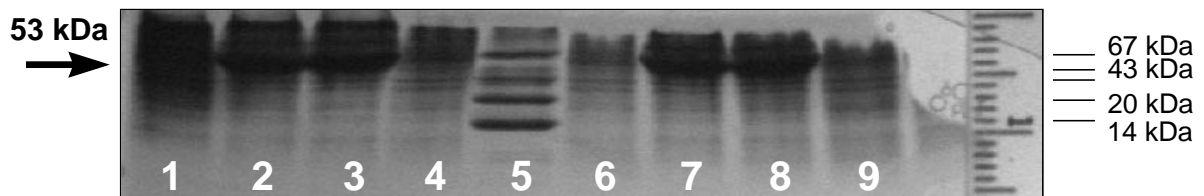


Abb. 4.47 SDS-Gelelektrophorese der Zelllysate von p53-defekten A253-Zellen, vector-only-transformierten A253CW16G-Zellen und p53-cDNA-transformierten A253CW14G-Zellen (Klon 2).

Spur 1: A253

Spur 2: A253

Spur 3: A253CW14G / Klon2

Spur 4: A253CW14G / Klon2

Spur 5: Längenstandard

(SDS-7 Dalton Mark VII-L)

Spur 6: A253CW16G

Spur 7: A253CW16G

Spur 8: A253CW14G / Klon2

Spur 9: A253CW14G / Klon2

Spur 10: A253CW14G / Klon2

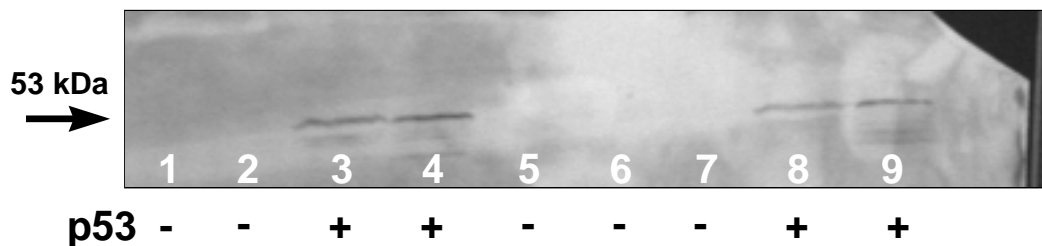


Abb. 4.48 Immunochemischer Nachweis des Proteins p53 in unbehandelten A253-Zellen, „vector-only“-transformierten Zellen (A253CW16G) und p53-cDNA-transformierten Zellen (A253CW14G, Klon 2). Westernblot mit p53-Antikörper. Spurenverteilung analog **Abb. 4.49**.

Antikörper: 1.: BP 53-12 (monoklonaler Anti-p53-Maus-AK)

2.: Goat-Anti-Mouse, Alkaline Phosphatase-labeled

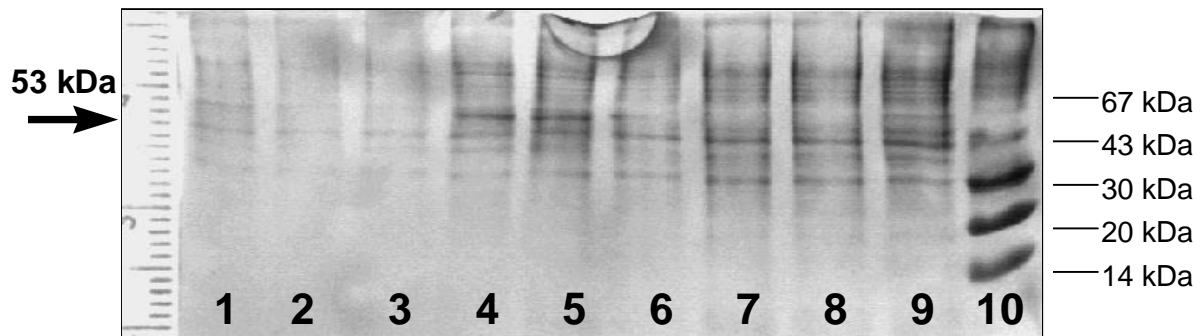


Abb. 4.49 SDS-Gelelektrophorese der Zelllysate p53-cDNA-transformierter A253CW14G-Zellen (Klon 1). Von links nach rechts wurden steigende Mengen des Total-Protein-Gehalts (TP) aufgetragen.

Spur 1: A253CW14G/Klon1, 20 µg TP Spur 6: 50 µg TP

Spur 2: 20 µg TP

Spur 7: 50 µg TP

Spur 3: 20 µg TP

Spur 8: 100 µg TP

Spur 4: 50 µg TP

Spur 9: 100 µg TP

Spur 5: 50 µg TP

Spur 10: Längensstandard

(SDS-7 Dalton Mark VII-L)

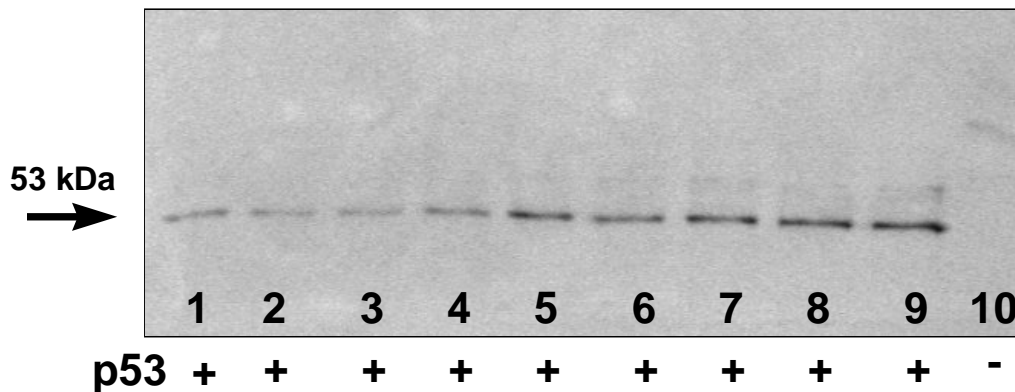


Abb. 4.50 Immunochemischer Nachweis des Proteins p53 in p53-cDNA-transformierten A253CW14G-Zellen (Klon 1). Westernblot mit p53-Antikörper. Spurenverteilung analog Abb. 4.47.

Antikörper: 1.: BP 53-12 (monoklonaler Anti-p53-Maus-AK)

2.: Goat-Anti-Mouse, Alkaline Phosphatase-labeled

4.5 Untersuchung der durch Alkoxy-Radikale-induzierten DNA-Schäden

Alkoxy-Radikale entstehen endogen bei der Lipidperoxidation (**Dix et al., 1993; Fujita et al. 1992**). Die Bildung oxidativer DNA-Schäden und Mutation durch Alkoxy-Radikale sind jedoch unzureichend erforscht.

Es wurde gezeigt, daß die Photolyse des wasserlöslichen Peroxyesters [4-[(*tert*-butyldioxy)carbonyl]benzyl]-triethylammoniumchlorid (BCBT) die Bildung von *tert*-Butoxyradikalen bedingt (**Adam et al., 1998**). Die Bildung von DNA-Schäden und Mutationen der durch diese Verbindung generierten Alkoxy-Radikale wurden im folgenden Kapitel untersucht.

4.5.1 Charakterisierung von Modifikationen in zellfreier DNA

4.5.1.1 Zellfreie Entstehung von DNA-Modifikationen durch BCBT + UV-A

Zunächst wurde der durch [4-[(*tert*-butyldioxy)carbonyl]benzyl]-triethylammoniumchlorid (BCBT) und [4-[methylcarbonyl]benzyl]-triethylammoniumchlorid (MCBT) unter zellfreien Bedingungen erhaltene DNA-Schaden untersucht. Superhelikale DNA des Bakteriophagen PM2 wurde mit 1 mM BCBT und verschiedenen Lichtdosen UV-A-Licht (360 nm) (vgl. Kap. 3.2.1.2.2). Nach Fällung der DNA wurde diese auf direkte Einzelstrangbrüche und Basenmodifikationen die von Fpg-Protein erkannt werden untersucht. Wie aus **Abbildung 4.51** hervorgeht, generiert BCBT plus UV360 Fpg-sensitive Modifikationen in hohem Ausmaß und nur wenig direkte Strangbrüche. Die Entstehung beider DNA-Schäden verläuft proportional zur Bestrahlungsdosis. Durch Inkubation der PM2 DNA mit BCBT ohne Bestrahlung entsteht kein DNA-Schaden (Daten nicht gezeigt). Der photochemisch stabile Ester MCBT, der als Kontrolle ebenfalls mit PM2 DNA inkubiert und mit UV360 bestrahlt wurde, bewirkt selbst bei großen Bestrahlungsdosen keine Schädigung der DNA.

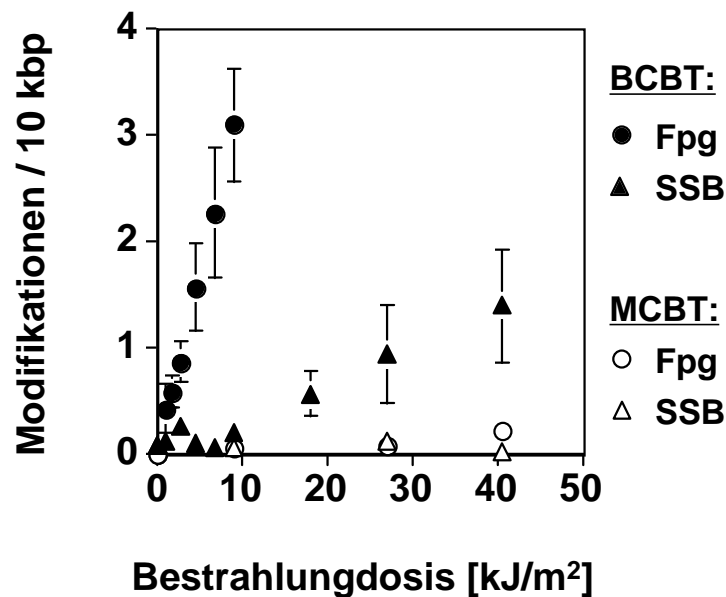


Abb. 4.51 Entstehung von Einzelstrangbrüchen (SSB) und Fpg-sensitiven Läsionen (Endonuklease-sensitive Modifikationen + SSB) in zellfreier PM2 DNA durch Inkubation mit 1 mM BCBT (schwarze Symbole) und 1 mM MCBT (offene Symbole) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer mit UV-A-Licht (360 nm). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2-6 Bestimmungen \pm S.D.

BCBT erzeugt fast ausschließlich Fpg-sensitive Modifikationen und sehr wenig direkte SSB bzw. andere Endonuklease-sensitive Modifikationen. Die von verschiedenen Reparaturodonukleasen erkannte Modifikationen die durch BCBT UV-A-Licht erzeugt werden, sind in **Abbildung 4.52** in einem sog. DNA-Schadensprofil zusammengefaßt.

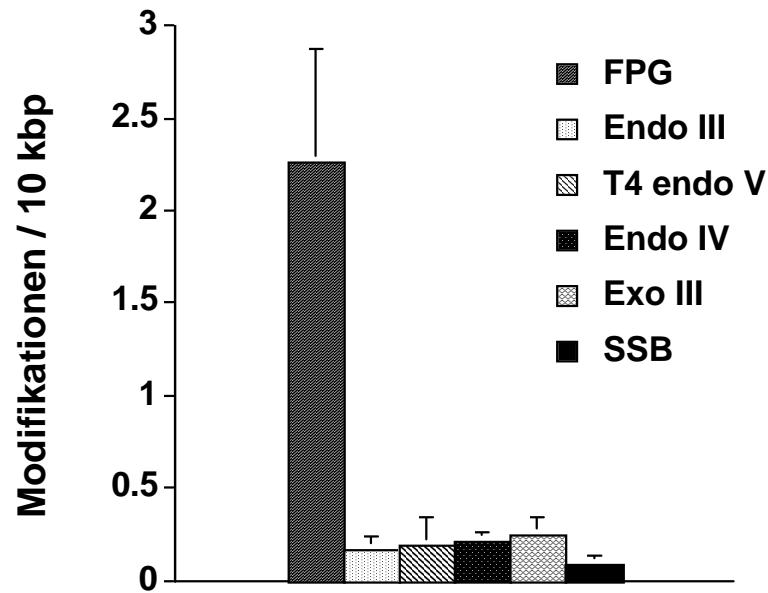


Abb. 4.52 DNA-Schadensprofil von BCBT (1 mM) in PM2 DNA nach Bestrahlung mit UV-A-Licht (6.75 kJ/m^2). Die Säulen geben die Zahl verschiedener Endonuklease-sensitiver Modifikationen (ESS), die um die Zahl der SSB korrigiert wurden, und die Zahl direkter Einzelstrangbrüche an. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3-7 Bestimmungen \pm S.D.

4.5.1.2 Einfluß von Quenchern auf die Schädigung zellfreier DNA

Um herauszufinden, ob und inwiefern sich die durch BCBT und UV360 gebildete, ultimale mit der DNA reagierende reaktive Spezies von Singulett-Sauerstoff und Typ-I-Photosensibilisatoren unterscheidet, waren weitere Versuche erforderlich. Experimente in D_2O -Puffer, welcher die Halbwertszeit von Singulett-Sauerstoff verlängert und Versuche unter Zusatz von Katalase, SOD, Natriumazid und *tert*-Butanol können indirekte Hinweise auf die Art der reaktiven Spezies liefern.

Abbildung 4.53 zeigt die Reduzierung des DNA-Schadens, gemessen als Fpg-sensitive Modifikationen, durch steigende Konzentrationen an Natriumazid.

Aus **Abbildung 4.54** ist ersichtlich, in welchem Ausmaß *tert*-Butanol die Entstehung Fpg-sensitiver Modifikationen durch BCBT + UV360 zu verhindern vermag. *tert*-Butanol zeigt stark inhibierende Effekte auf die Schädigung, sie ist jedoch schwächer als bei Hydroxylradikalen als ultimale Spezies (Epe et al., 1996).

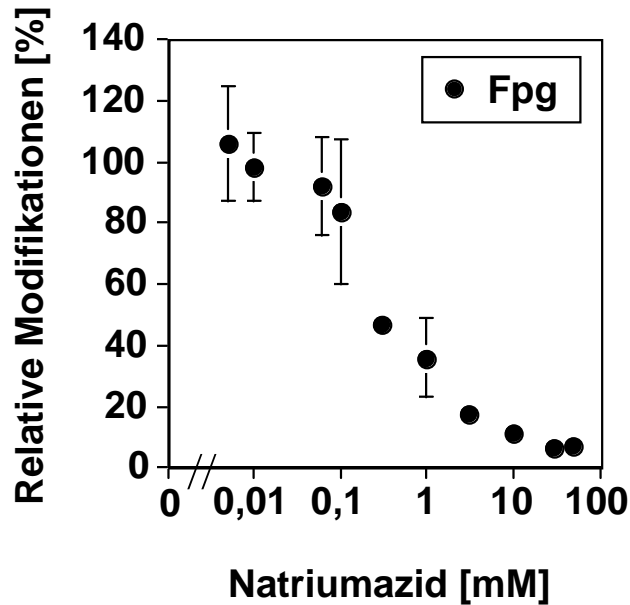


Abb. 4.53 Einfluß von Natriumazid auf die Entstehung Fpg-sensitiver Läsionen (ESS+SSB) an zellfreier PM2 DNA durch 1 mM BCBT + UV-A-Licht (6.75 kJ/m^2). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2-6 Bestimmungen \pm S.D.

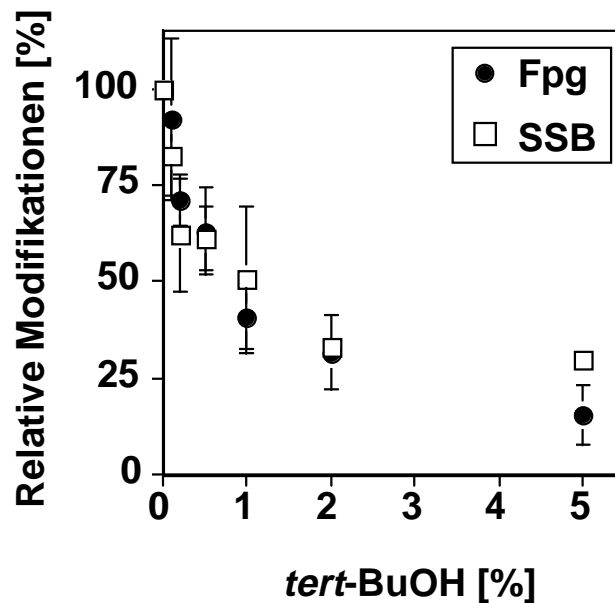


Abb. 4.54 Einfluß von *tert*-Butanol auf die Entstehung von Einzelstrangbrüchen (SSB) und Fpg-sensitiven Läsionen (ESS+SSB) an zellfreier PM2 DNA durch 1 mM BCBT + UV-A-Licht (6.75 kJ/m^2). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2-5 Bestimmungen \pm S.D.

Die Ergebnisse der Schädigung in Anwesenheit von Natriumazid, *tert*-Butanol, Katalase und SOD sowie der Schädigung in D_2O -Puffer sind **Tabelle 4.9** zu entnehmen.

Tab. 4.9 Einfluß verschiedener Zusätze auf die DNA-Schädigung durch 1 mM BCBT und 6.75 kJ/m² UV360. # Die Zahl der Modifikationen ohne Zusatz wird als 100% angenommen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 6-12 Bestimmungen \pm S.D.

Zusatz	Relative Zahl an Modifikationen [%] #	
	Fpg-sens. Modifikationen	SSB
D₂O-Puffer	86 \pm 13	93 \pm 9
Katalase (315 U/ml)	105 \pm 27	117 \pm 21
SOD (20 μ g/ml)	97 \pm 32	99 \pm 18
Natriumazid (1 mM)	36 \pm 13	n. b.
tert-Butanol (0.5 %)	70 \pm 13	63 \pm 22
tert-Butanol (2 %)	32 \pm 10	36 \pm 8

Aus **Tabelle 4.9** geht hervor, daß D₂O keinen Einfluß auf die Schädigung hat. Ebenso zeigt der Zusatz von Katalase bzw. SOD keinerlei Wirkung. Es handelt sich daher weder um eine durch Singulett-sauerstoff noch Hydroxylradikale verursachte Schädigung.

Die Darstellung der reziproken Werte des nach Zusatz verschiedener Konzentrationen von *tert*-Butanol bzw. Natriumazid noch vorhandenen Anteils Fpg-sensitiver Modifikationen erfolgt in einem sog. Stern-Volmer-Plot. Die Werte ergeben in dieser Darstellung eine Gerade, deren Steigung („Quench-Konstanten“ als Maß für das Ausmaß anzusehen ist, mit der der Zusatz (*tert*-Butanol bzw. Natriumazid) die DNA-Schädigung durch eine bestimmte reaktive Spezies zu inhibieren vermag.

Tab. 4.10 Stern-Volmer-Konstanten von BCBT für *tert*-Butanol und Natriumazid.

	Quenchkonstante für	
	<i>tert</i> -Butanol [M ⁻¹]	Natriumazid [mM ⁻¹]
BCBT (1mM) plus UV360	15.1 \pm 6.0	2.18 \pm 0.47

Tabelle 4.10 gibt die sog. Quenchkonstanten für die Schädigung mit BCBT und UV360 für Natriumazid und *tert*-Butanol an. Der Vergleich mit bekannten Quenchkonstanten reaktiver Spezies wie Hydroxylradikalen (generiert durch 2-HPT und Licht), Singulett-sauerstoff (generiert durch NDPO₂) ermöglicht die Identifikation der reaktiven Spezies und zeigt klar, daß es sich bei den durch BCBT nach Bestrahlung generierten reaktiven Spezies um ein anderes Radikal, nämlich *tert*-Butoxy-Radikale handelt.

4.5.1.3 Einfluß von Quenchern auf die Schädigung zellfreier DNA durch Riboflavin

Um den Vergleich von Stern-Volmer-Konstanten („Quench-Konstanten“) mit den bereits ermittelten Konstanten von BCBT zu ermöglichen, wurde im folgenden der Einfluß von Natriumazid und *tert*-Butanol auf die Schädigung durch Riboflavin, einem Typ-I-Photosensibilisator, untersucht.

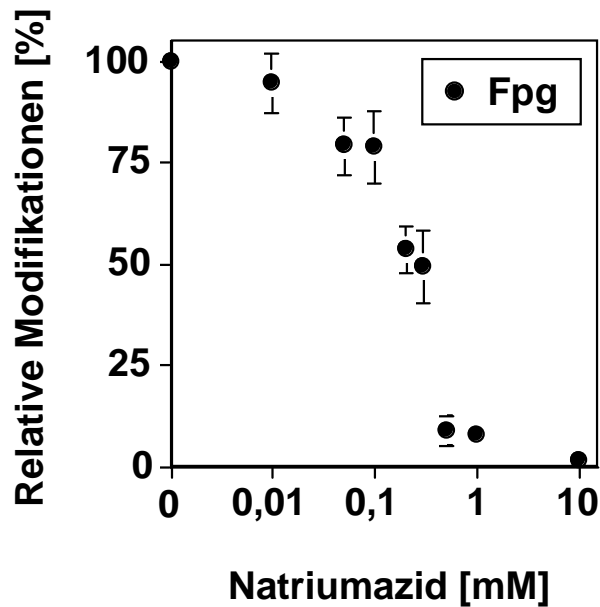


Abb. 4.55 Einfluß von Natriumazid auf die Entstehung Fpg-sensitiver Läsionen (ESS+SSB) in zellfreier PM2 DNA durch 30 μ M Riboflavin und sichtbares Licht (11,25 kJ/m²). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 5 Bestimmungen \pm S.D.

Abbildung 4.55 zeigt den Einfluß von Natriumazid auf die Entstehung Fpg-sensitiver Modifikationen durch Riboflavin und sichtbares Licht. Die Inhibierung des Schadens ist hier weitaus stärker als bei der Schädigung mit BCBT oder auch NDPO₂.

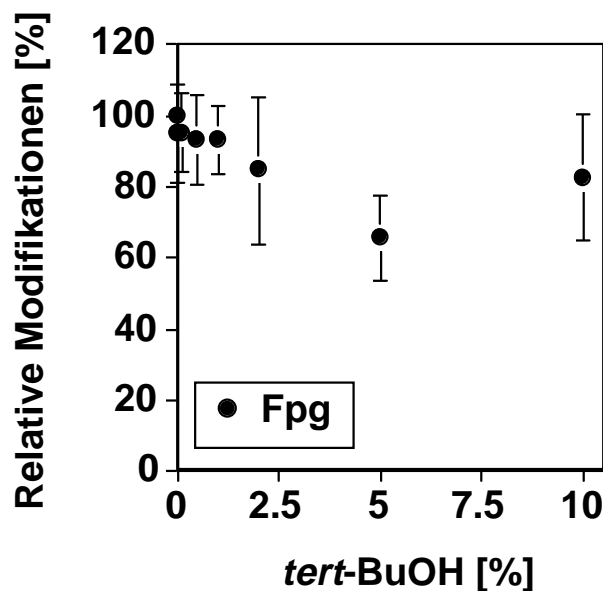


Abb. 4.56 Einfluß von *tert*-Butanol auf die Entstehung Fpg-sensitiver Läsionen (ESS+SSB) an zellfreier PM2 DNA durch 30 μ M Riboflavin und sichtbares Licht (11,25 kJ/m²). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 5 Bestimmungen \pm S.D.

Während die Anwesenheit von Natriumazid die Schädigung durch Riboflavin beeinflusst, zeigt die Gegenwart von *tert*-Butanol kaum Auswirkungen auf die Schädigung (**Abb. 4.56**).

Tabelle 4.11 zeigt die Stern-Volmer-Konstanten („Quench-Konstanten“), die wie oben beschrieben ermittelt wurden.

Tab. 4.11 Stern-Volmer-Konstanten für *tert*-Butanol und Natriumazid bei der Schädigung durch Riboflavin + Licht.

	Quenchkonstante für	
	<i>tert</i> -Butanol [M ⁻¹]	Natriumazid [mM ⁻¹]
Riboflavin + Licht	0.19 ± 0.26	5.02 ± 0.67

Der Wert für die Natriumazid-bedingte Inhibierung Fpg-sensitiver Modifikation, die durch Riboflavin gebildet werden beträgt nahezu Null.

4.5.2 Nachweis von 8-oxodG in PM2 nach Schädigung mit BCBT durch HPLC

Die Bestimmung des durch BCBT und Bestrahlung mit UV360 induzierten Gehalts an 8-oxoG in zellfreier PM2 DNA erfolgte mittels HPLC (elektrochemische Detektion) nach Totalhydrolyse der DNA (siehe 3.2.7.2). Die Detektion von 8-oxodG erfolgte durch Messung der Absorption bei 290 nm.

Die mit Hilfe des Relaxationsassays bestimmte Anzahl induzierter Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen wurden mit dem Ergebnis der 8-oxoG-Bestimmung verglichen (**Tab. 4.12**). Der Quotient beider Messungen ergibt die Zahl der Fpg-sensitiven Modifikationen, bei denen es sich um 8-oxodG handelt (und nicht um andere Fpg-sensitive Modifikationen wie etwa FaPy). Der Quotient 8-oxodG/Fpg-sensitive Modifikationen ist charakteristisch für die ultimale DNA-schädigende Spezies.

8-oxodG zeigte unter den gewählten HPLC-Bedingungen eine Retentionszeit von ca. 8.4 Minuten, während dG nach ca. 6 min und dT nach ca. 7.2 min detektiert wurde (**Abb. 4.57**).

Tab. 4.12 Verhältnis von 8-oxodG (ermittelt durch HPLC/ECD) und Fpg-sensitiven Modifikationen (ermittelt durch PM2 Relaxationsassay) und Verhältnis von AP-Läsionen (Endonuklease IV-sensitive Modifikationen) und Fpg-sensitiven Modifikationen (ermittelt im Relaxationsassay). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 1-4 Bestimmungen ± S.D.

8-oxodG / Fpg-sens. Modifikation	AP-Läsionen / Fpg-sens. Modifikation
83 ± 18 %	10 ± 2 %

Die Ergebnisse aus **Tabelle 4.12** zeigen, daß es sich bei 83% der Fpg-sensitiven Modifikationen nach Schädigung mit BCBT und UV360 um 8-oxodG handelt. Wie aus dem zellfreien Schadensprofil von BCBT ablesbar, entstehen AP-Läsionen in einer Menge, die etwa 5% des entstandenen Schadens, der durch Fpg-Protein erkannt wird, entspricht. Die Schädigung zellfreier DNA führt also hauptsächlich zur Entstehung von 8-oxodG.

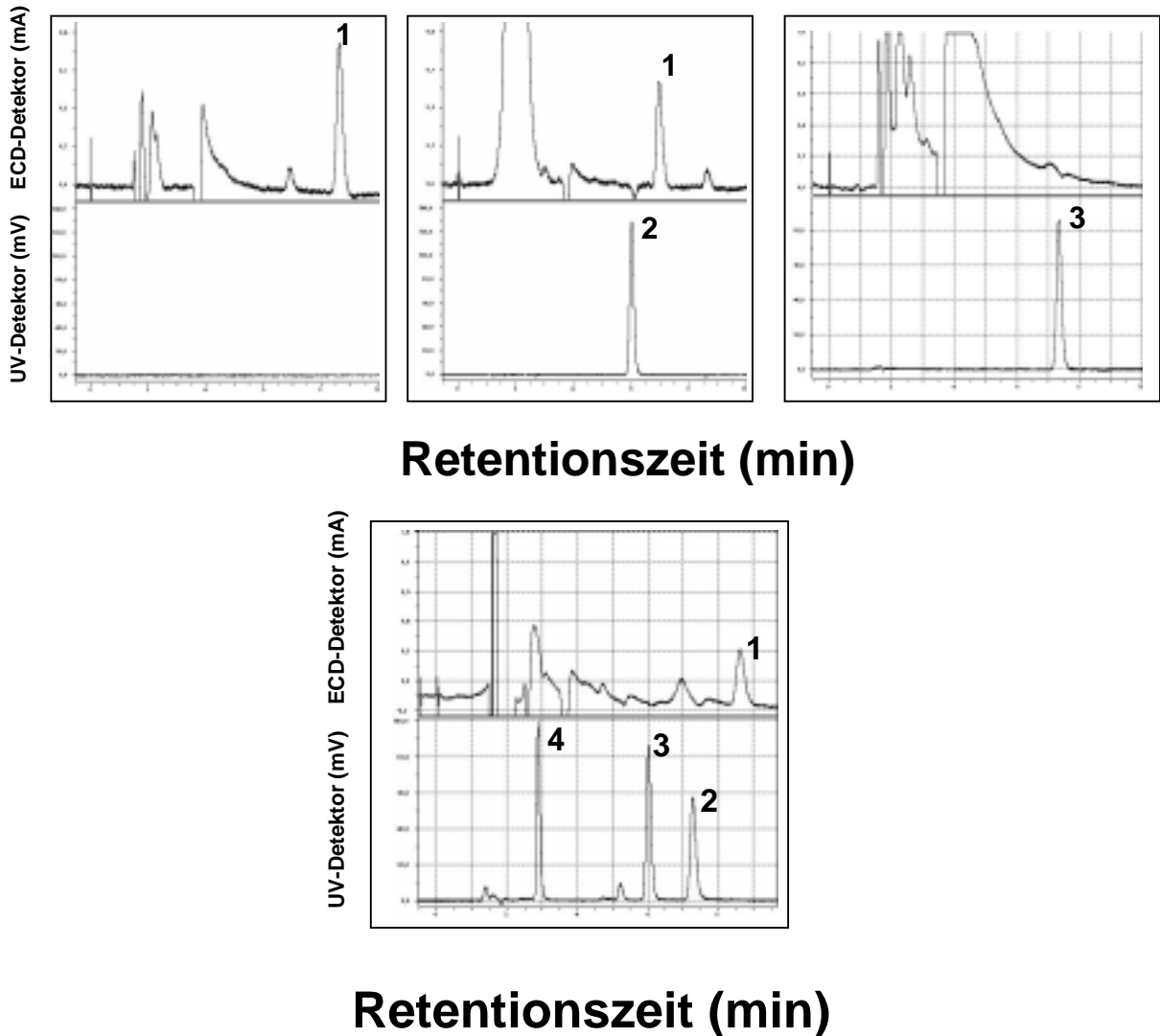


Abb. 4.57 HPLC-Diagramme von 8-oxodG-, dG- und dT-Standard und hydrolysiertes PM2 DNA; [1 = 8-oxodGuanosin, 2 = 2-dGuanosin, 3 = 2-dThymidin, 4 = 2-dCytidin]

Oben (von links nach rechts): a) 1 pmol 8-oxodG (t_R 8:39)

b) 5 nmol dG (t_R 6:03)

c) 5 nmol dT (t_R 7:21)

Unten:

a) mit 1 mM BCBT und 90 kJ/m^2 geschädigte, hydrolysierte PM2 DNA

4.5.3 Charakterisierung von Modifikationen in zellulärer DNA durch Alkalische Elution

Die Schädigung von AS52-Zellen mit BCBT und UV360 wurde mit Hilfe der Alkalischen Elution untersucht. Die Ergebnisse sind in **Abb. 4.58** dargestellt. Sie zeigen eine lineare Zunahme von SSB und Fpg-sensitiven Modifikationen mit der Bestrahlungsdosis.

