

Untersuchungen zur Induktion der
8-oxo-dGTPase -
ein Enzym der oxidativen Streßabwehr

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Frauke Meyer
aus Hamburg

Hamburg 2000

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Marquardt
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Westendorf

1	Abkürzungsverzeichnis	1
2	Einleitung.....	5
2.1	Biochemie der antioxidativen Enzyme.....	5
2.2	Chemische Kanzerogenese.....	7
2.2.1	<i>Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies an der Kanzerogenese.....</i>	<i>9</i>
2.2.2	<i>Rolle von Antioxidantien in der Kanzerogenese.....</i>	<i>10</i>
2.3	Oxidative DNA-Schäden und ihre Reparatur.....	11
2.3.1	8-Oxoguanin.....	13
2.3.2	8-Oxo-2'-deoxyguanosin-5'-triphosphat-pyrophosphohydrolase (8-oxo-dGTPase).16	
3	Fragestellung.....	18
4	Material und Methoden.....	20
4.1	Geräte	20
4.2	Chemikalien.....	21
4.3	Zellkultur	24
4.3.1	<i>Isolierung humaner Hautfibroblasten</i>	<i>24</i>
4.3.2	<i>Kultivierung humaner Hautfibroblasten.....</i>	<i>25</i>
4.3.3	<i>Isolierung primärer Rattenhepatozyten</i>	<i>25</i>
4.3.4	<i>Kultivierung primärer Rattenhepatozyten.....</i>	<i>26</i>
4.3.5	<i>Kultivierung von Jurkat-Zellen.....</i>	<i>26</i>
4.3.6	<i>Kultivierung von HT29-Zellen.....</i>	<i>27</i>
4.4	Mikroskopie.....	27
4.5	Zytotoxizitätsuntersuchungen.....	28
4.5.1	Trypanblau-Exklusionstest.....	28
4.5.2	Messung der extrazellulären Lactatdehydrogenase-Aktivität.....	28
4.6	Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford.....	29
4.7	Bestimmung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität.....	30
4.7.1	<i>Synthese der 8-oxo-Guanin-Nukleotide</i>	<i>30</i>
4.7.1.1	<i>Aufreinigung von 8-oxo-dGMP und 8-oxo-dGDP</i>	<i>30</i>
4.7.1.2	<i>Aufreinigung von 8-oxo-dGTP.....</i>	<i>30</i>
4.7.2	<i>Gewinnung des zellfreien Extraktes.....</i>	<i>31</i>
4.7.2.1	<i>Fällung mit Ammoniumsulfat.....</i>	<i>31</i>
4.7.2.2	<i>Ultrazentrifugation.....</i>	<i>31</i>
4.7.3	<i>8-oxo-dGTPase-Assay.....</i>	<i>32</i>
4.7.4	<i>HPLC-Analyse.....</i>	<i>32</i>
4.8	Aktivitätsbestimmung antioxidativer Enzyme	33
4.8.1	<i>Messung der Katalase-Aktivität</i>	<i>33</i>
4.8.2	<i>Messung der Superoxid-Dismutase-Aktivität.....</i>	<i>33</i>
4.8.3	<i>Messung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität.....</i>	<i>34</i>
4.9	Glutathionbestimmung.....	36
4.10	Nachweis der Differenzierung in HT29-Zellen.....	37
4.11	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	38
4.11.1	<i>Isolierung von RNA aus Zellen.....</i>	<i>38</i>
4.11.2	<i>Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes.....</i>	<i>39</i>
4.11.3	<i>Semiquantitative RT-PCR zur Bestimmung der Genexpression.....</i>	<i>40</i>
4.11.3.1	<i>Reverse Transkription (RT).....</i>	<i>40</i>
4.11.3.2	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)</i>	<i>40</i>
4.11.3.3	<i>Agarose-Gelelektrophorese.....</i>	<i>44</i>
4.11.3.4	<i>Auswertung und Dokumentation der Gele.....</i>	<i>45</i>

