

Einfluss von oxidativem Stress auf die DNA-Reparatur in Säugerzellen

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN“

vorgelegt von

Wolfgang Eiberger

geboren in Böblingen

Mainz, 2008

Dekan:

1. Berichtstatter:

2. Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

„Separates The Men From The Boys”

W.Baldessarini

Meinen lieben Eltern !

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Mai 2004 bis September 2007 am Institut für Pharmazie des Fachbereichs Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Inhaltsverzeichnis

DISSERTATION	1
DEKAN: PROF. DR. P. LANGGUTH	2
DANKSAGUNG	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.
INHALTSVERZEICHNIS	5
ABKÜRZUNGEN	1
1 EINLEITUNG	1
2 KENNTNISSTAND	4
2.1 MALIGNES MELANOM (SCHWARZER HAUTKREBS)	4
2.1.1 GRUNDLAGEN	4
2.1.2 MECHANISTISCHE URSACHEN DER HAUTKREBSENTSTEHUNG	5
2.2 DIE HAUT	7
2.3 REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES UND OXIDATIVER STRESS	8
2.3.1 OXIDATIVER STRESS DURCH SUPEROXIDANION-RADIKALE ($O_2^{\cdot-}$)	10
2.3.2 OXIDATIVER STRESS DURCH WASSERSTOFFPEROXID (H_2O_2)	10
2.3.3 OXIDATIVER STRESS DURCH HYDROXYLRADIKALE (OH^{\cdot})	11
2.3.4 OXIDATIVER STRESS DURCH SINGULETT-SAUERSTOFF (1O_2)	11
2.3.5 GENERIERUNG OXIDATIVEN STRESSES DURCH BESTRAHLUNG MIT SONNENLICHT UND UV- STRAHLUNG	12
2.3.6 GENERIERUNG OXIDATIVEN STRESSES DURCH RO19-8022	15
2.3.7 GENERIERUNG ALKYLIERENDER DNA-SCHÄDEN DURCH BEHANDLUNG MIT MMS	16
2.4 BIOLOGISCHE AUSWIRKUNG OXIDATIVEN STRESSES AUF DIE ZELLE	17
2.4.1 OXIDATIVE DNA-MODIFIKATIONEN	17
2.4.2 LIPIDPEROXIDATION	18
2.4.3 PROTEINOXIDATION	18
2.5 AUSWIRKUNGEN OXIDATIVER DNA-MODIFIKATIONEN	19
2.6 DNA-REPARATURMECHANISMEN	20
2.6.1 DIREKTE DNA-REPARATUR (SCHADENSREVERSION)	21
2.6.2 BASENEXZISIONSREPARATUR (BER)	22
2.6.3 NUKLEOTIDEXZISIONSREPARATUR (NER)	26

2.6.4	EINZELSTRANGBRUCHREPARATUR	27
2.6.5	POSTREPLIKATIVE REPARATUR (MISMATCH REPAIR)	29
2.7	GLUTATHION (GSH)	30
2.8	REAGENZIEN ZUR MODULIERUNG DES INTRAZELLULÄREN REDOXSYSTEMS	31
2.8.1	BSO (D,L-BUTHIONIN-(S,R)-SULFOXIMIN)	31
2.8.2	DTT (D,L-DITHIOTREITOL)	31
2.8.3	DIAMID (N,N,N',N'-TETRAMETHYLAZABISFORMAMID)	32
3	ZIELSETZUNG	33
4	MATERIAL UND METHODEN	34
4.1	MATERIAL	34
4.1.1	GERÄTE	34
4.1.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	36
4.1.3	CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN	38
4.1.4	ANTIKÖRPER UND ENZYME	40
4.1.5	DNA	41
4.1.6	ZELLEN	41
4.1.7	PUFFER, LÖSUNGEN, MEDIEN	42
4.2	METHODEN	53
4.2.1	ZELLKULTUR	53
4.2.2	HERSTELLUNG VON ZELLPALLETS	55
4.2.3	ALKALISCHE ELUTION	56
4.2.4	TESTUNG DES APN1-ENZYS MITTELS DER ALKALISCHEN ELUTION	66
4.2.5	CLEAVAGE-ASSAY - BESTIMMUNG DER ENZYMAKTIVITÄT (8-OXOG- GLYCOSYLASEAKTIVITÄT) EINES DNA-REPARATURENZYS (HOGG1)	67
4.2.6	BESTIMMUNG DES GLUTATHION (GSH) – GEHALTS	71
4.2.7	DEPLETION VON GLUTATHION	73
4.2.8	IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNG ZUR IDENTIFIZIERUNG HUMANER HAUTFIBROBLASTEN	73
4.2.9	BESTIMMUNG DER TOXIZITÄT IN SÄUGERZELLEN	75
4.2.10	HERSTELLUNG VON ZELLEXTRAKTEN	77
4.2.11	WESTERN-BLOT (PROTEINTRANSFER)	78
5	ERGEBNISSE	82
5.1	VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN AN MELANOMZELLEN UND FIBROBLASTEN	82
5.1.1	UNTERSUCHUNG DES INTRAZELLULÄREN GSH-SPIEGELS IN MELANOMZELLEN UND FIBROBLASTEN	82

5.1.2	TOXIZITÄT DURCH GLUTATHION-DEPLETION BEI BESTRAHLUNG DURCH SICHTBARES LICHT (VIS) ODER UVA	87
5.1.3	ERMITTLUNG DER DNA-SCHADENSPROFILE IN MELANOMZELLEN UND FIBROBLASTEN NACH BESTRAHLUNG MIT SICHTBAREM LICHT ODER UVA	91
5.1.4	INDUKTION UND REPARATUR OXIDATIVER DNA-SCHÄDEN IN MELANOMZELLEN UND FIBROBLASTEN NACH BESTRAHLUNG MIT UVA ODER SICHTBAREM LICHT	93
5.1.5	ÜBERPRÜFUNG DER 8-OXOG-GLYKOSYLASEAKTIVITÄT VON HOGG1 IN MELANOMZELLEN UND FIBROBLASTEN	97
5.2	EINFLUSS EXOGENER UND ENDOGENER THIOLE AUF DIE BILDUNG UND REPARATUR OXIDATIVER DNA-SCHÄDEN IN MELANOMZELLEN UND FIBROBLASTEN	101
5.2.1	INDUKTION UND REPARATUR OXIDATIVER DNA-SCHÄDEN NACH BESTRAHLUNG MIT SICHTBAREM LICHT UND Ro19-8022	101
5.2.2	EINFLUSS EINER GLUTATHION-DEPLETION AUF BILDUNG OXIDATIVER DNA-SCHÄDEN IN FIBROBLASTEN UND MELANOMZELLEN NACH BESTRAHLUNG MIT SICHTBAREM LICHT / Ro19-8022	104
5.2.3	EINFLUSS EINER GLUTATHION-DEPLETION AUF DIE BILDUNG UND REPARATUR OXIDATIVER DNA-SCHÄDEN IN MELANOMZELLEN UND FIBROBLASTEN NACH BESTRAHLUNG MIT SICHTBAREM LICHT	107
5.2.4	EINFLUSS EINER DIAMID-VORBEHANDLUNG VON MELANOMZELLEN UND FIBROBLASTEN AUF DIE BILDUNG UND REPARATUR OXIDATIVER DNA-SCHÄDEN NACH BESTRAHLUNG MIT SOLAR-SIMULATOR	111
5.2.5	REVERSION DER BSO- ODER DIAMID-INDUZIERTEN HEMMUNG DER DNA-REPARATUR MITTELS DTT	113
5.3	UNTERSUCHUNG ANDERER DNA-REPARATURWEGE AUF BEEIN-FLUSSUNG DURCH OXIDATIVEN STRESS	115
5.3.1	UNTERSUCHUNG DER NUKLEOTIDEXZISIONSREPARATUR AUF BEEIN-FLUSSUNG DURCH OXIDATIVE DNA-MODIFIKATIONEN	116
5.3.2	UNTERSUCHUNG DER EINZELSTRANGBRUCHREPARATUR AUF BEEIN-FLUSSUNG DURCH OXIDATIVEN STRESS	118
5.4	UNTERSUCHUNGEN ZUR REPARATURHEMMUNG INNERHALB DER BER	120
5.4.1	UNTERSUCHUNG DER 8-OXOG-GLYKOSYLASEAKTIVITÄT VON HOGG1 IN MELANOMZELLEN UND FIBROBLASTEN	120
5.4.2	UNTERSUCHUNGEN ZUM ABBAU VON HOGG1 NACH BSO- PRÄINKUBATION UND BESTRAHLUNG MIT SICHTBAREM LICHT	124
5.4.3	UNTERSUCHUNG DER FUNKTIONSFÄHIGKEIT DES APE1-PROTEINS	125
6	<u>DISKUSSION</u>	128
6.1	VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN AN MELANOMZELLEN UND FIBROBLASTEN	128

6.1.1	INTRAZELLULÄRE GLUTATHION-SPIEGEL IN MELANOMZELLEN UND FIBROBLASTEN	128
6.1.2	DNA-SCHADENSPROFILE UND REPARATURKAPAZITÄT VON MELANOMZELLEN UND FIBROBLASTEN	131
6.2	MODULIERUNG REPARATURKAPAZITÄT VON MELANOMZELLEN UND FIBROBLASTEN ...	134
6.2.1	... DURCH BESTRAHLUNG MIT SICHTBAREM LICHT IN KOMBINATION MIT PHOTOSENSIBILISATOR Ro19-8022	135
6.2.2	... DURCH BESTRAHLUNG MIT SICHTBAREM LICHT IN KOMBINATION MIT Ro19-8022 NACH PRÄINKUBATION MIT BSO	136
6.2.3	... DURCH BESTRAHLUNG MIT SICHTBAREM LICHT NACH VORBEHANDLUNG MIT DIAMID	137
6.2.4	... DURCH BESTRAHLUNG MIT SICHTBAREM LICHT (MIT BSO ODER DIAMID) UND ANSCHLIEßENDER DTT-INKUBATION	138
6.3	UNTERSUCHUNG ANDERER DNA-REPARATURWEGE AUF BEEIN-FLUSSUNG DURCH GLUTATHION-DEPLETION UND INDUZIERTER ROS	139
6.3.1	UNTERSUCHUNG DER NUKLEOTIDEXZISIONSREPARATUR AUF BEEINFLUSSUNG DURCH GSH-DEPLETION UND OXIDATIVEN STRESS	140
6.3.2	UNTERSUCHUNG DER EINZELSTRANGBRUCHREPARATUR AUF BEEINFLUSSUNG DURCH GLUTATHION-DEPLETION UND OXIDATIVEN STRESS	141
6.4	UNTERSUCHUNG DER REPARATURHEMMUNG INNERHALB DER BER	142
6.4.1	UNTERSUCHUNG DER 8-OXOG-LYKOSYLASEAKTIVITÄT VON HOGG1 IN MELANOMZELLEN UND FIBROBLASTEN	142
6.4.2	UNTERSUCHUNGEN ZUR PROTEINOXIDATION VON HOGG1 NACH BSO-PRÄINKUBATION UND BESTRAHLUNG MIT SICHTBAREM LICHT	143
6.4.3	UNTERSUCHUNG DER FUNKTIONSFÄHIGKEIT DES APE1-PROTEINS	144
6.5	SCHLUßFOLGERUNG	145
7	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	147
8	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	151
CURRICULUM VITAE	FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	
ERKLÄRUNG		171

Abkürzungen

8-oxoA	8-Hydroxyadenin
8-oxoG	7,8-Dihydro-8-oxo-guanin
Abb.	Abbildung
AP-Läsion	basenfreie Stelle in der DNA (apurinische / apyrimidinische)
APN1	apurinische/apyrimidinische Endonuklease
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
BSO	D,L-Buthionin-[S,R]-sulfoximin
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
Csa	Cockayne Syndrom Typ A
Csb	Cockayne Syndrom Typ B
CYP P450	Cytochrom P450-System
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTNB	5,5' Dithio-bis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellman's Reagenz)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Endo	Endonuklease
ERCC1	excision repair cross complementing group 1
Exo1	Exonuklease 1
FaPy	Formamidopyrimidin
FCS	Fötales Kälberserum
Fpg	Formamidopyrimidinglykosylase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion (Disulfid-Dimer)
hOGG1	humanes analoges Protein zu Fpg
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie
IgG	Immunglobulin G
Lsg.	Lösung
MEFs	Mausembryofibroblasten
min	Minute(n)
MMR	Mismatch-Reparatur
MMS	Methylmethansulfonat
MK	Mikrokerne
n	Anzahl der durchgeführten, voneinander unabhängigen Experimente
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur

p.a.	hohe Reinheit (pro analysi)
PARP	poly-ADP-ribose-polymerase
PBS/CMF	phosphatgepufferte Salzlösung (Calcium-/Magnesiumfrei)
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
RNA	Ribonukleinsäure
Ro19-8022	[R]-1-(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4Hbenzo[a]chinolizin-1-yl)carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
rpm	Umdrehungen pro minute (revolutions per minute)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
SS	„steady state“
ssb	Einzelstrangbruch (single strand break)
T4EndoV	T4 Endonuklease V
TCR	transkriptionsgekoppelte Reparatur
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid
Tris	2-Amino-2-hydroxymethylpropan-1,3-diol
UVA	Ultraviolettes Licht der Wellenlänge 320-400 nm
UVB	Ultraviolettes Licht der Wellenlänge 280-320 nm
UVC	Ultraviolettes Licht der Wellenlänge 200-280 nm
UZ	Ultrazentrifuge
VIS	Sichtbares Licht der Wellenlänge 400-800 nm
WT	Wildtyp
XP	Xeroderma pigmentosum
XRCC1	X-ray repair cross complementing group 1

1 EINLEITUNG

In der heutigen Wohlstandsgesellschaft westlicher Industrienationen sind Herzkreislauferkrankungen, nicht zuletzt auch aufgrund veränderter Lebensgewohnheiten und Lebensumstände, die häufigste Todesursache. Direkt an zweiter Stelle folgt aber schon mit 25 % aller Todesfälle Krebs – Tendenz steigend. Die Gründe hierfür liegen zum Teil in einer immer älter werdenden Bevölkerung, wodurch das Risiko an Krebs zu erkranken steigt - allein in Deutschland werden jährlich bis zu 380 000 Neuerkrankungen registriert (BMBF, 2007). Aber auch rein biologisch betrachtet ist die Spezies Mensch hauptsächlich darauf programmiert, ebenso wie alle anderen Spezies, sich innerhalb eines gewissen Zeitraums zu reproduzieren. Aus diesem Grund kann sich der menschliche Organismus in der Regel bis zu einem gewissen Alter in bestmöglichem Zustand erhalten. Nach Ablauf dieses Zeitraums, etwa ab dem 30. Lebensjahr, setzen erste Verschleißerscheinungen ein und enzymatische Prozesse verlangsamen sich. Ab diesem Alter ist ein rasanter Anstieg hinsichtlich der Krebsmortalität zu verzeichnen, der sich circa alle 5 Jahre verdoppelt (BMBF, 2007).

Anhand dieser Zahlen und Zusammenhänge ist es daher nur zu verständlich, dass in unserer heutigen Zeit ein sehr großes Interesse darin besteht, die genauen Prozesse der Krebsentstehung aufzuklären und zu verstehen, um in Zukunft geeignete Therapien oder präventive Maßnahmen gegen diese Krankheit aufbieten zu können.

Grundsätzlich kann man die Ursachen der Krebsentstehung in endogene und exogene Faktoren einteilen, die die genetische Information einer Zelle so verändern können, dass diese nicht mehr in der Lage ist, ihre normale Funktion auszuüben. Das kann sich beispielsweise darin äußern, dass Protoonkogene (K-ras, N-ras, sis, src) zu Onkogenen „aktiviert“ oder aber Tumorsuppressorgene (p53, hMLH1, BRCA-1, BRCA-2) derart mutiert werden, dass sie inaktiviert werden, was einen Kontrollverlust der Zellteilung zur Folge hat (Weinberg, 1996b; Weinberg, 1996a; Le Page et al., 2000; Kops et al., 2005). Weitere eventuell auftretende Basenveränderungen können dann zu zusätzlichen Mutationen führen. Eine weitere für die Krebsentstehung wichtige Gruppe von Genen sind die sogenannten DNA-Reparaturgene, die zum einen fortwährend das komplette Genom nach veränderten DNA-Basen, den sogenannten DNA-Basenmodifikationen, absuchen und zum anderen während der Replikation auftretende Basenveränderungen sicher entfernen können. Kommt es in diesen Genen aufgrund einer Mutation zu einem Funktionsverlust, so kann sich die spontane Mutationsfrequenz in dem jeweiligen Organismus erhöhen (Mutatorhypothese / (Loeb, 1998; Loeb, 2001; Loeb et al., 2003; Trapp et al., 2007).

Zu den exogenen Risikofaktoren, die zu Mutationen führen können, zählen beispielsweise Umwelteinflüsse, wie Sonnenstrahlung (UV-Strahlung) oder radioaktive Strahlung, die direkt die DNA schädigen können. Aber auch Industriechemikalien (Benzol, Dioxine), Naturstoffe (Aflatoxin B) oder aber der persönliche Lebensstil (Alkoholmißbrauch, Rauchen, ungesunde Ernährung) sind potentielle Ursachen für Veränderungen des Erbguts der Zelle.

Auf der anderen Seite besteht für jeden sauerstoffkonsumierenden Organismus die Gefahr, dass als Nebenprodukt des oxidativen Metabolismus von Sauerstoff (zum Beispiel in der mitochondrialen Atmungskette) sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) generiert werden können (Collins, 1999), die dann endogene Mutagene darstellen. Hierbei handelt es sich um oft kurzlebige aber hochreaktive Sauerstoffverbindungen, wie Hydroxylradikale, Superoxidanion-Radikale, Alkoxyradikale, Wasserstoffperoxid oder Singulett-Sauerstoff, die nach heutigem Kenntnisstand permanent die zelluläre DNA schädigen. Dabei werden oxidative DNA-Modifikationen induziert, die, wenn sie nicht von der Zelle beseitigt werden, bei einer eventuell nachfolgenden Zellteilung zu einer Mutation manifestiert werden können (Wiseman and Halliwell, 1996; Beckman and Ames, 1997; Sekiguchi and Tsuzuki, 2002). Im Lauf der evolutionären Anpassung haben sich zelluläre Abwehr- und Verteidigungsmechanismen etabliert, die diesen Prozessen entgegenwirken. So existiert in den meisten Zellen ein komplexes „Antioxidatives Abwehrsystem“, das zum einen direkt mit verschiedenen Antioxidantien, wie zum Beispiel Glutathion (GSH, siehe Kapitel 2.7) oder Enzymen, wie zum Beispiel der Superoxiddismutase (SOD) oder der Katalase (siehe Kapitel 2.3.1, 2.3.2) induzierte ROS abfangen, oder aber auch durch gesteigerte transkriptionelle Aktivität (über Nrf2 oder oxyR) (Kim and Mayfield, 2000; Jaiswal, 2004; Seib et al., 2007) zu einer erhöhten antioxidativen Verteidigung beitragen kann. Außerdem besitzen die Zellen eine Vielzahl von DNA-Reparaturmechanismen, die in der Lage sind, selektiv die unterschiedlichsten DNA-Basenmodifikationen zu erkennen und zu reparieren.

Somit entstehen in allen Zellen sogenannte Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Basenmodifikationen (Abb. 1.1), die sich einerseits aus der Bildungsgeschwindigkeit und Konzentration der DNA-Schäden und andererseits aus der enzymatischen Abwehrleistung und DNA-Reparaturgeschwindigkeit der Zellen ergeben (Sies 1993, Epe 2003). Besonders hervorzuheben ist hierbei die oxidative DNA-Modifikation 7,8-Dihydro-8-oxo-guanin (8-oxoG), die mengenmäßig wahrscheinlich am häufigsten vorkommt und zudem eines der höchsten mutagenen Potentiale aufweist. Daher wird die Anzahl an 8-oxoG pro untersuchter Zelle als Maß für die Höhe des zellulären oxidativen Stresses herangezogen (Floyd, 1990; Bessho et al., 1993; Kasai et al., 1993).

Ein Organ, das sowohl exogen wie endogen oxidativem Stress ausgesetzt ist, ist die Haut. Denn zum einen sind die verschiedenen Hautzellen täglich der energiereichen Sonnenstrahlung exponiert, die, wie unten beschrieben (Kapitel 2.3.5), ROS generiert. Zudem ist jeder Sonnenbrand mit Entzündung und damit mit erhöhter endogener Produktion von ROS (oxidativem Stress) verbunden. Den Zusammenhang zwischen UVB-Strahlung und der Entstehung des Plattenepithelzell- und Basalzellkarzinoms ist gut belegt, wohingegen die Bedeutung von oxidativem Stress bzw. oxidativen DNA-Schäden für den Hautkrebs allerdings noch unklar ist.

Für das maligne Melanom konnte bisher noch kein kausaler Zusammenhang zwischen der Krebsinzidenz und einem speziellen Wellenlängenbereich der Sonnenstrahlung oder einer bestimmten DNA-Basenmodifikation hergestellt werden. Aus diesem Grund war das Ziel dieser Arbeit einerseits vergleichend Melanomzellen und Hautfibroblasten desselben Patienten auf deren oxidativen „Grundstress“ zu untersuchen und andererseits die Auswirkungen einer Beeinträchtigung der antioxidativen Abwehr auf die Generierung und Reparatur oxidativer DNA-Schäden in diesen Zellen nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht oder UV-Strahlung zu bestimmen.

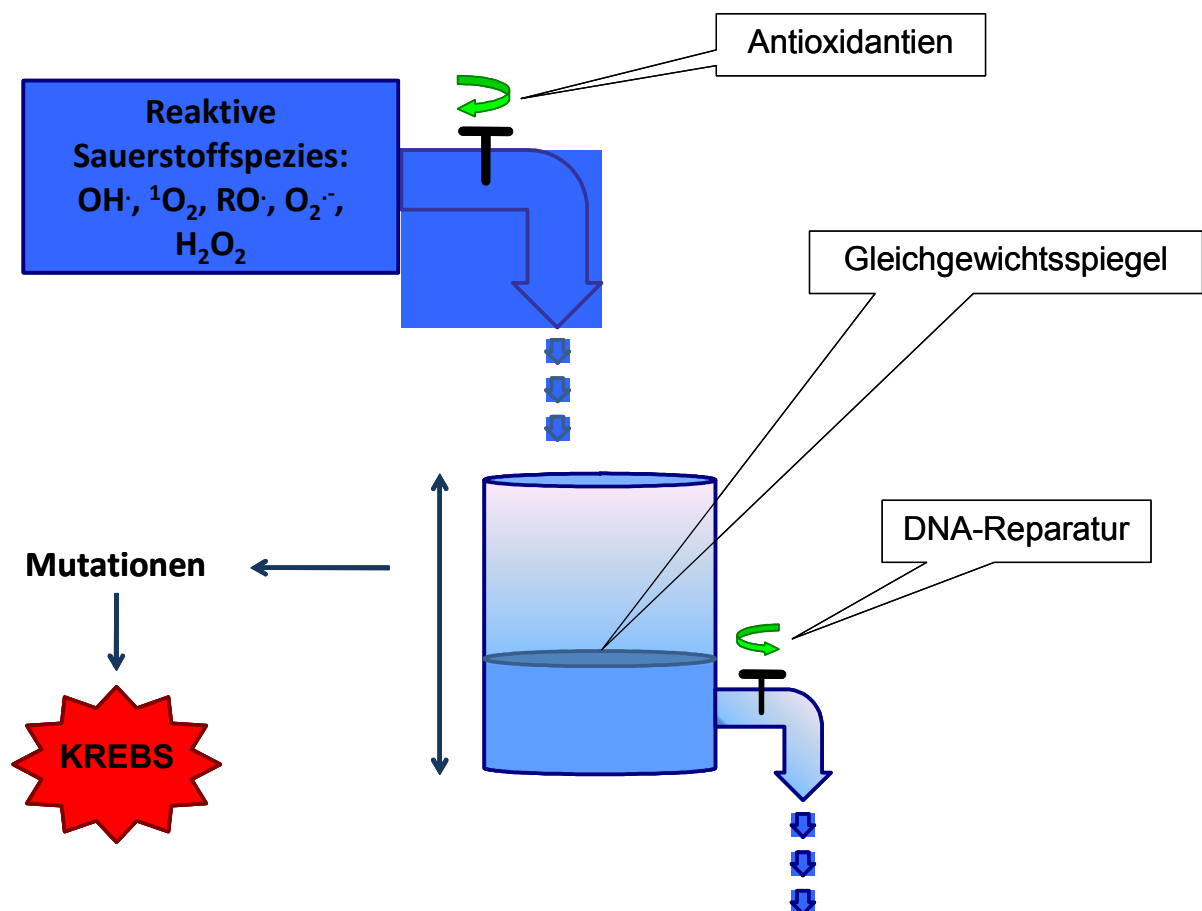


Abb. 1.1: Ursprung und Beeinflussbarkeit basaler Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Modifikationen in Zellen und mögliche biologische Konsequenzen (nach Epe, 2002).

2 KENNTNISSTAND

2.1 Malignes Melanom (Schwarzer Hautkrebs)

2.1.1 Grundlagen

Unter dem malignen Melanom versteht man die Form des Hautkrebses, die sich aus den pigmentbildenden Zellen der Oberhaut (Epidermis) bzw. der Schleimhäute, den sogenannten Melanozyten, entwickelt. Hinsichtlich der Inzidenz pro 100.000 Einwohner steht diese Form „nur“ an dritter Stelle der verschiedenen Hautkrebsarten, an dessen ersten Position aufgrund der Häufigkeit der Fallzahlen mit Abstand das Basalzell- und an zweiter Position das Plattenepithelzellkarzinom rangiert. Vergleicht man jedoch die Metastasierungsrate, die Erkrankung in relativ jungen Jahren oder die Mortalität, so ist das maligne Melanom eindeutig die gefährlichste Krebserkrankung der Haut. Zudem ist innerhalb der letzten 30 Jahre weltweit ein rasanter Anstieg an Hautkrebs allgemein, vor allem aber an malignem Melanom zu verzeichnen.

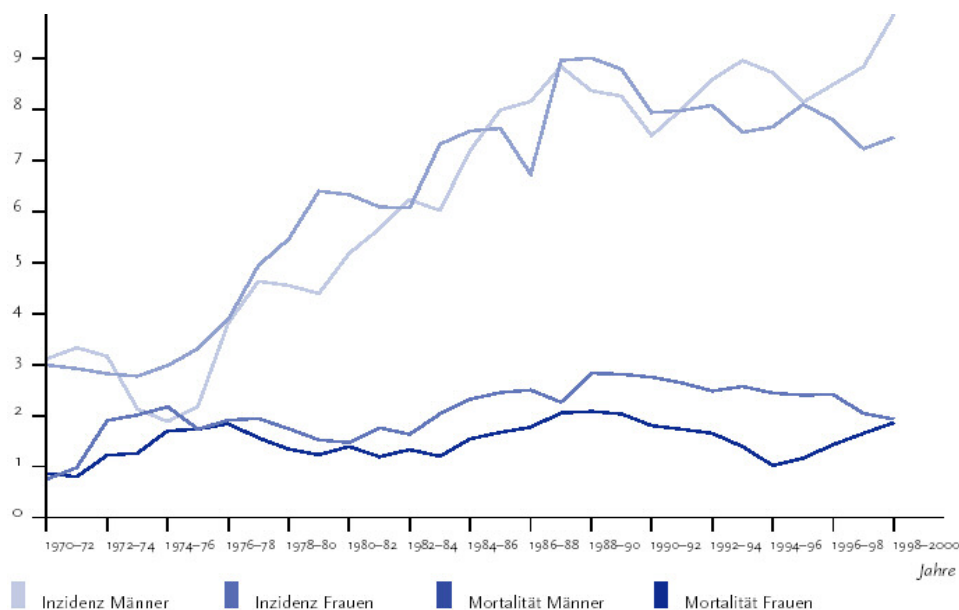


Abb. 2.1: Inzidenz und Mortalität des malignen Melanoms im Saarland, betrachtet über einen Zeitraum von 30 Jahren (Angabe in Fällen pro 100.000 Einwohner / www.gbe-bund.de)

In der Abbildung (Abb. 2.1) sieht man deutlich, dass sich diese Entwicklung auch in Deutschland widerspiegelt. Eine mögliche Ursache könnte einerseits in einem veränderten Freizeitverhalten mit längeren Urlauben in Ländern mit stärkerer Sonneneinstrahlung und der Nutzung von Solarien liegen. Andererseits schwindet

seit Jahren die schützende Ozonschicht, was sich dramatisch in der Melanominzidenz der Australier bemerkbar macht (Abb. 2.2 B).

Sehr deutlich ist auch anhand der Abb. 2.2 (A) und (B) zu erkennen, dass der jeweilige Hauttyp ein wichtiges Kriterium für die Krebsinzidenz des malignen Melanoms darstellt. Obwohl in den südlichen Ländern Europas und der südlichen

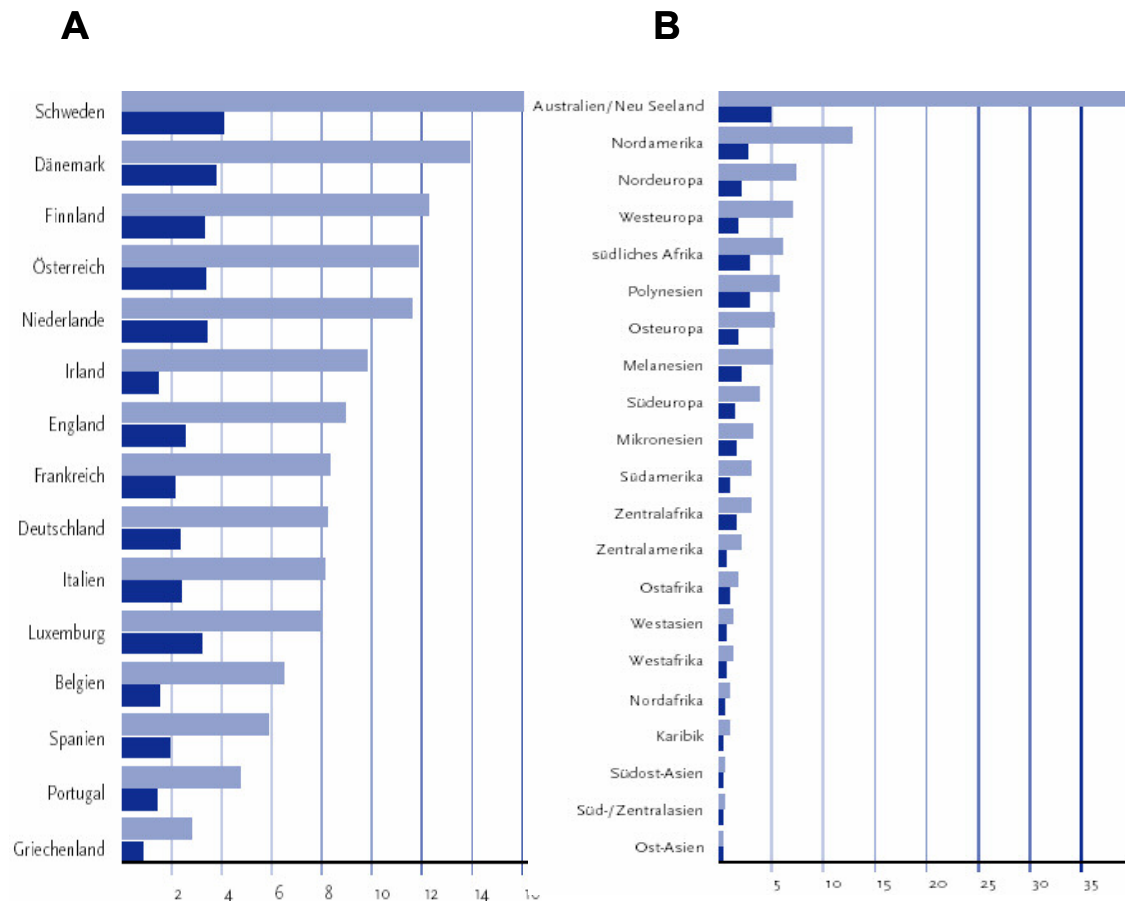


Abb. 2.2: Inzidenz und Mortalität des malignen Melanoms bei Männern im europäischen (A) und weltweiten (B) Vergleich (Angabe in Fällen pro 100.000 Einwohner / www.gbe-bund.de).

Hemisphäre die Sonneneinstrahlung wesentlich stärker ist als auf der Nordhalbkugel, werden dort deutlich mehr Fälle des schwarzen Hautkrebses registriert.

2.1.2 Mechanistische Ursachen der Hautkrebsentstehung

Wie jede Krebsart, so sind auch die verschiedenen Formen des Hautkrebses ursächlich auf den mehrstufigen Prozeß der Kanzerogenese zurückzuführen (Neumann, 1992). Wie bereits für die „weißen“ Hautkrebsarten (Basalzell- und Plattenepithelzellkarzinom) gezeigt werden konnte, führt die direkte Einwirkung von energiereicher UVB-Strahlung auf DNA-Basen zu Cyclobutan-Pyrimidindimeren (CPDs) und (6-4)-Photoprodukten (Drouin and Therrien, 1997; Kielbassa et al., 1997; Tommasi et al., 1997; You et al., 2000). Falls diese von der Zelle nicht erkannt und /

oder repariert werden, kann es im Falle einer nachfolgenden Zellteilung zu den typischen CC → TT-Tandemmutationen kommen (Besaratina et al., 2005). Diese Veränderungen der genetischen Information können dann unter Umständen zu defekten Proteinen, wie zum Beispiel zu einer veränderten DNA-Bindungsdomäne des p53-Tumorsuppressorgens in Basalzellkarzinomazellen und somit zu einem nicht mehr kontrollierbarem Zellzyklus führen (Cleaver and Crowley, 2002; Kramata et al., 2005).

Beim malignen Melanom hingegen konnten bisher noch keine eindeutigen Hinweise für die Ursache der malignen Entartung gefunden werden. Trotz massiver Bemühungen durch Forschung an verschiedenen Tiermodellen, an potentiellen Tumorsuppressorgenen oder antioxidativen Enzymsystemen, konnte bislang weder eine genaue Wellenlänge bzw. Wellenlängenbereich noch ein signifikanter Gendefekt identifiziert werden. Erste Hinweise der letzten Jahre deuteten eher auf eine Beteiligung von UVA-Strahlung und / oder Sichtbarem Licht (Setlow et al., 1993; Setlow, 1999; Woodhead et al., 1999) als auf die lange in Verdacht stehende energiereichere UVB-Strahlung hin. Außerdem konnte in den vergangenen Jahren gezeigt werden, dass auch UVA-Strahlung (315 – 390 nm) in der Lage ist, Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPDs) in großer Zahl zu induzieren. Sie sind sogar die dominierende DNA-Modifikation in UVA-bestrahlten Zellen, in denen aber auch 7,8-Dihydro-8-oxo-guanin (8-oxoG) in hohem Maße gebildet wird (Ikehata et al., 2003; Rochette et al., 2003; Besaratina et al., 2005; Cadet et al., 2005). Zudem wird auch eine wesentliche Rolle für das von Melanozyten gebildete Melanin diskutiert. Einerseits schützt es die Zellen vor weiterer UVA-Strahlung, indem durch vorangegangene UV-Strahlung und nachfolgende Reparatur induzierten CPDs dessen de-novo-Synthese angeregt wird (Eller et al., 1994; Kadekaro et al., 2005; Lin and Fisher, 2007). Andererseits können die als Nebenprodukt der Pheomelaninproduktion anfallenden ROS zelluläre Strukturen und die DNA schädigen (Marrot et al., 2005; Lin and Fisher, 2007). Darüberhinaus existieren zudem auch Hinweise, dass das zelluläre Melanin auch als endogener Photosensibilisator agieren kann. Auch scheinen Melanozyten gegenüber UVA-Strahlung und oxidativem Stress wesentlich weniger anfällig zu sein als Hautfibroblasten (Applegate et al., 1996; Tyrrell, 1999) und Melanomzellen ein wesentlich stärker ausgeprägtes antioxidatives Abwehrsystem als andere Zellen besitzen (Kvam and Dahle, 2003; Sander et al., 2003; Sander et al., 2004; Benlloch et al., 2006).

2.2 Die Haut

Mit einer Fläche von 1,5 – 2 m² und einem Gewicht von bis zu 10 kg ist die Haut das mit Abstand größte Organ des Menschen und hat zudem ein äußerst breites Spektrum an Aufgaben zu erfüllen. Ihre zentrale Funktion ist die Abgrenzung des Organismus Mensch gegen die Umwelt also Schutz- und Barrierefunktion, so dass Krankheitserreger, Keime oder schädliche Substanzen nicht ungehindert in den menschlichen Körper eindringen können. Desweiteren hält sie schädliche Sonnenstrahlung davon ab, tief in das darunterliegende Gewebe einzudringen, isoliert gegen Hitze und Kälte, reguliert den Temperaturhaushalt und verleiht über Sinneszellen das Gefühl für Empfindungen und Berührungen.

Die Haut ist aus drei funktionellen Schichten aufgebaut (Abb. 2.3), deren äußerste Schicht die Epidermis darstellt, gefolgt von der Dermis und der Subcutis.

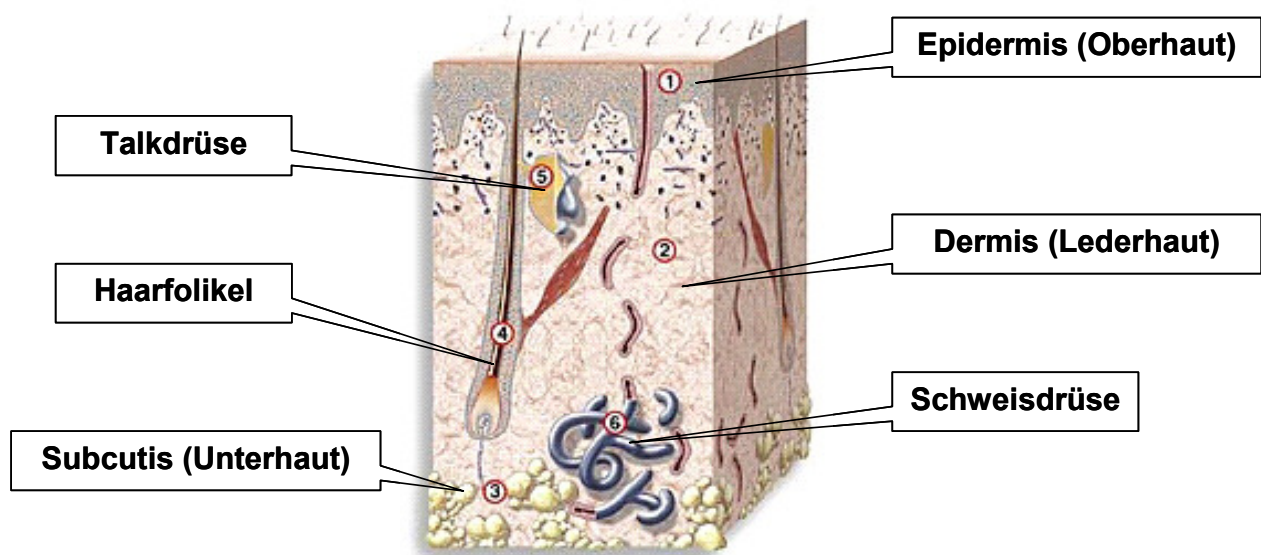


Abb. 2.3: Aufbau der Haut.

Die Epidermis, auch Oberhaut genannt, kann in ihrer Dicke zwischen 0,1 - 1,0 mm variieren und ist die eigentliche Schutzschicht der Haut. Daher ist sie in der Regel an den Handflächen und den Fußsohlen am stärksten ausgeprägt. Die Epidermis ist wiederum aus fünf verschiedenen Schichten aufgebaut und besteht zu 90 % aus Keratinozyten. Die innerste Schicht ist die Basalzellschicht (Stratum basale), die für die fortwährende Neuproduktion der Oberhautzellen verantwortlich ist und zudem die melaninproduzierenden Melanozyten enthält. Als nächstes folgt die Stachelzellschicht (Stratum spinosum), die ebenso wie die Basalzellschicht aus lebenden Zellen besteht. Die dritte Schicht ist die Körnerschicht (Stratum granulosum). In ihr beginnt nun die fortschreitende Verhornung der Keratinozyten, bei der die Zellen langsam absterben und ihren Zellkern verlieren. Danach folgt die Glanzschicht (Stratum lucidum), in der die Zellen sehr dicht beeinander liegen und

einen sehr hohen Lipidgehalt aufweisen, was eine zusätzliche Barriere für Fremdstoffe darstellt. Die letzte Schicht der Epidermis ist nun die Hornschicht (Stratum corneum), in der nur noch abgestorbene, völlig verhornte Keratinozyten dicht übereinandergeschichtet sind. Diese Schicht stellt die eigentliche Barriere zur Umwelt dar und ist in der Lage, sehr effektiv Xenobiotika von dem menschlichen Organismus fern zu halten.

Die Dermis (Lederhaut) hat hauptsächlich Ernährungs- und Stützfunktion für die Epidermis. Sie kann zudem in zwei unterschiedliche Schichten unterteilt werden. Die obere Schicht wird als Stratum papillare bezeichnet und zeigt mit der darüberliegenden Basalzellschicht eine starke „Verzahnung“, wodurch die Kontaktfläche zwischen den beiden Zellschichten stark vergrößert wird und eine optimale Nährstoffversorgung der blut- und lymphgefäßlosen Epidermis gewährleistet wird. Die darunterliegende Schicht, Stratum reticulare, stellt ihrerseits den Kontakt zu der nachfolgenden Unterhaut (Subcutis) her. In beiden Schichten befinden sich viele Bindegewebsfasern (Stützfunktion und Verankerung), Blut- und Lymphgefäße (Ernährung und Immunabwehr), Muskelzellen (Temperaturregelung) und Sinneszellen.

Die unterste Hautschicht (Subcutis) besteht nun zu einem großen Teil aus größeren Blut- und Lymphgefäßen (Ernährungs- und Immunfunktion), lockerem Bindegewebe (Stützfunktion) und darin eingelagerten Fettzellen (Adipozyten). Diese haben die Aufgabe Energie in Form von Fetten zu speichern und dienen außerdem der Wärmeisolation des Körpers.

2.3 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wird in allen aerob lebenden Organismen molekularer Sauerstoff mit der Atemluft aufgenommen und in der mitochondrialen Atmungskette, unter Energiegewinnung in Form von ATP, sequentiell zu Wasser reduziert. Dabei können endogen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), sehr kurzlebige und äußerst reaktive Sauerstoffradikale, wie zum Beispiel Hydroxylradikale, Superoxidation-Radikale oder Alkoxyradikale, entstehen. Aber es können auch nichtradikalische Sauerstoffverbindungen generiert werden, die dann eine etwas längere Halbwertszeit aufweisen und enzymatisch oder nicht enzymatisch zu reaktiveren radikalischen ROS umgewandelt werden (zum Beispiel H_2O_2 oder Singulett-Sauerstoff). Weitere größere Quellen endogen gebildeter ROS können zum einen das Cytochrom-P450-System sein, das für den Xenobiotika-Metabolismus wesentlich verantwortlich ist, und zum anderen Peroxisomen, die im Cytoplasma eukaryotischer Zellen den Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel koordinieren (Kunau et al., 1995). Kommt es aufgrund einer unvollständigen Reduktion molekularen

Sauerstoffs (Atmungskette) oder einer Fehlfunktionen von anderen Enzymen oder Reaktionsketten (CYP450-System, Peroxisomen) zu höheren Konzentrationen von ROS im Zellkern, so kann dieser „oxidative Stress“ zu einer Erhöhung des Gleichgewichtsspiegels oxidativer DNA-Modifikationen führen (Sies, 1991). Als Folge können auch vermehrt Lipid- und Proteinoxidationen auftreten, was Störungen in der Signaltransduktion und entzündliche Prozesse nach sich ziehen und somit die Krebsentstehung begünstigen kann (promovierender Effekt) (Bauerle et al., 1996; Schulze-Osthoff et al., 1997; Epe, 2002). Auch die de-novo-Synthese von Melanin nach einem entsprechend langen Aufenthalt in der Sonne führt zu erhöhten intrazellulären Spiegeln von H_2O_2 (Meyskens et al., 2001).

In der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 1) sind zu einigen der wichtigsten ROS die jeweiligen Halbwertszeiten aufgeführt:

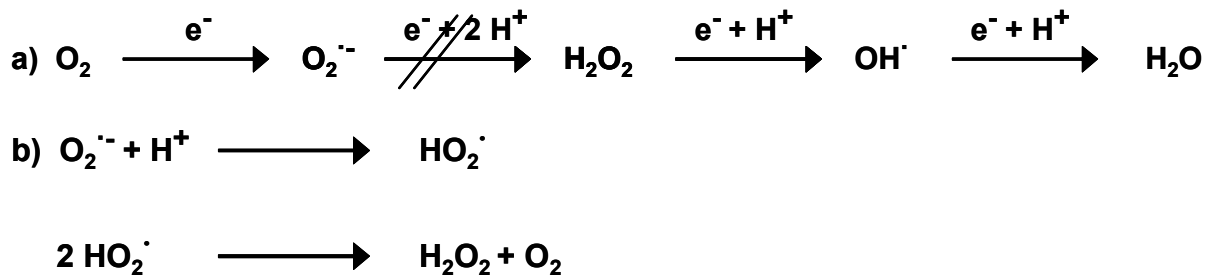
Tabelle 1: Wichtige reaktive Sauerstoffspezies und ihre geschätzten Halbwertszeiten.

Sauerstoffspezies	Halbwertszeit [s]
OH^\cdot = Hydroxylradikal	10^{-9}
RO^\cdot = Alkoxyradikal	10^{-6}
1O_2 = Singulett-Sauerstoff	10^{-6}
$ONOO^-$ = Peroxynitrit	bis zu 1
ROO^\cdot = Peroxylradikal	7
NO^\cdot = Stickstoffmonoxid	bis zu 10
$O_2^{\cdot-}$ = Superoxidationion-Radikal	relativ stabil
H_2O_2 = Wasserstoffperoxid	stabil

Natürlich können auch durch exogene Faktoren ROS in einem lebenden Organismus induziert werden. Beispielsweise führt die Bestrahlung einer Zelle mit sichtbarem Licht oder mit UV-Strahlung zu einer deutlichen Erhöhung von 8-oxoG, das als sensibler Marker für das Ausmaß oxidativen Stresses gilt (Epe, 1991). Desweiteren besteht auch die Möglichkeit mit sogenannten Photosensibilisatoren, wie zum Beispiel Ro19-8022 oder Arzneistoffen (Tetrazyklinen oder Gyrasehemmern), DNA-Basen zu oxidieren. Hierbei gelangt der Photosensibilisator in den Zellkern, wird durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht in einen angeregten Zustand versetzt und gibt anschließend diese Energie direkt an DNA-Basen ab oder reagiert zunächst mit molekularem Sauerstoff. Dabei werden dann ROS gebildet, die ihrerseits DNA-Basen schädigen können (Will, 1995, Hertel, 2006).

2.3.1 Oxidativer Stress durch Superoxidanion-Radikale ($O_2^{\cdot-}$)

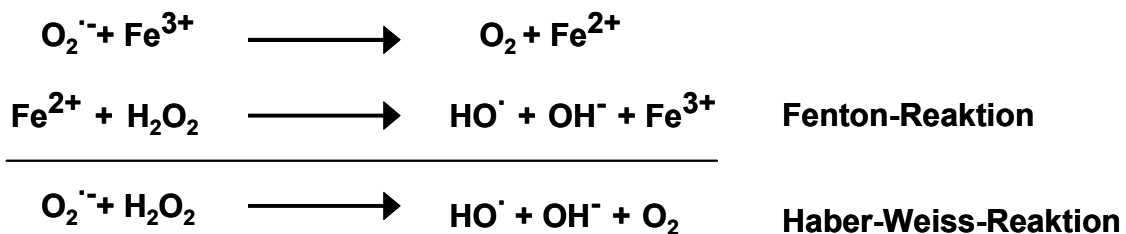
Ungefähr 0,1 – 1 % des in der mitochondrialen Atmungskette umzuwandelnden molekularen Sauerstoffs werden nur unvollständig reduziert (Boveris 1972, siehe Formel 2.1a). Es entstehen Superoxidanion-Radikale, die aber selbst nicht in der Lage sind direkte DNA-Schäden zu induzieren. Nichtsdestotrotz kann durch sowohl spontane als auch enzymatische Dismutation (mit Hilfe der SOD) in der Zelle sehr leicht H_2O_2 und O_2 generiert werden (Fridovich, 1995).



Formel 2.1: a) Unvollständige Reduktion von molekularem Sauerstoff mit b) anschließender Dismutation von Superoxidanion-Radikalen ($O_2^{\cdot-}$) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und molekularem Sauerstoff (O_2).

2.3.2 Oxidativer Stress durch Wasserstoffperoxid (H_2O_2)

Wie bereits in 2.3.1 beschrieben, kann H_2O_2 durch spontane oder enzymatische Dismutation von Superoxidanion-Radikalen, aber auch durch in der Leber lokalisierte Peroxisomen in größerem Umfang gebildet werden. Die Gefährlichkeit von H_2O_2 lässt sich damit erklären, dass es zwar selbst reaktionsträge, dadurch aber relativ stabil ist, wodurch es innerhalb der Zelle größere Strecken zurücklegen kann. Desweiteren kommt noch erschwerend hinzu, dass das Molekül in der Lage ist, Biomembranen zu passieren.



Formel 2.2: Metallkatalysierte Bildung von Hydroxylradikalen (HO^\cdot) aus Superoxidanion-Radikalen ($O_2^{\cdot-}$).

Damit kann es nun in die direkte Nähe der empfindlichen DNA-Basen gelangen und in Gegenwart von Übergangsmetallen (Eisen, Kupfer) zu hochreaktiven Hydroxylradikalen umgewandelt werden – diese Reaktion wird als „Fenton-Reaktion“

bezeichnet (Formel 2.2) (Halliwell and Gutteridge, 1984b; Halliwell and Gutteridge, 1990; Halliwell, 1996).

2.3.3 Oxidativer Stress durch Hydroxylradikale (OH^\cdot)

Die wie in 2.3.2 durch die metallkatalysierte Haber-Weiss-Reaktion gebildeten Hydroxylradikale sind die wahrscheinlich reaktivsten Vertreter ihrer Art. Sie sind demnach in der Lage mit beinahe allen zellulären Bestandteilen zu reagieren. Aufgrund ihrer sehr kurzen Halbwertszeit haben sie nur einen beschränkten Aktionsradius von circa 2 nm (Saran and Bors, 1989). So führt beispielsweise die direkte Reaktion von Hydroxylradikalen mit der DNA-Doppelhelix typischerweise zu DNA-Einzelstrang- oder Doppelstrangbrüchen, apurinischen/apyrimidinischen Läsionen (AP-Läsionen), DNA-Protein-Quervernetzungen und Fragmentierung des Zucker-Phosphat-Gerüsts (Aruoma et al., 1991).

2.3.4 Oxidativer Stress durch Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$)

Die Generierung von Singulett-Sauerstoff erfolgt auf indirektem Weg innerhalb der Zelle. Dabei werden entweder durch sichtbares Licht oder aber UVA-Strahlung endogene Photosensibilisatoren, wie zum Beispiel Protoporphyrin IX oder Riboflavin, angeregt und geben dann die Anregungsenergie an molekularen Sauerstoff innerhalb der Zelle ab (Muller et al., 1990; Epe et al., 1993b). Dabei kommt es zu einer Änderung des Elektronenspins des Sauerstoffs, wodurch dessen Reaktivität und oxidierendes Potential merklich steigt (Gutteridge, 1994). Zwar ist Singulett-Sauerstoff bei weitem nicht so reaktionsfreudig wie Hydroxylradikale, doch seine Gefährlichkeit beruht in seiner größeren Halbwertszeit, die es ihm ermöglicht, weitere Strecken (1 - 2 μm , (Pryor, 1986) innerhalb der Zelle zurückzulegen und somit auch in den Zellkern zu gelangen, um dort direkt mit DNA-Basen zu reagieren.

2.3.5 Generierung oxidativen Stresses durch Bestrahlung mit Sonnenlicht und UV-Strahlung

2.3.5.1 Mechanismen der Schadensinduktion durch Sonnenlicht

Sonnenlicht, das auf die Erdoberfläche trifft, setzt sich aus drei verschiedenen Strahlenarten zusammen. Den größten Anteil dabei hat das sichtbare Licht (51,8 %), dicht gefolgt von dem energieärmsten Anteil, der Infrarotstrahlung (43,9 %). Den kleinsten, aber zugleich energiereichsten Anteil, macht die UV-Strahlung mit 4,3 % aus. Diese kann dabei in zwei energetisch unterschiedliche Bereiche unterteilt werden, den der energiereicheren UVB-Strahlung mit einem Wellenlängenbereich von 280 - 315 nm und den der energieärmeren UVA-Strahlung mit einem Wellenlängenbereich von 315 - 380 nm. Grundsätzlich gilt dabei, je längerwellig eine Strahlungsart ist, desto größer ist ihre jeweilige Eindringtiefe.

Der dabei durch die jeweilige Strahlung induzierte DNA-Schaden hängt von deren Energie ab. So ist seit langem bekannt, dass energiereichere UVB-Strahlung direkt von den DNA-Molekülen oberer Hautschichten der Epidermis absorbiert wird, diese in einen angeregten Zustand versetzt, so dass hauptsächlich Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPDs) gebildet werden (2.4.1). Außerdem kann sie endogene (oder exogene) Photosensibilisatoren anregen, die dann ihrerseits direkt mit DNA-Molekülen in einer sogenannten Typ-I-Reaktion weiterreagieren (Abb. 2.4).

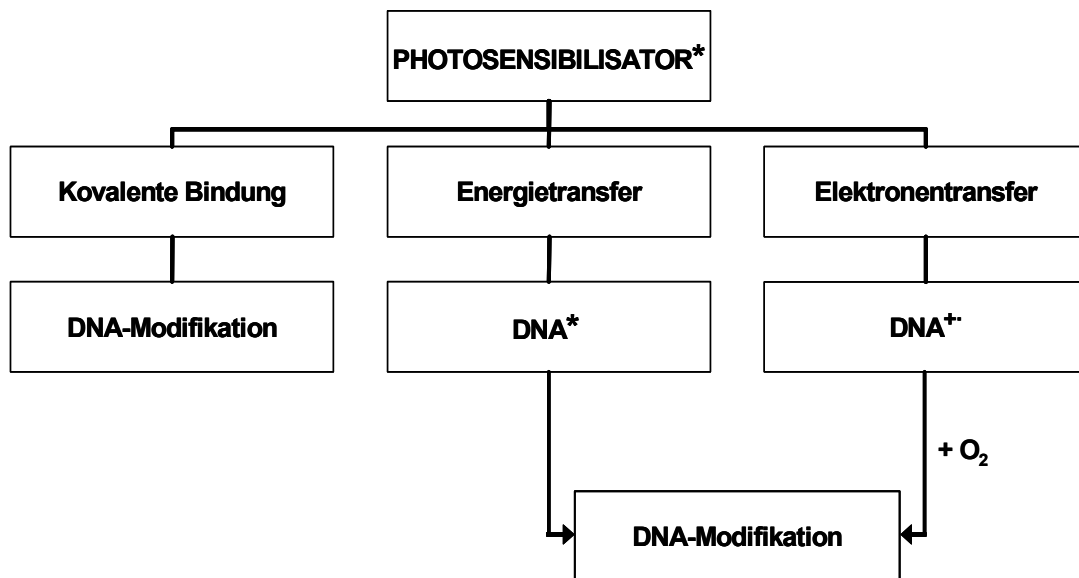


Abb. 2.4: Induktion von DNA-Modifikationen durch eine Typ-I-Reaktion (nach Epe, 1998).

Dabei kann der Photosensibilisator direkt kovalent an die DNA binden, die DNA in einen energetisch höheren Zustand versetzen oder mittels eines Eielektronentransfers ein DNA-Radikal erzeugen, was schließlich auch in einer DNA-Modifikation resultiert.

Die energetisch schwächeren Strahlenarten, wie die UVA-Strahlung oder das sichtbare Licht hingegen, sind nicht in der Lage ihre Energie direkt auf DNA-Moleküle zu übertragen. Stattdessen kann die Strahlungsenergie von einem Photosensibilisator absorbiert werden, der dann (wie zum Beispiel Ro19-8022, 2.3.6) in einer Typ-II-Reaktion zunächst mit molekularem Sauerstoff (O_2) als Zwischenstufe reagiert (Abb. 2.5).

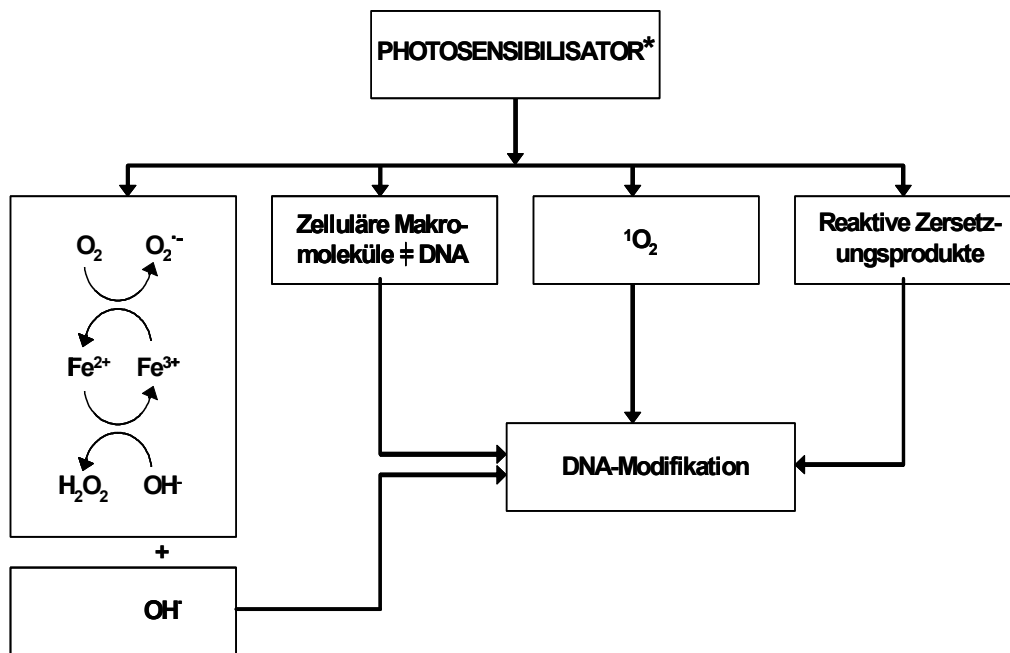


Abb. 2.5: Induktion von DNA-Modifikationen durch eine Typ-II-Reaktion (nach Epe, 1998).

Auf diese Weise werden Singulett-Sauerstoff (2.3.4), beziehungsweise Superoxidanion-Radikale (2.3.1) generiert, aus denen wiederum intrazellulär mit Hilfe von Übergangsmetallionen (Cu^{2+} , Fe^{3+}) in einer Haber-Weiss-Reaktion Wasserstoffperoxid und hochreaktive Hydroxylradikale entstehen können.

2.3.5.2 Generierung oxidativen Stresses durch UVA-Strahlung

Es ist seit langem bekannt, dass UVA-Strahlung tatsächlich nach dem in 2.3.5.1 Mechanismus in einem Wellenlängenbereich von 315 - 390 nm (Maximum bei 365 nm) reaktive Sauerstoffspezies (ROS) induzieren kann. Dabei entsteht hauptsächlich in einer Typ-II-Reaktion Singulett-Sauerstoff (1O_2) (2.3.4) und in wesentlich geringerem Umfang Superoxidanion-Radikale (ebenfalls über eine Typ-II-Reaktion) (Runger et al., 1995; Sato et al., 1995; Cadet et al., 1997; Zhang et al., 1997). Aus diesen kann dann zusammen mit Cu-, oder Fe-Ionen in einer Haber-Weiss-Reaktion Wasserstoffperoxid (H_2O_2) entstehen (2.3.2). Die biologische Konsequenz der ROS zeigt sich darin, dass vor allem Singulett-Sauerstoff (1O_2) in der Lage ist, DNA-sequenzunabhängig 7,8-Dihydro-8-oxo-guanin (8-oxoG) zu

induzieren (Ito and Kawanishi, 1997; Wamer and Wei, 1997; Cadet et al., 2002; Hiraku et al., 2007). Ebenso können die aus H_2O_2 entstehenden Hydroxylradikale (OH^\cdot) 8-oxoG generieren (Sato et al., 1995).

Darüberhinaus zeigen neuere Untersuchungen und auch DNA-Schadensprofile von humanen Melanomzellen und Hautfibroblasten in dieser Arbeit (Abb.), dass die dominierende DNA-Läsion nach Bestrahlung mit UVA, Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPDs) sind (Ikehata et al., 2003; Rochette et al., 2003; Besaratinia et al., 2005; Cadet et al., 2005). Allerdings ist ihre Reparaturgeschwindigkeit im Vergleich zu UVB-induzierten CPDs verlangsamt (Mouret et al., 2006). Eine Erklärung dafür könnte in einem unterschiedlichen Entstehungsmechanismus begründet sein. Denn es wird vermutet, dass UVA-induzierte CPDs eher durch einen Triplet-Energie Transfermechanismus als durch einen direkten Anregungsprozeß induziert werden, wofür das völlige Fehlen von (6-4)Photoprodukten ein möglicher Hinweis sein könnte.

2.3.5.3 *Generierung oxidativen Stresses durch sichtbares Licht*

Bereits vor längerer Zeit konnte gezeigt werden, dass sichtbares Licht in Bakterien ein ähnliches DNA-Schadensprofil wie Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) induziert (Epe et al., 1989). Darüberhinaus ist auch seit längerem bekannt, dass die durch sichtbares Licht induzierte, dominierende oxidative DNA-Läsion das 7,8-Dihydro-8-oxo-guanin (8-oxoG) ist, wobei die Bildung von 8-oxoG ein zweites Maximum zwischen 400 und 450 nm aufweist (Epe et al., 1993c; Pflaum et al., 1994; Cadet et al., 1997). Diese Fakten lassen nun mechanistisch auf eine Generierung von Singulett-Sauerstoff über eine Typ-II-Reaktion schließen, wobei ein endogener Phototsensibilisator (endogenes Chromophor) durch sichtbares Licht angeregt wird und diese Energie dann auf molekularen Sauerstoff überträgt (Abb.) (Cadet et al., 1997). Allerdings ist dieser Effekt limitiert durch eine Erschöpfung des dabei angeregten endogenen Chromophores – man spricht in diesem Zusammenhang von einem sogenannten „Photobleaching-Effekt“ (Pflaum et al., 1998). Neben den bisher genannten DNA-Modifikationen können zudem auch DNA-Protein-crosslinks induziert werden (Cadet et al., 1992). Als Folge einer mehrfachen Bestrahlung menschlicher Melanomzellen und Hautfibroblasten mit reinem sichtbarem Licht, konnte zudem eine erhöhte Zahl von Mikrokernen als Hinweis auf genotoxische Prozesse nachgewiesen werden (Hoffmann-Dorr et al., 2005).

2.3.6 Generierung oxidativen Stresses durch Ro19-8022

Die leuchtend dunkelgelbe Verbindung mit dem internen Namen Ro19-8022 bezeichnet eine polare Substanz, deren systematischer Name [R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl)carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol lautet (siehe Abb. 2.6).

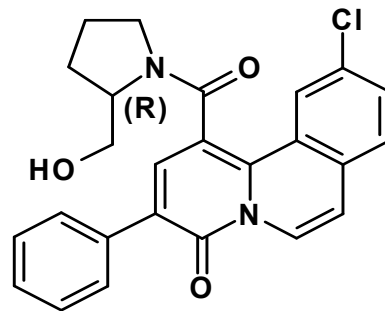


Abb. 2.6: Ro19-8022.