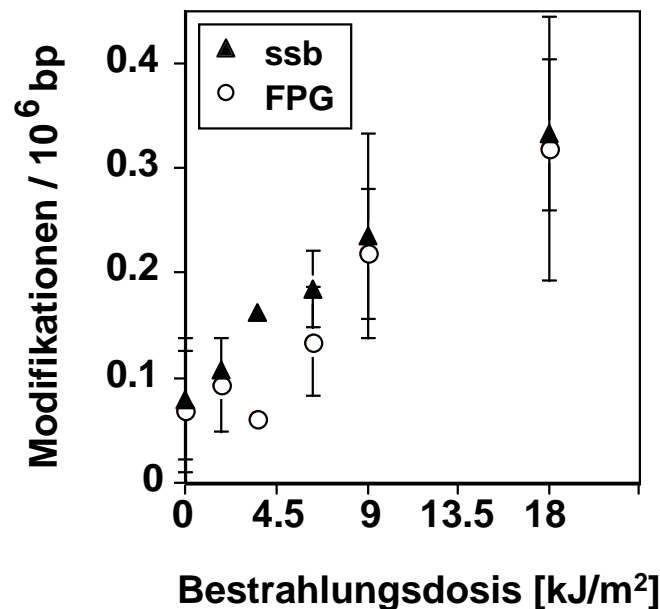


Abb. 4.58 Entstehung von Einzelstrangbrüchen (SSB) und Fpg-sensitiven Modifikationen in AS52-Zellen mit 1 mM BCBT in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis mit UV-A-Licht (360 nm). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen \pm S.D.

Die Inkubation von BCBT mit AS52-Zellen im Dunkeln induzierte weder direkte Einzelstrangbrüche noch Endonuklease-sensitive Modifikationen (Daten nicht gezeigt). Die Bestrahlung mit einer Lösung von BCBT mit UV-A-Licht ergab das in **Abbildung 4.59** gezeigte Schadensprofil. Wie aus **Abb. 4.58** und **4.59** ersichtlich, beträgt das Verhältnis direkt durch BCBT nach Bestrahlung entstandener Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitiver Modifikationen ca. 1:1. Endonuklease III-, T4 Endonuklease V- und Endonuklease IV-sensitive Modifikationen betragen ca. 40% der von Fpg-Protein erkannten Läsionen. Das Schadensprofil ähnelt stark dem durch Hydroxylradikale entstandenen Schadensprofil (**Epe, 1995**) und unterscheidet sich deutlich von dem unter zellfreien Bedingungen an PM2 DNA beobachteten (**Abb. 4.52**). Auch das absolute Ausmaß der Schäden ist stark unterschiedlich: Während 1 mM BCBT bei Bestrahlung mit 10 kJ/m² UV-A zellfrei an PM2 DNA etwa 3 Fpg-sensitive Modifikationen pro 10⁴ bp induziert, sind mit der gleichen Konzentration bei Bestrahlung mit 9 kJ/m² UV-A in AS52-Zellen nur etwa 0.2 Fpg-sensitive Modifikationen pro 10⁶ bp.

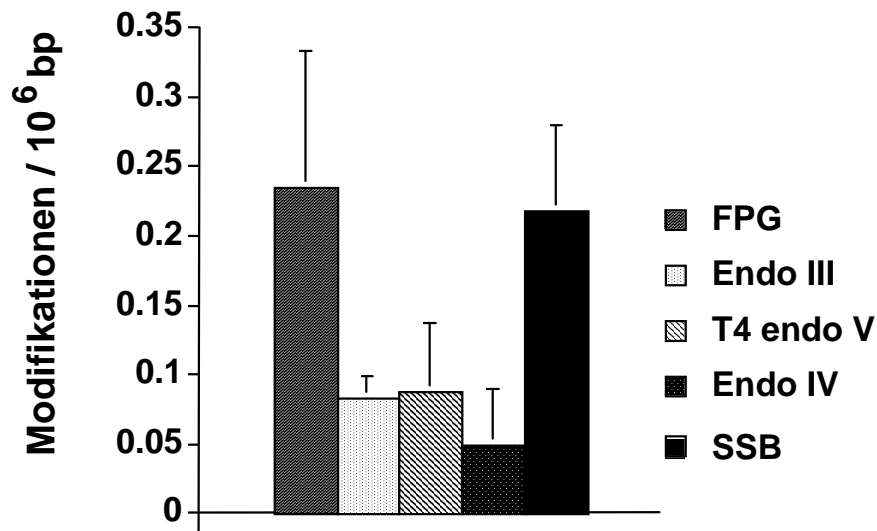


Abb. 4.59 DNA-Schadensprofil von BCBT (1 mM) in AS52-Zellen bei Bestrahlung mit 9 kJ/m^2 UV-A-Licht. Die Säulen geben die Zahl verschiedener endonuklease-sensitiver Modifikationen und direkter Einzelstrangbrüche an. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D.

4.5.4 Untersuchung der Mutagenität und Toxizität von BCBT

4.5.4.1 Zellfreie Entstehung von DNA-Schäden durch BCBT in Plasmid pSV2-gpt

Analog zu der Schädigung von PM2 DNA (siehe **Abb. 4.51**) wurde zellfreie DNA des Plasmids pSV2-gpt mit BCBT und variablen Bestrahlungsdosen geschädigt. Fpg-sensitive Modifikationen und SSB entstehen linear mit zunehmender Bestrahlungsdosis (**Abb. 4.60**).

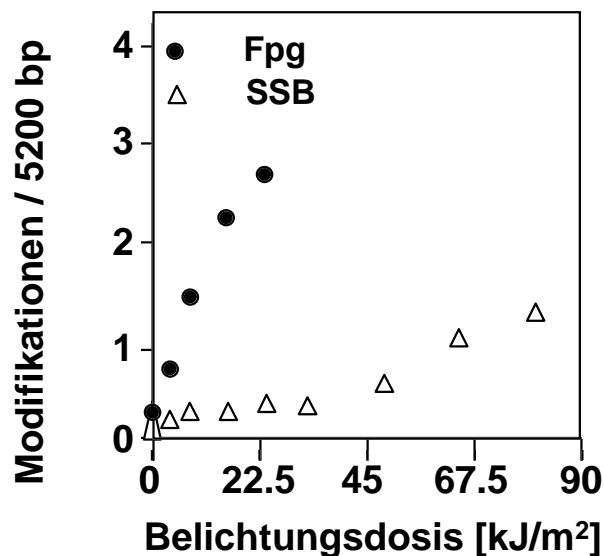


Abb. 4.60 Entstehung von Einzelstrangbrüchen (SSB) und Fpg-sensitiven Läsionen in zellfreier DNA (Plasmid pSV2-gpt) mit 2 mM BCBT in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer mit UV-A-Licht (360 nm).

4.5.4.2 Transformationsrate und Mutagenität von BCBT

Das mutagene Potential der durch BCBT gebildeten Alkoxy-Radikale wurde in einem bakteriellen Vektor-System untersucht. Dazu wurde pSV2-*gpt* Plasmid nach Schädigung mit BCBT + UV360 (vgl. Kap. 3.2.1.2.2) in *E. coli* DT-2 transformiert (siehe 3.2.2). Als Folge der DNA-Schädigung kommt es zur Abnahme der Transformationsrate. Transformaten besitzen Resistenz gegenüber Ampicillin, während Mutanten eine Ampicillin- und 6-Thioguanin-Resistenz aufweisen. In **Abbildung 4.61** ist die Transformationsrate des Plasmids pSV2-*gpt* in Prozent halblogarithmisch dargestellt. Die Transformationsrate mit ungeschädigtem Plasmid wird als 100% definiert. Die Transformationsrate nimmt mit Dauer der Bestrahlung - und damit Zunahme der Fpg-sensitiven Modifikationen im Plasmid - ab.

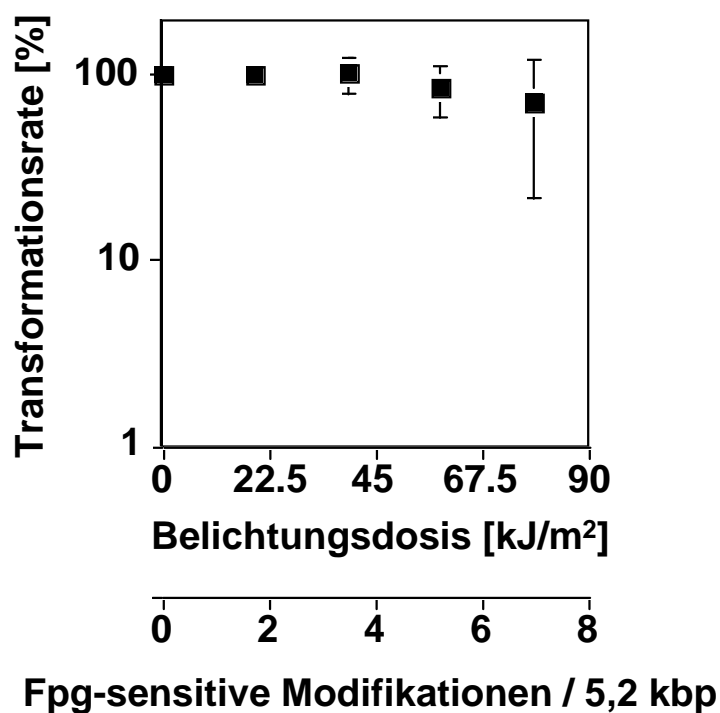


Abb. 4.61 Transformationsrate des mit BCBT (2 mM) geschädigten Plasmids pSV2-*gpt* in *E. coli* DT-2 Bakterien in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer mit UV-A-Licht. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 6 Bestimmungen \pm S.D. Die Anzahl Fpg-sensitiver Modifikationen wurde durch lineare Extrapolation der in **Abb. 4.60** gezeigten Daten erhalten.

In **Abbildung 4.62** wird die Mutationsfrequenz in Plasmid pSV2-*gpt* gezeigt. Mit zunehmender Belichtungszeit steigt die Anzahl Fpg-sensitiver Modifikation pro Plasmid und die Zahl der durch BCBT und UV360 induzierten Mutanten nahezu linear an. Die Darstellung in **Abb. 4.62** läßt einen Zusammenhang mit der Zahl induzierter Fpg-sensitiver Modifikationen vermuten.

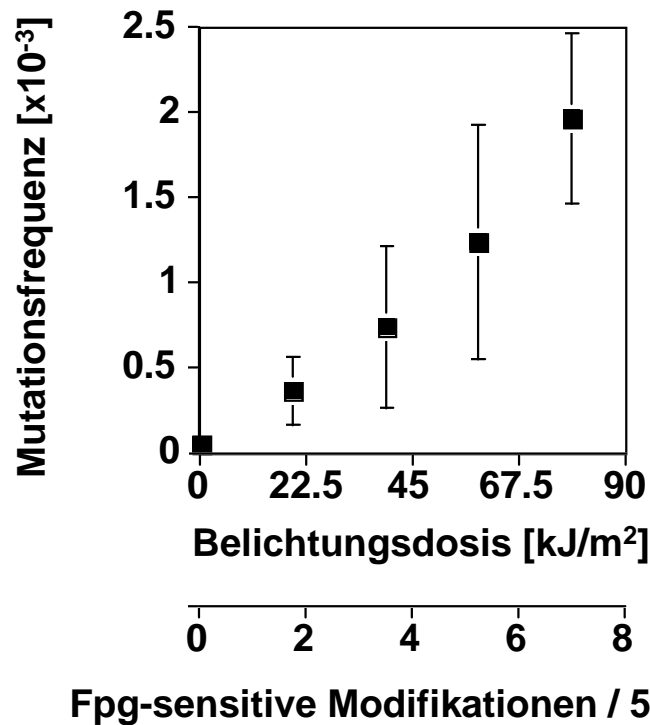


Abb. 4.62 Mutationsfrequenz von BCBT (2 mM) im *gpt*-Gen des Plasmids pSV2-*gpt* in *E. coli* DT-2 Bakterien in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer mit UV-A-Licht. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 6 Bestimmungen \pm S.D. Die Anzahl Fpg-sensitiver Modifikationen wurde durch lineare Extrapolation der in **Abb. 4.58** gezeigten Daten erhalten.

4.5.4.3 Sequenzanalyse der durch BCBT induzierten *gpt*-Mutanten

Um die Art der Mutationen und damit der zugrundeliegenden DNA-Schäden zu ermitteln, wurde Plasmid-DNA der Mutanten isoliert und die *gpt*-Sequenz analysiert. Die durch die Sequenzanalyse im *gpt*-Gen gefundenen Mutationen sind in **Abb. 4.63** dargestellt. **Tabelle 4.13** zeigt Anzahl und Art der gefundenen Mutationen der mit BCBT + UV-A induzierten Mutanten.

Tab. 4.13 Durch BCBT und UV360 induzierte Mutation in der *gpt*-Sequenz des pSV2-*gpt* Plasmids (21 Sequenzierungen). Die Basen des codierenden Stranges (nicht transkribiert) sind unterstrichen.

Mutationsart	Anzahl
<u>GC</u> → <u>CG</u>	0
<u>GC</u> → <u>CG</u>	1
<u>GC</u> → <u>TA</u>	16
<u>GC</u> → <u>TA</u>	4
<u>GC</u> → <u>AT</u>	0
Transposon	1

Man kann erkennen, daß 20 der 21 Punktmutationen GC →TA Transversionen sind. In 16 Fällen (80%) befindet sich das Guanin dabei auf dem codierenden (nicht transkribierten) Strang. Insgesamt 6 Mutanten wiesen eine Punktmutation der Base 145 auf, die zu einem Stop-Codon führt.

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

Abb. 4.63 Mutationen in der *gpt*-Sequenz, induziert durch BCBT + UV-A in *E. coli* DT-2.

4.5.4.4 Untersuchung der Mutagenität und Toxizität von NDPO₂

pSV2-*gpt* Plasmid wurde nach Schädigung mit NDPO₂ (vgl. Kap. 3.2.1.2.1) in *E. coli* DT-2 transformiert (siehe 3.2.2). Die induzierten DNA-Schäden wurden mit Hilfe des Relaxationsassays in pSV2-*gpt* Plasmid in Kombination mit Reparaturenukleasen quantifiziert (Abb. 4.64).

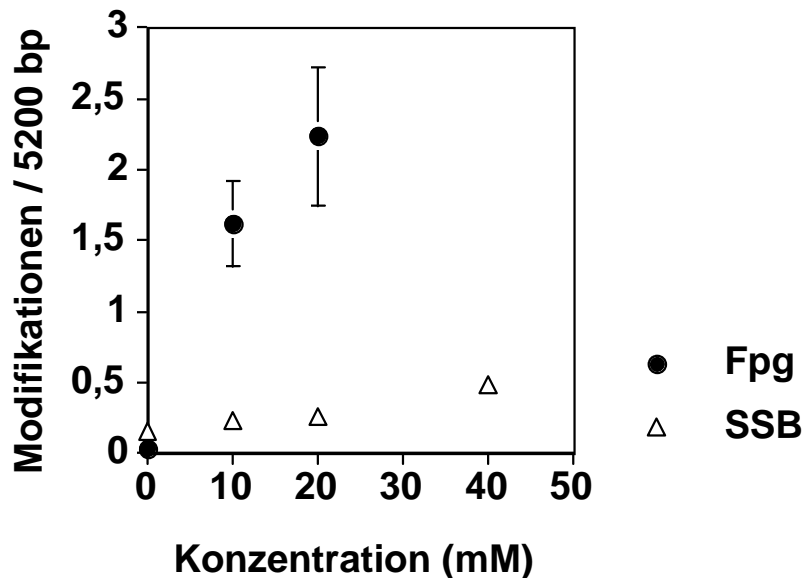


Abb. 4.64 Entstehung von Einzelstrangbrüchen (SSB) und Fpg-sensitiven Läsionen in zellfreier DNA (Plasmid pSV2-*gpt*) mit NDPO₂ (10-40 mM).

Als Folge der DNA-Schädigung kommt es zur Abnahme der Transformationsrate. In **Abbildung 4.65** ist die Transformationsrate nach Schädigung mit NDPO₂ in Prozent halblogarithmisch dargestellt. Die Transformationsrate ist auch nach Induktion von ca. 5 Fpg-sensitiven Modifikationen pro Plasmid kaum reduziert.

In **Abbildung 4.66** wird die Mutationsfrequenz im Plasmid pSV2-*gpt* nach Schädigung mit NDPO₂ gezeigt. Die Zahl induzierter Mutanten steigt linear mit der Anzahl Fpg-sensitiver Modifikation pro Plasmid. Die Steigung der Mutationsfrequenz pro Fpg-sensitiver Modifikation entspricht der in **Abb. 4.62** (Mutationsfrequenz von BCBT).

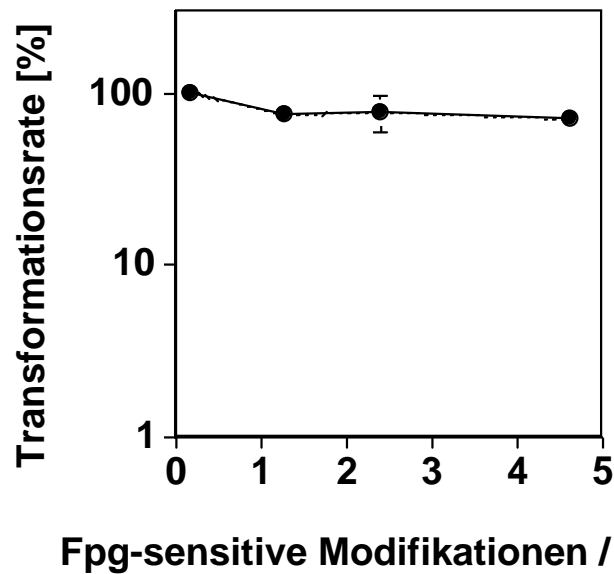


Abb. 4.65 Transformationsrate des mit NDPO₂ (10-40 mM) geschädigten Plasmids pSV2-*gpt* in *E. coli* DT-2 Bakterien. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 6 Bestimmungen \pm S.D. Die Anzahl Fpg-sensitiver Modifikationen wurde durch lineare Extrapolation der in **Abb. 4.64** gezeigten Daten erhalten.

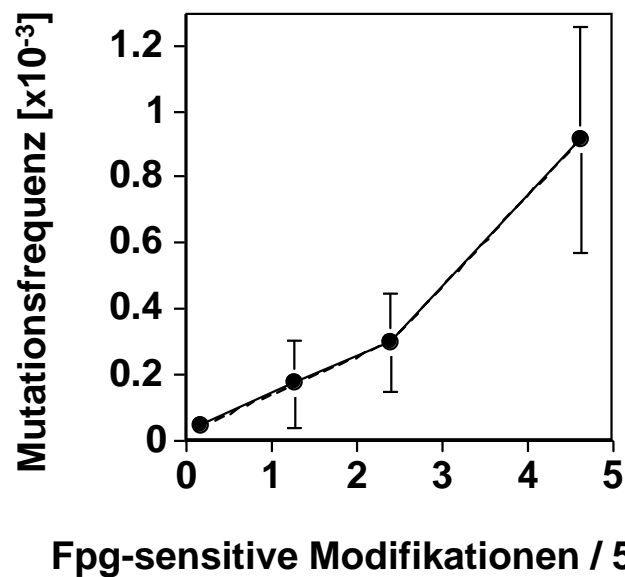


Abb. 4.66 Mutationsfrequenz von NDPO₂ (10-40 mM) im *gpt*-Gen des Plasmids pSV2-*gpt* in *E. coli* DT-2 Bakterien. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 7 Bestimmungen \pm S.D. Die Anzahl Fpg-sensitiver Modifikationen wurde durch lineare Extrapolation der in **Abb. 4.64** gezeigten Daten erhalten.

4.5.4.5 Sequenzanalyse der durch NDPO₂ induzierten *gpt*-Mutanten

Nach Isolierung der DNA der Mutanten wurde die *gpt*-Sequenz analysiert. Die durch die Sequenzanalyse im *gpt*-Gen gefundenen Mutationen sind in **Abb. 4.67** dargestellt. **Tabelle 4.14** zeigt Anzahl und Art der gefundenen Mutationen der mit NDPO₂ induzierten Mutanten.

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

Abb. 4.67 Mutationen in der *gpt*-Sequenz, induziert durch NDPO₂ in *E. coli* DT-2.

Tab. 4.14 Durch NDPO₂ induzierte Mutation in der *gpt*-Sequenz des pSV2-*gpt* Plasmids (18 Sequenzierungen). Die Basen des codierenden Stranges (nicht transkribiert) sind unterstrichen.

Mutationsart	Anzahl
<u>GC</u> → <u>CG</u>	6
G <u>C</u> →C <u>G</u>	2
<u>GC</u> → <u>TA</u>	4
G <u>C</u> →T <u>A</u>	5
<u>GC</u> → <u>AT</u>	0
Transposon	1

Tab. 4.14 zeigt, daß 9 der 18 Punktmutationen GC →TA Transversionen sind. Das Guanin befindet sich dabei in etwa 50% der Fälle auf dem codierenden und 50% auf dem nicht-codierenden Strang.

4.6 Untersuchung der durch Norfloxacin und Ofloxacin-induzierten DNA-Schäden

Als Beispiele für exogene Stoffe, die zur Bildung oxidativer DNA-Schäden führen, wurden die Arzneistoff Ofloxacin und Norfloxacin untersucht. Ziel der in diesem Kapitel beschriebenen Untersuchungen war es, Ausmaß und Art der Schädigung durch Ofloxacin und Norfloxacin nach Bestrahlung mit UV-A-Licht zu bestimmen. Unter zellfreien und zellulären Bedingungen bestimmte DNA-Schadensprofile, die charakteristisch für die jeweiligen ultimalen DNA-schädigenden Spezies sind („Fingerabdruck“), sollten dabei Auskunft über mechanistische Abläufe der Schädigung geben.

4.6.1 Untersuchungen an zellfreier DNA

4.6.1.1 Zellfreie Entstehung von DNA-Modifikationen durch Norfloxacin und Ofloxacin + UV-A

Zur Untersuchung der DNA-Schädigung an zellfreier DNA wurde ein Relaxationsassay mit PM2 DNA eingesetzt (siehe 3.2.1). Die Schädigung mit Ofloxacin + UV-A-Licht erfolgt nach Kap. 3.2.1.2.3.

Abbildung 4.68 zeigt die Entstehung von DNA-Schäden (direkte Einzelstrangbrüche, Fpg- und Endo IV-sensitive Modifikationen) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer. Die DNA-Schädigung steigt linear mit zunehmender Bestrahlungsdauer an. Wie aus der Graphik

ersichtlich entstehen Fpg-sensitive Modifikationen und Einzelstrangbrüche ungefähr im Verhältnis 1:1. Endo IV-sensitive Läsionen, das sind basenfreie Stellen (AP-Läsionen, siehe Tab. 2.3) entstehen in geringerem Ausmaß.

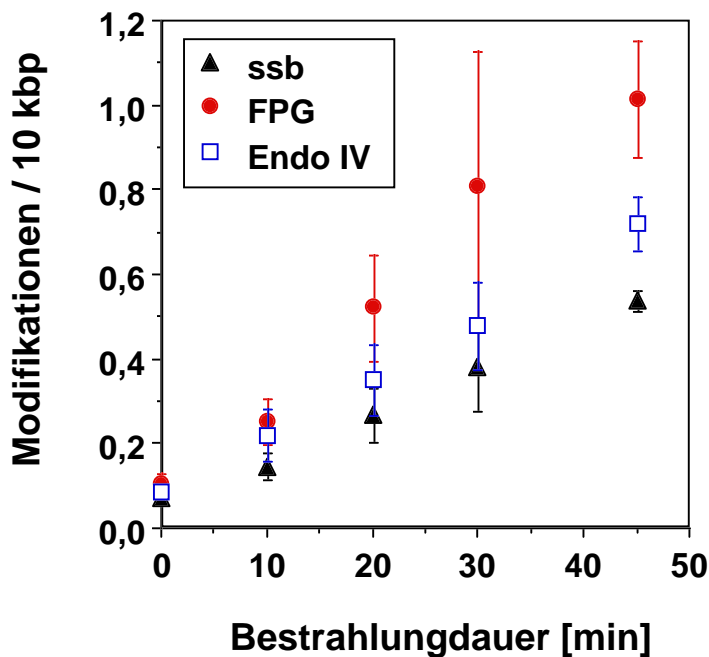


Abb. 4.68 Entstehung von Einzelstrangbrüchen (SSB), Fpg- und Endonuklease IV-sensitiven Läsionen (ESS + SBB) in zellfreier PM2 DNA durch Behandlung mit 100 μM Ofloxacin in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer mit UV-A-Licht (360 nm). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D.

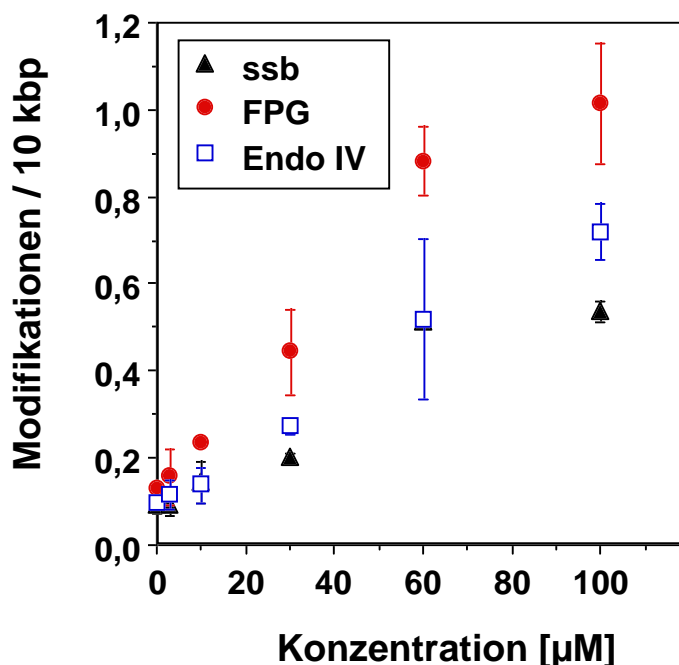


Abb. 4.69 Entstehung von Einzelstrangbrüchen (SSB), Fpg- und Endonuklease IV-sensitiven Läsionen (ESS + SSB) in zellfreier PM2 DNA durch Behandlung mit Ofloxacin in Abhängigkeit von der Konzentration (0-100 μM) und UV-A-Licht (45 min, 10 cm, 20°C, 40.5 kJ/m^2). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D.

Abbildung 4.69 zeigt die Abhängigkeit der Generierung von DNA-Schäden von der eingesetzten Konzentration von Ofloxacin. Der entstandene Schaden an zellfreier PM2 DNA korreliert linear mit der eingesetzten Konzentration des Gyrasehemmers. Fpg-sensitive Modifikationen und direkte Einzelstrangbrüche entstehen zu gleichen Anteilen, wohingegen AP-Läsionen (basenfreie Stellen), die von dem Enzym Endonuklease IV erkannt werden, in geringem Ausmaß entstehen.

Die Schädigung zellfreier PM2 DNA durch Norfloxacin + UV-A-Licht erfolgte nach Kap. 3.2.1.4.

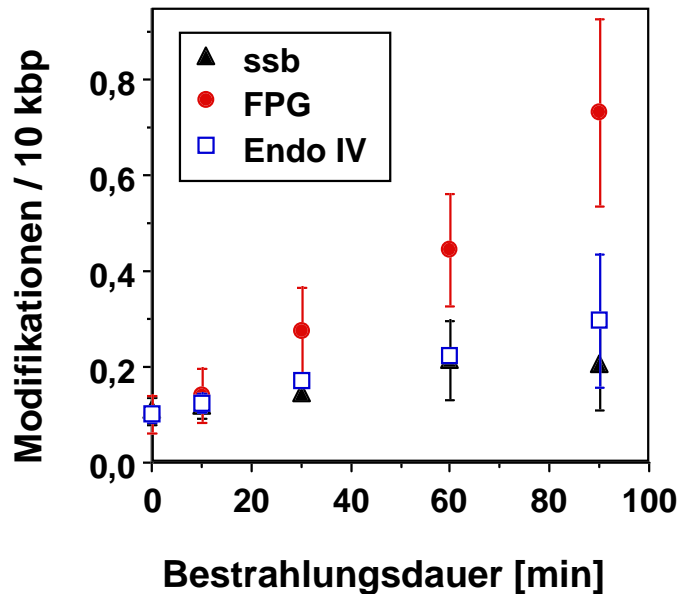


Abb. 4.70 Entstehung von Einzelstrangbrüchen (SSB), Fpg- und Endonuklease IV-sensitiven Läsionen (ESS + SSB) in zellfreier PM2 DNA durch Behandlung mit Norfloxacin (10 μ M) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer mit UV-A-Licht (360 nm). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D.

Abbildung 4.70 zeigt die lineare Zunahme von DNA-Schäden (direkten Einzelstrangbrüchen, Fpg- und Endo IV-sensitiven Modifikationen) in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer. Es entstanden hauptsächlich Fpg-sensitive Modifikationen; direkte Einzelstrangbrüche und Läsionen, die von dem Enzym Endonuklease IV erkannt werden, wurden durch die Schädigung kaum gebildet.

Die Entstehung von DNA-Schäden in Abhängigkeit der Konzentration bei einer Bestrahlungsdauer von 90 Minuten zeigt **Abbildung 4.71**. Die Zunahme der Modifikationen erfolgte linear mit steigender Konzentration des Antibiotikums. Fpg-sensitive Modifikationen entstehen im größten Anteil.

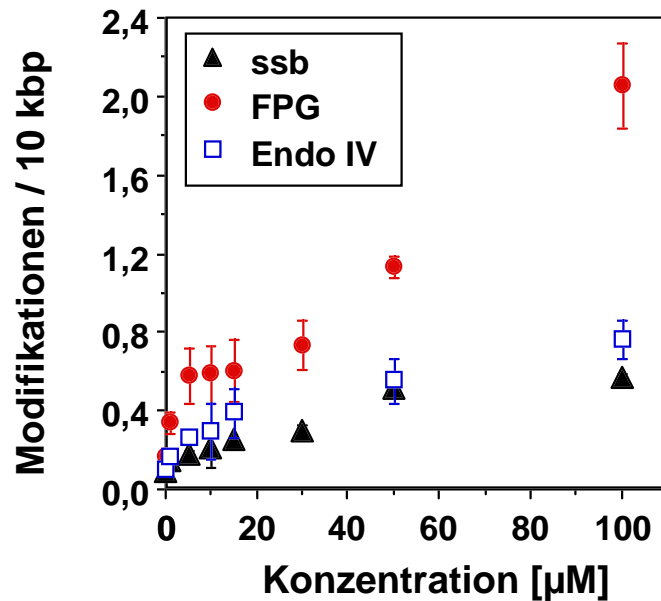


Abb. 4.71 Entstehung von Einzelstrangbrüchen (SSB), Fpg- und Endonuklease IV-sensitiven Läsionen (ESS + SSB) in zellfreier PM2 DNA durch Behandlung mit Ofloxacin in Abhängigkeit von der Konzentration (0-100 µM) und UV-A-Licht (40.5 kJ/m²). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± S.D.

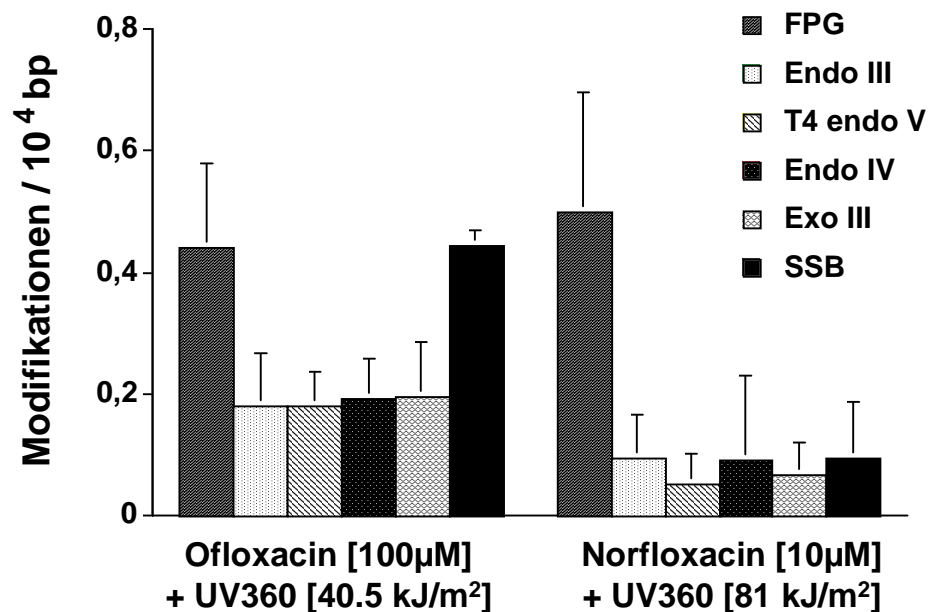


Abb. 4.72 DNA-Schadensprofile in isolierter PM2 DNA nach Schädigung mit Ofloxacin und Norfloxacin + UV-A-Licht. Die Säulen geben die Zahl verschiedener endonuklease-sensitiver Modifikationen und direkter Einzelstrangbrüche an. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte ± S.D.