Von der Firma Hoffmann-La Roche als mögliches neues Tranquilans entwickelt stellte sich jedoch relativ schnell heraus, dass die Substanz in Kombination mit sichtbarem Licht mutagenes Potential im Ames-Test zeigte. Daher folgten zellfreie Untersuchungen mittels des PM2-Assays, die ein für Singulett-Sauerstoff typisches Schadensprofil nachwiesen (Abb. 2.7) (Epe and Hegler, 1994; Will, 1995).

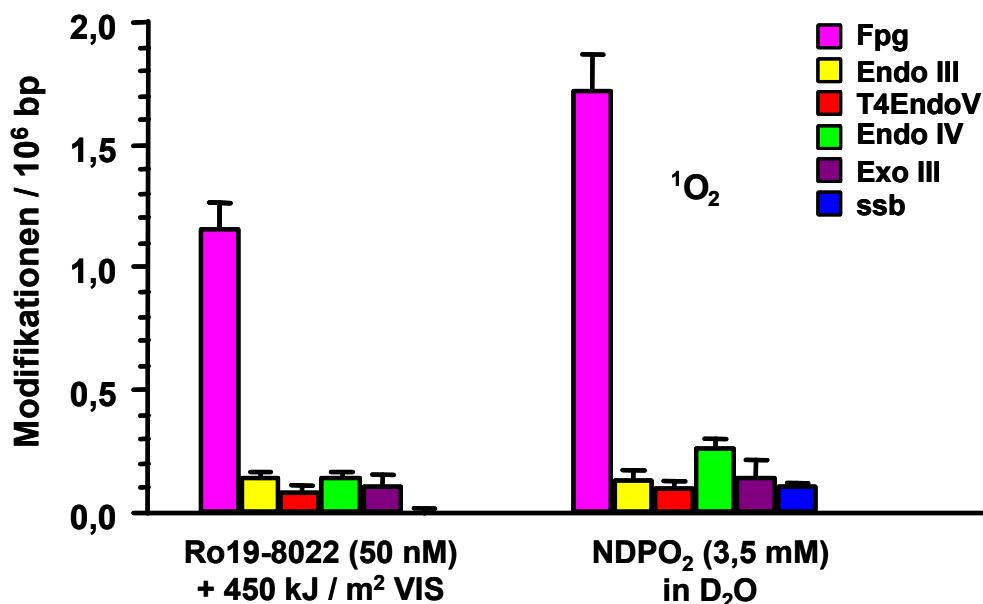


Abb. 2.7: Schadensprofil von Ro19-8022 plus Licht und NDPO₂ in PM2-Bakteriophagen-DNA

Die Schädigung der PM2-DNA erfolgte entweder mit Ro19-8022 (50 nM) und nachfolgender Bestrahlung mit sichtbarem Licht für 20 min [225 kJ/m²] in PBS/CMF oder durch Inkubation mit der chemischen Singulett-Sauerstoffquelle NDPO₂ (3,5 mM) in D₂O. Die Quantifikation erfolgte mit Hilfe des PM2-Relaxationsassays (Will, 1995).

Zur Kontrolle wurde mit NDPO₂, einer Substanz, die in der Lage ist Singulett-Sauerstoff zu generieren, ein Vergleichsschadensprofil bestimmt, anhand dessen deutlich wird, dass Singulett-Sauerstoff für die Generierung der oxidativen DNA-Modifikationen verantwortlich ist (Will, 1995).

Desweiteren konnte in Zellen (AS52) mit Hilfe der Alkalischen Elution und Fpg-Protein ein sehr ähnliches Schadensprofil detektiert werden wie es bereits aus zellfreien Untersuchungen bekannt war (Will, 1995). Die dabei durch Bestrahlung von Ro19-8022 vorwiegend erzeugte DNA-Modifikation war 8-oxoG. Einzelstrangbrüche wurden bei der verwendeten Konzentration von 50 nM nicht zusätzlich induziert. Anhand dieser Datenlage konnte daher geschlossen werden, dass Ro19-8022 eine photosensibilisierende Verbindung darstellte, mit Absorptionsmaxima bei 250, 315 und 425 nm (Will, 1995). Darüberhinaus konnte sowohl in Säugerzellen als auch in E. coli-Bakterien nachgewiesen werden, dass Ro19-8022 in Kombination mit sichtbarem Licht mutagen ist. Für die E. coli-Bakterien konnte gezeigt werden, dass die Mutationen zu 50 % auf 8-oxoG beruhten (Will et al., 1999a). Zudem wurden in Säugerzellen nach dem oben beschriebenen Schädigungsprotokoll Mikrokerne induziert (Will et al., 1999b).

Frühere Untersuchungen der Zytotoxizität mit Hilfe des Proliferationstests (4.2.9.1) zeigten, dass 50 nM Ro19-8022 und eine nachfolgende Bestrahlung mit sichtbarem Licht keinen zytotoxischen Effekt auf immortalisierte Mausembryofibroblasten (F11.1) haben (unveröffentlichte Daten von I.Eckert und L.Weidenfeller). Darüberhinaus wurde gezeigt, dass nach Schädigung durch Ro19-8022 plus Licht in einer Konzentration von 200 nm zwar keine Proliferation mehr stattfindet, aber die Zellen noch in der Lage sind in Zellkulturflaschen anzuwachsen (Bercht et al., 2007).

2.3.7 Generierung alkylierender DNA-Schäden durch Behandlung mit MMS

Die elektrophile Verbindung Methylmethansulfonat (MMS) (Abb. 2.8) alkyliert bevorzugt über einen S_N2-Mechanismus Guanin an Position N-7.

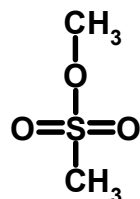


Abb. 2.8: Struktur von Methylmethansulfonat (MMS).

Die Alkylierung an N-7 hat zur Folge, dass die Bindung zwischen DNA-Base und Zuckerphosphat-Gerüst der DNA leicht hydrolytisch zum Zuckerhalbacetal und 7-

Methylguanin gespalten werden kann. Es entsteht eine AP-Läsion, die entweder spontan oder enzymatisch mittels des APE1-Proteins der Basenexzisionsreparatur in einen Einzelstrangbruch (ssb) überführt werden kann.

2.4 Biologische Auswirkung oxidativen Stresses auf die Zelle

In diesem Kapitel sollen außer der für diese Arbeit essentiell wichtigen Nukleinsäureoxidation auch die intrazelluläre Lipidperoxidation und die Proteinoxidation näher beleuchtet werden. Es wird vermutet, dass bei den meisten degenerativen Erkrankungen, wie zum Beispiel der Arteriosklerose oder der Rheumatoiden Arthritis, oxidierte Lipide und Proteine einen Beitrag zu einer Krankheitsprogression leisten (Feher et al., 1997; Shinomiya et al., 2002; Kovtun et al., 2007).

2.4.1 Oxidative DNA-Modifikationen

Nach heutigem Kenntnisstand sind mehr als 100 verschiedene DNA-Basenmodifikationen identifiziert (Halliwell and Aruoma, 1991; Boiteux et al., 1992; Dizdaroglu, 1992; Nackerdien et al., 1992); Dizdaroglu, 1992). Ihr Spektrum reicht dabei von direkt, durch hochreaktive ROS verursachten Einzel- oder Doppelstrangbrüchen, über Basenmodifikationen und AP-Läsionen (basenfreien Stellen), bis hin zu DNA-Protein- oder DNA-DNA-Quervernetzungen (Epe, 1996). Einige, für diese Arbeit wichtige Modifikationen sind in Abb. 2.9 gezeigt.

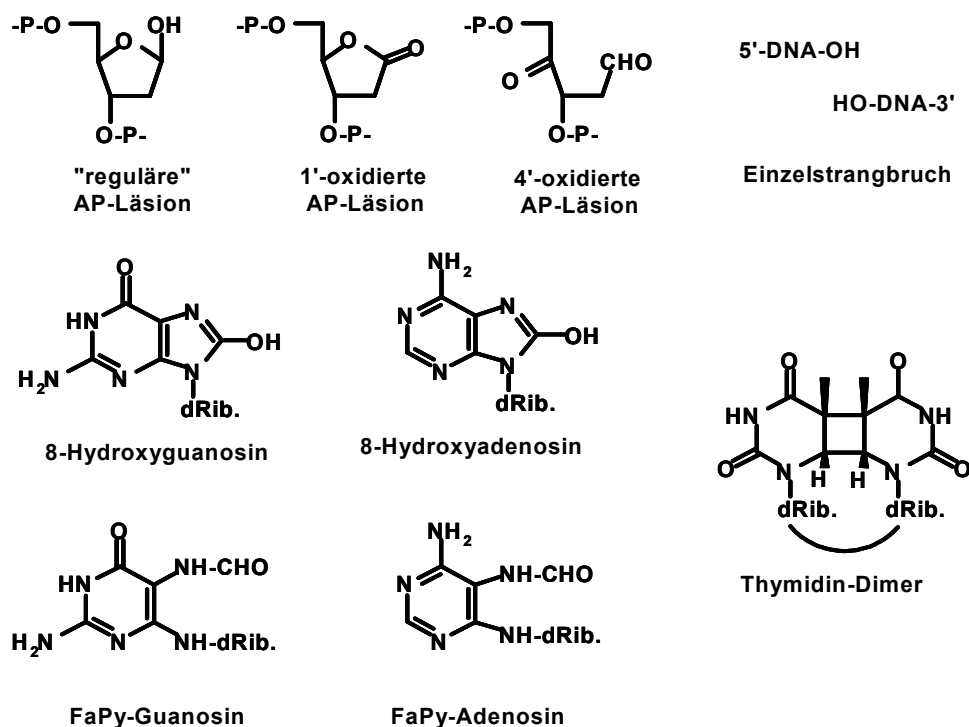


Abb. 2.9: Einige für die vorliegende Arbeit relevante DNA-Modifikationen.

7,8-Dihydro-8-oxo-guanin (8-oxoG), die wahrscheinlich am häufigsten vorkommende und zugleich eine der mutagensten oxidativen DNA-Modifikationen, kann auf zwei Wegen gebildet werden: Zum einen durch direkten Angriff eines Hydroxylradikals an Position C-8 des Guanins (Epe, 1996; Loft and Poulsen, 1996) oder zum anderen durch das Einwirken von Singulett-Sauerstoff auf Guanin (Devasagayam et al., 1991; Halliwell and Aruoma, 1991). Außerdem kann aus dem radikalischen Zwischenprodukt durch Ringöffnung des Imidazols das sogenannte FaPy-Guanin (2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin) entstehen (Asagoshi et al., 2000a; Asagoshi et al., 2000b; Cadet et al., 2000). Die Bildung von 8-Hydroxyadenosin und FaPy-Adenosin verläuft analog aber in wesentlich geringerem Umfang, da Guanin von allen 4 DNA-Basen das niedrigste Oxidationspotential aufweist (Huttermann, 1982).

Die Bildung von AP-Läsionen kann dadurch erklärt werden, dass Wasserstoff von den Desoxyriboseresten radikalisch entfernt wird. Unter anderem können dabei auch Einzel- oder Doppelstrangbrüche entstehen (Teoule, 1987; Epe et al., 1996). Durch spontane Depurinierung entstehen zu einem kleinen Teil auch nicht oxidierte AP-Läsionen (Lindahl, 1993).

2.4.2 Lipidperoxidation

Unter Lipidperoxidation versteht man die radikalische Oxidation von ungesättigten Fettsäuren. Hierbei entstehen in aeroben Zellen durch reaktive Sauerstoffspezies organische Sauerstoffverbindungen mit teilweise radikalischem Charakter (Schieberle et al., 1981). Diese Intermediate, wie zum Beispiel Alkoxy- ($\text{RO}\cdot$), Hydroperoxyradikale ($\text{ROO}\cdot$), α - β -ungesättigte Carbonylverbindungen oder Malondialdehyd, können nun ihrerseits Phospholipide der Zell- oder Kernmembran angreifen und beschädigen (Esterbauer et al., 1992; Cadet et al., 2003). Mitunter können dadurch als Folgereaktion auch DNA-Modifikationen (z.B. Ethenoaddukte) durch direkte Reaktion von α - β -ungesättigte Carbonylverbindungen mit der DNA entstehen (Bartsch and Nair, 2000) oder aber die Zelle aufgrund des Membranschadens zerstört werden (Halliwell and Gutteridge, 1984a; Rowley et al., 1984).

2.4.3 Proteinoxidation

Ebenso wie Lipide oder Nukleinsäuren werden auch Proteine sehr leicht von reaktiven Sauerstoffspezies oxidiert oder strukturell verändert. Zum einen sind sehr häufig redoxempfindliche funktionelle Gruppen, wie beispielsweise SH- oder OH-Gruppen, Ziel einer solchen Oxidation durch reaktive Sauerstoffspezies, wodurch

die Funktion der Proteine entweder eingeschränkt oder aber ganz verloren gehen kann. Zum anderen wird das Proteine nach einer Oxidation oft verstärkt durch das Proteasom abgebaut (Grune et al., 1997; Merker and Grune, 2000) – was indirekt auch eine Aktivitätsminderung zur Folge hat (Klotz et al., 2003). Außerdem kann durch den Angriff reaktiver Sauerstoffspezies die Tertiärstruktur verändert und so das betreffende Protein inaktiviert werden (Merker and Grune, 2000).

2.5 Auswirkungen oxidativer DNA-Modifikationen

Wie bereits in Kapitel 2.4 erörtert, können aufgrund oxidativen Stresses innerhalb der Zelle eine Vielzahl von wichtigen Strukturen geschädigt werden. Um entweder voll funktionsfähig weiter existieren zu können oder aber sich korrekt zu replizieren, muß die Zelle versuchen, den eingetretenen Schaden zu reparieren. Hierbei bestehen drei Optionen, die die Evolution im Lauf der Zeit zum funktionsfähigen Fortbestehen eines Organismus etabliert hat.

Option eins besteht darin, dass die Zelle den entstandenen Schaden vollständig und fehlerfrei repariert. Sie kann sich nun gefahrlos für den Gesamtorganismus replizieren. Option zwei kann von der Zelle gewählt werden, wenn der induzierte Schaden zu groß ist und die Reparaturkapazitäten überlastet sind – sie geht in die Apoptose. Option drei ist von allen zur Wahl stehenden Optionen die schlechteste. Hierbei wird nur ein Teil des induzierten Schadens von der Zelle erkannt oder aber fehlerhaft repariert. Auf diese Weise können sich bei der Replikation DNA-Modifikationen als Mutationen manifestieren – ein irreversibler Schritt im Mehrstufenprozeß der Kanzerogenese (Neumann, 1992).

Nachfolgend sollen einige, für die vorliegende Arbeit wichtige DNA-Modifikationen näher charakterisiert werden.

8-oxoG: Wie bereits schon teilweise in 2.4.1 erörtert, ist 7,8-Dihydro-8-oxo-guanin (8-oxoG) aufgrund des niedrigen Oxidationspotentials von Guanin wahrscheinlich die mengenmäßig am häufigsten vorkommende oxidative DNA-Basenmodifikation. Zudem besitzt sie ein hohes prämutagenes Potential, da während der Replikation häufig Fehlpaarungen von 8-oxoG mit Adenin anstelle von Cytosin stattfinden können (Shibutani et al., 1991; Tchou et al., 1991; Tchou and Grollman, 1993). Folgen darauf weitere Replikationsschritte der Zelle, so manifestiert sich eine sogenannte G:C → T:A-Transversion (Klein et al., 1992; Moriya and Grollman, 1993; Kuipers et al., 1999). Bestimmungen der Mutationsfrequenz in Säugerzellen mittels Einbringung eines 8-oxoG tragenden, einzelsträngigen Vektors in die Zelle, ergaben eine Mutationshäufigkeit von 2,5 – 4,8 % (Moriya, 1993). Auch hier konnte gezeigt werden, daß deutlich mehr als 70 % der gefundenen Mutationen auf G:C → T:A-Transversionen zurückzuführen sind. Die verhältnismäßig niedrige Mutagenität

spiegelt jedoch die Effizienz der vorhandenen DNA-Reparaturmechanismen wieder (mismatch-Reparatur - 2.6.5, Basenexzisionsreparatur - 2.6.2). Trotz allem liegt aber die Mutagenität von 8-oxoG deutlich über der anderer DNA-Basenmodifikationen.

Formamidopyrimidine: Sowohl für FaPy-Guanin als auch FaPy-Adenin konnte kein mutagenes Potential nachgewiesen werden. Ihre Anwesenheit innerhalb der DNA führt zu einem Abbruch der Replikation durch Blockade von Polymerase I (O'Connor et al., 1988; Laval, 1996), wodurch sie für die Zelle zytotoxisch sind (Tudek et al., 1992; Tudek, 2003).

Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPDs): Sollten in der DNA CPDs induziert werden, so führt dies zu Helixdistortionen. Daher werden diese auch als „bulky-lesions“ bezeichnet. Aufgrund ihrer nicht-codierenden Eigenschaften kann ihre Anwesenheit sowohl die DNA-Replikation als auch die DNA-Transkription hemmen (Witkin, 1976; Lawrence et al., 1990a; Borden et al., 2002).

AP-Läsionen: Es existieren verschiedene mögliche Szenarien, wie AP-Läsionen an der Mutagenese beteiligt sind (Epe, 1996; Yu et al., 2003). Die erste Möglichkeit besteht in einer Basenfehlpaarung während der Replikation, was in Bakterien zu G:C → T:A Transversionen führen kann (Lawrence et al., 1990b; Klinedinst and Drinkwater, 1992; Neto et al., 1992). Die zweite Möglichkeit besteht in einer spontanen Hydrolyse oder enzymatischen Entfernung einer DNA-Base, wodurch es dann zu Einzelstrangbrüchen kommen kann. Diese besitzen, falls sie nicht repariert werden, ebenfalls mutagenes Potential (Yu et al., 2003).

Einzelstrangbrüche (ssb): Einzelstrangbrüche werden wegen ihrer Neigung in einen Doppelstrangbruch überzugehen, sehr schnell von der Zelle repariert. Dem dabei ablaufenden Prozess stehen zwei verschiedene Wege zu Verfügung (Churchill et al., 1991a; Churchill et al., 1991b; Caldecott, 2001; Caldecott, 2003b). Zudem besitzen Einzelstrangbrüche ein mutagenes Potential (Churchill et al., 1991a; Epe, 1996; Caldecott, 2003a).

2.6 DNA-Reparaturmechanismen

Wie bereits in Kapitel 2.3 erwähnt, ist die Zelle eines lebenden, sauerstoffkonsumierenden Organismus zu jeder Zeit den Angriffen reaktiver Sauerstoffspezies ausgesetzt, wodurch Lipide, Proteine aber vor allem auch Nukleinsäuren oxidiert werden können. Ohne effektive Beseitigung würden diese oxidativen Schäden relativ schnell massive Funktionsverluste auf Proteinebene, Membranschäden, Mutationen und final den Zelltod nach sich ziehen (siehe 2.4). Daher bestehen in nahezu allen lebenden Organismen hochkonservierte Verteidigungs- und Reparaturmechanismen, um nach Möglichkeit eine fehlerfreie und vollständige Beseitigung der auftretenden Schäden zu gewährleisten. Ein

besonderes Interesse besteht hierbei an der Aufrechterhaltung der genomischen Integrität, was sich allein in der Zahl von über 150 verschiedenen DNA-Reparaturgenen widerspiegelt (Wood et al., 2005). Um das äußerst komplexe und faszinierende Zusammenspiel der unterschiedlichen Gene und Proteine in ihren jeweiligen DNA-Reparaturwegen und die grenzübergreifende Kooperation der verschiedenen Reparaturwege zu erforschen und zu verstehen (Slupphaug et al., 2003; Kovtun and McMurray, 2007), werden häufig einfachere Organismen wie Bakterien oder Hefen als Studienobjekte herangezogen. Die dabei gewonnenen Erkenntnisse können dann für Homologiesuchen in eukaryotischen Organismen genutzt werden (Samson et al., 1986).

In den nachfolgenden Kapiteln sollen nun einige der wichtigsten DNA-Reparaturmechanismen näher erläutert werden. Diese können dabei in folgende Gruppen gegliedert werden:

- Direkte DNA-Reparatur (Schadensreversion)
- Basenexzisionsreparatur (BER)
- Nukleotidexzisionsreparatur (NER)
- Postreplikative DNA-Reparatur (Mismatch-Reparatur)

2.6.1 Direkte DNA-Reparatur (Schadensreversion)

Eine direkte Reversion von DNA-Schäden kommt nach heutigem Kenntnisstand relativ selten vor. Seit längerem ist bekannt, dass zum Beispiel in menschlichen Zellen alkylierte DNA-Basen direkt durch eine O⁶-Methylguaninmethyltransferase (MGMT) regeneriert werden können. Dabei wird von dem Protein der an der DNA-Base kovalent gebundene Methylrest (O⁶-Methylguanin) entfernt und auf enzymeigene Cysteinreste übertragen (Pegg, 2000; Wibley et al., 2000; Xu-Welliver et al., 2000). Diese Reaktion verläuft irreversibel, da das gebildete S-Methylcystein chemisch sehr stabil ist. Somit wird das Protein inaktiviert, kann nicht mehr regeneriert werden und wird über das Proteasom abgebaut.

Vor einigen Jahren konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der DNA-Dioxygenasen hABH2 und hABH3 Methylgruppen von 1-Methyladenin (1meA) und 3-Methylcytosin (3meC) durch oxidative Demethylierung entfernt werden können (Duncan et al., 2002; Yu et al., 2006). Ob dabei als unerwünschtes Nebenprodukt oxidierte DNA-Modifikationen anfallen können, wird noch diskutiert (Ringvoll et al., 2006).

Desweiteren existiert in Bakterien, Pilzen, Pflanzen und einigen Säugern die Möglichkeit, durch UV-Strahlung induzierte Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPDs) enzymatisch zu revertieren. Das dabei zum Einsatz kommende Enzym wird als Photolyase bezeichnet, die in Gegenwart von blauem Licht die zwei kovalent

verbundenen Pyrimidine wieder in zwei separate Basen spalten kann (Kim and Sancar, 1993; Mitani and Shima, 1995; van de Poll et al., 2002).

2.6.2 Basenexzisionsreparatur (BER)

Wie der Name schon verrät, ist das Substrat dieses DNA-Reparaturweges eine modifizierte DNA-Base, die enzymatisch erkannt, entfernt und ersetzt wird. Bei den Substraten der von der BER erkannten und prozessierten DNA-Basenmodifikationen handelt es sich um alkylierte, desaminierte, durch ROS oxidierte oder fragmentierte DNA-Basen (siehe 2.4.1) aber auch um induzierte Einzelstrangbrüche. Voluminöse, zu Helix-Distortionen führende Modifikationen (CPDs, siehe auch Kapitel 2.5), Doppelstrangbrüche oder „clustered lesions“ werden jedoch nicht von der BER repariert.

Grundsätzlich besteht die Reparatur jeder einzelnen modifizierten Base aus einem mehrstufigen Prozeß (siehe Abb. 2.10). Der initiierende Schritt bei beiden Varianten der BER (short-patch oder long-patch) ist immer die Erkennung und Bindung der substratspezifischen DNA-Glykosylase an die jeweilige DNA-Modifikation (Krokan et al., 1997; Lindahl and Wood, 1999; Gros et al., 2002). Dann wird diese durch hydrolytische Spaltung der N-glykosidischen Bindung zwischen modifizierter Base und Desoxyribose des Zuckerphosphatrückrats der DNA entfernt. Es ist nun eine sogenannte AP-Läsion entstanden, die jetzt im Falle einer monofunktionellen DNA-Glykosylase (wie zum Beispiel der Uracil-DNA-Glykosylase, UNG / (Akbari et al., 2004; Pettersen et al., 2007) von der AP-Endonuklease (APE1, hAP1) in einen Einzelstrangbruch mit 3'-OH-Gruppe und einem 5'-Desoxyribosephosphat-Rest (5'-dRP) überführt wird (Barzilay et al., 1995a; Barzilay et al., 1995b; Masuda et al., 1998; Dianov et al., 2003). Der aktivierende Impuls wird APE1 dabei von dem Plattformprotein XRCC1 vermittelt (Vidal et al., 2001a).

Handelt es sich aber um eine bifunktionelle Glykosylase, wie zum Beispiel der 7,8-Dihydro-8-oxo-guanin-DNA-Glykosylase (hOGG1), so erfolgt ebenfalls als erster Schritt die Erkennung und das Entfernen der modifizierten Base (8-oxoG). Dabei greift nun ein Lysinrest des aktiven Zentrums nukleophil die N-glykosidische Bindung zwischen DNA-Base und Zuckerphosphatrückrat an und formt dabei eine vorübergehende Schiff-Base. Nach Entfernung der defekten Base vollzieht das immer noch gebundene Enzym mit seiner Lyase-Funktion eine β -Elimination, die zu einem Strangbruch führt. Dabei wird ein 3'-phospho- α - β -ungesättigtes Aldehyd einerseits und andererseits ein 5'-Phosphatrest generiert (Scharer and Jiricny, 2001; Bhakat et al., 2006). Im Anschluß erfolgt auch hier wieder die Aktivierung der AP-Endonuklease (APE1), um eine 3'-OH-Gruppe zu erzeugen, damit im nächsten Schritt die Polymerase β (Pol β) ein korrektes Substrat vorfindet und ihre

Synthesearbeit aufnehmen kann. Zudem wird die koordinierte, ineinandergreifende Zusammenarbeit von Pol β und dem letzten Enzym der Kaskade, der Ligase III, durch das Plattformprotein XRCC1 vermittelt, das Bindestellen sowohl für Pol β als auch für Ligase III aufweist (Nash et al., 1997; Vidal et al., 2001a; Petermann et al., 2006; Nazarkina et al., 2007).

Wie bereits erwähnt, wird in der BER in den sogenannten short-patch- oder long-patch-pathway unterschieden. Im short-patch-pathway wird nur eine defekte DNA-Base entfernt. Sollte aber in der Zelle das 5'-Ende blockiert sein, so dass die Pol β sich nicht an ihr Substrat anlagern kann, können die Polymerasen δ und ϵ den long-patch-pathway initiieren. Hierbei werden 2 – 8 Nukleotide unter Verdrängung des alten Stranges von 5' nach 3' in die bestehende Lücke der DNA eingefügt. Nach Beendigung des Synthesevorgangs wird mit Hilfe der flap-Endonuklease (FEN1), unter Zuhilfenahme von PCNA (proliferating cell nuclear antigen) und PARP1 der alte, überstehende DNA-Strang abgeschnitten (Klungland and Lindahl, 1997; Gary et al., 1999a; Gary et al., 1999b; Matsumoto et al., 1999; Nilsen and Krokan, 2001; Le Page et al., 2003). Die verbleibende Lücke wird dann durch Ligase I, von PCNA an die Reparaturstelle vermittelt, geschlossen (Mackeeney et al., 1997).

Darüberhinaus können zusätzlich zu den DNA-Basenmodifikationen auch Einzelstrangbrüche mit einer 3'-blockierenden Gruppe, wie zum Beispiel Phosphoglykolaldehyde oder Phosphoglykolate, repariert werden (Demple and DeMott, 2002). Dabei wird durch die intrinsische 3'-Phosphodiesteraseaktivität der APE1 die 3'-blockierende Gruppe entfernt, damit die restliche Reparaturkaskade wie gewohnt ablaufen kann.

Nachfolgend werden einige aus Menschen, Hefen, Bakterien oder Bakteriophagen stammende DNA-Glykosylasen mit ihrer jeweiligen Substratspezifität näher vorgestellt: Sie fanden in der Alkalischen Elution und dem Cleavage-Assay Verwendung zur Quantifizierung der entsprechenden DNA-Modifikationen (Epe et al., 1993a; Epe et al., 1993c; Hegler et al., 1993).

hOGG1: Die 7,8-Dihydro-8-oxo-guanin-DNA-Glykosylase (hOGG1) ist eine bifunktionelle Glykosylase, die zusätzlich zur Glykosylase- noch eine AP-Lyasefunktion besitzt (Nash et al., 1996; Girard et al., 1997; Boiteux and Radicella, 2000). Das Erkennungsspektrum für modifizierte DNA-Basen erstreckt sich von 7,8-Dihydro-8-oxo-guanin (8-oxoG), über FaPy-Guanin bis hin zu AP-Läsionen (Dherin et al., 1999). Es stellte sich heraus, dass von hOGG1 durch alternatives Splicing zwei verschiedene Formen entstehen. Eine Sequenzanalyse ergab, dass die ersten 316 Aminosäuren identisch sind, die α -Form jedoch am C-terminalen Ende eine sogenannte „nuclear localisation sequence“ (NLS) trägt (Boiteux and Radicella, 1999; Boiteux and Radicella, 2000). Dadurch wird gewährleistet, dass die α -Form im

Zellkern anzutreffen ist, wohingegen die β -Form in die Mitochondrien geleitet wird (Takao et al., 1998; Boiteux and Radicella, 1999).

Fpg: Das Fpg-Protein ist eine bifunktionelle Glykosylase, isoliert aus dem Bakterium *E. coli*, die neben der Glykosylasefunktion zusätzlich mit einer AP-Lyase und einer 5'-dRPasefunktion ausgestattet ist (Bailly et al., 1989; O'Connor and Laval, 1989; Boiteux et al., 1990; Graves et al., 1992). Es handelt sich hierbei um das funktionelle Homolog des humanen Ogg1-Enzyms (hOGG1). Das Erkennungsspektrum modifizierter DNA-Basen reicht dabei von 7,8-Dihydro-8-oxo-guanin (Orimo et al., 2004) zu FaPy-Guanin und FaPy-Adenin (Coste et al., 2004), die im Anschluß mit der Glykosylasefunktion aus dem DNA-Strang entfernt werden (Laval et al., 1990; Jurado et al., 1998; D'Ham et al., 1999). 8-Hydroxyadenin wird nicht erkannt. Mit Hilfe der AP-Lyasefunktion können zudem AP-Läsionen detektiert und die DNA 3' und 5' von der Läsion gespalten werden, so dass ein Einzelstrangbruch mit 3'-OH-Gruppe und ein 5'-Phosphorrest entsteht. Die Bindung an die DNA und die katalytische Aktivität werden über ein Zink-Finger-Motiv vermittelt (Boiteux et al., 1987).

APE1: Die AP-Endonuklease 1 hat ein vielfältiges Aktivitätsspektrum, wobei die AP-Endonukleaseaktivität während der BER wohl die wichtigste Funktion darstellt (Bailly and Verly, 1989). Darüberhinaus interagiert sie mit ebenfalls an der BER beteiligten Enzymen, wie XRCC1, PCNA oder FEN1. Über XRCC1 ist zudem bekannt, dass es die Aktivität von APE1 steigert. Außerdem wird durch APE1 die Aktivität verschiedener DNA-Glykosylasen erhöht, wie zum Beispiel der hOGG1-turnover (Vidal et al., 2001b). Weitere enzymatische Funktionen sind eine 3' \rightarrow 5' Exonuklease-, eine Phosphodiesterase-, eine Phosphatase- und eine 3'-Mismatch-Exonukleasefunktion.

APN1: Das Homolog zu APE1 aus Hefen, APN1 (Ramotar et al., 1993), erkennt AP-Läsionen und kann diese mit seiner AP-Endonukleasefunktion, die 3'-Phosphatase- und 3'-Phosphoglykolaldehyd-Diesteraseaktivität besitzt, reparieren (Ramotar et al., 1991; Bogliolo et al., 2002). Darüberhinaus können von dem Enzym mit seiner 3'-Endonuklease- und seiner 3'-Phosphoglykolaldehyd-Diesterasefunktion 3'-blockierende Enden entfernt werden (Boiteux and Guillet, 2004).

T4EndoV: Die T4Endonuklease V wird aus dem Bakteriophagen T4 gewonnen und zur Quantifizierung von CPDs eingesetzt. Sie besitzt neben einer Glykosylasefunktion zusätzlich noch eine davon unabhängige AP-Lyasefunktion. Mit der Glykosylasefunktion wird hydrolytisch die N-glykosidische Bindung eines der beiden Pyrimidine gespalten und anschließend mit Hilfe der AP-Lyase die Phosphodiesterbindung zwischen den beiden Pyrimidinen gelöst. Auf diese Weise entstehen 3'-OH- und 5'-OH-Enden auf der 3'-Seite der AP-Läsion.

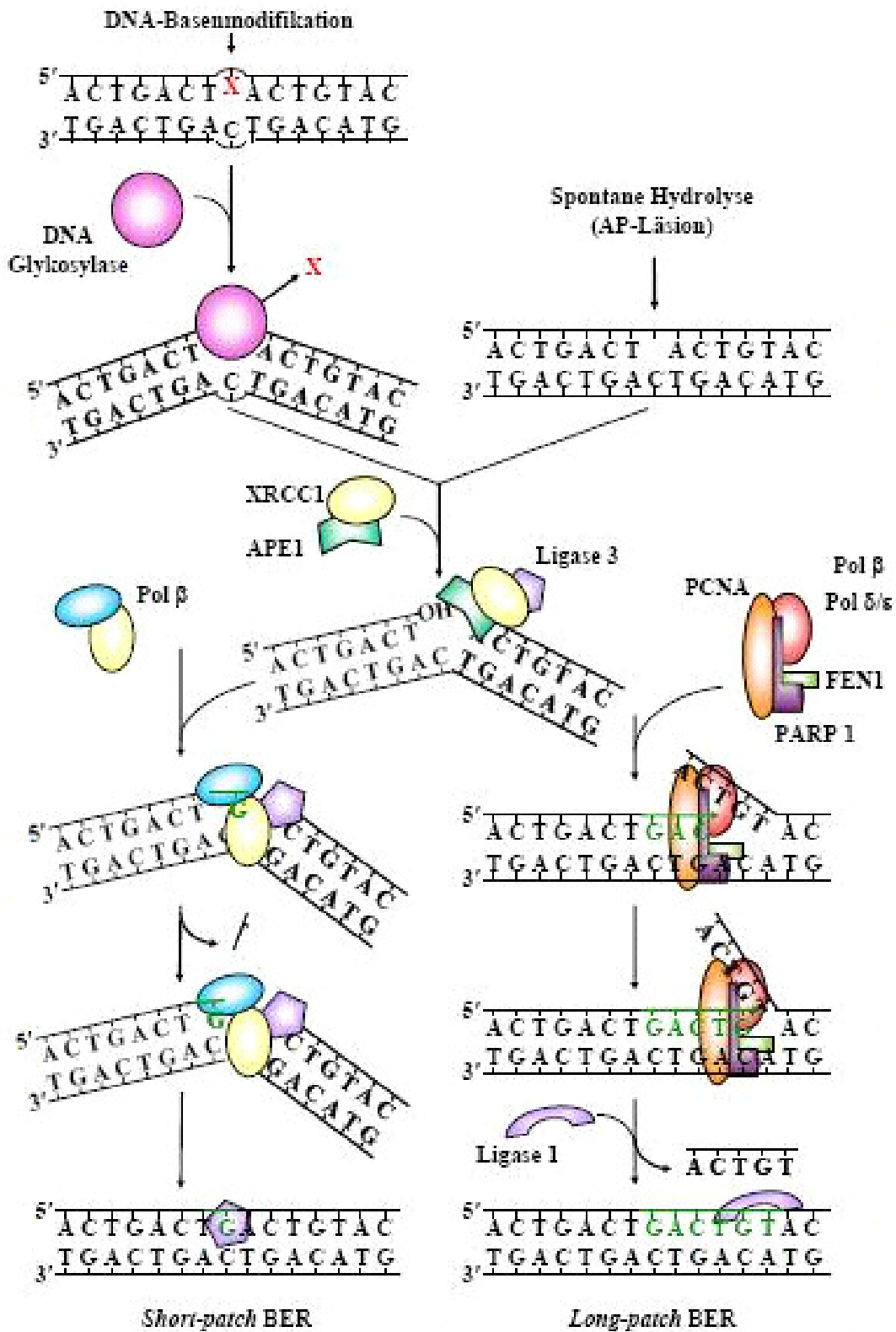


Abb. 2.10: Die Basenexzisionsreparatur (BER) in Säugerzellen - modifiziert nach Flohr (Flohr, 2003).

2.6.3 Nukleotidexzisionsreparatur (NER)

Im Gegensatz zur BER ist die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) für die Reparatur voluminöser, die Struktur der DNA-Helix störender DNA-Modifikationen verantwortlich. Zu diesen sogenannten „bulky lesions“ werden durch UV-Strahlung induzierte Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPDs), (6-4)-Photoprodukte, aber auch verschiedene Alkylierungsprodukte an der DNA gezählt, die in der Lage sind die Replikation oder Transkription zu blockieren. Aufgrund dieses breiten Spektrums an zu erkennenden DNA-Schäden, ist die NER prädestiniert für die Reparatur von Schäden, die durch exogene Agentien entstehen. Prinzipiell ähneln sich BER und NER grob in dem Ablauf der Reparatur von DNA-Modifikationen. Der erste Schritt besteht bei beiden Reparaturwegen aus der Erkennung der jeweiligen die DNA-Helix beeinträchtigenden DNA-Modifikation(en). Dann erfolgt in beiden Fällen deren Entfernung, direkt im Anschluß die Neusynthese des DNA-Strangs und abschließend die Schließung der Lücke mittels einer Ligase.

Innerhalb dieses Reparaturweges wird außerdem noch in zwei unterschiedliche Formen der NER unterschieden. Zum einen gibt es die „global genome“ NER (GGR), die sowohl transkribierte als auch nicht transkribierte Regionen des Genoms nach Schäden absucht und diese dann repariert. Zum anderen existiert die Transkriptionsgekoppelte NER (TCR), die ihre Arbeit nur nach Blockade der RNA-Polymerase II (RNA Pol II) in transkribierten Regionen aufnimmt.

2.6.3.1 „Global Genome“ NER (GGR)

Die Schadenserkenkung der GGR erfolgt initial durch den XPC-hHRAD23-Komplex (XPC), was eine Konformationsänderung der DNA auslöst, wodurch dann XPA und RPA ebenfalls an den Schaden binden können. Im nächsten Schritt erfolgt die schrittweise Rekrutierung von TFIIH (Svejstrup et al., 1995; Bhatia et al., 1996), den zwei DNA-Helikasen XPB und XPD, sowie den Endonukleasen XPG und ERCC1-XPF mit nachfolgender Inzision der DNA 3' und 5' neben der modifizierten Base (Klungland et al., 1999). Dabei wird ein Oligonukleotid von 24 – 32 Basen Länge herausgetrennt. Anschließend erfolgt komplementär zum Gegenstrang die Neusynthese des zu reparierenden DNA-Stranges durch den DNA-Polymerase- δ/ϵ -RPA-RFC-Komplex. Im letzten Schritt wird die verbliebene Lücke mit Hilfe der Ligase I verschlossen.

2.6.3.2 *Transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR)*

Im Gegensatz zur GGR erfolgt die Schadenserkenkung während der TCR nicht über XPC. Vielmehr ist die Blockade der RNA-Polymerase II durch eine voluminöse DNA-Modifikation der Auslöser, dass zusätzliche Proteine, wie zum Beispiel Csa und Csb, an die Schadensstelle rekrutiert werden (Friedberg, 1996). Dabei haben sie, neben einer zwischen der RNA-Pol II und anderen Proteinen vermittelnden Funktion noch die Aufgabe, die blockierte RNA-Pol II von der Schadensstelle zu entfernen. Ist dies erfolgt, können die gleichen Proteine wie bei der GGR nun den Schaden weiterprozessieren.

2.6.4 Einzelstrangbruchreparatur

Es gibt mehrere Möglichkeiten der Entstehung von Einzelstrangbrüchen (ssb) innerhalb des Genoms. Einerseits können beispielsweise durch γ -Strahlung reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in Form von Hydroxylradikalen entstehen und direkt den Bruch eines der DNA-Stränge verursachen. Andererseits können sie auch durch spontane Depurinierung mit nachfolgender Hydrolyse der Phosphodiesterbindung entstehen. Eine dritte Möglichkeit besteht darin, dass während der Reparaturprozesse der Basenexzisionsreparatur (BER) oder der Nuklelidexzisionsreparatur (NER) Einzelstrangbrüche als Reparaturintermediate auftreten – sozusagen indirekte Einzelstrangbrüche. Sollten Einzelstrangbrüche nicht repariert werden, besteht die Gefahr, dass aus ihnen bei der Replikation sehr rasch Doppelstrangbrüche mit wesentlich höherem mutagenem und zytotoxischem Potential resultieren können. Aus diesem Grund existieren schnelle und effiziente Reparaturmechanismen, so dass ihre Toxizität relativ gering ist. Die Reparatur indirekter Einzelstrangbrüche im Zuge der BER und der NER wurde bereits in Kapitel 2.6.2 und 2.6.3 erörtert. Sollten aber direkt in die DNA Einzelstrangbrüche induziert werden, oft durch Zuckerfragmentierung mit nachfolgender Abspaltung der DNA-Base, können diese auf zwei unterschiedlichen Wegen repariert werden – dem short-patch- oder dem long-patch-pathway (Abb. 2.11). In beiden Fällen fungiert die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP1) als hochsensibler Sensor, der den Einzelstrangbruch entdeckt, an ihn bindet und dadurch aktiviert wird. Infolgedessen beginnt die PARP1 nun negativ geladene ADP-Ribose-Polymere aus ADP-Ribose-Monomeren zu synthetisieren. Das gilt im nächsten Schritt für XRCC1 als Signal, um an die Schadensstelle zu diffundieren und den anwesenden Enzymen als Plattformprotein zu dienen.

Der restliche Verlauf der Einzelstrangbruchreparatur erfolgt dann wie in der BER (2.6.2) beschrieben – entweder über den short-patch- oder den long-patch-pathway. Sollte aber einmal ein Einzelstrangbruch ohne die für Polymerase β (Pol β) benötigte

3'-OH-Gruppe vorliegen, so wird er zunächst durch die Lyasefunktion der Pol β oder durch APE1 zur 3'-OH-Gruppe prozessiert, damit anschließend die Reparatur zu Ende geführt werden kann (Jilani et al., 1999; Caldecott, 2003c; Caldecott, 2007).

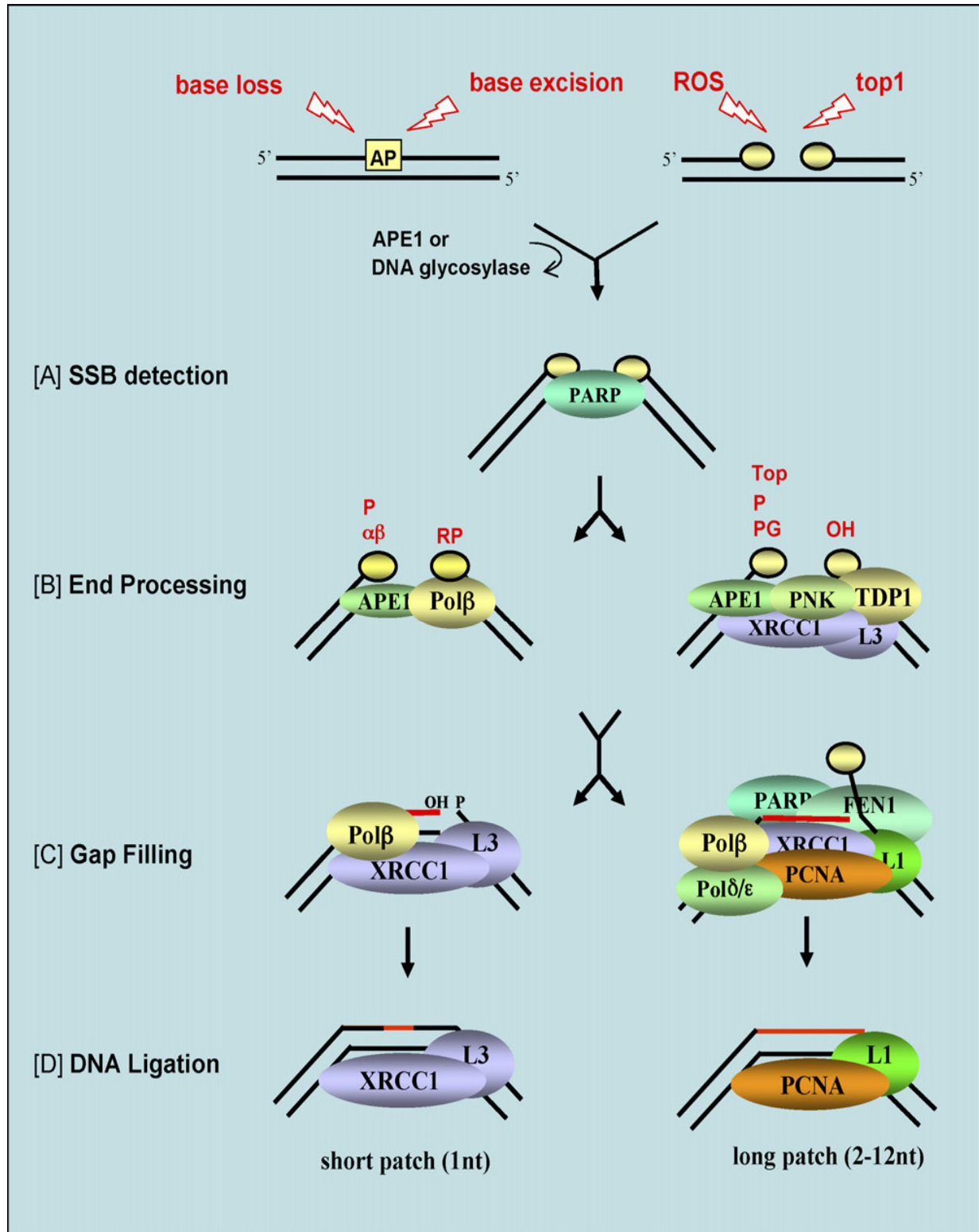


Abb. 2.11: Mechanismus der Einzelstrangbruchreparatur (Caldecott, 2007).

2.6.5 Postreplikative Reparatur (mismatch repair)

Die Mismatch-Reparatur hat nach erfolgter DNA-Replikation die Funktion, nochmals das Genom auf Fehlerfreiheit hin zu untersuchen. Gegebenenfalls werden hierbei Basenfehlpaarungen und Insertionsschleifen entfernt (Marti et al., 2002; Peltomaki, 2003; Renkonen et al., 2003). Dabei gilt es zu beachten, dass für die Glykosylase bei diesem Reparaturweg die Schwierigkeit darin besteht, dass sie nicht modifizierte, sondern völlig intakte aber fehlgepaarte DNA-Basen erkennen und entfernen muß. Darüberhinaus darf auch nur aus dem neusynthetisierten Tochterstrang eine DNA-Base entfernt werden. Dieses Problem der Unterscheidung wird vermutlich dadurch gelöst, dass der Tochterstrang durch einen bereits existierenden Strangbruch markiert ist (hier beispielhaft 3' zum „mismatch“ dargestellt).

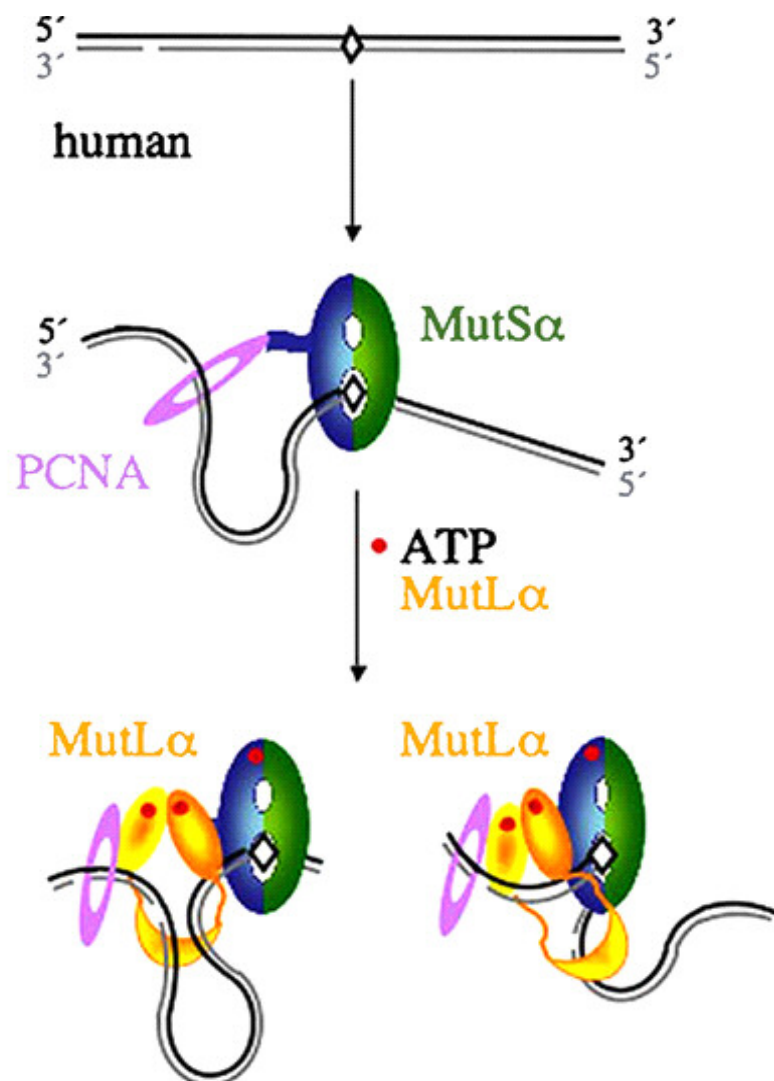


Abb. 2.12: Schematische Darstellung der Mismatch-Reparatur beim Menschen (Yang, 2007).

Entdeckt nun die MutSα (Abb. 2.12), ein Heterodimer bestehend aus den Untereinheiten MSH2 und MSH6, eine fehlgepaarte Base, so bindet sie an diese.

Dann wird PCNA von RFC über ein offenes 3'-Ende ebenfalls an die Schadensstelle rekrutiert und beginnt mit MutS α zu interagieren. Im nächsten Schritt gelangt MutL α , ebenfalls ein Heterodimer bestehend aus den Untereinheiten MLH1 und PMS2, an die Basenfehlpaarung und wird durch MutS α und PCNA aktiviert. Dadurch kann nun die PMS2-Untereinheit in 3'-Richtung neben der fehlgepaarten Base einschneiden. Soll aber von der 5'-Seite aus die DNA eingeschnitten werden, so wird die Exonuklease 1 (Exo1) in Anspruch genommen (Kolodner and Marsischky, 1999; Kolodner et al., 1999; Yang, 2007).

2.7 Glutathion (GSH)

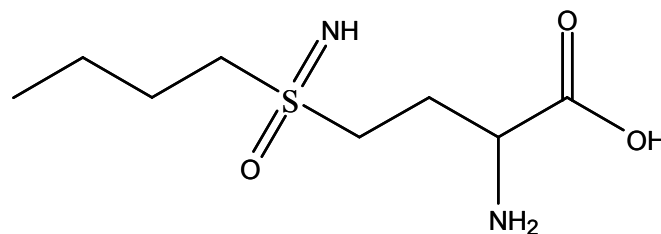
Glutathion (GSH) ist eine der wichtigsten intrazellulären antioxidativ wirkenden Substanzen (Turrens et al., 1986). Es wird in der Zelle durch die γ -Glutamylcysteinsynthetase aus den drei Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin in relativ hohen Konzentrationen gebildet und unterliegt einem äußerst komplexen Redox- bzw. Recyclingprozess. GSH kann einerseits direkt mit Fremdstoffen oder reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) reagieren und diese dabei reduzieren, wobei GSH dann zu GSSG oxidiert wird. Andererseits kann es auch von der Glutathionperoxidase (GPx) als Cosubstrat zur Reduktion von zelltoxischen Wasserstoffperoxid, Lipidhydroperoxiden aber auch Nukleotid- und Steroidhydroperoxiden verwendet werden (Flohe et al., 1973; Flohe, 1985; Flohe, 1988; Chubatsu et al., 1992). GSH dient dabei als Elektronendonator, um die oxidierte GPx wieder zu regenerieren (Epp et al., 1983).

GSH wird nach einer gewissen Zeit abgebaut. Dafür wird es in den Extrazellulärraum transportiert und von der γ -Glutamylpeptidase und anderen Dipeptidasen (Proteasom) gespalten (Merker and Grune, 2000).

2.8 Reagenzien zur Modulierung des intrazellulären Redoxsystems

2.8.1 BSO (D,L-Buthionin-(S,R)-sulfoximin)

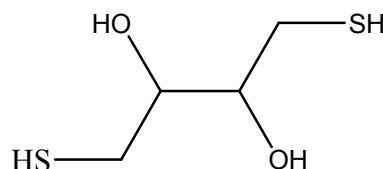
Seit vielen Jahren steht mit BSO (Formel 2.3) ein selektiver, irreversibler Hemmstoff der γ -Glutamylcysteinsynthetase zur Verfügung (Anderson, 1997; Anderson, 1998). Mit dessen Hilfe ist es möglich, die de-novo-Synthese von Glutathion (GSH) vollständig zu unterbinden (Will et al., 1999b). Wird den Zellen 24 h vor Versuchsbeginn eine BSO-Lösung (1 mM) mit dem Medium zugesetzt, so ist nach Ablauf dieser Zeit kein GSH mehr in der Zelle nachweisbar.



Formel 2.3: Chemische Struktur von BSO.

2.8.2 DTT (D,L-Dithiotreitol)

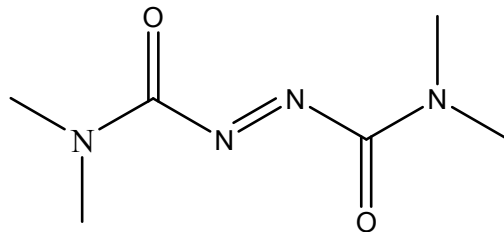
Ebenfalls seit Jahrzehnten hat DTT (Formel 2.4) einen festen Platz in der Molekularbiologie, da es in der Lage ist, die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen zu Disulfidbrücken durch Luftsauerstoff zu verhindern. Darüberhinaus wird es auch experimentell zur Reduktion von Disulfidbrücken zu freien Thiolgruppen eingesetzt.



Formel 2.4: Chemische Struktur von DTT.

2.8.3 Diamid (N,N,N',N'-Tetramethylazabisformamid)

Diamid (Formel 2.5) ist eine seit langem bekannte und in Laboratorien eingesetzte Substanz zur gezielten Oxidation von thiolhaltigen Proteinen. So kann es neben der äußerst raschen Oxidation von GSH zu GSSG auch direkt Thiolgruppen von Proteinen oxidieren. Darüberhinaus ist die Proteinoxidation reversibel und kann zum Beispiel im Falle des GSSG durch einen Überschuß an GSH wieder rückgängig gemacht werden (Kosower et al., 1969a; Kosower et al., 1969c; Kosower et al., 1969b; Kosower et al., 1969d; Szekely and Lobreau, 1987; Kosower and Kosower, 1995).



Formel 2.5: Chemische Struktur von Diamid.

3 ZIELSETZUNG

Über den Entstehungsmechanismus des malignen Melanoms, der gefährlichsten und aggressivsten Form des Hautkrebses, ist bisher nur sehr wenig bekannt. Weder ein Wellenlängenbereich (UVA, UVB oder sichtbares Licht) noch spezifische Signaturmutationen in Tumorgenen konnten bislang identifiziert und für die maligne Entartung von Melanozyten verantwortlich gemacht werden. Auch existieren noch sehr wenige Informationen über grundlegende Eigenschaften oder Besonderheiten der unterschiedlichen Zellen innerhalb der menschlichen Haut hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber oxidativem Stress. Denn Sonnenlicht ist bekanntermaßen eine der größten exogenen Quellen für oxidativen Stress im menschlichen Körper.

Aus diesem Grund bestand das erste Ziel der vorliegenden Arbeit in einer vergleichenden Untersuchung zweier verschiedener Zellarten, den Melanomzellen und den Hautfibroblasten derselben Patienten, hinsichtlich deren Reaktion auf die Bestrahlung mit Sonnenlicht. Dabei wurde zunächst eine Charakterisierung des in den Zellen durch sichtbares Licht oder UVA-Strahlung induzierten DNA-Schadens vorgenommen. Desweiteren wurde die Reparaturgeschwindigkeit dieser induzierten Schäden untersucht, ebenso wie die Funktion des hOGG1-Proteins nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht, da es den ersten Schritt der Reparatur oxidativer Basenmodifikationen initiiert. Auch die Reaktion des Glutathion-Gehalts auf die Bestrahlung mit sichtbarem Licht war von großem Interesse, da es sich bei Glutathion um einen der wichtigsten Bestandteile der antioxidativen Abwehr innerhalb der Zelle handelt.