Das Schadensprofil (**Abb. 4.66**) zeigt die von verschiedenen Reparaturenzymen (siehe 2.6.2) erkannten Basenmodifikationen, die durch Ofloxacin oder Norfloxacin entstehen. Durch Vergleich des DNA-Schadensprofils einer zu untersuchenden DNA-Schädigung (zellfrei oder zellulär) mit bekannten Schadensprofilen reaktiver Spezies, können Rückschlüsse auf die ultimale die DNA schädigende Spezies der untersuchten Schädigung geschlossen werden.

4.6.1.2 Einfluß von Quenchern auf die Schädigung zellfreier DNA

Um Hinweise auf die ultimale die DNA-schädigende Spezies und den Reaktionsmechanismus zu erhalten, wurde der Einfluß von Quenchern, Radikalfängern und anderen Zusätzen auf die Schädigung untersucht. Eingesetzt wurden Natriumazid, welches in besonderem Maße Singulett-Sauerstoff zu quenchen vermag, *tert*-Butanol, ein guter Radikalfänger für Hydroxylradikale und als enzymatische Antioxidantien Katalase und Superoxiddismutase (siehe 2.5.2). Ersetzt man das Wasser des Phosphatpuffers komplett mit D₂O und führt in diesem Puffer eine Schädigung durch, vergrößert sich der Schaden im Fall einer Beteiligung von Singulett-Sauerstoff als reagierende Spezies durch Verlängerung der Halbwertszeit des ¹O₂ in D₂O-Puffer um das 10fache.

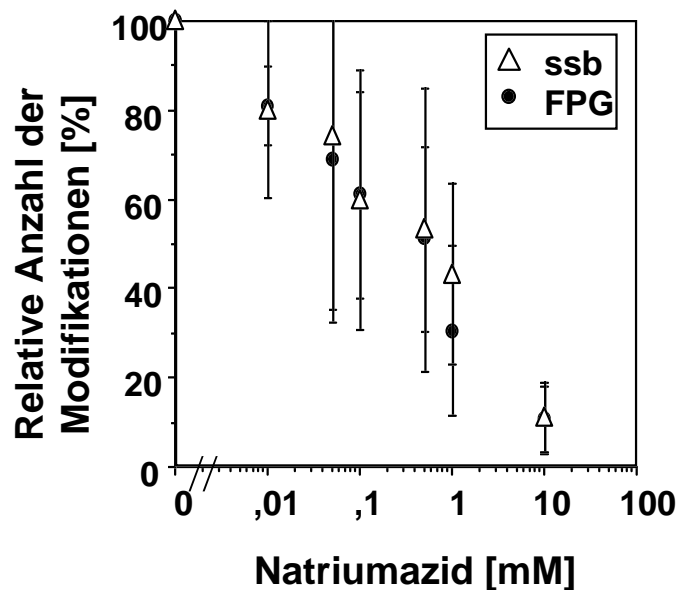


Abb. 4.73 Einfluß von Natriumazid auf die Entstehung von Einzelstrangbrüchen (SSB) und Fpg-sensitiven Läsionen an zellfreier PM2 DNA durch 100 µM Norfloxacin + UV-A-Licht (81 kJ/m²). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2-6 Bestimmungen ± S.D.

Abbildung 4.73 zeigt die starke Reduktion des entstehenden DNA-Schadens, gemessen als direkte Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Läsionen durch steigende Konzentrationen an Natriumazid als Zusatz bei der Schädigung. Der Zusatz von *tert*-Butanol vermag jedoch die Schädigung durch Norfloxacin + UV-A-Licht kaum zu verringern (**Abbildung 4.75**).

Im Gegensatz dazu ist der durch Ofloxacin induzierte DNA-Schaden, wie in **Abbildung 4.74** ersichtlich durch *tert*-Butanol nahezu komplett zu verhindern.

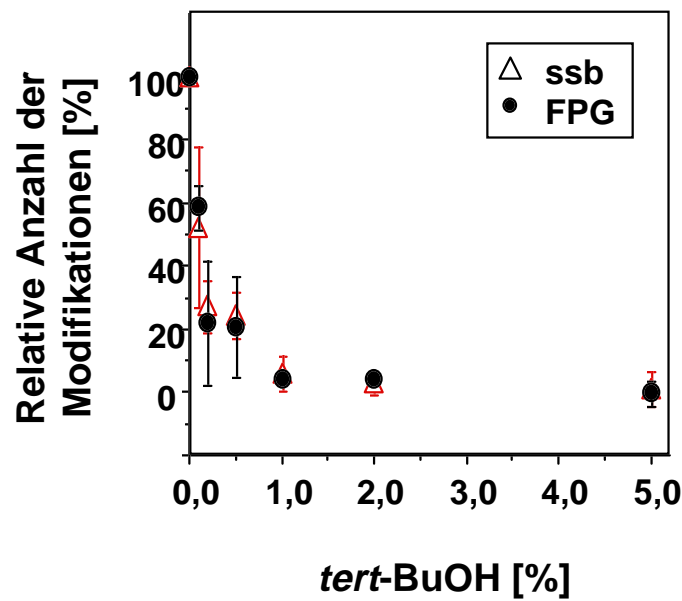


Abb. 4.74 Einfluß von *tert*-Butanol auf die Entstehung von Einzelstrangbrüchen (SSB) und Fpg-sensitiven Läsionen an zellfreier PM2 DNA durch 100 μ M Ofloxacin + UV-A-Licht (40.5 kJ/m²). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2-6 Bestimmungen \pm S.D.

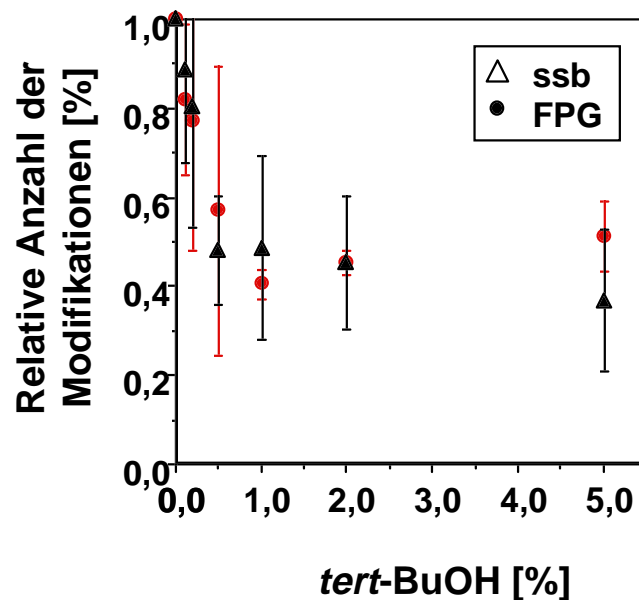


Abb. 4.75 Einfluß von *tert*-Butanol auf die Entstehung von Einzelstrangbrüchen (SSB) und Fpg-sensitiven Läsionen an zellfreier PM2 DNA durch 100 μ M Norfloxacin + UV-A-Licht (40.5 kJ/m²). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2-6 Bestimmungen \pm S.D.

Die Ergebnisse mit Natriumazid, *tert*-Butanol und anderen Zusätzen sind in den **Tabellen 4.15** (für Ofloxacin) und **4.16** (für Norfloxacin) angegeben. Einen stark hemmenden Einfluß auf die Schädigung (gemessen als direkte SSB und Fpg-sensitive Modifikationen) durch Ofloxacin + UV-A-Licht haben Katalase und *tert*-Butanol. Daher sind vermutlich HO•-Radikale, die aus H₂O₂ über eine Fenton-Reaktion mit Spuren von Metallionen entstehen (Kap.2.1.1).

Alle Zusätze beeinflussen die Bildung von SSB und Fpg-sensitiven Modifikationen in gleichen Ausmaß. Die Entstehung beider Läsionen scheint somit dem gleichen Wirkmechanismus zu unterliegen.

Tab. 4.15 Einfluß verschiedener Zusätze auf die DNA-Schädigung durch Ofloxacin (100 µM) und UV360 (40.5 kJ/m²). # Die Zahl der Modifikationen ohne Zusatz wird als 100% angenommen.

Zusatz	Relative Zahl an Modifikationen [%] #	
	Fpg-sens. Modifikationen	SSB
D ₂ O-Puffer	96 ± 11	117 ± 29.3
Katalase (315 U/ml)	27 ± 18*	28 ± 16*
SOD (20 µg/ml)	130 ± 36	158 ± 33
Natriumazid (0.1 mM)	62 ± 6	72 ± 12
Natriumazid (1 mM)	56 ± 4	56 ± 16
<i>tert</i> -Butanol (0.5 %)	16 ± 22*	15 ± 4*
<i>tert</i> -Butanol (2 %)	4 ± 6*	5 ± 3*

Im Falle der Schädigung mit Norfloxacin sind signifikante Effekte in D₂O-Puffer und mit Natriumazid als Zusatz feststellbar. Dies wiederum deutet auf Singulett-Sauerstoff als beteiligte reaktive Spezies hin.

Tab. 4.16 Einfluß verschiedener Zusätze auf die DNA-Schädigung durch Norfloxacin (100 µM) und UV360 (81 kJ/m²). # Die Zahl der Modifikationen ohne Zusatz wird als 100% angenommen.

Zusatz	Relative Zahl an Modifikationen [%] #	
	Fpg-sens. Modifikationen	SSB
D ₂ O-Puffer	266 ± 76*	353 ± 39*
Katalase (315 U/ml)	109 ± 12	108 ± 19
SOD (20 µg/ml)	106 ± 20	116 ± 33
Natriumazid (0.1 mM)	61 ± 23*	60 ± 29*
Natriumazid (1 mM)	11 ± 8*	11 ± 8*
<i>tert</i> -Butanol (0.5 %)	57 ± 32	48 ± 121
<i>tert</i> -Butanol (2 %)	45 ± 3	45 ± 15

Tabelle 4.17 zeigte die Stern-Volmer-Konstanten („Quench-Konstanten“) von *tert*-Butanol und Natriumazid für die Schädigung mit Ofloxacin bzw. Norfloxacin. Die Stern-Volmer-Konstanten wurden wie in in Kap.4.5.1.2 beschrieben ermittelt.

Tab. 4.17 Stern-Volmer-Konstanten verschiedener schädigender Agentien für *tert*-Butanol und Natriumazid.

	Quenchkonstante für	
	<i>tert</i> -Butanol [M^{-1}]	Natriumazid [mM^{-1}]
Ofloxacin plus UV360	32.0 ± 5.7	n.b.
Norfloxacin plus UV360	0.2 ± 0.1	1.5 ± 1.6

4.6.1.3 Nachweis von 8-oxodG in PM2 nach Schädigung mit Ofloxacin durch HPLC

Die Bestimmung des durch Ofloxacin und Bestrahlung mit UV360 induzierten Gehalts an 8-oxodG in zellfreier PM2 DNA erfolgte mittels HPLC (elektrochemische Detektion) nach Totalhydrolyse der DNA (siehe 3.2.7.2).

Die mit Hilfe des Relaxationsassays bestimmte Anzahl induzierter Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen wurde mit dem Ergebnis der 8-oxoG Bestimmung verglichen (**Tab. 4.18**). Der Quotient beider Messungen ergibt die Zahl der Fpg-sensitiven Modifikationen, bei denen es sich um 8-oxodG handelt. Der Quotient 8-oxodG/Fpg-sensitive Modifikationen gibt Hinweise auf die ultimal DNA-schädigende Spezies.

8-oxodG zeigte eine Retentionszeit von 8.4 Minuten, während dG nach 6 min und dT nach 7.2 min detektiert wird.

Tab. 4.18 Verhältnis von 8-oxodG (ermittelt durch HPLC/ECD) und Fpg-sensitiven Modifikationen (ermittelt durch PM2 Relaxationsassay) und Verhältnis von AP-Läsionen und Fpg-sensitiven Modifikationen (ermittelt im Relaxationsassay). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2 Bestimmungen \pm S.D.

8-oxodG / Fpg-sens. Modifikation	AP-Läsionen / Fpg-sens. Modifikation
$23 \pm 2 \%$	$26 \pm 0 \%$

Die Ergebnisse (**Tabelle 4.18**) zeigen, daß es sich bei 23% der Fpg-sensitiven Modifikationen nach Schädigung mit Ofloxacin + UV-Licht um 8-oxodG handelt. Wie aus dem zellfreien Schadensprofil von Ofloxacin ablesbar, entstehen AP-Läsionen in einer Menge, die etwa 25% des entstandenen Schadens, der durch Fpg-Protein erkannt wird, entspricht.

4.6.2 Charakterisierung von Modifikationen in zellulärer DNA durch Alkalische Elution

4.6.2.1 Entstehung von DNA-Modifikationen durch Norfloxacin und Ofloxacin + UV-A in Zellen

Nach Schädigung von AS52-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen Ofloxacin und 18 kJ/m^2 UV-A sind mit Hilfe der Alkalischen Elution DNA-Schäden feststellbar, die linear mit steigender Konzentration zunehmen (Abb. 4.76 und 4.77). Der bereits in AS52-Zellen vorhandene Schaden in Kontrollzellen (Steady-State-Spiegel) steigt dabei von 0.24 Fpg-sensitiven Modifikationen und 0.06 Einzelstrangbrüchen pro 10^6 bp auf 1.32 ± 0.14 Fpg-sensitive Modifikationen und 0.54 ± 0.05 SSB pro 10^6 bp in Gegenwart von $100 \mu\text{M}$ Ofloxacin (Abb. 4.76). Ofloxacin induziert also direkte SSB und Fpg-sensitive Modifikationen ungefähr im Verhältnis 1:1.

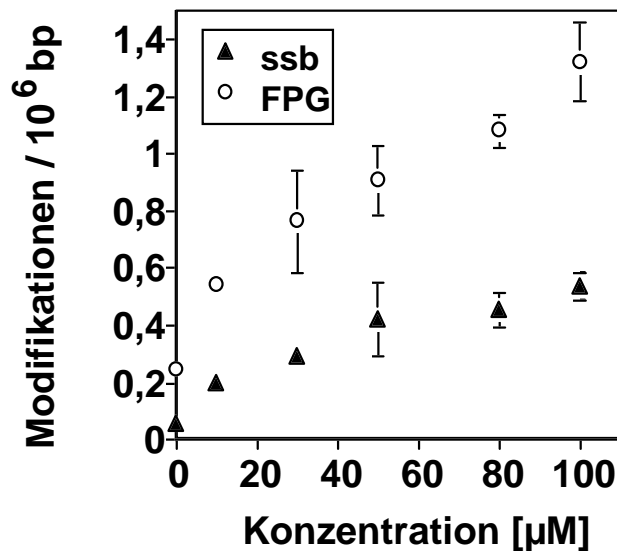


Abb. 4.76 Entstehung von Einzelstrangbrüchen (SSB) und Fpg-sensitiven Läsionen in AS52-Zellen durch Ofloxacin (0 - $100 \mu\text{M}$) + UV-A-Licht (18 kJ/m^2). Die Bestimmung erfolgte mittels Alkalischer Elution. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 3 Bestimmungen \pm S.D.

Auch Norfloxacin induziert in AS52-Zellen nach Bestrahlung mit UV-A direkte Strangbrüche und Fpg-sensitive Modifikationen (Abb. 4.77). Wie bei der Schädigung zellfreier DNA (siehe 4.6.1.1) ist der Anteil von Einzelstrangbrüchen allerdings nur gering.

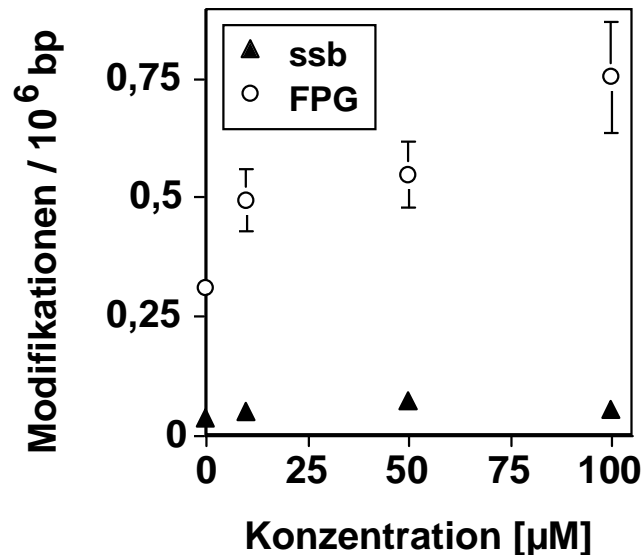


Abb. 4.77 Entstehung von Einzelstrangbrüchen (SSB) und Fpg-sensitiven Läsionen in AS52-Zellen durch Norfloxacin (0-100 μM) + UV-A-Licht (18 kJ/m^2). Die Bestimmung erfolgte mittels Alkalischer Elution. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von 3 Bestimmungen \pm S.D.

Abb. 4.78 zeigt die von verschiedenen DNA-Reparaturenzymen erkannten Läsionen als Schadensprofile. Für beide Gyrasehemmer ist das Verhältnis der Modifikationen sehr ähnlich wie das unter zellfreien Bedingungen gefundene (**Abb. 4.72**). Das absolute Ausmaß der Schäden ist in den Zellen unter gleichen Bestrahlungsbedingungen bei 0,4 Fpg-sensitiven Modifikationen pro 10^6 bp. Die Inkubation von AS52-Zellen mit Ofloxacin oder Norfloxacin ohne Bestrahlung zeigte, daß die Antibiotika alleine keine DNA-Schädigung verursachen (Daten nicht gezeigt).

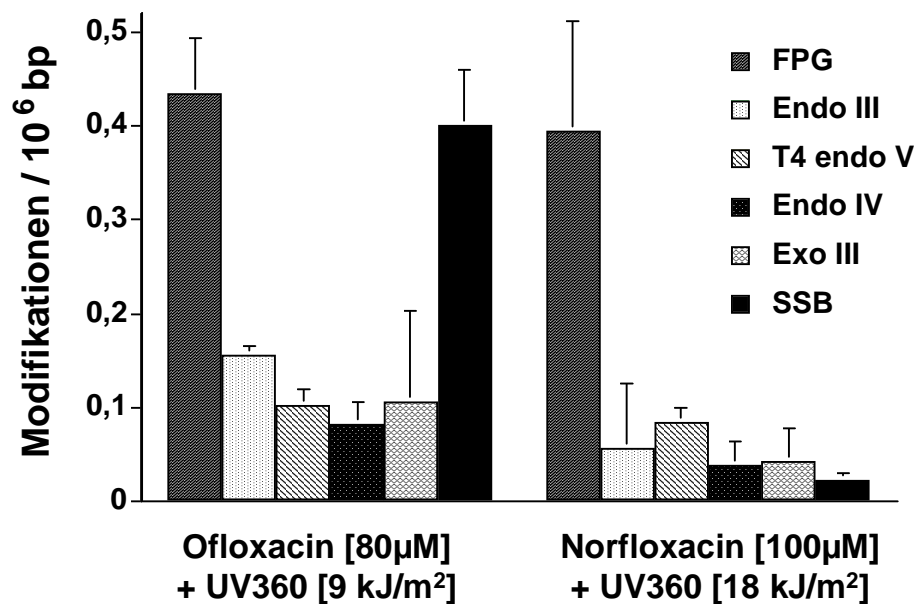


Abb. 4.78 DNA-Schadensprofile in AS52-Zellen nach Schädigung mit Ofloxacin und Norfloxacin und Bestrahlung mit UV-A-Licht. Die Säulen geben die Zahl verschiedener endonuklease-sensitiver Modifikationen und direkter Einzelstrangbrüche an. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm S.D.

5 Diskussion

5.1 Steady-State-Spiegel oxidativer DNA-Schäden

Als Ausdruck des Fließgleichgewichts zwischen Bildung und Reparatur ist in allen Zellen ein gewisses Ausmaß oxidativer DNA-Schäden (Steady-State-Spiegel) durch verschiedene Bestimmungsmethoden, wie HPLC/ECD, GC/MS, ³²P-Postlabeling, Einzelzellgelelektrophorese („Comet-Assay“, SCGE), Alkaline unwinding, Nick-Translation und Alkalische Elution nachweisbar (**Kasai et al., 1986; Nackerdien et al., 1992; Collins et al., 1993; Devanaboyina & Gupta, 1996; Pflaum et al., 1997; Kasai, 1997; Helbock et al., 1998**).

In dieser Arbeit wurden Steady-State-Spiegel oxidativer DNA-Schäden mit Hilfe der Alkalischen Elution bestimmt. In unbehandelten AS52-Zellen wurde ein zelluläres Schadensprofil ermittelt (**Abb. 4.3**). Es treten vorherrschend Basenmodifikationen, die von Fpg-Protein erkannt werden (z.B. 8-Hydroxyguanin, siehe **Tab. 2.3**), auf. Die Dominanz Fpg-sensitiver Modifikationen im Schadensprofil von Lymphozyten, AS52-Zellen und mitochondrialer DNA aus Ratten- und Schweineleber wurde beschrieben (**Pflaum et al., 1998**). Die Anzahl an DNA-Einzelstrangbrüchen und AP-Läsionen, erkannt durch Endonuklease IV, Exonuklease III und T4 Endonuklease V (siehe **Tab. 2.3**), ist weitaus geringer.

Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver Modifikationen verschiedener Zelllinien, die mittels Alkalischer Elution bestimmt wurden (**Tab. 4.1**), variierten zwischen 0.13 und 0.24 Fpg-sensitiven Modifikationen pro 10⁶ bp. Ein Zusammenhang mit Herkunft der Zellen und Ausmaß der Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver Modifikationen ist nicht feststellbar.

Es ist eine wichtige Frage, ob Fpg-Protein im Assay alle 8-oxoG Modifikationen in der DNA unter den gegebenen Bedingungen erkennt. Die Sättigung der Erkennung von Basenmodifikationen, die durch den Photosensibilisator Ro 19-8022 + Licht induziert wurden, durch Fpg-Protein wurde gezeigt (**Abb. 4.1**). Es ist anzunehmen, daß nicht nur induzierte 8-oxoG Läsionen, sondern auch Basenmodifikationen in unbehandelten Zellen vollständig durch Fpg-Protein erkannt werden. Man sollte jedoch erwähnen, daß die Bestimmung durch die Alkalische Elution eine randomisierte Verteilung der Läsionen voraussetzt und daß geclusterte Modifikationen Fehler verursachen können.

Die Anzahl Fpg-sensitiver Modifikationen, die in unbehandelten Zellen mit Hilfe der Alkalischen Elution bestimmt wurden, ist um Größenordnungen kleiner als die Anzahl von 8-oxoG Resten, die mit HPLC/ECD und GC/MS bestimmt wurden (**Pflaum et al., 1997; Collins et al., 1997**). Für die Quantifizierung von 8-oxoG durch HPLC/ECD und GC/MS wurde jedoch gezeigt, daß während Zellyse, DNA-Hydrolyse und - im Falle der GC/MS - während Derivatisierung eine artifizielle Oxidation stattfindet, die zur Überschätzung des 8-oxoG Gehalts führt (**Ravanat et al., 1995; Finnegan et al., 1996; Kvam & Tyrrell, 1997; Pflaum et al., 1997**). Unter sauerstofffreien Bedingungen oder durch Zusatz von

Antioxidantien wurden auch mit diesen Methoden Steady-State-Spiegel gemessen, die ähnlich niedrig wie die Spiegel Fpg-sensitiver Modifikationen, deren Bestimmung mit der Alkalischen Elution, Einzelzellgelelektrophorese („Comet-Assay“, SCGE), Alkaline unwinding oder Nick-Translation erfolgte (**Kasten et al., 1995; Dally & Hartwig, 1997; Collins et al., 1997; Pflaum et al., 1998**). Die artifizielle Entstehung von 8-oxoG durch Fenton-Reaktion bei der Alkalischen Elution kann, wie Untersuchungen mit Desferrioxamin, DMSO und Glutathion als Zusätze bei der Bestimmung zeigen, ausgeschlossen werden (**Pflaum et al., 1998**). Die Entstehung von DNA-Schäden durch Hydroxylradikale kann durch die geringe Zahl direkter Einzelstrangbrüche (SSB) im Schadensprofil von AS52-Zellen (**Abb. 4.3**) ausgeschlossen werden, da Hydroxylradikale Fpg-sensitive Modifikationen und Einzelstrangbrüche im Verhältnis 1:1 induzieren (**Epe, 1995**). Die Unterschiede zwischen verschiedenen Zelltypen sprechen auch gegen die Messung von Artefakten.

5.2 Bildung oxidativer DNA-Schäden

5.2.1 DNA-Schäden und Mutationen durch Alkoxy-Radikale

Hydroxylradikale (HO•) und Alkoxy-Radikale (RO•) können endogen oder exogen gebildet werden (**Dix et al., 1993; Fujita & Fujimoto, 1992**) und zur Schädigung zellulärer DNA beitragen (**Inouye, 1984; Veda et al., 1985; Yang et al., 1996; Davies et al. 1995**). Eine Beteiligung von Alkoxy-Radikalen bei der Krebsentstehung und bei Alterungsprozessen wird angenommen (**Jurkiewicz et al., 1996**). Im Gegensatz zu DNA-Schäden und Mutationen durch Hydroxylradikale war jedoch, vor Beginn dieser Arbeit, über die DNA-Schäden und Mutationen durch Alkoxy-Radikale, die unter anderem durch Lipidperoxidation entstehen können, wenig bekannt. Die Generierung von *tert*-Butoxyradikalen durch Bestrahlung des wasserlöslichen Peroxyesters [4-[(*tert*-butyldioxy)carbonyl]benzyl]-triethylammoniumchlorid (BCBT) (**Adam et al., 1998**) erlaubte nun, diese Schädigung genauer zu untersuchen.

BCBT induzierte in PM2 DNA (siehe **Abb. 4.51**) und DNA des Plasmids pSV2 *gpt* (siehe **Abb. 4.60**) Fpg-sensitive Modifikationen und direkte Einzelstrangbrüche mit zunehmender Bestrahlungsdosis mit UV-Licht. Einzelstrangbrüche wurden nur in geringem Ausmaß gebildet. Die strukturanaloge Verbindung MCBT, die keine Alkoxy-Radikale freisetzt, verursachte keinen DNA Schaden, so daß die Beteiligung des Arenchromophors bei der Schädigung von DNA ausgeschlossen werden kann. Die Peroxyester-Teilstruktur ist demnach essentiell für die Bildung des DNA-Schadens nach Photolyse von BCBT.

Die Anzahl an Einzelstrangbrüchen und verschiedenen Endonuklease-sensitiven Modifikationen, die durch photoangeregtes BCBT induziert wurden, sind in **Abb. 4.52** in einem DNA-Schadensprofil zusammengefaßt worden. Zum Vergleich sind in **Abb. 5.1** bekannte Schadensprofile von Singulett-Sauerstoff (generiert durch thermische Zersetzung von NDPO₂, **DiMascio et al., 1989**), Triplett-Carbonyl-Verbindungen (wie z.B. Aceton, **Epe et al., 1993a**), Hydroxylradikalen (generiert durch Photolyse von *N*-hydroxy-2-pyridinthion (2-HPT),

Epe et al., 1996) und photoangeregtem Riboflavin (Epe et al., 1993c), welches mit DNA über einen Typ-I-Mechanismus reagiert (Ito et al., 1993), dargestellt. Das Schadensprofil von BCBT ist durch eine hohe Anzahl Fpg-sensitiver Modifikationen charakterisiert. Oxidative Pyrimidin-Modifikationen (sensitiv gegenüber Endonuklease III), AP-Läsionen (sensitiv gegenüber Endonuklease IV oder Exonuklease III) und Einzelstrangbrüche wurden nur in sehr niedriger Zahl gebildet. In Übereinstimmung damit, wurde das Ausmaß der Entstehung direkter Einzelstrangbrüche in der Literatur mit 2% angegeben (Udovicic et al., 1996). Die Bildung von DNA-Einzelstrangbrüchen in superhelikaler pBR 322 DNA wurde beschrieben (Adam et al., 1998). Das Schadensprofil von BCBT ist demnach den Schadensprofilen von Singulett-Sauerstoff und photoangeregtem Riboflavin sehr ähnlich, unterscheidet sich aber von dem von Hydroxylradikalen (Abb 5.1).

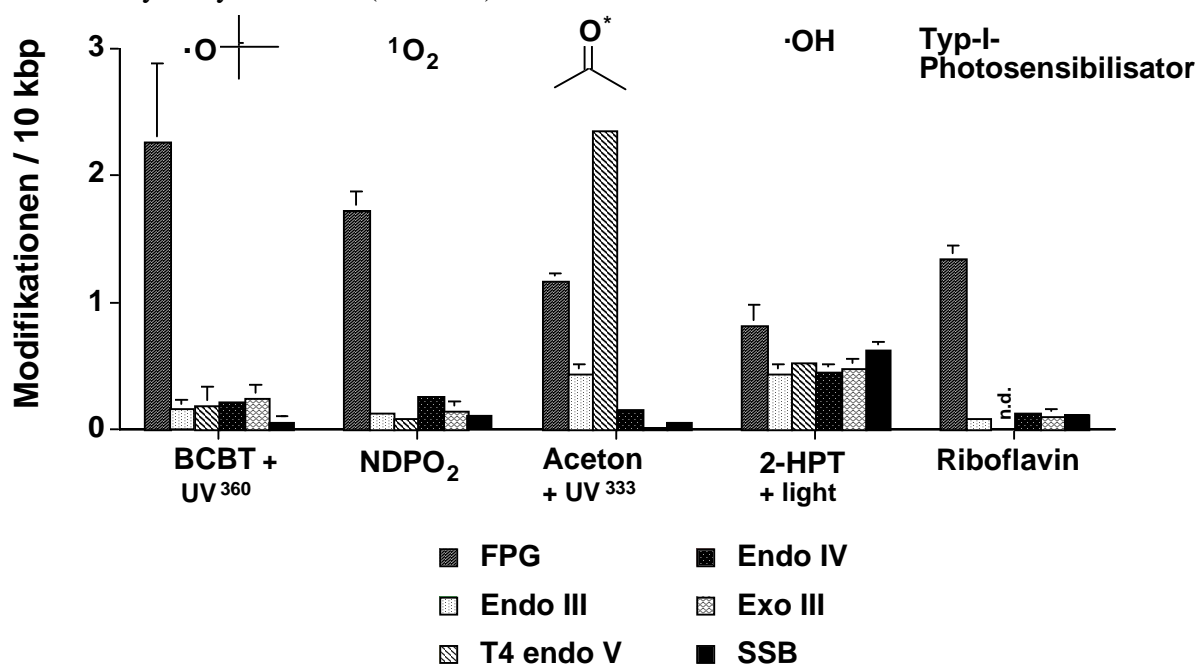


Abb. 5.1 DNA-Schadensprofile verschiedener schädigender Agentien. Daten für 2-HPT aus Epe et al., 1996, für Aceton aus Epe et al., 1993a, für Riboflavin aus Epe et al., 1993c, für NDPO₂ aus Epe et al., 1993d

Das Ausmaß des DNA-Schadens durch BCBT änderte sich nicht, wenn H₂O im Puffer durch D₂O ersetzt wird, während der Schaden durch Singulett-Sauerstoff verzehnfacht wurde (siehe Tab. 5.1). Singulett-Sauerstoff ist also nicht bei der Bildung von DNA-Schäden durch BCBT involviert. Eine Beteiligung von H₂O₂ oder Superoxid kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da der Zusatz von Katalase und Superoxiddismutase ebenfalls keinen Einfluß auf das Schadensausmaß durch BCBT hatte. Die Gegenwart von *tert*-Butanol inhibierte effizient die Entstehung von DNA-Schäden durch BCBT + UV-360 (Abb. 4.54). Die schädigende Spezies ist also in der Lage, ein Wasserstoff-Atom von der Methyl-Gruppe von *tert*-Butanol zu abstrahieren. Fpg-sensitive Modifikationen und Einzelstrangbrüche wurden gleichermaßen reduziert, was darauf hinweist, daß beide Arten von Läsionen durch die gleiche reaktive Spezies, vermutlich *tert*-Butoxyl-Radikale, gebildet werden.

Tab. 5.1 Einfluß verschiedener Zusätze auf die DNA-Schädigung durch BCBT (1 mM) und UV360 (6.75 kJ/m²). # Die Zahl der Modifikationen ohne Zusatz wird als 100% angenommen. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 6-12 Bestimmungen ± S.D.. Daten für 2-HPT aus **Epe et al., 1996**, für Riboflavin aus **Epe et al., 1993c**, für NDPO₂ aus **Epe et al., 1993d**

Schädigendes Agens	Ultimale Spezies	Relativer Anteil des Schadens (%) in Anwesenheit von			
		D ₂ O Puffer	SOD (20µg/ml)	Katalase (315 U/ml)	Azid (1 mM)
BCBT + UV360	RO.	86 ± 13	97 ± 32	105 ± 27	36 ± 13
Riboflavin + Licht^d	Rib*	91 ± 7	50 ± 12	86 ± 7	8 ± 3
2-HPT + Licht^d	OH.	96 ± 18	85 ± 21	115 ± 23	57 ± 4
NDPO₂	¹ O ₂	960 ± 190	105 ± 12	99 ± 2	41 ± 2

Stern-Volmer-Konstanten (Quench-Konstanten) für *tert*-Butanol zeigen (**Tab. 5.2**), daß der DNA-Schaden durch BCBT + UV-360 signifikant weniger effektiv inhibiert wird, als DNA-Schäden durch 2-HPT + Licht. Der Schaden durch Singulett-sauerstoff und Riboflavin (**Abb. 4.56**) wurde durch *tert*-Butanol nicht beeinflusst. Azidanionen inhibierten den DNA-Schaden durch BCBT + UV-360 (**Abb. 4.54**) in gleichem Ausmaß wie DNA-Schäden durch Singulett-sauerstoff, jedoch weniger effizient als DNA-Schäden durch Riboflavin und Aceton (**Abb. 4.55; Tab. 4.11; siehe Tab. 5.2**).

Tab. 5.2 Stern-Volmer-Konstanten verschiedener schädigender Agentien für *tert*-Butanol und Natriumazid.

	Quenchkonstante für	
	<i>tert</i> -Butanol [M ⁻¹]	Natriumazid [mM ⁻¹]
BCBT (1mM) plus UV360	15.1 ± 6.0	2.2 ± 0.5
2-HPT plus Licht^a	40.8 ± 9.7	n.b.
NDPO₂ (20 mM, 2h, 37°C)	< 0.0 ^d	1.4 ± 0.1 ^b
Riboflavin + Licht	0.2 ± 0.3	5.0 ± 0.7
Aceton (2.7 M) plus UV333^c	0.8	38.4 ± 0.9

^a Daten für 2-HPT aus **Epe et al., 1996**.

^b Daten für NDPO₂ aus **Epe et al., 1993d**.

^c Daten für Aceton aus **Epe et al., 1993a**.

^d 2% BuOH: 110±10 % Schaden

Die Ergebnisse zeigen, daß *tert*-Butoxyl-Radikale direkt für den DNA-Schaden durch BCBT + UV-360 verantwortlich sind. Die Beteiligung anderer reaktiver Spezies, wie Hydroxylradikale, Singulett-sauerstoff oder Typ-I-Photoreaktion, kann ausgeschlossen werden. Andere, bei der Photolyse von BCBT primär und sekundär entstehende Radikale, wie Benzoylalkoxyl-Radikale und Methylperoxyl-Radikale, können aufgrund ihrer geringen Reaktivität als DNA-schädigende Spezies ausgeschlossen werden (**Adam et al., 1998**).

Um die Art der durch BCBT-induzierten Fpg-sensitiven Modifikationen zu untersuchen, wurde geschädigte DNA mit Hilfe der HPLC/ECD untersucht. Der Vergleich des Gehalts an 8-oxodG und Fpg-sensitiven Modifikationen zeigte, daß es sich bei 83±18% der

Fpg-sensitiven Modifikationen (das entspricht 92% der Fpg-sensitiven Basenmodifikationen) um 8-oxoG handelt (**Tab. 4.12**). Andere Substrate des Fpg-Proteins, also z.B. Formamidopyrimidine (siehe **Tab. 2.3**), wurden nur in geringem Ausmaß gebildet. Der Anteil von 8-oxoG und Fpg-sensitiven Modifikationen, die durch Singulett-Sauerstoff, Riboflavin und Hydroxylradikale induziert wurden ist weitaus geringer (**Pflaum et al., 1998**) und beträgt für Singulett-Sauerstoff ca. 30%, für Riboflavin ca. 20% und für Hydroxylradikale ca. 20% (**Pflaum et al., 1998**). Zum Vergleich wurden die Daten in **Tab. 5.3** zusammengefaßt. Der Anteil 8-oxoG / Fpg-sensitive Modifikationen ist somit für die ultimale mit der DNA reagierenden Spezies charakteristisch.

Tab. 5.3 Anteil der Fpg-sensitiven Modifikationen induziert in PM2 DNA, die mittels HPLC/ECD als 8-oxoG und durch Endonuklease IV und Exonuklease III als basenfreie Stellen erkannt werden konnten. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2-6 Bestimmungen \pm S.D.

Schädigendes Agens	Ultimale Spezies	% der Fpg-sensitiven Modifikationen ^a erkannt als		
		8-oxoG ^{b,c}	AP-Läsionen, erkannt durch	
			Endonuklease IV	Exonuklease III
BCBT + UV360	RO.	83 \pm 18 (3)	10 \pm 2	11 \pm 4
Riboflavin + Licht^d	Rib*	21 \pm 13 (6)	10 \pm 3	8 \pm 4
2-HPT + Licht^d	OH.	19 \pm 2 (2)	56 \pm 6	58 \pm 10
NDPO₂	¹ O ₂	30 \pm 2 (2)	16 \pm 2	9 \pm 4

^a Bestimmt im PM2 DNA Relaxationsassay.

^b Bestimmt durch HPLC/ECD.

^c Anzahl der Versuche in Klammern.

^d Daten aus **Pflaum et al., (1998)**.

Die Ergebnisse zeigen, daß *tert*-Butoxyl-Radikale spezifisch 8-oxoG Läsionen in DNA induzieren. Die durch BCBT und hohe Dosen UV-Licht induzierte Bildung Guanidin-freisetzender Produkte (**Adam et al., 1998**) ist vermutlich durch eine sekundäre Reaktion des 8-oxoG mit der reaktiven Spezies bedingt (**Adam et al., 1996**). Die Selektivität der Bildung von 8-oxoG ist weitaus größer als die aller bisher untersuchten reaktiven Spezies (**Tab. 5.2**). Die effiziente Oxidation von DNA durch BCBT ist möglicherweise durch die sterische Nähe der Bildung von *tert*-Butoxy-Radikalen über elektrostatische Bindung des kationischen Peresters an DNA (**Adam et al., 1998**) zu erklären. Die Bildung von 8-oxoG erfolgt vermutlich durch Abstraktion eines Wasserstoff-Atoms von der Guanin-Base. Die Addition von Alkoxy-Radikalen ist wahrscheinlich weniger favorisiert als die Addition der Hydroxylradikale (**Pryor, 1988**), was auch das Fehlen von Nebenreaktionen erklärt.

Um die Konsequenzen des DNA-Schadens, der durch Alkoxy-Radikale entsteht, zu untersuchen, wurde mit BCBT + UV-360 geschädigtes Plasmid pSV2gpt in *E.coli* DT-2 transformiert. Auch in Plasmid-DNA wurden hauptsächlich Fpg-sensitive Modifikationen und wenig Einzelstrangbrüche induziert (**Abb. 4.60**). Die Transformationsrate ist in **Abb. 4.61** dargestellt und zeigt, daß die Induktion von ungefähr 6 Fpg-sensitiven Modifikationen pro Plasmid ohne signifikante Abnahme der Überlebens der mit diesen Plasmiden transfizierten

Bakterien toleriert wird. Die Anzahl der Mutanten stieg linear mit der Dosis und den Fpg-sensitiven Modifikation (**Abb. 4.62**). Die Induktion von einer Fpg-sensitiven Modifikation pro Plasmid war mit der Induktion von 2.6 Mutanten pro 10^4 Transfektanten verbunden. 20 von 21 untersuchten Mutanten (95%) wiesen GC→TA Transversionen auf. In 80% der Fälle war mutiertes Guanin auf dem codierenden (nicht transkribierten) Strang zu finden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit dem Befund, daß durch BCBT + UV-360 vorwiegend 8-oxoG induziert wurde, welches eine prämutagene Läsion ist und nach Fehlpaarung mit Adenin zur Entstehung von GC→TA Transversionen führt (**Shibutani et al., 1991**). Das Auftreten einer bevorzugten Reparatur transkribierter Gene („preferential repair“) in Bakterien - die bisher noch nicht gezeigt werden konnte - könnte erklären, warum sich BCBT-induzierte Mutationen vorwiegend auf dem nicht transkribierten Strang manifestieren.

Die Untersuchung der durch Singulett-Sauerstoff (generiert durch thermischen Zerfall von NDPO_2) bedingten Mutationen zeigte, daß die Mutationsfrequenz mit steigendem Ausmaß der Schädigung (Fpg-sensitiven Modifikationen) linear anstieg. Wie auch bei BCBT, war die Induktion von einer Fpg-sensitiven Modifikation pro Plasmid mit der Induktion von ca. 2 Mutanten pro 10^4 Transfektanten verbunden. 50% der Mutanten wiesen GC→TA Transversionen auf, was durch die Induktion von 8-oxoG (30% der Fpg-sensitiven Modifikationen) erklärbar ist.

Die Schädigung zellulärer DNA mit BCBT + UV-360 zeigte, daß Fpg-sensitiven Modifikationen und Einzelstrangbrüche ungefähr im Verhältnis 1:1 induziert wurden (**Abb. 4.58**). Das zelluläre Schadensprofil weist auf Hydroxylradikale als schädigende Spezies hin (**Abb. 4.59**), die vermutlich intrazellulär durch Fenton-Reaktion entstehen. Da es sich bei BCBT um eine quartäre Ammoniumverbindung handelt, ist die Aufnahme der Substanz in Zellen ausgeschlossen. Die Schädigung verläuft daher vermutlich über extrazellulär gebildete sekundäre Folgeprodukte der BCBT-Zersetzung, bei denen es sich womöglich um Peroxide handelt.

Die hier gefundenen Daten zeigen das genotoxische Potential von Alkoxy-Radikalen auf. Die Relevanz von Alkoxy-Radikalen als ultimal mit der DNA reagierenden Spezies in physiologischen Prozessen bedarf weiterer Untersuchungen. Die selektive Generierung von 8-oxoG in DNA durch BCBT + UV-360 könnte ferner die Untersuchungen der Prozessierung dieser Läsionen erleichtern.

5.2.2 DNA-Schäden durch Gyrasehemmer

Eine exogene Quelle von reaktiven Sauerstoffspezies stellen Arzneistoffe wie Ofloxacin und Norfloxacin dar. Neuere Untersuchungen haben den Verdacht auf photokanzerogene Wirkungen der Fluorochinolone-carbonsäure-Antibiotika erhärtet: *in vivo* konnte das Auftreten von Tumoren der Haut sowohl mit phototoxischen Dosen (**Johnson et al. 1997**) als auch mit subphototoxischen Dosen UV-A-Licht gezeigt werden (**Mäkinen et al., 1997; Klecak et al., 1997; Food and Drug Administration, 1993**).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß sowohl Ofloxacin als auch Norfloxacin bei Bestrahlung mit UV-A in der Lage sind, an zellfreier DNA Schäden zu verursachen (siehe **Abb. 4.68** bis **Abb. 4.71**). Direkte Einzelstrangbrüche (SSB), Endonuklease IV-sensitive und Fpg-sensitive Modifikationen entstanden durch zellfreie Schädigung von DNA mit Ofloxacin ungefähr im Verhältnis 2:1:2, während durch Norfloxacin vorwiegend Fpg-sensitive Modifikationen und wenig direkte SSB und Endo IV-sensitive Modifikationen gebildet wurden (vgl. **Abb. 4.72**). Das Ausmaß der Schäden nahm jeweils linear mit zunehmender Bestrahlungsdauer mit UV-360 und mit zunehmender Konzentration der Substanzen zu. Unbestrahlte Proben wiesen keine DNA-Schäden auf. Der Vergleich der Schadensprofile von Ofloxacin und Norfloxacin mit denen bekannter Sauerstoffradikal-Quellen wird in **Abb. 5.2** gezeigt. Bei der Schädigung mit Ofloxacin handelt es sich vermutlich um Hydroxylradikale, während die Schädigung mit Norfloxacin über Singulett-Sauerstoff verläuft (**Abb. 4.72**, vgl. **Abb. 5.2**)

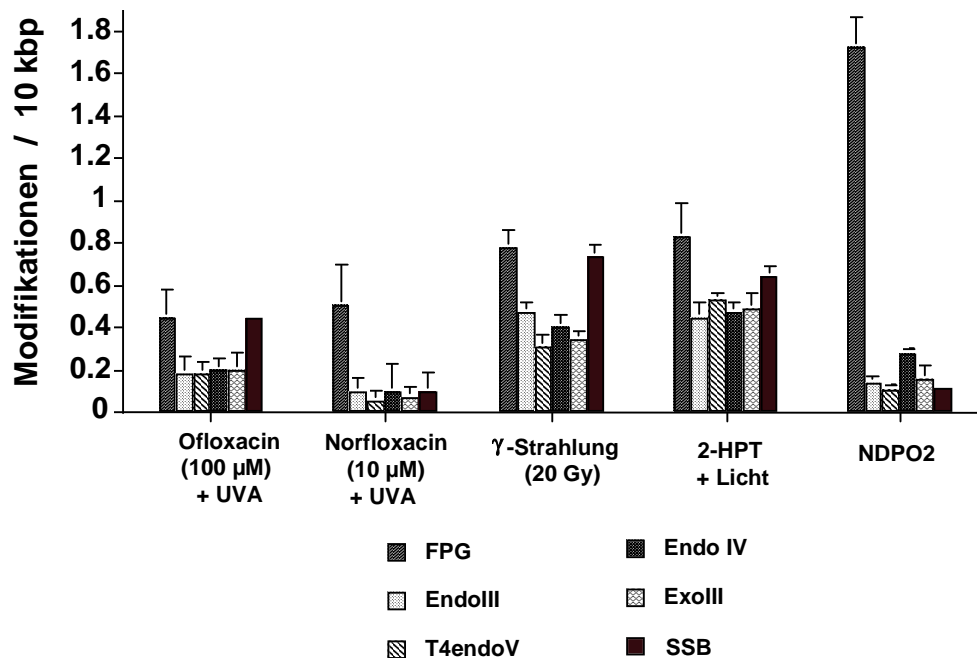


Abb. 5.2 Zellfreie DNA-Schadensprofile von Ofloxacin (100 µM) + UV-A (40.5 kJ/m²) und Norfloxacin (100 µM bzw. 10 µM) + UV-A (81 kJ/m²). Die Daten für 2-HPT sind aus **Epe et al., 1996**, die Daten für NDPO₂ aus **Epe et al., 1993d**, die Daten für Riboflavin aus **Epe et al., 1993c**.

Bei der Schädigung durch Ofloxacin + UV-360 erniedrigte der Zusatz von Katalase und erhöht der Zusatz von Superoxiddismutase das Schadensausmaß (**Tab. 4.15**). Die Gegenwart von *tert*-Butanol inhibierte effizient die Entstehung von DNA-Schäden durch Ofloxacin + UV-360 (**Abb. 4.74**, **Tab. 4.17**). Der Schaden durch Ofloxacin wurde durch *tert*-Butanol ähnlich effektiv inhibiert wie DNA-Schäden durch Hydroxylradikale (2-HPT + Licht). Fpg-sensitive Modifikationen und SSB waren gleichermaßen betroffen, was darauf hinweist, daß beide Arten von Läsionen durch die gleiche reaktive Spezies gebildet werden. Der Vergleich des Gehalts an 8-oxodG und Fpg-sensitiven Modifikationen zeigte, daß es sich bei 23% der Fpg-sensitiven Modifikationen, die durch Ofloxacin generiert wurden, um 8-oxoG handelt

(**Tab. 4.18**). Der Anteil von 8-oxoG pro Fpg-sensitive Modifikation, die durch 2-HPT + Licht (Hydroxylradikale) induziert wurden, ist von ähnlicher Größenordnung (**Pflaum et al., 1998**), weist also auf Hydroxylradikale als ultimal mit der DNA reagierende Spezies bei der Schädigung mit Ofloxacin + UV-A hin. Vermutlich entstehen bei der Schädigung mit Ofloxacin + UV-A die Hydroxylradikale durch Umwandlung von Superoxid in Wasserstoffperoxid und nachfolgende *Fenton*-Reaktion durch Spuren von Metallionen (z.B. Eisen). Das zelluläre Schadensprofil von Ofloxacin + UV-A (**Abb. 4.78**) entspricht dem Schadenprofil, daß mit zellfreier DNA bestimmt wurde (**Abb. 4.72**). Der Mechanismus und das Ausmaß der Schädigung zellulärer DNA entspricht den Ergebnissen mit zellfreier DNA.

Im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit, wurde die Entstehung von Hydroxylradikalen durch Ofloxacin durch *Fenton*-Reaktion auch von anderen Autoren beschrieben (**Wagai & Tawara, 1992a**). Der Einfluß von Katalase, Superoxiddismutase und anderer Antioxidantien auf die Phototoxizität wurde gezeigt (**Chételat et al., 1996**). In Übereinstimmung mit den Befunden dieser Arbeit, zeigten mehrere Autoren die Entstehung reaktiver Spezies, wie Superoxid, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikalen nach Bestrahlung von Chinolonen (u.a. Ofloxacin) mit UV-A-Licht (**Fujita & Matsuo, 1994; Wagai & Tawara, 1992**). **Umezawa et al. (1997)** demonstrierten, daß Ofloxacin - und andere untersuchte Chinoloncarbonsäuren - Superoxid (aber auch Singulett-Sauerstoff) produziert und die Entstehung von Einzelstrangbrüchen bedingt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Beteiligung von Singulett-Sauerstoff bei der Schädigung von DNA durch Ofloxacin + UV-A ausgeschlossen ist. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, daß Ofloxacin zur Schädigung zellulärer DNA führt, konnte *in vitro* in Lymphozyten keine Bildung SCE („Schwester-Chromatid-Austauschraten“) gezeigt werden, *in vivo* erhöhte Ofloxacin jedoch die Bildung von SCE (**Kulich et al., 1988**). Obwohl in dieser Arbeit die Entstehung oxidativer DNA-Modifikationen wie 8-oxoG gezeigt wurden, sind Studien auf zelluläre Mutagenität von Ofloxacin negativ bzw. das mutagene Potential sehr gering (**Stahlmann, 1990; Mayer, 1987**). Die Mutagenität im *Salmonella typhimurium*-Test gilt jedoch als erwiesen (**Clerch et al., 1992; Gocke, 1991; Chételat et al., 1996; Albertini et al., 1995; Anderson & Berger, 1994; Ferguson & Baguley, 1994; Fort, 1992**).

Das Ausmaß des DNA-Schadens durch Norfloxacin wurde verdreifacht, wenn H₂O im Puffer durch D₂O ersetzt wird. Vermutlich ist also Singulett-Sauerstoff bei der Bildung von DNA-Schäden durch Norfloxacin involviert. Die Beteiligung von H₂O₂ oder Superoxid bei der Schädigung durch Norfloxacin kann ausgeschlossen werden, da der Zusatz von Katalase und Superoxiddismutase ebenfalls keinen Einfluß auf das Schadensausmaß durch Norfloxacin hatte (**Tab. 4.16**). Azidanionen inhibierten den DNA-Schaden durch Norfloxacin + UV-360 (**Abb. 4.75; Tab. 4.17**) in gleichem Ausmaß wie DNA-Schäden durch Singulett-Sauerstoff. Die Schädigung zellulärer DNA entspricht der Schädigung zellfreier DNA, wie an der Übereinstimmung der Schadensprofile zu erkennen ist (**Abb. 4.72 und 4.78**).

Nach Bestrahlung verschiedener Chinoloncarbonsäuren wurde die Generierung von Singulett-Sauerstoff festgestellt (**Umezawa et al., 1997**). Die Bildung von Singulett-Sauerstoff durch Norfloxacin ist abhängig vom pH-Wert und besitzt ein Maximum bei pH 8-9 (**Bilski et al., 1996**). Besonders bei dem physiologischen pH-Wert 7.4 scheint so die Entstehung von Singulett-Sauerstoff durch Norfloxacin + UV-Strahlung wahrscheinlich. Im Einklang damit, daß in dieser Arbeit Norfloxacin in AS52-Zellen DNA-Schäden verursachte, konnten auch im Comet Assay nach Bestrahlung von V79-Zellen mit 37 kJ/m² UV-A (**Reavy et al., 1997; Chételat et al., 1996**) DNA-Schäden nachgewiesen werden. Untersuchungen zur Genotoxizität *in vivo* zeigten, daß Norfloxacin nach oraler Gabe hoher Dosen in fötaler Rattenleber und -Niere DNA-Schäden in Leber und Niere verursachte (**Pino et al., 1991**).

Das Auftreten phototoxischer Reaktionen nach Bestrahlung mit UV-A (30 J/cm²) wurde von **Horio et al. (1994)** *in vivo* gezeigt, wobei Ofloxacin eine stärkere phototoxische Potenz zu besitzen scheint als Norfloxacin. Das phototoxische Potential der Antibiotika scheint mit der Menge der produzierten Sauerstoffradikale zu korrelieren (**Wagai & Tawara, 1992a**). Auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß das absolute Ausmaß zellulärer DNA-Schäden in AS52-Zellen durch Schädigung mit Ofloxacin um ein Vielfaches höher ist als das Ausmaß an DNA-Schäden nach Schädigung mit Norfloxacin.

Ofloxacin generiert durch Bestrahlung mit UV-A Superoxid, welches unter dem Einfluß von Metallionen in der Fenton-Reaktionen zu Hydroxylradikalen reagiert, die die DNA schädigen können. Norfloxacin trägt durch Generierung von Singulett-Sauerstoff zur Schädigung von DNA bei. Beide Gyrasehemmer besitzen also einen unterschiedlichen Schädigungsmechanismus. Da photokanzerogene Effekte von Gyrasehemmern in Mausmodellen gezeigt werden konnten, muß man sich die Frage stellen, ob die Arzneimittel-Sicherheit dieser Arzneistoffe für den Menschen noch gewährleistet ist. Eine kanzerogene Wirkung dieser Arzneistoffe beim Menschen konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden. Die Exposition gegenüber UV während der ungefähr zweiwöchigen Therapie mit Fluorochinoloncarbonsäure-Antibiotika ist jedenfalls möglichst zu vermeiden. Aufgrund unterschiedlicher Hauttypen und unterschiedlicher DNA-Reparaturkapazitäten (**Wei et al., 1995**) der Patienten ist ein Risiko individuell variabel.

5.3 Einfluß bestimmter Antioxidantien auf oxidative DNA-Schäden

5.3.1 Einfluß von intrazellulärem Glutathion

Glutathion ist einer der wesentlichen physiologischen Radikalfänger (**Meister & Anderson, 1983; Meister, 1991**). Dessen Bedeutung für die Entstehung bzw. den vermittelten Schutz vor oxidativen DNA-Schäden ist jedoch relativ wenig bekannt. Neben der Wirkung von GSH als Antioxidans, ist auch dessen prooxidative Wirkung beschrieben (**Fiescher-Nielsen et al., 1992; Lafleur & Retel, 1993**).

Durch Behandlung mit DL-Buthionin-SR-sulfoximin (BSO), einem Inhibitor der γ -Glutamylcystein-Synthetase (**Griffith & Meister, 1979**) kam es konzentrationsabhängig bei 37°C und 41°C zur Abnahme bzw. völligen Depletion des intrazellulär vorhandenen Glutathions (GSH) (**Abb. 4.5**). Die Behandlung mit BSO bei 37°C war für die Zellen kaum toxisch, während durch Inkubation mit BSO bei 41°C oder durch Inkubation bei 41°C ohne weitere Zusätze nur 40-50% der Zellen überlebten (**Tab. 4.2**). Von **Kang & Enger** wurde **1992** berichtet, daß BSO konzentrationsabhängig einen Einfluß auf den GSH-Spiegel hatte. Während von den Autoren angegeben wird, daß sich oberhalb von 0.1 mM BSO keine Unterschiede bezüglich GSH-Spiegel zeigten, konnte hier mit 24-stündiger Präinkubation mit 0.3 mM BSO noch ein meßbarer GSH-Spiegel erhalten werden. Die Toxizität bzw. Inhibierung des Zellwachstums nach Behandlung mit BSO ist bekannt. Dieses Ergebnis ist durch einen verzögerten Eintritt in den Zellzyklus und permanenten Arrest in der S und G2-Phase des Zellzyklus, für dessen Fortschreiten die GSH-de novo-Synthese essentiell zu sein scheint (**Poot et al., 1995**), zu erklären. Die durch BSO auftretende Zytostase scheint jedoch nicht mit der GSH-Depletion zu korrelieren, so daß die Hemmung der Aufnahme von Aminosäuren dafür verantwortlich gemacht wird (**Kang & Enger, 1992**).

Zellen, deren Glutathion depletiert wurde, zeigten bei 37°C einen um 50% erhöhten Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver Modifikationen (**Abb. 4.4**). Es besteht also ein Zusammenhang zwischen Glutathion-Gehalt und Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver Modifikationen. Eine Korrelation von GSH-Spiegel und 8-oxoG konnte bei humanen Lymphocyten gefunden werden (**Lenton et al., 1999**). Es wurde festgestellt, daß mit zunehmendem Lebensalter der GSH-Level durch ansteigendem oxidativen Streß sinkt, während die Zahl oxidativer Läsionen an mitochondrialer DNA zunehmen (**de la Asuncion et al., 1996**). Eine Korrelation zwischen dem Gehalt an intrazellulärem Gesamt-Glutathion und mit Hilfe der Alkalischen Elution ermittelter Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen in unbehandelten Zellen wurde von **Will et al. (1999)** beschrieben. Es besteht eine inverse Korrelation zwischen GSH-Gehalt und Fpg-sensitiven Modifikationen (siehe **Abb. 5.3**), die jedoch keine direkte lineare Abhängigkeit zeigt. Nach der Korrelation von **Will et al. (1999)** sollten Fpg-sensitive Modifikationen bei kompletter Depletion des Glutathions jedoch weitaus höher liegen, als die in dieser Arbeit ermittelten Werte von 0,3 pro 10^6 bp. Vermutlich können andere antioxidative Systeme die Erhöhung des Steady-State-Spiegels oxidativer Modifikationen verhindern. Andererseits findet die Depletion von GSH nach Beobachtungen von **Edgren & Revesz (1987)** im Kern und im Zytoplasma unterschiedlich stark statt. Die Abnahme von GSH findet im Nukleus in weitaus geringerem Ausmaß statt. Dies könnte den geringen Einfluß der vollständigen Depletion der Zelle an Glutathion auf den Steady-State-Spiegel oxidativer Modifikationen erklären.

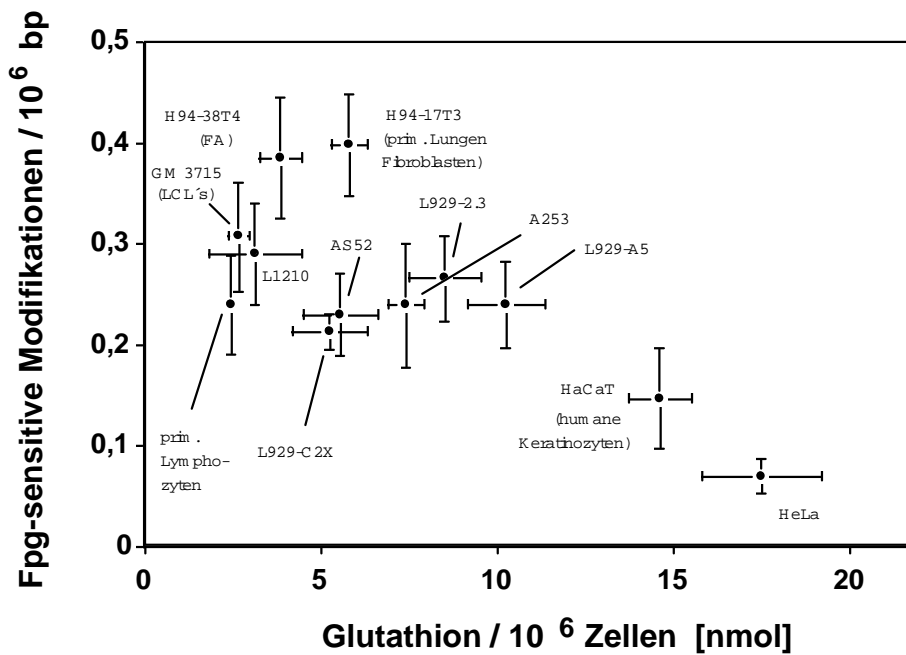


Abb. 5.3 Korrelation zwischen dem Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen in verschiedenen Zelltypen und entsprechender GSH-Spiegel. Nach Will et al. (1999).

Auch die Inkubation bei einer Temperatur von 41°C erhöhte den Steady-State-Spiegel, obwohl der GSH-Spiegel um das 1,6fache erhöht wurde. Die Inkubation bei erhöhter Temperatur bedingt eine verstärkte oxidative Belastung, vermutlich durch mitochondriale Entkopplung (Skibba et al., 1991), der die Zellen durch Erhöhung des GSH-Spiegels gegenzuwirken versuchen. Ein Hinweis darauf ist auch, daß bei Depletion mit GSH die Inkubation bei 41°C den Steady-State-Spiegel weitaus stärker erhöhte. Dies ist durch den Wegfall des Schutzes vor oxidativen DNA-Schäden durch Glutathion (durch BSO) bei gleichzeitiger oxidativer Belastung (durch Inkubation bei erhöhter Temperatur) zu erklären.

Der Einfluß der Depletion von GSH auf die Induktion von DNA-Schäden wurde anhand verschiedener DNA-Schädigungen untersucht. Bei der Schädigung mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022 + Licht entstanden überwiegend Fpg-sensitiver Modifikationen (Abb. 4.6). Das Schadensausmaß der durch Ro 19-8022 induzierten Modifikationen war durch Depletion von GSH nicht beeinflussbar (Abb. 4.6). Die Entstehung Fpg-sensitiver Modifikationen durch Ro 19-8022 + Licht, die von Will et al. (1999a) zu $65 \pm 9\%$ als 8-oxoG identifiziert wurden, ist durch Generierung von Singulett-Sauerstoff (Will et al., 1999a) zu erklären. Bedingt dadurch, daß die Depletion von GSH durch BSO im Nukleus weniger effizient verläuft (Edgren & Revesz, 1987) konnte in dieser Arbeit auch kein Effekt einer Depletion von GSH auf durch Ro 19-8022 + Licht induzierte Läsionen festgestellt werden.