Der zweite Teil dieser Arbeit sollte nun die Frage klären, wie wichtig das Zusammenspiel zwischen antioxidativem Abwehrsystem und der DNA-Reparatur für die untersuchten Zellen ist. Denn viele Hinweise deuten auf ein komplexes Wechselspiel verschiedenster Faktoren darunter auch DNA-Reparaturproteine wie APE1 auf den „Schlüsselreiz“ oxidativen Stress hin. Daher sollte durch Zusatz unterschiedlicher Stoffe (BSO, Diamid, DTT) die antioxidative Abwehr der Zellen verändert und Auswirkungen auf die Induktion oxidativer DNA-Schäden sowie die Reparaturgeschwindigkeit der Zellen untersucht werden. Demzufolge stand die Klärung der Frage im Vordergrund, ob durch eine gestörte oxidative Balance auch die Reparatur oxidativer DNA-Schäden beeinträchtigt werden könnte.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Analysenwaage	AG 245, max. 210 g (Mettler Toledo, Schweiz)
Autoklav	Tecnoclav 50 6.0, bzw. 2.0 (Fedegari Autoklav SPA, Albuzzo, Italien)
Brutschränke (Zellkultur)	CO ₂ -Inkubator BB16, BB6060 O ₂ und Hera-Cell (Heraeus Instruments, Hanau)
Computer	Macintosh mit Mac OS 9 und X TM sowie und PC mit Windows XP TM
Coulter Counter TM	Beckmann Coulter Z2 (Beckmann, München) und Modell N Industry (Coulter Electronics LTD, Beds., England)
Destillationsapparatur	Destamat® (Heraeus, Hanau)
Fluoreszenzmikroskop	Eclipse E400, Nikon, Düsseldorf
Fluorimeter	TKO 100, DNA Fluorimeter (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA)
Folienschweißgerät	Typ. 255 (Fa. Schott)
Fraktionssammler	Ultrorac 2070 II (Pharmacia/LKB, Uppsala, Schweden) und mM 10, Neolab 4 mit Zeitnehmer SM 999 (Neolab, Heidelberg)
Gefrierbehälter (Zellen)	Flüssigstickstoffcontainer TW 750 RS (Taylor Wharton, Theodore, AL, USA)
Gefrierschrank (-20 °C)	KG 3666-23 (Liebherr)
Gefrierschrank (-70 °C)	Colora UF 85-300S (Colora, Lorch)
Gelapparatur (Western-Blot)	(BioRad, Hercules, CA, USA)
Halogenlampe (1000 W)	Osram SLG 1000-Studio (Osram, München) mit Flecta Halogen mini-Brenner (Reflekta)
Heissluftsterilisator	WTC Binder, Tuttlingen
Heizblock	Thermoblock-Thermostat (Gebr. Liebisch, Bielefeld)
Kamera Fluoreszenzmikroskop	ProgRes C10 (Jenoptik Jena)
Kantenfilter	Schott Spezialglas GmbH, Mainz
Kühlzentrifuge	Sorvall Superspeed RC2-B (Sorvall, Conn., USA)

Lichtintensitätsmessgerät	Luxmeter 110 (PRC Krochmann GmbH, Berlin) mit geeichtem Photoelement GaP
Lichtmikroskop	Telaval 31 (Zeiss, Oberkochen)
Magnetrührer	Ikamag RET-G (Ika-Werk, Janke & Kunkel GmbH & Co kg, Staufen i. Br.)
Multipette	Eppendorf GmbH, Hamburg
Peristaltikpumpe	ISM 759 (20 Kanäle), (Ismatec Laboratoriumstechnik, mit Schläuchen, Schweiz)
pH-Meter	PHM 62 (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark)
Phosphoimager	Storm (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA)
Pipetten	Pipetman P 20, P 100, P 200, P 1000, P 5000, P 10000 (Gilson, Frankreich)
Pipettierhilfe	Pipetus-akku [®] (Hirschmann [™] Laborgeräte, Eberstadt)
Pumpe	Desaga (Heidelberg, Deutschland)
Rotoren für Kühlzentrifuge	SS-34, GS-3 (Sorvall, New.t.on, Conn., USA)
Rotoren für UZ	Ti 60, VTi 50 (Beckman Instruments, Palo Alto, Kalifornien, USA)
Schüttelbäder	heizbar bis 100 °C (Köttermann GmbH & Co., Uetze-Hänigsen)
Schüttelinkubator (Zellkultur)	Typ Certomat R+H, (B. Braun, Melsungen, Deutschland)
Software (sonstige)	MS Office 2003, Adobe Acrobat 7.0, Adobe Photoshop CS2
Solar-Simulator	Suntest CPS + (Atlas, Linsengericht / Altenhasslau)
Spannungsquelle	Power PAC- 3000 (BioRad, Hercules, (Protein-, DNA-Gele) CA, USA)
Speedvac	Konzentrationszentrifuge Univapo 100 h mit Unijet II Refrigerated Aspirator (Laborgerätebau A.N. Kraupa, Martinsried)
Spektrophotometer	WPA biowave S2100 Diode Array Spectrophotometer (Whatman Biometra)
Sterile Werkbank	LaminAir [®] HB 2472 und HB 2448 (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
Thermostat für Haake W19	Haake D8 (Haake, Karlsruhe)
Tischschüttler	GFL 3015 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel)
Trockenschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Ultraschallbad	Sonorex RK 100 (Bandelin Electronic, Berlin)

Ultraschall-Homogenisator	SONOPULS; HD 70 mit Sonotrode MS 73 und (Sonifier) HF-Generator GM 70 (70 W, 20 kHz) (Bachofer, Reutlingen)
Ultrazentrifuge (UZ)	Optima LE-80K (Beckman Instruments, Palo Alto, Kalifornien, USA)
UV-Sensoren	UVA-, UVB-Sensor (Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH, Ettlingen)
UV/VIS-Photometer	Ultraspec II, LKB Biochrom (Pharmacia / LKB, Uppsala, Schweden)
Vortexer	Vortex Genie 2, Model G-560° (Scientific Industries, INC, Bohemia, N.Y., USA)
Waage	PB 3002, Delta Range, max. 3100 g (Mettler Toledo, Schweiz)
Wasserbad (heizbar bis 100 °C)	Köttermann Type 3042 (Köttermann GmbH & Co, Uetze-Hänigsen, Deutschland)
Wasserbad	Haake K, Haake LH mit Kältethermostat Haake F3 (Haake, Karlsruhe)
Wasserbad	Haake Fisons W19 mit Kältethermostat Haake D8 (Haake, Karlsruhe)
Zählkammer	Neubauer Kammer (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Zentrifugen	Hettich Micro Rapid/K und Hettich Universal/K2S (Hettich, Tuttlingen), Biofuge 28RS und Sigma 3K-2 (Heraeus Instruments GmbH, Osterode am Harz, Deutschland)
Zytozentrifuge	Cytospin 3 (Shandon, Astmoor, England)

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Blottingfilm	Kodak Biomax ligt-1, ml, 13x18 cm Sigma; Z37, 039-80 50pc Lot: 108H1385 (Eastman Kodak Comp., Rochester, NY, USA)
Blottingmembran	Hybond-P PVDF membrane (Amersham Pharmacia Biotech UK Lmd., Little Chalfont, UK)
Blotting-Papier (Proteine)	(Schleicher & Schüll, Würzburg)
Cellulosenitrat-Membran	(Schleicher & Schüll, Würzburg)
Deckgläser	(A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Deckgläser (groß)	(A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Einmalpipetten, steril	(A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Filter (Alkalische Elution)	Isopore TM , Polycarbonat-Membran, 2 µm, Ø 25 mM (Millipore, Irland)

Filterhalter (Alkalische Elution)	Swinnex SX 2500 (Millipore, Holstein, Frankreich)
Filterpapier und Faltenfilter	(Schleicher & Schüll, Würzburg)
Fluoreszenzküvetten	(A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Glasgeräte	(Schott Spezialglas GmbH, Mainz)
Glaspipetten (Zellkultur)	(A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Kanülen, steril	Nr.2 (Dispomed WITT oHG, Gelnhausen-Hailer)
Kryoröhrchen	Nunc Kryo, 1,5 ml (A/S Nunc, Roskilde, Dänemark)
Kryoröhrchen, steril	(1,8 ml; Nalgene Comp., Rochester, USA)
Kulturröhrchen	PP, steril (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Lochfilter	Shandon Filter Cards (Schleicher & Schüll, Würzburg)
Multipette (1-10 µl, 20-200 µl)	„Discovery“ (high tech lab, Warschau, Polen)
Multipettenaufsätze	Combitips 50 ml (Eppendorf AG, Hamburg)
Multiwell-Gewebeplatten	6-Well Platten, Falcon [®] (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)
Objektträger	geschnitten, mit Mattrand (Knittel Gläser, Deutschland)
Objektträger	Labcraft, DFF 76×26 mM (Richardson Supply Comp. Ltd., London, England)
Pasteurpipetten	Flint Glass (Chase Instruments Corp., Glen Falls, NY, USA)
Pipettenspitzen (Einweg)	(Eppendorf AG, Hamburg)
Pipettenspitzen (Ein-, Mehrweg)	5 ml (Einweg), 10 ml (Mehrweg) (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Plastikmaterialien (Caps, usw.)	(Eppendorf AG, Hamburg)
Protein-Längenstandard	Sigma SDS-7 Dalton Mark VII I (Sigma Chemie, Deisenhofen)
Quecksilberdampf-Lampe	(für Fluoreszenzmikroskop) HBO Quecksilberdampf Kurzbogenlampe, (Osram, München)
Spritzen (Alkalische Elution)	20cc-Syringe, Luerlock (Becton Dickinson & Co., Rutherford, USA)
Spritzen (Western-Blot)	1cc-Syringe, (Becton Dickinson & Co., Rutherford, USA)
Sterilfilter	Porengröße 0,22 µm (Schleicher & Schüll, Dassel, Deutschland)
Ultrazentrifugenröhrchen (Glas)	„Centrifuge Tubes“ (Beckman Instruments, Inc.; Palo Alto, USA)
Whatmanpapier (Western-Blot)	(Schleicher & Schuell, Dassel)
Zählkammer, graduiert	Kora Hycor Slide 10 (Biomedical Glasstic)

Zellkulturflaschen	(Greiner GmbH, Nürtingen)
Zellkulturschaber	(Greiner GmbH, Nürtingen)
Zellkulturschalen	Falcon® (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)
Zentrifugenröhrchen (Glas)	Corex-Röhrchen, 15 ml, 50 ml (A. Hartenstein GmbH, Würzburg)
Zentrifugenröhrchen (Plastik)	15 ml, 50 ml (Greiner GmbH, Nürtingen)

4.1.3 Chemikalien und Reagenzien

1-Butanol	(Fisherscientific, USA)
Acrylamid/Bisacrylamid	(Roth, Karlsruhe) (Rotiphorese Gel 30®)
Aktivkohle	(Merck, Darmstadt)
Ammoniumchlorid	(Merck, Darmstadt)
Ammoniumdihydrogenphosphat	(Merck, Darmstadt)
Ammoniumperoxodisulfat	(Roth, Karlsruhe)
Aprotein	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Bisbenzimid (Hoechst Nr. 33258)	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Blocker (non-fat dry milk)	(BioRad, Hercules, CA, USA)
Bromphenolblau	(Sigma Aldrich, Steinheim)
DL-Buthioninsulfoxim	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Calciumchlorid x 2 H ₂ O	(Merck, Darmstadt)
Chloroform	(Roth, Karlsruhe)
DAPI	(Sigma Aldrich, Steinheim)
DAPI Mounting Medium	Vectashield DAPI (Axxora, Grünberg)
di-Kaliumhydrogenphosphat x 3 H ₂ O	(Roth, Karlsruhe)
di-Natriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O	(Merck, Darmstadt)
Dithioerythritol	(Sigma Aldrich, Steinheim)
DMEM Medium high Glucose	(PAA, Cölbe)
DMSO	Dimethylsulfoxid (Sigma Aldrich, Steinheim)
EDTA	Tetramethylethyldiamin (Merck, Darmstadt)
Eichlösungen	Puffer (pH 5, 7, 8, 10, 11), (Sigma Aldrich, Steinheim)
Essigsäure	(Roth, Karlsruhe)
Ethanol, absolut	(Roth, Karlsruhe)
Formamid 90 %	(Sigma Aldrich, Steinheim)
D-Glucose x 1 H ₂ O	(Roth, Karlsruhe)
Glutamin (100x)	(PAA, Cölbe)
Glutathion (Glu-Cys-Gly)	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Glycerol	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Glycin	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Harnstoff	(Sigma Aldrich, Steinheim)

Isopropanol	(Roth, Karlsruhe)
Isoton-II-Lösung	(Beckman Coulter, Krefeld)
Kälberserum (fetales)	(PAA, Cölbe)
Kaliumacetat	(Merck, Darmstadt)
Kaliumchlorid	(Merck, Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	(Merck, Darmstadt)
Kaliumhydroxid	(Merck, Darmstadt)
KBM-2 Medium	(Cambrex, Walkersville, MD)
Kohlendioxid (CO ₂)	(Linde, Höllriegelskreuth)
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	(Merck, Darmstadt)
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	(Roth, Karlsruhe)
Methanol	Roti [®] solv (HPLC, Gradient grade) (Roth, Karlsruhe)
Milch	siehe Blocker
MMS	Methylmethansulfonat, (Sigma Aldrich, Steinheim)
NADPH, Tetranatriumsalz	(Boehringer, Mannheim)
Natriumacetat	(Merck, Darmstadt)
Natriumcarbonat	(Merck, Darmstadt)
Natriumchlorid	(Merck, Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Natriumhydrogencarbonat	(Merck, Darmstadt)
Natriumhydrogenphosphat x 1 H ₂ O	(Merck, Darmstadt)
Natriumhydroxid	(Merck, Darmstadt)
Natriumpyruvat	(PAA, Cölbe)
Paraformaldehyd	Paraformaldehyde 16 % cat. # 15710 (SCI science services, München / Electron Microscopy sciences)
Penicillin/Streptomycin-Lösung	(PAA, Cölbe)
Phenol (Roti [®] -phenol)	(Roth, Karlsruhe)
Proteinlängenstandard	(SDS-7, Dalton Mark VII-L) (Sigma Aldrich, Steinheim)
Rinderserumalbumin (BSA)	(Sigma Aldrich, Steinheim)
RNase-freies Wasser	(Dharmacon, Lafayette, CO, USA)
Ro19-8022	[R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl)-carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol], (Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz)
RPMI 1640	(PAA, Cölbe)
Salzsäure 25 %, 37 %	(Merck, Darmstadt)
Stickstoff, flüssig	(Linde, Höllriegelskreuth)

TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (BioRad, Hercules, CA, USA)
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid (Merck, Darmstadt)
TRIS	(Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan) (Sigma Aldrich, Steinheim)
Tris Base	(BioRad, Hercules, CA, USA)
Tris-HCl	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Triton X-100	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Trypanblau-Lösung 0,4 %ig	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Trypsin /EDTA-Lösung	(PAA, Cölbe)
Tween	(BioRad, Hercules, CA, USA) (BioRad, Hercules, CA, USA)
Wasserstoffperoxid	(Sigma Aldrich, Steinheim)
Western Detection Kit	ECL-plus, Western blotting detection kit (Amersham Pharmacia Biotech UK Lmd., Little Chalfont, UK)
Xylen/Cyanol FF	(Sigma Aldrich, Steinheim)

4.1.4 Antikörper und Enzyme

Antipain	Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert (Sigma Aldrich, Steinheim)
Antikörper AS02	Dianova, Hamburg
APN1	zur Verfügung gestellt von S. Boiteux (CEA, Département de Radiobiologie et Radiopathologie, UMR217 CNRS/CEA, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France); Testung in (4.2.4) beschrieben;
Aprotinin	Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert (Sigma Aldrich, Steinheim)
Fpg-Protein (Rohextrakt)	(Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase) aus <i>Escherichia coli</i> ; hergestellt als Rohextrakt von M. Osterod nach (Boiteux et al., 1990)
Leupeptin, Trifluoroacetat-Salz	Stammlösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert (Sigma Aldrich, Steinheim)
Humaner Ogg1 PA3 AK	dhOGG1-Monoklonaler Kaninchen-Antikörper, hergestellt von S. Boiteux (CEA, Département de Radiobiologie et Radiopathologie, UMR217 CNRS/CEA, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France)

Ogg1-Protein (rein)	(8-oxoG-DNA-Glykosylase/AP-Lyase) aus <i>Drosophila melanogaster</i> ; zur Verfügung gestellt von S. Boiteux (CEA, Département de Radiobiologie et Radiopathologie, UMR217 CNRS/CEA, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France)
Proteinase K	lyophilisiert, aus <i>Tritirachium album</i> (Roth, Karlsruhe)
T4EndonukleaseV (<i>E.coli</i>)	Präparation nach Nakabeppu et al. (Nakabeppu, 1982), modifiziert durch Pflaum (Pflaum, 1996), hergestellt durch M. Pflaum, C. Flohr und I. Schulz (Mainz)

4.1.5 DNA

34-mer Oligonukleotid	5'- [$\alpha^{32}\text{P}$]-ATP radioaktiv markiertes Oligonukleotid der Sequenz: 5'-GGCTTCATCGTTATT(8-oxoG)ATGACCTG GTGGATACCG-3' zur Verfügung gestellt von S. Boiteux (CEA, Département de Radiobiologie et Radiopathologie, UMR217 CNRS/CEA, F-92265 Fontenay-aux-Roses, France)
Kalbsthymus-DNA	Serva, Heidelberg

4.1.6 Zellen

F11.1	Adhärenz wachsende, immortalisierte Fibroblasten von C57/BL6-Wildtyp-Mäusen. Zur Verfügung gestellt vom Imperial Cancer Research Fund, Clare Hall Laboratories, South Mimms, Hertfordshire EN6 3LD, UK.
M2IV/04, M2/02, M8.99	Aus Biopsiematerial gewonnene und in Zellkulturflaschen adhärenz wachsende primäre humane Melanomzellen; zur Verfügung gestellt vom Dermatologischen Zentrum Buxtehude, Buxtehude.
HT144, SKMel25	Zur Verfügung gestellt von der Boston University, Boston USA.
NW-Mel19, NW-Mel38, NW-Mel145	Zur Verfügung gestellt vom Krankenhaus Nordwest Frankfurt, Frankfurt.

FH11/04, FH20/02, F8.99

Aus Biopsiematerial gewonnene und in Zellkulturflaschen adhärent wachsende primäre humane Fibroblasten; zur Verfügung gestellt vom Dermatologischen Zentrum Buxtehude, Buxtehude.

4.1.7 Puffer, Lösungen, Medien

4.1.7.1 Zellkultur

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

Kulturmedium für primäre Melanomzellen	RPMI 1640 (with Glutamin) 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg/ml)
Kulturmedium für primäre Hautfibroblasten	DMEM (4,5 g/l Glucose) 20 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg/ml) 2 % Glutamin

4.1.7.2 Alkalische Elution

PBSCMF (autoklaviert)	pH 7,4	137 mM NaCl 2,70 mM KCl 8,30 mM NaH ₂ PO ₄ 1,50 mM KH ₂ PO ₄
BE1 (autoklaviert)	pH 7,5	100 mM NaCl 20 mM Tris-HCl 1,0 mM Na ₂ EDTA
BE1/BSA (autoklaviert)	pH 7,5	100 mM NaCl 20 mM Tris-HCl 1,00 (15,0) mM Na ₂ EDTA 0,10 g/l BSA
BE15-KCl (autoklaviert)	pH 7,5	100 mM KCl 20 mM Tris-HCl 15 mM Na ₂ EDTA
BE15-KCl/BSA (autoklaviert)	pH 7,5	100 mM KCl 20 mM Tris-HCl 15 mM Na ₂ EDTA 0,10 g/l BSA

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

Bisbenzimid-Stammlösung erst unmittelbar vor Gebrauch auftauen und dem autoklavierten Phosphatpuffer in einer lichtgeschützten Flasche zusetzen – sorgfältig schütteln;

4.1.7.3 Bestimmung der Toxizität in Säugerzellen

PBSCMF (10X)	80 g NaCl 2 g KCl 1,5 g NaHPO ₄ x 2 H ₂ O ad 1 l mit H ₂ O _{dest.}
PBSCMF (1X, autoklaviert)	100 ml PBSCMF (10 X) ad 1 l mit H ₂ O _{dest.}
tert.-D,L-Buthionin-[S,R]-sulfoximin-Stamm- lösung lösen	33,5 mg in 15 ml Vollmedium gut vortexen (=10 mM), frisch angesetzt und sterilfiltrieren
tert.-D,L-Buthionin-[S,R]-sulfoximin-Vorver- dünnung (=„Arbeitslösung“)	1:10-Verdünnung der Stammlösung (10 mM) in Vollmedium (=1 mM), frisch angesetzt
Einsatz bei mittleren Zellkulturflaschen:	10 ml „Arbeitslösung“
Einsatz bei großen Zellkulturflaschen:	20 ml „Arbeitslösung“
WST-1-Stammlösung	zu je 1,0 ml aliquotieren; für den Assay 1,0 ml WST-1-Stammlösung + 0,2 ml PBS/CMF (1x)

4.1.7.4 Depletion von Glutathion

tert.-D,L-Buthionin-[S,R]-sulfoximin-Stamm- lösung	33,5 mg in 15 ml Vollmedium lösen gut vortexen (=10 mM), frisch angesetzt und sterilfiltrieren
tert.-D,L-Buthionin-[S,R]-sulfoximin-„Arbeits- lösung“	1:10-Verdünnung der Stammlösung

Einsatz bei mittleren Zellkulturflaschen: (=1 mM), frisch angesetzt
10 ml „Arbeitslösung“

Einsatz bei großen Zellkulturflaschen: 20 ml „Arbeitslösung“

4.1.7.5 Quantifizierung des Glutathion-Gehaltes

TCA-Puffer 5 ml 20 %ige Trichloressigsäure (m/v)
40 µl EDTA, 0,5 M
2 ml HCl, 1 N
ad 60 ml mit H₂O_{dest.}

Phosphat/EDTA-Puffer pH 7,5 7,98 g Na₂HPO₄
(autoklaviert) 0,86 g NaH₂PO₄ (0,125 M Phosphat)
1,18 g Na₂EDTA (6,3 mM EDTA)
ad 500 ml mit H₂O_{dest.}

Phosphat/NADPH-Lösung 0,3 mM Na₄NADPH
bei 4 °C drei Tage lang verwendbar

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

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

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

Ammoniumpersulfat 10 % (APS) 0,1 g Ammoniumpersulfat
ad 1,0 ml mit H₂O_{dest.}, bei 0 °C lagern
15,0 ml 2x Gel Puffer

Proteintransfer (Western-Blot), Detektion mit Antikörpern

Transfer Puffer 14,4 mg Tris Base
69,18 mg Glycin
4800 ml H₂O_{dest.}
1200 ml Methanol
bei 4 °C lagern

Coomassieblau-Lösung	0,5 g Coomassie Brilliant Blue R (1 %) 200 ml Methanol 50 ml Essigsäure 250 ml H ₂ O _{dest.}
Gel-Wasch-Lösung	200 ml Methanol 50 ml Essigsäure 250 ml H ₂ O _{dest.}
Gel-Wasch-Lösung G	100 ml Gel-Wasch-Lösung 2 ml Glycerol
Tween 20 %	10 ml Tween 40 ml H ₂ O _{dest.}
PBS/Tween (0,05 %)	2,5 ml Tween 20 % 1 l PBS
Milch 1 %	0,1 g Blocker (non-fat dry milk) 10 ml PBS/Tween (0,05 %)
Milch 5 %	1,25 g Blocker (non-fat dry milk) 25 ml PBS/Tween (0,05 %)
BSA 1 %	1 % BSA 10 ml PBS/Tween (0,05 %)
Antikörperlösung I a frisch herstellen!	10 µl Anti-hOGG1 (PA3) Rabbit, rAB 10 ml Milch 1 %
Antikörperlösung I b frisch herstellen!	10 µl Tubulin-Antikörper, mAB 10 ml BSA 1 %
Antikörperlösung II a	5 µl anti-rabbit IgG-HRP 10 ml PBS/Tween (0,05 %)
Antikörperlösung II b	5 µl anti-mouse IgG-HRP 10 ml PBS/Tween (0,05 %)

4.1.7.7 Western-Blot (Proteintransfer)

Transfer Puffer	14,4 mg Tris Base 69,18 mg Glycin 4800 ml H ₂ O _{dest.} 1200 ml Methanol bei 4 °C lagern
Coomassieblau-Lösung	0,5 g Coomassie Brilliant Blue R (1 %) 200 ml Methanol 50 ml Essigsäure 250 ml H ₂ O _{dest.}
Gel-Wasch-Lösung	200 ml Methanol 50 ml Essigsäure 250 ml H ₂ O _{dest.}
Gel-Wasch-Lösung G	100 ml Gel-Wasch-Lösung 2 ml Glycerol
Tween 20 %	10 ml Tween 40 ml H ₂ O _{dest.}
PBS/Tween (0,05 %)	2,5 ml Tween 20 % 1 l PBS
Milch 1 %	0,1 g Blocker (non-fat dry milk) 10 ml PBS/Tween (0,05 %)
Milch 5 %	1,25 g Blocker (non-fat dry milk) 25 ml PBS/Tween (0,05 %)
BSA 1 %	1 % BSA 10 ml PBS/Tween (0,05 %)
Antikörperlösung I a frisch herstellen!	10 µl Anti-hOGG1 PA3 Rabbit, rAB 10 ml Milch 1 %
Antikörperlösung I b	10 µl Tubulin-Antikörper, mAB

frisch herstellen!		10 ml BSA 1 %
Antikörperlösung II a		5 µl anti-rabbit IgG-HRP 10 ml PBS/Tween (0,05 %)
Antikörperlösung II b		5 µl anti-mouse IgG-HRP 10 ml PBS/Tween (0,05 %)
4.1.7.8 Cleavage - Assay		
AEBSF		0,4 mM
APS 10 %		100 mg APS ad 1,0 ml H ₂ O _{dest.} frisch ansetzen! (ca. 4 Wochen haltbar)
EDTA 0,5 M	pH 8,0	18,61 g Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O 80,0 ml H ₂ O _{dest.} lösen 2,0 g NaOH-Pellets pH-Wert mit 10 N NaOH einstellen
Lysepuffer MIT Salz (10x)		2,0 ml Tris-HCl 1 M pH 8,0 200 µl EDTA 0,5 M pH 8,0 5,0 ml NaCl 5 M ad 10,0 ml H ₂ O _{dest.}
Lysepuffer OHNE Salz (10x)		2,0 ml Tris-HCl 1 M pH 8,0 200 µl EDTA 0,5 M pH 8,0 ad 10,0 ml H ₂ O _{dest.}
Lysepuffer MIT Salz (1x)		1:10 Lysepuffer MIT Salz (10x) in H ₂ O _{dest.}
Lysepuffer OHNE Salz (1x)		1:10 Lysepuffer OHNE Salz (10x) in H ₂ O _{dest.}
NaAcetat 1 M		2,72 g NaAcetat ad 20,0 ml H ₂ O _{dest.}
NaCl, 5 M		29,22 g NaCl

	ad 100 ml mit H ₂ O _{dest.}
Oligonukleotid-Lösung	0,2 µl Oligonukleotid (25 fmol) 9,8 µl Lysepuffer OHNE Salz
PNK-Puffer (10x)	0,5 ml Tris-HCl, 1 M (pH 7,6) 0,1 ml MgCl ₂ , 1 M 2 µl EDTA, 0,5 M ad 1 ml mit H ₂ O _{dest.}
Polyacrylamidlösung	10 ml TBE (10X) 42 g Harnstoff 50 ml Acrylamid-Lösung (30 %, 19/1) Herstellung: Harnstoff durch mildes (ca. 25 - 30 °C) Erwärmen lösen, mit H ₂ O _{dest.} auf 100 ml auffüllen, unter Anlegen eines Vakuums solange rühren, bis keine Luftblasen der Lösung mehr entweichen; Lagerung bei 4 °C (ca. vier Wochen lang verwendbar)
Polyacrylamidlösung (0,25 %)	40 µl Tris-HCl 1 M pH 7,8 20 µl NaAcetat 1 M pH 7,0 2 µl EDTA 0,5 M pH 8,0 10 µl APS 10 % 1 µl TEMED 125 µl Acrylamid-Lösung (40 %, 19/1) 802,0 µl H ₂ O _{dest.} Herstellung: sämtliche Lösungen in ein 1,5er Cap pipettieren (ohne APS), vortexen, 99 µl dieser Lösung in 2,0er Cap, 1 µl APS 10 % hinzu pipettieren, 30 min bei RT polymerisieren lassen, 2,5 faches Volumen (250,0 µl) EtOH abs. hinzugeben, vortexen, 10 min bei 12000 rpm / RT zentrifugieren, Überstand abziehen, das Pellet in

		H ₂ O _{dest.} (37 °C / 2,0 ml = 20 faches Volumen) lösen
SDS 10 %	pH 7,2	1 g Sodiumdodecylsulfat in wenig H ₂ O _{dest.} lösen, dann auf 10 ml auffüllen pH-Wert mit verdünnter HCl einstellen
Stoppuffer		110 µl TBE (10X) 100 µl Xylencyanol 1 %ig 100 µl Bromphenolblau 800 µl deionisiertes Formamid 90 %
TBE-Puffer (10x)		108,0 g Tris-Base 55,0 g Borsäure 40,0 ml EDTA 0,5 M pH 8,0 pH-Wert mit verdünnter HCl einstellen ad 1,0 l mit H ₂ O _{dest.}
TBE-Puffer (1X)		100 ml TBE-Puffer (10X) ad 1000 ml mit H ₂ O _{dest.}
TE-Puffer (10x)	pH 8,0	1,212 g Tris-Base 2,0 ml EDTA 0,5 M pH 8,0 ad 100 ml mit H ₂ O _{dest.} pH-Wert mit konz. HCl einstellen
TE-Puffer (1X)	pH 8,0	10 ml TE-Puffer (10X) ad 100 ml mit H ₂ O _{dest.}
Tris-HCl	pH 7,8	12,11 g Tris-Base 80 ml H ₂ O _{dest.} 4,4 ml HCl konz. mit konz. HCl finalen pH einstellen
Tris-HCl	pH 8,0	12,11 g Tris-Base 80 ml H ₂ O _{dest.} 4,2 ml HCl konz. mit konz. HCl finalen pH einstellen

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Allgemeine Pflegeroutine

Standardmäßig werden sämtliche Arbeiten an und mit Zellen unter sterilen Bedingungen, d.h. unter einer Sterilwerkbank (Laminar-Flow-Box) durchgeführt. Die Kultivierungsbedingungen in den Brutschränken entsprechen den Normbedingungen (37 °C, 5 % CO₂, und 99 % Luftfeuchtigkeit). Entsprechend ihrer Verdopplungszeiten erfolgt die Passagierung der Zellen in regelmäßigen Abständen oder gegebenenfalls nur ein Wechsel des verbrauchten Mediums.

Bei Erreichen einer gewissen Zelldichte, wobei ein konfluentes Stadium stets zu vermeiden war, wird das verbrauchte Kulturmedium mittels einer sterilen Glaspipette abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS/CMF gewaschen und 2 ml Trypsin/EDTA zugegeben. Das Trypsin/EDTA löst nun enzymatisch die Proteinverbindungen, die die adhärent wachsenden Zellen mit der Spezialbeschichtung des Zellkulturflaschenbodens eingegangen sind. Zur Abstopfung dieser Reaktion werden, nach sanftem Abklopfen der Zellen vom Flaschenboden und visueller Kontrolle via Mikroskop, 8 ml FCS-haltigen Kulturmediums zugesetzt. Im Anschluß werden die teilweise agglomerierten Zellen mit einer 5 ml Glaspipette durch mehrmaliges aufsaugen und abblasen an die Flaschenwand (ca. 10 x) vereinzelt und 200 µl dieser Zellsuspension in ein Coulter CounterTM-Zählgefäß, welches mit 9,8 ml ISOTON II gefüllt ist (1:50 Verdünnung), pipettiert. Es erfolgt die automatische Zählung der Zellzahl. Entsprechend der gewünschten Zelldichte wird zunächst eine neue Zellkulturflasche mit frischem Medium befüllt und anschließend die Menge an errechneter Zellsuspension zugesetzt, kurz geschwenkt, damit der komplette Flaschenboden benetzt wird und dann in den Brutschrank gelegt.

4.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur sicheren und langfristigen (für mehrere Jahre) Aufbewahrung von Zellen können diese in flüssigem Stickstoff eingelagert werden. Um die Zellen hierbei nicht zu beschädigen werden diese so schonend wie möglich über einen mehrstufigen Einfrierprozeß an die Endtemperatur herangeführt.

Hierbei werden, wie in 4.2.1.1 bereits beschrieben, die abgelösten, gezählten und sorgfältig resuspendierten Zellen in ein bereits vorgekühltes Greinerröhrchen pipettiert. Dann erfolgt die Abzentrifugation des Mediums in einer bereits vorgekühlten

Zentrifuge (1200 U/ min, 5 min, 4 °C). Nun wird das Medium über dem Zellpellet entfernt und entsprechend der Berechnung (ca. 3 Mio. Zellen in 1,0 ml Medium) durch neues, DMSO-haltiges (10 %) ersetzt. Nach gründlicher Resuspendierung wird jetzt die Zellsuspension auf die vorgekühlten Kryocaps verteilt (je 1,0 ml) und direkt für 2 h bei -20 °C gelagert. Anschließend werden die angefrorenen Caps über Nacht bei -80 °C untergebracht, um sie dann am nächsten Tag in den flüssigen Stickstoff zu überführen.

Beim Auftauprozess hält man die zuvor aus dem flüssigen Stickstoff entnommenen Kryocaps solange in ein 37 °C warmes Wasserbad, bis sie nahezu vollständig durchgetaut sind. Der Inhalt des Caps wird sofort in ein Greinerröhrchen mit ca. 10 ml gekühltem Medium (ohne DMSO) gestürzt und zentrifugiert (1200 U/ min, 5 min, 4 °C). Es sollte schnell gearbeitet werden, um den zellwandschädigenden Einfluss des DMSO so gering wie möglich zu halten. Nach erfolgter Zentrifugation wird der Überstand über dem Zellpellet entfernt und 5 ml frisches, auf 37 °C vorgewärmtes Medium hinzugefügt. Es wird sehr gut mit einer 5 ml Glaspipette resuspendiert und der gesamte Inhalt des Greinerröhrchens in eine neue, kleine Zellkulturflasche überführt.

4.2.1.3 *Testung auf Mycoplasmenkontamination*

Generell besteht bei der Arbeit mit Zellen immer die Gefahr einer Mycoplasmenkontamination – noch größer ist diese bei Verwendung primärer Zellen. Im Falle einer Infektion können die betroffenen Zellen nicht die gewünschten oder aber veränderte Eigenschaften aufweisen. Um dies auszuschließen, wurden die in Kultur gehaltenen Zellen regelmäßig auf einen möglichen Befall mit Mycoplasmen getestet.

Wie in 4.2.1.1 beschrieben, werden die Zellen abgelöst. Anschließend wird die Cytospin-Zentrifuge vorbereitet, wobei jeweils ein beschrifteter Objektträger mit einer neuen Filterkarte und dem Trichteraufsatz in je einen Zentrifugeneinsatz eingespannt und dieser dann senkrecht nach unten (mit der Trichteröffnung nach oben) in den Rotor eingehängt wird. Als nächstes erfolgt, entsprechend der ermittelten Zelldichte, das Eintropfen der Zellsuspension in die Trichteröffnungen (hierbei ergibt eine Zellzahl von 60 – 65 000 Zellen pro Objektträger einen später sehr gut auswertbaren Zellfleck). Dann erfolgt die Zentrifugation bei 1000 U/ min für 5 min bei RT. Direkt im Anschluß werden die Objektträger den Zentrifugeneinsätzen entnommen und für mindestens 2 h in einer mit eiskaltem Methanol gefüllten Glasküvette bei -20 °C fixiert. Danach werden die Präparate mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid Nr. 33258 für 45 s gefärbt und zweimal für je 1 min mit kaltem PBS/CMF gewaschen. Anschließend wird das überschüssige PBS/CMF abgewischt, 20 µl Eindecklösung

auf den Zellfleck pipettiert und ein Deckgläschen luftblasenfrei aufgelegt. Durch die Färbung mit Bisbenzimid wird sämtliche, in der Probe befindliche DNA blassblau gefärbt, das Zytoplasma und andere Zellbestandteile jedoch nicht. Bei der visuellen mikroskopischen Auswertung wird geprüft, ob um die gut sichtbaren und klar abgegrenzten Zellkerne herum ein hell angefärbter Schleier zu sehen ist, der auf eine Kontamination mit Mycoplasmen hindeutet.

4.2.1.4 Zelllinien

4.2.1.4.1 Primäre humane maligne Melanomzellen (M2IV/04, M2/02, M8.99, SKMel25, HT144)

Adhärenz wachsende Zellen, die aus Biopsiematerial operierter Melanompatienten kultiviert wurden. Die Trypsininkubation erfolgt bei RT, wobei die Zellen sich äußerst gut ablösen lassen. Die Verdopplungszeit beträgt circa 48 h.

4.2.1.4.2 Primäre humane Hautfibroblasten (FH11/04, FH20/02, F8.99)

Adhärenz wachsende Zellen, die als Nebenprodukt aus Operationsmaterial herangezogen wurden. Die Trypsininkubation erfolgt bei 37 °C für 6 min. Die Fibroblasten müssen kaum durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt werden. Sie weisen alle eine sehr lange Verdopplungszeit von circa 2 – 3 Wochen auf.

4.2.1.4.3 Mausembryofibroblasten (F11.1)

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

4.2.2 Herstellung von Zellpellets

Zur Herstellung von Zellpellets werden die Zellen, wie in Kapitel 4.2.1.1 detailliert beschrieben, abgelöst, zwischen $5 - 10 \times 10^6$ von ihnen in ein Greinerröhrchen überführt und zentrifugiert (1200 U/min, 5 min, 4 °C). Anschließend wird der Überstand entfernt, mit 10 ml kaltem PBS/CMF gewaschen/resuspendiert, zentrifugiert, die Waschlösung entfernt und ein zweites Mal dieser Vorgang wiederholt. Abschließend wird auf das Zellpellet 1 ml kaltes PBS/CMF pipettiert, gut

resuspendiert und die Zellsuspension in bereits vorgekühlte konische 1,5er Caps überführt. Nach erneuter Zentrifugation wird final der Überstand über dem Pellet entfernt. Die Zellen können jetzt direkt weiterverarbeitet, oder aber für mehrere Jahre bei -80 °C gelagert werden.

4.2.3 Alkalische Elution

4.2.3.1 Prinzip

Die von Kohn (Kohn et al., 1976) entwickelte Alkalische Elution stellt eine äußerst empfindliche Methode zur in vitro Quantifizierung intrazellulärer DNA-Schäden dar. Mit ihr hat der Experimentator die Möglichkeit Einzelstrangbrüche, DNA-DNA- und DNA-Proteinquervernetzungen zu erfassen. Durch Einführung einer modifizierten Variante der Alkalischen Elution ist es außerdem möglich, mittels Inkubation spezieller DNA-Reparaturenzyme, sogenannter Reparaturenukleasen, die dem Erkennungsspektrum der Enzyme entsprechenden DNA-Basenmodifikationen quantitativ zu erfassen, die DNA-Basenmodifikationen zu entfernen und das Zuckerphosphatrückgrat der DNA-Doppelhelix einzuschneiden. Die dabei entstehenden Einschnitte werden als zusätzliche Einzelstrangbrüche detektiert / quantifiziert und somit ursprünglich „unsichtbare“ Basenmodifikationen sichtbar gemacht. Das Verfahren besitzt eine Empfindlichkeit von ca. 0,5 Läsionen pro 10^7 Basenpaaren und ist damit beispielsweise 200 mal empfindlicher als der PM2-Relaxationsassay oder 10 mal empfindlicher als die HPLC/ECD-Analyse (Pflaum et al., 1997).

Experimentell gestaltet sich die Durchführung der Alkalischen Elution folgendermaßen: Die unter der Laminar-Flow-Box abgelösten und in Medium suspendierten Zellen (4.2.1.1) werden in Spritzen, an deren unteren Ende Filterhalter mit zuvor eingelegten Polycarbonatfiltern angeschraubt sind, aufgetragen und mit PBS/CMF auf eben diese Polycarbonatfilter gewaschen. Dann werden die Zellen mit einem SDS und Proteinase K enthaltenden alkalischen Lysepuffer inkubiert und gleichzeitig lysiert. Durch diese Behandlung werden die Zellwände zerstört und sämtliche Zellbestandteile, zelluläre Proteine sowie die RNA durch die Filterporen gewaschen. Die nackte, doppelsträngige DNA bleibt alleine auf dem Filter zurück, da sie für die Passage durch die Filterporen zu groß ist. Dann wird der Lysepuffer durch mehrmaliges waschen mit BE1-Puffer entfernt und die DNA direkt im Anschluß mit den entsprechenden Reparaturenukleasen inkubiert. Nach erfolgter Schadenserkenung werden durch nochmaliges Waschen mit BE1-Puffer eventuell an der DNA noch anhaftenden Reparaturenzymmoleküle entfernt und die doppelsträngige DNA durch Zugabe eines alkalischen Puffers (Elutionspuffer pH 12,15) in ihre einzelsträngige Form überführt. Hier startet nun die fraktionierte

Elution, wobei die DNA-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Molekülgröße die Filterporen passieren. Je kleiner (und somit geschädigter) die DNA-Fragmente sind, desto eher sind sie in frühen Fraktionen detektierbar. Im Umkehrschluß gilt natürlich: Je intakter die DNA vor der Inkubation mit den Reparaturenukleasen war, desto weniger zusätzliche Einzelstrangbrüche treten auf und desto länger und demzufolge langsamer eluierbar sind die DNA-Fragmente. Sie gelangen dann in die späteren Fraktionen. Ungeschädigte DNA bleibt auf dem Filter zurück. Anschließend werden die Eluate mit Phosphatpuffer (PP pH 6,0) neutralisiert, wobei sich die Einzelstränge der DNA wieder zu Doppelsträngen zusammenfügen. Um den DNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen und der auf dem Filter verbliebenen DNA quantitativ zu erfassen, wird nun jede Probe mit einem Gemisch aus Phosphatpuffer (PP pH 7,2) / Bisbenzimid versetzt, wobei das enthaltene Bisbenzimid in die DNA interkaliert. Die Elutionsrate der DNA errechnet sich nun aus dem Anteil der DNA in den einzelnen Fraktionen. Sie ist direkt proportional zur Anzahl an Einzelstrangbrüchen und alkalilabilen Läsionen. Die Methode wird standardmäßig mittels γ -Strahlung kalibriert, wobei eine Schädigung mit 6 Gy γ -Strahlung eine Läsion pro 10^6 erzeugt (Kohn et al., 1976).

4.2.3.2 Versuchsaufbau

Die Versuchsanlage besteht aus 16 – 20 25 ml-Einwegspritzen ohne Kolben, die in eine Halterung eingespannt sind, so dass alle Spritzen sich auf einem Niveau befinden. An ihrem unteren Ende werden über das luerlockTM-Gewinde Filterhalter angeschraubt, in die zuvor passende Frittenböden und darauf Polycarbonatfilter (Porengröße 2,0 μm) eingelegt wurden. Die Zellsuspension und alle verwendeten Lösungen werden von oben in die Einwegspritzen pipettiert. Mittels einer peristaltischen Mehrkanalpumpe werden sämtliche Flüssigkeiten, wie Medium, Spülpuffer oder Enzymlösungen durch die Spritze über den Filter und den sich darauf befindlichen Zellen in ein Abfallgefäß gepumpt. Zur Aufrechterhaltung verschiedener Temperaturen wird ein temperierbares Wasserbad verwendet, in das die Filterhalter vollständig eintauchen. Für den finalen Schritt der fraktionierten DNA-Elution wird der Abfallbehälter gegen einen Fraktionssammler getauscht (Abb. 4-1).

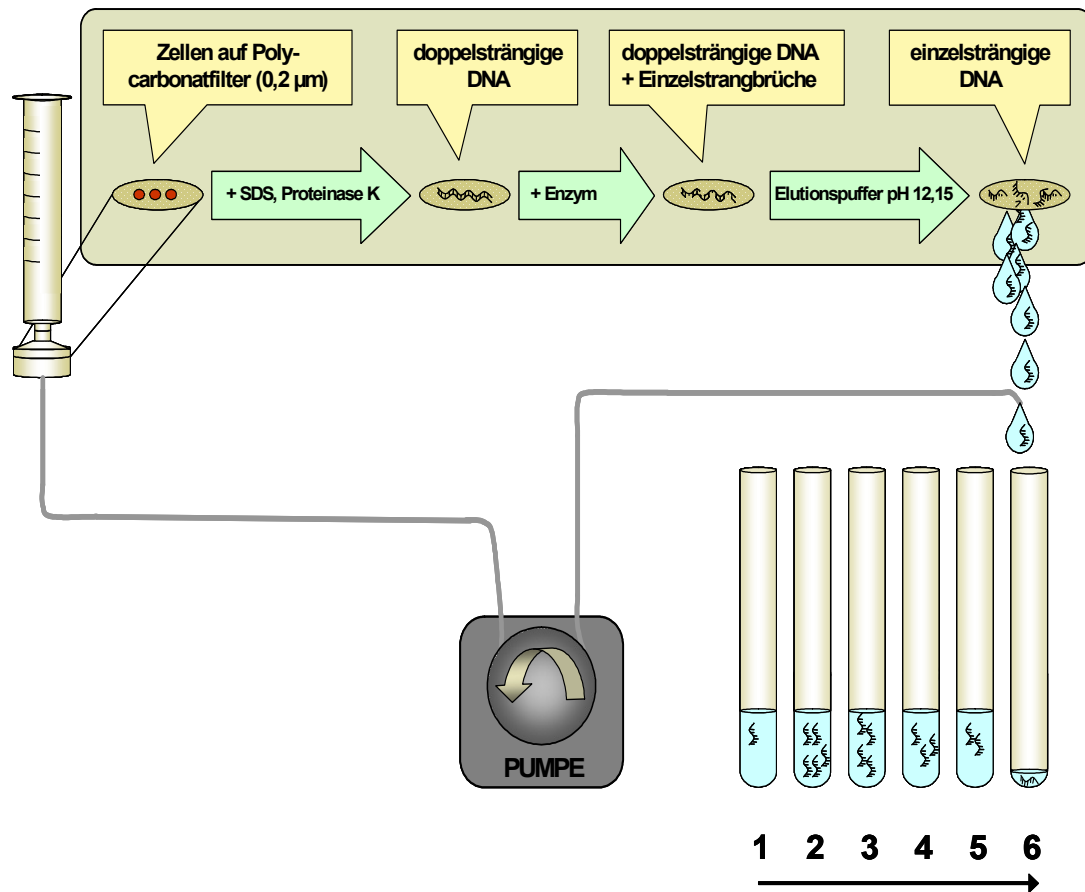


Abb. 4-1: Schematischer Aufbau und Funktionsprinzip der Alkalischen Elution.

4.2.3.3 Filtereinbau, Temperierung und Schädigung der Zellen

4.2.3.3.1 Filtereinbau

Die zu Reinigungszwecken in 0,1 M NaOH eingelegten Frittenböden werden vor Benutzung mehrfach (3 – 4 x) mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ gespült. Im Anschluß wird die entsprechende Anzahl an Polycarbonatfiltern in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ befeuchtet. Dann werden die Filterhalter aufgeschraubt, mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ befüllt, die Frittenböden eingelegt, die Polycarbonatfilter luftblasenfrei aufgelegt, die Filterhalter wieder verschlossen und an den Einwegspritzen befestigt. Das Wasserbad wird auf 4 °C heruntertemperiert, um die enzymatische Aktivität in den Versuchszellen auf ein minimum zu reduzieren und so eine etwaige Reparatur der induzierten DNA-Schäden während des Auftrags der Zellen zu vermeiden. Anschließend wird zweimal mit kaltem PBS/CMF (5 ml) gespült und der Überstand abpipettiert.

4.2.3.3.2 Schädigung mit sichtbarem Licht (VIS)

Für die Bestrahlung mit sichtbarem Licht (VIS) wird zunächst die Bestrahlungsanlage wie folgt vorbereitet: In einer Styroporkiste oder geeigneten Plastikwanne wird Eis zu einer gleichmäßigen, ebenen Fläche verdichtet. Die Box wird mittig unter der zu verwendenden Halogenlampe (1000 W Halogenlicht im Bereich von 400 – 800 nm) auf einem Schüttler platziert und der Abstand zwischen Eisfläche und Lampenunterseite genau ausgemessen. Er muß 33,0 cm betragen, damit bei einer Bestrahlungsdauer von genau 30 min eine Energiedosis von 675 kJ/m² die Zellen erreicht. Die Versuchsflasche mit den adhärent wachsenden Zellen wird zweimal mit eiskaltem PBS/CMF (4 °C) gewaschen, anschließend erfolgt Zugabe von 10 ml eiskaltem PBS/CMF. Dann wird die Flasche genau zentriert unter der Halogenlampe platziert und die Bestrahlung unter sanftem Schwenken gestartet. Nach der Schädigung wird das PBS/CMF unverzüglich entfernt und erneut zweimal mit kaltem PBSCMF (4 °C) gewaschen.

Je nach Fragestellung können die Zellen nun nach Ablösung (4.2.1.1) direkt auf die Filter der Alkalischen Elution pipettiert (4.2.3.1) oder aber zur Untersuchung der DNA-Reparatur für eine definierte Zeit in den Brutschrank zurückgelegt werden, wobei in diesem Fall auf 37 °C vorgewärmtes Medium den Zellen zugesetzt wird.

4.2.3.3.3 Schädigung mit sichtbarem Licht (VIS) + Kantenfilter (KF)

Die Schädigung der Zellen erfolgt hierbei analog zu der Schädigung mit sichtbarem Licht (VIS) (4.2.3.3.2), mit dem einzigen Unterschied, dass zwischen die Zellkulturflasche und der Halogenlampe ein Kantenfilter gelegt wird. Dieser ist aus Spezialglas und lässt nur Licht der Wellenlängen > 395 nm auf die Zellen treffen. Somit wird der geringe, aber dennoch vorhandene UVA- und UVB-Anteil der Halogenlampe herausgefiltert. Anschließend wird wie unter 4.2.3.3.2 nach der Schädigung verfahren.

4.2.3.3.4 Schädigung mit sichtbarem Licht (VIS) und D,L-Buthionin-[S,R]-sulfoximin (BSO) (mit und ohne Kantenfilter)

Die Schädigung erfolgt analog zu der Schädigung mit sichtbarem Licht (VIS) (4.2.3.3.2) oder der Schädigung mit sichtbarem Licht (VIS) + Kantenfilter (KF) (4.2.3.3.3). Die BSO-Lösung (1 mM) wird lediglich mit dem für die Zellen entsprechenden Medium aus einer sterilfiltrierten Stammlösung (10 mM) verdünnt und 24 h vor Versuchsbeginn auf die Zellen pipettiert. Anschließend wird wie unter 4.2.3.3.2 nach der Schädigung verfahren (bei Reparaturversuchen wird den Zellen im Brutschrank BSO-haltiges Medium zugesetzt).

4.2.3.3.5 Schädigung mit sichtbarem Licht (VIS) mit und ohne BSO oder Solar-Simulator (SolSim) oder UVA und Dithiotreitol (DTT)

Die Schädigung erfolgt analog zu der Schädigung mit sichtbarem Licht (VIS) (4.2.3.3.2), der Schädigung mit sichtbarem Licht (VIS) und BSO (4.2.3.3.4), der Schädigung mit Solar-Simulator (SolSim, 4.2.3.3.9), plus Diamid (4.2.3.3.11) oder UVA (4.2.3.3.12) plus BSO (4.2.3.3.13). Im Anschluß wird das PBS/CMF entfernt und die DTT-Lösung (1 mM) für die Dauer der jeweiligen DNA-Reparaturzeit auf die Zellen gegeben (Brutschrank, 37 °C, 5 % CO₂, 99 % Luftfeuchtigkeit). Die DTT-Lösung (1 mM) wird mit dem für die Zellen entsprechenden Medium aus einer sterilfiltrierten Stammlösung (10 mM) verdünnt.

4.2.3.3.6 Schädigung mit sichtbarem Licht (VIS) mit / ohne BSO und H₂O₂

Die Schädigung erfolgt analog zu der Schädigung mit sichtbarem Licht (VIS) (4.2.3.3.2) oder sichtbarem Licht und BSO (4.2.3.3.4). Direkt im Anschluß an die Bestrahlung wird das PBS/CMF entfernt und es erfolgt die Zugabe der H₂O₂-Lösung (10 ml / 75 µM). Die Inkubationszeit beträgt 15 min im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 99 % Luftfeuchtigkeit). Anschließend wird wie unter 4.2.3.3.2 nach der Schädigung verfahren.

4.2.3.3.7 Schädigung mit sichtbarem Licht (VIS) und pH 5,0

Die Schädigung erfolgt analog zu der Schädigung mit sichtbarem Licht (VIS) (4.2.3.3.2). Direkt im Anschluß an die Bestrahlung wird das PBS/CMF entfernt und es erfolgt die Zugabe des jeweiligen sterilfiltrierten Mediums, das zuvor mit verdünnter Essigsäure auf pH 5,0 eingestellt worden ist. Die Inkubationszeit beträgt 15 min, wobei die Zellkulturflaschen vollständig mit Eis bedeckt werden. Anschließend wird wie unter 4.2.3.3.2 nach der Schädigung verfahren.

4.2.3.3.8 Schädigung mit sichtbarem Licht (VIS) und Ro19-8022

Die Schädigung erfolgt analog zu der Schädigung mit sichtbarem Licht (VIS) (4.2.3.3.2), wobei allerdings vor der Bestrahlung mit einer Ro-Stammlösung und den 10 ml PBS/CMF die gewünschte Konzentration an Ro19-8022 hergestellt wird (zwischen 50 – 150 nM Endkonzentration). Die Bestrahlung erfolgt in einem Abstand von 38 cm für genau 10 min. Daraus resultiert für die Zellen eine Energiedosis von 166 kJ/m². Anschließend wird wie unter 4.2.3.3.2 nach der Schädigung verfahren.

4.2.3.3.9 Schädigung mit Solar-Simulator (SolSim)

Vor Bestrahlungsbeginn wird jedes Mal die Bestrahlungsstärke der Lampe mit einem Radiometer für UVA bestimmt. Dabei ist nach Start des Gerätes zuerst der Initialblitz abzuwarten. Dann kann durch Veränderung des Abstandes der Zellen zur Lampe die gewünschte Bestrahlungsstärke eingestellt werden.

Die adhärennten Zellen werden zweimal mit eiskaltem PBS/CMF gewaschen, dann erfolgt die Zugabe von 10 ml eiskaltem PBS/CMF für die Bestrahlung. Die Zellen werden unverzüglich unter die Lampe des SolSim gelegt, die Gerätetür wird geschlossen und das Bestrahlungsprogramm wird gestartet. Anschließend wird wie unter 4.2.3.3.2 nach der Schädigung verfahren.

4.2.3.3.10 Schädigung mit Solar-Simulator (SolSim) + Kantenfilter (KF)

Die Schädigung der Zellen erfolgt analog zu der Schädigung mit Solar-Simulator (SolSim) (4.2.3.3.9), mit dem einzigen Unterschied, dass zwischen die Zellkulturflasche und die Xenonlampe des SolSim ein Kantenfilter gelegt wird. Dieser ist aus Spezialglas und lässt nur Licht der Wellenlängen > 395 nm auf die Zellen treffen. Somit wird der geringe UVA- und UVB-Anteil der Halogenlampe herausgefiltert. Anschließend wird wie unter 4.2.3.3.2 nach der Schädigung verfahren.

4.2.3.3.11 Schädigung mit Solar-Simulator (SolSim) und Diamid

Von den adhärennt wachsenden Zellen wird das Medium abgesaugt und 10 ml des jeweiligen diamidhaltigen Mediums (Endkonzentration 0,2 mM) zupipettiert. Die Zellkulturflaschen werden dann für 15 min in den Brutschrank gelegt, so dass das Diamid in die Zellen gelangen kann. Die Schädigung der Zellen erfolgt analog zu der Schädigung mit Solar-Simulator (SolSim) (4.2.3.3.9). Anschließend wird wie unter 4.2.3.3.2 nach der Schädigung verfahren. Die Diamid-Lösung (0,2 mM) wird mit dem für die Zellen entsprechenden Medium aus einer sterilfiltrierten Stammlösung (20 mM) verdünnt.

4.2.3.3.12 Schädigung mit UVA

Für die Bestrahlung mit UVA wird zunächst die Bestrahlungsanlage wie folgt vorbereitet: In einer Styroporkiste wird Eis zu einer gleichmäßigen ebenen Fläche verdichtet. Die Box wird mittig unter der zu verwendenden UVA-Lampe (125 W, Quecksilberdampf Lampe) platziert und der Abstand zwischen Eisfläche und Lampenunterseite genau ausgemessen. Er muß 15 cm betragen, damit bei einer Bestrahlungsdauer von genau 22 min 33 s eine Energiedosis von 12 kJ/m^2 die Zellen

erreicht. Die Versuchsflasche mit den adhären wachsenden Zellen wird zweimal mit eiskaltem PBS/CMF (4 °C) gewaschen, anschließend erfolgt Zugabe von 10 ml eiskaltem PBS/CMF. Dann wird die Flasche genau zentriert unter der UVA-Lampe platziert und die Bestrahlung gestartet. Anschließend wird wie unter 4.2.3.3.2 nach der Schädigung verfahren.

4.2.3.3.13 Schädigung mit UVA und DL-Buthionin-(S,R)-sulfoximin (BSO)

Die Schädigung der Zellen erfolgt hierbei analog zu der Schädigung mit UVA (4.2.3.3.12). Die BSO-Lösung (1 mM) wird lediglich mit dem für die Zellen entsprechenden Medium aus einer sterilfiltrierten Stammlösung (10 mM) verdünnt und 24 h vor Versuchsbeginn auf die Zellen pipettiert. Anschließend wird wie unter 4.2.3.3.2 nach der Schädigung verfahren.

4.2.3.3.14 Schädigung mit Methylmethansulfonat (MMS)

Die Zellen werden zweimal mit kaltem PBS/CMF gewaschen. Dann werden 100 µm MMS in vorgewärmtes, serumfreies Medium zugegeben und die Zellen für 30 min unter Kulturbedingungen inkubiert. Anschließend wird wie unter 4.2.3.3.2 nach der Schädigung verfahren.

4.2.3.4 Durchführung der Alkalischen Elution

Die für die Alkalische Elution abtrypsinieren und auf Eis gelagerten Zellen werden in einer Konzentration von 1 Mio. Zellen pro Spur in die Einwegspritzen pipettiert und direkt mit maximaler Pumpleistung der Peristaltikpumpe (80 ml / h) auf die Polycarbonatfilter aufgebracht. Dann wird zweimal hintereinander mit je 3 ml eiskaltem PBS/CMF gespült, um etwaige Mediumsreste vollständig von den Zellen zu entfernen. Unterdessen sollte die Temperatur des Wasserbades schon auf mindestens 15 °C gestiegen sein, damit nicht das SDS des Lysepuffers in der

Kälte ausfällt. Ist die Mindesttemperatur erreicht, werden die 2 ml Lysepuffer zupipettiert und schnell durch die Filter gepumpt (80 ml / h). Direkt im Anschluß wird jetzt der Proteinase K-haltige Lysepuffer in die Spritzen pipettiert und langsam, in einem Zeitraum von 90 min, mit einer Geschwindigkeit von 3 ml / h durch die Filter gepumpt. Der Zusatz von Proteinase K ist entscheidend, da sie das Anhaften von Proteinen an die DNA verhindert und somit die Struktur der DNA für die später folgenden Reparaturenendonukleasen zugänglich macht. Ist die Lyse beendet, so folgt ein siebenmaliges Spülen der Spritzen / Filter mit je 5 ml BE1-Puffer (pH 7,5) und einer Pumpgeschwindigkeit von 80 ml / h. Bei diesem Schritt ist es wichtig, dass sämtliche Reste des SDS-haltigen Lysepuffers aus den Spritzen und von der DNA entfernt werden, da sonst bei der Neutralisation des Eluats Schaumbildung auftreten könnte. Während dieses Spülvorganges ist die Temperatur des Wasserbads auf 37 °C erhöht worden, so dass die Reparaturenendonukleasen bei dem nun folgenden Auftrageschritt direkt ihre optimale Arbeitstemperatur vorfinden. Hierbei werden 2 ml der zuvor angesetzten Enzymlösung (Tabelle 1) in die für das Enzym vorgesehenen Spuren pipettiert. In die enzymfreien Spuren, die der Ermittlung der ohne Enzymzugabe direkt entstandenen Einzelstrangbrüche dienen, werden 3 ml BE1-Puffer zugegeben. Nun wird der erste ml der Enzym- bzw. Pufferlösungen mit maximaler Pumpgeschwindigkeit (80 ml / h) auf die Filter gesaugt. Dann wird die 50 minütige Enzyminkubation mit reduzierter Geschwindigkeit gestartet. Falls jetzt im Anschluß eine zweite Enzyminkubation erfolgen soll, so wird verfahren wie bereits oben beschrieben nur mit dem Unterschied, dass in die Spuren, die jetzt nicht mehr mit Enzym inkubiert werden sollen BE1-Puffer pipettiert wird. Abschließend wird das Wasserbad auf 25 °C heruntergekühlt, jede Spur zweimal mit je 5 ml BE1-Puffer von Enzymresten befreit, einmal mit 4 ml Waschpuffer (pH 10) gespült und dann in jede Spritze 25 ml Elutionspuffer (pH 12,15) gefüllt. Anstelle des Abfallgefäßes werden nun die reagenzglasbestückten Ständer des Fraktionssammlers eingesetzt und die fraktionierte Elution mit einer Pumpgeschwindigkeit von 1,9 ml / h über 11 h gestartet. Alle 2 h erfolgt dabei automatisch ein Fraktionswechsel, so dass daraus 6 Fraktionen und in den Reagenzgläsern ein Volumen zwischen 3,6 – 4,0 ml resultiert.

Tabelle 1: Arbeitskonzentrationen der in der Alkalischen Elution verwendeten Reparaturenendonukleasen.

Enzym	Puffer	Arbeitskonzentration
Fpg-Rohextrakt	BE1 mit 0,5 mg / ml BSA	10 µg / ml
T4Endonuklease V	BE15-KCl mit 0,5 mg / ml BSA	1 µg / ml
APN1	BE1 mit 0,5 mg / ml BSA	1,5 µg/ml

4.2.3.5 Auswertung der Alkalischen Elution

Nach Beendigung des Elutionsprozesses werden die in den Spritzen verbliebenen Reste des Elutionspuffers in die Reagenzgläser der 6. Fraktion gepumpt und die Frittenböden mitsamt den ihnen anhaftenden Polycarbonatfiltern in je ein CoulterCounterTM-Döschen ausgebaut. Dann werden die Volumina der einzelnen Spuren der 6. Fraktion mittels eines Messzylinders bestimmt und mit den ihnen zugehörigen Filtern + Fritten in den CoulterCounterTM-Döschen vereint. Anschließend werden die Döschen für 2h in ein 65 °C heißes Schüttelwasserbad gestellt, damit die an den Filtern anhaftende DNA in Lösung gehen kann. Nach Ablauf dieser Zeit wird den Döschen jeweils das den anderen Fraktionen (zwischen 3,6 – 4,0 ml) entsprechende Volumen an Flüssigkeit entnommen, in die Reagenzgläser der 6. Fraktion zurückpipettiert und alle Fraktionen gleichzeitig mit Phosphatpuffer (PP pH 6) für mindestens 15 min neutralisiert. Das entscheidende bei diesem Schritt ist, dass sich die zuvor bei pH 12,15 zerstörten Wasserstoffbrücken zwischen den beiden DNA-Einzelsträngen neu bilden und sich auf diese Weise wieder ein DNA-Doppelstrang zusammenlagern kann. Anschließend wird ebenfalls allen Fraktionen das in Phosphatpuffer (PP pH 7,2) gelöste Bisbenzimid zugesetzt, wobei auf eine gute Durchmischung zu achten ist, da sich der Fluoreszenzfarbstoff gleichmäßig in die DNA-Doppelstränge einlagern soll. Nach weiteren 15 min Wartezeit unter Lichtausschluss werden die Bisbenzimid-DNA-Komplexe der einzelnen Fraktionen im Fluorimeter bei 360 nm angeregt und die Emission bei 450 nm gemessen. Die dabei erhaltenen Meßwerte werden in eine Excel-Tabelle übertragen, die dann die Läsionen pro 10⁶ Basenpaare berechnet. Die Grundlage hierfür ist, dass die Summe der Fluoreszenzeinheiten sämtlicher 6 Fraktionen einer Spur proportional der Gesamtmenge der darin befindlichen DNA ist. Wird nun der DNA-Gehalt im halblogarithmischen Maßstab gegen die Zeit aufgetragen, erhält man eine Gerade, deren Steigung direkt proportional der Zahl der Einzelstrangbrüche ist, wobei eine völlig zufällige Verteilung der Modifikationen in der DNA vorausgesetzt wird. Mit folgender Formel (Formel 4.1) kann die absolute Zahl an Einzelstrangbrüchen und Endonuklease-sensitiven Modifikationen berechnet werden:

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

Formel 4.1: Formel zur Berechnung der DNA-Modifikationen in der Alkalischen Elution.

SSB (single-strand breaks); ESS (endonuclease-sensitive sites); m (Geradensteigung).

Für unsere Bedingungen wurde von M. Pflaum per Kalibrierung mit γ -Strahlung experimentell der Faktor -2,24 bestimmt (Epe et al., 1993a; Pflaum, 1996). Zur Bestimmung der reinen Endonuklease-sensitiven Modifikationen ist es notwendig,

von den jeweiligen durch Reparaturrendonukleasen erzeugten Strangbrüche, den Anteil der direkten Einzelstrangbrüche (SSB), ermittelt aus Ansätzen ohne Reparaturrendonukleasen, abzuziehen.

Je nach Einsatz spezifischer Reparaturrendonukleasen oder deren Kombinationen (siehe Tabelle 1) können durch Berechnung verschiedenste DNA-Modifikationen nachgewiesen werden (Formel 4.2).

Tabelle 1: A) Erkennungsspektren einer Auswahl DNA-Glykosylasen modifiziert nach Epe, (Epe, 1996). B) Erkennungsspektren der unterschiedlichen Kombinationen verschiedener DNA-Glykosylasen.

A

Reparaturrendonuklease	Fpg	T4EV	APN1
Humanes homologes Protein	hOGG1	/	/
AP-Läsionen			
normal	+	+	+
1'-oxidiert	-	-	+
4'-oxidiert	+	+	+
Basenmodifikationen			
8-Hydroxyguanin	+	-	-
FaPy-Guanin	+	-	-
FaPy-Adenin	(+) ^a	-	-
Pyrimidinedimer	-	+	-

B

APN1 + Fpg	APN1 + T4EV
+	+
+	+
+	+
+	-
+	-
+	-
-	+

^a nicht prozessiert von hOGG1

Formel 4.2: Berechnung verschiedener oxidativer DNA-Modifikationen. Mit Hilfe verschiedener Reparaturenzyme und deren Kombination wurde die Anzahl der durch Sichtbares Licht [675 kJ/m²] oder UVA-Strahlung [12 kJ/m²] induzierten DNA-Modifikationen (pro 10⁶ bp) ermittelt und aufgeschlüsselt.

1) oxidierte Purine +AP-Läsionen	=	(APN1 + Fpg)
2) oxidierte Purine	=	(APN1 + Fpg) – APN1
3) Pyrimidindimere (CPDs)	=	(APN1 + T4EndoV) – (APN1)
4) reguläre + 4' oxidierte AP-Läsionen	=	T4EndoV – CPDs
5) 1' oxidierte AP-Läsionen	=	APN1 – (reguläre + 4' oxidierte)
6) reguläre, 1' und 4' oxidierte AP-Läsionen	=	APN1

4.2.3.6 *Schnelle Alkalische Elution zur Detektion höherer DNA-Schäden*

Falls die Anzahl der detektierten Schäden außerordentlich hoch ausfallen sollte und die oben beschriebene „langsame“ Alkalische Elution an ihre Nachweisgrenze von 0,7 Läsionen / 10^6 Basenpaaren stoßen sollte, so besteht noch die Möglichkeit eine „schnelle“ Alkalische Elution durchzuführen. Hierbei wird die Pumpgeschwindigkeit auf 30,7 ml / h während der Elution erhöht, wodurch sich die Elutionszeit von 11 h auf 54 min verkürzt. Durch diese Vorgehensweise wird die Empfindlichkeit der Methode zwar herabgesetzt, aber im Gegenzug können Schäden von bis zu zwei Strangbrüchen pro 10^6 Basenpaare detektiert werden. Die Anzahl der Fraktionen und das Fraktionsvolumen bleiben gleich.

Auch hier wurde die Methode mittels Schädigung durch γ -Strahlung (Kohn et al., 1976; Epe et al., 1993a) kalibriert. Aus den von D. Ballmaier (Ballmaier, 1997) durchgeführten γ -Bestrahlungsexperimenten ergibt sich demzufolge für die Umrechnung der Geradensteigungen aus der Alkalischen Schnellelution in die Anzahl Einzelstrangbrüchen pro 10^6 Basenpaaren ein Faktor $F = -8,6$ (siehe 4.2.3.5 / Formel 4.1).

4.2.4 **Testung des APN1-Enzyms mittels der Alkalischen Elution**

Nach Eintreffen des aus Frankreich gelieferten Enzyms, erfolgte die Überprüfung der Aktivität des APN1-Proteins mit Hilfe der Alkalischen Elution. Hierzu wurden humane maligne Melanomzellen (M2IV/04) mit MMS in serumfreien Medium geschädigt (siehe 4.2.3.3.14) und direkt im Anschluß auf die Filter der Alkalischen Elution aufgetragen. Durch die Verwendung verschiedener Konzentrationen der APN1-Präparation während der Enzyminkubation in BE1/BSA-Puffer bei 37 °C kann der Sättigungsbereich des APN1-Proteins ermittelt werden.

Wie aus Abb. 4-2 ersichtlich wird, liegt ab einer Konzentration von 1 μg / ml APN1 bereits eine vollständige Erkennung der induzierten DNA-Modifikationen (AP-Läsionen) durch APN1vor. In den nachfolgend durchgeführten Experimenten wurde das APN1-Enzym in einer Konzentration von 1,5 μg / ml eingesetzt.

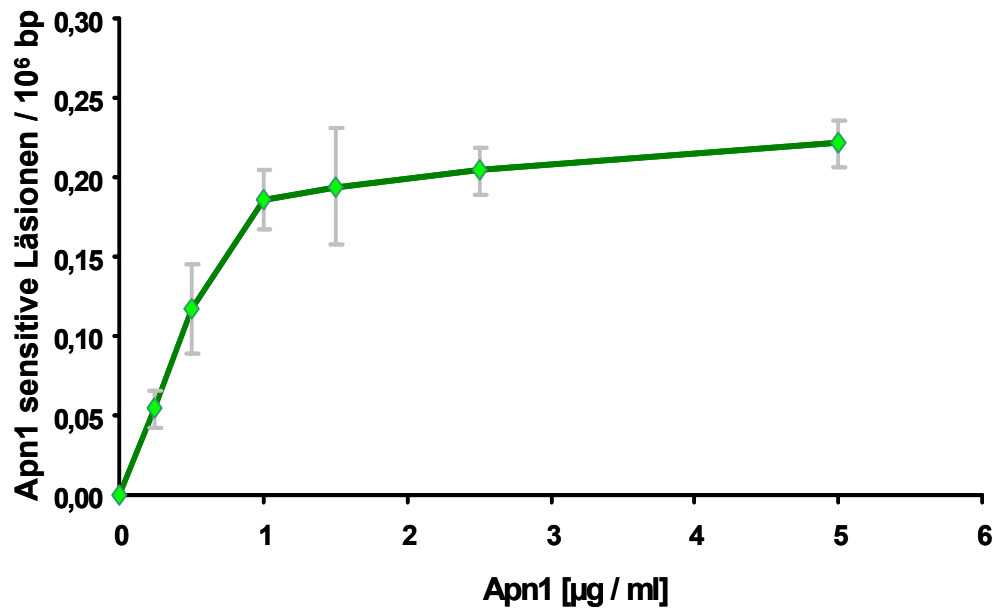


Abb. 4-2: APN1-Sättigungskurve in der Alkalischen Elution

Die humanen malignen Melanomzellen (M21V/04) wurden mit 100 µm MMS für 30 min bei 37 °C in serumfreien Medium geschädigt. Anschließend wurde mit Hilfe der Alkalischen Elution (siehe 4.2.3) die Zahl APN1-sensitiver Läsionen pro 10⁶ bp mit unterschiedlichen Enzymkonzentrationen quantifiziert. n = 2

4.2.5 Cleavage-Assay - Bestimmung der Enzymaktivität (8-oxoG-Glycosylaseaktivität) eines DNA-Reparaturenzyms (hOGG1)

4.2.5.1 Prinzip

Der Cleavage-Assay ermöglicht die direkte in vitro-Bestimmung von Enzymaktivitäten aus zellulären Proteinextrakten. Bei dieser Methode wird ein synthetisch hergestelltes, doppelsträngiges 34mer-Oligonukleotid, das an Position 16 seines einen Stranges eine modifizierte DNA-Base (7,8-Dihydro-8-oxo-guanin / 8oxoG) trägt (5'-GGCTTCATCGTTATT(8-oxoG)ATGACCTGGTGGATACCG-3') mit ³²P-Phosphor radioaktiv markiert und anschließend mit dem zu untersuchenden Enzymextrakt inkubiert. Die Synthese erfolgt wie von Girard et al. beschrieben (Girard and Boiteux, 1997). Ist das aus dem Proteinextrakt zu untersuchende Enzym (8oxoG-Glycosylase) funktionsfähig, so lagert es sich an die DNA-Modifikation an, entfernt diese und schneidet den Strang des Oligonukleotids am Zuckerphosphatrückrat ein (siehe 2.6.2).

Nach der darauffolgenden Denaturierung liegen zwei unterschiedlich lange radioaktivmarkierte Oligonukleotide vor, das zuvor durch die Glycosylase eingeschnittene und das noch völlig unveränderte Oligonukleotid. Dann werden diese mittels eines 20 %igen vertikalen Acrylamidgels aufgetrennt und mit Hilfe eines

Computerprogramms (Quantity One[®]) quantifiziert. Anhand der im Verhältnis zueinander stehenden Bandenintensitäten (geschnittene, weiterlaufende Bande gegen ungeschnittene, kürzerlaufende Bande) kann nun das Ausmaß der Enzymaktivität bestimmt werden.

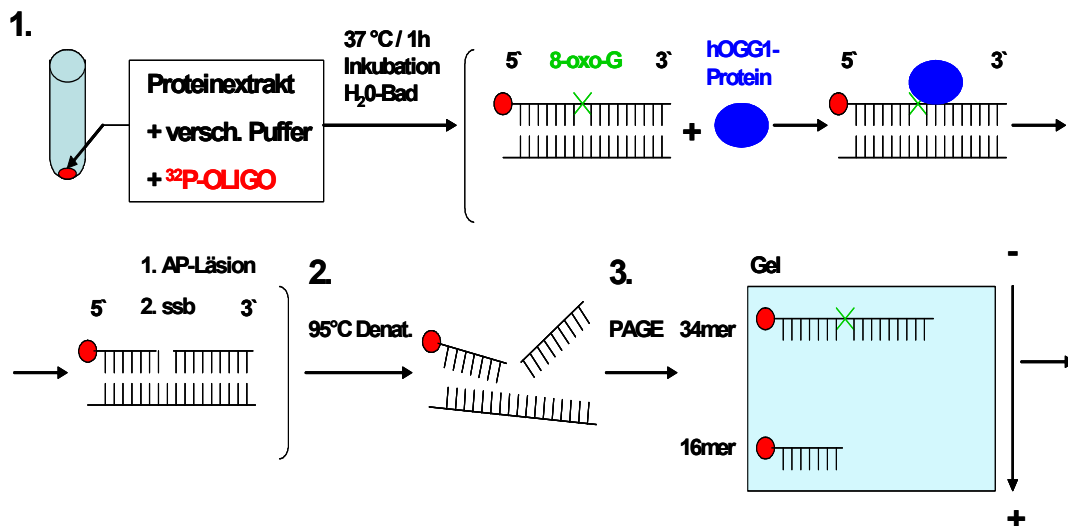


Abb. 4-3: Schematischer Aufbau und Funktionsprinzip des Cleavage-Assays.

4.2.5.2 Durchführung

4.2.5.2.1 Herstellung des 34mer-Oligonukleotids mit modifizierter Base (8oxoG) an Position 16 und seinem komplementären Strang

Die Synthese der benötigten Oligonukleotide wurde bei der Firma Operon[®] in Auftrag gegeben.

4.2.5.2.2 Herstellung der Zellextrakte

Für die Herstellung der Zellextrakte werden ca. $5 - 10 \times 10^6$ Zellen wie in (4.2.1.1) beschrieben abgelöst, zentrifugiert (2000 U/ min, 5 min, 4 °C), der Überstand wird abdekantiert, in 10ml eiskaltem PBS/CMF resuspendiert und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Vorgang wird ein zweites Mal wiederholt. Dann wird nur noch 1 ml eiskaltes PBS/CMF auf das Zellpellet gegeben, erneut gut resuspendiert und die Suspension in ein konisch geformtes 1,5er Cap pipettiert (in diesen Caps lassen sich die Zellen besser sonifizieren). Jetzt wird erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Pellet mit 400 µl Lysepuffer MIT Salz / AAL) versetzt. Als nächster Schritt folgt die Sonifikation (8 x 1 s mit je 8 s Pause, Amplitude 15 %) bei der durch mehrfache Ultraschallimpulse die Zellwände zerstört werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Caps stets auf Eis gelagert werden, da durch die Sonifikation Wärme entsteht (Gefahr der

Denaturierung). Außerdem sollte die Spitze des Sonifiers nicht den Boden des Caps berühren oder sich knapp unter der Flüssigkeitsoberfläche befinden, da sonst Schaumbildung auftreten kann. Anschließend wird der Inhalt der Caps in spezielle Ultrazentrifugengläser pipettiert, diese auf der Feinwaage genau gegeneinander austariert und die Zentrifugation gestartet (50 000 U/ min, 45 min, 4 °C). Der Überstand, mit den darin enthaltenden Proteinen, wird in ein neues Cap überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

4.2.5.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Während die Ultrazentrifugation stattfindet kann die nachfolgende Proteinbestimmung vorbereitet werden.

Zunächst wird in die Einmalküvette 798 µl H₂O_{dest.} vorgelegt, in das dann 2 µl der Proteinprobe und 200 µl des Biorad-Farbstoffreagenz pipettiert wird. Nach sehr guter Durchmischung der Probe wird diese für 15 min bei RT inkubiert und direkt danach im Spektralphotometer bei 595 nm vermessen. Analog dazu erstellt man mit Hilfe von BSA (Stammkonzentration 1 µg / µl) eine Kalibriergerade im Bereich von 0 – 20 µg.

4.2.5.2.4 Radioaktivmarkierung des Oligonukleotids

Zu 10 µl des die DNA-Basenmodifikation (8oxoG) enthaltenden Oligonukleotids (2 pmol / µl) werden bei RT 2 µl H₂O_{dest.}, 2 µl PNK-Puffer (10x), 1 µl T4Polynukleotidkinase (T4-PNK, 9 U/ µl) und 5 µl 5'-[γ-³²P]-ATP (500 µCi) in ein 0,2er Cap pipettiert, sehr gut durchmischt und 1h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

Dann wird der gesamte Inhalt des 0,2er Caps in ein 1,5er Cap überführt, 180 µl TE-Puffer (1 x), 55 µl NaCl (5 M), 20 µl SDS (10 % → 0,7 % final) und 300 µl eines Chloroform- / Ethanolgemisches (abs.) zugesetzt und 1 min stark gevortext (dabei das Cap mit einer Zange halten – heiß!). Anschließend wird 2 min auf Eis inkubiert, 2 min zentrifugiert (12 000 U/ min, 4 °C) und der Überstand in ein neues 1,5er Cap überführt. Zu dem neugewonnenen Überstand wird nun 5 µl Acrylamidlösung (0,25 %) pipettiert, kurz gevortext, 1ml Ethanol abs. hinzugefügt und erneut zentrifugiert (12 000 U/ min, 30 min, 4 °C). Dabei ist es wichtig sich die Lage des Caps in der Zentrifuge zu merken, damit man nach Beendigung der Zentrifugation eine ungefähre Vorstellung hat, wo sich das entstandene, unsichtbare DNA-Pellet befindet. Nun wird vorsichtig der Überstand entfernt und das Cap mit offenem Deckel 1 h bei RT unter dem Abzug trocknen gelassen. Nach der Trocknungszeit wird das Pellet (20 pmol / µl) mit 40 µl TE-Puffer (1 x) versetzt (Verdünnung auf 500 fmol / µl = 1:40). 20 µl davon werden in ein neues 0,2er Cap pipettiert, mit 20 µl des komplementären Oligonukleotids (1 pmol / µl) und 40 µl TE-Puffer (1 x) versetzt und gut gemischt (Endkonzentration = 125 fmol / µl). Abschließend wird das Cap für

5 min bei 95 °C auf einem Heizblock gründlich erhitzt und langsam über Nacht abkühlen gelassen (bei RT), wobei die beiden Oligonukleotide hybridisieren können. Die Lagerung erfolgt bei -20 °C; vor Gebrauch langsam auftauen lassen. Das doppelsträngige, radioaktiv markierte Oligonukleotid kann für ca. 4 – 6 Wochen verwendet werden (Halbwertszeit 14 Tage).

4.2.5.2.5 Bestimmung der Enzymaktivität (8oxoG-Glycosylaseaktivität)

Nachdem die Proteinbestimmung abgeschlossen ist wird entsprechend des Proteingehalts Proteinextrakt (n) mit Lysepuffer MIT Salz / AAL auf 4 µl (4 – n) in ein 0,2er Cap gefüllt, mit 0,2 µl radioaktivmarkiertem doppelsträngigem Oligonukleotid und 11,8 µl Lysepuffer OHNE Salz versetzt, gut gevortext und anschließend für 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Dann wird 1,6 µl NaOH (1M → final 0,1 M) zugesetzt, erneut im Wasserbad inkubiert (15 min, 37 °C) und zur Abstopfung der enzymatischen Reaktion 4 µl Stoppuffer zupipettiert und gevortext. Abschließend werden die Caps für 3 min bei 100 °C auf dem Heizblock erhitzt und direkt im Anschluß auf das Acrylamidgel aufgetragen. Als Positivkontrolle wird Fpg-Rohextrakt (10 ng) und als Negativkontrolle reiner Lysepuffer MIT Salz verwendet.

4.2.5.2.6 Durchführung der Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Analyse der in 4.2.5.2.5 enzymatisch gespaltenen Oligonukleotide wird ein 20 %iges, harnstoffhaltiges (7 M) Polyacrylamidgel verwendet. Die Gele werden immer frisch am Versuchstag hergestellt (während der Inkubation). Hierbei werden in einem Greinerröhrechen 7 ml Polyacrylamidlösung mit 70 µl APS und 7 µl TEMED gemischt und zügig in die vorbereiteten Gelkammern gegossen. Nach circa 20 min sind die Gele ausgehärtet, werden mit Kammerpuffer (TBE 1 x) überschichtet und die Geltaschen mit Hilfe einer Einwegspritze (und darin aufgezogenem Kammerpuffer) gereinigt. Dann erfolgt ein 15 minütiger Vorlauf des Gels (400 V) in dessen Anschluß direkt die Proben nach erneuter Reinigung der Geltaschen aufgetragen werden können. Die Gelelektrophorese erfolgt bei 400 V für 40 min.

4.2.5.2.7 Auswertung der Gele

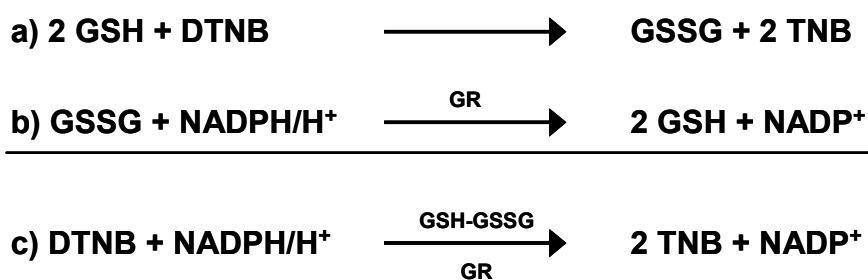
Nachdem die Gelelektrophorese beendet ist werden die Gele vorsichtig den Glasplatten der Gelkammern entnommen, zwischen die Folienschichten eines handelsüblichen Gefrierbeutels gelegt und luftblasenfrei mit einem Folienschweißgerät eingeschweißt. Dann erfolgt die Fixierung der Gele mittels Klebestreifen in einer Phosphorscreen-Cassette, der Phosphorscreen wird aufgelegt, die Cassette geschlossen und über Nacht in einem Kühlschrank aufbewahrt. Am nächsten Tag wird der Phosphorscreen mit Hilfe eines Storm[®] Phosphorimagers ausgelesen und die radioaktivmarkierten Banden so sichtbar gemacht. Die Auswertung erfolgt anschließend mit einer speziellen Computersoftware, wie zum Beispiel Quantity One[®].

4.2.6 Bestimmung des Glutathion (GSH) – Gehalts

4.2.6.1 Prinzip

Zur Ermittlung des gesamten intrazellulären Glutathion-Gehalts, bestehend aus der reduzierten Form GSH und der oxidierten Form GSSG, wird die Methode nach Griffith (Griffith and Meister, 1985) angewandt.

Hierbei wird 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellman's Reagenz) verwendet, die Thiolgruppen wie z.B. GSH unter Bildung von 5'-Thio-(2-nitrobenzoesäure) (TNB) zum Disulfid oxidiert (GSSG / siehe Formel 4.2a). Das GSSG seinerseits wird dann durch die ebenfalls im Reaktionsgemisch anwesende Glutathionreduktase, unter NADPH / H⁺ Verbrauch, wieder zum GSH reduziert (siehe Formel 4.2b). Das neugebildete GSH kann nun wieder mit DTNB reagieren. Die Konzentrationen der Reaktanden DTNB, NADPH / H⁺ und Glutathionreduktase sind so gewählt, dass die Geschwindigkeit der gesamten Reaktion c) proportional zur Konzentration des gesamten GSH-Gehaltes abläuft. Die Absorption des sich bildenden TNB wird spektralphotometrisch über die Zeit bei 412 nm erfasst.



Formel 4.2: Reaktionsgleichungen zur Bestimmung von Glutathion mit DTNB-Reagenz (Griffith and Meister, 1985)

4.2.6.2 Durchführung

4.2.6.2.1 Herstellung der Zellpellets

Zwischen $5 - 10 \times 10^6$ adhären wachsender Zellen werden wie in 4.2.1.1 beschrieben abgelöst und zentrifugiert (1200 U/ min, 5 min, 4 °C). Der Überstand wird verworfen, die Zellen mit 5 ml eiskaltem PBS/CMF gewaschen / resuspendiert, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Jetzt werden die Zellen in genau 5 ml eiskaltem PBS/CMF aufgenommen, sorgfältig vereinzelt, gezählt abermals zentrifugiert. Zum Schluß wird das Pellet in 1 ml eiskaltem PBS/CMF aufgenommen, resuspendiert, in ein 1,5er Cap transferiert und erneut zentrifugiert. Auch dieser Überstand wird verworfen, den Zellen entsprechend ihrer vorher bestimmten Zelldichte TCA-Puffer (10^7 Zellen / ml) zugesetzt und die Caps auf Eis gelagert.

4.2.6.2.2 Herstellung der Proteinextrakte

Idealerweise direkt nach Herstellung der Zellpellets sonifiziert man diese. Dabei werden mittels eines Ultraschall-Homogenisators (3 x 20 Impulse, 10 kHz, 35 W) die Zellwände der einzelnen Zellen zerstört / aufgebrochen und die zellulären Proteine somit experimentell zugänglich gemacht. Wichtig ist hierbei, dass die Spitze des Sonifiers nicht den Boden des Caps berührt oder zu gering eintaucht, denn dadurch kann Schaumbildung auftreten. Im Anschluß folgt ein Zentrifugationsschritt (12 000 U/ min, 10 min, 4 °C) um die Zellwandbruchstücke zu entfernen – der Überstand mit den darin enthaltenden Proteinen wird in ein neues Cap überführt.

4.2.6.2.3 Bestimmung der GSH + GSSG-Konzentration

Zur spektralphotometrischen Bestimmung des GSH-Gehaltes der zu untersuchenden Zellen werden in eine Einmalküvette 700 µl NADPH / Phosphat-Lösung, 100 µl DTNB-Lösung, 200 µl – n H₂O_{dest.}, 20 – 40 µl (n) der Proteinprobe und 4 µl GSH-Reduktase pipettiert. Nach guter Durchmischung wird sofort die Küvette in das Photometer platziert und die Absorptionsänderung bei 412 nm (Entstehung von TNB) alle 30 s über einen Zeitraum von 2 min gemessen. Analog wird für jeden Versuch eine Kalibriergerade mit einer frisch angesetzten GSH-Standardlösung (0 – 40 µl) erstellt.

4.2.7 Depletion von Glutathion

4.2.7.1 Prinzip und Durchführung

Für eine quantitative intrazellulären Glutathiondepletion werden die Zellen mit D,L-Buthionin-(S,R)-sulfoximin (BSO) für mindestens 24 h inkubiert (Griffith and Meister, 1979). Dabei wird in den Zellen irreversibel die γ -Glutamylcystein-Synthetase, die für den ersten Schritt der intrazellulären GSH-Neusynthese verantwortlich ist, gehemmt. Zunächst verdünnt man die BSO-Stammlösung mit Kulturmedium wie in 4.2.3.3.4 beschrieben zu einer 1 mM Lösung. Dann wird das alte Kulturmedium entfernt und die Verdünnung zu den Zellen in die Kulturflasche pipettiert. Die Inkubation erfolgt im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂, 99 % Luftfeuchtigkeit für mindestens 24 h. Vor Beginn einer Bestrahlung oder wenn die Zellen für die Alkalische Elution abgelöst werden oder im Falle einer zusätzlichen Substanzinkubation (z. B. DTT) wird zweimal mit eiskaltem PBS/CMF gewaschen, um das BSO vollständig zu entfernen.

4.2.8 Immunfluoreszenzfärbung zur Identifizierung humaner Hautfibroblasten

4.2.8.1 Prinzip

Da die humanen Hautfibroblasten aus dem gleichen Operationsmaterial stammen wie die dazugehörigen Melanomzellen, ist die Möglichkeit gegeben, dass sich unter Umständen neben der Population der Hautfibroblasten eine zweite, nämlich die der Melanomzellen befindet. Im schlimmsten Fall würde diese dann die Hautfibroblasten überwachsen, da sie eine wesentlich kürzere Verdopplungszeit haben. Um daher sicherzugehen, dass in der Zellkultur von humanen Hautfibroblasten nur diese eine Sorte von Zellen wächst, bietet sich die Möglichkeit der Immunfluoreszenzfärbung gegen ein spezifisches, nur auf der Membranoberfläche von humanen Hautfibroblasten vorkommendes Protein als eine schnelle und sehr verlässliche Methode an. Dabei wird zuerst mit dem spezifischen Antikörper gegen das Fibroblastenoberflächenprotein und dann mit einem zweiten gegen Strukturen des ersten Antikörpers gerichteten Antikörper inkubiert. Das Ergebnis kann dann unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

4.2.8.2 Durchführung

4.2.8.2.1 Ablösen der Zellen und Aufschleudern auf Objektträger

Wie in 4.2.1.1 beschrieben, werden die Zellen abgelöst. Anschließend wird die Cytospin-Zentrifuge vorbereitet, wobei jeweils ein beschrifteter Objektträger mit einer neuen Filterkarte und dem Trichteraufsatz in je einen Zentrifugeneinsatz eingespannt wird und dieser dann senkrecht nach unten (mit der Trichteröffnung nach oben) in den Rotor eingehängt wird. Als nächstes wird, entsprechend der ermittelten Zelldichte, die Zellsuspension in die Trichteröffnungen eingetropt (hierbei ergibt eine Zellzahl von 60 – 65 000 Zellen pro Objektträger einen sehr gut auswertbaren Zellfleck). Dann erfolgt die Zentrifugation (1000 U/ min für 5 min bei RT). Direkt im Anschluß werden die Objektträger den Zentrifugeneinsätzen entnommen und für 2 h in einer mit eiskaltem Methanol gefüllten Glasküvette bei -20 °C fixiert.

4.2.8.2.2 Fluoreszenzfärbung mit Antikörpern

Die Objektträger werden der Glasküvette entnommen, kurz mit eiskaltem PBS/CMF gewaschen, dann für 10 min in eiskaltem Methanol inkubiert und an der Luft trocknen gelassen. Auf die Zellflecke werden jetzt jeweils 200 µl Fibroblastenantikörper (AS02 / Verdünnung 1:100 in 5 %iger PBS/CMF-Magermilchmischung) pipettiert und die Objektträger in eine „Feuchte Kammer“ bei 37 °C für 30 min gelegt. Die Präparation der „Feuchten Kammer“ erfolgt einen Tag zuvor, indem man eine Plastikschaale ohne Nocken mit einer doppelten Lage feuchtem Zewa (H₂O_{dest.}) auslegt, diese in den Brutschrank bei 37 °C platziert, nach 1 h nachfeuchtet und über Nacht stehen lässt.

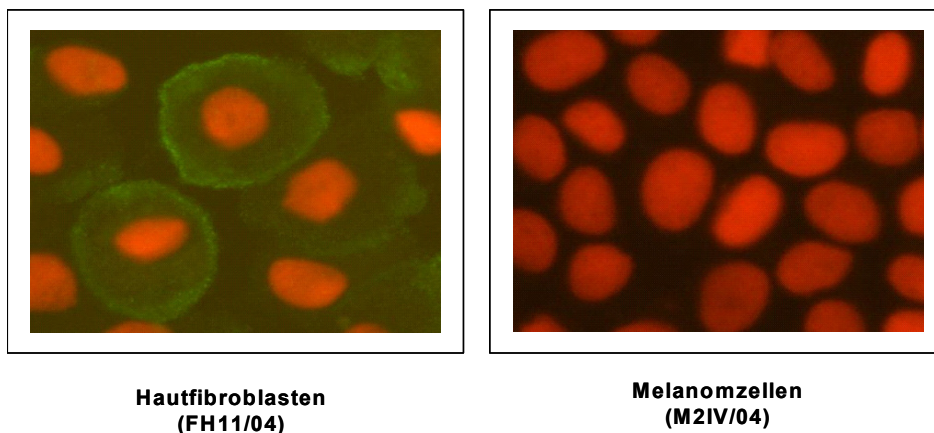


Abb. 4-4: Immunfluoreszenzfärbung eines Oberflächenantigens von humanen Hautfibroblasten (FH11/04) mit einem spezifischen Antikörper (als Vergleich: humane Melanomzellen (M2IV/04)).

Dann erfolgt die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (α -Maus FITC / Verdünnung 1:100) für 30 min bei RT. Anschließend werden die Objektträger dreimal für 5 min mit PBS/CMF auf dem Schüttler gewaschen, für 30 min die Zellkerne in einer Propidiumjodid-Küvette (Endkonzentration 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) angefärbt, erneut mit PBS/CMF für 5 min gewaschen und dann mit Antifade eingedeckt. Danach erfolgt die Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop.

4.2.9 Bestimmung der Toxizität in Säugerzellen

4.2.9.1 Proliferationsfaktor

4.2.9.1.1 Prinzip

Der Proliferationsfaktor (PF) ist ein mit wenig Aufwand und in relativ kurzer Zeit zu bestimmender Parameter, um die Toxizität einer Substanz abschätzen zu können. Dabei werden Zellen mit der entsprechenden Substanz bzw. Bestrahlungsart geschädigt, über mehrere Verdopplungszeiten weiterkultiviert und im Anschluß die Zellzahl bestimmt. Der so erhaltene Wert wird mit dem unbehandelten Wert verglichen.

4.2.9.1.2 Durchführung

4.2.9.1.2.1 Vorbereitung und Schädigung der Zellen

Als erstes werden entsprechend der Verdopplungszeit (M2IV/04 = 48 h) ca. $1 - 1,5 \times 10^6$ Zellen jeweils in zwei mittlere Zellkulturflaschen ausgestreut. Am nächsten Tag wird der Inhalt der einen Flasche mit BSO (1 mM / 24 h) inkubiert und am darauffolgenden Tag mit Sichtbarem Licht (VIS) bestrahlt (siehe 4.2.3.3.4). Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBS/CMF gewaschen, vorgewärmtes Medium (37 °C) zugesetzt und für zwei Verdopplungszeiten im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂, 99 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Dann werden die Zellen beider Flaschen abgelöst (4.2.1.1) und die Zellzahlen bestimmt.

4.2.9.1.2.2 Auswertung

96 h (= circa 2,5 Verdopplungszeiten) später werden die Zellen beider Flaschen abgelöst (4.2.1.1) und die Zellzahlen mittels Coulter CounterTM bestimmt. Der Proliferationsfaktor (PF) ist der Quotient aus der Zellzahl t_1 und t_0 . Er ist ein Maß für die Anzahl der innerhalb des Zeitraums (96 h) überlebenden Zellen und wird mit Formel 4.3 berechnet.

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

Formel 4.3: Berechnung Proliferationsfaktor.

4.2.9.2 WST-1 Zytotoxizitätstest

4.2.9.2.1 Prinzip

Mit Hilfe des WST-1-Tests lässt sich eine Vielzahl verschiedenster Substanzen auf ihr zytotoxisches Potential hin untersuchen. Dabei werden die Zellen zuerst mit der Testsubstanz inkubiert und anschließend mit dem Tetrazoliumsalz WST-1 (WST-1-(4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzendisulfonat) versetzt. Sobald das WST-1 nun in die Zellen gelangt, erfolgt die Spaltung des Tetrazoliumsalzes durch eine mitochondriale Dehydrogenase der Zellen in Formazan, wobei die Absorption (bei 450 nm) des gebildeten Formazans in regelmäßigen zeitlichen Abständen gemessen wird (Iwaki et al., 1995; Liu et al., 1995; Ishiyama et al., 1996). Je mehr lebensfähige Zellen bzw. Zellen mit funktionsfähiger mitochondrialen Dehydrogenase vorhanden sind, desto schneller und in größerem Ausmaß kann der dunkelrote Farbstoff gebildet werden.

4.2.9.2.2 Durchführung

Zwei Tage vor Versuchsbeginn werden die Zellen (M2IV/04 und FH11/04) zu je 7500 pro Well auf eine 96-Well-Platte aufgetragen. Am nächsten Tag erfolgt dann die Inkubation mit BSO für 24 h (siehe 4.2.7.1). Nach Beendigung der Inkubationszeit erfolgt direkt die Bestrahlung mit sichtbarem Licht (VIS, siehe 4.2.3.3.2 / 4.2.3.3.4)) oder mit UVA (siehe 4.2.3.3.12 / 4.2.3.3.13), dann wird pro Well das WST-1 zugesetzt und direkt die Absorption bei 450 nm zum Zeitpunkt 0 bestimmt. Nachfolgend wird alle 30 min erneut die Absorption gemessen (bis 3 h nach der ersten Messung).

4.2.10 Herstellung von Zellextrakten

4.2.10.1 Trypsin-Methode

4.2.10.1.1 Herstellung von Zellpellets

Zur Herstellung von Zellextrakten mit einer ausreichenden Proteinkonzentration benötigt man zwischen $5 - 10 \times 10^6$ Zellen. Aus entsprechend vielen Flaschen werden die Zellen abtrypsiniert (4.2.1.1), mittels Coulter CounterTM gezählt und zentrifugiert (1200 U/ min, 5 min, 4 °C). Die dabei erhaltenen Zellpellets werden zweimal mit je 10 ml eiskaltem PBS/CMF gewaschen, um noch eventuell vorhandenes Medium oder Trypsin zu entfernen, nach jedem Waschschrift gut resuspendiert und wieder pelletiert. Der Überstand des letzten Waschschriftes wird vorsichtig entfernt und die Pellets sofort bei -80 °C gelagert (mehrere Monate möglich) oder aber direkt weiterverarbeitet.

4.2.10.1.2 Herstellung von Zellextrakten

Aus mindestens 10×10^6 Zellen wird ein Pellet hergestellt (siehe 4.2.10.1.1) dem 400 µl Lysepuffer MIT Salz / AAL zugesetzt werden und auf Eis gelagert. Dann erfolgt die Zerstörung der Zellwände mit Ultraschall (Puls: 1 s, Pause: 9 s, 8 Zyklen, Amplitude 20 %), Überführung des Zelllysats in spezielle Ultrazentrifugengläser, Austarierung der Proben und die Zentrifugation für 45 min mit der Ultrazentrifuge (50000 U/ min, 4 °C). Der erhaltene Überstand wird in ein neues 0,5er Cap überführt und stets gekühlt bzw. sofort bei -70 °C eingefroren. Zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes wird ein Bradford-Test mit 2 µl des Extraktes durchgeführt. Analog dazu wird gleichzeitig eine Kalibriergerade mit einer BSA-Stammlösungen (0 bis 40 µg / ml) erstellt (siehe 4.2.5.2.3).

4.2.10.2 Zellschaber-Methode

Der Vorteil dieser Methode ist der Verzicht auf ein eventuell störendes, zusätzlich im Western-Blot auftretendes Protein (Trypsin). Außerdem werden nur ca. 5×10^6 Zellen benötigt, da keine Verluste durch Zentrifugationsschritte auftreten. Die adhärent wachsenden Zellen werden zweimal mit eiskaltem PBS/CMF gewaschen, nach berechneter Zelldichte mit Erntepuffer mP versetzt (60-120 µl für eine mittlere Zellkulturschale / p60 bzw. 250-500 µl für eine große Zellkulturschale / p100) hinzu und mit einem Zellschaber abgelöst. Die nun vorhandene Suspension wird mit einer 5 ml Pipette durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut resuspendiert, in ein konisch geformtes 1,5er Eppendorf-Cap überführt und die Zellwände mittels eines Ultraschall-Sonifikators zerstört (3-5 Sekunden konstanter Puls, maximale Amplitude,

auf Eis). Das Zelllysate wird nun bei 15000 U/ min für 15 min zentrifugiert, um Zellwand- und Organellenbestandteile abzutrennen. Der Überstand wird in ein neues 0,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und wie bei 4.2.10.1.2 weiterbehandelt.

4.2.11 Western-Blot (Proteintransfer)

4.2.11.1 Prinzip

Die Technik des Western-Blots ermöglicht den Nachweis bestimmter Proteine eines Gesamtzellextraktes aus den zu untersuchenden Zellen. Der erste Schritt besteht dabei in einer Auftrennung der Proteine des Gesamtzellextraktes (siehe 4.2.10) mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE / 4.2.5.2.6). Direkt im Anschluß werden die nun separierten Proteine auf eine „Blotting-Membran“ transferiert.

Dabei wird die Membran auf das Gel gelegt und die Proteine durch das Anlegen einer Spannung auf die Membran gezogen („geblottet“). Das ursprüngliche Trennmuster der verschiedenen Proteinmoleküle bleibt erhalten. Der spezifische Nachweis der Proteine erfolgt dann auf dieser Membran mit Hilfe einer immunologischen Reaktion, wobei die Proteine mit den für sie spezifischen Antikörpern inkubiert werden (Towbin et al., 1979).

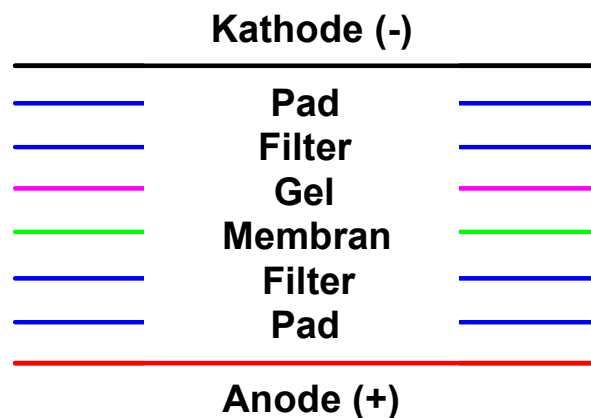


Abb. 4-5: Prinzip des Western-Blots (schematisch)

4.2.11.2 Durchführung

4.2.11.2.1 Protein-Blotting

Zunächst werden wie in Kapitel 4.2.10.2 Zellextrakte hergestellt und mit Hilfe einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (4.2.5.2.6). Dann werden pro Gel eine Nitrocellulosemembran und jeweils zwei Pads und Whatman-Filter durch Einweichen in $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ und anschließend in Transferpuffer befeuchtet. Dabei sind Luftblasen auf der Membran unbedingt zu vermeiden. Selbstverständlich werden bei allen Arbeitsschritten Handschuhe getragen, um Verunreinigungen des Gels und der Membranen zu vermeiden. Das SDS-Gel wird nach Entnahme aus der Elektrophoresekammer vorsichtig mit entionisiertem Wasser abgespült, das Sammelgel abgetrennt und in Transferpuffer unter leichtem Schwenken gereinigt. Nun stapelt man vorsichtig unter Vermeidung von Luftblasen der Reihe nach (Abb. 4-5) ein Pad, einen Whatman-Filter, die äquilibrierte Membran, das befeuchtete Trenngel und schließlich nochmals eine Lagen Whatman-Filter und Pad auf die der Anode zugewandten Seite der Transferkammer. Jetzt wird die Kammer vorsichtig verschlossen und in die Transferapparatur eingeschoben. Die Blotting-Kammer wird mit kaltem Transfer-Puffer befüllt und in einen Kälteraum gestellt. Der Transfer erfolgt nun unter Anlegen einer Spannung von 20 V für 1 h. Danach wird die Blotmembran wieder entnommen. Das Sammelgel kann nun zur unspezifischen Anfärbung aller Proteine mit Coomassieblau-Lösung behandelt werden (4.2.11.2.2).

4.2.11.2.2 Färbung des Gels

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

4.2.11.2.3 Inkubation mit Antikörpern

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

10, 15, 15 und 10 min bei Raumtemperatur aufbewahrt wird. Anschließend wird die Antikörperlösung II a oder b je nach primärem Antikörper angesetzt und zur Membran gegeben, die darin 45 min bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken aufbewahrt wird. Danach wird unter den gleichen Bedingungen dreimal für 15 min und zweimal für 10 min mit PBS/Tween (0,05 %) gewaschen.

4.2.11.3 Detektion mit ECL

Nach Durchführung der Waschschriffe können jetzt diejenigen Proteinbanden detektiert werden, an die zunächst die spezifischen Antikörper (reduzierte Form Anti-hOGG1 PA3 oder Anti-Tubulin) und anschließend die mit horse-raddish-peroxidase-gelabelten (HRP) Antirabbit-(IgG)- oder Antimouse-(IgG)- Sekundärantikörper gebunden haben. Zum Sichtbarmachen der Immunreaktion wird das Western Detection Kit mittels Chemilumineszenz (ECL+Plus™), gemäß den Angaben des Herstellers, verwendet. In ein 50 ml Greinerröhrchen werden pro Membran 4 ml der Lösung A und 4 ml der Lösung B pipettiert. Die Waschlösung wird nun von der Membran entfernt und die Detektionslösung hinzugegeben. Nach genau einer Minute wird das Reagenz entfernt und die Membran mit einem Papiertuch getrocknet. Die Membran wird in eine Autoradiographiekassette gelegt und blasenfrei mit Zellophanfolie bedeckt. Nun muss die Kassette, um Lichteinfall zu vermeiden, sofort geschlossen werden. In einer Dunkelkammer wird ein Kodak-Blottingfilm zur Belichtung in die Kassette auf die Membran gelegt und nach 10 s - 30 min (die Belichtungszeit ist abhängig von der Bindung des sekundären Antikörpers und muss experimentell ermittelt werden) wieder entnommen. Es können auch mehrere Filme hintereinander mit unterschiedlichen Expositionszeiten belichtet werden. Der belichtete Film wird mit Hilfe eines automatischen Filmentwicklers entwickelt und schließlich dokumentiert.

Nachdem der Film entwickelt wurde, wird die Membran dreimal für 15 min und zweimal für 10 min mit PBS/Tween (0,05 %) gewaschen. Sie kann nun entweder in PBS/Tween (0,05 %) bei 4 °C für sieben Tage aufbewahrt werden (vor Austrocknung schützen!) oder mit einem weiteren Antikörper inkubiert werden. Dazu wird sie, wie in 4.2.11.2.3 beschrieben, behandelt. Wichtig ist, dass ein erneutes Blockieren mit Milch 5 % erfolgt.

5 ERGEBNISSE

5.1 Vergleichende Untersuchungen an Melanomzellen und Fibroblasten

Da bisher sehr wenig über die ursächlichen Mechanismen der malignen Entartung von Melanozyten zu Melanomzellen bekannt ist, sollten in diesem Kapitel zunächst einige grundlegende Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten Melanomzellen gesammelt werden. Dazu wurden „gesunde“ Hautfibroblasten derselben Patienten zum Vergleich herangezogen.

Eines der Hauptaugenmerke lag dabei auf der Bestimmung des in ihnen mit sichtbarem Licht oder UVA-Strahlung induzierten DNA-Schadens und der nachfolgenden DNA-Reparaturgeschwindigkeit bzw. ihrer DNA-Reparaturkapazität zur Beseitigung dieses Schadens. Ein weiterer wichtiger Punkt war die Überprüfung der Funktion des hOGG1-Proteins, eines der wichtigsten Proteine der Basenexzisionsreparatur zur Beseitigung von 7,8-Dihydro-8-oxo-guanin (8-oxoG) aus der DNA (2.5 und 2.6.2). Darüberhinaus sollte auch der intrazelluläre Glutathion-Gehalt (GSH) als Bestandteil des äußerst komplexen antioxidativen Abwehrsystems der Zellen bestimmt und dessen Verlauf nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht ermittelt werden.

5.1.1 Untersuchung des intrazellulären Glutathion-Spiegels in Melanomzellen und Fibroblasten

5.1.1.1 Bestimmung des intrazellulären Glutathion-Gehalts in Melanomzellen und Fibroblasten

Da Glutathion (GSH) eines der wichtigsten zellulären Antioxidantien ist und gerade unter Bedingungen erhöhten intrazellulären oxidativen Stresses die Zelle nachhaltig vor dessen schädlichen Einfluss zu schützen vermag, war es von Interesse zu ermitteln, wie hoch der Glutathion-Gehalt in unterschiedlichen Hautzellen desselben Patienten ist und ob zwischen den Zellarten quantitative Unterschiede existieren. Aus diesem Grund wurden für die nachfolgenden Versuche unbehandelte Hautfibroblasten und Melanomzellen verschiedener Spender und zum Vergleich Mausembryofibroblasten (MEFs) untersucht. Zumal vielfältige Hinweise daraufhindeuten, dass besonders Melanomzellen eine ausgeprägtere intrazelluläre antioxidative Abwehr besitzen im Gegensatz zu Hautfibroblasten. Daher wurden die Zellen wie in 4.2.6 beschrieben aufgearbeitet und enzymatisch der Gesamtglutathion-Gehalt bestimmt.

Wie aus Abb. 5.1 ersichtlich wird, zeigt sich sowohl bei den Glutathion-Gehalten der Hautfibroblasten als auch bei den Glutathion-Gehalten der Melanomzellen ein heterogenes Bild.

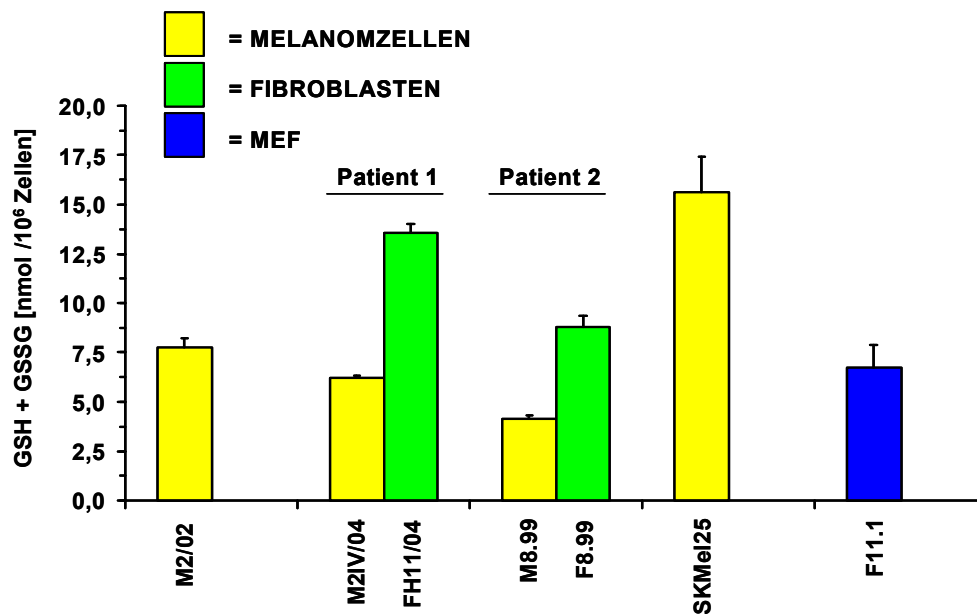


Abb. 5.1: Intrazellulärer Glutathion-Gehalt in unbehandelten Hautfibroblasten, Melanomzellen und Mausembryofibroblasten (MEFs). Von unbehandelten Zellen wurden Gesamtproteinextrakte gewonnen. Anschließend erfolgte die enzymatische Quantifizierung des intrazellulären Glutathion-Gehalts (siehe 4.2.6). $n=3$.

Auffällig ist, dass zwischen den einzelnen Melanomzellen, aber auch zwischen den Hautfibroblasten der zwei verschiedenen Patienten, starke Unterschiede hinsichtlich des Glutathion-Gehaltes existierten (bis zu Faktor 4 zwischen M8.99 und SKMel25). Ebenso zeigen sich zwischen den humanen Fibroblasten (FH11/04 und F8.99) und immortalisierten Mausembryofibroblasten (MEFs) starke Unterschiede, die aber sehr wahrscheinlich auf Interspeziesunterschiede zurückgeführt werden können. Der auffälligste Befund ist aber, dass zum einen die Hautfibroblasten der Melanompatienten bei beiden Patienten einen höheren Glutathion-Gehalt als ihre Melanomzellen aufweisen. Daraus kann geschlossen werden, dass Hautfibroblasten scheinbar stärker auf GSH für eine effektive intrazelluläre antioxidative Abwehr angewiesen sind als Melanomzellen. Letztgenannte sollen aber über ausgeprägtere Verteidigungsmechanismen gegenüber oxidativem Stress verfügen (2.1.2).

5.1.1.2 Bestimmung intrazellulärer Glutathion-Spiegel in Fibroblasten und Melanomzellen nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht

Aufgrund der auffälligen Unterschiede des Glutathion-Gesamtgehalts von Hautfibroblasten und Melanomzellen sollte als nächster Schritt die Reaktion des zellulären Glutathion-Spiegels der Zellen nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht untersucht werden. Dazu wurden die Zellen mit einer einmaligen Dosis sichtbaren Lichts [675 kJ/m^2] bestrahlt und für unterschiedlich lange Erholungsphasen (zwischen 2 h und 48 h) im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde aus dem Gesamtproteinextrakt enzymatisch der GSH-Gehalt bestimmt.

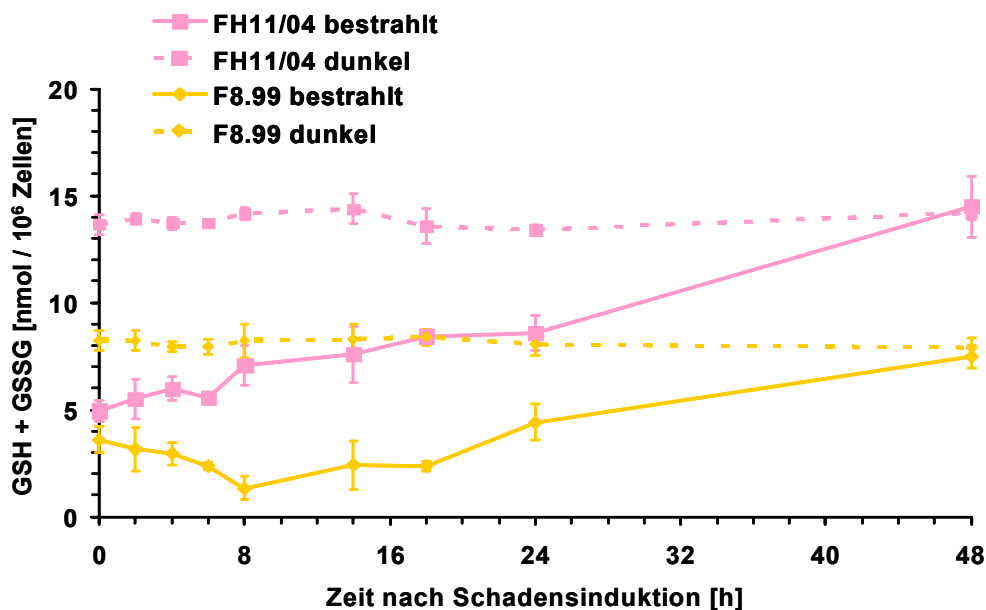


Abb. 5.2: Bestrahlung humaner Hautfibroblasten mit sichtbarem Licht. Die Bestrahlung erfolgte jeweils einmalig für 30 min [675 kJ/m^2], in PBS/CMF, Abstand 33 cm (4.2.3.3.2). Direkt im Anschluß folgten verschieden lange Erholungsphasen der jeweiligen Ansätze im Brutschrank (unter Normbedingungen). Die Quantifizierung des Glutathion-Gehalts erfolgte enzymatisch (4.1.7.5). $n=3$.

Sehr deutlich ist in Abb. 5.2 zu erkennen, dass der GSH-Gehalt in den Fibroblasten der beiden Patienten unmittelbar nach der Bestrahlung mit sichtbarem Licht massiv abfällt. Bei Patient F8.99 fällt der Glutathion-Spiegel im Verlauf der nächsten Stunden sogar noch weiter ab und erreicht seinen Tiefstand nach 8 h. In beiden Fibroblastenlinien schließt sich dann eine Regenerationsphase an, während welcher sich die Glutathion-Spiegel langsam erholen. Um das Ausgangsniveau der Glutathionkonzentration zu erreichen, benötigen die Zellen mindestens 48 h. Der Verlauf der Erholungsphase zwischen den Zellen der unterschiedlichen Patienten ist annähernd identisch, wohingegen sich die Grundspiegel der Zellen und die Glutathion-Gehalte zu den jeweiligen Zeitpunkten teilweise stark voneinander unterscheiden.

Eine gänzlich andere Reaktion auf Bestrahlung mit sichtbarem Licht unter gleichen Versuchsbedingungen, zeigen die Melanomzellen (Abb. 5.3).

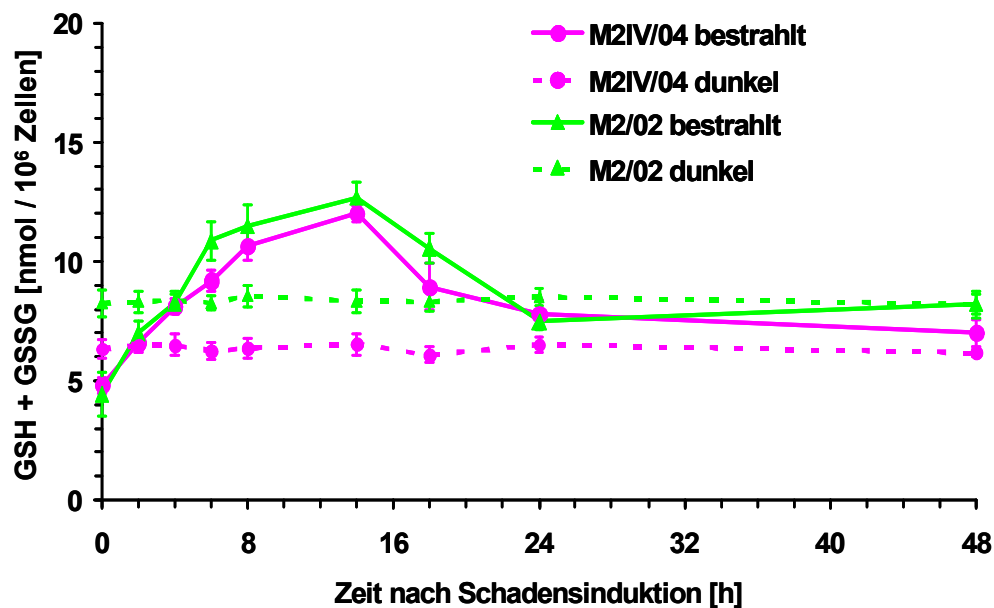


Abb. 5.3: Bestrahlung humaner Melanomzellen mit sichtbarem Licht. Die Bestrahlung erfolgte jeweils einmalig für 30 min [675 kJ/m²], in PBS/CMF, Abstand 33 cm (4.2.3.3.2). Direkt im Anschluß folgten verschieden lange Erholungsphasen der jeweiligen Ansätze im Brutschrank (unter Normbedingungen). Die Quantifizierung des Glutathion-Gehalts erfolgte enzymatisch (4.1.7.5). n=3.

Ebenfalls fiel der Glutathion-Spiegel direkt nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht (ohne Erholungsphase) stark ab – allerdings in geringerem Umfang als bei den Fibroblasten (vergleiche Abb. 5.2 und Abb. 5.3). Innerhalb der nächsten 2 – 4 h erreichte er bereits wieder sein Ausgangsniveau und nach ungefähr 12 - 14 h ein Maximum, wobei der Glutathion-Gesamtgehalt nahezu das Doppelte des Ausgangsniveaus betrug. Ab der 14. Stunde nach Bestrahlung begann ein langsamer Abfall des Glutathion-Spiegels zurück auf Ausgangswerte. Auch bei den Melanomzellen sind die zeitlichen Verläufe der Glutathion-Neubildung untereinander nahezu identisch, und es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Patienten. Für die Bestrahlung nach UVA [12 kJ/m²] konnte in Melanomzellen (M2IV/04) ein ähnlicher Verlauf des Glutathion-Spiegels wie nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

5.1.1.3 Bestimmung intrazellulärer Glutathion-Spiegel in Fibroblasten und Melanomzellen nach Inkubation mit BSO

Da in den nachfolgenden Experimenten teilweise das intrazelluläre Glutathion völlig depletiert werden sollte, wurde auf die seit langem bekannte Substanz D,L-Buthionin-(S,R)-sulfoximin (BSO) zurückgegriffen, die durch irreversible Hemmung der γ -Glutamylcysteinsynthetase die de-novo-Synthese von Glutathion hemmt. Um zu verifizieren, dass durch eine 24 stündige Vorbehandlung der Zellen mit BSO tatsächlich die teilweise beträchtlichen Glutathion-Spiegel nahezu auf Null reduziert werden können, wurden die Zellen, wie detailliert in 4.2.6 beschrieben, an Tag 1 ausgestreut, an Tag 2 mit BSO (1 mM) für 24 h inkubiert und am dritten Tag aufgearbeitet. Dabei wurden aus den zu untersuchenden Zellen Gesamtprotein-extrakte gewonnen, und diese dann enzymatisch auf ihren Glutathion-Gehalt hin vermessen (4.2.6.2.3).

Wie in Abb. 5.4 sehr gut zu erkennen ist, erfolgt durch eine 24 stündige Präinkubation der Zellen mit BSO (1 mM) eine vollständige Inhibition der Glutathion-de novo-Synthese (Will et al., 1999b). Sowohl in den Melanomzellen als auch in den Fibroblasten konnte nahezu kein Glutathion mehr dedektiert werden.

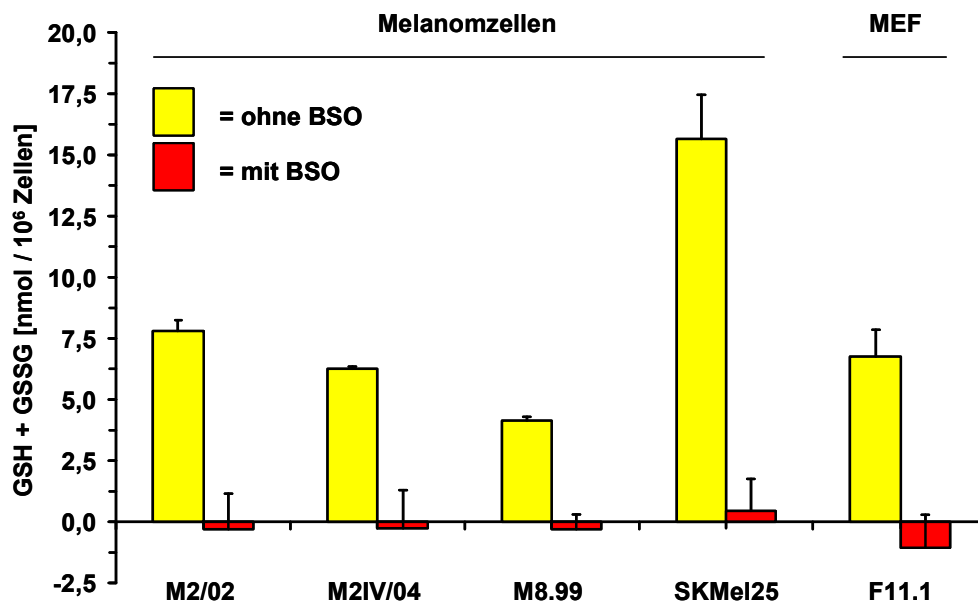


Abb. 5.4: Depletion des intrazellulären Glutathion-Spiegels mittels BSO. Die Bestimmung des Gesamtglutathion-Gehalts erfolgte nach einer 24 stündigen Inkubation der Melanomzellen und Mausembryofibroblasten (MEF) mit BSO (1 mM) im Vollmedium (siehe 4.2.7). $n=3$.

5.1.2 Toxizität durch Glutathion-Depletion bei Bestrahlung durch Sichtbares Licht (VIS) oder UVA

Um zu überprüfen, ob die BSO-Inkubation und/oder die Bestrahlungsdosen unterschiedlicher Strahlenquellen mit einer hohen Mortalität der Zellen verbunden sind, wurde die Zytotoxizität mit verschiedenen Testsystemen bestimmt.

Zum einen wurde mit Hilfe des WST-1-Tests an humanen Hautfibroblasten (FH11/04) und malignen Melanomzellen (M2IV/04) desselben Patienten der Einfluss einer Bestrahlung durch Sichtbares Licht (VIS) [225, 450, 675 kJ/m²] (siehe 4.2.3.3.2) oder UVA [4, 8, 12 kJ/m²] (siehe 4.2.3.3.12), mit oder ohne 24 stündiger BSO-Präinkubation (1 mM), ermittelt. Zum anderen wurden mittels des Proliferationsfaktors (4.2.10.1.1) der Einfluss von BSO, VIS und die Kombination aus BSO und Bestrahlung an humanen malignen Melanomzellen getestet.

5.1.2.1 Toxizitätsprüfung mittels kolorimetrischem Assay (WST-1-Test)

Mit Hilfe des WST-1-Tests, einem kolorimetrischen Assay zur Bestimmung der Toxizität verschiedenster, den zu untersuchenden Zellen zugesetzter Substanzen, ist es möglich deren zytotoxisches Potential in der jeweils verwendeten Konzentration zu bestimmen. Dazu wurden die Zellen an Tag 1 in 96-Well-Platten ausgestreut und ein Teil von ihnen mit BSO (1 mM) für 24 h präinkubiert (siehe 4.2.9.2). An Tag 2 erfolgte dann für alle Zellen die Bestrahlung mit sichtbarem Licht (4.2.3.3.2, 4.2.3.3.4) oder UVA (4.2.3.3.12, 4.2.3.3.13). Anschließend wurde den Zellen gleichzeitig der WST-1-Farbstoff (Tetrazoliumsalz) zugesetzt und in regelmäßigen Abständen dessen enzymatische Reduktion zum Formazan durch eine mitochondriale Dehydrogenase der Zellen per Absorptionsänderung (450nm) gemessen. Die Kontrollen wurden dabei bis auf die Bestrahlung völlig indentisch behandelt.

In Abb. 5.5 ist nun zum einen sehr gut zu erkennen, dass die humanen Hautfibroblasten den WST-1-Farbstoff im gleichen Zeitraum wesentlich schneller umsetzten als die Melanomzellen desselben Patienten. Betrachtet man dabei den unbestrahlten Wert auf der Y-Achse, so ergibt sich zwischen Fibroblasten und Melanomzellen ein Unterschied von circa 45 %, was auf eine höhere metabolische Aktivität der Fibroblasten schließen lässt. Der Kurvenverlauf der Hautfibroblasten zeigt nun, dass weder die Bestrahlung alleine noch die Kombination aus 24 stündiger Präinkubation mit BSO (1 mM) und nachfolgender Bestrahlung mit sichtbarem Licht, einen Einfluss auf die Viabilität der Zellen hat. Allenfalls bei der höchsten Strahlendosis Sichtbaren Lichts zusammen mit BSO ist eine leichte Minderung der gemessenen Absorption zu erkennen.

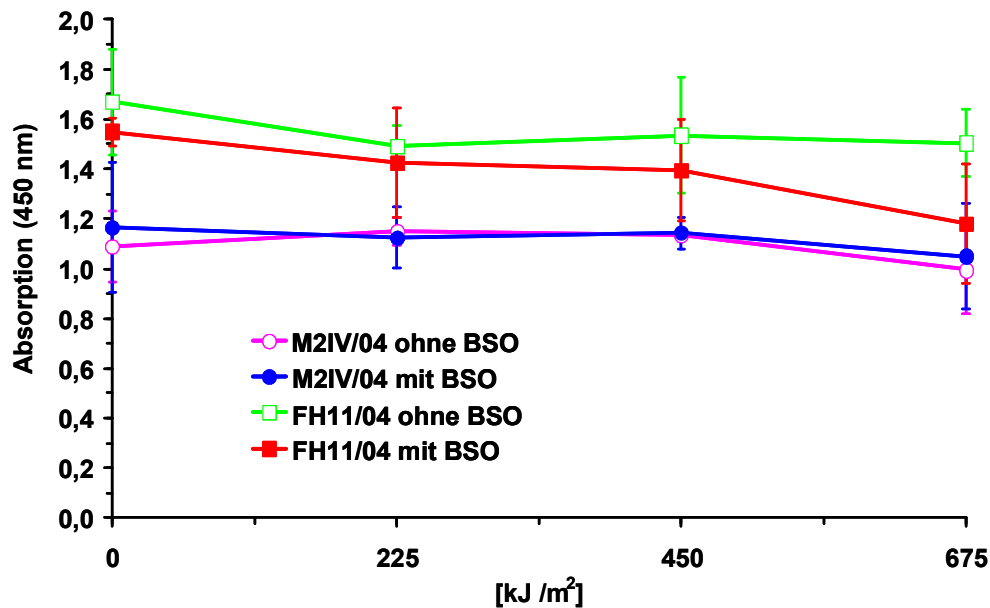


Abb. 5.5: Zytotoxizität der Bestrahlung von Hautfibroblasten (FH11/04) und Melanomzellen (M2IV/04) mit sichtbarem Licht (VIS) im WST-1-Test. Die Bestrahlung erfolgte mit sichtbarem Licht (1000 W) für 10, 20, 30 min in Vollmedium und 33 cm Abstand [225, 450, 675 kJ/m²]. Ein Teil der Zellen wurden mit BSO (1 mM) für 24 h präinkubiert. 2 h nach WST-1-Zugabe wurde die Absorption bei 450 nm bestimmt (4.2.9.2).

Einen offensichtlich ebenso geringen Einfluss hat die alleinige Bestrahlung der untersuchten Melanomzellen mit sichtbarem Licht. Auch bei der höchsten Strahlendosis zeigt sich kein Unterschied zu der Dunkelkontrolle. Zudem wird deutlich, dass auch die Präinkubation mit BSO und nachfolgende Bestrahlung die Viabilität der Zellen nicht senkt. Die Grafik zeigt deutlich, dass unter den gewählten Bedingungen die Bestrahlung mit sichtbarem Licht und die Behandlung mit BSO keinen Effekt auf die Viabilität der Hautfibroblasten und der Melanomzellen haben.

Abb. 5.6 zeigt nun die WST-1-Testergebnisse der gleichen Zellen nach dem gleichen Prozedere der BSO-Präinkubation. Der einzige Unterschied besteht darin, dass statt sichtbarem Licht UVA-Strahlung [4, 8, 12 kJ/m²] verwendet wurde. Auch hier ist auf den ersten Blick erkennbar, dass die Fibroblasten deutlich schneller den WST-1-Farbstoff umsetzen können. Betrachtet man zunächst die Hautfibroblasten, so zeigt sich, dass ab einer Strahlendosis von 4 kJ/m² die Viabilität kontinuierlich bis zur höchsten Strahlendosis um circa 20 % absinkt. Genau der gleiche Verlauf ist auch bei einer BSO-Präinkubation zu erkennen. Demzufolge hat der Zusatz von BSO keinen Einfluss. Ein etwas anderes Bild präsentiert sich bei den Melanomzellen. Weder die alleinige Bestrahlung mit UVA noch die Kombination aus BSO und UVA-Bestrahlung zeigen für sich einen toxischen Effekt. Auch in diesem Fall zeigen sich die Melanomzellen also etwas robuster als die Hautfibroblasten.

Demzufolge ist auch bei der Bestrahlung mit UVA unter den gewählten Bedingungen mit keiner Beeinflussung der nachfolgenden Untersuchungen durch zytotoxische Effekte zu rechnen.

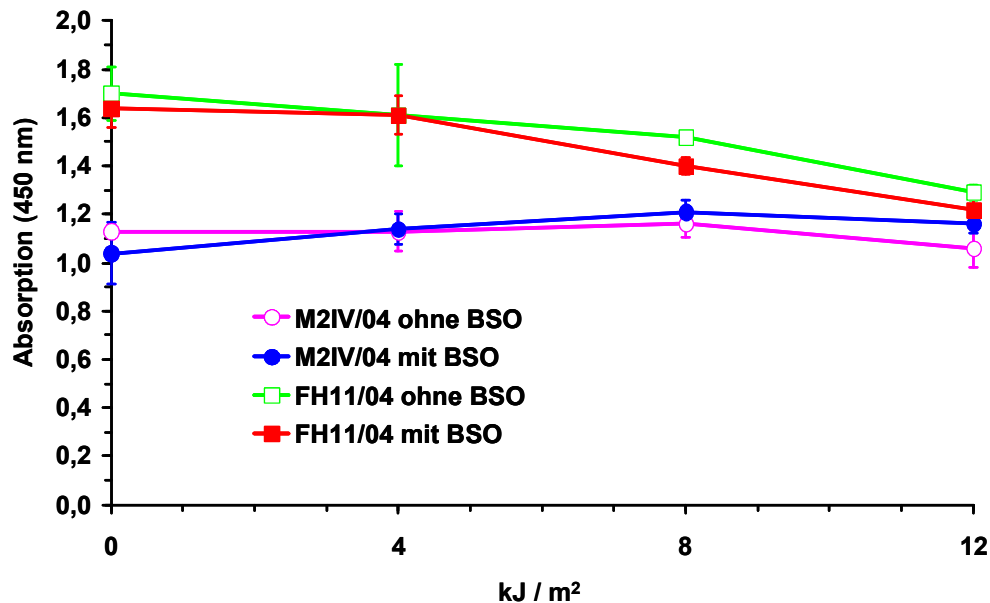


Abb. 5.6: Zytotoxizität von Hautfibroblasten (FH11/04) und Melanomzellen (M2IV/04) nach Bestrahlung mit UVA im WST-1Test. Die Bestrahlung erfolgte mit UVA (125 W) in Vollmedium und 15 cm Abstand [4, 8, 12 kJ/m²]. Ein Teil der Zellen wurden mit BSO (1 mM) für 24 h präinkubiert. 2 h nach WST-1-Zugabe wurde die Absorption bei 450 nm bestimmt (4.2.9.2).