Die Schädigung mit sichtbarem Licht alleine bedingt auch die Entstehung Fpg-sensitiver Modifikationen, die durch Depletion von GSH um ca. 50% erhöht werden konnten. Die Bildung Fpg-sensitiver Modifikationen durch sichtbares Licht alleine wurde von Pflaum et al. (1994) gezeigt. Das absolute Ausmaß induzierter Fpg-sensitiver Modifikationen entspricht den von Pflaum et al., (1998) beschriebenen Werten. Mechanistisch verläuft die Schädigung

mit sichtbarem Licht vermutlich über endogene Photosensibilisatoren wie Riboflavin (**Pflaum, 1996**). Ein Einfluß von BSO auf die Entstehung von Einzelstrangbrüchen konnte nicht festgestellt werden, jedoch entstanden direkte Einzelstrangbrüche nur in geringer Zahl.

Das Ausmaß bei der Bestrahlung mit Breitband-UV-B-Strahlung induzierten Pyrimidindimere (T4-Endonuklease V-sensitive Modifikationen) wurde durch Präinkubation mit BSO nicht beeinflusst (siehe **Abb. 4.8**). Die Bildung der Cyclobutanpyrimidindimere durch Ringschluß benachbarter Pyrimidinbasen erfolgt durch direkte Reaktion der DNA mit den Lichtquanten. Die Beeinflussung des Ausmaß an T4 Endo V-sensitiven Modifikationen durch BSO wurde demnach auch nicht erwartet. Die Bestrahlung mit einer höheren Dosis UV-B-Strahlung bedingte die Bildung direkter Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitiver Modifikationen (**Abb. 4.9**). Die Bildung Fpg-sensitiver Modifikationen und Einzelstrangbrüche durch hohe Dosen UV-Licht wurde beschrieben (**Kielbassa et al., 1997**) und erfolgt vermutlich durch direkte Anregung der DNA (**Kielbassa et al., 1997**). 8-oxoG wurde in UV-B bestrahlten Säugerzellen identifiziert (**Zhang et al., 1997; Beehler et al., 1992**). Formamidopyrimidine wurden in UV-B-bestrahlter, zellfreier DNA detektiert (**Doetsch et al., 1995**). Beide Arten der Modifikationen sind Substrate des Fpg-Proteins (siehe **Tab. 2.3**). Durch Vorbehandlung mit BSO wurden verstärkt Fpg-sensitive Modifikationen gebildet (**Abb. 4.9**). In Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit gibt es in der Literatur auch Hinweise darauf, daß die Depletion intrazellulären Glutathions menschliche Hautfibroblasten oder epidermale Keratinozyten gegenüber der Schädigung mit UV-B oder UV-A sensitiviert (**Tyrrell & Pidoux, 1986**).

Andere Autoren konnten auch einen Einfluß von Glutathion auf induzierte oxidative DNA-Modifikationen feststellen. Durch GSH-Depletion kam es zu Chromosomendeletionen und Mikrokernen nach Induktion von DNA-Schäden mit ionisierenden Strahlen durch gestörte Reparatur (**Bertsche & Schorn, 1986**). Es wurde beschrieben daß der GSH-Spiegel zwar im Laufe des Wachstums von Zellen variiert, GSH-Spiegel aber nicht mit der Sensitivität gegenüber oxidativer Schädigung (mit Wasserstoffperoxid) korrelierten (**Duthie & Collins, 1997**). Man kann aber annehmen, daß die Unterschiede im Gehalt an reduziertem Glutathion im Verlauf des zellulären Wachstums für einen Effekt auf induzierte Läsionen nicht ausreichen. Nur stärker ausgeprägte Veränderungen des Glutathion-Spiegels besitzen möglicherweise signifikante Auswirkungen auf induzierte DNA-Schäden.

Die Ergebnisse zeigen, daß Glutathion eine wichtige Rolle bei dem Schutz von Zellen vor oxidativen DNA-Schäden spielt. Bei der Entstehung der DNA-Schäden können endogen und auch exogen generierte reaktive Sauerstoffspezies beteiligt sein.

5.3.2 Einfluß von Selen

Selenmangel wird mit einer erhöhten Tumorzinzidenz in Verbindung gebracht (**Blot, 1993; Yu, 1991; Fleet, 1997; Ip et al., 1992, Ip & Lisk, 1994; Ip & Lisk, 1994a; Ip & Lisk, 1995**). Die Beeinflussung oxidativer DNA-Schäden durch verschiedene Selenverbindungen wie Natriumselenit und Ebselen war bisher unzureichend erforscht.

Dem Zellkultur-Medium zugesetztes Natriumselenit zeigte ab einer Konzentrationen von 50 μM prooxidative Eigenschaften (**Abb. 4.10**); der Steady-State-Spiegel direkter Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitiver Modifikationen wurde erhöht. Selen besitzt durch Katalyse der Oxidation von Thiolen und Generierung von Superoxid prooxidative Eigenschaften (**Spallholz, 1994; Xu et al., 1991**). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen in dieser Arbeit, berichten **Lu et al. (1994; 1995; 1996)** von einer Zunahme an DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen nach Inkubation mit Natriumselenit. **Wilson et al. (1992)** konnten auch die Erhöhung des Spiegels an Einzelstrangbrüchen mit Hilfe der Alkalischen Elution messen. Die durch Natriumselenit induzierten Einzelstrangbrüche sollen direkt entstehen (**Snyder, 1987**). Nach **Biswas et al. (1997)** verursachten Natriumselenit und Natriumselenat *in vivo* Chromosomenbrüche und Spindelstörungen. Natriumselenit soll in Gegenwart von Glutathion zu Chromosomenaberrationen in kultivierten menschlichen Zellen führen (**Whiting et al., 1980**). Die Bildung Fpg-sensitiver Modifikationen durch Natriumselenit wurde auch von **Stewart et al. (1999)** gezeigt, die durch Behandlung mit Natriumselenit 8-oxodG mittels HPLC bestimmen konnten.

Ab einer Konzentration von 50 μM erhöhte Natriumselenit den Glutathion-Gehalt (GSH) (**Abb. 4.11**), während die Teilungsfähigkeit der Zellen abnahm (**Tab 4.3**). Übereinstimmend zeigten auch **Sugiyama et al. (1987)** die Erhöhung des zellulären Glutathiongehalts durch Natriumselenit in V79-Zellen. Die Erhöhung des Glutathionspiegel ist eine Begleiterscheinung der erhöhten Toxizität (**Hu & Spallholz, 1984**) und stellt einen Schutzmechanismus der Zelle gegen Selen-bedingten prooxidativen Streß dar (**Pence, 1991**). Die Toxizität von Natriumselenit wurde beschrieben (**Lu et al., 1994; 1995; Wilson et al., 1992; Nano et al., 1989**). Vermutlich handelt es sich dabei um apoptotische Vorgänge, die durch die Induktion von p53 durch Selenodiglutathion (einem Metabolit des Selenits) (**Lanfear et al., 1994; Cho et al., 1999**) erfolgt. Die Toxizität steht in Zusammenhang mit der prooxidativen Wirkung von Selenit (**Spallholz, 1994**). Weitere Studien zeigen die Wirkung von Selen auf eine Wachstumshemmung und Zellzyklusarrest in Abhängigkeit intrazellulärer GSH-Spiegel (**Ip, 1985**).

Natriumselenit zeigte keinen Einfluß auf das Ausmaß der durch Ro 19-8022 + Licht gebildeten Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitiven Modifikationen (**Abb. 4.14** und **Abb. 4.15**). Ro 19-8022 induzierte Mikrokerne - wie von **Will et al., (1999a)** beschrieben, deren Ausmaß durch Vorbehandlung mit Ebselen und Natriumselenit reduziert werden konnte.

Die durch sichtbares Licht gebildeten Einzelstrangbrüche konnten durch Vorbehandlung mit Natriumselenit gesenkt werden, während Fpg-sensitive Modifikationen nicht reduziert

wurden (**Abb. 4.16**). Die Teilungsfähigkeit der mit sichtbarem Licht geschädigten Zellen konnte auch verbessert werden (**Tab. 4.5**).

Die durch Breitband-UV-B entstehenden Einzelstrangbrüche wurden durch Natriumselenit gesenkt (**Abb. 4.18**), während Fpg-sensitiven Modifikationen nicht inhibiert wurden. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen einer anderen Autorengruppe, die mit Hilfe der HPLC/ECD zeigten, daß die Vorinkubation mit 5 oder 12.5 µM Selenit durch UV-B-Strahlung induziertes 8-oxodG reduzieren konnte (**Stewart et al., 1996**). Ein Einfluß von Natriumselenit auf die Toxizität von UV-B konnte nicht festgestellt werden (**Tab. 4.5**). Das Überleben von in Kultur befindlichen Zellen nach Bestrahlung mit UV-B (**Leccia et al., 1993**) soll durch Zusatz von Selen zum Kulturmedium jedoch signifikant positiv beeinflusst werden.

Durch Kaliumbromat werden, wie auch in dieser Arbeit gezeigt, vorwiegend Fpg-sensitive Modifikationen gebildet (**Ballmaier & Epe, 1995; Ballmaier, 1997**). Das Ausmaß der oxidativen Schäden durch Kaliumbromat wurde durch Natriumselenit (**Abb. 4.20**) nicht beeinflusst. Ein Einfluß auf die in äußerst geringem Maß gebildeten Einzelstrangbrüche war in dieser Arbeit nicht meßbar, jedoch läßt das geringe Ausmaß der gebildeten SSB keine genaueren Aussagen zu. Kaliumbromat induzierte *in vivo* und *in vitro* Chromosomenaberrationen und Mikrokerne (**Kurokawa et al., 1990; Nakijima et al., 1989; Hayashi et al., 1982; 1988; Ishidate & Yoshikawa, 1980**). Auch in dieser Arbeit konnten durch Behandlung mit Kaliumbromat Mikrokerne induziert werden. Das Ausmaß der gebildeten Mikrokerne konnte durch Supplementation mit Natriumselenit reduziert werden.

Auch Wasserstoffperoxid bedingte die Bildung von Mikrokernen. Das Ausmaß der durch Wasserstoffperoxid gebildeten Mikrokerne konnte durch Vorbehandlung mit Natriumselenit reduziert werden. Es wurde gezeigt, daß Natriumselenit und Ebselen die durch Wasserstoffperoxid gebildeten Einzelstrangbrüche inhibierten (**Yang et al., 1999; Leist et al., 1996; Sandstrom & Marklund, 1990**) und das Überleben nach Schädigung mit Wasserstoffperoxid erhöhten (**Bélanger et al., 1991; Richard et al., 1990; Yang et al., 1999**). Vermutlich ist der Schutz von H₂O₂-induziertem DNA-Schaden und Toxizität durch die erhöhte Aktivität der Glutathionperoxidase durch Vorbehandlung mit Selenit bedingt (**Sandstrom et al., 1989a**). Tatsächlich ist die Aktivität der Glutathionperoxidase in AS52-Zellen um das mindestens 10fache erhöht (**Homburg, 1999**).

Ebselen zeigte (bis zu 200 µM) keinen Einfluß auf den Steady-State-Spiegel von Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Modifikationen (**Abb. 4.12**). Es ist bekannt, daß Ebselen nicht die Induktion von DNA-Schäden bedingt (**Yang et al., 1999**). Studien an zellfreier DNA konnten zeigen, daß radikalische Prozesse, die bei der Lipidperoxidation stattfinden durch Ebselen nicht beeinflussbar sind (**Batna et al., 1997**). Der Gehalt an intrazellulär vorhandenem GSH wurde durch Ebselen auch nicht beeinflusst (**Abb. 4.13**). Ebselen zeigte keine Toxizität in AS52-Zellen (**Tab. 4.4**). In der Literatur wird ein konzentrationsabhängiger Einfluß des Ebselens auf die Teilungsfähigkeit von Zellen beschrieben: niedrige Konzentrationen stimulierten das Zellwachstum, wohingegen Konzentrationen über 50 µM das Zellwachstum inhibierten (**Yang et al., 1999**). Die geringe Toxizität von Ebselen läßt sich dadurch erklären, daß nur Selenverbindungen, die in der Lage sind Selenid-Anionen zu bilden, toxisch wirken

(Spallholz, 1994). Diese Voraussetzung erfüllt Natriumselenit, nicht jedoch Ebselen. In Tierversuchen wirkt Ebselen durch geringe Bioverfügbarkeit nicht toxisch (Wendel et al., 1984).

Ebselen beeinflusste weder das Ausmaß induzierter DNA-Schäden, noch die Toxizität von Ro 19-8022 + Licht. Ebselen senkt jedoch die durch sichtbares Licht entstandenen Einzelstrangbrüche, ohne einen Einfluß auf Fpg-sensitive Modifikationen zu haben (Abb. 4.17). Ebselen verbesserte auch das Überleben der Zellen nach Behandlung mit sichtbarem Licht (Tab. 4.6). Das Überleben der Zellen nach Schädigung mit Kaliumbromat wurde durch Ebselen ebenfalls verbessert (Tab. 4.7). Die Lebens- und Teilungsfähigkeit von AS52-Zellen nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid ist durch Ebselen auch positiv beeinflussbar (Tab. 4.7).

Der Einfluß der Supplementation von Natriumselenit und Ebselen auf die Inhibierung induzierter Mikrokerne in AS52-Zellen wird in Tab. 5.4 zusammengefaßt. *In vitro* Studien am Menschen bestätigen die Wirksamkeit der Supplementation mit Selen auf Mikrokerne. Nach Supplementation über einem Zeitraum von einem Jahr wurde die Frequenz der Mikrokerne signifikant gesenkt (Prasad et al., 1995). Als Ursache der Bildung von Mikrokernen werden Einzelstrangbrüche diskutiert (Speit et al., 1984; Pflaum, 1996; Schmuck et al., 1988). Fpg-sensitive DNA-Modifikationen alleine sind nicht die Hauptursache der Mikrokernbildung (Pflaum, 1996). Die Reduktion der Zahl an Einzelstrangbrüchen, die direkt durch verschiedene Agentien induziert werden oder durch Endonukleasen während DNA-Reparatur entstehen können, bietet daher einen guten Erklärungsansatz für den Befund, daß Natriumselenit und Ebselen sowohl einen Einfluß auf die Anzahl induzierter Einzelstrangbrüche, als auch Mikrokerne haben.

Tab. 5.4 Einfluß von Natriumselenit und Ebselen auf die Induzierbarkeit von Mikrokernen. Die Anzahl der ohne Präinkubation mit Ebselen oder Natriumselenit bestimmten Mikrokerne abzüglich den Kontrollwerten wurde als 100% definiert.

Schädigendes Agens	Einfluß von			
	Ebselen		Natriumselenit	
	20 µM	200 µM	0.1 µM	1 µM
Ro 19-8022 + Licht	31 ± 5 %	21 ± 14 %	1 ± 10 %	-1 ± 5 %
KBrO ₃	33 ± 14 %	51 ± 5 %	39 ± 8 %	20 ± 15 %
H ₂ O ₂	63 ± 6 %	29 ± 10 %	39 ± 18 %	27 ± 7 %

Die Ergebnisse zeigen, daß auch Selen eine wichtige Rolle bei dem Schutz von Zellen vor oxidativen DNA-Schäden und Mikrokernen spielt. Ein Einfluß auf die Bildung oxidativer DNA-Schäden hängt von der Art der Selen-Verbindung und deren Konzentration ab. Selenit kann auch prooxidativ wirken und zur Entstehung von DNA-Schäden führen. Das Zusammenwirken von Glutathion und Selen als antioxidative Schutzmechanismen ist wahrscheinlich.

5.4 Einfluß bestimmter Gene auf oxidative DNA-Schäden und DNA-Reparatur

Zu den Genen, die die Reparatur oxidativer DNA-Schäden beeinflussen können, zählt das Tumorsuppressorgen p53. p53 wird durch DNA-Einzelstrangbrüche (**Jayaraman & Prives, 1995**), oxidativen Streß (**Renzing et al., 1996; Kinscherf et al., 1998**), und ultraviolette Strahlung (**Liu & Pelling, 1995**) induziert. p53 ist an der Regulation der Apoptose und des Zellzyklus beteiligt (**Lane, 1992**). Es liegen kontroverse Angaben über die Beteiligung bei der Nukleotidexzisionsreparatur vor (s.u.). Über die Beteiligung des Gens p53 bei der Basenexzisionsreparatur war bisher nichts bekannt.

5.4.1 Einfluß des p53 Tumorsuppressorgens auf oxidative DNA-Schäden und Basenexzisionsreparatur?

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß p53 keinen Einfluß auf die Reparatur UV-induzierter Modifikationen (Nukleotidexzisionsreparatur) und die Reparatur Fpg-sensitiver Modifikationen (Basenexzisionsreparatur) hat. Das Ergebnis ist unerwartet, denn p53 Protein bindet an zahlreiche Proteine, von denen einige eine Rolle bei der DNA-Reparatur und Transkription spielen, z.B. MSH2, einem Protein der DNA-Mismatch-Reparatur (**Scherer et al., 1996**), ERCC/XPB, XPD und CSA, Proteine der Nukleotidexzisionsreparatur (**Wang et al., 1995a, 1994; Xiao et al., 1994**). Diese Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der präferentiellen Reparatur transkribierter Gene (**Hanawalt, 1994**). Es wird von reduzierter globaler Reparatur UV-induzierter Pyrimidindimere in p53-defizienten *Li-Fraumeni* Syndrom-Zellen berichtet (**Wang et al., 1995a; McKay et al., 1997**). Radioimmunologische Untersuchungen *in vivo* und *in vitro* an transgener muriner Haut mit mutiertem p53 zeigen, daß die Mutation des p53-Gens zu einer reduzierten Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden führt, die Apoptose jedoch nicht beeinträchtigt ist (**Li et al., 1996**). Die globale DNA-Reparatur UV-induzierter Cyclobutanpyrimidindimere ist in p53-mutierten Zellen reduziert (**Smith et al., 1995**), während die transkriptionsgekoppelte Reparatur nicht betroffen ist (**Ford & Hanawalt, 1995**). Die Expression des p48 *Xeroderma pigmentosum* Gens ist p53-abhängig und an der globalen genomischen Reparatur der Pyrimidindimere beteiligt (**Hwang et al., 1999**). Allerdings verwendeten **Li et al. (1996)** bei ihren Untersuchungen der Reparatur UV-induzierter Modifikationen in Keratinozyten eine Dosis von 250 J/m² UV-B und Mäuse wurden mit 5000 J/m² UV-B bestrahlt, also das Vielfache, der in dieser Arbeit bei der Induktion von Pyrimidindimeren in Reparaturversuchen eingesetzten Dosis. **Smith et al. (1995)** schädigten Plasmid-DNA für die Bestimmung der Reparatur mit dem „Host Cell Reactivation Assay“ (HCR) mit 5000 J/m² UV-254. Die Expression von p53 nach Bestrahlung mit UV-Licht ist dosis- und wellenlängenabhängig. 5 Stunden nach Bestrahlung von Mauskeratonozyten mit 40 J/m² UV-B tritt eine 4-10fache Induktion des p53 Proteins auf (**Liu et al., 1994**). *In vivo* kommt es nach Bestrahlung menschlicher Haut mit UV-B innerhalb von 2 h zur Akkumulation von p53 Protein mit einem Maximum nach 24 h

(Hall et al., 1993). Eine Ursache dafür, daß in dieser Arbeit p53 keinen Einfluß auf die globale Nukleotidexzisionsreparatur bei Schädigung mit einer geringen Dosis UV-B besitzt, kann eine mangelnde Induktion von p53 sein. Die Messung der Reparaturgeschwindigkeit mit einer hohen Dosis UV-B-Licht (177 J/m^2) in dieser Arbeit zeigte jedoch auch, daß p53 nicht an der Reparatur UV-induzierter Modifikation bei dieser Dosis beteiligt ist. Möglicherweise beruhen die Unterschiede auf dem Einsatz unterschiedlicher Zelllinien. Die Expression von p53 Protein in den transfizierten Zelllinien A253CW14G, Klon 1 und 2 wurde mittels Western-Blot gezeigt (Abb. 4.48 und 4.50). Die Funktionsfähigkeit des p53 Proteins in den in dieser Arbeit verwendeten Zellen wurde von Garmyn (1997) und Courtois et al. (1997) durch Wiederherstellung der Zellzykluskontrolle, Reduktion von Tumorigenität und Induktion von p21 gezeigt. Eine leichte Erhöhung der Toxizität der Behandlung mit Ro 19-8022 + Licht war in den p53-transformierten Zellen nachweisbar (Tab. 4.8) und ist ein Hinweis auf die Wiederherstellung apoptotischer Regulationsmechanismen in diesen Zellen.

Die Induktion UV-induzierter DNA-Schäden durch Ishizaki et al. (1994) erfolgte mit $5\text{-}10 \text{ J/m}^2$. In Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit, soll nach Ishizaki et al. (1994) die DNA-Reparatur UV-induzierter Schäden in Zellen aus p53-knock-out-Mäusen und normalen embryonischen Fibroblasten mit der gleichen Geschwindigkeit verlaufen. Keinen Einfluß von p53 auf die Reparatur von DNA-Schäden in ES-Zellen stellten auch Prost et al. (1998) fest. Ein p53-überexprimierender Klon zeigte im Vergleich zu SAOS-2 Zellen keine erhöhte Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden, aber eine stark erniedrigte Mutationsfrequenz (Yagi et al., 1998).

Die Reparatur Fpg-sensitiver Modifikationen verläuft über die Basenexzisionsreparatur (BER) (Jaiswal et al., 1998). Die Bestimmung der Kinetik der Reparatur Fpg-sensitiver Modifikationen zeigte, daß die Halbwertszeit Fpg-sensitiver Modifikationen 2 bis $2 \frac{1}{2}$ Stunden betrug, in Einklang mit den Ergebnissen anderer Autoren (Kielbassa, 1996). Andere Autoren zeigen, daß ca. 60-70% des durch photoangeregtes Riboflavin induzierte 8-oxoG nach 2 Stunden repariert ist (Bessho et al., 1993).

Die Reparatur von Cyclobutanpyrimidindimeren erfolgt über die Nukleotidexzisionsreparatur. Die Halbwertszeit der Reparatur T4 Endonuklease V-sensitiver Modifikationen betrug ca. 6 bis 8 Stunden, verlief also im Vergleich zur Reparatur Fpg-sensitiver Modifikationen weitaus langsamer. Die Reparaturgeschwindigkeit soll zwischen 1.5 und 6 J/m^2 gleich sein (Keyse & Tyrrell, 1987). Ähnliche Halbwertszeiten wurden auch von anderen Autoren gefunden. Die Reparatur UV-induzierter Cyclobutandimere beträgt in haarlosen Mäusen 7.4 h (Yarosh & Yee, 1990), für UV-induzierte Einzelstrangbrüche 2-4 h (Kinley et al., 1995). In Hamsterzellen und menschlichen Zellen werden 40% der Cyclobutandimere in ca. 5-6h (Klaude et al., 1995) bzw. ca. 50% in 6-10 h (Rosenstein & Mitchell, 1991; Kasten et al., 1995) repariert. Young et al. (1996) geben jedoch für die Entfernung von Cyclobutan-Dimeren aus menschlicher Haut eine Halbwertszeit von 33.3 h an. Im allgemein wird jedoch angenommen, daß Nagerzellen im Vergleich zu menschlichen Zellen Pyrimidindimere langsamer reparieren (Mitchell & Nairn, 1989; Mitchell et al., 1985).

Als Folge dessen, daß p53 keinen Einfluß auf die Basenexzisionsreparatur besitzt, zeigten sich auch keine Unterschiede im Steady-State-Spiegel von Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Modifikationen (**Abb. 4.34** und **4.35**). Die Messung intrazellulärer Glutathion-Spiegel zeigte, daß sowohl in den von A253 abgeleiteten Zellen, als auch in primären Mausfibroblasten keine signifikanten Unterschiede auftreten (siehe **Abb. 4.36** und **Abb. 4.37**). Der geringe Steady-State-Spiegel Fpg-sensitiver Modifikation in Klon 1 der p53-Transfektanten (A253CW14G, Klon 1) ist somit nicht auf einen unterschiedlichen Glutathion-Gehalt zurückzuführen, für den in Kapitel 5.3.1 ein Einfluß auf den Steady-State-Spiegel oxidativer Modifikationen gezeigt wurde. Die Bestimmung von Mikrokernen in den Zelllinien A253 und A253CW14G (Klon 1) (**Abb. 4.38**) zeigte, daß in beiden Zelllinien die basale Mikrokernenfrequenz im Vergleich zu AS52-Zellen ca. 5fach erhöht ist (vgl. **Abb. 4.22** und **4.23**). In den permanenten Tumorzellen A253 und den davon abgeleiteten Zelllinien fällt das hohe Ausmaß vorhandener Einzelstrangbrüche auf (**Abb. 4.34**), die ja möglicherweise für die Entstehung von Mikrokernen bedeutsam sind (**Speit et al., 1984**).

Erwartungsgemäß war das Ausmaß induzierter Fpg-sensitiver Modifikationen und Einzelstrangbrüche, ebenso wie das Ausmaß UV-induzierter Modifikationen in den untersuchten Zellen - unabhängig vom p53-Status - gleich.

6 Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AP-Läsionen	basenfreie Stelle in der DNA (apurinische/apyrimidinische)
bp	Basenpaar
BCIP/NBT	5-Brom-3-Chlor-3-Indolyl-Phosphat / Nitro-Blue-Tetrazolium
BSA	Rindeserumalbumin
BSO	L-Buthionin-SR-sulfoximin
C	Cytosin
CHO-Zellen	Chinesische Hamster Ovarienzellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds	doppelsträngig
DTNB	5, 5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
EDTA	Ethylendinitrioloessigsäure
ECD	elektrochemischer Detektor
EDTA	Ethylendinitrotetraessigsäure-Dinatriumsalz
Endo	Endonuklease
ess	Endonuklease-sensitive Läsion
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	et cetera
EtOH	Ethanol
Exo	Exonuklease
FAPY-Guanin	2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin
FCS	Fötale Kälberserum
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
g	Gramm
G	Guanin
Gl.	Gleichung
GPx	Glutathionperoxidase
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion (Disulfid-Dimer)
[GSH]+2x[GSSG]	Summe der Konzentrationen von reduziertem und oxidiertem Glutathion
h	Stunde
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
kB	Kilobasen
kD	Kilodalton
ko	knock-out

l	Liter
m	milli
M	molar
mA	Milliampere
MG	Molekulargewicht
μ	mikro
min	Minute
MM	Molmasse
MeOH	Methanol
n	nano
NDPO ₂	1,4-Etheno-2,3-benzodioxin-1,4-dipropionsäure dinatriumsalz
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
8-oxoA	8-Hydroxyadenin
8-oxoG	8-Hydroxyguanin
8-oxodG	8-Hydroxydesoxyguanosin
p	pico
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBSCMF	phosphatgepufferte Salzlösung, Calcium- und Magnesiumfrei
Ro 19-8022	[R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl)-carbonyl]-2-pyrrolidinmethanol
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
s	Sekunde
SCGE	Einzelzell-Gelelektrophorese („Comet-Assay“)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sens.	Sensitiv
SOD	Superoxid-Dismutase
SoSe	Natriumselenit
ss	einzelsträngig
SSB	Einzelstrangbrüche (single strand-breaks)
Tab.	Tabelle
<i>tert</i> -Butanol	Tertiär-Butanol (2-Methyl-2-Propanol)
T	Thymin
6TG	6-Thioguanin
T4 Endo V	T4 Endonuklease V
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
TCA	Trichloressigsäure
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylenethyldiamin

TE-Puffer	Tris-EDTA
TP	Gesamt-Protein
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Units pro Milliliter
usw.	und so weiter
V	Volt
vo	vector-only
W	Watt
wt	wild-typ
z.B.	zum Beispiel

7 Literatur

- Abel, J., de Ruiter, N. (1989) Inhibition of hydroxyl-radical generated DNA degradation by metallothionein. *Toxicol. Lett.*, 47, 191-196.
- Abello, P.A., et al. (1994) Antioxidants modulate induction of programmed endothelial cell death (apoptosis) by endotoxin. *Arch. Surg.*, 129, 134-141.
- Adam, W. and Cilento, G. (1983) Chemical and biological generation of excited states. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 22, 529-541.
- Adam, W., Saha-Möller, C.R., and Schönberger, A. (1996) Photooxidation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxy-guanosine by thermally generated triplet-excited ketones from 3-(hydroxymethyl)-3,4,4-trimethyl-1,2-dioxetane and comparison with type-I and type-II photosensitizers. *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 9233-9238.
- Adam, W., Grimm, G.N., Saha-Möller, C.R. (1998a) DNA cleavage induced by alkoxyl radicals generated in the photolysis of N-alkoxy-pyridinethiones. *Free Radic. Biol. Med.*, 24, 234-238.
- Adam, W., Grimm, G.N., Saha-Möller, C.R., Dall'Acqua, F., Miolo, G., Vedaldi, D. (1998) DNA damage by *tert*-butoxyl radicals generated in the photolysis of a water-soluble, DNA-binding peroxyester acting as a radical source. *Chem. Res. Toxicol.*, 11(9), 1089-1097.
- Akamatsu, H., Niwa, Y., Sasaki, H., Matoba, Y., Asada, Y., Horio, T. (1996) Effect of pyridone carboxylic acid anti-microbials on the generation of reactive oxygen species *in vitro*. *J. Int. Med. Res.*, 24(4), 345-351.
- Albertini, S., Chételat, A.-A., Miller, B., Muster, W., Pudjadas, E., Strobel, R., Gocke, E., (1995) Genotoxicity of 17 gyrase- and four mammalian topoisomerase II-poisons in prokaryotic and eukaryotic test systems. *Mutagenesis*, 10, 343-351.
- Allen, R.C., Stjernholm, R.L. and Steele, R.H. (1972) Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 47, 679-684.
- Ames, B.N. (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens, *Science*, 221, 1256-1264.
- Ames, B.N., Hollstein, M.C., Cathcart, R. (1982) Lipid peroxidation and oxidative damage to DNA. In: Yagi, K. (ed.) *Lipid Peroxides in Biology and Medicine*, Academic Press, New York, pp. 339-351.
- Anathaswamy, H.N., Perceall, W.E. (1990) Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. *Photochem. Photobiol.*, 52, 1119-1136.
- Anderson, R.D., Berger, N.A. (1994) International Commission for Protection against environmental mutagens and carcinogens. Mutagenicity and carcinogenicity of topoisomerase-interactive agents. *Mutat. Res.*, 309, 109-142.
- Anundi, I., Högborg, J., Stead, A.H. (1979) Glutathione depletion in isolated hepatocytes: its relation to lipid peroxidation and cell damage. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, 45, 45-51.
- Arouma, O.I., Halliwell, B., Gajewski, E., Dizdaroglu, M. (1989) Damage to the bases in DNA induced with hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *J. Biol. Chem.*, 264, 20509-20512.
- Arouma, O.I. et al. (1991) Copper-ion-dependent damage of the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J.*, 273, 601-604.
- Asahara, H., Wistort, P.M., Bank, J.F., Bakerian, R.H. and Cunningham, R.P. (1989) Purification and characterisation of *E. coli* endonuclease III from the cloned *nth* gen. *Biochem.*, 28, 4444-4449.
- Ashman, C.R., Davidson, R.L. (1984) *Mol. Cell. Biol.*, 4, 2266-2272.

- Aspinwall, R., Rothwell, D.G., Roldan-Arjona, T., Anselmino, C., Ward, C.J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 109-114.
- Aust, A.D., Morehouse, L.A., Thomas, E.C. (1985) Role of metals in oxygen radical reactions. *J. Free. Rad. Biol. Med.*, 1, 3-25.
- Babior, B.M. (1978) Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N. Engl. J. Med.*, 298, 659-668.
- Bailly, V., Verly, W.G., O'Connor, T.R., Laval, J. (1989) Mechanism of DNA strand nicking at apurinic/apyrimidinic sites by *Escherichia coli* formamidopyrimidin DNA glycosylase. *Biochem. J.*, 262, 581-589
- Bakalkin, G., Yakovleva, T., Selivanova, G., Magnusson, K.P., Szekely, L., Kiseleva, E., Klein, G., Terenius, L., Wiman, K.G. (1994) p53 binds single-stranded DNA ends and catalyzes DNA renaturation and strand transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 91, 413-417.
- Ballmaier, D. (1997) Oxidative DNA-Modifikationen durch extrazelluläre und intrazellulär gebildete reaktive Sauerstoffspezies. Dissertation, Universität Würzburg.
- Ballmaier, D., Epe, B. (1995) Oxidative DNA damage induced by potassium bromate under cell-free conditions and in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 16(2), 335-342.
- Barrett, J.C. (1993) Mechanisms of multistep carcinogenesis and risk assessment. *Environm. Health Perspectives*, 100, 9-20.
- Batna, A., Fuchs, C., Spittler, G. (1997) Lipid peroxidation in presence of selenium. *Chem. Phys. Lipids*, 87, 149-158.
- Beehler, B.C., Przybyszewski, J., Box, H.B. and Kulesz-Martin, M.F. (1992) Formation of 8-hydroxyguanosine within DNA of mouse keratinocytes exposed in culture to UVB and H₂O₂. *Carcinogenesis*, 13, 2003-2007.
- Behne, D., Kyriakopoulos, A. (1995) Neue Selenoproteine. *Med. Klin.* 90 (Suppl.1), 5-7.
- Bélanger, S., Richard, M.J., Guiraud, P., Monjo, A.M., Béani, J.C., Favier, A. (1991) Pouvoir antioxydant d'une forme minérale de sélénium sur des fibroblastes cutanés humains en culture. *Dermatol. Prat.*, Janvier (Suppl.), 1-4.
- Ben-Hur, E., Fujihara, T., Suzuki, F. and Elkind, M.M. (1987) Genetic toxicology of the photosensitization of Chinese hamster cells by phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.*, 45, 227-230.
- Bennett, W.P. et al. (1993) *Cancer Res.*, 53, 4817
- Berg, R.J., van Kranen, H.J., Rebel, H.G., de Vries, A., van Vloten, W.A., Van Kreijl, C.F., van der Leun, J.C., de Gruijl, F.R. (1996) Early p53 alterations in mouse skin carcinogenesis by UV-B radiation: immunohistochemical detection of mutant p53 protein in clusters of preneoplastic epidermal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 274-278.
- Bertsche, U., Schorn, H. (1986) Glutathione depletion by DL-buthionine-SR-sulfoximine (BSO) potentiates X-ray-induced chromosome lesions after liquid holding recovery. *Radiat. Res.*, 105(3), 351-369.
- Bessho, T., Tano, K., Nishimura, S., Kasai, H. (1993) Induction of mutation in mouse FM3A cells by treatment with riboflavin plus visible light and its possible reactions with formation of 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in DNA. *Carcinogenesis*, 14, 1069-1071.
- Bilski, P., Martinze, L.J., Koker, E.B., Chignell, C.F. (1996) Photosensitization of norfloxacin is a function of pH. *Photochem.- Photobiol.* 64(3), 496-500.
- Biswas, S., Talukder, G., Sharma, A. (1997) Selenium salts and chromosome damage. *Mutat. Res.*, 390(3), 201-205.
- Black, H.S., deGruijl, F.R., Forbes, P.D., Cleaver, J.E., Ananthaswamy, H.N. deFabo, E.C., Ullrich, S.E., Tyrrell, R.M. (1997) Photocarcinogenesis: an overview. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*, 40, 29-47..

- Blazek, E.R. and Hariharan, P.V. (1984) Alkaline elution studies of hematoporphyrin-derivative photosensitized DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Photochem. Photobiol.*, 40, 5-13.
- Blot, W.J. et al. (1993) Nutrition intervention trials in Linxian, China. *J. Natr. Cancer Inst.*, 85, 1483-1492.
- Boiteux, S. (1993) Properties and biological functions of the NTH and Fpg proteins of *Eschreichia coli*: two DNA glycosylases that repair oxidative damage in DNA. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 19, 87-96.
- Boiteux, S., Gajewski, E., Laval, J. and Dizdaroglu (1992) Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein: excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry*, 31, 106-110.
- Boiteux, S., O'Connor, T.R., Lederer, F., Gouyette, A. and Laval, J. (1990) Homogeneous *Eschreichia coli* Fpg protein. *J. Biol. Chem.*, 265, 3916-3922.
- Boiteux, S., Radicella, J.P. (1999) Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie*, 81, 59-67.
- Boorstein, R.J., Hilbert, T.P., Cadet, J., Cunningham, R.P., Teebor, G.W. (1989) UV-induced pyrimidine hydrates in DNA are repaired by bacterial and mammalian DNA glycosylase activities. *Biochemistry*, 28, 6164-6170.
- Bornkessel, B. (1995) Tumorsuppressorgene. *MMP*, 10, 280-281.
- Boukamp, P., Peter, W., Pascheberg, U., Altmeier, S., Fasching, C., Stanbridge, E.J., Fusening, N.E. (1995) Step-wise progression in human skin carcinogenesis *in vitro* involves mutational inactivation of p53, *ras^H* oncogene activation and additional chromosome loss. *Oncogene*, 11, 961-969.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., Fusenig, N.E. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.*, 106, 761-771.
- Boulikas, T. (1996) DNA lesion-recognizing proteins and the p53 connection. *Anticancer Res.*, 16(1), 225-242.
- Bradley, M.O., Sharkey, N.A. (1977) Mutagenicity and toxicity of visible fluorescent light to cultured mammalian cells. *Nature*, 266, 724-726.
- Brash, D.E., Rudolph, J.A., Simon, J.A., Lin, A., McKenna, G.J., Baden, H.P., Halperin, A.J., Ponten, J. (1991) A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 88, 10124-10128.
- Breen, A.P., Murphy, J.A. (1995) *Free Radic. Biol. Med.*, 18, 1033-1077.
- Breimer, L.H. and Lindahl, T. (1984) DNA glycosylase activities for thymine residues damaged by ring saturation, fragmentation, or ring contraction are functions of endonuclease III in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 259, 5543-5548.
- Breimer, L.H. and Lindahl, T. (1985) Thymine lesions produced by ionizing radiation in double-stranded DNA. *Biochemistry*, 24, 4018-4022.
- Breimer, L.H. and Lindahl, T. (1985a) Enzymatic excision of DNA bases damaged by exposure to ionizing radiation or oxidizing agents. *Mutation Res.*, 150, 85-89.
- Brewer, G.J. Yuzbasiyan-Gurkan, V. (1992) Wilson disease. *Medicine*, 71, 139-164.
- Burk, R.F. (1990) Protection against free radical injury by selenoenzymes. *Pharmacol. Ther.*, 45, 383-385.
- Burnette, W.N. (1981) Western blotting: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamidegels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radionated protein A. *Anal. Biochem.*, 112, 195-203.

- Cadet, J. and Téoule, R. (1978) Comparative study of oxidation of nucleic acid components by hydroxyl radicals, singlet oxygen and superoxide anion radicals. *Photochem. Photobiol.*, 28, 661-667.
- Cadet, J. and Vigny, P. (1990) The Photochemistry of nucleic acids. In: *Bioorganic Photochemistry*, Vol. 1, Morrison H. (ed.) New York: John Wiley & Sons, pp. 1-272.
- Cadet, J., Berger, M., Decarroz, C., Wagner, J.R., Van Lier, V.W., Ginot, Y.M., Vigny, P. (1986) Photosensitized reactions of nucleic acids. *Biochimie*, 68, 813.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., Morin, B., Raoul, S., Ravanat, J.-L., Spinelli, S. (1997) Effects of UV and visible radiation on DNA-final base damage. *Biol. Chem.*, 378, 1275-1286.
- Campbell, C., Quinn, A.G., Angus, B. Farr, P.M., Rees, J.L. (1993) Wavelength specific patterns of p53 induction in human skin following exposure to UV radiation. *Cancer Res.*, 53, 2697-2699.
- Cerutti, P. et al. (1993) Oxidant stress in tumor promotion. 40th Harden Conference. Regulation of Gene Expression by oxidative Stress. Implications for Health and Disease (Aviemore, U.K.), 41 (Abstract)
- Cerutti, P.A. (1985) Prooxidative state and tumor promotion. *Science*, 227, 375-381.
- Chan, E., Weiss, B. (1987) Endonuclease IV of *Escherichia coli* is induced by paraquat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 3189-3193.
- Chan, H.W-S. (1987) *Autoxidation of unsaturated lipids*. London, Academic Press.
- Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiolog. Rev.*, 59, 527-605.
- Chen, J., Lin, J., Levine, A.J. (1995) Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm-2 oncogene. *Mol. Med.*, 1(2), 142-152.
- Chen, J., Wu, X., Lin, J., Levine, A.J. (1996) Mdm-2 inhibits the G1 arrest and apoptosis functions of the p53 tumor suppressor protein. *Mol. Cell. Biol.*, 16(5), 2445-2452.
- Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S. and Loeb, L.A. (1992) 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G→T and A→C substitutions. *J. Biol. Chem.*, 267, 166-172.
- Chételat, A.A., Albertini, S., Gocke, E. (1996) The photomutagenicity of fluoroquinolones in tests for gene mutation, chromosomal aberration, gene conversion and DNA breakage (Comet Assay). *Mutagenesis*, 11(5), 496-504.
- Cho, D.Y., Jung, U., Chung, A.S. (1999) Induction of apoptosis by selenite and selenodiglutathione in HL-60 cells: correlation with cytotoxicity. *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 47(5), 781-793.
- Chow, C.K. (1979) Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. *Am. J. Clin. Nutr.*, 32, 1066-1081.
- Christie, N.T., Costa, M. (1984) In vitro assessment of the toxicity of metal compounds. IV: Disposition of metals in cells: Interactions with membranes, glutathione, metallothionein and DNA. *Biol. Trace Elem. Res.*, 6, 139-158.
- Chubatsu, L.S., Gennari, M., Meneghini, R. (1992) Glutathione is the antioxidant responsible for resistance to oxidative stress in V79 chinese hamster fibroblasts rendered resistant to cadmium. *Chem. Biol. Interactions.*, 82, 99-110.
- Churchill, M.E., Peak, J.G., Peak, M.J. (1991) Repair of near-visible- and blue-light-induced DNA single-strand breaks by the CHO cell lines AA8 and EM9. *Photochem. Photobiol.*, 54, 639-644.
- Ciulla, T.A., van Kamp, J.R., Rosenfeld, E. and Kochevar, I.E. (1989) Photosensitization of single-strand breaks in pBR322 DNA by rose bengal. *Photochem. Photobiol.*, 49, 293-298.

- Clark, J.M., Beardsley, G.P. (1987) Functional effects of *cis*-thymine glycol lesions on DNA synthesis *in vitro*. *Biochemistry*, 26, 5398-5403.
- Cleaver, J.E., Kraemer, K.H. (1995) Xeroderma pigmentosum and Cockayne Syndrome. In: Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D. (eds.) *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 6th edn., Vol. III, McGraw-Hill, New York, p. 4393-4419.
- Clerch, B., Barbe, J., Llagostera, M. (1992) The role of the excision and error-prone repair systems in mutagenesis by fluorinated quinolones in *Salomella typhimurium*. *Mutat. Res.*, 281(3), 207-213.
- Collins, A.R., Duthie, S.J. and Dobson, V.L. (1993) Direct enzymatic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis*, 14, 1733-1735.
- Collins, A.R., Cadet, J., Epe, B. and Gedik, C. (1997) Problems in the measurement of 8-oxoguanine in human DNA. Report of a workshop, DNA oxidation, held in Aberdeen, UK, 19-21 January, 1997. *Carcinogenesis*, 18, 1833-1836.
- Concar, D. (1992) The resistable rise of skin cancer. *New Scientist*, 23-28.
- Cotgreave, I.A., Moldéus, P., Brattsand, R., Hallberg, A., Andersson, C.M., Engman, L. (1992) *Biochem. Pharmacol.*, 43, 793.
- Cotgreave, I.A., Sandy, M.S., Berggren, M., Moldeus, P.M. Smith, M.T. (1987) *Biochem. Pharmacol.*, 36, 2899.
- Courtois, S.J., Woodworth, C.D., Degreef, H., Garmyn, M. (1997) Early Ultraviolet-B-induced G1 arrest and suppression of the malignant phenotype by wild-type p53 in human squamous cell carcinoma cells. *Exp. Cell. Res.*, 233(1), 135-144.
- Dally, H. and Hartwig, A. (1997) Induction and repair of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 18, 1021-1026.
- Davies, M.J. (1989) *Biochem. J.*, 257, 603-606.
- Davies, M.J., Hazlewood, C. (1995) EPR Spin-trapping studies of the reaction of radicals derived from hydroperoxide tumor-promoters with nucleic acids and their components. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, 2, 895-901.
- de la Asuncion, J.G., Millan, A., Pla, R., Bruseghini, L., Esteras, A., Pallardo, F.V., Sastre, F.V., Vina, J. (1996) Mitochondrial glutathione oxidation correlates with age-associated oxidative damage to mitochondrial DNA. *FASEB J.*, 10(2), 333-338.
- Dekant, W. and Vamvakas, S. (1994) *Toxikologie für Chemiker und Biologen*. Spektrum akademischer Verlag, Heidelberg, 93-108.
- Demple, B., Harrison, L. (1994) Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annual Rev. Biochem.*, 63, 915-948.
- Demple, B., Linn, S. (1980) DNA-N-glycosylase and UV-repair. *Nature*, 287, 203-208.
- Deppert, W., Mummenbrauer, T., Janus, F., Albrechtsen, N., Wiesmüller, L., Grosse, F. (1998) A dual role for the tumor suppressor p53 in DNA damage control. *Abstract 29. Poster präsentiert auf dem Meeting der DNA-Repair-Network, Mainz, 1998*.
- Devanaboyina, U. and Gupta, R.C. (1996) Sensitive detection of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by ³²P-postlabeling assay and the basal levels in rat tissues. *Carcinogenesis*, 17, 917-924.
- Di Mascio, P., Kaiser, S. and Sies, H. (1989) Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.*, 274, 532-538.
- Dix, T.A., Aikens, K. (1993) *Chem. Res. Tox.*, 6, 2-18.
- Dizdaroglu, M. (1992) Oxidative DNA damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutation Res.*, 275, 331-342.

- Dizdaroglu, M., Laval, J., Boiteux, S. (1993) Substrate specificity of the *Escherichia coli* endonuclease III: excision of thymine- and cytosine-derived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals. *Biochemistry*, 32, 12105-12111.
- Doetsch, P.W., Zasatawny, T.H., Martin A.M. and Dizdaroglu, M. (1995) Monomeric base damage products from adenine, guanine and thymine induced by exposure of DNA to ultraviolet radiation. *Biochemistry*, 34, 737-742.
- Donehower, L.A., Harvey, M., Slagle, B.L., McArthur, M.J. Montgomery, C. J., Butel, J.S., Bradley, A (1992) *Nature*, 356, 215-221.
- Duke, R.C., Ojcius, D.M., Young, J.D.-E. (1997) Die Apoptose - Regeln und Fehler beim Zellselbstmord. *Spektrum der Wissenschaft*, Februar 1997, 26-35
- Duthie, S.J., Collins, A. (1997) The influence of cell growth, detoxifying enzymes and DNA repair on hydrogen peroxide-mediated DNA damage (measured using the comet assay) in human cells. *Free Rad. Biol. Med.*, 22(4), 717-724.
- Edgren, M., Révész, L. (1987) Compartmentalised depletion of glutathione in cells treated with buthionine sulphoximine. *Brit. J. Rad.*, 60, 723-724.
- Eide, L., Bjoras, M., Provano, M., Alseth, I. Bergdal, K.G. and Seeberg, E. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 10735-10740.
- El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, 75, 817-825.
- Epe, B. (1991) Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem.-Biol. Interactions*, 80, 239-260.
- Epe, B. (1993) DNA damage induced by photosensitization. In: Halliwell, B., Aruoma, O.I., Hoorwood, E. (eds.) *DNA and Free Radicals*, S. 41-65.
- Epe, B. (1995) DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 127, 223-249.
- Epe, B. and Hegler, J. (1994) Oxidative DNA damage: endonuclease fingerprinting. *Methods Enzymol.*, 234, 122-131.
- Epe, B., Ballmaier, D., Adam, W., Grimm, G.N., Saha-Möller, C.R. (1996) Photolysis of N-hydroxypyridine-thiones: a new source of hydroxyl radicals for the direct damage of cell-free and cellular DNA. *Nucleic Acids Res.*, 24(9), 1625-1631.
- Epe, B., Häring, M., Ramaiah, D., Stopper, H., Abou-Elzhab, M.M., Adam, W. and Saha-Möller, C. (1993b) DNA damage induced by furocumarin hydroperoxides plus UV (360 nm). *Carcinogenesis*, 14, 2271-2276.
- Epe, B., Henzl, H., Adam, W., Saha-Möller, C.R. (1993a) Endonuclease-sensitive DNA modifications induced by acetone and acetophenone as photosensitizers. *Nucleic Acids. Res.*, 21, 863-869.
- Epe, B., Mützel, P. and Adam, W. (1988) DNA damage by oxygen radicals and excited state species: a comparative study using enzymatic probes *in vivo*. *Chem- Biol. Interactions*, 67, 149-165.
- Epe, B., Pflaum, M. and Boiteux, S. (1993c) DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems. *Mutation Res.*, 299, 135-145.
- Epe, B., Pflaum, M., Häring, M., Hegler, J., Rüdiger, H. (1993d) Use of repair endonucleases to characterize DNA damage induced by reactive oxygen species in cellular and cell-free systems. *Toxicol. Lett.*, 67, 57-72.
- Epp, O., Ladenstein, R. and Wendel, A. (1983) The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2 nm resolution. *Eur. J. Biochem.*, 133, 51-69.

- Evans, J., Maccabee, M., Hatahet, Z., Courcelle, J., Bockrath, R., Ide, H., Wallace, S. (1993) Thymine ring saturation and fragmentation products: lesion bypass, misinsertion and implications for mutagenesis. *Mutat. Res.*, 299, 147-156.
- Evans, P.J., Halliwell, B. (1994) Measurement of iron and copper in biological systems: Bleomycin and copper-phenanthroline. *Meth. Enzymol.* 233, 82-92.
- Facklam, M., Schoch, P., Bonetti, E.P., Jenck, F., Martin, J.R., Moreau, J.L., Haefely, W.E. (1992a) Relationship between benzodiazepine receptor occupancy and functional effects *in vivo* of four ligands of differing intrinsic efficiencies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 261, 1113-1121.
- Facklam, M., Schoch, P., Haefely, W.E. (1992) Relationship between benzodiazepine receptor occupancy and potentiation of γ -aminobutyric acid-stimulated chloride flux *in vitro* of four ligands of differing intrinsic efficiencies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 261, 1106-1112.
- Faljoni, A., Haun, M., Hoffman, M.E., Meneghini, R., Duran, N. and Cilento, G. (1978) Photochemical-like effects in DNA caused by enzymatically energized triplet carbonyl compounds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 80, 490-495.
- Ferguson, J., Johnson, B.E. (1991) Recently developed photosensitizing agents, in: F. Urbach (ed), *Biological Responses to Ultraviolet A Radiation*, Valenmar, Overland Park, KS, p. 107-119.
- Ferguson, J., Johnson, B.E. (1993) Clinical and laboratory studies of the photosensitizing potential of norfloxacin, a 4-quinolone broad-spectrum antibiotic. *Br. J. Dermatol.*, 128, 285-295.
- Ferguson, L.R., Baguley, B.C. (1994) Topoisomerase II enzymes and mutagenicity. *Environ. Mol. Mutagen.*, 24, 245-261.
- Fernandes, R.S., Cotter, T.G. (1994) Apoptosis or necrosis: intracellular levels of glutathione influence mode of cell death. *Biochem. Pharmacol.*, 48(4), 675-681.
- Findlay, G.M. (1928) Ultraviolet light and skin cancer. *Lancet*, 2, 1070-1073.
- Finnegan, M.T.V., Herbert, K.F., Evans, M.D., Griffiths, H.R. and Lunec, J. (1996) Evidence for sensitization of DNA to oxidative damage during isolation. *Free Rad. Biol. Med.*, 20, 93-98.
- Fischer-Nielsen, A., Poulsen, H.E., Loft, S. (1992) 8-Hydroxydeoxyguanosine *in vitro*: effects of glutathione, ascorbate, and 5-aminosalicylic acid. *Free Radic. Biol. Med.*, 13(2), 121-126.
- Fleet, J.C. (1997) Dietary selenium repletion may reduce cancer incidence in people at high risk who live in areas with low soil selenium. *Nutr. Rev.*, 55(7), 277-279.
- Flohe, L. (1980) Glutathione peroxidase. *Basic Life Sci.*, 49, 663-668.
- Flores-Rozas, H., Kelman, Z. Dean, F.B., Pan, Z.-Q., Harper, J.W., Elledge, S.J., O'Donnell, M., Hurwitz, J. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 8655-8659.
- Floyd, R.A., West, M.S., Schneider, J.E., Watson, J.J. and Maitt M.L. (1990) Hematoporphyrin D plus light mediates 8-hydroxydeoxyguanosine formation in DNA and RNA. *Free Radicals Biol. Med.*, 9, 76.
- Food and Drug Administration [Editorial] (1993) FDA toxicity concerns with maxaquin. *Script*, 1805, 19.
- Foote, C.S. (1968) Photosensitized oxygenations and the role of singlet oxygen. *Acc. Chem. Res.*, 1, 104-110.
- Foote, C.S. and Clennan, E.L. (1995) Properties and reactions of singlet oxygen. In: Fotte, C.S., Valentine, J.S., Greenberg, A. and Liebman, J.F. (eds.), *Active oxygen in chemistry*. London: Blackie Academic and Professional, 105-141.
- Ford, J.M., Hanawalt, P.C. (1995) Li-Fraumeni syndrome fibroblasts homozygous for p53 mutations are deficient in global DNA repair but exhibit normal transcription-coupled repair and enhanced UV resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 8876-8880.

- Ford, J.M., Hanawalt, P.C. (1997) Expression of wild-type p53 is required for efficient global genomic nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 272(44), 28073-28080.
- Ford, J.M., Baron, E.L., Hanawalt, P.C. (1998) Human fibroblasts expressing the human papillomavirus E6 gene are deficient in global genomic nucleotide excision repair and sensitive to ultraviolet irradiation. *Cancer Res.*, 58(4), 599-603.
- Fornace, A.J. (1993) DNA-damage inducible genes in mammalian cells and the role for the p53 tumor suppressor in their regulation, 40th Harden Conference. Regulation of Gene Expression by oxidative Stress. Implications for Health and Disease (Aviemore, U.K.), 25.
- Fort, F.L. (1992) Mutagenicity of quinolone antibacterials. *Durg Safety*, 7, 214-222.
- Foster, L.H., Sumar, S. (1997) Selenium in health and disease: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 37(3), 211-228.
- Fraga, C.C., Shigenaga, M.K. Park, J.W. (1991) Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2deoxyguanosine in rat organ DNA and urine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4533-4537.
- Freeman, B.A. (1984) Biological sites and mechanism of free radical production. In: Armstrong, D. et al. (Hrsg.) Free Radicals in Molecular Biology, Aging and Disease. Rave Press, NY, 24-29.
- Fridovich, I. (1983) Superoxid radical, an endogenous toxicant. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 23, 239-257.
- Fridovich, I. (1986) Biological effects of the superoxid radical. *Arch. Biochem. Biophys.*, 247, 1-11.
- Friedberg, E.C. (1985) In: Freeman, W.G., *DNA Repair*, New York.
- Fritsche, M. Haessler, C., Brandner, G. (1993) Induction of the nuclear accumulation of the tumor suppressor gene p53 by DNA damaging agents. *Oncogene*, 8, 307-318.
- Fuciarelli, A.F., Wegher, B.J., Blakely, W.F. and Dizdaroglu, M. (1990) Yields of radiation-induced base products in DNA: effects of DNA conformation and gassing conditions. *Int. J. Radiat. Biol.*, 58, 397-415.
- Fujita, H., Matsuo, I. (1994) *In vitro* phototoxic activities of new quinolone antibacterial agents: lipid peroxidative potentials. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 10(5), 202-205.
- Fujita, T., Fujimoto, Y. (1992) *Folia Pharmacol. Jpn.*, 99, 381-389.
- Gallagher, P.E., Duker, N.J. (1986) Detection of UV purine photoproducts in a defined sequence of human DNA. *Mol. Cell. Biol.*, 6, 707-709.
- Garzyn, M. (1997) persönliche Mitteilung.
- Gates III, F.T., Linn, S. (1977) Endonuclease from *Escherichia coli* that acts specifically upon duplex DNA damaged by ultraviolet light, osmium tetroxide, acid, or X-rays. *J. Biol. Chem.*, 252, 2802-2807.
- Gey, G.O., Coffman, W.O., Kubicek, M.T. (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Res.*, 12, 264-267.
- Gocke, E. (1991) Mechanism of quinolone mutagenicity in bacteria. *Mutat. Res.*, 248(1): 135-143.
- Gollnick, K. (1968) Type II photooxygenation reactions in solution. *Adv. Photochem.*, 6, 1-22.
- Graves, R.J., Felzenszwalb, I., Laval, J., O'Connor, T.R. (1992) Excision of 5' terminal deoxyribose phosphate from damaged DNA is catalyzed by the Fpg protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 267(20), 14429-14435.
- Greenley, T.L., Davies, M.J. (1994) Direct detection of radical generation in rat liver nuclei on treatment with tumor-promoting hydroperoxides and related compounds. *Biochim. Biophys. Acta*, 1226, 56-64
- Grether-Beck, S., Buettner, R., Krutmann, J. (1997) Ultraviolet A radiation-induced expression of human genes: molecular and photobiological mechanisms. *Biol. Chem.*, 378, 1231-1236.

- Griffith, O.W. (1985) Glutathione and glutathione disulphide. In: Bernt, E. & Bergmeyer, H.U. (ed.), *Methods of Enzymatic Analysis* 3rd Ed., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Vol VIII, pp 521-529.
- Griffith, O.W. and Meister, A. (1979) Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthione sulfoximine (S-n-butyl homocystein sulfoximine). *J. Biol. Chem.*, 1, 91-96.
- Grombacher, T., Eichhorn, U., Kaina, B. (1998) p53 is involved in regulation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) by DNA damaging agents. *Oncogene*, 17(7), 845-851.
- Grossmann, A. and Wendel, A. (1983) Non-reactivity of the seleno-enzyme glutathione-peroxidase with enzymatically hydroperoxidized phospholipids. *Eur. J. Biochem.*, 135, 549-552.
- Gutteridge, J.M.C., Westermarck, T. and Halliwell, B. (1985) Oxygen radical damage in biological systems. In: Johnson, J.E. et al. (eds.), *Free Radicals, Aging and Degenerative Diseases*. Alan R. Liss Inc., New York, 99-139.
- Haffner, R., Oren, M. (1995) Biochemical properties and biological effects of p53. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 5(1), 84-90.
- Hainaut, P., Milner, J. (1993) Redox modulation of p53 conformation and sequence-specific DNA binding *in vitro*. *Cancer Res.*, 53, 4469-4473.
- Hall, P.A., McKee, P.H., Menage, H.P., Dover, R., Lane, D.P. (1993) High levels of p53 protein in UV-induced normal human skin. *Oncogene*, 8, 203-207.
- Halliwell, B., Arouma, O.I. (1991) DNA damage by oxygen-derived radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, 219, 1-14.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1985) Free radicals in biology and medicine. Clarendon Press, Oxford.
- Hanawalt, P. (1994) Transcription-coupled repair and human disease. *Science*, 266, 1957-1958.
- Häring, M., Rüdiger, H., Demple, B., Boiteux, S., Epe, B. (1994) Recognition of oxidized abasic sites by repair endonucleases. *Nucleic Acids Res.*, 22, 2010-2015.
- Harper, J.W., Adami, G.R., Wei, N., Keyomarsi, K., Elledge, S.J (1993) *Cell*, 75, 805
- Harris, C.C. and Hollstein, M. (1993) Clinical implications of the p53 tumoursuppressor gene. *N. Engl. J. Med.*, 329, 1318-1327.
- Harris, C.C., Remack, J.S., Houghton, P.J., Brent, T.P (1996) Wild-type p53 suppresses transcription of the human O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res.*, 56(9), 2029-2032.
- Harris, G., Bashir, S., Winyard, P.G. (1994) 7,8-Dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine present in DNA is not simply an artifact of isolation. *Carcinogenesis*, 15, 411-413.
- Hartwell, L.H., Kastan, M.B. (1994) Cell cycle control and cancer. *Science*, 266, 1821-1828.
- Hatahet, Z., Kow, Y.W., Purmal, A.A., Cunningham, R.P., Wallace, S.S. (1994) New substrates for old enzymes. 5-Hydroxy-2'-deoxycytidine and 5-hydroxy-2'-deoxyuridine are substrates for *Escherichia coli* endonuclease III and formamidopyrimidine DNA glycosylase, while 5-hydroxy-2'-uridine is a substrate for uracil DNA N-glycosylase. *J. Biol. Chem.*, 269, 18814-18820.
- Haupt, Y., Maya, R., Kazaz, A., Oren, M. (1997) Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387, 296-299.
- Hayashi, M., Sofuni, T. and Ishidate, M., Jr. (1982) High sensitivity in micronucleus induction of a mouse strain. *Mutat. Res.*, 105, 253-156.
- Hayashi, M., Kishi, M., Sofuni, T., Ishidate, M., Jr. (1988) Micronucleus tests with mice on 39 food additives and 8 miscellaneous chemical substances. *Food Chem Toxicol.*, 26, 487-500.