5.1.2.2 Toxizitätsprüfung mittels Proliferationsfaktor

Zur Bestätigung und Absicherung der im WST-1-Test ermittelten Daten wurde für die Melanomzellen (M2IV/04) der Proliferationsfaktor nach Inkubation mit BSO (1 mM / 24 h), nach einmaliger Bestrahlung mit sichtbarem Licht [675 kJ/m²] und nach der Kombination BSO + Bestrahlung ermittelt. Dazu wurden die Zellen an Tag 1 in Zellkulturflaschen ausgestreut, an Tag 2 teilweise mit BSO inkubiert und an Tag 3 mit einer einmaligen Dosis sichtbaren Lichts bestrahlt [675 kJ/m²] (siehe 4.2.9.1). Nach Ablauf eines Zeitraums von 96 h (entspricht etwa 2,5 Verdopplungszeiten) wurden die Zellzahlen der behandelten Zellen und der unbestrahlten Kontrollen ermittelt. Der „Proliferationsfaktor“ ist als der Quotient aus den Zellzahlen nach der 96-h-Inkubation (t_1) und direkt nach der Schädigung (t_0) definiert (4.2.9.1.2.2). Für Fibroblasten desselben Patienten war dies nicht möglich, da zwei Verdopplungszeiten in diesem Fall einem Zeitraum von 20 Tagen entsprechen hätten.

Die Ergebnisse der Bestimmung der Proliferationsfaktoren (Abb. 5.7) spiegeln die Daten des WST-1-Tests wieder (siehe Abb. 5.5).

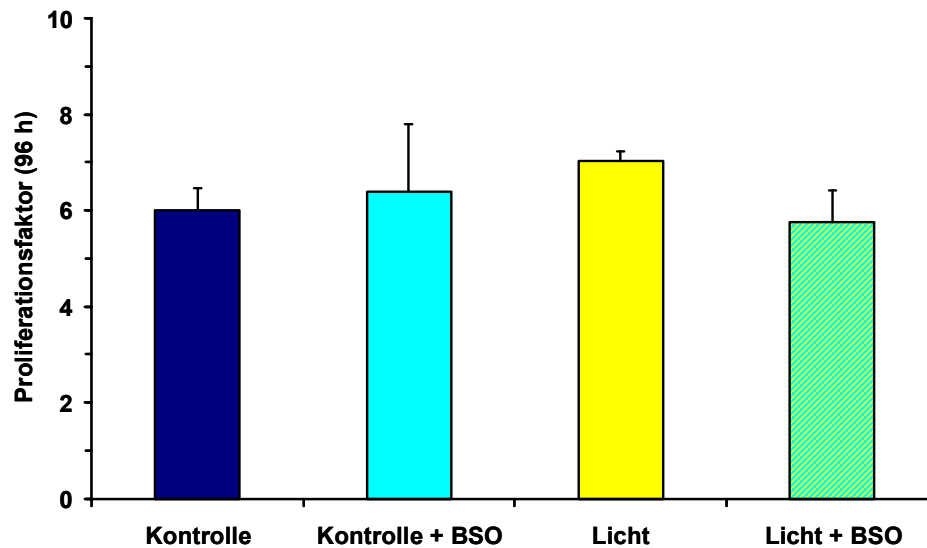


Abb. 5.7: Proliferationsfaktor von Melanomzellen (M2IV/04) nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht, Präinkubation mit BSO oder deren Kombination. Die Zellen wurden mit BSO (1 mM / für 24 h) präinkubiert und nach der Schädigung in Vollmedium im Brutschrank inkubiert. Die Bestrahlung erfolgte mit sichtbarem Licht (1000 W) für 30 min in PBS/CMF und 33 cm Abstand [675 kJ/m²]. Das Verhältnis der Zellzahlen 96 h nach der Schädigung und direkt nach der Schädigung wurde als „Proliferationsfaktor“ bestimmt. n=3.

Weder die alleinige Inkubation mit BSO (1 mM / 24 h) oder die alleinige Bestrahlung mit sichtbarem Licht [675 kJ/m²], noch die Kombination aus beidem zeigt unter den gewählten Bedingungen einen zytotoxischen Effekt für die untersuchten Melanomzellen. Die Proliferationsfaktoren der behandelten Zellen bewegen sich auf dem Niveau der Kontrollzellen. Daher kann unter den gewählten Versuchsbedingungen ein zytotoxischer Einfluss der Glutathion-Depletion durch BSO, der Bestrahlung mit sichtbarem Licht oder deren Kombination auf die Zellen während der Versuchsdauer ausgeschlossen werden. Demzufolge sind die bei diesen Versuchen verwendeten Konzentrationen bzw. Bestrahlungsdosen für nachfolgende Experimente geeignet.

5.1.3 Ermittlung der DNA-Schadensprofile in Melanomzellen und Fibroblasten nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht oder UVA

Zur genauen Quantifizierung des durch die zwei verschiedenen Bestrahlungsarten induzierten DNA-Schadens wurden humane maligne Melanomzellen (M2IV/04) und humane Hautfibroblasten (FH11/04) desselben Patienten mit Hilfe der Alkalischen Elutionstechnik untersucht. Zunächst wurden die Zellen entweder mit einer einmaligen Dosis Sichtbaren Lichts + Kantenfilter (undurchlässig für $\lambda < 395 \text{ nm}$ / siehe 4.2.3.3.3) oder mit einer einmaligen Dosis UVA bestrahlt (siehe 4.2.3.3.12) und anschließend mit verschiedenen Reparaturenendonukleasen inkubiert (Fpg, T4EndonukleaseV und APN1 / siehe Tabelle und Formel 4.1).

Da die verwendeten Reparaturproteine alle unterschiedliche Erkennungsspektren für verschiedene DNA-Modifikationen aufwiesen (Tabelle), war es nun durch deren Kombination möglich, den induzierten Schaden genau aufzuschlüsseln. Von den ermittelten Werten wurden die Hintergrundspiegel an DNA-Modifikationen völlig unbehandelter Zellen abgezogen, um den direkten, durch die Bestrahlung induzierten Schaden zu bestimmen.

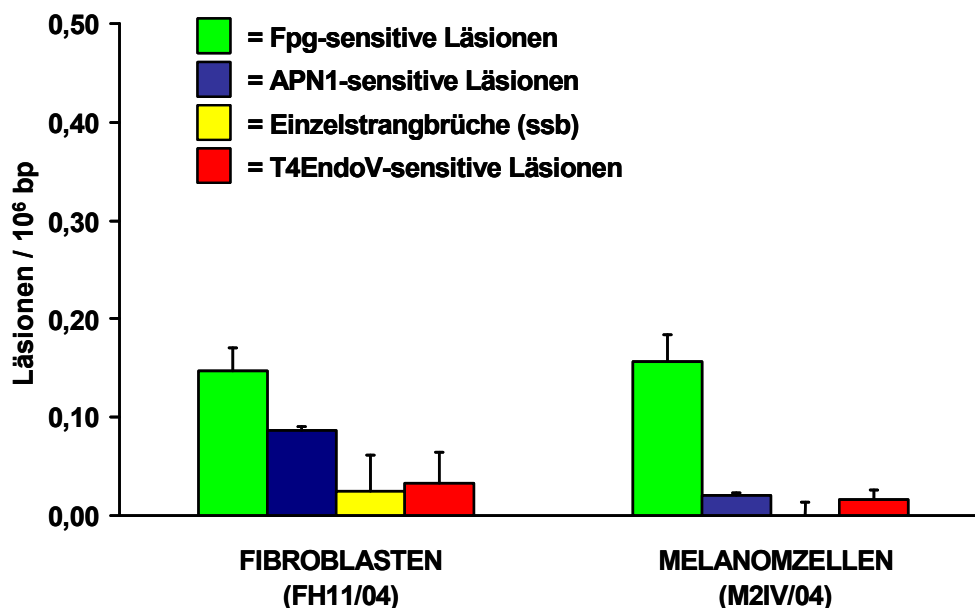


Abb. 5.8: DNA-Schadensspektrum nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht + Kantenfilter (> 395 nm). Die Bestrahlung der humanen Hautfibroblasten (FH11/04) und der humanen malignen Melanomzellen (M2IV/04) erfolgte mit sichtbarem Licht (1000 W) für 30 min in PBS/CMF und 33 cm Abstand [675 kJ/m^2], wobei zusätzlich zwischen der Zellkulturflasche und der Lampe ein Kantenfilter (undurchlässig für $\lambda < 395 \text{ nm}$) verwendet wurde. Die Quantifizierung der verschiedenen DNA-Modifikationen erfolgte mit Hilfe unterschiedlicher DNA-Reparaturenendonukleasen (Fpg-, APN1- und T4EndoV-Protein) (Tabelle 1, Formel 4.2). $n=2$.

Wie nun aus dem Schadensprofil (Abb. 5.8), erhalten durch die einmalige Bestrahlung mit sichtbarem Licht + Kantenfilter (undurchlässig für $\lambda < 395$ nm), ersichtlich wird, dominieren sowohl in Fibroblasten als auch in Melanomzellen Fpg-sensitive oxidierte DNA-Basenmodifikationen wie 7,8-Dihydro-8-oxo-guanin (8-oxoG). Auffällig ist zudem die Tatsache, dass in Hautfibroblasten AP-Läsionen um den Faktor 4 häufiger auftreten als in Melanomzellen. Einzelstrangbrüche werden nur in sehr geringem Ausmaß in Fibroblasten induziert, in Melanomzellen fehlen sie völlig. Bei Verwendung eines Kantenfilters (undurchlässig für $\lambda < 395$ nm) werden nahezu keine Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPDs) induziert.

In Abb. 5.9 ist nun der durch eine einmalige Dosis UVA-Strahlung [12 kJ/m^2] induzierte DNA-Schaden dargestellt. Die hier dominierenden DNA-Modifikationen sind eindeutig Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPDs), die in gleichem Umfang sowohl in Fibroblasten als auch in Melanomzellen gebildet werden.

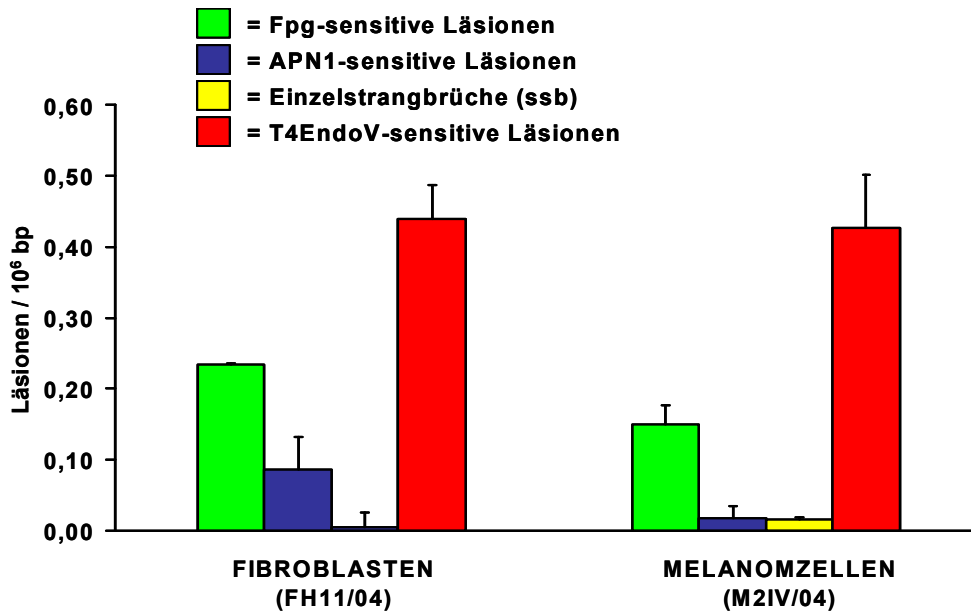


Abb. 5.9: DNA-Schadensspektrum nach Bestrahlung mit UVA. Die Bestrahlung der humanen Hautfibroblasten (FH11/04) und der humanen malignen Melanomzellen (M2IV/04) erfolgte mit UVA (125 W) für 22 min 33 s in PBS/CMF und 15 cm Abstand [12 kJ/m^2]. Die Quantifizierung der verschiedenen DNA-Modifikationen erfolgte mit Hilfe unterschiedlicher DNA-Reparaturenukleasen (Fpg-, APN1- und T4EndoV-Protein) (Tabelle 1, Formel 4.2). $n=2-3$.

Ebenfalls werden reine oxidierte Purine, wie 8-oxoG, in ähnlichem Ausmaß in beiden Zellarten induziert (Fpg-sensitive Läsionen abzüglich der AP-Läsionen). Allerdings fällt auf, dass in den Fibroblasten durch UVA-Strahlung deutlich mehr Fpg-sensitive Läsionen induziert werden als durch sichtbares Licht (Abb. 5.8). Das lässt den Schluß zu, dass Hautfibroblasten wahrscheinlich sensitiver auf UVA-Strahlung reagieren als Melanomzellen. Wie auch schon bei der Bestrahlung mit sichtbarem

Licht wurden mit UVA-Strahlung ebenfalls um den Faktor 4 mehr AP-Läsionen in Fibroblasten induziert als in Melanomzellen.

5.1.4 Induktion und Reparatur oxidativer DNA-Schäden in Melanomzellen und Fibroblasten nach Bestrahlung mit UVA oder sichtbarem Licht

Sonnenlicht, das zu über 50 % aus sichtbarem Licht und dessen UV-Strahlung zu über 90 % aus UVA-Strahlung besteht (2.3.5.1), stellt für alle Hautzellen eine ständige Quelle exogen gebildeter reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) dar. Desweiteren ist bekannt, dass eben diese ROS oxidative DNA-Modifikationen induzieren können, die aber bis zu einem gewissen Grad von der Zelle mit Hilfe ihrer vielfältigen und effektiven DNA-Reparaturmechanismen und ihrem antioxidativen Abwehrsystem erkannt und entfernt bzw. repariert werden können. Da unser Hauptaugenmerk eben auf der Reparatur oxidativer DNA-Schäden und deren Beitrag zur Vermeidung der Krebsentstehung liegt, war es äußerst interessant zu untersuchen, in welchem Ausmaß zwei sehr unterschiedliche Zellarten der Haut, nämlich Hautfibroblasten und Melanomzellen, die durch sichtbares Licht oder UVA-Strahlung induzierten DNA-Modifikationen reparieren können.

5.1.4.1 Induktion und Reparaturkapazität von Melanomzellen und Fibroblasten gegenüber Bestrahlung mit UVA

Zunächst wurde das verwendete Zellpaar, bestehend aus Melanomzellen (M2IV/04) und Hautfibroblasten (FH11/04) desselben Patienten, durch eine einmaligen Bestrahlung mit UVA [12 kJ/m²] auf deren Sensitivität und DNA-Reparaturkapazität hin untersucht. Nach erfolgter Bestrahlung wurden die behandelten Zellen für 4 h im Brutschrank inkubiert (5 % CO₂, 99 % Luftfeuchtigkeit), so dass sie die Möglichkeit hatten, den zuvor induzierten DNA-Schaden zu reparieren. Nach Ablauf dieser Reparaturphase wurden die Zellen von den Böden ihrer Zellkulturflaschen abgelöst (siehe 4.2.1), sofort auf die Filter der Alkalischen Elution aufgetragen und der noch verbliebene „Restschaden“ mit Hilfe der Reparaturrendonuklease Fpg (siehe 4.2.3) bestimmt.

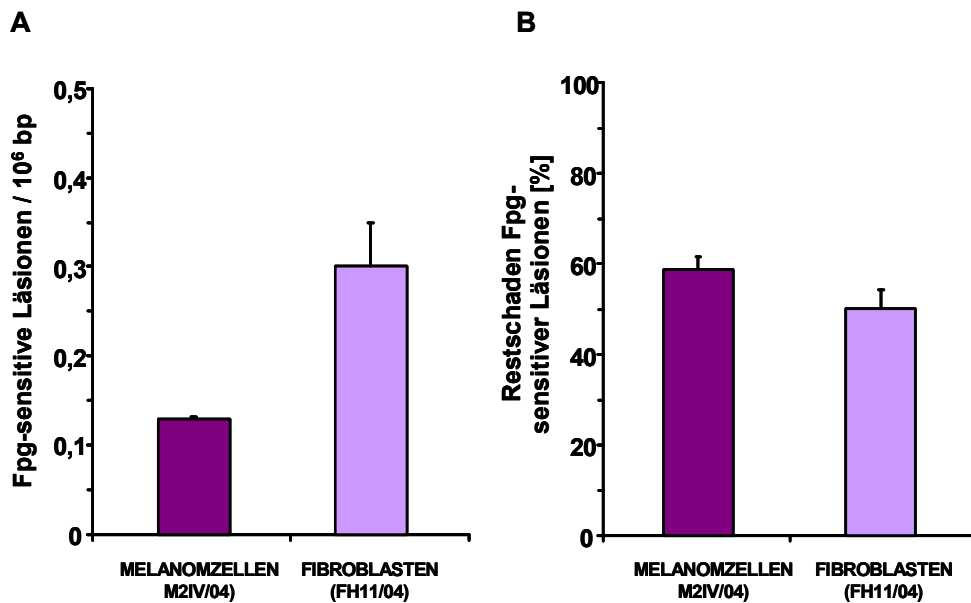


Abb. 5.10: Induktion (A) und Reparatur (B) oxidativer DNA-Schäden in Melanomzellen (M2IV/04) und Hautfibroblasten (FH11/04) desselben Patienten nach Bestrahlung mit UVA. Die Zellen wurden mit einer einmaligen Dosis UVA-Strahlung [12 kJ/m^2] in PBS/CMF geschädigt. Anschließend folgte eine 4 stündige Reparaturphase im Brutschrank (unter Normbedingungen) (4.2.3.3.12). Dann erfolgte die Quantifizierung der induzierten DNA-Modifikationen mit Hilfe der Alkalischen Elution und Fpg-Protein. $n=3$.

Aus Abb. 5.10 wird nochmals ersichtlich, dass Hautfibroblasten deutlich sensitiver auf UVA-Strahlung reagieren als Melanomzellen (siehe auch Abb. 5.9). In ihnen wurden mit der gleichen Strahlendosis um den Faktor 2 mehr oxidative DNA-Modifikationen induziert als in Melanomzellen. Betrachtete man aber die DNA-Reparaturkapazität der beiden Zellarten, so ist nach einer 4 stündigen Reparaturphase im Brutschrank kein Unterschied hinsichtlich des Restschadens zwischen Melanomzellen oder Fibroblasten zu erkennen. In beiden Fällen wurde der DNA-Schaden deutlich reduziert – in den Melanomzellen um ca. 40 % und in den Fibroblasten um ca. 50 %.

Daraus lässt sich folgern, dass beide Zellarten fähig sind, durch UVA-Strahlung induzierte oxidative DNA-Modifikationen in relativ kurzer Zeit effektiv zu erkennen und zu reparieren. Desweiteren scheint die DNA-Reparaturkapazität auch in den Fibroblasten, in denen doppelt so viele oxidative DNA-Modifikationen induziert wurden wie in den Melanomzellen, nicht beeinträchtigt oder gar überlastet zu sein.

5.1.4.2 Induktion und Reparatur oxidativer DNA-Schäden in Melanomzellen und Fibroblasten nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht

Nachdem exemplarisch in einem Zellpaar, bestehend aus Fibroblasten (FH11/04) und Melanomzellen (M2IV/04) eines Patienten, die DNA-Schadensprofile nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht oder UVA bestimmt worden waren, war es nun von Interesse, ob sich größere individuelle Unterschiede hinsichtlich der Sensitivität aber auch der DNA-Reparaturkapazität nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht finden ließen. Daher wurden die Fibroblasten und Melanomzellen verschiedener Patienten zunächst mit einer einmaligen Dosis Sichtbaren Lichts [675 kJ/m²] bestrahlt, da unter diesen Bedingungen, wie in Abb. 5.8 gezeigt, eine beträchtliche Anzahl oxidativer DNA-Modifikationen induziert werden können. Anschließend wurden die behandelten Zellen für 4 h im Brutschrank inkubiert (5 % CO₂, 99 % Luftfeuchtigkeit), so dass sie die Möglichkeit hatten, den zuvor induzierten DNA-Schaden zu reparieren. Nach Ablauf dieser Reparaturphase wurden die Zellen von den Böden ihrer Zellkulturflaschen abgelöst (siehe 4.2.1), sofort auf die Filter der Alkalischen Elution aufgetragen und der noch verbliebene „Restschaden“ mit Hilfe der Alkalischen Elution und Reparaturoendonuklease Fpg (siehe 4.2.3) bestimmt.

Wie in Abb. 5.11 zu erkennen ist, bietet die Induktion oxidativer DNA-Schäden in Melanomzellen ein eher uneinheitliches Bild. Unter Melanomzellen verschiedener Patienten variiert die Induktion Fpg-sensitiver Läsionen relativ stark. So zeigen

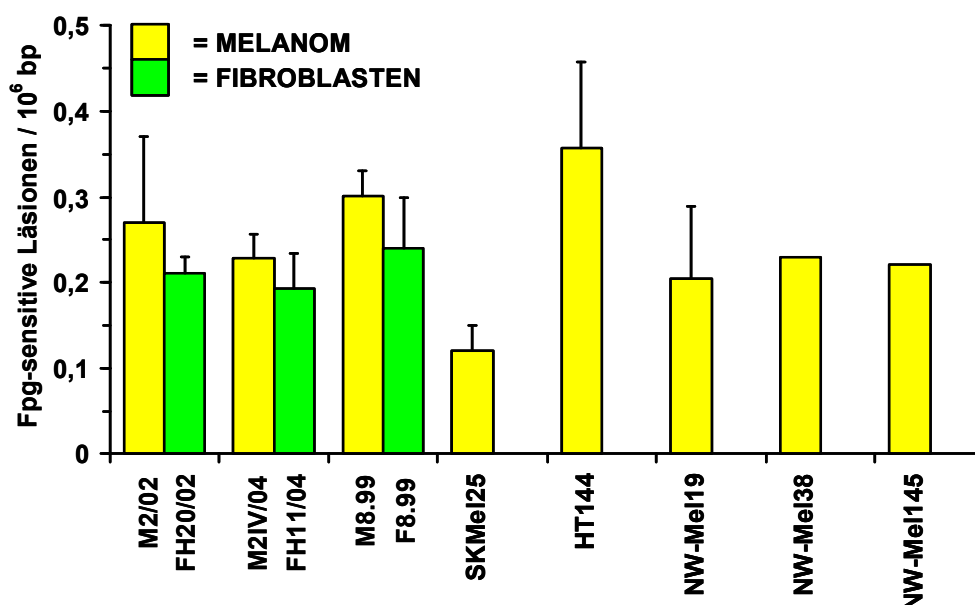


Abb. 5.11: Induktion oxidativer DNA-Schäden in verschiedenen Melanomzellen und ihrer zugehörigen Hautfibroblasten nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht. Die Schadensinduktion erfolgte durch eine einmalige 30 minütige Bestrahlung mit sichtbarem Licht [675 kJ/m²] (siehe 4.2.3.3.2). Die Quantifizierung des induzierten Schadens erfolgte nach 4 stündiger Reparaturzeit im Brutschrank (5 % CO₂, 37 °C, 99 % Luftfeuchtigkeit) mittels Fpg-Protein im Zuge der Alkalischen Elution (siehe 4.2.3). n=1-4.

beispielsweise die Melanomzelle HT144 eine annähernd dreifach so hohe Sensitivität wie die Zellen SKMel25 (Abb. 5.11). Die Induktion oxidativer DNA-Schäden innerhalb des Fibroblastenkollektivs zeigt sich wesentlich homogener. Hier liegen die einzelnen Werte relativ dicht beieinander, so dass keine signifikanten Unterschiede zu erkennen sind. Grundsätzlich kann auch festgestellt werden, dass die Induktion oxidativer DNA-Schäden der Fibroblasten etwas niedriger liegt als die der zugehörigen Melanomzellen desselben Patienten – allerdings ist der Unterschied ohne statistische Signifikanz.

Ein ähnliches Bild wie zuvor bei der Bildung oxidativer DNA-Schäden zeigt sich auch bei den Reparaturkapazitäten der untersuchten Zellen (Abb. 5.12).

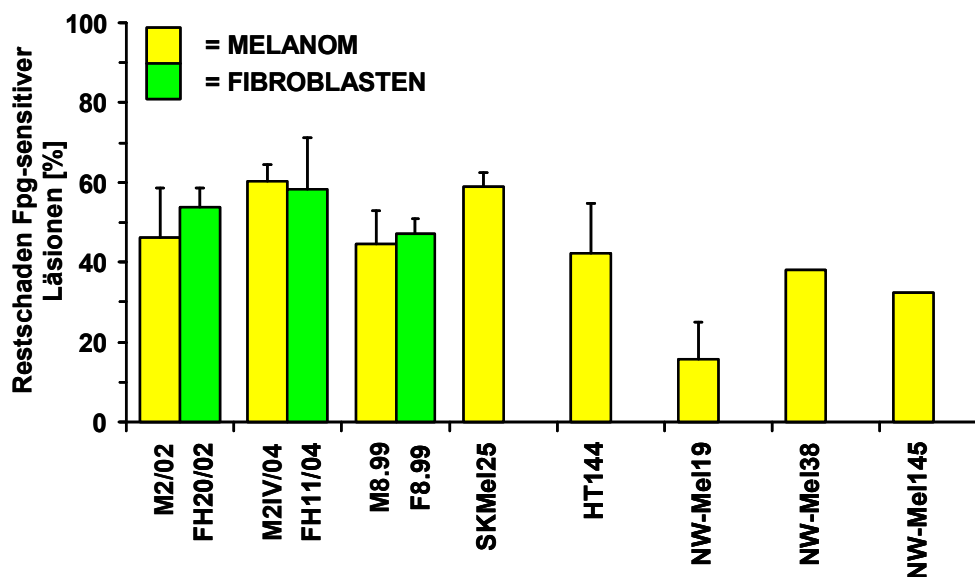


Abb. 5.12: Reparaturkapazität verschiedener Melanomzellen und Hautfibroblasten derselben Patienten nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht. Die Schadensinduktion erfolgte durch eine einmalige, 30 minütige Bestrahlung mit sichtbarem Licht [675 kJ/m²] (siehe 4.2.3.3.2). Die Quantifizierung des reparierten Schadens erfolgte nach 4 stündiger Reparaturzeit im Brutschrank (5 % CO₂, 37 °C, 99 % Luftfeuchtigkeit) mittels Fpg-Protein im Zuge der Alkalischen Elution. n=1-4.

Auffällig ist, dass sich innerhalb der Melanomzellen ebenfalls eine größere Varianz mit teilweise starken Unterschieden ergibt (siehe M2IV/04 zu NW-Mel19), wohingegen die Schwankungen innerhalb der Fibroblasten unterschiedlicher Patienten geringer ausfallen. Interessant war zudem auch der Befund, dass Fibroblasten und Melanomzellen desselben Patienten sich hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber sichtbarem Licht [675 kJ/m²] und ihrer Reparaturkapazität nur geringfügig bis gar nicht unterscheiden.

Aus den ermittelten Daten kann gefolgert werden, dass die bestrahlten Zellen allesamt die einmalige Dosis sichtbaren Lichts [675 kJ/m²] und die damit verbundene Induktion oxidativer DNA-Modifikationen sehr gut ohne erkennbare Beeinträchtigung ihrer DNA-Reparatur stehen. Ebenso ist ersichtlich, dass bereits nach 4 h

Reparaturzeit mindestens 40 – 50 % der induzierten DNA-Modifikationen erkannt und repariert worden sind. Diese gefundenen Reparaturgeschwindigkeiten entsprechen in diesem Arbeitskreis früher ermittelter Vergleichswerte identisch geschädigter anderer Zellenarten. Demzufolge ist die DNA-Reparaturkapazität der Zellen nach einer einmaligen Dosis sichtbaren Lichts [675 kJ/m²] nicht erschöpft oder überlastet.

5.1.5 Überprüfung der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität von hOGG1 in Melanomzellen und Fibroblasten

Nachdem in den vorangegangenen Kapiteln (5.1.4.1 und 5.1.4.2) gezeigt werden konnte, dass sowohl Melanomzellen als auch Hautfibroblasten in der Lage sind, durch sichtbares Licht oder UVA-Strahlung induzierte oxidative DNA-Modifikationen innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums zu reparieren, sollte nun zum einen verifiziert werden, ob dies mit einem voll funktionsfähigen hOGG1-Protein bewerkstelligt wurde. Dazu sollte die Höhe der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität des hOGG1-Proteins (2.6.2) in Melanomzellen und Fibroblasten bestimmt werden, um eventuell vorhandene Unterschiede aufzudecken. Darüberhinaus war es von großem Interesse, ob sich die hOGG1-Aktivität nach einer einmaligen Bestrahlung mit sichtbarem Licht, verglichen mit unbestrahlten Zellen, verändern würde. Zu diesem Zweck wurden die Melanomzellen und Fibroblasten entweder unbestrahlt direkt mit dem Zellschaber von dem Boden der Zellkulturflasche gekratzt (4.2.10.2) und daraus Zellpellets hergestellt (4.2.10.1.1), oder aber zuvor mit einer einmaligen Dosis sichtbaren Lichts bestrahlt. Im Anschluß erfolgte dann aus diesen Pellets die Herstellung von Gesamtproteinextrakten, die dann mit einem synthetischen, radioaktivmarkierten Oligonukleotid, das eine definierte DNA-Basenmodifikation (8-oxoG) auf einem seiner DNA-Stränge trug, inkubiert wurden (siehe 4.2.5).

Abb. 5.13 zeigt die 8-oxoG-Glykosylaseaktivität von Gesamtproteinextrakten (zwischen 2,25 – 9,0 µg) dreier unterschiedlicher Melanompatienten. Die Daten der in Abb. 5.14 gezeigten Hautfibroblasten von Patient 1 und 2 wurden zu einem späteren Zeitpunkt erhoben.

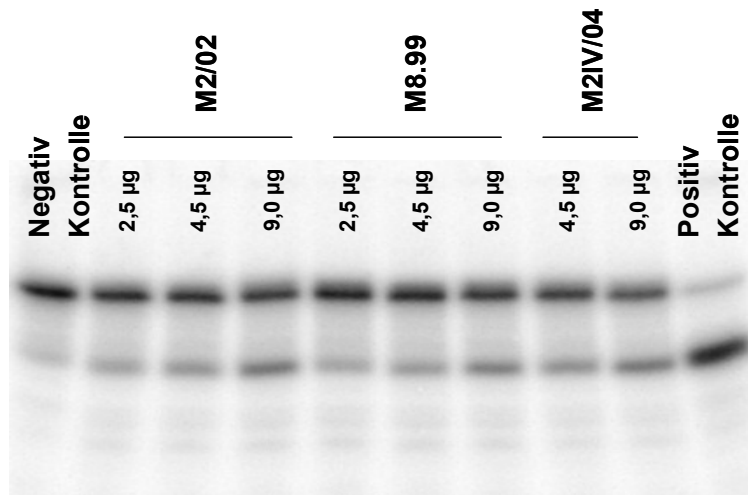


Abb. 5.13: 8-oxoG-Glykosylaseaktivität in unbehandelten Melanomzellgesamtproteinextrakten (2,5 – 9,0 µg) dreier verschiedener Patienten. Die Gesamtproteinextrakte der Melanomzellen wurden mit einem doppelsträngigen ^{32}P -markierten 34-mer Oligonukleotid, das an Position 16 des markierten Stranges einen 8-oxoG-Rest enthielt, für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Auftrennung der DNA-Stränge erfolgte elektrophoretisch, die Visualisierung mittels Storm® Phosphoimager.

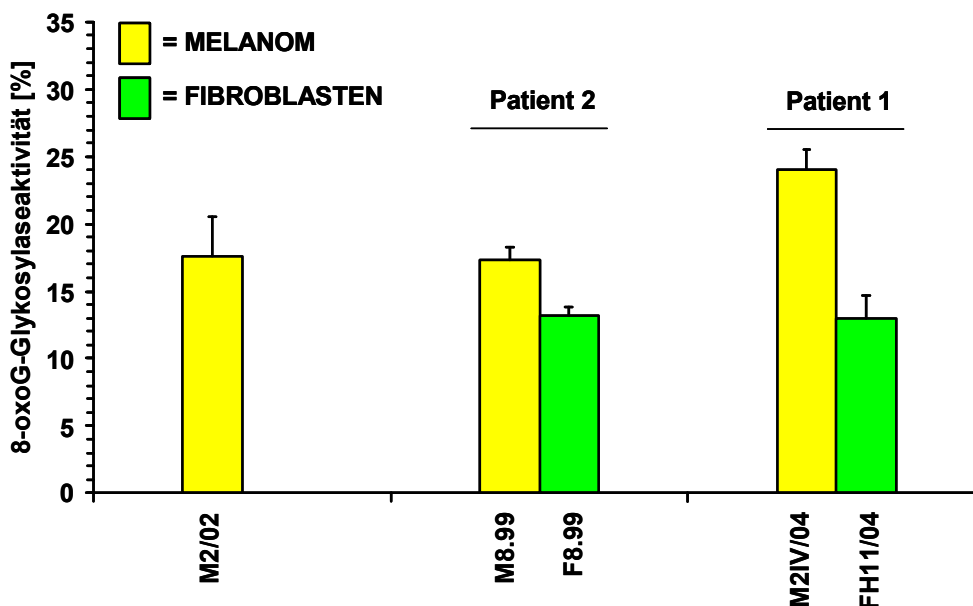


Abb. 5.14: Quantitative Bestimmung der 8-oxoG-Glykosylaseaktivitäten unbestrahlter Melanomzellen und Fibroblasten. Die Gesamtproteinextrakte (9 µg) der Zellen wurden mit einem doppelsträngigen ^{32}P -markierten 34-mer Oligonukleotid, das an Position 16 des markierten Stranges einen 8-oxoG-Rest enthielt, für 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die DNA-Stränge elektrophoretisch aufgetrennt und mittels Storm® Phosphoimager visualisiert. Der Anteil des durch die hOGG1-Aktivität gebildeten 16-mer-Oligonukleotids an der Gesamt-DNA ist auf der Ordinate in [%] angegeben. $n=2-3$.

Abb. 5.14 zeigt die quantitative Auswertung der 8-oxoG-Glykosylaseaktivitäten der unbestrahlten Melanomzell- und Fibroblastenextrakte.

Daraus wird ersichtlich, dass alle getesteten Zellextrakte 8-oxoG-Glykosylaseaktivität aufweisen. Grundsätzlich scheinen die Melanomzellen dabei eine etwas höhere Aktivität zu besitzen als die Fibroblasten. Besonders deutlich ist diese Tatsache bei dem Zellpaar M2IV/04 und FH11/04 zu erkennen. Darüberhinaus zeigt der Extrakt des Patienten M2IV/04 die höchste Glykosylaseaktivität von allen getesteten Zellen, wobei sich teilweise starke Unterschiede zwischen verschiedenen Melanomzellen (M2IV/04 und M8.99), aber auch zwischen den Melanomzellen und Fibroblasten desselben Patienten (M2IV/04 und FH11/04) ergeben. Diese Ergebnisse lassen auf eine bessere bzw. effektivere Abwehr oxidativen Stresses in Melanomzellen, verglichen mit Hautfibroblasten, schließen.

In Abb. 5.15 ist nun die 8-oxoG-Glykosylaseaktivität von hOGG1 in Melanomzellextrakten vor und nach Bestrahlung mit Sichtbarem Licht zu erkennen.

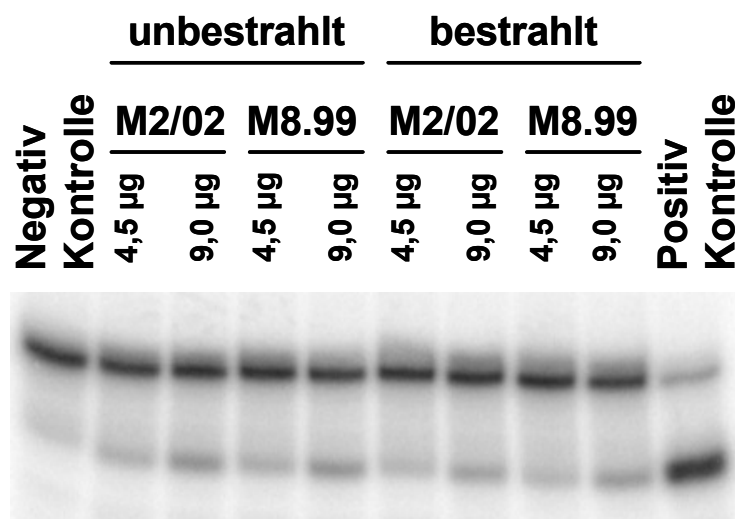


Abb. 5.15: 8-oxoG-Glykosylaseaktivität des hOGG1-Proteins aus Melanomzellgesamtproteinextrakten (4,5 – 9,0 µg) zweier verschiedener Patienten vor und nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht (VIS). Die Bestrahlung erfolgte mit einer einmaligen Dosis sichtbaren Lichts für 30 min [675 kJ/m²] in PBS/CMF, Abstand 33 cm. Anschließend wurden die Gesamtproteinextrakte der Melanomzellen mit einem doppelsträngigen ³²P-markierten 34-mer Oligonukleotid, das an Position 16 des markierten Stranges einen 8-oxoG-Rest enthielt, für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Auftrennung der DNA-Stränge erfolgte elektrophoretisch, die Visualisierung mittels Storm® Phosphoimager. n=3.

Die Zellen wurden direkt nach der Bestrahlung abgelöst 4.2.1.1 und für den Cleavage-Assay aufgearbeitet (4.2.5). Deutlich ist schon anhand des Gelbildes zu erkennen, dass die Glykosylaseaktivität konzentrationsabhängig linear zunimmt.

Die quantitative Auswertung (Abb. 5.16) zu dem Gelbild (Abb. 5.15) ergab, dass auch nach Bestrahlung mit einer einmaligen Dosis sichtbaren Lichts in den untersuchten Melanomzellen die 8-oxoG-Glykosylaseaktivität des hOGG1-Proteins fast unverändert vorhanden ist.

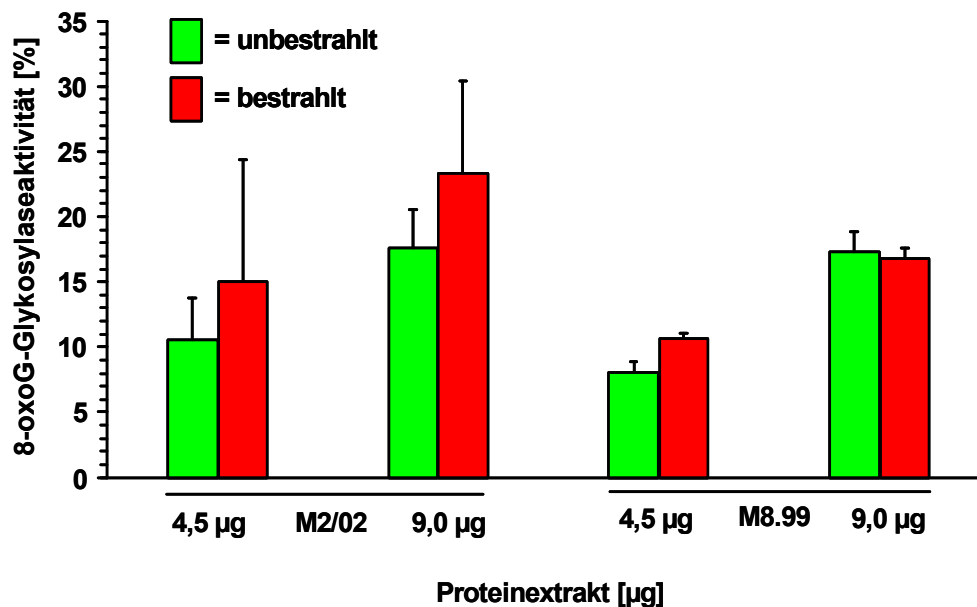


Abb. 5.16: Quantitative Auswertung der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität in Melanomzellen vor und nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht. Die Bestrahlung erfolgte mit einer einmaligen Dosis sichtbaren Lichts für 30 min [675 kJ/m^2] in PBS/CMF, Abstand 33 cm. Anschließend wurden die Gesamtproteinextrakte der Melanomzellen mit einem doppelsträngigen ^{32}P -markierten 34-mer Oligonukleotid, das an Position 16 des markierten Stranges einen 8-oxoG-Rest enthielt, für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Auftrennung der DNA-Stränge erfolgte elektrophoretisch, die Visualisierung mittels Storm® Phosphoimager. Der Anteil des durch die hOGG1-Aktivität gebildeten 16-mer-Oligonukleotids an der Gesamt-DNA ist auf der Ordinate in [%] angegeben. $n=3$.

Daraus kann geschlossen werden, dass die einmalige Bestrahlung mit sichtbarem Licht der Dosis [675 kJ/m^2] weder zu einem Funktionsverlust noch zu einer Aktivitätsminderung des hOGG1-Proteins führt. Dieser Befund wird zudem durch die bereits gezeigten Reparaturdaten der Melanomzellen nach Bestrahlung mit Sichtbarem Licht unterstrichen (Abb. 5.12). Außerdem kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse des Cleavage-Assays (und somit des Funktionsbeweises des hOGG1-Proteins) geschlossen werden, dass in den Melanomzellen die Reparatur der oxidativen DNA-Modifikationen nach Bestrahlung mit Sichtbarem Licht durch hOGG1 initiiert wird. Darüberhinaus kann aus Abb. 5.16 auch die Erkenntnis gewonnen werden, dass die einmalige Bestrahlung mit sichtbarem Licht zu keiner Steigerung der Glykosylaseaktivität bzw. einer Induktion der hOGG1-Proteinbiosynthese führt.

5.2 Einfluss exogener und endogener Thiole auf die Bildung und Reparatur oxidativer DNA-Schäden in Melanomzellen und Fibroblasten

In diesem Kapitel sollte mit Hilfe verschiedener Substanzen (BSO, Diamid, DTT) und dem Photosensibilisator (Ro19-8022) die antioxidative Abwehr verändert und dadurch die Sensitivität und DNA-Reparaturgeschwindigkeit der Zellen moduliert werden. Vor allem stand die Klärung der Frage im Vordergrund, ob durch eine zu starke Induktion oxidativen Stresses oder eine gestörte oxidative Balance auch die DNA-Reparatur oxidativer DNA-Schäden beeinträchtigt wird, was zu einer erhöhten Mutationsfrequenz und erleichterten Krebsentstehung führen könnte.

5.2.1 Induktion und Reparatur oxidativer DNA-Schäden nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht und Ro19-8022

Nachdem aus Kapitel 5.1.3 ersichtlich war, dass die einmalige Bestrahlung mit sichtbarem Licht [675 kJ/m^2] die DNA-Reparaturkapazität der Zellen noch nicht erschöpfen konnte, wurde ein exogener Photosensibilisator (Ro19-8022, siehe 2.3.6) zur Erzeugung zusätzlicher oxidativer DNA-Modifikationen eingesetzt. Ziel war es zu testen, ob die natürliche DNA-Reparaturkapazität der Fibroblasten und Melanomzellen überlastet, und somit die induzierten DNA-Modifikationen nicht mehr wie im zuvor bestimmten Ausmaß (Abb. 5.11 und Abb. 5.12) von den Zellen erkannt und entfernt / repariert werden würden. Hierzu wurden die Zellen mit eiskaltem PBS/CMF gewaschen, mit dem Photosensibilisator Ro19-8022 (150 nm) versetzt und anschließend mit einer 1000 W Halogenlampe für 10 min [166 kJ/m^2] bestrahlt (siehe 4.2.3.3.8). Anschließend erfolgte die Quantifizierung der induzierten DNA-Modifikationen und der DNA-Reparaturkapazität mittels der Alkalischen Elution und der Reparaturrendonuklease Fpg (siehe 4.2.3).

Klar erkennbar war nach Auswertung der Experimente (Abb. 5.17), daß sich in den verwendeten Zellen durch die Kombination aus sichtbarem Licht [166 kJ/m^2] und dem Photosensibilisator Ro19-8022 (150 nM), im Vergleich zur alleinigen Bestrahlung mit sichtbarem Licht [675 kJ/m^2], die 2 – 4,4 fache Menge an oxidativen DNA-Modifikationen induzieren ließen (siehe Abb. 5.11).

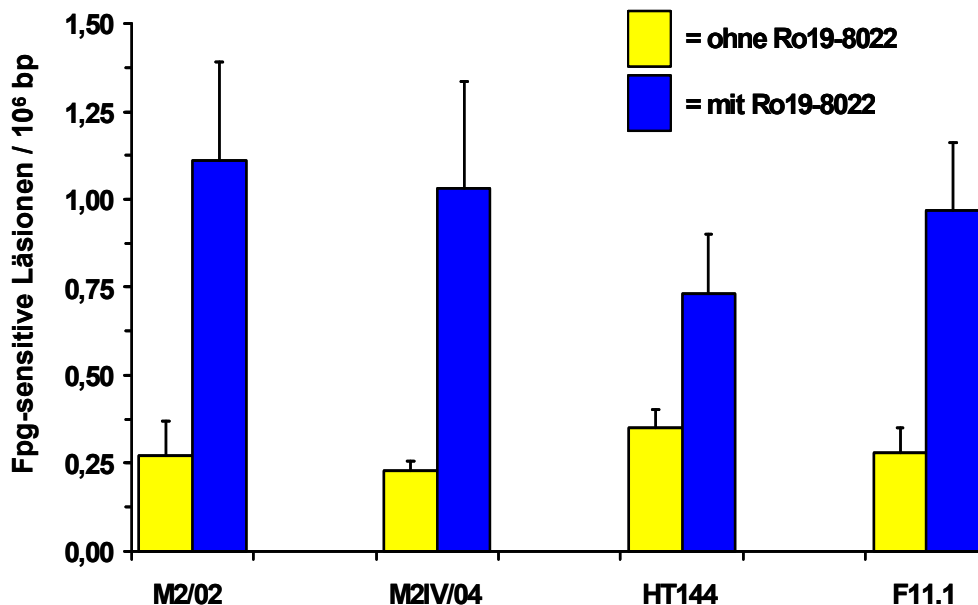


Abb. 5.17: Ausmaß der oxidativen DNA-Schädigung in verschiedenen Melanomzellen nach Bestrahlung in Anwesenheit des Photosensibilisators Ro19-8022. Die Schadensinduktion erfolgte durch eine einmalige, 10 minütige Bestrahlung mit sichtbarem Licht (VIS) 166 kJ/m^2 im Abstand von 38 cm (siehe 4.2.3.3.8) in Gegenwart von Ro19-8022 (150 nM). Die Quantifizierung des induzierten Schadens erfolgte mittels Fpg-Protein im Zuge der schnellen Alkalischen Elution (siehe 4.2.3 und 4.2.3.6). $n=2-4$

Zwischen den verschiedenen Melanomzellen oder zwischen den Melanomzellen und den Mausembryofibroblasten (MEFs) konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Höhe der DNA-Schadensinduktion gefunden werden.

Überraschenderweise wurden von sämtlichen Zellen, wie schon zuvor bei wesentlich geringeren Mengen an induzierten oxidativen DNA-Modifikationen gezeigt (siehe Abb. 5.12), innerhalb einer Reparaturzeit von 4 h ein Großteil des erzeugten DNA-Schadens erkannt und repariert (zwischen 50 – 60 %, siehe Abb. 5.18). Verblüffend war zudem die Tatsache, dass die Melanomzellen die durch den Photosensibilisator Ro19-8022 erzeugten oxidativen DNA-Modifikationen scheinbar besser als die durch ihren eigenen, endogenen Photosensibilisator produzierten oxidativen DNA-Modifikationen reparieren konnten (um 22-27 % beschleunigte Reparatur).

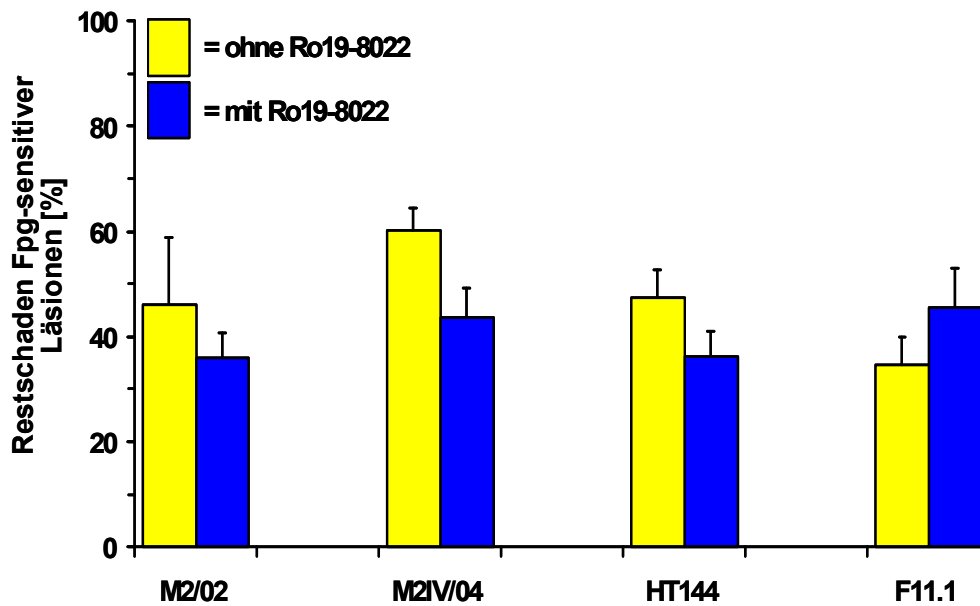


Abb. 5.18: Reparaturkapazität verschiedener Melanomzellen (und einer Mausembryo-fibroblastenzelllinie, F11.1). Die Schadensinduktion erfolgte durch eine einmalige, 10 minütige Bestrahlung mit sichtbarem Licht [166 kJ/m^2] im Abstand von 38 cm (siehe 4.2.3.3.8) unter Verwendung von Ro19-8022 [150 nM]. Quantifizierung des reparierten Schadens erfolgte nach 4 h Reparaturzeit im Brutschrank (5 % CO_2 , 37 °C, 99 % Luftfeuchtigkeit) mittels Fpg-Protein im Zuge der schnellen Alkalischen Elution. $n=2-4$

Abschließend kann nach diesem Teil der Experimente die Schlussfolgerung gezogen werden, dass sich zwar mit Hilfe der Kombination aus Bestrahlung durch Sichtbares Licht und Photosensibilisator die absolute Zahl der oxidativen DNA-Modifikationen drastisch erhöhen lässt, die Grenzen der DNA-Reparaturkapazität der verwendeten Zellen aber noch nicht erreicht sind. Aufgrund zu erwartender zytotoxischer Konsequenzen, wurde von einer weiteren Erhöhung der Konzentration des Photosensibilisators Ro19-8022 während der Bestrahlung mit Sichtbarem Licht abgesehen (Will, 1995).

5.2.2 Einfluss einer Glutathion-Depletion auf Bildung oxidativer DNA-Schäden in Fibroblasten und Melanomzellen nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht / Ro19-8022

Aufgrund der noch nicht erreichten Überlastung der Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen in den verwendeten Fibroblasten und Melanomzellen lag die Vermutung nahe, dass die Zellen durch ihr antioxidatives Verteidigungssystem sehr gut gegen oxidativen Stress und dessen Konsequenzen für die Integrität der DNA geschützt sind. Deswegen wurde durch die Depletion eines der wichtigsten zellulären Antioxidantien, nämlich des Tripeptids Glutathion (GSH, siehe Kapitel 2.7), versucht, einen wichtigen Teil eben dieses antioxidativen Verteidigungssystems der Zellen auszuschalten. Überprüft werden sollte, ob durch eine vorangegangene Depletion des intrazellulären GSH-Spiegels mittels BSO und einer nachfolgenden Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht [166 kJ/m²] in Kombination mit dem Photosensibilisator Ro19-8022 (150 nM) die DNA-Schadensinduktion stark erhöht und die Zellen nicht mehr in der Lage sind, den Schaden zu bewältigen.

Nachdem der intrazelluläre Glutathion-Gehalt für Fibroblasten und Melanomzellen bestimmt war (siehe Abb. 5.1), wurde den Zellen 24 h vor Versuchsbeginn BSO-haltiges Medium (1 mM) zugesetzt, so dass die Neuproduktion von Glutathion vollständig unterbunden wurde. Dann erfolgte am Versuchstag die Bestrahlung mit sichtbarem Licht, wobei einem Teil der Zellen zusätzlich noch der Photosensibilisator Ro19-8022 zugesetzt wurde. Nach Ablauf einer Reparaturzeit von 4 h wurden die in den Zellen noch verbliebenen DNA-Modifikationen mit Hilfe der Alkalischen Elutionstechnik und Fpg-Protein bestimmt (4.2.3 und 4.2.3.4).

Abb. 5.19 zeigt nun überraschende Ergebnisse bezüglich des Ausmaßes der Schadensinduktion in den BSO-vorbehandelten Zellen.

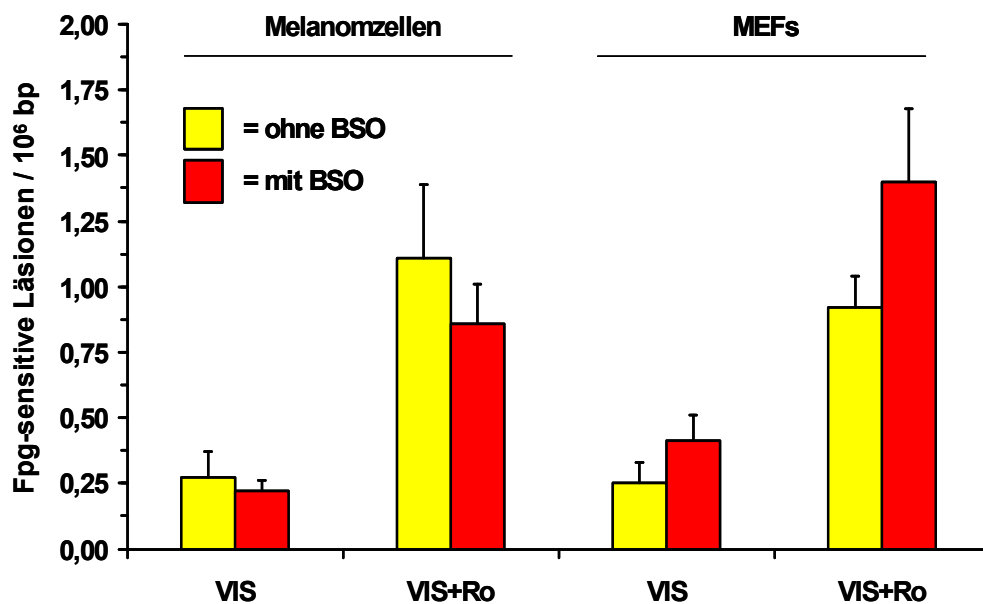


Abb. 5.19: Ausmaß oxidativer DNA-Schäden in Melanomzellen (M2/02) und Mausembryofibroblasten (MEFs, F11.1) nach Glutathion-Depletion und anschließender Bestrahlung mit sichtbarem Licht (plus Ro19-8022). Die Zellen wurden mit BSO (1 mM) für 24 h präinkubiert. Anschließend erfolgte Bestrahlung mit sichtbarem Licht für entweder 30 min [675 kJ/m²] in PBS/CMF, Abstand 33 cm oder für 10 min [166 kJ/m²] in PBS/CMF, Abstand 38 cm plus Ro19-8022 [150 nM]. Danach schloß sich eine 4 stündige Reparaturphase in Vollmedium (mit oder ohne BSO-Zusatz) im Brutschrank an. n=3-4

Denn durch die Glutathion-Depletion und nachfolgende Bestrahlung mit sichtbarem Licht plus Ro19-8022 hätte man ebenfalls in den Melanomzellen (M2/02) eine deutlich erhöhte Induktion oxidativer DNA-Modifikationen erwarten können wie sie in den Mausembryofibroblasten (F11.1) zu erkennen ist. Dies konnte beispielsweise schon in menschlichen HeLa-Zellen gezeigt werden (Hoffmann, 2003). Doch scheint dieser Effekt in Melanomzellen nicht existent zu sein (siehe Abb. 5.19). Scheinbar spielt Glutathion bei der Vermeidung oxidativer DNA-Modifikationen in Melanomzellen keine zentrale Rolle. Denn obwohl in den Zellen zum Zeitpunkt der Schädigung und während der Reparaturphase der Glutathion-Gehalt auf null reduziert ist (siehe Abb. 5.4), kann keine zusätzliche Induktion oxidativer DNA-Modifikationen, verglichen mit den Ansätzen ohne vorherige Glutathion-Depletion, verzeichnet werden. Ganz anders dagegen kommt es in den unter identischen Bedingungen untersuchten Mausembryofibroblasten zu einer deutlichen Erhöhung oxidativer DNA-Modifikationen – sowohl mit als auch ohne Beteiligung von Ro19-8022. Aus diesem Grund liegt die Vermutung nahe, dass Melanomzellen sehr wahrscheinlich über zusätzliche, stärkere oder umfangreichere antioxidative

Abwehrsysteme bzw. Mechanismen verfügen als die Mausembryofibroblasten (MEF).

Als nächster Schritt wurde nun die DNA-Reparaturkapazität von Melanomzellen nach Präinkubation mit BSO (1 mM / 24 h) und nachfolgender Bestrahlung (plus Ro19-8022) untersucht (Abb. 5.20). Hierbei erfolgte, nach Beendigung einer 4 stündigen Reparaturphase im Brutschrank (4.2.3.3.8), die Quantifizierung des Restschadens mit Hilfe der Alkalische Elution und Fpg-Protein (siehe 4.2.3.4).

Auch Abb. 5.20 zeigt ein überraschendes und außergewöhnliches Ergebnis.

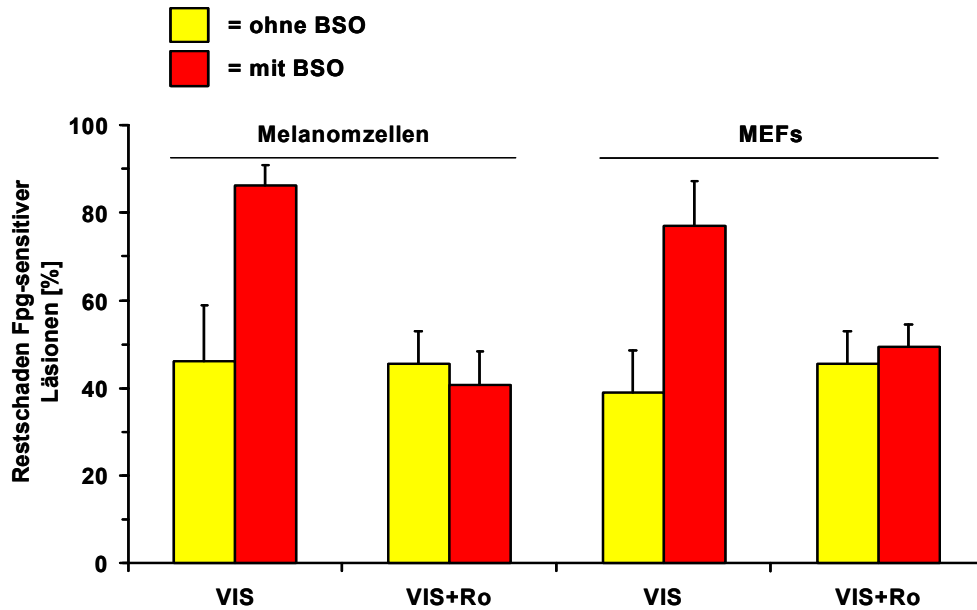


Abb. 5.20: Einfluss einer Glutathion-Depletion durch BSO auf die Reparaturkapazität von Melanomzellen (M2/02) nach Präinkubation mit BSO und Bestrahlung mit sichtbarem Licht (+ Ro19-8022). Die Zellen wurden mit BSO (1 mM) für 24 h präinkubiert. Anschließend erfolgte Bestrahlung mit Sichtbarem Licht entweder für 30 min [675 kJ/m²] in PBS/CMF, Abstand 33 cm oder für 10 min [166 kJ/m²] in PBS/CMF, Abstand 38 cm plus Ro19-8022 [150 nm]. Danach schloß sich eine 4 stündige Reparaturphase unter Vollmedium (mit oder ohne BSO) im Brutschrank an. n=2-4.

Denn nach Präinkubation mit BSO und anschließender Bestrahlung mit sichtbarem Licht (ohne Ro19-8022) zeigt sich in den Melanomzellen eine signifikante Hemmung der Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen. Obwohl keine zusätzlichen Modifikationen durch den Einsatz von BSO induziert werden, scheint der Mangel an intrazellulärem Glutathion einen dramatischen Einfluss auf die Aufrechterhaltung der DNA-Reparatur zu haben. Ein gänzlich anderes Bild hingegen zeigt sich in den BSO-präinkubierten Zellen, die unter Anregung von Ro19-8022, durch Sichtbares Licht geschädigt wurden. Nach Ablauf der 4 stündigen Reparaturzeit befand sich nämlich deren Restschaden an induzierten DNA-Modifikationen auf genau dem gleichen Niveau wie der Restschaden der Kontrollzellen ohne vorangegangene BSO-Inkubation. Hier wurde demzufolge in Gegenwart von Ro19-8022 die DNA-Reparatur

durch den Zusatz von BSO nicht inhibiert. Wahrscheinlich liegt diesem Phänomen ein unterschiedlicher Mechanismus der Schadensgenerierung über die zwei verschiedenen Photosensibilisatoren (endogen und exogen) zu Grunde.

5.2.3 Einfluss einer Glutathion-Depletion auf die Bildung und Reparatur oxidativer DNA-Schäden in Melanomzellen und Fibroblasten nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht

Aufgrund der direkt vorangegangenen Ergebnisse (siehe Abb. 5.20) stellte sich nun die Frage, ob der beobachtete Effekt (gleichhohe Induktion oxidativer DNA-Modifikationen trotz Depletion intrazellulären Glutathions, aber starke Inhibition der DNA-Reparatur) sich nur in den Melanomzellen des einen Patienten, oder aber auch in einem größeren Kollektiv von Melanompatienten zeigen würde. Desweiteren war von großem Interesse, wie im Vergleich dazu die Hautfibroblasten derselben Patienten auf die Behandlung reagieren würden.

Wie nun in Abb. 5.21 deutlich wird, zeigen durchweg alle getesteten Melanomzellen den gleichen Effekt, wie die Zellen des ersten Patienten (M2/02).

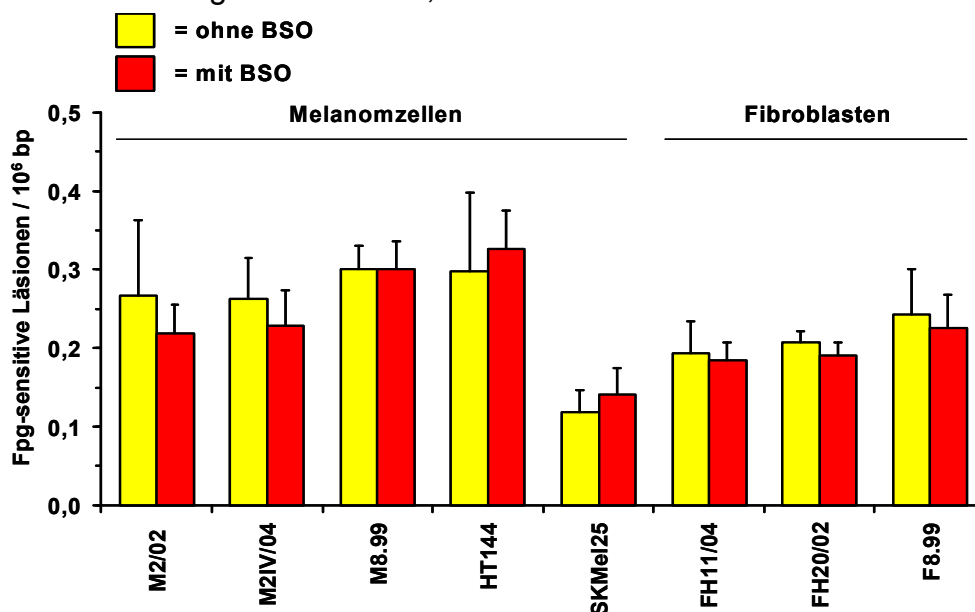


Abb. 5.21: Ausmaß oxidativer DNA-Schäden in Melanomzellen und dazugehöriger Fibroblasten nach Glutathion-Depletion und nachfolgender Bestrahlung mit sichtbarem Licht. Die Zellen wurden mit BSO (1 mM) für 24 h präinkubiert. Anschließend erfolgte Bestrahlung mit sichtbarem Licht für 30 min [675 kJ/m²] in PBS/CMF, Abstand 33 cm. Daran schloß sich eine 4 stündige Reparaturphase der Zellen in Vollmedium (mit und ohne BSO) im Brutschrank an. n=2-5.

Trotz völliger Depletion des Glutathion-Spiegels innerhalb der Zellen kommt es zu keiner verstärkten Induktion oxidativer DNA-Modifikationen nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht. Interessanterweise ist dieses Phänomen auch bei den Hautfibroblasten derselben Patienten zu beobachten. Hinsichtlich der Höhe der DNA-Schadensinduktion liegen die Hautfibroblasten etwas unter den Werten der Melanomzellen. Desweiteren sollte geprüft werden, ob die neugetesteten Melanomzellen und ihre Fibroblasten den gleichen Effekt hinsichtlich ihrer Reparaturkapazität zeigen (Abb. 5.22), wie jene des Patienten M2/02 aus Abb. 5.20. Aus diesem Grund wurde einem Teil der Zellen 24 h vor Versuchsbeginn BSO (1 mM) mit dem Vollmedium zugesetzt. Direkt danach erfolgte die Bestrahlung mit

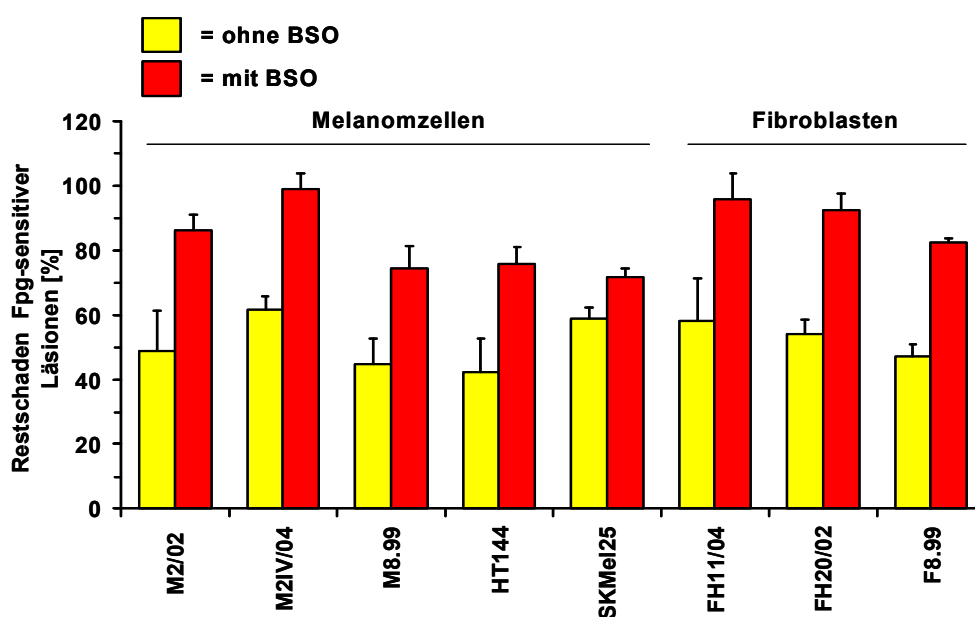


Abb. 5.22: Einfluss einer Glutathion-Depletion durch BSO auf die Reparaturkapazität von Melanomzellen und Fibroblasten nach Präinkubation mit BSO und nachfolgender Bestrahlung mit sichtbarem Licht. Die Zellen wurden mit BSO (1 mM) für 24 h präinkubiert. Anschließend erfolgte Bestrahlung mit sichtbarem Licht für 30 min [675 kJ/m²] in PBS/CMF, Abstand 33 cm. Danach schloß sich eine 4 stündige Reparaturphase der Zellen in Vollmedium (mit und ohne BSO) im Brutschrank an. n=2-5.

sichtbarem Licht, der sich eine 4 stündige Reparaturphase der Zellen im Brutschrank anschloß (siehe auch 4.2.3.3.4).

Ebenso wie bei den Zellen des ersten Patienten (M2/02) (siehe Abb. 5.20) zeigt sich auch bei den Melanomzellen und Fibroblasten der nachfolgend getesteten Patienten eine massive Hemmung der DNA-Reparatur 4 h nach Bestrahlung mit Sichtbarem Licht bei vorausgegangener Präinkubation der Zellen mit BSO. Darüberhinaus sind keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Reparaturkapazität zwischen Melanomzellen und ihren zugehörigen Fibroblasten erkennbar (sowohl mit als auch ohne Präinkubation mit BSO).

5.2.3.1 Reparaturkinetik in Fibroblasten und Melanomzellen nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht

Da sowohl die Fibroblasten als auch die Melanomzellen eine derart starke Hemmung der Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen nach einer Reparaturphase von 4 h zeigten, war es nun interessant, den zeitlichen Verlauf dieser Reparaturhemmung zu untersuchen. Das Ziel war es herauszufinden, ob es sich hierbei um einen eher kurzfristigen Effekt aufgrund des deutlich verschobenen Redoxgleichgewichts in den Zellen handelte – eventuell um eine kurzfristige Proteinoxidation, die innerhalb kürzerer Zeit durch die Zelle korrigiert werden könnte.

Oder aber ob durch das völlige Fehlen eines der wichtigsten Antioxidantien (GSH) ein länger andauernder Schaden durch die während der Bestrahlung gebildeten ROS auftreten würde. Zu diesem Zweck wurden die Zellen, wie bei den Reparaturversuchen zuvor (Abb. 5.22), mit sichtbarem Licht bestrahlt. Anschließend wurde mit Hilfe der Alkalischen Elution und Fpg-Protein der zeitliche Verlauf der DNA-Reparatur ermittelt.

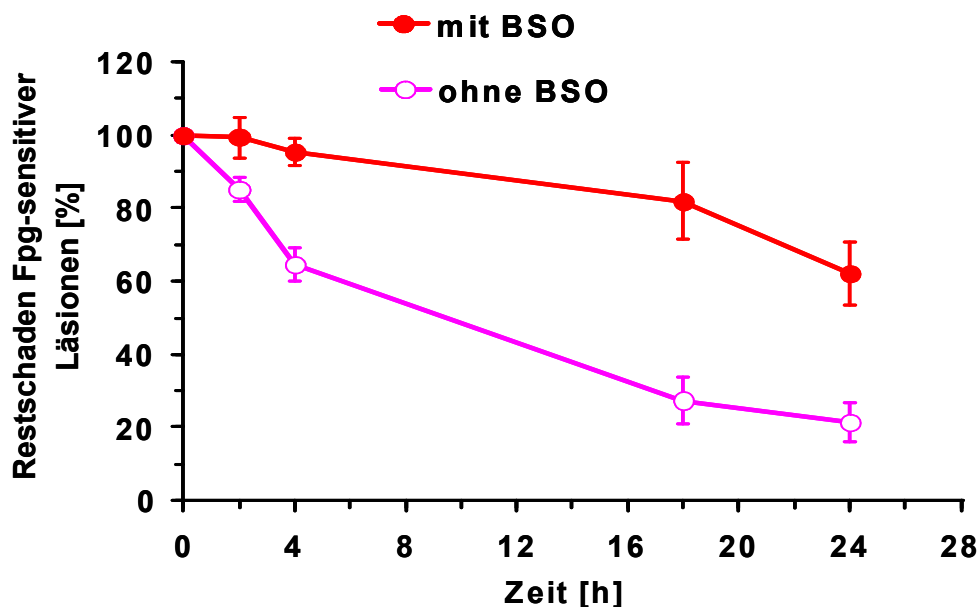


Abb. 5.23: Reparaturkinetik von Melanomzellen (M2IV/04) nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht. Ein Teil der Zellen wurde mit BSO (1 mM) für 24 h präinkubiert. Die Bestrahlung erfolgte mit sichtbarem Licht für 30 min [675 kJ/m^2] in PBS/CMF, Abstand 33 cm. Im Anschluß folgte eine 2 – 24 stündige Reparaturphase der Zellen in Vollmedium (mit und ohne BSO) im Brutschrank. $n=3$.

Wie deutlich aus Abb. 5.23 zu erkennen ist, zeigen die mit sichtbarem Licht bestrahlten Melanomzellen (ohne BSO) eine normale Reparaturgeschwindigkeit, so dass bereits annähernd 40 % der induzierten DNA-Modifikationen innerhalb der ersten 4 h repariert sind. Ab diesem Zeitpunkt benötigen die Zellen für etwa das gleiche Ausmaß an Reparatur die dreifache Zeit. Daraus kann gefolgert werden, dass sich die Melanomzellen wahrscheinlich in den ersten 4 h Stunden nach einer

akuten Sonnenbestrahlung durch eine beschleunigte DNA-Reparaturrate zu schützen versuchen. Danach verläuft die Reparatur der restlichen Modifikationen etwas langsamer. Ganz anders dagegen verhalten sich die mit BSO präinkubierten Zellen. Hier findet innerhalb der ersten 4 h nahezu keine DNA-Reparatur statt. Auch nach 18 h sind erst etwa 20 % des induzierten Schadens beseitigt. Nach 24 h weisen die Zellen noch einen Restschaden von über 60 % auf, wohingegen die nicht Glutathion-depletierten Zellen einen Restschaden von deutlich unter 30 % erreicht haben.

Auch die Hautfibroblasten desselben Patienten zeigen eine in den ersten 4 h beschleunigte Reparatur der induzierten DNA-Modifikationen (Abb. 5.24).

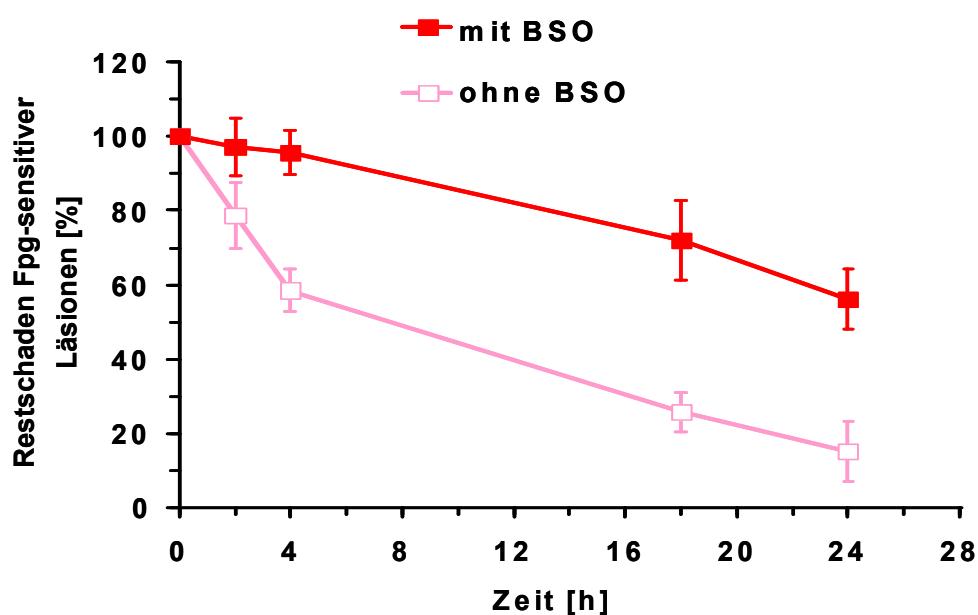


Abb. 5.24: Reparaturkinetik von Hautfibroblasten (FH11/04) nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht. Ein Teil der Zellen wurde mit BSO (1 mM) für 24 h präinkubiert. Die Bestrahlung erfolgte mit sichtbarem Licht für 30 min [675 kJ/m^2] in PBS/CMF, Abstand 33 cm. Im Anschluß folgte eine 2 – 24 stündige Reparaturphase der Zellen in Vollmedium (mit und ohne BSO) im Brutschrank. $n=3$.

Es werden in diesem Zeitraum prozentual gesehen sogar etwas mehr als 40 % des induzierten Schadens beseitigt. Ebenfalls verlangsamt sich dann ab der 4. Stunde nach Bestrahlung die Geschwindigkeit des Reparaturprozesses. Nach 24 h beträgt der Restschaden nur noch 15 % des Ausgangswertes. Auch die mit BSO für 24 h vorbehandelten Zellen ähneln vom Ausmaß ihrer Reparaturgeschwindigkeit den Melanomzellen. Innerhalb der ersten 4 h ist nahezu keine DNA-Reparatur erkennbar. Diese setzt dann nur sehr zögerlich ein, so dass nach 18 h erst 28 % und nach 24 h erst 44 % der induzierten DNA-Modifikationen beseitigt sind.

5.2.4 Einfluss einer Diamid-Vorbehandlung von Melanomzellen und Fibroblasten auf die Bildung und Reparatur oxidativer DNA-Schäden nach Bestrahlung mit Solar-Simulator

Aus den bisher beschriebenen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass es durch Depletion des Glutathion-Spiegels in Melanomzellen und ihren zugehörigen Fibroblasten zu einer massiven Hemmung der Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen kommt. Um diesen Befund zu verifizieren wurden die Zellen mit Diamid (0,2 mM) inkubiert, anschließend mit dem Solar-Simulator bestrahlt (siehe 4.2.3.3.11) und dann für eine 4 stündige Reparaturphase im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die verbliebenen induzierten DNA-Modifikationen mit Hilfe der Alkalischen Elution und Fpg-Protein bestimmt (siehe 4.2.3.4). Diamid wurde gewählt, da seit langem bekannt ist, dass es direkt Thiolgruppen von Proteinen oxidieren kann (2.8.3). Somit würden die intrazellulär vorhandenen, reduzierten GSH-Moleküle zu GSSG oxidiert und zelluläre Proteine (z.B. hOGG1-Protein) wären wie im Falle der Glutathion-Depletion einem oxidativen Angriff der während der Bestrahlung gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ausgeliefert.

Aus Abb. 5.25 wird nun zum einen ersichtlich, dass die Bestrahlung der Zellen mit dem Solar-Simulator unter den gewählten Bedingungen annähernd so viele oxidative DNA-Modifikationen induziert wie zuvor die Bestrahlung mit Sichtbarem Licht (1000 W Halogenlampe).

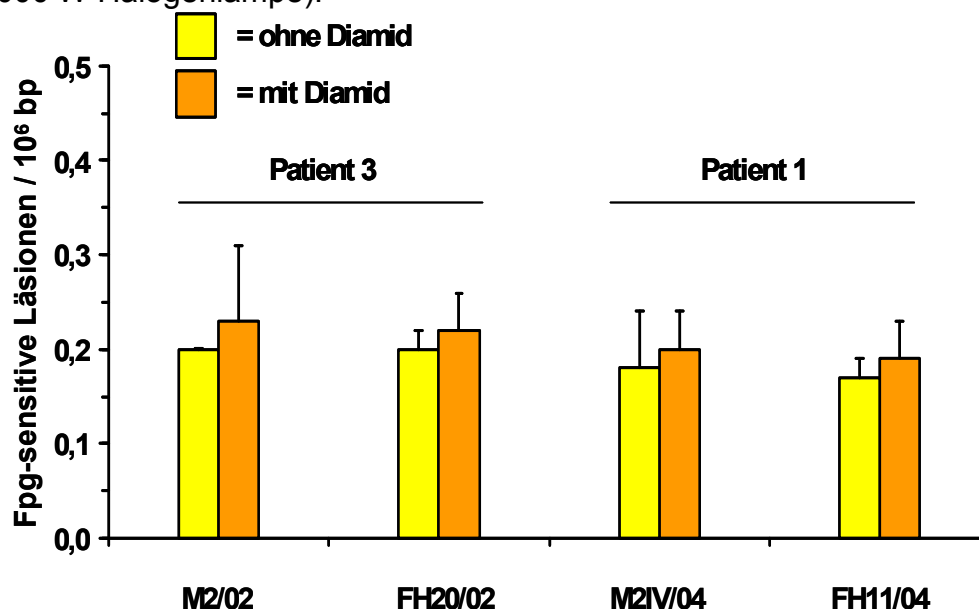


Abb. 5.25: Ausmaß oxidativer DNA-Schäden in Melanomzellen und Fibroblasten zweier Patienten nach Vorbehandlung mit Diamid und nachfolgender Bestrahlung durch Solar-Simulator. Zunächst erfolgte für 15 min eine Inkubation der Zellen mit Diamid (0,2 mM). Anschließend wurde mit Solar-Simulator für 11 min 15 s in PBS/CMF bestrahlt [516 kJ/m² zwischen 300 – 800 nm]. n=2-3.

Ebenso ergab auch die Ermittlung der DNA-Reparaturkapazität (Abb. 5.26) das gleiche Bild wie nach Behandlung mit BSO (1 mM) plus Bestrahlung mit sichtbarem Licht (Abb. 5.22).

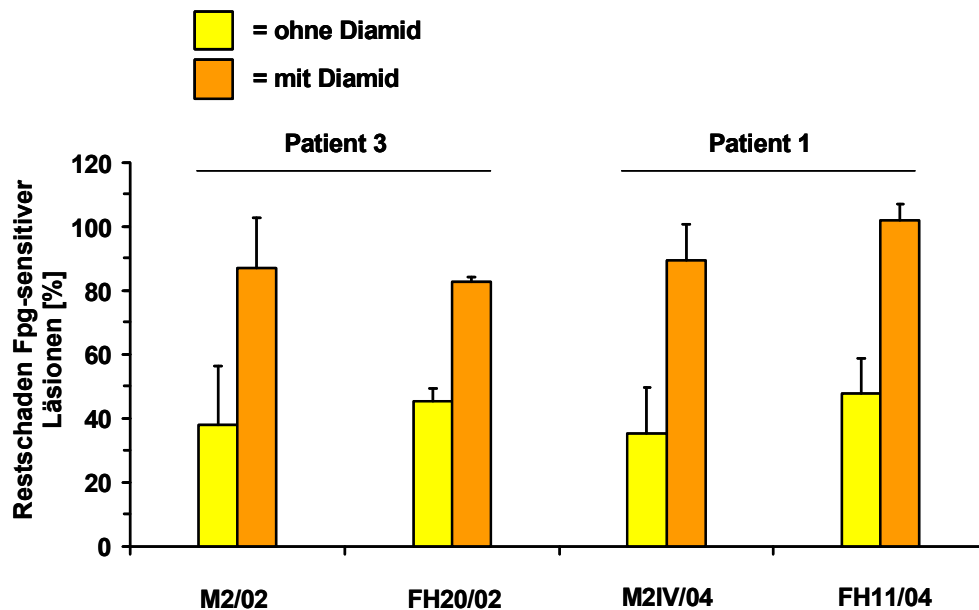


Abb. 5.26: Einfluss einer Diamid-Vorbehandlung mit nachfolgender Bestrahlung durch Solar-Simulator auf die Reparaturkapazität von Melanomzellen und Fibroblasten zweier Patienten. Zunächst erfolgte für 15 min eine Inkubation der Zellen mit Diamid (0,2 mM). Anschließend wurde mit Solar-Simulator für 11 min 15 s in PBS/CMF bestrahlt [516 kJ/m² zwischen 300 – 800 nm]. n=2-3.

Sowohl die Melanomzellen als auch die Fibroblasten zeigten durch Vorbehandlung mit Diamid eine vergleichbar starke Hemmung der Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen wie zuvor durch eine 24 stündige Präinkubation mit BSO (1 mM). Daraus kann geschlossen werden, dass sowohl die Depletion des intrazellulären GSH-Gehaltes (BSO) als auch die Oxidation von GSH durch Diamid zur Folge haben, dass die betroffenen Zellen dem zusätzlich induzierten oxidativen Stress wahrscheinlich schutzloser ausgeliefert sind als zuvor. Das Redox-Gleichgewicht der Zellen wird verschoben und infolgedessen besteht durchaus die Möglichkeit, dass auch essentiell notwendige DNA-Reparaturproteine, wie zum Beispiel hOGG1-Protein (siehe 2.6.2) in ihrem oxidativen Status verändert werden können.

5.2.5 Reversion der BSO- oder Diamid-induzierten Hemmung der DNA-Reparatur mittels DTT

Das nächste Experiment sollte nun zeigen, ob die vermutete Oxidation der für die korrekte Funktion der DNA-Reparatur relevanten Proteine oder Cofaktoren reversibel ist und sich durch Zugabe von D,L-Dithiotreitol (DTT) (2.8.2) die Reparaturhemmung wieder rückgängig machen läßt. Aus diesem Grund wurden die Zellen wie zuvor entweder mit BSO plus sichtbarem Licht (siehe 4.2.3.3.4) oder mit Diamid plus Solar-Simulator (siehe 4.2.3.3.11) geschädigt und anschließend während der gesamten Reparaturphase von 4 h mit DTT (1 mM) inkubiert (siehe 4.2.3.3.5). Die Quantifizierung der Fpg-sensitiven Läsionen und dem Ausmaß der DNA-Reparaturkapazität erfolgte mit Hilfe der Alkalischen Elution und Fpg-Protein (siehe 4.2.3.4).

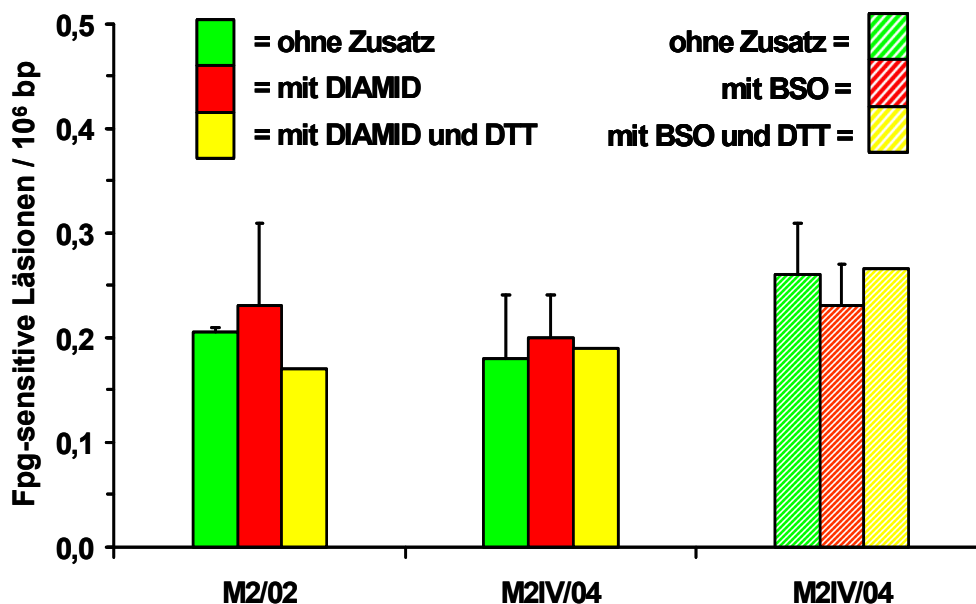


Abb. 5.27: Induktion oxidativer DNA-Schäden in Melanomzellen nach Zusatz verschiedener Substanzen (Diamid, BSO, DTT) und nachfolgender Bestrahlung. Die Bestrahlung erfolgte im Falle der BSO-Vorbehandlung (1 mM / 24 h) mit sichtbarem Licht [675 kJ/m²] (siehe 4.2.3.3.4) und im Falle der Diamid-Vorbehandlung (0,2 mM / 15 min) mittels Solar-Simulator [516 kJ/m² zwischen 300 – 800 nm] (siehe 4.2.3.3.11). Die Reparaturphase betrug 4 h mit DTT-Zusatz (1 mM) zum Vollmedium im Brutschrank (siehe 4.2.3.3.5). n=1-3.

Wie nun in Abb. 5.27 zu erkennen ist, kommt es weder nach Präinkubation mit BSO (rot gestreifter Balken), nach Vorbehandlung der Zellen mit Diamid (rote Balken) oder nach dem Zusatz von DTT während der 4 stündigen Reparaturphase (gelbe oder gelb gestreifter Balken) zu einer Erhöhung der Induktion oxidativer DNA-Modifikationen in Melanomzellen (M2/02 und M2IV/04). Die Werte bewegen sich auf gleichem Niveau der ohne Additiv bestrahlten Kontrollzellen. Bei der Betrachtung des Restschadens (Abb. 5.28) fällt nun auf, dass die Hemmung der DNA-

Reparaturkapazität durch eine Diamid-Inkubation genauso effektiv ausfällt, wie durch eine BSO-Präinkubation. Interessanterweise konnte in dem Umkehrexperiment, durch Zusatz von DTT während der 4 stündigen Reparaturphase, dieser Effekt in beiden Fällen aufgehoben, und die DNA-Reparatur wieder auf ihre vorherige Geschwindigkeit reaktiviert werden (vergleiche Abb. 5.22).

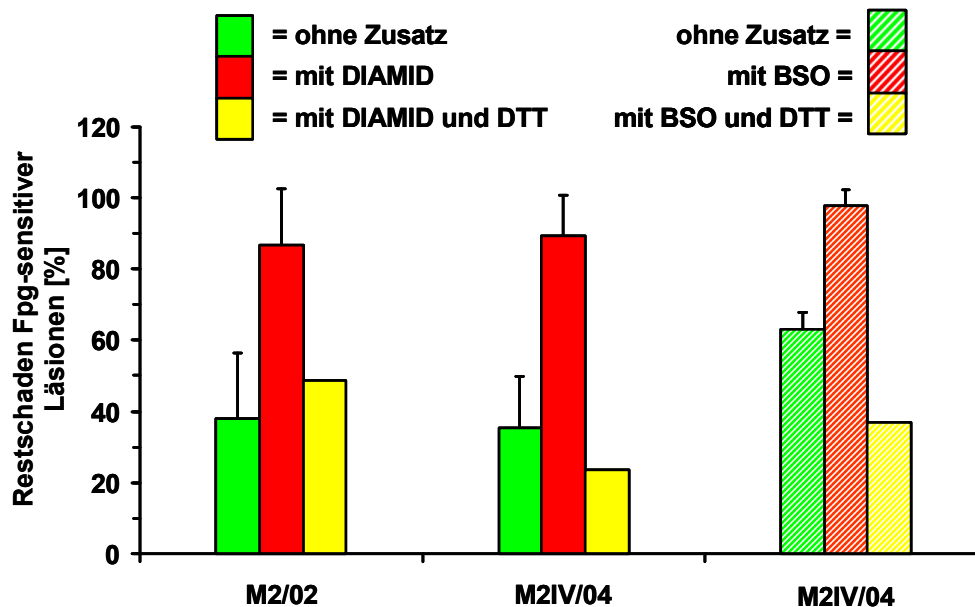


Abb. 5.28: Reversion der DNA-Reparaturhemmung in Melanomzellen nach Zusatz von DTT.

Die Bestrahlung erfolgte im Falle der BSO-Vorbehandlung (1 mM / 24 h) mit sichtbarem Licht [675 kJ/m²] (4.2.3.3.4) und im Falle der Diamid-Vorbehandlung (0,2 mM / 15 min) mittels Solar-Simulator [516 kJ/m² zwischen 300 – 800 nm] (siehe 4.2.3.3.11) Die Reparaturphase betrug 4 h mit DTT-Zusatz (1 mM) zum Vollmedium im Brutschrank (siehe 4.2.3.3.5). n=1-3.

Im Falle der Reversion des BSO-Effekts wird der Restschaden sogar unter das Referenzniveau der nur mit sichtbarem Licht geschädigten Kontrollzellen (grün gestreifter Balken) gesenkt. Daher sollten in einem zusätzlichen Experiment Melanomzellen (M2IV/04) und Hautfibroblasten (FH11/04) desselben Patienten ohne Zusatz eines Additivs nur mit sichtbarem Licht bestrahlt und während der 4 stündigen Reparaturphase mit DTT inkubiert werden. Denn wie in Abb. 5.18 erstmalig andeutungsweise zu sehen war, schien sichtbares Licht allein in höherer Dosis [675 kJ/m²] schon eine Reparaturhemmung in Melanomzellen auszulösen.

Wie nun in Abb. 5.29 sehr deutlich zu erkennen ist, wird in Melanomzellen (M2IV/04), nicht aber in deren zugehörigen Hautfibroblasten (FH11/04), durch Inkubation mit DTT nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht die Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen stark beschleunigt. Betrachtet man zum Vergleich die Reparatur ohne DTT-Zusatz, so scheint bereits sichtbares Licht alleine die Geschwindigkeit der DNA-Reparatur in Melanomzellen (M2IV/04) deutlich zu verlangsamen. Die Hautfibroblasten (FH11/04) desselben Patienten hingegen zeigen diesen Effekt nicht.

Aufgrund der eindeutigen Aufhebung der Reparaturhemmung durch die DTT-Behandlung (Abb. 5.28) kann jetzt von einer reversiblen Reaktion oxidationsempfindlicher funktioneller Gruppen innerhalb der Zelle ausgegangen

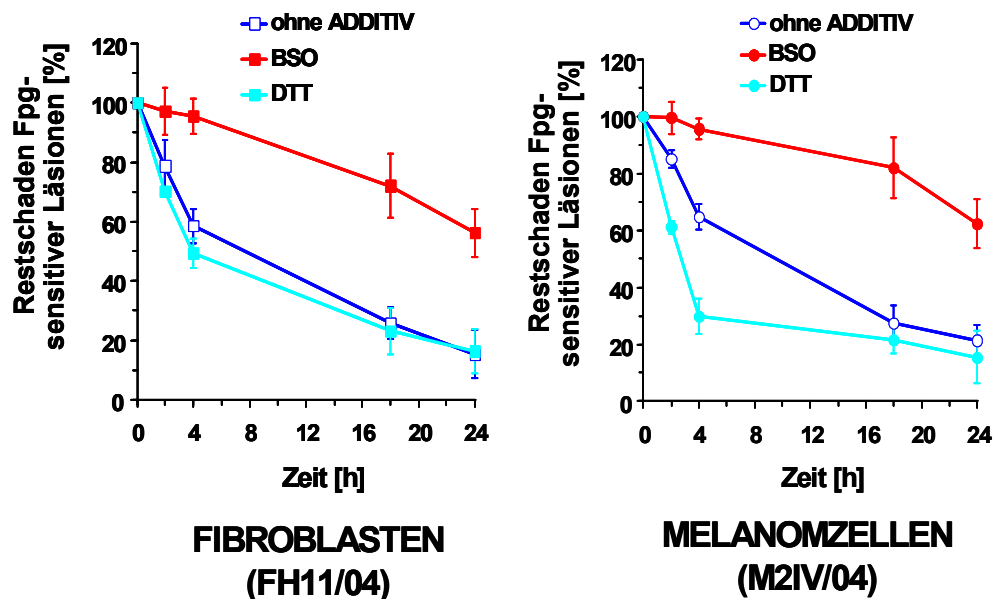


Abb. 5.29: Einfluss einer DTT-Inkubation in Melanomzellen und Fibroblasten nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht. Die Bestrahlung erfolgte mit sichtbarem Licht für 30 min [675 kJ/m²], Abstand 33 cm, in PBS/CMF (4.2.3.3.2). Die DTT-Inkubation (1 mM / Vollmedium) erfolgte während der 4 stündigen Reparaturphase im Brutschrank (Normbedingungen). n=2-3.

werden. Bislang ist deutlich erkennbar, dass durch den Wegfall der in großer Menge vorkommenden Antioxidans Glutathion die Reparatur von 7,8-Dihydro-8-oxo-guanin (8-oxoG) und demzufolge die Basenexzisionsreparatur (BER) massiv beeinträchtigt ist. Die nächsten Experimente sollten daher Klarheit darüber verschaffen, ob eine exklusive Inaktivierung der BER vorliegt oder aber noch zusätzlich andere DNA-Reparaturmechanismen, wie zum Beispiel die Nukleotidexzisionsreparatur oder aber die Einzelstrangbruchreparatur betroffen sind.

5.3 Untersuchung anderer DNA-Reparaturwege auf Beeinflussung durch oxidativen Stress

Nachdem gezeigt werden konnte, dass oxidativer Stress in der Lage ist, in Melanomzellen und ihren zugehörigen Hautfibroblasten die Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen massiv zu hemmen, war es nun von größtem Interesse, ob dieser Effekt exklusiv für die Basenexzisionsreparatur galt, oder ob auch andere, für die Zelle ebenso lebensnotwendige DNA-Reparaturwege betroffen sind.

5.3.1 Untersuchung der Nukleotidexzisionsreparatur auf Beeinflussung durch oxidative DNA-Modifikationen

Aus diesem Grund wurde zunächst in einem Teil der Melanomzellen und Hautfibroblasten nach dem gleichen Versuchsdesign das intrazelluläre GSH mit BSO depletiert (siehe 4.2.7) und anschließend die Zellen mit sichtbarem Licht, welches einen kleinen UV-Anteil enthielt, bestrahlt (siehe 4.2.3.3.2 und 4.2.3.3.4). Dieser geringe UV-Anteil war nun für das Gelingen des nachfolgenden Experiments von größter Bedeutung, da auf diese Weise Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD) in größerer Zahl induziert werden konnten. Denn es ist seit langem bekannt, dass diese sogenannten „bulky lesions“ vornehmlich durch die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) erkannt und repariert werden (2.6.3).

Aus Abb. 5.30 wird ersichtlich, dass bereits durch die einmalige Bestrahlung mit sichtbarem Licht (+ geringem UV-Anteil) eine relativ hohe Anzahl von CPDs, sowohl in den Melanomzellen als auch in den Hautfibroblasten desselben Patienten induziert werden können.

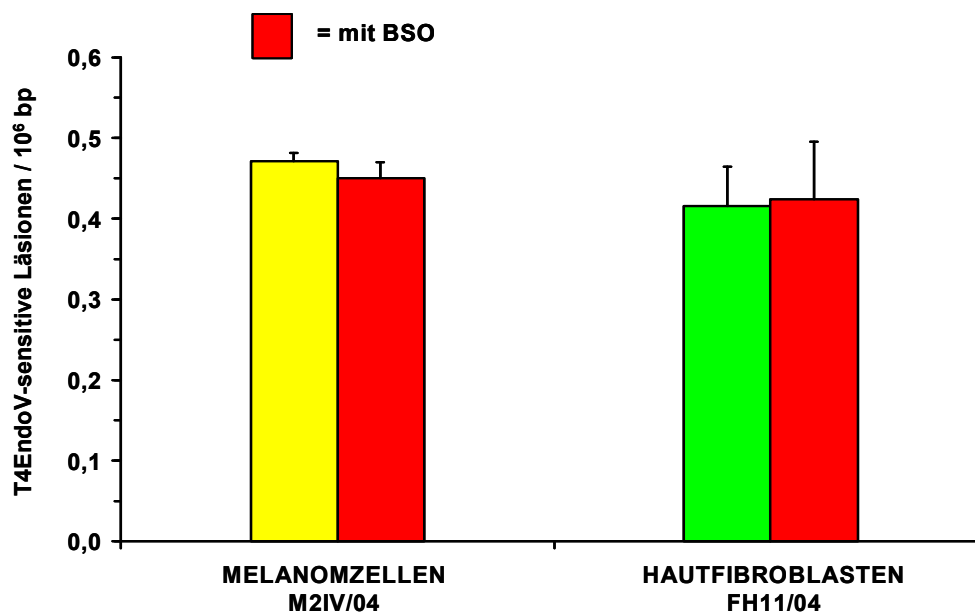


Abb. 5.30: Induktion von CPDs in Melanomzellen (M2IV/04) und ihren zugehörigen Hautfibroblasten (FH11/04) nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht. Die Bestrahlung erfolgte einmalig mit sichtbarem Licht (+ geringem UV-Anteil) für 30 min [675 kJ/m^2], in PBS/CMF, Abstand 33 cm (4.2.3.3.2, 4.2.3.3.4). Die Präinkubation mit BSO (1 mM) erfolgte für 24 h. Die Quantifizierung der induzierten CPDs erfolgte mit Hilfe der Alkalischen Elution und T4EndonukleaseV (T4EndoV). $n=3$.

Ebenso wie im Falle der Induktion Fpg-sensitiver Läsionen (8-oxoG / Abb. 5.21) zeigen die beiden Zellarten auch gegenüber der Induktion T4EndoV-sensitiver Läsionen keine erhöhte Sensitivität nach vorangegangener Glutathion-Depletion.

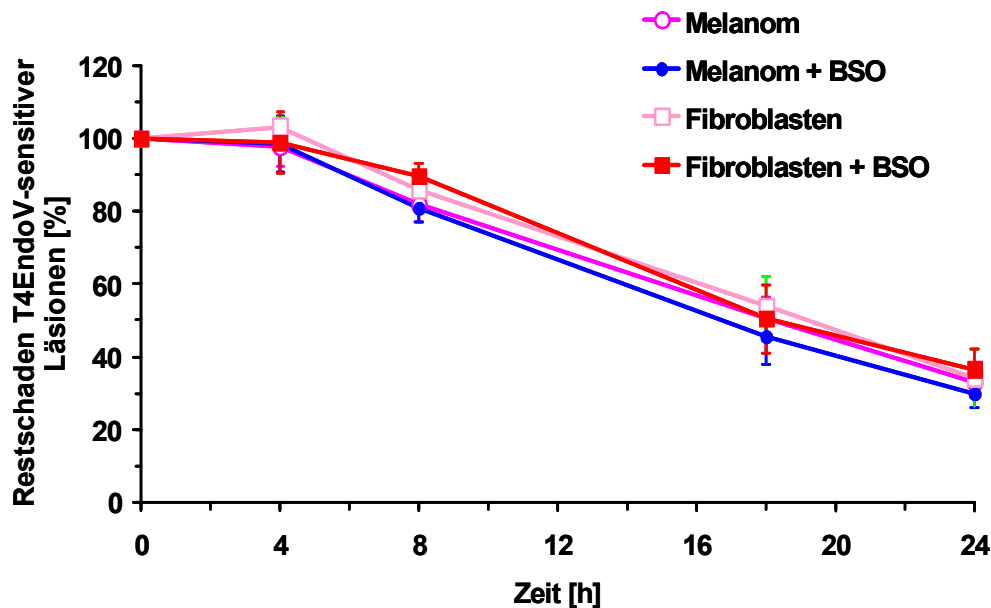


Abb. 5.31: Reparaturkinetik induzierter CPDs in Melanomzellen (M2IV/04) und ihren zugehörigen Hautfibroblasten (FH11/04). Die Bestrahlung erfolgte einmalig mit sichtbarem Licht (+ geringem UV-Anteil) für 30 min [675 kJ/m²], in PBS/CMF, Abstand 33 cm (4.2.3.3.2, 4.2.3.3.4). Die Präinkubation mit BSO (1 mM) erfolgte für 24 h. Die Quantifizierung der induzierten CPDs erfolgte mit Hilfe der Alkalischen Elution und T4EndonukleaseV (T4EndoV). n=3.

In Abb. 5.31 ist zu erkennen, dass Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD) im Gegensatz zu 7,8-Dihydro-8-oxo-guanin (8-oxoG) oder AP-Läsionen eine wesentlich längere Halbwertszeit ihrer Reparatur aufweisen.

Während 8-oxoG in ca. 4-6 h zu 50 % repariert werden (siehe Abb. 5.22), so vergehen im Fall der CPDs 16 bis 18 h. Desweiteren zeigt sich interessanterweise, dass die Vorbehandlung der Melanomzellen und der Fibroblasten mit BSO zu keiner Hemmung der DNA-Reparaturkapazität der CPDs führt. Auch sind keinerlei Unterschiede zwischen den Reparaturkinetiken der Melanomzellen und der Fibroblasten, sowohl mit als auch ohne BSO-Vorbehandlung zu verzeichnen.

Daraus kann gefolgert werden, dass trotz Sensibilisierung der Zellen mittels BSO für den darauffolgend induzierten oxidativen Stress durch Bestrahlung mit Sichtbarem Licht (+ geringem UV-Anteil), keinerlei Hemmung oder Beeinträchtigung der Reparatur von CPDs bzw. der NER stattfindet.

5.3.2 Untersuchung der Einzelstrangbruchreparatur auf Beeinflussung durch oxidativen Stress

Nachdem die letzten Ergebnisse (Abb. 5.31) gezeigt hatten, dass die Nukleotidexzisionsreparatur in Melanomzellen und den zugehörigen Hautfibroblasten nicht durch oxidativen Stress nicht beeinträchtigt wird, sollte nun abschließend noch die Einzelstrangbruchreparatur nach dem gleichen Versuchdesign auf eine etwaige Funktionshemmung untersucht werden. Aus diesem Grund wurden die Melanomzellen (M2IV/04) teilweise mit BSO präinkubiert (4.2.7), mit einer einmaligen Dosis sichtbaren Lichts bestrahlt und anschließend mit H_2O_2 inkubiert (4.2.3.3.6). Auf diese Weise wurde erreicht, dass nachfolgend auf den oxidativen Stress, Einzelstrangbrüche (ssb) innerhalb der Zellen induziert wurden. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Alkalischen Elutionstechnik (4.2.3).

Aus Abb. 5.32 wird ersichtlich, dass mit Hilfe von H_2O_2 ($75 \mu\text{m}$) innerhalb kurzer Zeit eine beträchtliche Anzahl an Einzelstrangbrüchen in den untersuchten Melanomzellen (M2IV/04) induziert werden kann. Dabei fällt auf, dass erneut kein Unterschied zwischen den mit und ohne BSO präinkubierten Zellen hinsichtlich deren Schadensinduktion zu verzeichnen ist (siehe auch Abb. 5.22, Abb. 5.31, Abb. 5.38,).

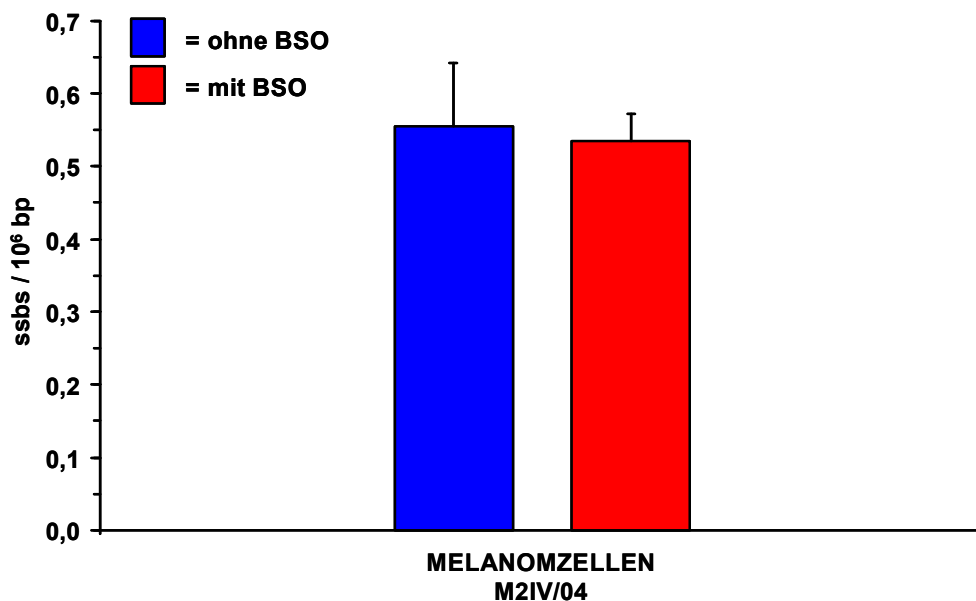


Abb. 5.32: Induktion von Einzelstrangbrüchen (ssb) in Melanomzellen (M2IV/04) nach Präinkubation mit BSO, Bestrahlung mit sichtbarem Licht und nachfolgender Inkubation mit H_2O_2 . Die Präinkubation mit BSO (1 mM) erfolgte für 24 h in der einen Hälfte der Zellen (roter Balken), die einmalige Bestrahlung mit sichtbarem Licht [675 kJ/m^2] und die nachfolgende Inkubation mit H_2O_2 ($75 \mu\text{m}$ / 15 min / 37°C) erfolgte in allen Zellen (siehe auch 4.2.3.3.6). $n=3$.

In Abb. 5.33 ist die Reparaturkinetik dieser Zellen dargestellt. Trotz der relativ hohen Anzahl an Einzelstrangbrüchen (ssbs) ist es bemerkenswert, mit welcher Geschwindigkeit die Zellen in der Lage sind, die induzierten Schäden zu reparieren. Auch hier ist zwischen den Ansätzen der BSO-präinkubierten und den unbehandelten Zellen kein Unterschied hinsichtlich der Reparaturgeschwindigkeit der ssbs zu erkennen. In einem Zeitraum von circa 30 bis 40 min wurden in beiden Ansätzen (mit und ohne BSO) 50 % der induzierten ssbs erkannt und repariert.

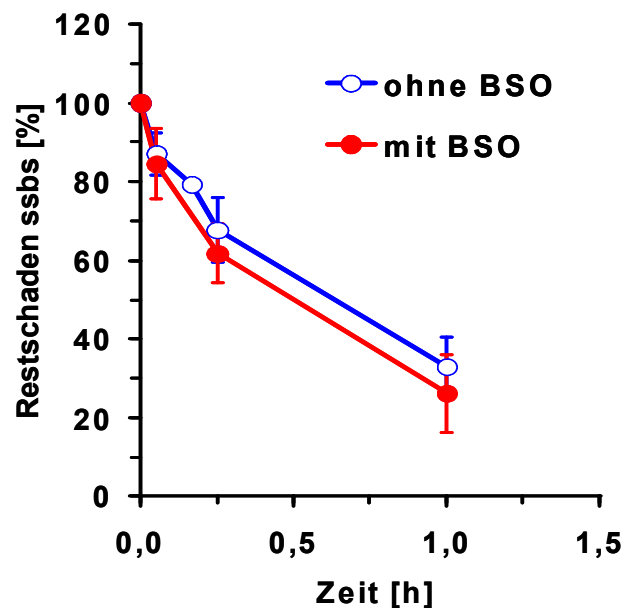


Abb. 5.33: Reparatur von Einzelstrangbrüchen (ssb) in Melanomzellen (M2IV/04) nach Präinkubation mit BSO, Bestrahlung mit sichtbarem Licht und nachfolgender Inkubation mit H_2O_2 . Die Präinkubation mit BSO (1 mM) erfolgte für 24 h in der einen Hälfte der Zellen (volle Kreise), die einmalige Bestrahlung mit sichtbarem Licht [675 kJ/m^2] und die nachfolgende Inkubation mit H_2O_2 ($75 \mu\text{M}$ / 15 min / 37°C) erfolgte in allen Zellen (siehe auch 4.2.3.3.6). $n=3$.

Somit führen diese Ergebnisse zu dem Schluß, dass auch die Reparatur von ssbs nicht durch eine vorangegangene Depletion von GSH mit nachfolgender Induktion oxidativen Stresses beeinträchtigt oder gar gehemmt wird.

5.4 Untersuchungen zur Reparaturhemmung innerhalb der BER

Da die bisherigen Untersuchungen unterschiedlichster DNA-Reparaturmechanismen (5.3.1 und 5.3.2) ergaben, dass durch Depletion von GSH und nachfolgender Induktion oxidativen Stresses allein die Basenexzisionsreparatur mit einem massiven Rückgang ihrer Reparaturkapazität für 7,8-Dihydro-8-oxo-guanin betroffen war, sollte nun versucht werden, einige Fragen hinsichtlich der Ursache dieses Phänomens zu beantworten.

5.4.1 Untersuchung der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität von hOGG1 in Melanomzellen und Fibroblasten

Zuerst sollte die Funktion bzw. die Aktivität des für eine Reparatur von 7,8-Dihydro-8-oxo-guanin (8-oxoG) essentiell notwendigen Proteins hOGG1 überprüft werden. Die Erkennung von 8-oxoG durch hOGG1 mit nachfolgender Entfernung der Läsion durch die 8-oxoG-Glykosylasefunktion ist der initiierte Schritt der Basenexzisionsreparatur (2.6.2). Daher lag auch die Vermutung nahe, dass durch die geschwächte antioxidative Abwehr der Zellen und nachfolgende Induktion oxidativen Stresses sensible und oxidationsempfindliche funktionelle Gruppen von hOGG1 leicht durch ROS oxidiert und dabei inaktiviert werden könnten. Um dieser Fragestellung nachzugehen wurde ein Teil der Melanomzellen und Fibroblasten wie zuvor für 24 h mit BSO (1 mM) inkubiert, mit Sichtbarem Licht bestrahlt und für eine Reparaturphase von 4h in den Brutschrank gelegt (siehe 4.2.3.3.4). Im Anschluß wurden die Zellen von den Flaschenböden abgelöst (4.2.1.1) und für den sogenannten „Cleavage-Assay“ vorbereitet. Dazu wurden aus den Zellpellets Gesamtproteinextrakte hergestellt, die dann mit einem synthetischen Oligonukleotid mit definierter DNA-Basenmodifikation (8-oxoG) auf einem seiner DNA-Stränge inkubiert wurden (siehe 4.2.5).

Die quantitative Auswertung mit Hilfe der Software Quantity One[®] lieferte nun sehr interessante Ergebnisse, die zeigten, dass unter den gewählten Bedingungen (einmalige Bestrahlung mit Sichtbarem Licht [675 kJ/m²], Präinkubation mit BSO (1 mM / 24 h), Reparaturphase von 4 h) in allen Zellen die 8-oxoG-Glykosylaseaktivität zwischen 26 – 54 % zurückging.

Dabei ließ sich auch anhand von „Zellpaaren“, bestehend aus jeweils Melanomzellen und Fibroblasten desselben Patienten, zeigen, dass es hinsichtlich des Ausmaßes der Reduktion der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität keinen Unterschied zwischen den beiden Zellarten gab (Abb. 5.34).

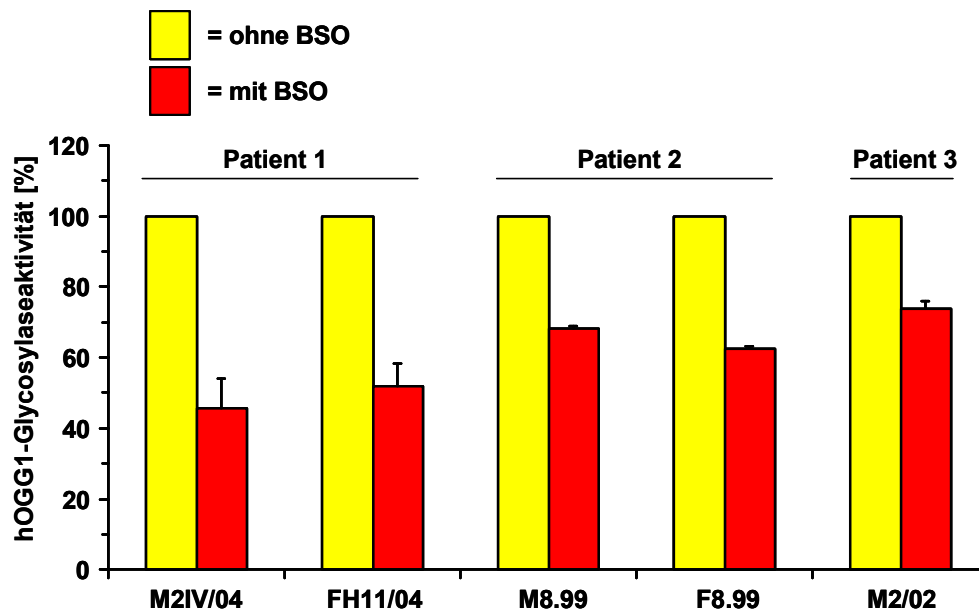


Abb. 5.34: 8-oxoG-Glycosylaseaktivität von hOGG1 in Melanomzellen (M) und Fibroblasten (F) derselben Patienten. Die einmalige Bestrahlung erfolgte mit sichtbarem Licht für 30 min [675 kJ/m²] in PBS/CMF, Abstand 33 cm. Zuvor wurden Zellen mit BSO (1 mM / 24 h) präinkubiert und für eine Reparaturphase von 4 h in den Brutschrank gelegt (4.2.3.3.4). Anschließend wurde mittels des Cleavage-Assays die 8-oxoG-Glykosylaseaktivität der Zellen bestimmt (4.2.5). Der Anteil des durch die hOGG1-Aktivität gebildeten 16-mer-Oligonukleotids an der Gesamt-DNA ist auf der Ordinate in [%] angegeben. n=2-3.

Daraus wird demnach ersichtlich, dass durch eine Schwächung der antioxidativen Abwehr innerhalb der Zellen durch Depletion von Glutathion mittels BSO (4.2.7) und einer Induktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht die 8-oxoG-Glycosylaseaktivität des hOGG1-Proteins in ihrer Funktion beeinträchtigt, jedoch nicht gänzlich aufgehoben wird. Aufgrund dieser Resultate war der nächste logische Schritt die Erstellung einer Kinetik über 48 h, um zu untersuchen wie rasch diese Funktionsbeeinträchtigung des hOGG1-Proteins einsetzte. Daher wurden die Zellen wie bereits oben beschrieben vorbehandelt und bestrahlt (4.2.3.3.4) und für den Cleavage-Assay aufgearbeitet (4.2.5).

Abb. 5.35 zeigt die 8-oxoG-Glykosylaseaktivität von Gesamtproteinextrakten aus den Melanomzellen M2IV/04. Nach Glutathion-Depletion mit BSO wurden die Zellen mit sichtbarem Licht bestrahlt und für verschieden lange Zeitpunkte (2 – 24 h) im Brutschrank inkubiert.

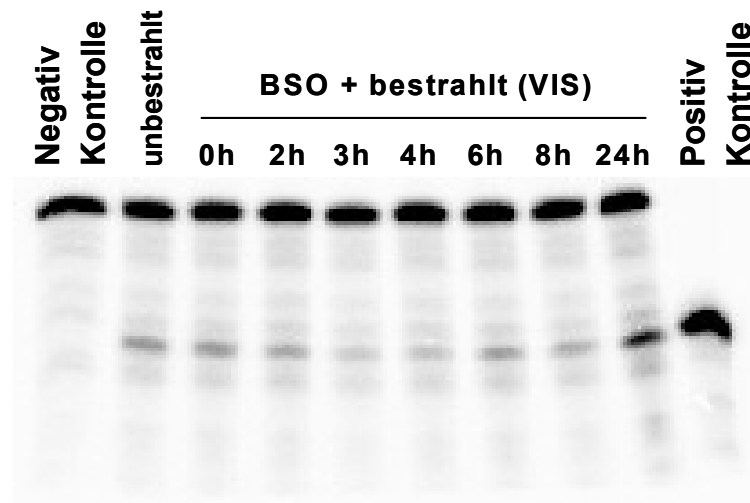


Abb. 5.35: 8-oxoG-Glycosylaseaktivität von hOGG1 in Melanomzellen (M2IV/04). Die einmalige Bestrahlung erfolgte mit sichtbarem Licht für 30 min [675 kJ/m^2] in PBS/CMF, Abstand 33 cm. Zuvor wurden Zellen mit BSO (1 mM) für 24 h präinkubiert und für eine Reparaturphase von 2 - 24 h in dem Brutschrank inkubiert (4.2.3.3.4). Anschließend wurde mittels des Cleavage-Assays die 8-oxoG-Glycosylaseaktivität der Zellen bestimmt (4.2.5). Der Anteil des durch die hOGG1-Aktivität gebildeten 16-mer-Oligonukleotids an der Gesamt-DNA ist auf der Ordinate in [%] angegeben.

In Abb. 5.36 ist nun der zeitliche Verlauf der 8-oxoG-Glycosylaseaktivität grafisch dargestellt.

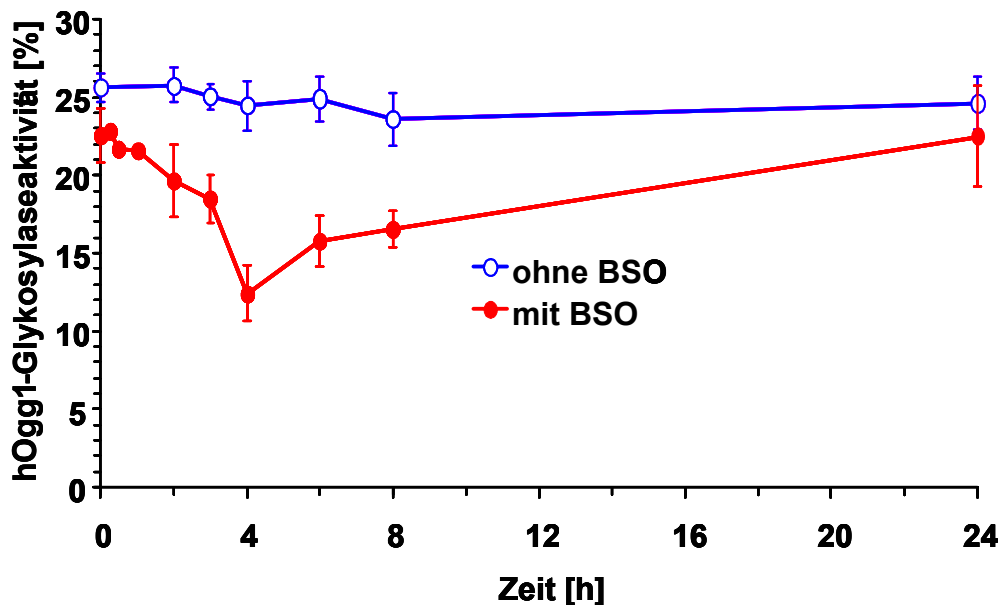


Abb. 5.36: Kinetik der 8-oxoG-Glycosylaseaktivität von Melanomzellen (M2IV/04) nach Präinkubation mit BSO und Bestrahlung mit Sichtbarem Licht. Ein Teil der Zellen wurde 24 h vor Versuchsbeginn mit BSO (1 mM) präinkubiert. Anschließend wurden alle Zellen für 30 min mit sichtbarem Licht bestrahlt [675 kJ/m^2], in PBS/CMF, Abstand 33 cm (4.2.3.3.2 und 4.2.3.3.4). Der Anteil des durch die hOGG1-Aktivität gebildeten 16-mer-Oligonukleotids an der Gesamt-DNA ist auf der Ordinate in [%] angegeben. $n=3-6$.

Daraus wird ersichtlich, dass sich in den Melanomzellen die Glykosylaseaktivität bis 1 h nach Bestrahlung mit Sichtbarem Licht noch nahezu auf dem Niveau wie vor der Schädigung befindet. Ab diesem Zeitpunkt beginnt sie. Der niedrigste Wert der Proteinfunktion wird 4 h nach Bestrahlung erreicht (- 54 %). Ab der vierten Stunde beginnt die Glykosylaseaktivität langsam wieder anzusteigen und erreicht um die 24. Stunde nach erfolgter Bestrahlung Werte unbestrahlter Zellen. Der obere Kurvenverlauf (offene Kreise) zeigt die 8-oxoG-Glykosylaseaktivität der nur bestrahlten, nicht BSO-präinkubierten Zellen zu den gleichen Zeitpunkten. Hieraus wird klar ersichtlich, dass in den Melanomzellen, trotz Bestrahlung mit Sichtbarem Licht der gleichen Dosis, keinerlei Verlust der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität zu verzeichnen ist (siehe auch 5.1.5).

Ebenso zeigt die Kinetik der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität der Hautfibroblasten desselben Patienten einen zu den Melanomzellen sehr ähnlichen Kurvenverlauf (Abb. 5.37).

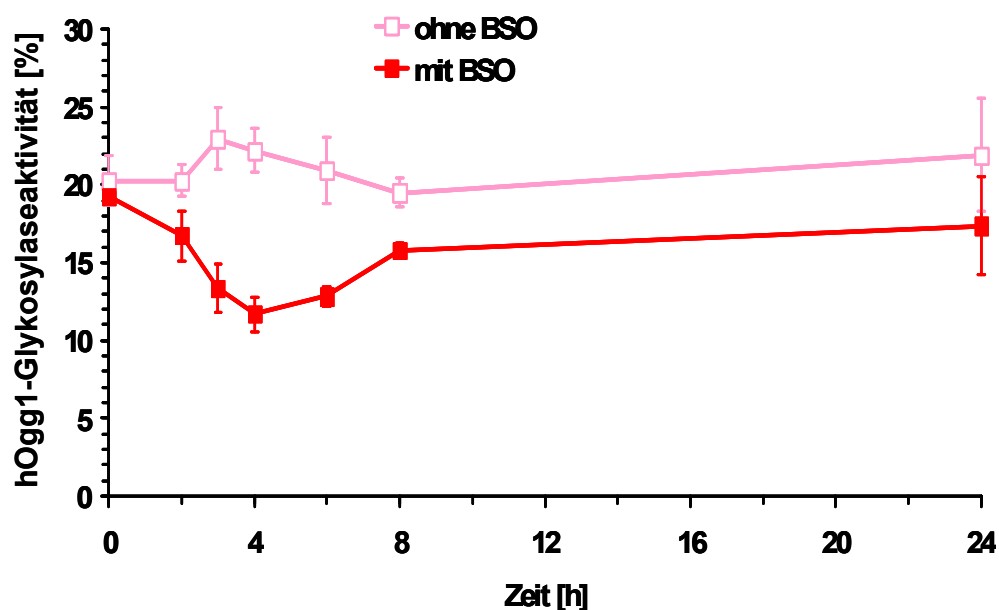


Abb. 5.37: Kinetik der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität von Hautfibroblasten (FH11/04) nach Präinkubation mit BSO und Bestrahlung mit sichtbarem Licht. Ein Teil der Zellen wurde 24 h vor Versuchsbeginn mit BSO (1 mM) präinkubiert. Anschließend wurden alle Zellen für 30 min mit sichtbarem Licht bestrahlt [675 kJ/m²], in PBS/CMF, Abstand 33 cm (4.2.3.3.2 und 4.2.3.3.4). Der Anteil des durch die hOGG1-Aktivität gebildeten 16-mer-Oligonukleotids an der Gesamt-DNA ist auf der Ordinate in [%] angegeben. n=2.

Auch hier setzt ein langsames Absinken der Proteinaktivität bis zur zweiten Stunde und ein etwas Forcierteres bis zur vierten Stunde nach Bestrahlung ein. Insgesamt betrachtet kommt es jedoch in den Hautfibroblasten zu einem etwas früheren, zwischen der zweiten und dritten Stunde einsetzenden Abfall der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität, verglichen mit den Melanomzellen. Danach setzt ein

langsamer, über mehrere Stunden andauernder Anstieg der Proteinfunktion ein, bis nach nahezu 24 h das Ausgangsniveau wieder erreicht ist. Der obere Kurvenverlauf (offene Rechtecke) zeigt auch hier, daß den Zellen nach alleiniger Bestrahlung (ohne vorherige BSO-Präinkubation) die volle 8-oxoG-Glykosylaseaktivität des hOGG1-Proteins während des gesamten Zeitraums zur Verfügung steht.

Aus den Abbildungen (Abb. 5.36 und Abb. 5.37) wird ersichtlich, dass die 8-oxoG-Glykosylaseaktivität des hOGG1-Proteins der BSO-vorbehandelten Melanomzellen und Hautfibroblasten nicht sofort innerhalb der ersten Minuten nach Bestrahlung mit Sichtbarem Licht an Aktivität verliert, sondern dass hier ein schleichender, sich über mehrere Stunden hinziehender Prozeß vorliegt

5.4.2 Untersuchungen zum Abbau von hOGG1 nach BSO-Präinkubation und Bestrahlung mit sichtbarem Licht

Nachdem nun die Ergebnisse des Cleavage-Assays vorlagen und sowohl bei den Melanomzellen (M2IV/04) als auch bei den Hautfibroblasten (FH11/04) eine deutliche Abnahme der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität von hOGG1-Protein zu erkennen war, sollte parallel zum hOGG1-Aktivitätsverlust geklärt werden, ob sich mit Hilfe eines Western-Blots eine Veränderung des hOGG1-Proteins nachweisen lässt. Aus diesem Grund wurden die Melanomzellen wie zuvor mit BSO präinkubiert, mit sichtbarem Licht bestrahlt und anschließend aus ihnen Gesamtproteinextrakte hergestellt (4.2.10 und 4.2.11). Nach dem gleichen Versuchsdesign wurden die Kontrollzellen aufgearbeitet – allerdings ohne BSO- Vorbehandlung.