- Healy, E., Reynolds, N.J., Smith, M.D., Campbell, C., Farr, P.M., Rees, J.L. (1994) Dissociation of erythema and p53 protein expression in human skin following UV-B irradiation, and induction of p53 protein and mRNA following application of skin irritants. *J. Invest. Dermatol.*, 103, 493-499.
- Hegler, J. and Epe, B. (1994) unveröffentlichte Ergebnisse, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg.
- Helbock, H.J., Beckman, K.B., Shigenaga, M.K., Walter, P.B., Woodall, A.A., Yeo, H.C. and Ames, B. (1998) DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 288-293.
- Henriksen, T., Dahlbeck, A., Larsen, S.H., Moan, J. (1990) Ultraviolet-radiation and skin cancer. Effect of an ozone layer depletion. *Photochem. Photobiol.*, 51, 579-582.
- Henschler, D., Forth, W., Rummel, W., Starke, K., (1992) Pharmakologie und Toxikologie (Hrsg.: Forth, W.), 6.Aufl., BI-Wiss.-Verlag, Mannheim, Leipzig, Wien, S. 281-303.
- Herzinger, T., Funk, J.O., Hillmer, K., Eick, D., Wolf, D.A., Kind, P. (1995) Ultraviolet B irradiation-induced G2 cell cycle arrest in human keratinocytes by inhibitory phosphorylation of the cdc2 cell cycle kinase. *Oncogene*, 11(10), 2151-2156.
- Higinbotham, K.G., Rice, J.M., Divan, B.A., Kasprzak, K.S., Reed, C.D. and Parantoni, A.O. (1992) GGT to GTT transversion in codon 12 of the K-ras oncogene in rat renal sarcomas induced with nickel subsulfide or nickel subsulfide/iron are consistent with oxidative damage to DNA. *Cancer Res.*, 52, 4747-4751.
- Hilbert, T., Chaung, W., Boorstein, R., Cunningham, R. and Teebor, G. (1997) *J. Biol. Chem.*, 272, 6733-6740.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C.C. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science*, 253, 49-52.
- Homburg, M.I. (1999) unveröffentlichte Ergebnisse, Institut für Pharmazie, Universität Mainz.
- Horio, T., Miyauchi, H., Asada, Y., Aoki, Y., Harada, M. (1994) Phototoxicity and photoallergenicity of quinolones in guinea pigs. *J. Dermatol. Sci.*, 3(2), 130-135.
- Howard, B.M., Pinney, R.J., Smith, J.T. (1993) Function of the SOS process in repair of DNA damage induced by modern 4-quinolones. *J. Pharm. Pharmacol.*, 45(7), 658-662.
- Hsie, A.W., Brimer, P.A., Mitchell, T.J. and Gosslee, D.G. (1975) The dose-response relationships for ethyl-methanesulfonate-induced mutations at the hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase locus in Chinese hamster ovary cells. *Somat. Cell. Genet.*, 1, 247-261.
- Hu, M.L., Spallholz, J.E. (1982) In vitro hemolysis of rat erythrocytes by selenium compounds. *Biochem. Pharmacol.*, 32, 957-961.
- Hunter, T. (1993) Braking the cycle. *Cell*, 75, 839-841.
- Hüttermann, J. (1982) Solid-state radiation chemistry of DNA and its constituents. *J. Ultramicroscopy*, 10, 25-40.
- Hwang, B.J., Ford, J.M., Hanawalt, P.C., Chu, G. (1999) Expression of the p48 xeroderma pigmentosum gene is p53-dependent and is involved in global genomic repair. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(2), 424-428.
- Ide, H., Kow, Y.W., Wallace, S.S. (1985) Thymine glycol and urea residues in M13 DNA constitute replicative blocks *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, 13, 8032-8052.
- Inouye, S. (1984) Site-specific cleavage of double-strand DNA by hydroperoxide of linoleic acid, *FEBS Lett.*, 172, 231-234.
- Ip, C. (1985) Selenium inhibition of chemical carcinogenesis. *Fed. Proc.*, 44, 2573-2578.
- Ip, C. and Lisk, D.J. (1994) Characterization of tissue selenium profiles and anticarcinogenic responses in rats fed natural sources of selenium-rich products. *Carcinogenesis*, 15, 573-576.

- Ip, C. and Lisk, D.J. (1994a) Enrichment of selenium in allium vegetables for cancer prevention. *Carcinogenesis*, 15, 1881-1885.
- Ip, C. and Lisk, D.J. (1995) Efficacy of cancer prevention by high selenium-garlic is primarily dependent on the action of selenium. *Carcinogenesis*, 16, 2649-2652.
- Ip, C., Lisk, D.J., Stoewsand, G.S. (1992) Mammary cancer prevention by regular garlic and selenium enriched garlic. *Nutr. Cancer.*, 17, 279-286.
- Ishidate, M., Jr. And Yoshikawa, K. (1980) Chromosome aberration tests with Chinese hamster cells *in vitro* with and without metabolic activation - a comparative study on mutagens and carcinogens. *Arch. Toxicol., Suppl.*, 4, 41-44.
- Ishizaki et al. (1994) Increased UV-induced SCEs but normal repair of DNA damage in p53-deficient mouse cells. *Int. J. Cancer*, 58, 254-257.
- Issels, R.D., Bourrier, S., Biaglow, J.E., Gerweck, L.E. and Wilmanns, W. (1985) Temperature-dependent influence of thiols upon Glutathione levels in Chinese Hamster Ovary cells at cytotoxic concentrations; *Cancer Res.* 45, 6219-6224.
- Ito, K., Inoue, S., Yamamoto, K. and Kawanishi, S., (1993) 8-Hydroxydeoxyguanosine formation at the 5' site of 5'-GG-3' sequences in double stranded DNA by UV radiation with riboflavin. *J. Biol. Chem.*, 268, 13221-13227.
- Jaiswal, M., Lipinski, L.J., Bohr, V.A., Mazur, S.J. (1998) Efficient *in vitro* repair of 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine by human cell extracts: involvement of multiple pathways. *Nucleic Acids Res*, 26(9), 2184-2191.
- Jayaraman, L., Prives, C. (1995) Activation of p53 sequence-specific DNA binding by short single strands of DNA requires the p53 C-terminus. *Cell*, 81, 1021-1029.
- Jenck, F., Moreau, J.-L., Bonetti, E.P., Martin, J.R., Haefely, W.E. (1992) Ro 19-8022, a Nonbenzodiazepine Partial Agonist at Benzodiazepine Receptors: Neuropharmacological Profile of a Potential Anxiolytic. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 262, 1121-1127.
- Jensen, T., Pedersen, S.S., Nielsen, C.H., Holby, N., Koch, C. (1987) The efficacy and safety of ciprofloxacin and ofloxacin in chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Chemother.*, 20, 585-594.
- Johnson, B.E., Gibbs, N.K.L., Ferguson, F. (1997) Quinolone antibiotic with potential to photosensitize skin tumorigenesis. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 37, 171-173.
- Jones, C.A., Huberman, E., Cunningham, M.L., Peak, M.J. (1987) Mutagenesis and cytotoxicity in human epithelial cells by far- and near-ultraviolet radiations: action spectra. *Radiation Res.*, 110, 244-254.
- Joshi, P.C. (1985) Comparison of the DNA-damaging property of photosensitized riboflavin via singlet oxygen (1O_2) and superoxide radical (O_2^-) mechanisms. *Tox. Letters*, 26, 211-217.
- Jungst, G., Mohr, R. (1987) Side effects of ofloxacin in clinical trials and in postmarketing surveillance. *Drugs*, 34 (Suppl 1), 144-149.
- Jurkiewicz, B.A., Buettner, G.R. (1996) *Photochem. Photobiol.*, 64, 918-935.
- Kaech, M., Lu, J., Strange, R., Ip, C., Ganther, H.E., Thompson, H.J. (1997) Differential induction of growth inducible genes by selenium compounds. *Biochem. Pharmacol.*, 53(7), 921-926.
- Kamiya, H., Miura, K., Ishikawa, H., Nishimura, S. and Ohtsuka, E. (1992) c-H-ras containing 8-hydroxyguanine at codon 12 induces point mutations at the modified and adjacent positions. *Cancer Res.*, 52, 3483-3485.
- Kamiya, H., Ueda, T., Ohgi, T., Matsukage, A., Kasai, H. (1995) Misincorporation of dAMP opposite 2-hydroxyadenine, an oxidative form of adenine. *Nucleic Acids Res.*, IN PRESS ???

- Kang, Y.-J., Enger, M.D. (1992) Buthionine sulfoximine-induced cytostasis does not correlate with glutathione depletion. *Am. J. Physiol.*, 262, 122-127.
- Kasai, H. (1997) Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutation Res.*, 387, 147-163.
- Kasai, H., Crain, P.F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Ootsuyama, A. and Tanooka, H. (1986) Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis*, 7, 1849-1851.
- Kastan, M.B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B. Craig, R.W. (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Mol. Cell. Biol.*, 51, 6304-6311.
- Kasten, U., Beyersmann, D., Dahm-Daphi, J., Hartwig, A. (1995) Sensitive nonradioactive detection of UV-induced cyclobutan pyrimidine dimers in intact mammalian cells. *Mutat. Res.*, 336, 143-152.
- Kawanishi, S., Inoue, S., Sano, S. and Aiba, H. (1986) Photodynamic guanine modification by hematoporphyrin is specific for single-stranded DNA with singlet oxygen as mediator. *J. Biol. Chem.*, 261, 6090-6095.
- Kazantsev, A., Sancer, A. (1995) Does the p53 up-regulated Gadd45 protein have a role in excision repair? *Nature*, 270(5238), 1003-1004.
- Kearsey, J.M., Shivij, M.K.K., Hall, P.A., Wood, R.D. (1995) Does the p53 up-regulated Gadd45 protein have a role in excision repair? *Nature*, 270, 1004-1005 .
- Keyse, S.M. Tyrrell, R.M. (1987) Rapidly occurring DNA excision repair events determine the biological expression of u.v.-induced damage in human cells. *Carcinogenesis*, 8(9), 1251-1256.
- Kibbey, M.C., Royce, L.S., Dym, M., Baum, B.J., Kleinman, H.K. (1992) Glandular-like morphogenesis of the human submandibular tumor cell line A253 on basement membrane components. *Exp. Cell. Res.*, 198(2), 343-351.
- Kielbassa, C. (1996) Die Bedeutung oxidativer DNA-Modifikationen für die Genotoxizität solarer Strahlung, Dissertation, Universität Würzburg.
- Kielbassa, C., Roza, L., Epe, B. (1997) Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis*, 18(4), 811-816.
- Kinley, J.S., Brunborg, G., Moan, J., Young, A.R. (1995) Detection of UVR-induced DNA damage in mouse epidermis *in vivo* using alkaline elution. *Photochem. Photobiol.*, 61, 149-158.
- Kinscherf, R., Claus, R. et al. (1998) Apoptosis caused by oxidized LDL is manganese superoxide and p53 dependent. *FASEB J.*, 12(6)
- Klaude, M., Gedik, C.M. Collins, A.R. (1995) DNA damage and repair after low doses of UV-C radiation: comparable rates of repair in rodent and human cells. *Int. J. Radiat. Biol.*, 67, 501-508.
- Klecak, G., Urbach, F., Urwyler, H. (1997) Fluoroquinolone antibacterials enhance UV-A-induced skin tumors. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 37(3), 174-181.
- Klein, J.C., Bleeker, M.J., Saris, C.P., Roelen, H.C.P.F., Brugghe, H.F. and Berns, A.J.M. (1992) Repair and replication of plasmids with side-specific 8-oxodG and 8-AAFdG residues in normal and repair deficient human cells. *Nucleic Acids Res.*, 20, 4437-4443.
- Klinedinst, D.K. and Drinkwater, N.R. (1992) Mutagenesis of apurinic sites in normal and ataxia teleangiectasia human lymphoblastoid cells. *Mol. Carcinogenesis*, 6, 32-42.
- Kochevar, I.E., Dunn, D.A. (1990) Photosensitized reactions of DNA: cleavage and addition. In: Morrison, H. (ed.) *Bioorganic Photochemistry*, Vol. 1, Wiley, New York, p. 273-316.
- Kohn, K.W., Erickson, L.C., Ewig, R.A.G., Friedman, C.A. (1976) Fractionation of DNA from mammalian cells by Alkaline Elution. *Biochemistry*, 15, 4629-4637.

- Kohn, K.W., Ewig, R.A.G. (1973) Alkaline elution analysis, a new approach to the study of DNA single-strand interruptions in cells. *Cancer Res.*, 33, 1849-1853.
- Korycka-Dahl, M., Richardson, T. (1980) Photodegradation of DNA with fluorescent light in the presence of riboflavin and photoprotection by flavin triplet-state quenchers. *Biochim. Biophys. Acta*, 610, 229-234.
- Kubbutat, M.H.G., Jones, S.N., Vousden, K.H. (1997) Regulation of p53 stability by mdm2. *Nature*, 387, 299-303.
- Kuerbitz, S.J., Plunkett, B.S., Walsh, W.V., Kastan, M.B. (1992) Wild-type p53 is a cell cycle checkpoint determinant following irradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 7491-7495.
- Kulich, W., Brugger, P., Klein, G. (1988) Zur Beurteilung des genotoxischen Risikos durch den Gyrasehemmer Ofloxacin mittels der Bestimmung von Schwesterchromatidaustauschraten. *Wien. Med. Wochenschr.*, 138(5), 107-109.
- Kurokawa, Y., Maekawa, A., Takahashi, M. and Hayashi, Y. (1990) Toxicity and carcinogenicity of potassium bromate-a new renal carcinogen. *Environm. Health Perspec.*, 87, 309-335.
- Kvam, E., Tyrrell, R.M. (1997) Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation. *Carcinogenesis*, 18(12), 2379-2384.
- Lafleur, M.V., Retel, J. (1993) Contrasting effects of SH-compounds on oxidative DNA damage: repair and increase of damage. *Mutat. Res.* 295(1), 1-10.
- Lane, D. (1992) p53, Guardian of the genome. *Nature*, 358, 15-16.
- Lane, D.P., Hall, P.A. (1997) MDM2 - arbiter of p53's destruction. *TIBS*, 22, 372-374.
- Langford, J., Fleming, J., Wu, L., Webster, G., Harrison, P.R. (1994) The selenium metabolite selenodiglutathione induces p53 and apoptosis: relevance to the chemopreventive effect of selenium? *Carcinogenesis*, 15(7), 1387-1392
- Laustriat, G. (1986) Molecular mechanisms of photosensitization. *Biochimie*, 68, 771-778.
- Laval, J., Jurando, J., Saparbaev, M., Sidorkina, O. (1998) Antimutagenic role of base-excision repair enzymes upon free radical-induced DNA damage. *Mutat. Res.*, 402(1-2), 93-102.
- Lawrence, C.W., Borde, A., Kanerjee, S.K., LeClerk, J.R. (1990) Mutation frequency and spectrum resulting from a single abasic site in single stranded vector. *Nucleic Acids Res.*, 18, 2153-2157.
- Lawrence, J.W., Darkin-Rattray, S., Xie, F., Neims, A.H., Rowe, T.C. (1993) 4-Quinolones cause a selective loss of mitochondrial DNA from mouse L1210 leukemia cells. *J. Cell. Biochem.*, 51(2), 165-174.
- Lawson, T., Birt, D.F. (1983) Enhancement of the repair of carcinogen-induced DNA damage in the hamster pancreas by dietary selenium. *Chem. Biol. Interact.* 45(1), 95-104.
- Leccia, M.T., Richard, M.J., Beani, J.C., Faure, H., Monjo, A.M., Cadet, J., Amblard, P., Favier, A. (1993) Protective effect of selenium and zinc on UV-A damage in human fibroblasts. *Photochem. Photobiol.*, 58(4), 548-553.
- Lee, P.C.C. and Rogers, M.A.J. (1987) Laser flash photokinetic studies of rose bengal sensitized photodynamic interactions of nucleotides and DNA. *Photochem. Photobiol.*, 45, 79-86.
- Leibovitz, B., Hu, M.L. and Tappel, A.L. (1990) Dietary supplements of vitamin E, β -carotene, coenzyme Q₁₀ and selenium protect tissues against lipidperoxidation in rat tissue slices. *J. Nutr.*, 120, 97-104.
- Leist, M., Raab, B., Maurer, S., Rosick, U., Brigelius-Flohe, R. (1996) Conventional cell culture media do not adequately supply cells with antioxidant and thus facilitate peroxide-induced genotoxicity. *Free Radic. Biol. Med.*, 21(3), 297-306.

- Lenton, K. J., Therriault, H., Fülöp, T., Payette, H., Wagner, J.R. (1999) Glutathione and ascorbate are negatively correlated with oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis*, 20(4), 607-613.
- Levin, J.D., Johnson, A.W., Demple, B. (1988) Homogeneous *Escherichia coli* endonuclease IV. Characterization of an enzyme that recognizes oxidative damage in DNA. *J. Biol. Chem.*, 263, 8066-8071.
- Li, G., Ho, V.C., Berean, K., Tron, V.A. (1995) Ultraviolet radiation induction of squamous cell carcinomas in p53 transgenic mice. *Cancer Res.*, 55, 2070-2074.
- Li, G., Ho, V.C., Mitchell, D.L., Trotter, M.J., Tron, V.A. (1997) Differentiation-dependent p53 regulation of nucleotide excision repair in keratinocytes. *Am J. Pathol.*, 150(4), 1457-1464.
- Li, G., Mitchell, D.L., Ho, V.C., Reed, J.C., Tron, V.A. (1996) Decreased DNA repair but normal apoptosis in ultraviolet-irradiated skin of p53-transgenic mice. *Am. J. Pathol.*, 148 (4), 1113-1123.
- Li, R., Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D., Stillman, B. (1994) Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature*, 371, 534-537.
- Lindahl, T. (1990) Repair of intrinsic DNA lesions. *Mutat. Res.*, 238, 305-311.
- Lippke, J.A., Gordon, L.K., Brash, D.E., Hanawalt, W.A. (1981) Distribution of UV light-induced damage in a specified sequence of human DNA: detection of alkaline sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 78, 3388-3392.
- Liu, M., Dhanwada, K.R., Birt, D.F., Hecht, S., Pelling, J.C., (1994) Increase in p53 protein half-life in mouse keratinocytes following UV-B irradiation. *Carcinogenesis*, 15(6), 1089-1092.
- Liu, M., Pelling, J.C. (1995) UV-B/A irradiation of mouse keratinocytes results in p53-mediated WAF1/CIP1 expression. *Oncogene*, 10, 1955-1960.
- Lloyd, R.S., Haidle, C.W., Robertson, D.L. (1978) Bleomycin-specific fragmentation of double-stranded DNA. *Biochemistry*, 17, 1890-1896.
- Loeb, L.A., Preston, B.D. (1986) Mutagenesis by apurinic/aprimidinic sites. *Annual Rev. Genet.*, 20, 201-230.
- Loft, S. and Poulsen, H.E. (1996) Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.*, 74, 297-312.
- Longstreth, J.D., de Gurijl, F.R., Takizawa, Y., van der Leun, J.C. (1991) In: *Human Health. UNEP Environmental Effects Panel Report*, 33-40.
- Lu, J., Jiang, C., Kaeck, M., Ganther, H., Ip, C., Thompson, H. (1995) Cellular and metabolic effects of triphenylselenonium chloride in a mammary cell culture model. *Carcinogenesis*, 16(3), 513-517.
- Lu, J., Kaeck, M., Jiang, C., Wilson, A.C., Thompson, H.J. (1994) Selenite induction of DNA strand breaks and apoptosis in mouse leuemic L1210 cells. *Biochem. Pharmacol.*, 47(9), 1531-1535.
- Lu, J., Pei, H., Ip, C., Lisk, D.J., Ganther, H. Thompson, H.J. (1996) Effect of an aqueous extract of selenium-enriched garlic on *in vitro* markers and *in vivo* efficacy in cancer prevention. *Carcinogenesis*, 17(9), 1903-1907.
- Mäkinen et al. (1997) *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 37, 182-187.
- Maltzman, W., Czyzyk, L. (1984) UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1689-1694.
- Markant, A., Rimbach, G., Krämer, K., Mayer, H. and Pallauf, J. (1995) Reaktive Sauerstoffradikale: Entstehung, Wirkung, Eliminierung. *PZ*, 140, 2313-2327.
- Marx, J.L. (1987) Oxygen free radicals linked to many diseases. *Science*, 235, 529-531.
- Mayer, D.G. (1987) Overview of toxicological studies, *Drugs*, 34 Suppl. 1, 150-153.

- McBride, T.J., Schneider, J.E., Floyd, R.A. and Loeb, L.A. (1992) Mutations induced by methylene blue plus light in single-stranded M13mp2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 6866-6870.
- McDonald III, E.R., Wu, G.S., Waldman, T., El-Eiry, W.S. (1996) Repair defect in p21/WAF1/CIP1 -/- human cancer cells. *Cancer Res.*, 56(10), 2250-2255.
- McKay, B.C., Francis, M.A., Rainbow, A.J. (1997) Wildtype p53 is required for heat shock and ultraviolet light enhanced repair of a damaged reporter gene. *Carcinogenesis*, 18(2), 245-249.
- McQueen, C.A., Way, B.M., Queener, S.M., Schluter, G., Williams, G.M. (1991) Study of potential *in vitro* and *in vivo* genotoxicity in hepatocytes of quinolone antibiotics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 111(2), 255-252.
- Medina, D.H., Lane, H.W., Tracey, M. (1983) Selenium and mouse mammary tumorigenesis: an investigation of possible mechanism. *Cancer Res.*, 43, 2460-2464.
- Mehta, A.K., Shank, R.P. (1995) Interaction of acecarnil, bretazenil, and RO 19-8022 with diazepam-sensitive and -insensitive benzodiazepine sites in the rat cerebellum and cerebral cortex. *Life Sci.*, 57(24), 2215-2222.
- Meister, A. & Anderson, M.E. (1983) Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.*, 52, 711-760.
- Meister, A. (1985) Glutamate, glutamine, glutathione and related compounds. Academic Press, New York.
- Meister, A. (1991) Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; applications in research and therapy. *Pharmacol. Ther.*, 51(2), 155-194.
- Mello-Filho, A.C., Meneghini, R., (1984) *In vivo* formation of single strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weiss-reaction; *Biochim. Biophys. Acta*, 781, 56-63.
- Michaels, M.L., Cruz, C., Grollman, A.P. and Miller, J.H. (1992) Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidative damaged form of guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 7022-7025.
- Mitchell, D.L. Jen, J., Cleaver, J.E. (1991) Relative induction of cyclobutane dimers and cytosine photohydrates in DNA irradiated *in vitro* and *in vivo* with ultraviolet-C and ultraviolet-B light. *Photochem. Photobiol.*, 54, 741-746.
- Mitchell, D.L. Nairn, R.S. (1989) The biology of the (6-4) photoproduct. *Photochem. Photobiol.*, 49, 805-819.
- Mitchell, D.L., Haibe, C.A., Clarkson, J.M. (1985) (6-4) photoproducts are removed from the DNA of UV-irradiated mammalian cells more efficiently than cyclobutane dimers. *Mutat. Res.*, 143, 109-112.
- Moan, J., Peak, M.J. (1989) Effects of UV radiation on cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 4, 21-34.
- Moles, J.P., Moyret, C., Guillot, B., Jeanteur, P., Guilgo, J.J., Theillet, C., Basset-Seguin, N. (1993) p53 gene mutations in human epithelial skin cancers. *Oncogene*, 8, 583-588.
- Moriya, M. (1993) Single-stranded shuttle phage for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted GC→TA transversions in simian kidney cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 1122-1126.
- Moriya, M., Ou, C., Bodepudi, V., Johnson, F., Takeshita, M., Grollmann, A.P. (1991) Site-specific mutagenesis using a gapped duplex vector: A study of translesion synthesis past 8-oxodeoxyguanosine in *E. coli*. *Mutation Res.*, 254, 281-288.
- Morris, G.F., Bischoff, J.R., Mathews, M.B. (1996) Transcriptional activation of the human proliferating-cell nuclear antigen promoter by p53. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 93(2): 895-899.
- Müller, A., Cadenas, E., Graf, P., Sies, H. (1984) *Biochem. Pharmacol.*, 33, 3235.
- Müller, A., Garbiel, H., Sies, H. (1985) *Biochem. Pharmacol.*, 34, 1185.
- Müller, E., Boiteux, S., Cunningham, R.P. and Epe, B. (1990) Enzymatic recognition of DNA modifications induced by singlet oxygen and photosensitizers. *Nucleic Acids Res.*, 18, 5969-5973.

- Mulligan, R.C., Berg, P. (1980) Expression of a bacterial gene in mammalian cells. *Science*, 209, 1422-1424.
- Mutschler, E. (1991) Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 6. Aufl., Wiss. Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 599-602.
- Nackerdien, Z., Rao, G., Cacciuto, M.A., Gajewski, E. and Dizdaroglu, M. (1992) Chemical nature of DNA-protein-cross-links produced in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of iron or copper ions. *Biochemistry*, 30, 4873-4879.
- Nakabeppu, Y., Yamashita, K., Sekiguchi, M. (1982) Purification and characterization of normal and mutant forms of T4 endonuclease V. *J. Biol. Chem.*, 257, 2556-2562.
- Nakajima, M., Kitazawa, M., Oba, K., Kitagawa, Y. and Toyoda, Y. (1989) Effect of route of administration in the micronucleus test with potassium bromate. *Mutat. Res.*, 223, 399-402.
- Nano, J.L., Czerucka, D., Menguy, F., Rampal, P. (1989) Effect of selenium on the growth of three human colon cancer cell lines. *Biol. Trace Elem. Res.*, 20(1-2), 31-43.
- Narayanaswami, V., Sies, H. (1990) Antioxidant activity of selen and related selenoorganic compounds in microsomal lipid peroxidation. *Free Radical Res. Commun.*, 10, 237-244.
- Nataray, A.J., Trent, J.C., Ananthaswamy, H.N. (1995) p53 gene mutations and photocarcinogenesis. *Photochem. Photobiol.*, 62, 218-230.
- Neto, J.B., Gentil, A., Cabral, R.E., Sarasin, A. (1992) Mutation spectrum of heat-induced abasic sites on a single-stranded shuttle vector replicated in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 267, 19718-19723.
- Neu, H.C. (1990) Quinolones as broad-spectrum agents. In: Grumplin, G.C. (ed.) *The 4-Quinolones*, Springer-Verlag, London, p. 1-13.
- Neumann, H.G. (1992) Entstehung und Behandlung von Tumoren. In: Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K., (eds.) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 6. Aufl., BI-Wiss.-Verlag, Mannheim, Leipzig, Wien, 722-723.
- Norwitzki-Grimm, S., Grimm, P. (1997) Selen: Ein essentielles Spurenelement findet Eingang in die Medizin. *Pharm. Zeitung.*, 10, 11-23.
- O'Connor, T.R., Graves, R.J., de Murcia, G., Castaing, B., Laval, J. (1993) Fpg protein of *Escherichia coli* is a zinc finger protein whose cysteine residues have a structural and/or functional role. *J. Biol. Chem.*, 268(12), 9063-9070.
- Obersler, P., Hloch, P., Ramsperger, U., Stahl, H. (1993) p53-catalyzed annealing of complementary single-stranded nucleic acids. *EMBO J.*, 12 (6), 2389-2396.
- Ochi, T., et al. (1988) Glutathione and metallothionein as cellular defense against cadmium toxicity in cultures chinese hamster cells. *Chem. Biol. Interactions*, 65, 1-14.
- Ogawa, T., Higashi, S., Kawarda, Y. and Mizumoto, R. (1995) Role of reactive oxygen in synthetic estrogen induction of hepatocellular carcinomas in rats and preventive effects of vitamins. *Carcinogenesis*, 16, 831-836.
- OhUigin, C., McDonnel, D.J., Kelly, J.M. and von der Putten, J.M. (1987) Methylene blue photosensitized strand cleavage of DNA: effects of dye binding and oxygen. *Nucl. Acids Res.*, 15, 7411-7427.
- Owens, C.W.I., Belcher, R.V. (1965) A colorimetric micro-method for the determination of glutathione; *Biochem J.* 94, 705-711.
- Palombo, F., Dogliotti, E. (1989) Construction of an EBV-derived shuttle vector for studying the influence of transcription on mutagenesis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1009, 251-256.
- Pan, Z.-Q., Reardon, J.T., Li, L., Flores-Rozas, H., Legerski, R., Sancar, A., Hurwitz, J. (1995) Inhibition of nucleotide excision repair by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. *J. Biol. Chem.*, 270 (37), 22008-22016.

- Parnham, M.J., Leyck, S. Graf, E., Dowling, E.J., Blake, D.R. (1991) The pharmacology of ebselen. *Agents and Actions*, 32, 4-9.
- Patterson, M.S., Madsen, S.J., Wilson, B.S. (1990) Experimental tests of the feasibility of singlet oxygen luminescence monitoring *in vivo* during photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 5, 69-84.
- Pence, B.C. (1991) Dietary selenium and antioxidant status: toxic effects of 1,2-dimethylhydrazine in rats. *J Nutr.*, 121, 138-144.
- Pence, B.C., Delver, E., Dunn, D.M. (1994) Effect of dietary selenium on UV-B-induced skin carcinogenesis and epidermal antioxidant status. *J. Invest. Dermatol.*, 102, 759-761.
- Perceall, W.E., Mukhopadhyay, T., Goldberg, L.H., Ananthaswamy, H.N. (1991) Mutations in *p53* tumor suppressor gene in human cutaneous squamous cell carcinomas. *Mol. Carcinog.*, 4, 445-449.
- Perry, M.E., Piette, J., Zawadzki, J.A., Harvey, D., Levine, A.J. (1993) The *mdm-2* gene is induced in response to UV light in a *p53*-dependent manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 11623-11627.
- Pflaum, M. (1996) Oxidative DNA-Modifikationen durch langwelliges UV-Licht und sichtbares Licht
Dissertation, Universität Würzburg.
- Pflaum, M., Boiteux, S. and Epe, B. (1994) Visible light generates oxidative DNA base modifications in high excess of strand breaks in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 15, 297-300.
- Pflaum, M., Will, O. and Epe, B. (1997) Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis*, 18, 2225-2231.
- Pflaum, M., Will, O., Mahler, H.-C., and Epe, B. (1998) DNA oxidation products determined with repair endonucleases in mammalian cells: types, basal levels and influence of cell proliferation. *Free Rad. Res.*, 29, 585-594.
- Philips, B.J., James, T.E.B and Anderson, D. (1984) Genetic damage to CHO-cells exposed to enzymically generated active oxygen species. *Mutat. Res.*, 126, 265-271.
- Piette, J. (1991) Biological consequences associated with DNA oxidation mediated by singlet oxygen. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 11, 241-260.
- Piette, J., Calberg-Bacq, C.M. and van de Vorst, A. (1981) Alteration of guanine residues during proflavine mediated photosensitization of DNA. *Photochem. Photobiol.*, 33, 325-333.
- Piette, J., Merviolle-Louis, M.-P., Decuyper, J. (1986) Damages induced in nucleic acids by photosensitization. *Photochem. Photobiol.*, 44, 793-802.
- Pino, A., Marua, A., Villa, F., Masciangelo, L. (1991) Evaluation of DNA damage induced by norfloxacin in liver and kidney of adult rats and in fetal tissues after transplacental exposure. *Mutat. Res.*, 264(2), 81-85.
- Poot, M., Teubert, H., Rabinovitch, P.S., Kavanagh, T.J. (1995) De novo synthesis of glutathione is required for both entry and progression through the cell cycle. *J. Cell. Phys.*, 163, 555-560.
- Prasad, M.P., Mukundan, M.A., Krishnaswamy, K. (1995) Micronuclei and carcinogen DNA adducts as intermediate end points in nutrient intervention trial of precancerous lesions in the oral cavity. *Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.*, 31B(3), 155-159.
- Prost, S., Bellamy, C.O., Clarke, A.R., Wyllie, A.H., Harrison, D.J. (1998) *p53*-independent DNA repair and cell cycle arrest in embryonic stem cells. *FEBS Lett.*, 425(3), 499-504.
- Prost, S., Bellamy, C.O., Cunningham, D.S., Harrison, D.J. (1998a) Altered DNA repair and dysregulation of *p53* in IRF-1 null hepatocytes. *FASEB J.*, 12(2), 181-188.
- Pryor, W.A. (1988) What is the hydroxyl radical the only radical that commonly adds to DNA? Hypothesis: it has a rare combination of high electrophilicity, high thermichemical reactivity, and a mode of production that can occur near DNA. *Free Radic. Biol. Med.*, 4, 219-223.

- Przybilla, B., Georgii, A., Bergner, T., Ring, J. (1990) Demonstration of quinolone phototoxicity *in vitro*. *Dermatologica*, 181(2), 98-103.
- Purmal, A.A., Kow, Y.W. and Wallace, S.S. (1994) Major oxidative products of cytosine, 5-hydroxycytosine and 5-hydroxyuracil, exhibit sequence context-dependent mispairing *in vitro*. *Nucleic Acids Res.*, 22, 72-78.
- Radicella, J. P., Dherin, C., Desmaze, C., Fox, M. S. and Boiteux, S. (1997) Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 8010-8015.
- Radman, M. (1976) An endonuclease from *Escherichia coli* that introduces single polynucleotide chain scission in ultraviolet-irradiated DNA. *J. Biol. Chem.*, 251, 1438-1445.
- Rady, P., Scinicariello, F., Wagner, R.F., Tying, S.K. (1992) p53 mutations in basal cell carcinomas. *Cancer Res.*, 52, 3804-3806.
- Rafferty et al. (1996) Induction of murine O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase in response to ionising radiation is p53 gene dose dependent. *Oncogene*, 12(3), 693-697.
- Ramakrishnan, N., Clay, M.E., Xue, L.-Y., Evans, H.H., Rodriguez-Antunez, A., Oleinick, N.L. (1988) Induction of DNA-protein cross-links in Chinese hamster cells by the photodynamic action of chloroaluminium phthalocyanin and visible light. *Photochem. Photobiol.*, 48, 297-303.
- Ravanat, J.-L., Berger, M., Bucho, G.W., Benard, J.-F., van Lier, J. and Cadet, J. (1992) Photooxidation sensibilisée de la deoxy-2'-guanosine par des phtalocyanines et naphtalocyanines. Détermination de l'importance des mécanismes de type I et de type II. *J. Chim. Phys.*, 88, 1069-1076.
- Ravanat, J.-L., Turesky, R.J., Gremaud, F., Trudel, L.J. and Stadler, R. (1995) Determination of 8-oxoguanine in DNA by gas chromatography - mass spectrometry and HPLC - electrochemical detection: overestimation of the background level of the oxidized base by the gas chromatography - mass spectrometry assay. *Clinical Research in Toxicology*, 8, 1039-1045.
- Reavy, H.J., Traynor, N.J., Gibbs, N.K. (1997) Photogenotoxicity of skin phototumorigenic fluoroquinolone antibiotics detected using the comet assay. *Photochem. Photobiol.*, 66(3), 368-373.
- Reiss, M., Brash, D.E., Munoz-Antonia, T., Simon, J.A., Ziegler, A., Vellucci, V.F., Zhou, Z.L. (1992) Status of the p53 tumor suppressor gene in human squamous carcinoma cell lines. *Oncogene*, 4(8-9), 349-357.
- Renzing, J., Hansen, S., Lane, D. (1996) Oxidative stress is involved in the UV activation of p53. *J. Cell. Sci.*, 109(5), 1105-1112.
- Rétel, J., Hoebbee, B., Braun, J.E.F., Lutgerink, J.T., van den Acker, E., Wanamarta, A.H., Joenje, H. and Lafleur, M.V.M. (1993) Mutational specificity of oxidative DNA damage. *Mutation Res.*, 299, 165-182.
- Revesz, L., Edgren, M. (1984) Glutathione-dependent yield and repair of single-strand DNA breaks in irradiated cells. *Br. J. Cancer Suppl.* 6, 55-60.
- Richard, M.J., Guiraud, P., Arnaud, J. Cadi, R. Monjo, A.M., Richard, A., Amblard, P., Favier, A. (1990) Pouvoir antioxydant d'une eau thermale séléninée sur des fibroblasts cutanés humains en culture. *Nouv. Dermatol.*, 9, 1-7.
- Richardson, C.C., Kornberg, A. (1964a) A deoxyribonucleic acid phosphatase-exonuclease from *Escherichia coli*: I. Purification and characterization of the phosphatase activity. *J. Biol. Chem.*, 239, 242-250.
- Richardson, C.C., Lehman, I.R., Kornberg, A. (1964) A deoxyribonucleic acid phosphatase-exonuclease from *Escherichia coli*; II. Characterization of the exonuclease activity. *J. Biol. Chem.*, 239, 251-258.
- Richardson, K.K., Richardson, F.C., Crosby, R.M., Swenberg, J.A., Skopek, T.R. (1987) DNA base changes and alkylation following *in vivo* exposure of *Escherichia coli* to N-methyl-N-nitrosourea or N-ethyl-N-nitrosourea. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 84, 344-348.

- Richter, C., Park, J.W., Ames, B.N. (1988) Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 6465-6467.
- Robertson, D.G., Epling, G.A., Kiely, J.S., Bailey, D.L., Song, B. (1991) Mechanistic studies of the phototoxic potential of PD 117596, a quinolone antibacterial compound. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 111, 221-232.
- Rogers, S.G., Weiss, B. (1980) Cloning of the exonuclease III gene of *Escherichia coli*. *Gene*, 11, 187-195.
- Rosen, G.M., Pou, S., Ramos, C.L., Cohen, M.S., Britigan, B.E. (1995) Free radicals and phagocytic cells. *FASEB J.*, 9(2), 200-209.
- Rosenstein, B.S., Mitchell, D.L. (1991) The repair of DNA damage induced in normal human skin fibroblasts exposed to simulated sunlight. *Radiat. Res.*, 126, 338-342.
- Rotruck, J.T., et al. (1973) Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*, 179, 588.
- Russell, G.R., Nader, C.J., Patrick, E.J. (1980) Induction of DNA repair by some selenium compounds. *Cancer Lett.*, 10(1), 75-81.
- Sai, K., Umemura, T., Takagi, A., Hasegawa, R. and Kurokawa, Y. (1992) The protective role of glutathione, cysteine and vitamin C against oxidative DNA damage induced in rat kidney by potassium bromate. *Jpn. J. Cancer Res.*, 83, 45-51.
- Salditt M., Braunstein S.N., Camerini-Otero R.D., Franklin R.M. (1972) Structure and synthesis of a lipid containing bacteriophage. Improved techniques for the purifications of bacteriophage PM2; *Virology* 48, 259-262.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Second Edition, Band 3, 6.1-6.19.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989a) *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, Second Edition, Band 3, 16.13 ff.
- Sancar, A. (1994) Mechanisms of DNA excision repair. *Science*, 266, 1954-1956.
- Sancar, A. (1995) DNA repair in humans. *Annu. Rev. Genetics*, 29, 69-106.
- Sancar, A. (1996) DNA Excision Repair. *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 43-81.
- Sancar, A., Rupp, W.D. (1983) A novel repair enzyme: uvrABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts in a DNA strand on both sides of the damaged region. *Cell*, 33, 249-260.
- Sanchez, Y., Elledge, D.J. (1995) Stopped for repairs. *Bioessays.*, 17(6), 545-548.
- Sanders, C.C. (1992) Review of preclinical studies with ofloxacin. *Clin. Infect. Dis.* 14(2), 526-538.
- Sandstrom, B.E., Carlsson, J., Marklund, S.L. (1989) Selenite-induced variation in glutathione peroxidase activity of three mammalian cell lines: no effect on radiation-induced cell killing or DNA strand breakage. *Radiat. Res.*, 117(2), 318-325.
- Sandstrom, B.E., Grankvist, K., Marklund, S.L. (1989a) Selenite-induced increase in glutathione peroxidase activity protects human cells from hydrogen peroxide-induced DNA damage, but not from damage inflicted by ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.*, 56(5), 837-841.
- Sandstrom, B.E., Marklund, S.L. (1990) Effects of variation in glutathione peroxidase activity on DNA damage and cell survival in human cells exposed to hydrogen peroxide and t-butyl hydroperoxide. *Biochem. J.*, 271(1), 17-23.
- Saniabadi, A.R., Wada, K., Umemura, K., Sakuma, S., Nakashima, M. (1996) Impairment of phagocytic cell respiratory burst by UV-A in the presence of fluoroquinolones: an oxygen-dependent phototoxic damage to cell surface microvilli. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 33(2), 137-142.

- Saran, M. and Bors, W. (1989) Oxygen radicals acting as chemical messengers: a hypothesis. *Free Rad. Res. Commun.*, 7, 213-220.
- Sato, N., Iwata, S., Nakamura, K., Hori, T., Mori, K., Yodoi, J. (1995) Thiol-mediated redox regulation of apoptosis. Possible roles of cellular thiols other than glutathione in T cell apoptosis. *J. Immunol.*, 154(7), 3194-3203.
- Scharffetter-Kochanek, K., Wlaschek, M., Brenneisen, P., Schauen, M., Blandschun, R., Wenk, J. (1997) UV-induced reactive oxygen species in photocarcinogenesis and photoaging. *Biol. Chem.*, 378, 1247-1257.
- Scherer, S.J., Welter, C., Zang, K.-D., Dooley, S. (1996) Specific *in vitro* binding of p53 to the promoter region of the human mismatch repair gene hMSH2. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 221(3), 722-728.
- Schieberle, P., Grosch, W. (1981) Decomposition of linoleic acid hydroperoxides. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 173, 192-198.
- Schirmacher, V. (Hrsg.) (1990) Krebs-Tumoren, Zellen, Gene. Spektrum der Wissenschaft, Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg.
- Schmidt, K.H., Bayer, W. (1988) Selen-aktueller wissenschaftlicher Erkenntnisstand. *VitaMinSpur* 3 (Suppl.), 1-20.
- Schmuck, G., Lieb, G., Wild, D., Schiffmann, D. and Henschler, D. (1988) Characterization of an *in vitro* micronucleus assay with Syrian hamster embryo fibroblasts. *Mutat. Res.* 203, 397-404.
- Schneider, J.E., Price, S., Maidt, L., Gutteridge, J.M.C. and Floyd, R.A. (1990) Methylene blue plus light mediates 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation in DNA preferentially over strand breakage. *Nucleic Acids Res.*, 18, 631-635.
- Seay, T.M., Peretsman, S.J., Dixon, P.S. (1996) Inhibition of human transitional cell carcinoma *in vitro* proliferation by fluoroquinolone antibiotics. *J. Urol.*, 155(2), 757-762.
- Serrano, M., Hannon, G.J., Beach, D. (1993) *Nature*, 366, 704.
- Sheikh, M.S., Chen, Y.Q., Smith, M.L., Fornace, A.J. Jr. (1997) Role of p21/Waf1/Cip1/Sdi1 in cell death and DNA repair as studied using a tetracycline-inducible system in p53-deficient cells. *Oncogene*, 14(15), 1875-1882.
- Shen, H.M. Yang, C.F., Ong, C.N. (1999) Sodium selenite-induced oxidative stress and apoptosis in human hepatoma HepG2 cells. *Int. J. Cancer*, 81(5), 820-828.
- Shibutani, S., Takeshita, M. and Grollman, A.P. (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature (London)*, 349, 431-434.
- Shimada, H., Itoh, S. (1996) Effects of new quinolone antibacterial agents on mammalian chromosomes. *J. Toxicol. Environ. Health.*, 47(2), 115-123.
- Shivij, M.K., Grey, S.J., Strausfeld, U.P., Wood, R.D., Blow, J.J. (1994) Cip1 inhibits DNA replication but not PCNA-dependent nucleotide excision-repair. *Curr. Biol.*, 4(12), 1062-1068.
- Siegers, C.P., Hubscher, W., Younes, M. (1982) Glutathione-S-transferase and GSH-peroxidase activities during the state of GSH-depletion leading to lipid peroxidation in rat liver. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 37(2), 163-169.
- Siems, W.G., Krämer, K., Grune, T. (1996) Zur Chemie und Biologie des Glutathionsystems: ein Überblick. *Pharm. Zeitung*, 45, 4239-4248.
- Siems, W.G., Krämer, K., Grune, T. (1996b) Störungen im Glutathionsystem und klinische Konsequenzen. *Pharm. Zeitung*, 46, 4343-4352.
- Sies, H. (1986) Biochemie des oxidativen Stress. *Angew. Chem.*, 98, 1061-1075.

- Sies, H. (1992) Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. *Free Radical Biol. Med.*, 14, 313-323.
- Sies, H. (1993) Damage to plasmid DNA by singlet oxygen and its protection. *Mutation Res.*, 299, 183-191.
- Sies, H. (1994) Ebselen: A glutathione peroxidase mimic. In: *Methods in Enzymology*, 234, 476-482. Academic Press.
- Sies, H. and Menck, C.F.M. (1992) Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutation Res.*, 275, 367-375.
- Skibba, J.L., Powers, R.H., Stadnika, A., Cullinane, D.W., Almagra, U.A. and Kalbfleisch, J.H. (1991) Oxidative stress is a precursor to the irreversible hepatocellular injury caused by hyperthermia. *Int. J. Hypertherm.*, 7, 749-761.
- Smith, C.R. (1987) The adverse effects of fluoroquinolones. *J. Antimicrob. Chemother.*, 19, 709-712.
- Smith, M.L., Chen, I.T., Zhan, Q., Bae, I. Chen, C.Y., Gilmer, T.M., Kastan, M.B., O'Connor, P.M., Fornace, A.J. Jr. (1994) Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science*, 266(5189), 1376-1380.
- Smith, M.L., Chen, I.T., Zhan, Q., O'Connor, P.M., Fornace, A. Jr. (1995) Involvement of the p53 tumor suppressor in repair of UV-type DNA damage. *Oncogene*, 10(6), 1053-1059.
- Smith, M.L., Kontny, H.U., Zhan, Q., Sreenath, A., O'Connor, P.M., G, A.J. Jr. (1996) Antisense GADD45 expression results in decreased DNA repair and sensitizes cells to u.v.-irradiation or cisplatin. *Oncogene*, 13(10), 2255-2263.
- Snyder, R.D. (1987) Effects of sodium selenite on DNA and carcinogen-induced DNA repair in human diploid fibroblasts. *Cancer Lett.*, 34(1), 73-81.
- Southorn, P.A. and Powis, G. (1988) Free radicals in medicine. I. Chemical nature and biological reactions. *Mayo. Clin. Proc.*, 63, 381-389.
- Spallholz, J.E. (1994) On the nature of selenium toxicity and carcinostatic activity. *Free Radic. Biol. Med.*, 17, 45-66.
- Speit, G., Hochsattel, R. and Vogel, W. (1984) Contribution of DNA single strand breaks to the formation of chromosome aberration and SCEs. *Basic Life Sci.*, 229-244.
- Srere, P. Kosicki, G.W., Lumry, R. (1961) Isotope rate effects with D₂O in several enzyme systems; *Biochem. Biophys. Acta*, 50, 184-185.
- Stahlmann, R. (1990) Safety profile of the quinolones. *J. Antimicro. Chemother. D*, 26, 31-44.
- Stahlmann, R., Lode, H. (1998) Nebenwirkungen der neueren Fluorochinolone. *Arzneimitteltherapie*, 12, 385-394.
- Stahlmann, R., Lode, H. (1998a) Safety overview. Toxicity, adverse effects, and drug interactions. In Andriole V. (ed.) *The Quinolones*, 2nd ed. Academic Press, 369-415.
- Statistisches Bundesamt (1997) Todesursachen in Deutschland 1997. *Fachserie 12: Gesundheitswesen*, Reihe 4, 26-28.
- Stewart, M.S., Cameron, G.S., Pence, B.C. (1996) Antioxidant nutrients protect against UV-B-induced oxidative damage to DNA of mouse keratinocytes in culture. *J. Invest. Dermatol.*, 106(5), 1086-1089.
- Stewart, M.S., Spallholz, J.E., Neldner, K.H., Pence, B.C. (1999) Selenium compounds have disparate abilities to impose oxidative stress and induce apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 26 (1/2), 42-48.
- Sturrock, J.E. and Nunn, J.F., (1978) Chromosomal damage and mutations after exposure of chinese hamster cells to high concentration of oxygen. *Mutation Res.*, 57, 27-33.

- Sugiyama, M., Ando, A., Furuno, A., Furlong, N.B., Hidaka, T., Ogura, R. (1987) Effects of vitamin E, vitamin B2 and selenite on DNA single strand breaks induced by sodium chromate (IV). *Cancer Lett.*, 38(1-2), 1-7.
- Sunde, R.A. (1990) Molecular biology of selenoproteins. *Annu. Rev. Nutr.*, 10, 451-474.
- Sutton, H., Winterbourn, C.C. (1989) On the participation of higher oxidation states of the iron and copper in fenotn reactions. *Free Rad. Med. Biol.*, 6, 53-60.
- Tchou, J., Bodepudi, V., Shibutani, S., Antoshechkin, I., Miller, J. Grollman, A.P., Johnson, F. (1994) Substrate specificity of Fpg protein. Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA. *J. Biol. Chem.*, 269, 15318-15324.
- Tchou, J., Grollman, A.P. (1995) The catalytic mechanism of Fpg protein. Evidence for a Schiff base intermediate and amino terminus localization of the catalytic site. *J. Biol. Chem.*, 270(19), 11671-11677.
- Tempel, K., Ignatius, A. (1992) Effect of gyrase inhibitors on some eukaryotic short-term test systems. Dnase I *in vitro* nucleic acid sythesis and DNA repair in primary cultures of chicken embryo and rat cells. *Arzneimittelforschung*, 42(8), 1031-1036.
- Thody, A.J. Higgings, E.M., Wakamatsu, K., Shosuke, I., Burchill, S.A., Marks, J.M. (1991) Pheomelanin as well as eumelanin is present in human epidermid. *J. Invest. Dermatol.*, 97, 340-344.
- Tindall, K.R. and Stankowski Jr., L.F. (1989) Molekular analysis of spontaneous mutations at the *gpt* locus in Chinese hamster ovary (AS52) cells. *Mutation Res.*, 220, 241-253.
- Tindall, K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff, R. and Hsie, A.W. (1984) Detection of deletion mutations in pSV2*gpt*-transformed cell. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 1411-1415.
- Tindall, K.R., Stankowski Jr., L.F., Machanoff, R. and Hsie, A.W. (1986) Analyses of mutation in pSV2*gpt*-transformed CHO-cells. *Mutation Res.*, 160, 121-131.
- Townbin, H., Staehlein, T. Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 76, 4350-4354.
- Tron, V.A., Trotter, M.J., Ishikawa, T., Ho, V.C., Li, G. (1998) p53-dependent regulation of nucleotide excision repair in murine epidermis *in vivo*. *J. Cutan Med Surg.*, 3(1), 16-20.
- Trosko, J.E., Chu, E.H.Y., Carrier, W.L. (1965) Induction of thymine dimers in ultraviolet-irradiated mammalian cells. *Radiat. Res.*, 24, 669-672.
- Tudek, B., Laval, J. and Boiteux, S. (1992) Biological properties of imidazol ring-opened N7-methylguanine in M13mp18 phage DNA. *Nucleic Acids Res.*, 20, 3079-3084.
- Turrens, J.F., Giulivi, C. and Boveris, A. (1986) Increased spontaneous chemiluminescence from liver homogenates and isolated hepatocytes upon inhibition of O₂⁻ and H₂O₂ utilization. *Free Rad. Biol. Med.*, 2, 135-140.
- Tyrrell, R.M., Keyse, S.M. (1990) The interaction of UV-A radiation with cultured cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 4, 349-361.
- Tyrrell, R.M., Pidoux, M. (1986) Endogenous glutathion protects human skin fibroblasts against the cytotoxic action of both UV-B, UV-A and near visible radiations. *Photochem. Photobiol.*, 44, 561-564.
- Tyrrell, R.M., Pidoux, M. (1987) Action spectra for human skin cells: estimates of the relative cytotoxicity of the middle ultraviolet, near ultraviolet and violet regions of sunlight on epidermal keratinocytes. *Cancer Res.*, 47, 1825-1829.
- Udovicic, L., Mark, F., Bothe, E. (1996) Single-strand breaks in double-stranded DNA irradiated in anoxiv solution: contribution of *tert*-butanol radicals, *Radiat. Res.*, 146(2), 198-205.

- Uggla, A.H. and Sundell-Bergmann, S. (1990) The induction and repair of DNA damage detected by the DNA precipitation assay in Chinese hamster ovary cells treated with acridine orange + visible light, *Mutation Res.*, 236, 119-127.
- Umezawa, N., Arakane, K., Ryu, A., Mashiko, S., Hirobe, M., Nagano, T. (1997) Participation of reactive oxygen species in phototoxicity induced by quinolone antibacterial agent. *Arch. Biochem. Biophys.*, 342(2): 275-281.
- Urbach, F (1982) Photocarcinogenesis. In: Regan, J.D., Parrish, J.A. (eds.), *The Science of Photomedicine*, Plenum, New York, p. 261-292.
- Ursini, F., Maiorino, M., Gregolin, C. (1985) The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *Biochim. Biophys. Acta.*, 839, 62-67.
- Ursini, F. et al. (1989) Microsomal lipid peroxidation: Mechanism of initiation. The role of iron and iron chelators. *Free Rad. Biol. Med.*, 6, 31-36.
- Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Floge, R., Aumann, K.D., Roveri, A., Schomburg, D., Flohe, L. (1995) *Meth. In Enzymol.*, 252, 38-53.
- Vaca, C.E., Wilhelm, J., Harms-Ringdahl, M. (1988) Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. *Mutation Res.*, 195, 137-149.
- VanHouten, B., Gamper, H., Hearst, J.E., Sancar, A. (1988) Analysis of sequential steps of nucleotide excision repair in *Escherichia coli* using synthetic substrates containing single psoralen adducts. *J. Biol. Chem.*, 263, 16553-16560.
- Veda, K., Kobayashi, S., Morita, Komano, T. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, 824, 341-348.
- Vile, G.F. (1997) Active oxygen species mediate the solar ultraviolet radiation-dependent increase in the tumour suppressor protein p53 in human skin fibroblasts. *FEBS Lett.*, 412(1), 70-74.
- Von Sonntag, C. (1987) The chemical basis of radiation biology. Taylor & Francis, London.
- Wada, K. Saniabadi, A.R., Umemura, K., Takiguchi, Y., Nakashima, M. (1994) UV-dependent quinolone-induced human erythrocyte membrane lipid peroxidation: studies on the phototoxicity of Y-26611, a new quinolone derivative. *Pharmacol. Toxicol.*, 74(4-5), 240-243.
- Wagai, N., Tawara, K. (1991) Important role of oxygen metabolites in quinolone antibacterial agent-induced cutaneous phototoxicity in mice. *Arch. Toxicol.*, 65(6), 495-499.
- Wagai, N., Tawara, K. (1991a) Quinolone antibacterial-agent-induced cutaneous phototoxicity: ear swelling reactions in Balb/c mice. *Toxicol. Lett.*, 58(2), 215-223.
- Wagai, N., Tawara, K. (1992) Possible direct role of reactive oxygens in the cause of cutaneous phototoxicity induced by five quinolones in mice. *Arch. Toxicol.*, 66(6), 392-397.
- Wagai, N., Tawara, K. (1992a) Possible reasons for differences in phototoxic potential of a 5 quinolone antibacterial agents: generation of toxic oxygen. *Free Radic. Res. Commun.*, 17(6), 387-398.
- Wagner, J.R., Hu, C.C. and Ames, B.N. (1992) Endogenous oxidative damage of deoxycytidine in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 3380-3384.
- Wagner, J.R., Motchnik, P.A., Stocker, R., Sies, H. and Ames, B.N. (1993) The oxidation of blood plasma and low density lipoprotein components by chemically generated singlet oxygen. *J. Biol. Chem.*, 268, 18502-18506.
- Waldman, T., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1995) p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res.*, 55, 5187-5190.
- Wallace, S.S. (1988) AP endonucleases and DNA glycosylases that recognize oxidative DNA damage. *Environm. Molec. Mutagen.*, 12, 431-477.

- Wallace, S.S., Ide, H., Kow, Y.W., Laspia, M.F., Melamede, R.J., Petrullo, L.A. and LeClerc, E. (1988) in: Friedberg, E.C. and Hanawalt, P.C. (eds.) *Mechanisms and consequences of DNA damage processing*, Alan R. Liss, New York, 151-157.
- Wang, X.W., Forrester, K., Yeh, H., Feitelson, M.A., Gu, J., Harris, C.C. (1994) Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 91, 2230-2234.
- Wang, X.W., Yeh, H., Schaeffer, L. et al. (1995a) p53 modulation of TFIIH-associated nucleotide excision repair activity. *Nature Genet.*, 10, 188-195.
- Wang, Y.L., Ho, Y.S., Lo, M.J., and Lin, J.K. (1995) Oxidative modification of DNA bases in rat liver and lung during chemical carcinogenesis and aging. *Chem. Biol. Interact.*, 94, 135-145.
- Wasserman, H.H. and Murray, R.W. (1979) Singlet oxygen. New York, Academic Press.
- Wei, Q., Matanoski, G.M., Farmer, E.R., Hedayati, M.A., Grossman, L. (1995) DNA repair capacity for ultraviolet light-induced damage is reduced in peripheral lymphocytes from patients with basal cell carcinoma. *J. Invest. Dermatol.*, 104, 933-936.
- Weis, M., Kass, G.E., Orrenius, S. (1994) Further characterization of the events involved in mitochondrial Ca^{2+} release and pore information by prooxidants. *Biochem. Pharmacol.*, 47, 2147-2156.
- Weiss, B. (1976) Endonuclease II of *Escherichia coli* is exonuclease III. *J. Biol. Chem.*, 251, 1896-1901.
- Wells, R.L., Han, A. (1984) Action spectra for killing and mutation of Chinese Hamster cells exposed to mid- and near-ultraviolet monochromatic light. *Mut. Res.*, 129, 251-258.
- Wendel, A., Fausel, M., Safayhi, H. Tiegs, G., Otter, R. (1984) *Biochem. Pharmacol.*, 33, 3241.
- Wertz, I.E., Hanley, M.R. (1996) Diverse molecular provocation of programmed cell death. *TIBS*, 21, 359-364.
- Whiting, R.F., Stich, H.F. (1980) Unscheduled DNA synthesis and chromosome aberrations induced by inorganic and organic selenium compounds in the presence of glutathione. *Mutat. Res.*, 78(2), 159-169.
- Will, O. (1995) Untersuchung zellulärer DNA-Schäden induziert durch [R]-1-[(Chloro-4-oxo-3phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl-carbonyl)-2-pyrrolidinmethanol (Ro 19-8022) in Gegenwart von Licht und deren Charakterisierung mit Hilfe von Reparaturenukleasen. Diplomarbeit, Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- Will, O. (1999) Steady-State-Level oxidativer DNA-Modifikationen in Säugerzellen und ihre Beeinflussbarkeit. Dissertation, Universität Mainz.
- Will, O., Gocke, E., Eckert, I., Schulz, I., Pflaum, M., Mahler, H.C. and Epe, B. (1999a) Oxidative DNA damage and mutations induced by a polar photosensitizer, Ro 19-8022. *Mutation Research*, 435 (1), 89-101..
- Will, O., Mahler, H.C., Arrigo, A.P. and Epe, B. (1999) Influence of glutathione levels and heat-shock on the steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 20, 333-337.
- Wilson, A.C., Thompson, H.J., Schedin, P.J., Gibson, N.W., Ganther, H.E. (1992) Effect of methylated form of selenium on cell viability and the induction of DNA strand breakage. *Biochem. Pharmacol.*, 43(5), 1137-1141.
- Wood, M.L., Dizdaroglu, M., Gajewski, E. and Essigmann, J.M. (1990) Mechanistic studies of ionizing radiation and oxidative mutagenesis: genetic effects of a single 8-hydroxyguanine (7-hydro-8-oxoguanine) residue inserted at a unique site in a viral genome. *Biochemistry*, 29, 7024-7032.
- Wood, R.D., Esteve, A., Morningstar, M.L., Kuziemko, G.M. and Essigmann, J.M. (1992) Genetic effects of oxidative DNA damage: comparative mutagenesis of 7,8-dihydro-8-guanine and 7,8-dihydro-8-oxoadenine in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.*, 20, 6023-6032.
- Woodworth, C.D., Wang, H., Simpson, S., Alvarez-Salas, L.M., Notario, V. (1993) *Cell Growth Differ.*, 4, 367-376.

- Wu, L., Levine, A.J. (1997) Differential regulation of the p21/waf-1 and mdm2 genes after high dose UV irradiation: p53-dependent and p53-independent regulation of the mdm2 gene. *Mol. Med.*, 3(7), 441-451.
- Wu, X., Bayle, J.H., Olson, D., Levine, A.J. (1993) The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev.*, 7(7A), 1126-1132.
- Xiao, H., Pearson, A., Coulombe, B. et al. (1994) Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domain of VP16 and p53. *Mol. Cell. Biol.*, 14, 7013-7024.
- Xiong, Y., Hannon G.J., Thang, H., Casso, D., Kobayashi, R., Beach, D. (1993) p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, 366, 701.
- Xu, H., Feng, Z., Yi, C. (1991) Free radical mechanism of the toxicity of selenium compounds. *Huyahong Longong Daxue Xuebao (English)*, 19, 13-19.
- Yagi, T., Mohri-Nakanishi, K., Matsuda, T., Yamagishi, N., Miyakoshi, J., Takebe, H. (1998) Reduced UV-induced mutations in human osteosarkoma cells stably expressing transfected wild-type p53 cDNA. *Cancer Lett.*, 123(1), 71-76.
- Yang, C.F., Shen, H.M., Ong, C.N. (1999) Protective effect of ebselen against hydrogen peroxide-induced cytotoxicity and DNA damage in HepG2 cells. *Biochem. Pharmacol.*, 57(3), 273-279.
- Yang, G. et al. (1989) Studies of human maximal and minimal safe intakes. In: Wendel, A. Selenium in Biology and Medicine. Springer, Berlin, New York, 223-228.
- Yang, G., Zhou, R. (1994) Further observations on the human maximum safe dietary selenium intake in a seleniferous area of China. *J. Trace. Elem. Electrolytes Health Dis.*, 8, 159-165.
- Yang, M.H., Schaick, K.M. (1996) *Free Rad. Biol. Med.*, 20, 225-236.
- Yarosh, D.B., Yee, V. (1990) SKH-1 hairless mice repair UV-induced pyrimidines in epidermal DNA. *J. Photochem. Photobiol.*, 7, 173-179.
- Young, A.R., Chadwick, C.A., Harrison, G.I., Hawk, J.L.M., Nikaido, O., Potten, C.S. (1996) Hte in situ repair kinetics of epidermal thymine dimers and 6-4 photoproducts in human skin types I and II. *J. Invest. Dermatol.*, 106, 1307-1313.
- Yu, S.-Y. et al., (1991) A preliminary report on the intervention trials of primary liver cancer in high-risk populations with nutritional supplementation of selenium in China. *Biol. Trace Elem. Res.*, 29, 289-294.
- Yuan, J., Yeasky, T.M., Havre, P.A., Glazer, P.A. (1995) Induction of p53 in mouse cells decreases mutagenesis by UV radiation. *Carcinogenesis*, 16 (10), 2295-2300.
- Zhan, Q., Carrier, F., Fornace, A.J. Jr (1993) Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest. *Mol. Cell. Biol.*, 13, 4242-4250.
- Zhang, X., Rosenstein, B.S., Wang, Y., Lebwohl, M., Mitchell, D.M., Wei, H. (1997) Induction of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by ultraviolet radiation in calf thymus DNA and HeLa cells. *Photochem. Photobiol.*, 65(1), 119-124.
- Ziegler, A., Leffell, D.J., Kunala, S., Shanna, H.W., Gailani, M., Simon, J.A., Halperin, A.J., Baden, H.P., Shapiro, P.E., Bale, A.E., Brash, D.E. (1993) Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 4216-4220.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

Will, O., Mahler, H.C., Arrigo, A.P. and Epe, B. (1999) Influence of glutathione levels and heat-shock on the steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 20, 333-337.

Pflaum, M., Will, O., Mahler, H.C. and Epe, B. (1999) DNA oxidation products determined with repair endonucleases in mammalian cells: types, basal levels and influence of the cell proliferation. *Free Radical Research*, 27, 585-594.

Will, O., Gocke, E., Eckert, I., Schulz, I., Pflaum, M., Mahler, H.C. and Epe, B. (1999) Oxidative DNA damage and mutations induced by a polar photosensitizer, Ro 19-8022. *Mutation Research*, 435 (1), 89-101..

Mahler, H.C., Schulz, I., Adam, W., Grimm, G.N., Saha-Möller, C.R. and Epe, B. (1999) Selective generation of 7,8-dihydro-8-oxoguanine in DNA by *tert*-butoxyl radicals, eingereicht.

Erklärung

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

Hanns-Christian Mahler

Mainz, im Dezember 1999