Wie aus Abb. 5.38 zu erkennen ist, verändert sich der Gehalt an hOGG1 der nicht mit BSO-vorbehandelten Zellen, aber auch der BSO-präinkubierten Zellen, nicht über den Zeitraum der Betrachtung. Es kommt in beiden Fällen (A und B) zu keiner Abnahme der Bandenintensität zwischen Zeitpunkt 0h und der vierten Stunde nach Bestrahlung, was einen Abbau oder eine die Antikörperbindung beeinflussende strukturelle Veränderung von hOGG1 in den Melanomzellen ausschließen lässt.

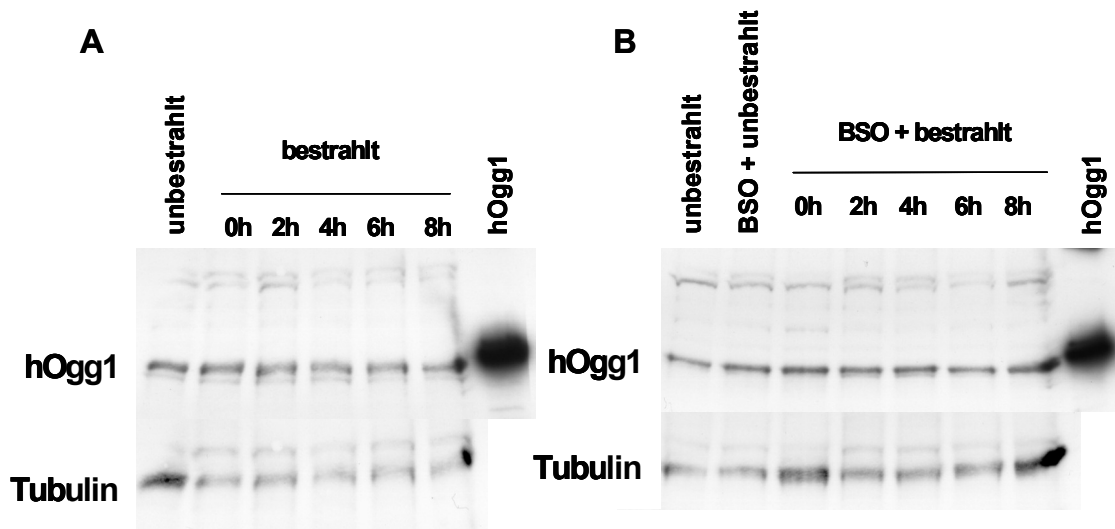


Abb. 5.38: Western-Blot von hOGG1 aus Melanomzellen (M2IV/04) mit BSO-Präinkubation (B) und ohne BSO-Präinkubation (A). Die Zellen wurden für 24 h mit BSO (1 mM) präinkubiert und am folgenden Tag mit sichtbarem Licht für 30 min bestrahlt [675 kJ/m²], 33 cm Abstand, in PBS/CMF. Nach den angegebenen Zeiten erfolgte die Aufarbeitung der Proben unter NICHT-reduzierenden Bedingungen (Laemli-Puffer ohne DTT). Das zu untersuchende Protein (hOGG1) wurde mit einem Antikörper gegen hOGG1 detektiert (anti-hOGG1 PA3).

5.4.3 Untersuchung der Funktionsfähigkeit des APE1-Proteins

Da die bisherigen Experimente zeigten, dass aufgrund einer Beeinträchtigung der antioxidativen Abwehr durch Depletion von Glutathion und nachfolgender Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht, kein Abbau von hOGG1 (Abb. 5.38), wohl aber eine deutliche Aktivitätsminderung der 8-oxoG-Glykosylasefunktion des Proteins verursacht wurde (Abb. 5.36 und Abb. 5.37), sollte nun abschließend das nächstfolgende Protein der Basenexzisionsreparaturkaskade auf seine volle Funktionsfähigkeit hin untersucht werden. Ziel des nachfolgenden Experiments war es herauszufinden, ob die entdeckte Aktivitätsminderung der 8-oxoG-Glykosylasefunktion des hOGG1-Proteins eventuell von „indirekter“ Natur sei, nämlich dass die 8-oxoG-Glykosylase nicht direkt einen strukturell bedingten Funktionsverlust aufgrund oxidierter funktioneller Gruppen erlitt, sondern dass das hOGG1-Protein an den von ihm erkannten und prozessierten Läsionen gebunden bleibt. Denn für eine möglichst schnelle und effiziente Reparatur von 7,8-Dihydro-8-oxo-guanin muss hOGG1 durch die AP-Endonuklease (APE1) rechtzeitig von seinem Substrat verdrängt werden (Hill et al., 2001). Somit könnte also eine Funktionsminderung von APE1 den „turnover“ von hOGG1 drastisch reduzieren und so der Anschein einer sinkenden Aktivität des Proteins erweckt werden. Aus diesem Grund sollte nun nach dem gleichem Versuchsprotokoll wie in den Experimenten

zuvor die Induktion und Reparatur von AP-Läsionen nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht untersucht werden. Daher wurde nun die eine Hälfte der Melanomzellen (M2IV/04) mit BSO für 24 h inkubiert, anschließend wieder alle Zellen mit einer einmaligen Dosis sichtbaren Lichts (mit Kantenfilter, durchlässig für $\lambda > 395$ nm) bestrahlt und dann mit serumfreien, saurem Medium (pH 5,0) inkubiert, um AP-Läsionen zu erzeugen.

Wie nun aus Abb. 5.39 ersichtlich wird, ist hinsichtlich der Induktion von AP-Läsionen keinerlei Unterschied zwischen BSO-vorbehandelter und nicht vorbehandelter Zellen nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht zu erkennen.

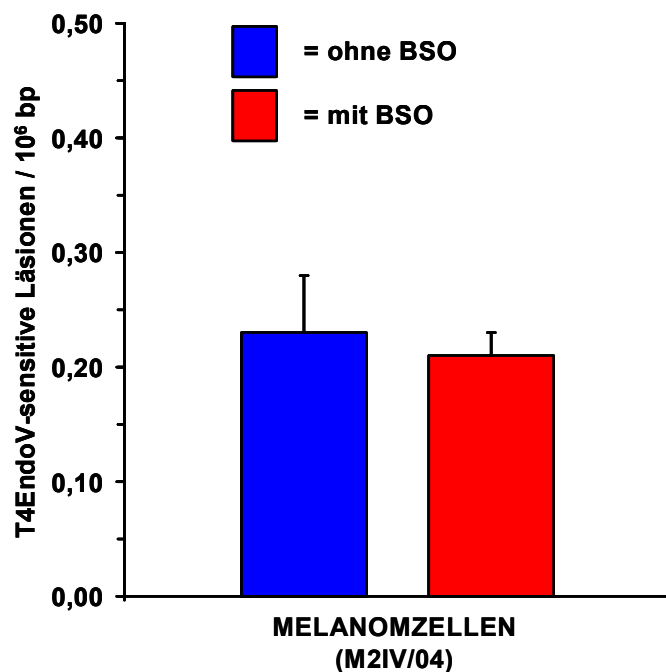


Abb. 5.39: Induktion von AP-Läsionen in Melanomzellen (M2IV/04). Ein Teil der Zellen wurde mit BSO (1 mM / 24 h) präinkubiert (roter Balken). Dann wurden alle Ansätze mit einer einmaligen Dosis sichtbaren Lichts für 30 min bestrahlt [675 kJ/m^2], in PBS/CMF, Abstand 33 cm (4.2.3.3.2 und 4.2.3.3.4). Anschließend wurden die Zellen mit saurem, serumfreien Medium (pH 5,0 / 15 min / unter Eis) inkubiert. $n=1-3$.

Das heißt, dass die Präinkubation mit BSO keine zusätzliche Induktion von AP-Läsionen begünstigt.

Desweiteren bleibt auch die Reparatur der induzierten AP-Läsionen unbeeinflusst von einer vorangegangenen Glutathion-Depletion in Melanomzellen (Abb. 5.40).

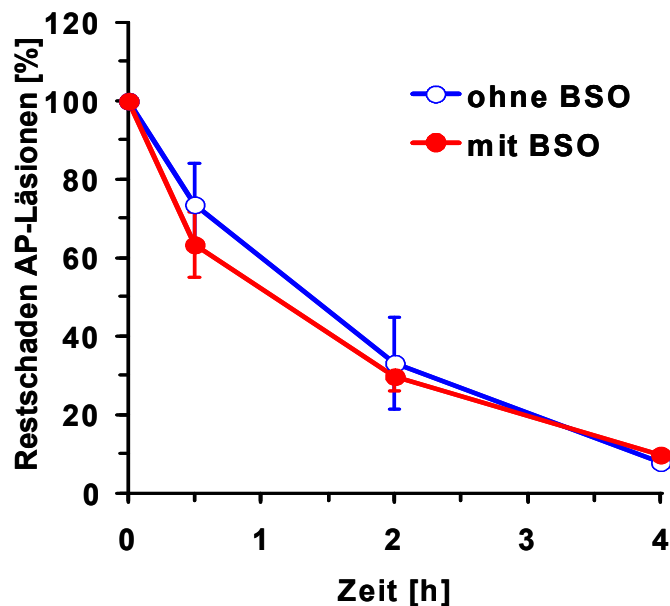


Abb. 5.40: Reparaturkinetik von AP-Läsionen in Melanomzellen (M21V/04). Ein Teil der Zellen wurde mit BSO (1 mM / 24 h) präinkubiert. Dann wurden alle Ansätze mit einer einmaligen Dosis sichtbaren Lichts für 30 min bestrahlt [675 kJ/m^2], in PBS/CMF, Abstand 33 cm (4.2.3.3.2 und 4.2.3.3.4). Anschließend wurden die Zellen mit saurem, serumfreiem Medium (pH 5,0 / 15 min / unter Eis) inkubiert. $n=1-3$.

Daraus kann geschlossen werden, dass trotz Schwächung der zellulären Verteidigung gegen oxidativen Stress und nachfolgender Induktion von ROS auch im Falle des APE1-Proteins keinerlei Funktionsbeeinträchtigung vorliegt. Daraus kann gefolgert werden, dass die Abnahme der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität des hOGG1-Proteins nicht wie zuvor vermutet auf ein zu geringes „turnover“ zurückzuführen ist (siehe Einleitung 5.4.3). Darüberhinaus ist auch bemerkenswert, mit welcher Geschwindigkeit die Melanomzellen in der Lage sind, AP-Läsionen zu detektieren und zu entfernen. Für eine Reduktion der induzierten Schäden um 50 % benötigen sie nur circa 1 h.

6 DISKUSSION

6.1 Vergleichende Untersuchungen an Melanomzellen und Fibroblasten

Ein erstes Ziel dieser Arbeit bestand in einem Vergleich von Melanomzellen und Hautfibroblasten derselben Patienten hinsichtlich einiger grundlegender und für die nachfolgenden Experimente relevanter Eigenschaften, da diese beiden Zelltypen sich einerseits sehr stark durch ihre Lage in der Haut (2.2) und durch ihre Struktur, andererseits aber vor allem auch hinsichtlich ihrer Malignität unterschieden. Als erstes wurde dabei der Status der antioxidativen Abwehr bestimmt. Dies erfolgte durch die Messung des intrazellulären Spiegels des Tripeptids Glutathion (GSH), bekanntermaßen eine der wichtigsten antioxidativ wirksamen Substanzen der Zelle (2.7). Ebenso wurde auch die Veränderung des Glutathion-Gehalts innerhalb der Zellen nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht überprüft. Darüberhinaus wurde mit Hilfe der Alkalischen Elution und verschiedener DNA-Reparaturenzyme der aus der Bestrahlung mit sichtbarem Licht resultierende oxidative DNA-Schaden charakterisiert (2.3) und die zelluläre Reparaturkapazität innerhalb einer definierten Zeit bestimmt. Außerdem wurden die Zellen auch auf die Funktionsfähigkeit und Aktivität des für die Reparatur von 7,8-Dihydro-8-oxo-guanin (8-oxoG) wichtigsten Proteins, hOGG1, überprüft (siehe 2.6.2).

6.1.1 Intrazelluläre Glutathion-Spiegel in Melanomzellen und Fibroblasten

Wie aus Abb. 5.1 ersichtlich wurde, unterschieden sich Melanomzellen und Hautfibroblasten desselben Patienten erheblich hinsichtlich ihres Glutathion-Gehalts. Dabei wiesen die Hautfibroblasten einen ungefähr doppelt so hohen Gesamtglutathion-Spiegel auf, wie die jeweiligen Melanomzellen. Diese Diskrepanz kann einerseits mit der unterschiedlichen Lage der zwei verschiedenen Zelltypen erklärt werden. Denn Hautfibroblasten liegen in einem wesentlich tieferen Bereich der Haut, der Dermis (siehe auch 2.2), was bedeutet, dass sie der energiereichen UV-Strahlung und deren direkt DNA-schädigendem Potential nur äußerst begrenzt ausgesetzt sind (2.3.5.1). Denn es wurde gezeigt, dass die Organisation der Haut in mehrere funktionelle Schichten die Anzahl der durch UVB-induzierten Cyclobutan-Pyrimdindimere in tiefer liegenden Keratinozyten um den Faktor 22 reduzieren konnte verglichen mit identisch geschädigten Keratinozyten aus „Monolayer-Kulturen“ (Mouret et al., 2006). Im Gegensatz dazu befinden sich Melanozyten und

Melanomzellen in der äußersten Hautschicht, der Epidermis, und somit in Reichweite der UV-Strahlung. Andererseits haben Melanozyten ganz andere Aufgaben innerhalb des Gesamtgefüges Haut zu bewältigen als Fibroblasten. Durch UV-Strahlung getriggert, synthetisieren sie Melanin, ein zelleigenes Polymer, das sich um den Zellkern von Keratinozyten lagern und diesem UV-Schutz verleihen kann (Eller et al., 1994; Lin and Fisher, 2007). Allerdings entsteht bei der Melaninsynthese (vor allem bei der des Pheomelanins) als Nebenprodukt Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (Meyskens et al., 2001; Lin and Fisher, 2007), das seinerseits in den Zellkern gelangen und dort in hochreaktive Hydroxylradikale gespalten werden kann (2.3.2). Die Folgen wären dann eine verstärkte Induktion prämutagener oxidativer DNA-Modifikationen (zum Beispiel 8-oxoG) und Einzelstrangbrüche (2.4). In diesem Zusammenhang konnte in Melanomzellen, nicht aber in Fibroblasten, eine signifikante Überexpression wichtiger, antioxidativ wirksamer Enzyme, wie verschiedener Superoxiddismutasen (CuZnSOD, MnSOD) und der Katalase nachgewiesen werden, was für eine Anpassung der Zellen an den erhöhten oxidativen Stress in oberen Hautschichten durch Sonnenlicht spräche (Kvam and Dahle, 2003; Sander et al., 2003). Desweiteren wiesen Melanomzellen bereits in früheren Untersuchungen niedrigere Glutathion- und Ferritin-Spiegel auf als Hautfibroblasten. Diese scheinen dagegen mit einem langsamen adaptiven Anstieg ihrer Ferritin-Spiegel auf durch UVA verursachten oxidativen Stress zu reagieren. Auf diese Weise kann der Gehalt an freien Eisenionen niedrig gehalten werden, was die „Fenton-Chemie“ und ihre Produkte niedrig hält (siehe auch 2.3.2) (Applegate et al., 1996; Tyrrell, 1999). In diesen doch deutlichen Unterschieden zwischen Melanomzellen und Hautfibroblasten hinsichtlich ihrer Lage in der Haut, ihrer enzymatischen Ausstattung der antioxidativen Abwehr und ihrer enzymatischen Reaktion auf oxidativen Stress könnte eine mögliche Erklärung für den höheren Glutathion-Gehalt der Fibroblasten liegen. Eine weitere Ursache für deren erhöhten Glutathion-Gehalt könnte aber auch in deren größerer Zellvolumina zu finden sein.

Ebenso wie zwischen Melanomzellen und Hautfibroblasten zeigten sich auch unter den Melanomzellen verschiedener Patienten große Unterschiede hinsichtlich des Glutathion-Gehalts. Vor allem die Melanomzellen SKMel25 wiesen einen sehr hohen Glutathion-Spiegel auf, der sich auf Niveau der Fibroblasten bewegte (Abb. 5.1). Interessanterweise enthalten diese Zellen vermutlich kein Melanin, da nach ihrer Zentrifugation ein weißes Zellpellet zu erkennen war. Im Gegensatz dazu waren sämtliche Pellets der Melanomzellen anderer Patienten dunkelbraun bis fast schwarz gefärbt, was auf einen hohen Melaningehalt schließen lässt. Dies lässt die Vermutung aufkommen, dass der Glutathion-Gehalt negativ korreliert ist mit dem Melaningehalt.

Die Abbildungen Abb. 5.2 und Abb.5.3 zeigen nun in einem Zeitraum von 48 h den Verlauf der Glutathion-Spiegel in Hautfibroblasten und Melanomzellen nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht. Dabei ergaben sich wiederum erhebliche Unterschiede zwischen den beiden Zellarten. Bei den Hautfibroblasten kommt es zu einem massiven Absinken des Glutathion-Spiegels direkt nach der Bestrahlung und einer sehr langen Erholungsphase über 48 h, bis das Ausgangsniveau wieder erreicht ist. Im Gegensatz dazu sinkt der Glutathion-Spiegel in Melanomzellen etwas schwächer ab, steigt bereits nach 2 – 4 h wieder auf sein Ausgangsniveau und erreicht nach 12 -14 h ein Maximum, um dann innerhalb der nächsten 10 h wieder Ausgangswerte zu fallen. In dieser adaptiven Antwort kann ein Schutzmechanismus vor weiterer Bestrahlung vermutet werden, da Melanomzellen bekanntermaßen ständig einem sehr hohen intrazellulären oxidativen Stress aufgrund der täglichen Bestrahlung durch Sonnenlicht ausgeliefert sind. Dies wäre keine ungewöhnliche Reaktion, da zum Beispiel die Bräunung nach einem Sonnenbad die wohl offensichtlichste adaptive Antwort des menschlichen Organismus auf exogene Faktoren darstellt (Eller et al., 1994; Lin and Fisher, 2007). Dabei wird jedoch die Melaninsynthese angeregt, was zu einer zusätzlichen Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies als Nebenprodukt der Synthese führt (Abdel-Malek et al., 1999; Kvam and Tyrrell, 1999; Suzuki et al., 1999). Eine mögliche Erklärung für die Glutathion-Neusynthese könnte die durch oxidativen Stress ausgelöste Freisetzung des Transkriptionsfaktors Nrf2 durch Oxidation des mit ihm assoziierten Proteins Keap1 sein. Das freigesetzte Nrf2 transloziert in den Zellkern und bewirkt eine gesteigerte transkriptionelle Aktivität am „antioxidative responsive element“ (ARE). Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass über eine Nrf2-Aktivierung eine deutliche Zunahme der Glutathion S-Transferase zu verzeichnen war (Itoh et al., 2004; McWalter et al., 2004). Somit wäre es denkbar, dass ebenfalls der mRNA-Gehalt für die γ -Glutamylcysteinsynthetase hochreguliert und dadurch Glutathion verstärkt synthetisiert werden könnte. Dieser Mechanismus scheint allerdings bei den Fibroblasten nicht vorzuliegen. Doch auch sie können den induzierten oxidativen Stress augenscheinlich gut abfangen, wären aber im Falle einer weiteren Bestrahlung vermutlich schlechter geschützt, da die Glutathion-Spiegel direkt nach der Bestrahlung fast erschöpft waren. Die geringere Abnahme des Glutathion-Gehalts in Melanomzellen kann zudem, wie schon oben beschrieben, auch auf eine erhöhte Aktivität zusätzlicher, antioxidativ wirksamer Enzyme zurückgeführt werden, die ihrerseits das GSH/GSSG-System bei der Neutralisation induzierter ROS entlasten (Sander et al., 2003). In beiden Zellarten kommt es aber zu einer deutlichen Reaktion intrazellulärer Glutathion-Spiegel auf die Bestrahlung mit sichtbarem Licht, was auf eine Beteiligung von Glutathion an der Neutralisierung der durch die Bestrahlung mit sichtbarem Licht induzierten reaktiven Sauerstoffspezies hinweist.

Eine mögliche Erklärung für den raschen Verlust an intrazellulärem GSSG könnte in der Beobachtung begründet sein, dass durch erhöhten oxidativen Stress in der Zelle auch die Lipidperoxidation gesteigert und dadurch die Zellmembran für GSH oder GSSG stärker permeabel wird (Merwald et al., 2005). Ein weiterer Hinweis für diese Theorie könnte zudem auch in der Beobachtung begründet sein, dass beispielsweise Melanomzellen einen sehr stark erhöhten Spiegel an Malondialdehyd aufweisen, ein Marker für oben beschriebene Lipidperoxidation (Sander et al., 2003).

6.1.2 DNA-Schadensprofile und Reparaturkapazität von Melanomzellen und Fibroblasten

Das DNA-Schadensprofil (Abb. 5.8) zeigt nun den in Hautfibroblasten und Melanomzellen durch einmalige Bestrahlung mit sichtbarem Licht, unter Verwendung eines Kantenfilters (durchlässig für $\lambda > 395$ nm), induzierten DNA-Schaden. Vermutlich ist jener Schaden ebenso eine Folge des induzierten oxidativen Stresses wie die oben beschriebene Wirkung auf den Glutathion-Gehalt der Zellen. Betrachtet man dabei die unterschiedlichen, mit Hilfe verschiedener DNA-Reparaturenzyme charakterisierten DNA-Modifikationen, so wird ersichtlich, dass in den beiden Zellarten Fpg-sensitive DNA-Modifikationen die dominierenden Läsionen darstellen. Dieser Befund untermauert frühere Ergebnisse (Pflaum, 1994, 1996), die zeigten, dass sichtbares Licht in einer Typ-II-Reaktion (2.3.5.1) hauptsächlich Singulett-Sauerstoff oder Superoxidradikale erzeugen kann. Diese reaktiven Sauerstoffspezies sind in der Lage DNA-Basen zu oxidieren, wobei hauptsächlich 8-oxoG generiert wird. Interessanterweise ist auch zu erkennen, dass in den Fibroblasten um den Faktor 4 vermehrt AP-Läsionen induziert werden, verglichen mit den Melanomzellen. Dieser Befund deutet eventuell auf einen zusätzlichen Schädigungsmechanismus innerhalb der Fibroblasten hin, bei dem durch die induzierten ROS Alkoxy- ($RO\cdot$) oder Hydroperoxyradikale ($ROO\cdot$) entstehen können. Diese sind dann ihrerseits in der Lage DNA-Basen anzugreifen und so AP-Läsionen zu verursachen (Harkin and Burcham, 1997; Kielbassa et al., 1997; Kanazawa et al., 2000). Einzelstrangbrüche (ssb) und Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD) entstehen in verschwindend geringer Zahl, da über den Typ-II-Mechanismus keine Hydroxylradikale (die ssb erzeugen) generiert werden und durch Verwendung eines Kantenfilters keine UV-Strahlung (die CPDs induziert) an die DNA gelangt.

Aus dem DNA-Schadensprofil (Abb. 5.9) nach Schädigung der Hautfibroblasten und Melanomzellen mit einer einmaligen Dosis UVA wird deutlich, dass ebenfalls in einer Typ-II-Reaktion größere Mengen an Singulett-Sauerstoff gebildet werden müssen, da auch hier deutlich erhöhte Spiegel an Fpg-sensitiven Läsionen gemessen werden. Hierbei zeigt sich, dass Hautfibroblasten scheinbar etwas

sensitiver hinsichtlich der Induktion von Fpg-sensitiven Läsionen auf reine UVA-Strahlung reagieren als Melanomzellen. Dieses Phänomen kann mit der Tatsache erklärt werden, dass im Gegensatz zu Hautfibroblasten sowohl Melanomzellen als auch Keratinozyten Melanin enthalten. Dieses Polymer hat die Eigenschaften eines natürlichen „sunscreen“, so daß Melanomzellen und Keratinozyten auf diese Weise mehr Schutz vor der UV-Strahlung erfahren (Lin and Fisher, 2007). Desweiteren werden in gleichem Umfang in beiden Zellarten Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPDs) als dominierende DNA-Modifikation induziert. Bislang wurde immer von der Tatsache ausgegangen, dass nur UVB-Strahlung exklusiv in der Lage sei, CPDs zu verursachen. Doch die Ergebnisse dieser Arbeit und kürzlich veröffentlichte Daten zeigen, dass durch die energieärmere UVA-Strahlung zwar nicht direkt DNA-Moleküle angeregt werden können, wahrscheinlich aber Energie in einem Triplett-Triplett-Energietransfer auf einen intrazellulären Photosensibilisator übertragen wird, der dann in einer Typ-I-Reaktion seinerseits mit DNA-Basen reagieren kann und so CPDs induziert (Besaratina et al., 2005; Mouret et al., 2006).

Nachdem die DNA-Schadensspektren der unterschiedlichen Bestrahlungsarten ermittelt worden waren, sollte in einem nächsten Schritt die Induktion und DNA-Reparaturkapazität von DNA-Schäden in Melanomzellen und Hautfibroblasten desselben Patienten nach Bestrahlung mit einer einmaligen Dosis UVA (12 kJ/m^2) bestimmt werden (Abb 5.10 A und B). Dafür wurden die Zellen direkt nach erfolgter Bestrahlung für 4 h im Brutschrank bei Normbedingungen ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 , 99 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert, so dass sie die Chance hatten, die induzierten oxidativen DNA-Modifikationen zu reparieren. Anschließend wurden die verbliebenen DNA-Modifikationen mit Hilfe der Alkalischen Elution und Fpg-Protein bestimmt. Dabei konnte in den Hautfibroblasten durch UVA-Strahlung eine größere Menge an Fpg-sensitiven Läsionen induziert werden als in Melanomzellen. Die nach 4 h ermittelten DNA-Reparaturdaten zeigten jedoch, dass die Hautfibroblasten, in gleichem Umfang wie die Melanomzellen in der Lage waren, 40 – 50 % des durch die Bestrahlung induzierten Schadens zu reparieren.

In Abb. 5.11 und Abb. 5.12 wurden Melanomzellen und Hautfibroblasten, dem gleichen Versuchsdesign wie zuvor bei Bestrahlung mit UVA folgend, mit einer einmaligen Dosis sichtbaren Lichts bestrahlt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Melanomzellen und Hautfibroblasten derselben Patienten hinsichtlich der Induktion von Fpg-sensitiven Läsionen (Abb. 5.11), was darauf schließen läßt, dass hier vermutlich ein anderer endogener Photosensibilisator angeregt wird als zuvor während der UVA-Bestrahlung. Desweiteren konnte schon in vorangegangenen Arbeiten (Kielbassa, 1997; Pflaum 1998; Hoffmann 2003) gezeigt werden, dass ab der verwendeten Strahlendosis von [675 kJ/m^2] sichtbaren Lichts eine Sättigung der induzierten oxidativen DNA-Modifikationen eintritt. Dieser Effekt ist

vermutlich auf ein Photobleaching des zellulären (endogenen) Photosensibilisators zurückzuführen.

Grundsätzlich ist ein etwas uneinheitliches Bild zwischen den verschiedenen Patienten hinsichtlich ihrer Reparaturkapazität gegenüber der Bestrahlung mit sichtbarem Licht zu erkennen. Der durch sichtbares Licht induzierte DNA-Schaden wird von beiden Zellarten (Melanomzellen und Hautfibroblasten) innerhalb von 4 h um 40 – 65 % (in einem Fall sogar um 84 %) reduziert (Abb. 5.12). Wobei die interessante Beobachtung zu machen ist, dass Melanomzellen und Hautfibroblasten desselben Patienten nahezu identische Reparaturgeschwindigkeiten aufweisen (Abb. 5.12).

Der nächste wichtige Parameter der in Melanomzellen und Hautfibroblasten untersucht werden sollte, war die 8-oxoG-Glykosylaseaktivität des hOGG1-Proteins, einem der wichtigsten Proteine der Basenexzisionsreparatur (BER), da es für die Erkennung und Entfernung der modifizierten DNA-Base 8-oxoG essentiell ist. Zu diesem Zweck wurde in dem sogenannten Cleavage-Assay Gesamtproteinextrakte der Zellen mit einem radioaktiv markierten, ein 8-oxoG-Rest auf einem seiner DNA-Stränge tragenden Oligonukleotid inkubiert (4.2.5). Aus Abb. 5.14 wird nun ersichtlich, dass zum einen alle getesteten Zellen Glykosylaseaktivität besitzen, da das Oligonukleotid jeweils zu einem gewissen Prozentsatz an der DNA-Modifikation eingeschnitten wurde. Zum anderen wiesen die Hautfibroblasten dabei eine signifikant niedrigere Glykosylaseaktivität auf als die Melanomzellen. Dies wurde bereits von S. Boiteux, Fontenay-aux-Roses, Frankreich, mündlich berichtet. Das könnte zum einen eventuell daran liegen, dass Hautfibroblasten aufgrund ihrer geschützteren Lage in tieferen Hautschichten grundsätzlich eine geringere Aktivierung des „antioxidative responsive elements“ (ARE) aufweisen, wodurch weniger hOGG1 gebildet werden würde. Ein unterstützendes Indiz für diese Vermutung ist der Befund einer erhöhten Resistenz von Keratinocyten und Melanomzellen im Vergleich zu Hautfibroblasten gegenüber UV-Strahlung (Applegate et al., 1996; Otto et al., 1999; Sander et al., 2004; D'Errico et al., 2007). Eine andere Begründung könnte aber auch in den unterschiedlichen Zellvolumina von Hautfibroblasten und Melanomzellen und einem daraus resultierenden „Verdünnungseffekt“ für hOGG1 in den Gesamtproteinextrakten (jeweils 9,0 µg) liegen.

Ebenfalls von Interesse war die Frage, ob in Melanomzellen durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht und durch die dabei induzierten reaktiven Sauerstoffspezies die Aktivität des hOGG1-Proteins in Form einer adaptiven Antwort, ähnlich des Anstiegs des Glutathion-Spiegels nach Schadensinduktion durch sichtbares Licht in Melanomzellen (Abb. 5.3), gesteigert werden würde. Es konnte nämlich bereits vor einigen Jahren gezeigt werden, dass beispielsweise die Bildung von XPC-Protein

durch Schädigung der Zellen mit UV in einem p53-abhängigen Mechanismus deutlich induziert werden konnte. Auch für andere Faktoren der NER wie PCNA oder ERCC1 wurde eine schädigungsabhängige Induktion nachgewiesen (Amundson et al., 2000; Adimoolam and Ford, 2002). Andererseits wäre auch denkbar, daß das hOGG1-Protein durch die während der Bestrahlung induzierten ROS in seiner Struktur verändert und dadurch an Aktivität verlieren würde. Das nachfolgende Experiment machte jedoch deutlich, dass sich trotz Bestrahlung mit sichtbarem Licht die 8-oxoG-Glykosylaseaktivität auf gleichem Niveau bewegte wie bei unbestrahlten Zellen, somit weder eine adaptive Steigerung eines DNA-Reparaturproteins, noch eine Aktivitätsminderung durch Proteinzerstörung stattfand. Eine mögliche Erklärung für das Fehlen einer adaptiven Antwort der Zellen auf eine Bestrahlung mit sichtbarem Licht könnte auch der zu große Zeitbedarf einer Proteinneusynthese sein. Denn im Gegensatz zu den sehr lange in der DNA persistierenden CPDs ($t^{1/2} = 16 - 20$ h, siehe auch Abb. 5.31) werden hOGG1-sensitive DNA-Schäden in verhältnismäßig kurzer Zeit repariert ($t^{1/2} = 4 - 6$ h, siehe auch Abb. 5.23). Außerdem existiert in menschlichen Zellen normalerweise eine ausreichende Zahl an Proteinen der Basenexzisionsreparatur, um initial eine schnelle Schadensreversion zu gewährleisten (Cappelli et al., 2001).

6.2 Modulierung der Reparaturkapazität von Melanomzellen und Fibroblasten ...

Nachdem nun ersichtlich war, dass Melanomzellen und Hautfibroblasten desselben Patienten sich hinsichtlich ihrer Reparaturkapazität nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht nicht unterschieden, jedoch der intrazelluläre Glutathion-Spiegel in beiden Zellarten sehr sensibel und zudem grundlegend verschieden reagierte, sollte nun mit Hilfe diverser Substanzen (BSO, Diamid, DTT) und einem Photosensibilisator (Ro19-8022) die antioxidative Abwehr der Zellen durch Beeinflussung des Glutathion-Spiegels moduliert werden. Das Ziel der nachfolgenden Experimente war es herauszufinden, in wieweit die daraus resultierende Veränderungen die Reparaturkapazität beeinflussen würden.

Denn eine beeinträchtigte Reparaturkapazität würde das Risiko für Mutationen und somit eine maligne Entartung der Zellen drastisch erhöhen. Daher war es zum einen von großem Interesse, wie unterschiedliche Zellen (Melanomzellen und Hautfibroblasten) auf eine intrazelluläre Verschiebung der oxidativen Balance reagieren würden. Und zum anderen sollte untersucht werden, ob eine Veränderung des oxidativen Milieus innerhalb der Zelle auch Konsequenzen für die Funktion wichtiger Proteine – im speziellen für DNA-Reparaturproteine haben würde.

6.2.1 ... durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Kombination mit Photosensibilisator Ro19-8022

Wie bereits in 6.1.2 diskutiert wurde, konnten in den Melanomzellen und Hautfibroblasten nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht bereits nach 4 h 40 – 65 % der induzierten oxidativen DNA-Modifikationen repariert werden, was den Schluß zulässt, dass die Reparaturkapazität der Zellen durch die Zahl der induzierten DNA-Schäden keineswegs überlastet war. Aus diesem Grund sollte nun, wie nachfolgend beschrieben, eine möglichst hohe Anzahl oxidativer DNA-Modifikationen in Melanomzellen induziert werden, um eventuell auftretende Grenzen der DNA-Reparaturkapazität zwischenden beiden Zellarten auszuloten. Dazu wurden die Zellen mit sichtbarem Licht in Anwesenheit des Photosensibilisators Ro19-8022 (150 nm) bestrahlt (4.2.3.3.8). Nach 4 stündiger Reparaturphase im Brutschrank wurden die verbleibenden oxidativen DNA-Modifikationen mittels der Alkalischen Elution und Fpg-Protein ermittelt (4.2.3).

Aus Abb. 5.17 wird nun ersichtlich, dass durch Anregung des Photosensibilisators mit sichtbarem Licht zwar die 2,5 bis 4,4 fache Menge an oxidativen DNA-Modifikationen induziert werden konnte, die Melanomzellen aber allesamt in der Lage waren, diese sogar schneller zu reparieren (Abb. 5 18) als die zuvor durch „reines“ sichtbares Licht (ohne Photosensibilisator) verursachten DNA-Schäden. Dies ließ aufmerksam werden, da eigentlich seit längerem bekannt ist, dass sowohl sichtbares Licht als auch der Photosensibilisator Ro19-8022 hauptsächlich zur Entstehung von Singulett-Sauerstoff beiträgt (Pflaum et al., 1994; Will et al., 1999a), und demzufolge ein vergleichbares Ausmaß der DNA-Reparatur zu erwarten gewesen wäre. Eine mögliche Erklärung könnte darin bestehen, dass aufgrund der unterschiedlichen Photosensibilisatoren (endogen und exogen) zwar in beiden Fällen Singulett-Sauerstoff mit 8-oxoG als dominierender DNA-Modifikation generiert, aber ein etwas anderes „set“ an oxidativ empfindlichen Genen aktiviert wurde. In diesem Zusammenhang existieren in Bakterien bereits seit längerem Beobachtungen und Beweise, dass durch Singulett-Sauerstoff ein spezieller Transkriptionsfaktor OxyR aktiviert wird, welcher die Expression von Enzymen und Proteinen, die zur Bekämpfung des oxidativen Stresses benötigt werden, reguliert (Kim et al., 2002b). Es konnte zudem auch gezeigt werden, dass ein solches bakterielles Protein Säugerzellen protektiven Schutz gegen oxidativem Stress verlieh und auch endogen Superoxidanion-Radikal-Spiegel senkte (Kush and Sabapathy, 2001). Darüberhinaus existieren zudem in Bakterien Hinweise, dass durch die Induktion von verschiedenen Arten oxidativen Stresses, wie zum Beispiel Singulett-Sauerstoff oder Wasserstoffperoxid, auch für den jeweiligen oxidativen Stresstyp spezifische „Gen-Sets“ aktiviert werden. Während dieser Zeit können dann nicht benötigte „Gen-Sets“ ruhen, wohingegen benötigte ihrerseits stärker hochreguliert werden. Durch diesen

„cross-talk“ zwischen den unterschiedlichen Signalpathways sind Bakterien in der Lage, sich effektiver und auch „ressourcenschonender“ gegen spezielle Arten oxidativen Stresses gezielt zu wehren und robuster auf ihre Umwelt zu reagieren (Laloi et al., 2007). Eine andere sehr interessante Theorie wäre die, dass sichtbares Licht selbst bereits in der Lage wäre, in Melanomzellen die DNA-Reparatur zu verlangsamen (siehe M2IV/04, Abb. 5.18).

Abschließend kann resumiert werden, daß augenscheinlich die Menge an initial in den Zellen vorrätigen Reparaturproteinen hoch genug ist, so dass auch größere Mengen induzierter DNA-Modifikationen schnell beseitigt werden können (Cappelli et al., 2001). Demzufolge zeigt sich die Reparaturkapazität der Zellen unbeeindruckt von der Höhe des induzierten DNA-Schadens.

6.2.2 ... durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht (in Kombination mit Ro19-8022) nach Präinkubation mit BSO

Nachdem nun ersichtlich war, dass trotz massiver Induktion oxidativer DNA-Schäden die Reparaturkapazität der Zellen unverändert blieb, wurden die Zellen für 24 h mit BSO präinkubiert, um auf diese Weise das intrazelluläre Glutathion vollständig zu depletieren. Die Überlegung hinter diesem Versuchsdesign war die vollständige Entfernung einer der wichtigsten zellulären Stützen der antioxidativen Abwehr. Anschließend wurden die Glutathion-depletierten Zellen entweder mit oder ohne Ro19-8022-Zusatz mittels sichtbaren Lichts bestrahlt (4.2.3.3.2 und 4.2.3.3.4), für eine 4 stündige Reparaturphase in dem Brutschrank inkubiert und dann die verbliebenen DNA-Modifikationen mittels der Alkalischen Elution und Fpg-Protein bestimmt (4.2.3).

Die Ergebnisse aus Abb. 5.19 zeigten ein erstaunliches Ergebniss. Denn in den untersuchten Melanomzellen (M2/02) blieb trotz vollständiger Glutathion-Depletion (siehe auch Abb. 5.4) der Spiegel induzierter oxidativer DNA-Modifikationen auf gleichem Niveau wie in nichtdepletierten Zellen – sowohl in mit als auch ohne Photosensibilisator Ro19-8022 bestrahlten Zellen. Wohingegen sich die vergleichend mituntersuchten Mausembryofibroblasten (F11.1) gänzlich anders verhielten. In ihnen kommt es in beiden Fällen (mit und ohne Ro19-8022) und zusätzlicher Glutathion-Depletion zu einem deutlichen Anstieg induzierter DNA-Modifikationen. Dies kann einerseits mit dem bestehenden Speziesunterschied Mensch-Maus, andererseits aber auch mit einer in Melanompatienten eventuell veränderten Schadensinduktion erklärt werden. Um auszuschließen, dass es sich bei dieser Beobachtung nur um einen Einzelfall handelte, wurde mit einer größeren Anzahl Melanomzellen verschiedener Patienten und deren jeweils zugehörigen Hautfibroblasten das gleiche Experiment durchgeführt (Abb. 5.21 und Abb. 5.22).

Hieraus wird ersichtlich, dass die Melanomzellen anderer Patienten sich genauso verhalten, wie die Melanomzellen des Patienten M2/02. Zudem zeigten auch die Untersuchungen an den jeweils zugehörigen Hautfibroblasten den gleichen Effekt.

Ebenso überraschend waren auch die Reparaturdaten. Wurden die induzierten DNA-Schäden in den BSO-depletierten und in Gegenwart von Ro19-8022 mit Licht bestrahlten Melanomzellen (M2/02) genauso schnell repariert wie in den nichtdepletierten Zellen (siehe Abb. 5.20), so zeigte sich bei den BSO-vorbehandelten, ohne exogenen Photosensibilisator bestrahlten Zellen eine massive Hemmung der DNA-Reparatur (vergleiche Abb. 5.21 und Abb. 5.22). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die in Kapitel 6.2.1 bereits diskutierte Vermutung einer bereits durch sichtbares Licht ausgelösten DNA-Reparaturhemmung sein, die nun durch die Depletion von Glutathion ernsthaft zum Tragen kommt. Um dieses Phänomen über einen längeren Zeitraum (24 h) zu beobachten, wurden mit einem Zellpaar, bestehend aus den Melanomzellen (M2IV/04, siehe Abb. 5.23) und den Hautfibroblasten (FH11/04, siehe Abb. 5.24), Reparaturkinetiken durchgeführt. Sehr gut ist dabei zu erkennen, dass der beobachtete Effekt der Reparaturhemmung von längerer Dauer ist und selbst nach 24 h in den BSO-vorbehandelten Zellen erst 38 % (Melanomzellen, M2IV/04) bzw. 43 % (Fibroblasten, FH11/04) der induzierten DNA-Modifikationen repariert worden sind. Dieser Befund weist darauf hin, dass Glutathion für sämtliche untersuchten Zellen essentiell notwendig ist, um vor allem in den ersten Stunden nach Schadensinduktion eine schnell funktionierende Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen zu gewährleisten. Da es durch den Verlust von Glutathion vorstellbar wäre, dass die induzierten ROS nun ungehindert oxidationsempfindliche Strukturen in der Zelle angreifen, könnte eine mögliche Erklärung in der Oxidation der für die Reparatur oxidativer Modifikationen wichtiger Enzyme oder deren Cofaktoren liegen. Die nach 24 h langsam wieder einsetzende Reparatur oxidativer DNA-Schäden kann damit erklärt werden, dass in den BSO-behandelten Zellen kontinuierlich Proteinneusynthese stattfindet. Auf diese Weise kann die Zelle, solange kein erneuter oxidativer Stress auf sie einwirkt, die Reparatur modifizierter DNA-Basen langsam wieder aufnehmen.

6.2.3 ... durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht nach Vorbehandlung mit Diamid

Nachdem sich nun durch Präinkubation der Zellen mit BSO und nachfolgender Induktion von ROS herausgestellt hatte, dass die Aufrechterhaltung der Reparatur Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen scheinbar abhängig ist von oxidationsempfindlichen Faktoren innerhalb der Zelle und daß das antioxidative Potential von Glutathion dabei eine wichtige Rolle zu spielen scheint, sollte dieser Befund in dem

nachfolgenden Experiment verifiziert werden. Da es zudem hinlänglich bekannt ist, dass Diamid in der Lage ist, Sulfhydrylgruppen direkt zu oxidieren (2.8.3), sollten die Zellen mit Diamid inkubiert, nachfolgend bestrahlt und jene empfindliche Proteine auf diese Weise direkt oxidiert werden (4.2.3.3.11).

Die zwei Zellpaare, bestehend aus jeweils Melanomzellen und Hautfibroblasten desselben Patienten, zeigten sowohl hinsichtlich der Höhe der Schadensinduktion Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen (Abb. 5.25) als auch hinsichtlich der DNA-Reparaturkapazität (Abb. 5.26) jeweils die gleichen Ergebnisse wie zuvor nach Präinkubation der Zellen mit BSO (Abb. 5.21 und Abb. 5.22). Somit scheint tatsächlich die Oxidation eines oder mehrerer an der DNA-Reparatur beteiligten Proteine für den Verlust der Reparaturkapazität verantwortlich zu sein.

6.2.4 ... durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht (mit BSO oder Diamid) und anschließender DTT-Inkubation

Um die Theorie einer reversiblen Oxidation eines für die Reparaturkaskade oxidativer DNA-Modifikationen unerlässlichen Bausteins zu untermauern und zu verifizieren, wurden in dem folgenden Experiment Melanomzellen zweier verschiedener Patienten (M2IV/04 und M2/02) entweder mit BSO oder Diamid präinkubiert, mit sichtbarem Licht bestrahlt und anschließend während der Reparaturphase im Brutschrank mit DTT inkubiert.

Die Daten der DNA-Reparaturkapazität zeigten, dass durch Zusatz von DTT während der Reparaturphase der Zellen sowohl die durch BSO-Präinkubation als auch die durch Diamid-Vorbehandlung ursprünglich bestehende Reparaturhemmung vollständig wieder aufgehoben wird (Abb. 5.28). Somit kann von einer reversiblen Reaktion an bislang noch unbekanntem redoxempfindlichen Strukturen innerhalb der Zelle ausgegangen werden. Darüberhinaus kann im Fall der BSO-Vorbehandlung sogar eine raschere Reparatur als nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht ohne jeglichen Zusatz von Additiven beobachtet werden. Dieses Ergebnis lässt die Vermutung aufkommen, dass unter Umständen die alleinige Bestrahlung mit sichtbarem Licht schon zu einer Reparaturhemmung in Melanomzellen führen kann (Abb. 5.29). Aus diesem Grund wurden Melanomzellen (M2IV/04) und Hautfibroblasten (FH11/04) nur mit sichtbarem Licht bestrahlt und während der 4 stündigen Reparaturphase mit DTT inkubiert. Dies führte im Fall der Melanomzellen zu einer klaren Beschleunigung der Reparatur induzierter Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen. Dieser Effekt konnte allerdings in den Hautfibroblasten nicht beobachtet werden.

Demnach kann zusammenfassend gefolgert werden, dass zum einen durch Schwächung der zellulären antioxidativen Abwehr mittels Glutathion-Depletion

vermutlich wichtige Bestandteile der Reparaturkaskade oxidativer DNA-Modifikationen im Falle einer Bestrahlung „indirekt“ oxidiert werden, da die induzierten ROS von den Zellen nicht mehr oder nur noch eingeschränkt neutralisiert werden können. Zum anderen kommt es durch Inkubation der Zellen mit Diamid zu einer „direkten“ Oxidation eben jener noch unbekanntesten Bestandteile der DNA-Reparaturkaskade. Somit scheint die Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen sehr sensitiv auf Veränderungen der zellulären Redox-Balance zu reagieren. Ebenso deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Glutathion eventuell nicht nur eine reine Abwehrfunktion innerhalb der Zelle gegen oxidativen Stress auszuüben, sondern auch an der Regulation von DNA-Reparaturprozessen – zumindest indirekt – beteiligt zu sein scheint.

6.3 Untersuchung anderer DNA-Reparaturwege auf Beeinflussung durch Glutathion-Depletion und induzierte ROS

Nachdem nun bestätigt war, dass die Reparaturhemmung oxidativer DNA-Modifikationen auf einem oxidativen Prozeß innerhalb der Melanomzellen und Hautfibroblasten beruhte, sollte zunächst mit den nachfolgenden Experimenten untersucht werden, ob es sich hierbei um einen für die Basenexzisionsreparatur exklusiven Effekt handelte. Daher wurde besonders der Nukleotidexzisionsreparatur erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt, da lange bekannt ist, dass durch den UVB-Anteil des Sonnenlichts große Mengen an Cyclobutan-Pyrimidindimeren in den verschiedenen Hautzellen induziert werden können. Aus diesen DNA-Modifikationen können dann spezifische C→T Transitionen oder aber auch CC→TT Tandemmutationen entstehen. Für das Plattenepithelzellkarzinom wurden diese Mutationen spezifisch für das p53-Gen nachgewiesen (de Gruijl et al., 2001; Gigliamari and Sarasin, 2003), wohingegen für das Basalzellkarzinom Mutationen sowohl im p53-Gen als auch im PTCH-Gen gefunden wurden (Ratner et al., 2001; Zhang et al., 2001; Kim et al., 2002a). Zudem stellte sich vor wenigen Jahren heraus, dass durch Schädigung von humanen Hautfibroblasten mit UVA ebenfalls hauptsächlich Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPD) als dominierende Läsion induziert werden, was bereits in dem Schadensprofil (Abb. 5.9) gezeigt werden konnte (Besaratina et al., 2005; Cadet et al., 2005). Für das maligne Melanom konnten zwar Mutationen in Onkogenen (z.B. BRAF) oder Mutationen oder Deletionen in Tumorsuppressorgenen (z.B. CDKN2A) nachgewiesen werden. Jedoch ist bislang noch unklar welcher Wellenlängenbereich des Sonnenlichts für diese genetischen Veränderungen verantwortlich gemacht werden kann (Gray-Schopfer et al., 2007). Darüberhinaus existieren seit einiger Zeit Hinweise, dass neben sichtbarem Licht vor allem UVA-Strahlung einen erheblichen Einfluss auf die maligne Entartung von Melanozyten

haben soll (Setlow et al., 1993; Agar et al., 2004; Besaratinia et al., 2005). Ein weiterer wichtiger Grund für die Untersuchung der NER lag in der Entdeckung, dass XPC als ein Cofaktor in der BER agieren kann, indem er das „loading“ und den „turnover“ von hOGG1 steigert (D'Errico et al., 2006). Zum anderen fungiert die NER über Csb-Protein als back-up-Reparaturweg, selbst in nicht transkribierten Genen, falls es zu einem Ausfall des hOGG1-Proteins kommen sollte (Trapp et al., 2007). Diese Befunde werden auch durch neueste Beobachtungen hinsichtlich eines „cross-talk“ zwischen den Enzymen verschiedener DNA-Reparaturwege unterstützt, wodurch eine reparaturwegübergreifenden Kooperation stattfinden kann (Kovtun and McMurray, 2007). Desweiteren sollte auch die Reparatur von Einzelstrangbrüchen genauer untersucht werden, da diese einerseits als Reparaturintermediate der BER auftreten und daher auch durch Proteine der BER prozessiert werden (Masuda et al., 1998; Dianov et al., 2003). Andererseits können Einzelstrangbrüche auch während der Schädigung der Zellen durch ROS induziert werden (Caldecott, 2003b).

6.3.1 Untersuchung der Nukleotidexzisionsreparatur auf Beeinflussung durch Glutathion-Depletion und oxidativen Stress

Zur Überprüfung dieses Zusammenhangs wurden die Melanomzellen (M21V/04) und Hautfibroblasten (FH11/04) desselben Patienten nach dem gleichen Versuchdesign wie in den Experimenten zuvor für 24 h mit BSO präinkubiert und am Versuchstag mit sichtbarem Licht (das einen kleinen UV-Anteil enthält) bestrahlt.

Aus den Ergebnissen (Abb. 5.31) wird klar ersichtlich, dass trotz Glutathion-Depletion und nachfolgender ROS-Induktion keinerlei Hemmung der CPD-Reparatur zu erkennen ist, weder bei Melanomzellen noch bei Fibroblasten. Somit scheint bei dieser Art des DNA-Schadens (CPDs) oxidativer Stress und eine beeinträchtigte antioxidative Abwehr keinerlei Einfluss auf die Geschwindigkeit der DNA-Reparatur für CPDs innerhalb der NER zu haben. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Tatsache sein, dass gerade „bulky lesions“, zu denen auch die CPDs gehören, aufgrund eines möglichen Transkriptionsblocks besonders gefährlich sind für die Zelle. Wohingegen die Hemmung der BER und somit die Hemmung der Reparatur von 8-oxoG für die Zelle zwar ein erhöhtes prämutagenes Potential, aber keine Hemmung der Viabilität oder der Zellproliferation beinhaltet (siehe auch Abb. 5.7). Zudem liegen auch neuere Berichte vor, dass in menschlichen Zellen die RNAPolymerase II durch den „transcription elongation factor TFIIIS“ befähigt wird, über 8-oxoG-Läsionen hinweg zu synthetisieren (Kuraoka et al., 2007). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass, im Gegensatz zur Basenexzisionsreparatur, die Nukleotidexzisionsreparatur (GGR) durch CPDs

induzierbar ist. Dabei wird der Gehalt des für die Schadenserkenkung entscheidenden Proteins XPC innerhalb der folgenden 15 h mehr als verdoppelt (Marrot et al., 2005).

6.3.2 Untersuchung der Einzelstrangbruchreparatur auf Beeinflussung durch Glutathion-Depletion und oxidativen Stress

Anhand der Schadensprofile durch sichtbares Licht und UVA-Strahlung (Abb. 5.8 und Abb. 5.9) konnte zwar gezeigt werden, dass Einzelstrangbrüche (ssb) durch die bei diesen Versuchen verwendeten Strahlendosen in kaum messbarem Umfang induziert wurden. Trotzdem kann die Untersuchung der ssb-Reparatur in BSO-präinkubierten und mit sichtbarem Licht bestrahlten Melanomzellen Aufschluß auf eventuell durch oxidativen Stress in ihrer Funktion beeinträchtigte Proteine der BER geben. Denn sobald der Einzelstrangbruch durch PARP1 erkannt und dadurch XRCC1 aktiviert wurde, erfolgt die weitere Prozessierung des Schadens mit Proteinen der BER (Vidal et al., 2001a; Caldecott, 2003c; Nazarkina et al., 2007). Aus diesem Grund wurde in den Zellen, zusätzlich zur vorangegangenen BSO-Präinkubation und Induktion von oxidativem Stress, mittels H₂O₂ Einzelstrangbrüche (ssb) induziert (4.2.3.3.6).

Aus der Reparaturkinetik (Abb. 5.33) ist direkt ersichtlich, dass sowohl in den Zellen mit geschwächter antioxidativer Abwehr (Glutathion-depletiert) als auch in den Kontrollzellen keinerlei Unterschiede in der Reparaturgeschwindigkeit induzierter ssb zu erkennen ist. Demzufolge liegt in Melanomzellen und Hautfibroblasten ebenfalls keine Beeinträchtigung oder gar ein Funktionsverlust der an der Reparatur von ssb beteiligten Proteine (oder Cofaktoren), wie zum Beispiel PARP1, XRCC1, Ligase I, Ligase III oder Polß vor.

6.4 Untersuchung der Reparaturhemmung innerhalb der BER

Nachdem nun die vorangegangenen Untersuchungen (6.3) ergaben, dass die Nukleotidexzisionsreparatur und die Einzelstrangbruchreparatur von einer Glutathion-Depletion mit nachfolgender ROS-Induktion unbeeinflusst blieben, sollte sich in den folgenden Experimenten der Focus auf die Basenexzisionsreparatur (BER) und der daran beteiligten Proteine beschränken.

6.4.1 Untersuchung der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität von hOGG1 in Melanomzellen und Fibroblasten

Natürlich war es von größtem Interesse zu untersuchen, worin der für oxidative Basenmodifikationen spezifische Rückgang der DNA-Reparaturkapazität seinen Ursprung hatte. Daher sollte mittels des Cleavage-Assays (4.2.5) die 8-oxoG-Glykosylaseaktivität von hOGG1 in Melanomzellen und Hautfibroblasten überprüft werden. Die Überlegung zu diesem Experiment bestand darin, dass durch die Depletion von Glutathion induzierte ROS nicht mehr in vollem Umfang neutralisiert werden und somit ungehindert in dem Zellkern Proteine, allen voran hOGG1 oxidieren könnten (Kim et al., 2000). Diese wiederum würden dadurch in ihrer Funktion beeinträchtigt oder inaktiviert, so dass eine normale DNA-Reparatur nicht mehr gewährleistet wäre. Die andere Möglichkeit könnte darin bestehen, dass Glutathion eventuell selbst eine wichtige Rolle in der Regulation der Basenexzisionsreparatur spielt und durch dessen völligen Wegfall diese nicht mehr oder nur verlangsamt aktiviert werden würde.

Für die folgenden Experimente wurden daher exemplarisch in dem Zellpaar eines Patienten, bestehend aus Melanomzellen (M2IV/04) und Hautfibroblasten (FH11/04), eine vollständige Kinetik der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität von hOGG1 über 24 h erstellt (Abb. 5.36 und Abb. 5.37). Die Zellen wurden dabei wie schon zuvor mit BSO präinkubiert, am nächsten Tag mit sichtbarem Licht bestrahlt und nach verschiedenen langen Erholungsphasen für den Cleavage-Assay aufgearbeitet (4.2.5). Erstaunlicherweise tritt sowohl bei den Melanomzellen als auch bei den Hautfibroblasten die beobachtete Aktivitätsminderung nicht direkt nach Bestrahlung und somit augenblicklich mit Beginn der ROS-Induktion ein. Stattdessen setzt sie verhalten ein, um dann zwischen der 3. und 4. Stunde ihre maximale Hemmung zu erreichen. Dieser zeitliche Verlauf spricht eher gegen eine starke direkte Oxidation durch die bei der Bestrahlung erzeugten kurzlebigen ROS. Denn diese würde zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt einsetzen. Eine naheliegende Erklärung für die zeitlich verzögerte Abnahme der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität des hOGG1-Proteins könnte in einer Funktionsbeeinträchtigung des nachfolgenden Proteins der BER-Kaskade, dem APE1-Protein liegen. Bekanntermaßen ist es unter anderem für eine

Verdrängung von hOGG1 von der durch Entfernung von 8-oxoG entstandenen AP-Läsion verantwortlich, zu der dieses eine sehr hohe Affinität besitzt (Hill et al., 2001). Es konnte nachgewiesen werden, dass durch diesen Verdrängungsprozeß der „turnover“ von hOGG1 deutlich erhöht werden konnte, da hOGG1 weiter an den DNA-Strang gebunden blieb und diesen weiter nach 8-oxoG absuchen konnte (Vidal et al., 2001b; Sidorenko et al., 2007). Geschieht dies nicht, so kann es bis zu mehrere Stunden dauern, bis hOGG1 sich wieder von der DNA gelöst hat (Kuznetsov et al., 2005). Weitere Ursachen für eine Abnahme der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität von hOGG1 könnten eventuell in einer Phosphorylierung (Dantzer et al., 2002; Hu et al., 2005) oder Acetylierung (Bhakat et al., 2006) des Proteins mit daraus resultierender Aktivitätsabnahme liegen. Bislang konnte in beiden Fällen allerdings nur eine Aktivitätszunahme gezeigt werden, was aber eine gegensätzliche regulatorische Funktion dieser Proteinmodifikationen nicht ausschließt. Auch der Abbau des hOGG1-Proteins durch das Proteasom könnte eine mögliche Begründung für den beobachteten Verlust der 8-oxoG-Glykosylaseaktivität sein (Mary et al., 2004).

6.4.2 Untersuchungen zur Proteinoxidation von hOGG1 nach BSO-Präinkubation und Bestrahlung mit sichtbarem Licht

Daher wurde als nächster Schritt in dem folgenden Experiment die Frage geklärt, ob das hOGG1-Protein durch die induzierten ROS in irgendeiner Form oxidiert wird. Dazu wurden die Zellen, ebenso wie in den vorangegangenen Versuchen zuvor, mit BSO präinkubiert und anschließend mit sichtbarem Licht bestrahlt (4.2.3.3.4). Gesamtproteinextrakte der Zellen wurden sodann mittels des Western-Blots auf ihr hOGG1-Protein hin untersucht (4.2.11). Es wurde hierbei unter nichtreduzierenden Bedingungen gearbeitet (Laemli-Puffer ohne DTT), um bereits oxidierte hOGG1-Moleküle während der Aufarbeitung nicht zu reduzieren. Durch diese Abwandlung würden demzufolge durch eine Abnahme der Bande des Proteins oxidierte Proteinmoleküle „indirekt“ sichtbar gemacht werden können. Zu erkennen war jedoch, dass weder die BSO-Präinkubation, noch die alleinige Bestrahlung oder die Kombination aus BSO-Präinkubation und Bestrahlung den detektierten Proteingehalt während des beobachteten Zeitraums von 8 h veränderte (Abb. 5.38). Dies lässt den Schluß zu, dass es sich hierbei, wenn überhaupt, um keine sehr starke Proteinoxidation von hOGG1 durch ROS während der Bestrahlung mit sichtbarem Licht handeln kann. Ein weiteres Indiz hierfür ist auch, dass keine Abnahme der Bandenintensität der BSO-präinkubierten Ansätze über den gesamten Untersuchungszeitraum zu beobachten ist. Dies würde nämlich für einen Abbau eines oxidierten Proteins durch das Proteasom sprechen (Chang et al., 2000; Ullrich

and Grune, 2001). Nicht ganz auszuschließen ist allerdings eine eventuell schwache Oxidation einzelner sensibler funktioneller Gruppen an der Oberfläche des Proteins. Das unveränderte Laufverhalten der hOGG1-Proteine aus Glutathion-depletierten Ansätzen gegenüber nicht depletierten Ansätzen weist zudem auf keinerlei beeinträchtigende „Protein-cross-links“ hin. Denn es ist hinlänglich bekannt, dass durch die Oxidation von Aminosäureseitenketten die Sekundär- und Tertiärstruktur von Proteinen zerstört werden kann, wodurch verstärkt hydrophobe Oberflächen exponiert werden. Das kann zur Folge haben, dass mehrere geschädigte Proteine sich über diese Flächen nichtkovalent verbinden und sogenannte „Protein-cross-links“ bilden können (Grune et al., 1997; Merker and Grune, 2000).

6.4.3 Untersuchung der Funktionsfähigkeit des APE1-Proteins

Nachdem eine Proteinoxidation von hOGG1 wahrscheinlich ausgeschlossen werden kann, sollte überprüft werden, ob eventuell das in der BER-Kaskade nachfolgende Protein, APE1, für den Funktionsverlust von hOGG1 verantwortlich gemacht werden kann. Ein vorstellbares Szenario wäre, dass durch den induzierten oxidativen Stress in GSH-depletierten Zellen APE1 oxidiert und somit in seiner Funktion beeinträchtigt werden könnte. Infolgedessen bliebe hOGG1 stärker an sein Produkt, die AP-Läsion, gebunden, da APE1 nicht mehr in der Lage wäre, diese zu prozessieren, dabei hOGG1 freizusetzen und so dessen „turnover“ zu erhöhen. Denn es ist seit längerem bekannt, dass hOGG1 eine 8fach höhere Affinität zu seinem Produkt AP-Läsion (nach Entfernung von 8-oxoG) als zu 8-oxoG selbst besitzt (Hill et al., 2001; Vidal et al., 2001b; Sidorenko et al., 2007), wodurch es mehrere Stunden dauern kann, bis hOGG1 sich wieder von der DNA gelöst hat (Kuznetsov et al., 2005).

Aus diesem Grund wurden Melanomzellen (M21V/04) mit BSO präinkubiert, mit sichtbarem Licht bestrahlt und anschließend auf ihre APE1-Funktion hin untersucht (5.4.3). Es zeigten sich keinerlei Unterschiede in der Reparaturkinetik der AP-Läsionen zwischen BSO-vorbehandelten Zellen und Kontrollzellen (Abb. 5.40). Das lässt den Schluß zu, dass auch APE1 scheinbar nicht durch die induzierten ROS in seiner Funktion hinsichtlich der Reparatur von AP-Läsionen beeinträchtigt wurde. Denkbar wäre allerdings, dass die Verdrängung des hOGG1-Proteins von der AP-Läsion durch APE1 nicht mehr in vollem Umfang gewährleistet ist. Zumal Hinweise darüber existieren, dass diese beiden Funktionen (Verdrängung von hOGG1 und AP-Endonukleasefunktion) scheinbar unabhängig voneinander sind (Vidal et al., 2001b).

6.5 *Schlußfolgerung*

Grundsätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Glutathion-Depletion in Melanomzellen und Hautfibroblasten mit nachfolgender Induktion oxidativen Stresses durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht eine deutliche Hemmung der Basenexzisionsreparatur (BER) nach sich zieht (Abb. 5.23 und Abb. 5.24). Desweiteren bleiben die Nukleotidexzisionsreparatur (Abb. 5.31) und auch die Einzelstrangbruchreparatur (Abb. 5.33) davon unbehelligt.

Eine mögliche Erklärung könnte, wie bereits erwähnt, in einem zwar für die Reparatur von AP-Läsionen funktionierenden aber für die Erhöhung des hOGG1-„turnovers“ beeinträchtigten APE1-Proteins liegen. Andererseits könnte das hOGG1-Protein auch einer posttranslationalen Modifikation, wie zum Beispiel einer Ubiquitinylierung oder einer Sumoylierung unterzogen worden sein (Huen and Chen, 2008), wobei diese Form der zellulären Antwort auf oxidativen Stress eventuell in direktem Zusammenhang mit dem erst vor wenigen Monaten postulierten „crosstalk“ zwischen verschiedenen DNA-Reparaturwegen stehen könnte (Kovtun and McMurray, 2007). Eine dritte, äußerst reizvolle Theorie könnte eventuell in der Rolle des humanen ribosomalen 3S-Proteins während der DNA-Reparatur begründet sein. Seit langem ist zwar dessen Rolle in posttranslationalen Vorgängen der Proteinbiosynthese bekannt, doch erst vor wenigen Jahren wurde dessen mögliche Rolle in der Beeinflussung der DNA-Reparatur (BER) entdeckt. Zum einen konnte für hS3 eine wesentlich höhere Bindungsaffinität zu 7,8-Dihydro-8-oxo-guanin (8-oxoG) und AP-Läsionen in der DNA nachgewiesen werden als sie das hOGG1-Protein aufweist (Hegde et al., 2004; Kim et al., 2005), ohne dabei jedoch selbst Reparaturaktivität zu besitzen. Zum anderen zeigte auch der „knockdown“ von hS3 mit nachfolgender Schädigung der Zellen durch H₂O₂ und der daraus resultierenden deutlich gesteigerten Überlebensrate, dass hS3 mit der BER interagiert. Denn dadurch, dass hS3 nicht mehr in ausreichender Konzentration in der Zelle vorhanden war, konnte es nicht mehr verhindern, dass hOGG1 an sein Substrat gelangte und die DNA-Schäden reparierte (Hegde et al., 2007). Somit scheint hS3 ein „indirekter“ Inhibitor von hOGG1 und demzufolge der BER zu sein. Darüberhinaus bieten neueste Ergebnisse eventuell eine Verbindung zwischen oxidativem Stress und der Aktivierung von hS3 über seinen Threoninrest (T42) mittels einer Phosphorylierung durch ERK1/2 (Yadavilli et al., 2007). Denn seit längerem ist bekannt, dass H₂O₂ die „extracellular signal-regulated kinase“ (ERK) 1/2 aktivieren kann, wobei Protein-Tyrosinkinase (PTKs) in der Signalkaskade wahrscheinlich eine wichtige Rolle zukommt (Mehdi et al., 2007). Zudem existieren seit einiger Zeit Hinweise, dass ERK in bis zu 90 % der humanen Melanomzellen hyperaktiviert ist (Cohen et al., 2002; Gray-Schopfer et al., 2007). Dies hat eine Translokation von hS3 in den Zellkern und eine Kolokalisation mit 8-oxoG-Foci zur Folge (Yadavilli et al., 2007). Auch für

hOGG1 konnte kürzlich eine aktive Rekrutierung zu 8-oxoG-Foci innerhalb des Zellkerns nachgewiesen werden, die ihrerseits mit „nuclear speckles“ kolokalisiert waren (Campalans et al., 2007). Dies lässt vermuten, dass auch hS3 in eben diese „nuclear speckles“ geleitet wird und dort 8-oxoG-Läsionen mit hoher Affinität blockiert.

Betrachtet man nun in diesem Zusammenhang die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit, so scheint es durchaus im Rahmen des Möglichen, dass der nachgewiesene Aktivitätsverlust des hOGG1-Proteins in direktem Zusammenhang mit hS3-Protein stehen könnte. Denn grundsätzlich ist der induzierte und durch Glutathion-Depletion noch zusätzlich verstärkte oxidative Stress (ROS) in der Lage, zelluläre Strukturen und Moleküle zu oxidieren. So könnte beispielsweise eine Signalkaskade aktiviert werden, an deren Ende ERK1/2 hS3 an seinem Threoninrest (T42) phosphoryliert und somit aktiviert, woraufhin dann dessen Translokation in den Zellkern zu den hOGG1-sensitiven Läsionen stattfindet. Die Bindung an die DNA-Schäden und somit stattfindende Blockade ihrer Reparatur könnte sich letztendlich in einer langsam fortschreitenden Aktivitätsabnahme von hOGG1 äußern (siehe Abb. 5.36 und Abb. 5.37).

7 ZUSAMMENFASSUNG

Der menschliche Organismus ist tagtäglich der energiereichen Strahlung der Sonne ausgesetzt, wobei im UVB-Bereich hauptsächlich Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPDs), im UVA- und sichtbaren Bereich eher die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Vordergrund stehen. Werden ROS über das „Normalmaß“ hinaus in den verschiedenen Hautzellen induziert, spricht man von oxidativem Stress, der unter anderem zu vermehrten oxidativen DNA-Schäden führt. Aus diesem Grund obliegt dem Zusammenspiel der antioxidativen Abwehr und der DNA-Reparatur die äußerst wichtige Aufgabe der Neutralisation oder gegebenenfalls der Reparatur dieser Schäden. Für zwei der drei wichtigsten Hautkrebsarten, dem Basalzellkarzinom und dem Plattenepithelzellkarzinom, konnte bislang ein direkter Zusammenhang zwischen Sonnenlichtexposition (UVB-Strahlung), Induktion oxidativer Basenmodifikationen (Cyclobutan-Pyrimidindimere, CPDs) und Entstehung des Hautkrebses durch Mutationen in Tumorsuppressorgenen nachgewiesen werden. Für den gefährlichsten und aggressivsten Hautkrebs hingegen, dem malignen Melanom, existieren bislang äußerst wenige Erkenntnisse und Vermutungen hinsichtlich seines Entstehungsmechanismus. Da sich in den letzten Jahren der Verdacht immer weiter verhärtet hat, dass als ursächliche Wellenlänge bzw. Wellenlängenbereich jene des sichtbaren Lichts (VIS) und der UVA-Strahlung in Frage kommen könnten, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, welches Ausmaß an DNA-Schäden in Melanomzellen und Hautfibroblasten desselben Patienten nach Bestrahlung mit oben genannten Strahlenarten induziert werden kann. Zudem sollte mit Hilfe der Alkalischen Elution und der Kombination verschiedener DNA-Reparaturenzyme die Reparatur dieser DNA-Modifikationen ermittelt werden.

Für beide Zellarten konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die dominierenden DNA-Läsionen im Falle einer Bestrahlung mit sichtbarem Licht (400 – 800 nm) Fpg-sensitive Läsionen, zu denen die Basenmodifikation 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG) gehört, und im Falle der UVA-Bestrahlung Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPDs) sind. Sowohl Melanomzellen als auch Hautfibroblasten waren problemlos in der Lage, die durch sichtbares Licht und UVA-Strahlung induzierten oxidativen DNA-Modifikationen zu reparieren. Ebenfalls zeigten sämtliche Gesamtproteinextrakte der untersuchten Zellen 8-oxoG-Glykosylaseaktivität, wobei die Glykosylaseaktivitäten der Hautfibroblasten unter denen der Melanomzellen lagen. Demnach reagieren unter „normalen“ Bestrahlungsbedingungen Melanomzellen und Hautfibroblasten hinsichtlich der DNA-Schadensinduktion und der DNA-Reparaturgeschwindigkeit gleich. Allerdings zeigten sich in den nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht untersuchten Glutathion-Spiegeln dramatische Unterschiede zwischen den beiden Zellarten. Denn die Melanomzellen erhöhten

ihren GSH-Gehalt innerhalb von 10 – 14 Stunden nach Bestrahlung in einer Art adaptiven Antwort auf ein Maximum, wohingegen die Hautfibroblasten einen massiven Einbruch direkt nach Bestrahlung und eine extrem lange Erholungsphase über 48 h aufzuweisen hatten.

Die Untersuchung der DNA-Reparaturkapazität der Zellen unter Bedingungen von oxidativem Stress brachte nun sehr interessante Ergebnisse hervor. Es zeigte sich nämlich bei vorangegangener Depletion intrazellulären Glutathions eine dramatische, nahezu vollständige Hemmung der Reparatur durch UVA- bzw. Sonnenlicht-induzierter Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen (8-oxoG) - sowohl in Melanomzellen als auch in Hautfibroblasten. Dieser Effekt ließ sich durch den Zusatz von Dithiothreitol (DTT), nach erfolgter Bestrahlung der Glutathion-depletierten Zellen, wieder komplett revertieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass an der Reparatur ein redoxempfindliches Protein oder zellulärer Cofaktor beteiligt sein muß.

Um zu überprüfen, ob es sich hierbei um einen für die Basenexzisionsreparatur (BER) von 7,8-Dihydro-8-oxo-guanin (8-oxoG) exklusiven Effekt handelte oder ob auch andere wichtige Reparaturwege ähnlich empfindlich reagieren, wurden die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) und die Einzelstrangbruchreparatur unter denselben Bedingungen auf ihre Geschwindigkeit hin untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass diese beiden Reparaturwege in keinsten Weise durch eine Glutathion-Depletion eine Beeinträchtigung erfuhren. Somit handelt es sich bei der Reparaturhemmung von 8-oxoG nach vorheriger Glutathion-Depletion und nachfolgender Bestrahlung mit Sonnenlicht um ein für die BER exklusives Phänomen.

Zwei der wichtigsten Reparaturproteine der BER nämlich hOGG1 und APE1, wurden auf ihre Funktionsfähigkeit hin untersucht, da es naheliegend war, dass der Reparaturhemmung ein Funktionsverlust eines dieser beiden Enzyme zugrunde liegen könnte. Im Falle des APE1-Proteins konnte dies ausgeschlossen werden, da mit Hilfe der Alkalischen Elution die volle Funktionsfähigkeit für die Reparatur von AP-Läsionen nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise zeigte aber das hOGG1-Protein eine zwischen der dritten und vierten Stunde nach Bestrahlung Glutathion-depletierter Zellen stark abfallende Aktivität der 8-oxoG-Glykosylasefunktion. Die Western-Blot-Analyse ergab allerdings keinen Hinweis auf eine Proteinoxidation von hOGG1. Möglicherweise wird nicht hOGG1 selbst, wohl aber ein anderes, für eine konzertierte Abfolge der einzelnen Reparaturschritte entscheidend notwendiges Protein innerhalb der Zelle durch ROS leicht oxidiert.

In jedem Fall bleibt festzustellen, dass Glutathion eine wichtige Aufgabe hinsichtlich einer voll funktionsfähigen Basenexzisionsreparatur zuzukommen scheint. Die Ergebnisse unterstreichen die mögliche Bedeutung von oxidativem Stress für die Entstehung von Krebs durch Sonnenlicht, insbesondere durch UVA, da die durch die

Strahlung (und eventuell auftretende Entzündung) gebildeten ROS nicht nur DNA-Schäden induzieren, sondern auch ihre Reparatur verhindern können.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- Abdel-Malek, Z., Suzuki, I., Tada, A., Im, S. and Akcali, C.: The melanocortin-1 receptor and human pigmentation. *Ann N Y Acad Sci* 885 (1999) 117-33.
- Adimoolam, S. and Ford, J.M.: p53 and DNA damage-inducible expression of the xeroderma pigmentosum group C gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 12985-90.
- Agar, N.S., Halliday, G.M., Barnetson, R.S., Ananthaswamy, H.N., Wheeler, M. and Jones, A.M.: The basal layer in human squamous tumors harbors more UVA than UVB fingerprint mutations: a role for UVA in human skin carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 4954-9.
- Akbari, M., Otterlei, M., Pena-Diaz, J., Aas, P.A., Kavli, B., Liabakk, N.B., Hagen, L., Imai, K., Durandy, A., Slupphaug, G. and Krokan, H.E.: Repair of U/G and U/A in DNA by UNG2-associated repair complexes takes place predominantly by short-patch repair both in proliferating and growth-arrested cells. *Nucleic Acids Res* 32 (2004) 5486-98.
- Amundson, S.A., Do, K.T., Shahab, S., Bittner, M., Meltzer, P., Trent, J. and Fornace, A.J., Jr.: Identification of potential mRNA biomarkers in peripheral blood lymphocytes for human exposure to ionizing radiation. *Radiat Res* 154 (2000) 342-6.
- Anderson, M.E.: Glutathione and glutathione delivery compounds. *Adv Pharmacol* 38 (1997) 65-78.
- Anderson, M.E.: Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chem Biol Interact* 111-112 (1998) 1-14.
- Applegate, L.A., Scaletta, C., Labidi, F., Vile, G.F. and Frenk, E.: Susceptibility of human melanoma cells to oxidative stress including UVA radiation. *Int J Cancer* 67 (1996) 430-4.
- Aruoma, O.I., Kaur, H. and Halliwell, B.: Oxygen free radicals and human diseases. *J R Soc Health* 111 (1991) 172-7.
- Asagoshi, K., Yamada, T., Okada, Y., Terato, H., Ohyama, Y., Seki, S. and Ide, H.: Recognition of formamidopyrimidine by *Escherichia coli* and mammalian thymine glycol glycosylases. Distinctive paired base effects and biological and mechanistic implications. *J Biol Chem* 275 (2000a) 24781-6.
- Asagoshi, K., Yamada, T., Terato, H., Ohyama, Y., Monden, Y., Arai, T., Nishimura, S., Aburatani, H., Lindahl, T. and Ide, H.: Distinct repair activities of human 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase and formamidopyrimidine DNA glycosylase for formamidopyrimidine and 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *J Biol Chem* 275 (2000b) 4956-64.

- Baeuerle, P.A., Rupec, R.A. and Pahl, H.L.: Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. *Pathol Biol (Paris)* 44 (1996) 29-35.
- Bailly, V. and Verly, W.G.: AP endonucleases and AP lyases. *Nucleic Acids Res* 17 (1989) 3617-8.
- Bailly, V., Verly, W.G., O'Connor, T. and Laval, J.: Mechanism of DNA strand nicking at apurinic/apyrimidinic sites by *Escherichia coli* [formamidopyrimidine]DNA glycosylase. *Biochem J* 262 (1989) 581-9.
- Ballmaier, D.: Oxidative DNA-Modifikationen durch extrazellulär und intrazellulär gebildete reaktive Sauerstoffspezies., Institut für Pharmakologie und Toxikologie. Universität Würzburg, Würzburg, 1997.
- Bartsch, H. and Nair, J.: New DNA-based biomarkers for oxidative stress and cancer chemoprevention studies. *Eur J Cancer* 36 (2000) 1229-34.
- Barzilay, G., Mol, C.D., Robson, C.N., Walker, L.J., Cunningham, R.P., Tainer, J.A. and Hickson, I.D.: Identification of critical active-site residues in the multifunctional human DNA repair enzyme HAP1. *Nat Struct Biol* 2 (1995a) 561-8.
- Barzilay, G., Walker, L.J., Robson, C.N. and Hickson, I.D.: Site-directed mutagenesis of the human DNA repair enzyme HAP1: identification of residues important for AP endonuclease and RNase H activity. *Nucleic Acids Res* 23 (1995b) 1544-50.
- Beckman, K.B. and Ames, B.N.: Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 272 (1997) 19633-6.
- Benlloch, M., Mena, S., Ferrer, P., Obrador, E., Asensi, M., Pellicer, J.A., Carretero, J., Ortega, A. and Estrela, J.M.: Bcl-2 and Mn-SOD antisense oligodeoxynucleotides and a glutamine-enriched diet facilitate elimination of highly resistant B16 melanoma cells by tumor necrosis factor-alpha and chemotherapy. *J Biol Chem* 281 (2006) 69-79.
- Bercht, M., Flohr-Beckhaus, C., Osterod, M., Runger, T.M., Radicella, J.P. and Epe, B.: Is the repair of oxidative DNA base modifications inducible by a preceding DNA damage induction? *DNA Repair (Amst)* 6 (2007) 367-73.
- Besaratinia, A., Synold, T.W., Chen, H.H., Chang, C., Xi, B., Riggs, A.D. and Pfeifer, G.P.: DNA lesions induced by UV A1 and B radiation in human cells: comparative analyses in the overall genome and in the p53 tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005) 10058-63.
- Bessho, T., Roy, R., Yamamoto, K., Kasai, H., Nishimura, S., Tano, K. and Mitra, S.: Repair of 8-hydroxyguanine in DNA by mammalian N-methylpurine-DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 8901-4.
- Bhakat, K.K., Mokkalapati, S.K., Boldogh, I., Hazra, T.K. and Mitra, S.: Acetylation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by p300 and its role in 8-oxoguanine repair in vivo. *Mol Cell Biol* 26 (2006) 1654-65.

- Bhatia, P.K., Wang, Z. and Friedberg, E.C.: DNA repair and transcription. *Curr Opin Genet Dev* 6 (1996) 146-50.
- BMBF: *Krebserkrankungen*, 2007.
- Bogliolo, M., Cappelli, E., D'Ossualdo, A., Rossi, O., Barbieri, O., Kelley, M.R. and Frosina, G.: Effect of *S. cerevisiae* APN1 protein on mammalian DNA base excision repair. *Anticancer Res* 22 (2002) 2797-804.
- Boiteux, S., Gajewski, E., Laval, J. and Dizdaroglu, M.: Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochemistry* 31 (1992) 106-10.
- Boiteux, S. and Guillet, M.: Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* 3 (2004) 1-12.
- Boiteux, S., O'Connor, T.R. and Laval, J.: Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli*: cloning and sequencing of the fpg structural gene and overproduction of the protein. *Embo J* 6 (1987) 3177-83.
- Boiteux, S., O'Connor, T.R., Lederer, F., Gouyette, A. and Laval, J.: Homogeneous *Escherichia coli* FPG protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/aprimidinic sites. *J Biol Chem* 265 (1990) 3916-22.
- Boiteux, S. and Radicella, J.P.: Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie* 81 (1999) 59-67.
- Boiteux, S. and Radicella, J.P.: The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 377 (2000) 1-8.
- Borden, A., O'Grady, P.I., Vandewiele, D., Fernandez de Henestrosa, A.R., Lawrence, C.W. and Woodgate, R.: *Escherichia coli* DNA polymerase III can replicate efficiently past a T-T cis-syn cyclobutane dimer if DNA polymerase V and the 3' to 5' exonuclease proofreading function encoded by dnaQ are inactivated. *J Bacteriol* 184 (2002) 2674-81.
- Cadet, J., Anselmino, C., Douki, T. and Voituriez, L.: Photochemistry of nucleic acids in cells. *J Photochem Photobiol B* 15 (1992) 277-98.
- Cadet, J., Bellon, S., Berger, M., Bourdat, A.G., Douki, T., Duarte, V., Frelon, S., Gasparutto, D., Muller, E., Ravanat, J.L. and Sauvaigo, S.: Recent aspects of oxidative DNA damage: guanine lesions, measurement and substrate specificity of DNA repair glycosylases. *Biol Chem* 383 (2002) 933-43.
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., Morin, B., Raoul, S., Ravanat, J.L. and Spinelli, S.: Effects of UV and visible radiation on DNA-final base damage. *Biol Chem* 378 (1997) 1275-86.

- Cadet, J., Bourdat, A.G., D'Ham, C., Duarte, V., Gasparutto, D., Romieu, A. and Ravanat, J.L.: Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. *Mutat Res* 462 (2000) 121-8.
- Cadet, J., Douki, T., Gasparutto, D. and Ravanat, J.L.: Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat Res* 531 (2003) 5-23.
- Cadet, J., Sage, E. and Douki, T.: Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutat Res* 571 (2005) 3-17.
- Caldecott, K.W.: Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. *Bioessays* 23 (2001) 447-55.
- Caldecott, K.W.: DNA single-strand break repair and spinocerebellar ataxia. *Cell* 112 (2003a) 7-10.
- Caldecott, K.W.: Protein-protein interactions during mammalian DNA single-strand break repair. *Biochem Soc Trans* 31 (2003b) 247-51.
- Caldecott, K.W.: XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 2 (2003c) 955-69.
- Caldecott, K.W.: Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin. *DNA Repair (Amst)* 6 (2007) 443-53.
- Campalans, A., Amouroux, R., Bravard, A., Epe, B. and Radicella, J.P.: UVA irradiation induces relocalisation of the DNA repair protein hOGG1 to nuclear speckles. *J Cell Sci* 120 (2007) 23-32.
- Cappelli, E., Hazra, T., Hill, J.W., Slupphaug, G., Bogliolo, M. and Frosina, G.: Rates of base excision repair are not solely dependent on levels of initiating enzymes. *Carcinogenesis* 22 (2001) 387-93.
- Chang, T.C., Chou, W.Y. and Chang, G.G.: Protein oxidation and turnover. *J Biomed Sci* 7 (2000) 357-63.
- Chubatsu, L.S., Gennari, M. and Meneghini, R.: Glutathione is the antioxidant responsible for resistance to oxidative stress in V79 Chinese hamster fibroblasts rendered resistant to cadmium. *Chem Biol Interact* 82 (1992) 99-110.
- Churchill, M.E., Peak, J.G. and Peak, M.J.: Correlation between cell survival and DNA single-strand break repair proficiency in the Chinese hamster ovary cell lines AA8 and EM9 irradiated with 365-nm ultraviolet-A radiation. *Photochem Photobiol* 53 (1991a) 229-36.
- Churchill, M.E., Peak, J.G. and Peak, M.J.: Repair of near-visible- and blue-light-induced DNA single-strand breaks by the CHO cell lines AA8 and EM9. *Photochem Photobiol* 54 (1991b) 639-44.
- Cleaver, J.E. and Crowley, E.: UV damage, DNA repair and skin carcinogenesis. *Front Biosci* 7 (2002) d1024-43.

- Cohen, C., Zavala-Pompa, A., Sequeira, J.H., Shoji, M., Sexton, D.G., Cotsonis, G., Cerimele, F., Govindarajan, B., Macaron, N. and Arbiser, J.L.: Mitogen-activated protein kinase activation is an early event in melanoma progression. *Clin Cancer Res* 8 (2002) 3728-33.
- Collins, A.R.: Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* 21 (1999) 238-46.
- Coste, F., Ober, M., Carell, T., Boiteux, S., Zelwer, C. and Castaing, B.: Structural basis for the recognition of the FapydG lesion (2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine) by formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *J Biol Chem* 279 (2004) 44074-83.
- D'Errico, M., Lemma, T., Calcagnile, A., Proietti De Santis, L. and Dogliotti, E.: Cell type and DNA damage specific response of human skin cells to environmental agents. *Mutat Res* 614 (2007) 37-47.
- D'Errico, M., Parlanti, E., Teson, M., de Jesus, B.M., Degan, P., Calcagnile, A., Jaruga, P., Bjoras, M., Crescenzi, M., Pedrini, A.M., Egly, J.M., Zambruno, G., Stefanini, M., Dizdaroglu, M. and Dogliotti, E.: New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. *Embo J* 25 (2006) 4305-15.
- D'Ham, C., Romieu, A., Jaquinod, M., Gasparutto, D. and Cadet, J.: Excision of 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine, 5,6-dihydrothymine, and 5-hydroxycytosine from defined sequence oligonucleotides by *Escherichia coli* endonuclease III and Fpg proteins: kinetic and mechanistic aspects. *Biochemistry* 38 (1999) 3335-44.
- Dantzer, F., Luna, L., Bjoras, M. and Seeberg, E.: Human OGG1 undergoes serine phosphorylation and associates with the nuclear matrix and mitotic chromatin in vivo. *Nucleic Acids Res* 30 (2002) 2349-57.
- de Gruijl, F.R., van Kranen, H.J. and Mullenders, L.H.: UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J Photochem Photobiol B* 63 (2001) 19-27.
- Demple, B. and DeMott, M.S.: Dynamics and diversions in base excision DNA repair of oxidized abasic lesions. *Oncogene* 21 (2002) 8926-34.
- Devasagayam, T.P., Steenken, S., Obendorf, M.S., Schulz, W.A. and Sies, H.: Formation of 8-hydroxy(deoxy)guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. *Biochemistry* 30 (1991) 6283-9.
- Dherin, C., Radicella, J.P., Dizdaroglu, M. and Boiteux, S.: Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human alpha-hOgg1 protein and the polymorphic alpha-hOgg1(Ser326Cys) protein which is frequently found in human populations. *Nucleic Acids Res* 27 (1999) 4001-7.
- Dianov, G.L., Sleeth, K.M., Dianova, II and Allinson, S.L.: Repair of abasic sites in DNA. *Mutat Res* 531 (2003) 157-63.

- Dizdaroglu, M.: Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res* 275 (1992) 331-42.
- Drouin, R. and Therrien, J.P.: UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimer frequency correlates with skin cancer mutational hotspots in p53. *Photochem Photobiol* 66 (1997) 719-26.
- Duncan, T., Trewick, S.C., Koivisto, P., Bates, P.A., Lindahl, T. and Sedgwick, B.: Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 16660-5.
- Eller, M.S., Yaar, M. and Gilchrest, B.A.: DNA damage and melanogenesis. *Nature* 372 (1994) 413-4.
- Epe, B.: Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem Biol Interact* 80 (1991) 239-60.
- Epe, B.: DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 127 (1996) 223-49.
- Epe, B.: Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice? *Biol Chem* 383 (2002) 467-75.
- Epe, B., Ballmaier, D., Roussyn, I., Briviba, K. and Sies, H.: DNA damage by peroxynitrite characterized with DNA repair enzymes. *Nucleic Acids Res* 24 (1996) 4105-10.
- Epe, B., Haring, M., Ramaiah, D., Stopper, H., Abou-Elzahab, M.M., Adam, W. and Saha-Moller, C.R.: DNA damage induced by furocoumarin hydroperoxides plus UV (360 nm). *Carcinogenesis* 14 (1993a) 2271-6.
- Epe, B. and Hegler, J.: Oxidative DNA damage: endonuclease fingerprinting. *Methods Enzymol* 234 (1994) 122-31.
- Epe, B., Hegler, J. and Wild, D.: Singlet oxygen as an ultimately reactive species in *Salmonella typhimurium* DNA damage induced by methylene blue/visible light. *Carcinogenesis* 10 (1989) 2019-24.
- Epe, B., Pflaum, M. and Boiteux, S.: DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems. *Mutat Res* 299 (1993b) 135-45.
- Epe, B., Pflaum, M., Haring, M., Hegler, J. and Rudiger, H.: Use of repair endonucleases to characterize DNA damage induced by reactive oxygen species in cellular and cell-free systems. *Toxicol Lett* 67 (1993c) 57-72.
- Epp, O., Ladenstein, R. and Wendel, A.: The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *Eur J Biochem* 133 (1983) 51-69.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H. and Jurgens, G.: The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 13 (1992) 341-90.

- Feher, J., Blazovics, A., Somogyi, A. and Lengyel, G.: [The role of oxidative stress and the preventive effect of free radical scavengers in arteriosclerosis]. *Orv Hetil* 138 (1997) 2283-7.
- Flohe, L.: The glutathione peroxidase reaction: molecular basis of the antioxidant function of selenium in mammals. *Curr Top Cell Regul* 27 (1985) 473-8.
- Flohe, L.: Glutathione peroxidase. *Basic Life Sci* 49 (1988) 663-8.
- Flohe, L., Gunzler, W.A. and Schock, H.H.: Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett* 32 (1973) 132-4.
- Flohr, C.: Untersuchungen zur Beeinflussung der Reparatur oxidativer DNA-Schäden durch Poly(ADP-Ribose)-Polymerase, AP-Endonuklease 1 und das Xeroderma pigmentosum A Protein, *Pharmakologie. Johannes-Gutenberg, Mainz, 2003.*, 2003.
- Floyd, R.A.: The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11 (1990) 1447-50.
- Fridovich, I.: Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* 64 (1995) 97-112.
- Friedberg, E.C.: Relationships between DNA repair and transcription. *Annu Rev Biochem* 65 (1996) 15-42.
- Gary, R., Kim, K., Cornelius, H.L., Park, M.S. and Matsumoto, Y.: Proliferating cell nuclear antigen facilitates excision in long-patch base excision repair. *J Biol Chem* 274 (1999a) 4354-63.
- Gary, R., Park, M.S., Nolan, J.P., Cornelius, H.L., Kozyreva, O.G., Tran, H.T., Lobachev, K.S., Resnick, M.A. and Gordenin, D.A.: A novel role in DNA metabolism for the binding of Fen1/Rad27 to PCNA and implications for genetic risk. *Mol Cell Biol* 19 (1999b) 5373-82.
- Giglia-Mari, G. and Sarasin, A.: TP53 mutations in human skin cancers. *Hum Mutat* 21 (2003) 217-28.
- Girard, P.M. and Boiteux, S.: Repair of oxidized DNA bases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimie* 79 (1997) 559-66.
- Girard, P.M., Guibourt, N. and Boiteux, S.: The Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: a 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase/AP lyase whose lysine 241 is a critical residue for catalytic activity. *Nucleic Acids Res* 25 (1997) 3204-11.
- Graves, R.J., Felzenszwalb, I., Laval, J. and O'Connor, T.R.: Excision of 5'-terminal deoxyribose phosphate from damaged DNA is catalyzed by the Fpg protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 267 (1992) 14429-35.
- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C. and Marais, R.: Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445 (2007) 851-7.

- Griffith, O.W. and Meister, A.: Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem* 254 (1979) 7558-60.
- Griffith, O.W. and Meister, A.: Origin and turnover of mitochondrial glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (1985) 4668-72.
- Gros, L., Sapparbaev, M.K. and Laval, J.: Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. *Oncogene* 21 (2002) 8905-25.
- Grune, T., Reinheckel, T. and Davies, K.J.: Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *Faseb J* 11 (1997) 526-34.
- Gutteridge, J.M.: Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chem Biol Interact* 91 (1994) 133-40.
- Halliwell, B.: Mechanisms involved in the generation of free radicals. *Pathol Biol (Paris)* 44 (1996) 6-13.
- Halliwell, B. and Aruoma, O.I.: DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281 (1991) 9-19.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.: Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage, and antioxidant therapy. *Lancet* 1 (1984a) 1396-7.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.: Role of iron in oxygen radical reactions. *Methods Enzymol* 105 (1984b) 47-56.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.: The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 280 (1990) 1-8.
- Harkin, L.A. and Burcham, P.C.: Formation of novel C1-oxidised abasic sites in alkylperoxyl radical-damaged plasmid DNA. *Biochem Biophys Res Commun* 237 (1997) 1-5.
- Hegde, V., Wang, M. and Deutsch, W.A.: Human ribosomal protein S3 interacts with DNA base excision repair proteins hAPE/Ref-1 and hOGG1. *Biochemistry* 43 (2004) 14211-7.
- Hegde, V., Yadavilli, S. and Deutsch, W.A.: Knockdown of ribosomal protein S3 protects human cells from genotoxic stress. *DNA Repair (Amst)* 6 (2007) 94-9.
- Hegler, J., Bittner, D., Boiteux, S. and Epe, B.: Quantification of oxidative DNA modifications in mitochondria. *Carcinogenesis* 14 (1993) 2309-12.
- Hill, J.W., Hazra, T.K., Izumi, T. and Mitra, S.: Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair. *Nucleic Acids Res* 29 (2001) 430-8.
- Hiraku, Y., Ito, K., Hirakawa, K. and Kawanishi, S.: Photosensitized DNA damage and its protection via a novel mechanism. *Photochem Photobiol* 83 (2007) 205-12.

- Hoffmann-Dorr, S., Greinert, R., Volkmer, B. and Epe, B.: Visible light (>395 nm) causes micronuclei formation in mammalian cells without generation of cyclobutane pyrimidine dimers. *Mutat Res* 572 (2005) 142-9.
- Hu, J., Imam, S.Z., Hashiguchi, K., de Souza-Pinto, N.C. and Bohr, V.A.: Phosphorylation of human oxoguanine DNA glycosylase (alpha-OGG1) modulates its function. *Nucleic Acids Res* 33 (2005) 3271-82.
- Huen, M.S. and Chen, J.: The DNA damage response pathways: at the crossroad of protein modifications. *Cell Res* 18 (2008) 8-16.
- Huttermann, J.: Solid-state radiation chemistry of DNA and its constituents. *Ultramicroscopy* 10 (1982) 25-40.
- Ikehata, H., Kudo, H., Masuda, T. and Ono, T.: UVA induces C-->T transitions at methyl-CpG-associated dipyrimidine sites in mouse skin epidermis more frequently than UVB. *Mutagenesis* 18 (2003) 511-9.
- Ishiyama, M., Tominaga, H., Shiga, M., Sasamoto, K., Ohkura, Y. and Ueno, K.: A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet. *Biol Pharm Bull* 19 (1996) 1518-20.
- Ito, K. and Kawanishi, S.: Site-specific DNA damage induced by UVA radiation in the presence of endogenous photosensitizer. *Biol Chem* 378 (1997) 1307-12.
- Itoh, K., Tong, K.I. and Yamamoto, M.: Molecular mechanism activating Nrf2-Keap1 pathway in regulation of adaptive response to electrophiles. *Free Radic Biol Med* 36 (2004) 1208-13.
- Iwaki, T., Iwaki, A., Fukumaki, Y. and Tateishi, J.: Alpha B-crystallin in C6 glioma cells supports their survival in elevated extracellular K⁺: the implication of a protective role of alpha B-crystallin accumulation in reactive glia. *Brain Res* 673 (1995) 47-52.
- Jaiswal, A.K.: Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic Biol Med* 36 (2004) 1199-207.
- Jilani, A., Ramotar, D., Slack, C., Ong, C., Yang, X.M., Scherer, S.W. and Lasko, D.D.: Molecular cloning of the human gene, PNKP, encoding a polynucleotide kinase 3'-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage. *J Biol Chem* 274 (1999) 24176-86.
- Jurado, J., Sapparbaev, M., Matray, T.J., Greenberg, M.M. and Laval, J.: The ring fragmentation product of thymidine C5-hydrate when present in DNA is repaired by the Escherichia coli Fpg and Nth proteins. *Biochemistry* 37 (1998) 7757-63.
- Kadekaro, A.L., Kavanagh, R., Kanto, H., Terzieva, S., Hauser, J., Kobayashi, N., Schwemberger, S., Cornelius, J., Babcock, G., Shertzer, H.G., Scott, G. and Abdel-Malek, Z.A.: alpha-Melanocortin and endothelin-1 activate antiapoptotic pathways and reduce DNA damage in human melanocytes. *Cancer Res* 65 (2005) 4292-9.

- Kanazawa, A., Sawa, T., Akaik, T. and Maeda, H.: Formation of abasic sites in DNA by t-butyl peroxy radicals: implication for potent genotoxicity of lipid peroxy radicals. *Cancer Lett* 156 (2000) 51-5.
- Kasai, H., Chung, M.H., Yamamoto, F., Ohtsuka, E., Laval, J., Grollman, A.P. and Nishimura, S.: Formation, inhibition of formation, and repair of oxidative 8-hydroxyguanine DNA damage. *Basic Life Sci* 61 (1993) 257-62.
- Kielbassa, C., Roza, L. and Epe, B.: Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light. *Carcinogenesis* 18 (1997) 811-6.
- Kim, J.A. and Mayfield, J.: Identification of *Brucella abortus* OxyR and its role in control of catalase expression. *J Bacteriol* 182 (2000) 5631-3.
- Kim, J.R., Yoon, H.W., Kwon, K.S., Lee, S.R. and Rhee, S.G.: Identification of proteins containing cysteine residues that are sensitive to oxidation by hydrogen peroxide at neutral pH. *Anal Biochem* 283 (2000) 214-21.
- Kim, M.Y., Park, H.J., Baek, S.C., Byun, D.G. and Houh, D.: Mutations of the p53 and PTCH gene in basal cell carcinomas: UV mutation signature and strand bias. *J Dermatol Sci* 29 (2002a) 1-9.
- Kim, S.H., Lee, J.Y. and Kim, J.: Characterization of a wide range base-damage-endonuclease activity of mammalian rpS3. *Biochem Biophys Res Commun* 328 (2005) 962-7.
- Kim, S.T. and Sancar, A.: Photochemistry, photophysics, and mechanism of pyrimidine dimer repair by DNA photolyase. *Photochem Photobiol* 57 (1993) 895-904.
- Kim, S.Y., Kim, E.J. and Park, J.W.: Control of singlet oxygen-induced oxidative damage in *Escherichia coli*. *J Biochem Mol Biol* 35 (2002b) 353-7.
- Klein, J.C., Bleeker, M.J., Saris, C.P., Roelen, H.C., Brugghe, H.F., van den Elst, H., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., Westra, J.G., Kriek, E. and et al.: Repair and replication of plasmids with site-specific 8-oxodG and 8-AAFdG residues in normal and repair-deficient human cells. *Nucleic Acids Res* 20 (1992) 4437-43.
- Klinedinst, D.K. and Drinkwater, N.R.: Mutagenesis by apurinic sites in normal and ataxia telangiectasia human lymphoblastoid cells. *Mol Carcinog* 6 (1992) 32-42.
- Klotz, L.O., Kroncke, K.D. and Sies, H.: Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells. *Photochem Photobiol Sci* 2 (2003) 88-94.
- Klungland, A., Hoss, M., Gunz, D., Constantinou, A., Clarkson, S.G., Doetsch, P.W., Bolton, P.H., Wood, R.D. and Lindahl, T.: Base excision repair of oxidative DNA damage activated by XPG protein. *Mol Cell* 3 (1999) 33-42.
- Klungland, A. and Lindahl, T.: Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *Embo J* 16 (1997) 3341-8.

- Kohn, K.W., Erickson, L.C., Ewig, R.A. and Friedman, C.A.: Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry* 15 (1976) 4629-37.
- Kolodner, R.D. and Marsischky, G.T.: Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* 9 (1999) 89-96.
- Kolodner, R.D., Tytell, J.D., Schmeits, J.L., Kane, M.F., Gupta, R.D., Weger, J., Wahlberg, S., Fox, E.A., Peel, D., Ziogas, A., Garber, J.E., Syngal, S., Anton-Culver, H. and Li, F.P.: Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res* 59 (1999) 5068-74.
- Kops, G.J., Weaver, B.A. and Cleveland, D.W.: On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nat Rev Cancer* 5 (2005) 773-85.
- Kosower, N.S. and Kosower, E.M.: Diamide: an oxidant probe for thiols. *Methods Enzymol* 251 (1995) 123-33.
- Kosower, N.S., Kosower, E.M., Wertheim, B. and Correa, W.S.: Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. *Biochem Biophys Res Commun* 37 (1969a) 593-6.
- Kosower, N.S., Song, K.R. and Kosower, E.M.: Glutathione. I. The methyl phenyldiazene-carboxylate (azoester) procedure for intracellular oxidation. *Biochim Biophys Acta* 192 (1969b) 1-7.
- Kosower, N.S., Song, K.R. and Kosower, E.M.: Glutathione. IV. Intracellular oxidation and membrane injury. *Biochim Biophys Acta* 192 (1969c) 23-8.
- Kosower, N.S., Song, K.R., Kosower, E.M. and Correa, W.: Glutathione. II. Chemical aspects of azoester procedure for oxidation to disulfide. *Biochim Biophys Acta* 192 (1969d) 8-14.
- Kovtun, I.V., Liu, Y., Bjoras, M., Klungland, A., Wilson, S.H. and McMurray, C.T.: OGG1 initiates age-dependent CAG trinucleotide expansion in somatic cells. *Nature* 447 (2007) 447-52.
- Kovtun, I.V. and McMurray, C.T.: Crosstalk of DNA glycosylases with pathways other than base excision repair. *DNA Repair (Amst)* 6 (2007) 517-29.
- Kramata, P., Lu, Y.P., Lou, Y.R., Singh, R.N., Kwon, S.M. and Conney, A.H.: Patches of mutant p53-immunoreactive epidermal cells induced by chronic UVB irradiation harbor the same p53 mutations as squamous cell carcinomas in the skin of hairless SKH-1 mice. *Cancer Res* 65 (2005) 3577-85.
- Krokan, H.E., Standal, R. and Slupphaug, G.: DNA glycosylases in the base excision repair of DNA. *Biochem J* 325 (Pt 1) (1997) 1-16.
- Kuipers, G.K., Poldervaart, H.A., Slotman, B.J. and Lafleur, M.V.: The influence of formamidopyrimidine-DNA glycosylase on the spontaneous and gamma-radiation-induced mutation spectrum of the lacZ alpha gene. *Mutat Res* 435 (1999) 141-50.

- Kunau, W.H., Dommès, V. and Schulz, H.: beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res* 34 (1995) 267-342.
- Kuraoka, I., Suzuki, K., Ito, S., Hayashida, M., Kwei, J.S., Ikegami, T., Handa, H., Nakabeppu, Y. and Tanaka, K.: RNA polymerase II bypasses 8-oxoguanine in the presence of transcription elongation factor TFIIIS. *DNA Repair (Amst)* 6 (2007) 841-51.
- Kush, A. and Sabapathy, K.: Oxy5, a novel protein from *Arabidopsis thaliana*, protects mammalian cells from oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol* 33 (2001) 591-602.
- Kuznetsov, N.A., Koval, V.V., Zharkov, D.O., Nevinsky, G.A., Douglas, K.T. and Fedorova, O.S.: Kinetics of substrate recognition and cleavage by human 8-oxoguanine-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res* 33 (2005) 3919-31.
- Kvam, E. and Dahle, J.: Pigmented melanocytes are protected against ultraviolet-A-induced membrane damage. *J Invest Dermatol* 121 (2003) 564-9.
- Kvam, E. and Tyrrell, R.M.: The role of melanin in the induction of oxidative DNA base damage by ultraviolet A irradiation of DNA or melanoma cells. *J Invest Dermatol* 113 (1999) 209-13.
- Laloi, C., Stachowiak, M., Pers-Kamczyc, E., Warzych, E., Murgia, I. and Apel, K.: Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 672-7.
- Laval, J.: Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. *Pathol Biol (Paris)* 44 (1996) 14-24.
- Laval, J., Boiteux, S. and O'Connor, T.R.: Physiological properties and repair of apurinic/apyrimidinic sites and imidazole ring-opened guanines in DNA. *Mutat Res* 233 (1990) 73-9.
- Lawrence, C.W., Banerjee, S.K., Borden, A. and LeClerc, J.E.: T-T cyclobutane dimers are misinstructive, rather than non-instructive, mutagenic lesions. *Mol Gen Genet* 222 (1990a) 166-8.
- Lawrence, C.W., Borden, A., Banerjee, S.K. and LeClerc, J.E.: Mutation frequency and spectrum resulting from a single abasic site in a single-stranded vector. *Nucleic Acids Res* 18 (1990b) 2153-7.
- Le Page, F., Randrianarison, V., Marot, D., Cabannes, J., Perricaudet, M., Feunteun, J. and Sarasin, A.: BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells. *Cancer Res* 60 (2000) 5548-52.
- Le Page, F., Schreiber, V., Dherin, C., De Murcia, G. and Boiteux, S.: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) is required in murine cell lines for base excision repair of oxidative DNA damage in the absence of DNA polymerase beta. *J Biol Chem* 278 (2003) 18471-7.

- Lin, J.Y. and Fisher, D.E.: Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445 (2007) 843-50.
- Lindahl, T.: Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362 (1993) 709-15.
- Lindahl, T. and Wood, R.D.: Quality control by DNA repair. *Science* 286 (1999) 1897-905.
- Liu, S.Q., Saijo, K., Todoroki, T. and Ohno, T.: Induction of human autologous cytotoxic T lymphocytes on formalin-fixed and paraffin-embedded tumour sections. *Nat Med* 1 (1995) 267-71.
- Loeb, L.A.: Cancer cells exhibit a mutator phenotype. *Adv Cancer Res* 72 (1998) 25-56.
- Loeb, L.A.: A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 61 (2001) 3230-9.
- Loeb, L.A., Loeb, K.R. and Anderson, J.P.: Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 776-81.
- Loft, S. and Poulsen, H.E.: Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med* 74 (1996) 297-312.
- Mackenney, V.J., Barnes, D.E. and Lindahl, T.: Specific function of DNA ligase I in simian virus 40 DNA replication by human cell-free extracts is mediated by the amino-terminal non-catalytic domain. *J Biol Chem* 272 (1997) 11550-6.
- Marrot, L., Belaidi, J.P., Jones, C., Perez, P. and Meunier, J.R.: Molecular responses to stress induced in normal human caucasian melanocytes in culture by exposure to simulated solar UV. *Photochem Photobiol* 81 (2005) 367-75.
- Marti, T.M., Kunz, C. and Fleck, O.: DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J Cell Physiol* 191 (2002) 28-41.
- Mary, J., Vouquier, S., Picot, C.R., Perichon, M., Petropoulos, I. and Friguet, B.: Enzymatic reactions involved in the repair of oxidized proteins. *Exp Gerontol* 39 (2004) 1117-23.
- Masuda, Y., Bennett, R.A. and Demple, B.: Dynamics of the interaction of human apurinic endonuclease (Ape1) with its substrate and product. *J Biol Chem* 273 (1998) 30352-9.
- Matsumoto, Y., Kim, K., Hurwitz, J., Gary, R., Levin, D.S., Tomkinson, A.E. and Park, M.S.: Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/apyrimidinic sites with purified human proteins. *J Biol Chem* 274 (1999) 33703-8.
- McWalter, G.K., Higgins, L.G., McLellan, L.I., Henderson, C.J., Song, L., Thornalley, P.J., Itoh, K., Yamamoto, M. and Hayes, J.D.: Transcription factor Nrf2 is essential for induction of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, glutathione S-transferases, and glutamate cysteine ligase by broccoli seeds and isothiocyanates. *J Nutr* 134 (2004) 3499S-3506S.

- Mehdi, M.Z., Azar, Z.M. and Srivastava, A.K.: Role of receptor and nonreceptor protein tyrosine kinases in H₂O₂-induced PKB and ERK1/2 signaling. *Cell Biochem Biophys* 47 (2007) 1-10.
- Merker, K. and Grune, T.: Proteolysis of oxidised proteins and cellular senescence. *Exp Gerontol* 35 (2000) 779-86.
- Merwald, H., Klosner, G., Kokesch, C., Der-Petrosian, M., Honigsmann, H. and Trautinger, F.: UVA-induced oxidative damage and cytotoxicity depend on the mode of exposure. *J Photochem Photobiol B* 79 (2005) 197-207.
- Meyskens, F.L., Jr., Farmer, P. and Fruehauf, J.P.: Redox regulation in human melanocytes and melanoma. *Pigment Cell Res* 14 (2001) 148-54.
- Mitani, H. and Shima, A.: Induction of cyclobutane pyrimidine dimer photolyase in cultured fish cells by fluorescent light and oxygen stress. *Photochem Photobiol* 61 (1995) 373-7.
- Moriya, M.: Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G:C→T:A transversions in simian kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 1122-6.
- Moriya, M. and Grollman, A.P.: Mutations in the mutY gene of *Escherichia coli* enhance the frequency of targeted G:C→T:A transversions induced by a single 8-oxoguanine residue in single-stranded DNA. *Mol Gen Genet* 239 (1993) 72-6.
- Mouret, S., Baudouin, C., Charveron, M., Favier, A., Cadet, J. and Douki, T.: Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 13765-70.
- Muller, E., Boiteux, S., Cunningham, R.P. and Epe, B.: Enzymatic recognition of DNA modifications induced by singlet oxygen and photosensitizers. *Nucleic Acids Res* 18 (1990) 5969-73.
- Nackerdien, Z., Olinski, R. and Dizdaroglu, M.: DNA base damage in chromatin of gamma-irradiated cultured human cells. *Free Radic Res Commun* 16 (1992) 259-73.
- Nash, H.M., Bruner, S.D., Scharer, O.D., Kawate, T., Addona, T.A., Spooner, E., Lane, W.S. and Verdine, G.L.: Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Curr Biol* 6 (1996) 968-80.
- Nash, R.A., Caldecott, K.W., Barnes, D.E. and Lindahl, T.: XRCC1 protein interacts with one of two distinct forms of DNA ligase III. *Biochemistry* 36 (1997) 5207-11.
- Nazarkina, Z.K., Khodyreva, S.N., Marsin, S., Lavrik, O.I. and Radicella, J.P.: XRCC1 interactions with base excision repair DNA intermediates. *DNA Repair (Amst)* 6 (2007) 254-64.

- Neto, J.B., Gentil, A., Cabral, R.E. and Sarasin, A.: Mutation spectrum of heat-induced abasic sites on a single-stranded shuttle vector replicated in mammalian cells. *J Biol Chem* 267 (1992) 19718-23.
- Neumann, H.G.: Entstehung und Behandlung von Tumoren, 1992.
- Nilsen, H. and Krokan, H.E.: Base excision repair in a network of defence and tolerance. *Carcinogenesis* 22 (2001) 987-98.
- O'Connor, T.R., Boiteux, S. and Laval, J.: Ring-opened 7-methylguanine residues in DNA are a block to in vitro DNA synthesis. *Nucleic Acids Res* 16 (1988) 5879-94.
- O'Connor, T.R. and Laval, J.: Physical association of the 2,6-diamino-4-hydroxy-5N-formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli* and an activity nicking DNA at apurinic/apyrimidinic sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 5222-6.
- Orimo, H., Mei, N., Boiteux, S., Tokura, Y. and Kasai, H.: Analysis of 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua) released from DNA by the formamidopyrimidine DNA glycosylase (Fpg) protein: a reliable method to estimate cellular oxidative stress. *J Radiat Res (Tokyo)* 45 (2004) 455-60.
- Otto, A.I., Riou, L., Marionnet, C., Mori, T., Sarasin, A. and Magnaldo, T.: Differential behaviors toward ultraviolet A and B radiation of fibroblasts and keratinocytes from normal and DNA-repair-deficient patients. *Cancer Res* 59 (1999) 1212-8.
- Pegg, A.E.: Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res* 462 (2000) 83-100.
- Peltomaki, P.: Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 21 (2003) 1174-9.
- Petermann, E., Keil, C. and Oei, S.L.: Roles of DNA ligase III and XRCC1 in regulating the switch between short patch and long patch BER. *DNA Repair (Amst)* 5 (2006) 544-55.
- Pettersen, H.S., Sundheim, O., Gilljam, K.M., Slupphaug, G., Krokan, H.E. and Kavli, B.: Uracil-DNA glycosylases SMUG1 and UNG2 coordinate the initial steps of base excision repair by distinct mechanisms. *Nucleic Acids Res* 35 (2007) 3879-92.
- Pflaum, M.: Oxidative DNA-Modifikationen durch langwelliges UV-Licht und sichtbares Licht., *Pharmakologie und Toxikologie*. Universität Würzburg, Würzburg, 1996.
- Pflaum, M., Boiteux, S. and Epe, B.: Visible light generates oxidative DNA base modifications in high excess of strand breaks in mammalian cells. *Carcinogenesis* 15 (1994) 297-300.
- Pflaum, M., Kielbassa, C., Garmyn, M. and Epe, B.: Oxidative DNA damage induced by visible light in mammalian cells: extent, inhibition by antioxidants and genotoxic effects. *Mutat Res* 408 (1998) 137-46.

- Pflaum, M., Will, O. and Epe, B.: Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis* 18 (1997) 2225-31.
- Pryor, W.A.: Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol* 48 (1986) 657-67.
- Ramotar, D., Kim, C., Lillis, R. and Demple, B.: Intracellular localization of the Apn1 DNA repair enzyme of *Saccharomyces cerevisiae*. Nuclear transport signals and biological role. *J Biol Chem* 268 (1993) 20533-9.
- Ramotar, D., Popoff, S.C., Gralla, E.B. and Demple, B.: Cellular role of yeast Apn1 apurinic endonuclease/3'-diesterase: repair of oxidative and alkylation DNA damage and control of spontaneous mutation. *Mol Cell Biol* 11 (1991) 4537-44.
- Ratner, D., Peacocke, M., Zhang, H., Ping, X.L. and Tsou, H.C.: UV-specific p53 and PTCH mutations in sporadic basal cell carcinoma of sun-exposed skin. *J Am Acad Dermatol* 44 (2001) 293-7.
- Renkonen, E., Zhang, Y., Lohi, H., Salovaara, R., Abdel-Rahman, W.M., Nilbert, M., Aittomaki, K., Jarvinen, H.J., Mecklin, J.P., Lindblom, A. and Peltomaki, P.: Altered expression of MLH1, MSH2, and MSH6 in predisposition to hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol* 21 (2003) 3629-37.
- Ringvoll, J., Nordstrand, L.M., Vagbo, C.B., Talstad, V., Reite, K., Aas, P.A., Lauritzen, K.H., Liabakk, N.B., Bjork, A., Doughty, R.W., Falnes, P.O., Krokan, H.E. and Klungland, A.: Repair deficient mice reveal mABH2 as the primary oxidative demethylase for repairing 1meA and 3meC lesions in DNA. *Embo J* 25 (2006) 2189-98.
- Rochette, P.J., Therrien, J.P., Drouin, R., Perdiz, D., Bastien, N., Drobetsky, E.A. and Sage, E.: UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells. *Nucleic Acids Res* 31 (2003) 2786-94.
- Rowley, D., Gutteridge, J.M., Blake, D., Farr, M. and Halliwell, B.: Lipid peroxidation in rheumatoid arthritis: thiobarbituric acid-reactive material and catalytic iron salts in synovial fluid from rheumatoid patients. *Clin Sci (Lond)* 66 (1984) 691-5.
- Runger, T.M., Epe, B. and Moller, K.: Processing of directly and indirectly ultraviolet-induced DNA damage in human cells. *Recent Results Cancer Res* 139 (1995) 31-42.
- Samson, L., Derfler, B. and Waldstein, E.A.: Suppression of human DNA alkylation-repair defects by *Escherichia coli* DNA-repair genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (1986) 5607-10.
- Sander, C.S., Chang, H., Hamm, F., Elsner, P. and Thiele, J.J.: Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis. *Int J Dermatol* 43 (2004) 326-35.

- Sander, C.S., Hamm, F., Elsner, P. and Thiele, J.J.: Oxidative stress in malignant melanoma and non-melanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 148 (2003) 913-22.
- Saran, M. and Bors, W.: Oxygen radicals acting as chemical messengers: a hypothesis. *Free Radic Res Commun* 7 (1989) 213-20.
- Sato, K., Taguchi, H., Maeda, T., Minami, H., Asada, Y., Watanabe, Y. and Yoshikawa, K.: The primary cytotoxicity in ultraviolet-a-irradiated riboflavin solution is derived from hydrogen peroxide. *J Invest Dermatol* 105 (1995) 608-12.
- Scharer, O.D. and Jiricny, J.: Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *Bioessays* 23 (2001) 270-81.
- Schieberle, P., Grosch, W., Kexel, H. and Schmidt, H.L.: A study of oxygen isotope scrambling in the enzymic and non-enzymic oxidation of linoleic acid. *Biochim Biophys Acta* 666 (1981) 322-6.
- Schulze-Osthoff, K., Bauer, M.K., Vogt, M. and Wesselborg, S.: Oxidative stress and signal transduction. *Int J Vitam Nutr Res* 67 (1997) 336-42.
- Seib, K.L., Wu, H.J., Srikhanta, Y.N., Edwards, J.L., Falsetta, M.L., Hamilton, A.J., Maguire, T.L., Grimmond, S.M., Apicella, M.A., McEwan, A.G. and Jennings, M.P.: Characterization of the OxyR regulon of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol Microbiol* 63 (2007) 54-68.
- Sekiguchi, M. and Tsuzuki, T.: Oxidative nucleotide damage: consequences and prevention. *Oncogene* 21 (2002) 8895-904.
- Setlow, R.B.: Spectral regions contributing to melanoma: a personal view. *J Investig Dermatol Symp Proc* 4 (1999) 46-9.
- Setlow, R.B., Grist, E., Thompson, K. and Woodhead, A.D.: Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 6666-70.
- Shibutani, S., Takeshita, M. and Grollman, A.P.: Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349 (1991) 431-4.
- Shinomiya, K., Fukunaga, M., Kiyomoto, H., Mizushige, K., Tsuji, T., Noma, T., Ohmori, K., Kohno, M. and Senda, S.: A role of oxidative stress-generated eicosanoid in the progression of arteriosclerosis in type 2 diabetes mellitus model rats. *Hypertens Res* 25 (2002) 91-8.
- Sidorenko, V.S., Nevinsky, G.A. and Zharkov, D.O.: Mechanism of interaction between human 8-oxoguanine-DNA glycosylase and AP endonuclease. *DNA Repair (Amst)* 6 (2007) 317-28.
- Sies, H.: Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 91 (1991) 31S-38S.

- Slupphaug, G., Kavli, B. and Krokan, H.E.: The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 531 (2003) 231-51.
- Suzuki, I., Im, S., Tada, A., Scott, C., Akcali, C., Davis, M.B., Barsh, G., Hearing, V. and Abdel-Malek, Z.: Participation of the melanocortin-1 receptor in the UV control of pigmentation. *J Investig Dermatol Symp Proc* 4 (1999) 29-34.
- Svejstrup, J.Q., Wang, Z., Feaver, W.J., Wu, X., Bushnell, D.A., Donahue, T.F., Friedberg, E.C. and Kornberg, R.D.: Different forms of TFIIH for transcription and DNA repair: holo-TFIIH and a nucleotide excision repairosome. *Cell* 80 (1995) 21-8.
- Szekely, J.G. and Lobreau, A.U.: The effect of glutathione depletion by diamide, diethyl maleate or buthione sulfoximine on the surface structure of mouse L-cells. *Scanning Microsc* 1 (1987) 273-81.
- Takao, M., Aburatani, H., Kobayashi, K. and Yasui, A.: Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* 26 (1998) 2917-22.
- Tchou, J. and Grollman, A.P.: Repair of DNA containing the oxidatively-damaged base, 8-oxoguanine. *Mutat Res* 299 (1993) 277-87.
- Tchou, J., Kasai, H., Shibutani, S., Chung, M.H., Laval, J., Grollman, A.P. and Nishimura, S.: 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 4690-4.
- Teoule, R.: Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 51 (1987) 573-89.
- Tommasi, S., Denissenko, M.F. and Pfeifer, G.P.: Sunlight induces pyrimidine dimers preferentially at 5-methylcytosine bases. *Cancer Res* 57 (1997) 4727-30.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (1979) 4350-4.
- Trapp, C., Reite, K., Klungland, A. and Epe, B.: Deficiency of the Cockayne syndrome B (CSB) gene aggravates the genomic instability caused by endogenous oxidative DNA base damage in mice. *Oncogene* 26 (2007) 4044-8.
- Tudek, B.: Imidazole ring-opened DNA purines and their biological significance. *J Biochem Mol Biol* 36 (2003) 12-9.
- Tudek, B., Boiteux, S. and Laval, J.: Biological properties of imidazole ring-opened N7-methylguanine in M13mp18 phage DNA. *Nucleic Acids Res* 20 (1992) 3079-84.
- Turrens, J.F., Giulivi, C. and Boveris, A.: Increased spontaneous chemiluminescence from liver homogenates and isolated hepatocytes upon inhibition of O₂- and H₂O₂ utilization. *J Free Radic Biol Med* 2 (1986) 135-40.

- Tyrrell, R.: Redox regulation and oxidant activation of heme oxygenase-1. *Free Radic Res* 31 (1999) 335-40.
- Ullrich, O. and Grune, T.: Proteasomal degradation of oxidatively damaged endogenous histones in K562 human leukemic cells. *Free Radic Biol Med* 31 (2001) 887-93.
- van de Poll, W.H., Hanelt, D., Hoyer, K., Buma, A.G. and Breeman, A.M.: Ultraviolet-B-induced cyclobutane-pyrimidine dimer formation and repair in Arctic marine macrophytes. *Photochem Photobiol* 76 (2002) 493-500.
- Vidal, A.E., Boiteux, S., Hickson, I.D. and Radicella, J.P.: XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *Embo J* 20 (2001a) 6530-9.
- Vidal, A.E., Hickson, I.D., Boiteux, S. and Radicella, J.P.: Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: bypass of the AP lyase activity step. *Nucleic Acids Res* 29 (2001b) 1285-92.
- Wamer, W.G. and Wei, R.R.: In vitro photooxidation of nucleic acids by ultraviolet A radiation. *Photochem Photobiol* 65 (1997) 560-3.
- Weinberg, R.A.: How cancer arises. *Sci Am* 275 (1996a) 62-70.
- Weinberg, R.A.: The molecular basis of carcinogenesis: understanding the cell cycle clock. *Cytokines Mol Ther* 2 (1996b) 105-10.
- Wibley, J.E., Pegg, A.E. and Moody, P.C.: Crystal structure of the human O(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Nucleic Acids Res* 28 (2000) 393-401.
- Will, O.: Untersuchung zellulärer DNA-Schäden induziert durch Ro19-8022 in Gegenwart von Licht und deren Charakterisierung mit Hilfe von Reparaturoendonukleasen., Würzburg, 1995.
- Will, O., Gocke, E., Eckert, I., Schulz, I., Pflaum, M., Mahler, H.C. and Epe, B.: Oxidative DNA damage and mutations induced by a polar photosensitizer, Ro19-8022. *Mutat Res* 435 (1999a) 89-101.
- Will, O., Mahler, H.C., Arrigo, A.P. and Epe, B.: Influence of glutathione levels and heat-shock on the steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells. *Carcinogenesis* 20 (1999b) 333-7.
- Wiseman, H. and Halliwell, B.: Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 313 (Pt 1) (1996) 17-29.
- Witkin, E.M.: Ultraviolet mutagenesis and inducible DNA repair in *Escherichia coli*. *Bacteriol Rev* 40 (1976) 869-907.
- Wood, R.D., Mitchell, M. and Lindahl, T.: Human DNA repair genes, 2005. *Mutat Res* 577 (2005) 275-83.

- Woodhead, A.D., Setlow, R.B. and Tanaka, M.: Environmental factors in nonmelanoma and melanoma skin cancer. *J Epidemiol* 9 (1999) S102-14.
- Xu-Welliver, M., Kanugula, S., Loktionova, N.A., Crone, T.M. and Pegg, A.E.: Conserved residue lysine165 is essential for the ability of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase to react with O6-benzylguanine. *Biochem J* 347 (2000) 527-34.
- Yadavilli, S., Hegde, V. and Deutsch, W.A.: Translocation of human ribosomal protein S3 to sites of DNA damage is dependant on ERK-mediated phosphorylation following genotoxic stress. *DNA Repair (Amst)* 6 (2007) 1453-62.
- Yang, W.: Human MutLalpha: the jack of all trades in MMR is also an endonuclease. *DNA Repair (Amst)* 6 (2007) 135-9.
- You, Y.H., Szabo, P.E. and Pfeifer, G.P.: Cyclobutane pyrimidine dimers form preferentially at the major p53 mutational hotspot in UVB-induced mouse skin tumors. *Carcinogenesis* 21 (2000) 2113-7.
- Yu, B., Edstrom, W.C., Benach, J., Hamuro, Y., Weber, P.C., Gibney, B.R. and Hunt, J.F.: Crystal structures of catalytic complexes of the oxidative DNA/RNA repair enzyme AlkB. *Nature* 439 (2006) 879-84.
- Yu, S.L., Lee, S.K., Johnson, R.E., Prakash, L. and Prakash, S.: The stalling of transcription at abasic sites is highly mutagenic. *Mol Cell Biol* 23 (2003) 382-8.
- Zhang, H., Ping, X.L., Lee, P.K., Wu, X.L., Yao, Y.J., Zhang, M.J., Silvers, D.N., Ratner, D., Malhotra, R., Peacocke, M. and Tsou, H.C.: Role of PTCH and p53 genes in early-onset basal cell carcinoma. *Am J Pathol* 158 (2001) 381-5.
- Zhang, X., Rosenstein, B.S., Wang, Y., Lebwohl, M. and Wei, H.: Identification of possible reactive oxygen species involved in ultraviolet radiation-induced oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med* 23 (1997) 980-5.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Einfluss von oxidativem Stress auf die DNA-Reparatur von Säugerzellen“ selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Die Arbeit hat in gleicher oder anderer Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Weiterhin habe ich bisher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Wolfgang Eiberger

Mainz, den 08.04.2008