5 Ergebnisse.....	46
5.1 Entwicklung eines Testsystems zur Bestimmung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität in Zellkulturen	46
5.1.1 HPLC-Analytik.....	46
5.1.2 8-oxo-dGTPase-Aktivitätsbestimmung	48
5.2 Charakterisierung der 8-oxo-dGTPase	50
5.2.1 Bestimmung des pH-Optimums.....	50
5.2.2 Abhängigkeit von Mg^{2+}	51
5.2.3 Bestimmung der kinetischen Parameter, K_M und v_{max}	51
5.2.4 Beeinflussung der katalytischen Aktivität durch Guanin-Nukleotide	53
5.2.4.1 Einfluß von dGTP, dGDP und dGMP.....	53
5.2.4.2 Einfluß von 8-oxo-dGDP und 8-oxodGMP.....	55
5.2.5 Bestimmung der 8-oxo-dGTPase-Halbwertszeit.....	56
5.2.6 Bestimmung von K_M und v_{max} in Hautfibroblasten.....	57
5.3 Untersuchungen zum Verhalten der 8-oxo-dGTPase bei oxidativem Streß.....	58
5.3.1 Auswahl geeigneter Zellsysteme	58
5.3.2 Einfluß von reaktiven Sauerstoffspezies	59
5.3.2.1 Einfluß von H_2O_2 auf Genexpression und Enzymaktivität in Jurkat-Zellen	60
5.3.2.2 Einfluß von H_2O_2 auf Genexpression und Enzymaktivität in humanen Hautfibroblasten	61
5.3.2.3 Zeitlicher Verlauf der Genexpression und Enzymaktivität in humanen Hautfibroblasten nach H_2O_2 Behandlung.....	64
5.3.2.4 Untersuchungen zur Regulation der Genexpression durch H_2O_2 in Jurkat-Zellen	65
5.3.2.5 Einfluß von Superoxid auf die Genexpression und Enzymaktivität in Jurkat-Zellen.....	66
5.3.2.6 Einfluß von Superoxid auf die Genexpression und Enzymaktivität in primären Hautfibroblasten.....	68
5.3.3 Einfluß von Übergangsmetallen.....	70
5.3.3.1 Einfluß von Fe^{2+} auf die Genexpression und Enzymaktivität in Jurkat-Zellen	70
5.3.3.2 Einfluß von Fe^{2+} auf die Genexpression und Enzymaktivität in primären Hautfibroblasten.....	73
5.3.4 Rolle des Redoxcycling bei der Induktion von Genexpression und Enzymaktivität ..	75
5.3.4.1 Einfluß von Paraquat auf die Genexpression und Enzymaktivität in Jurkat-Zellen	76
5.3.4.2 Einfluß von Paraquat auf die Genexpression und Enzymaktivität in primären Hautfibroblasten.....	77
5.3.5 Einfluß von Reduktionsmitteln	79
5.3.5.1 Einfluß von Butylhydroxianisol (BHA) auf die Genexpression und Enzymaktivität von Jurkat-Zellen.....	79
5.3.5.2 Einfluß von Butylhydroxianisol (BHA) auf die Genexpression und Enzymaktivität in primären Hautfibroblasten.....	82
5.3.5.3 Einfluß von N-Acetylcystein (NAC) auf die Genexpression und Enzymaktivität von Jurkat-Zellen.....	84
5.3.5.4 Einfluß von N-Acetylcystein auf die Genexpression und Enzymaktivität von primären Hautfibroblasten.....	86
5.3.6 Einfluß des Glutathion-Status.....	88
5.3.6.1 Einfluß von Buthioninsulphoxim (BTSO) auf die Genexpression und Enzymaktivität von Jurkat-Zellen.....	88
5.3.6.2 Einfluß von Buthioninsulphoxim (BTSO) auf die Genexpression und Enzymaktivität von primären Hautfibroblasten.....	90
5.3.7 Einfluß von Botenstoffen (second-messenger).....	92
5.3.7.1 Einfluß des Tumornekrosefaktors α (TNF α) auf die Genexpression und Enzymaktivität von Jurkat-Zellen	93
5.3.7.2 Einfluß von TNF α auf die Genexpression und Enzymaktivität in primären Hautfibroblasten.....	95
5.4 Untersuchungen zum Verhalten der 8-oxo-dGTPase bei der Zelldifferenzierung.....	97
5.4.1 Charakterisierung des gewählten Zellsystems.....	97

5.4.2	<i>Morphologische Veränderungen von HT-29 Zellen nach Differenzierungsinduktion mit Natriumbutyrat</i>	98
5.4.3	<i>Veränderung der Genexpression und Enzymaktivität nach Differenzierungsinduktion in HT29 Zellen</i>	99
5.4.4	<i>Vergleich der Genexpression und Enzymaktivität von un- und ausdifferenzierten HT29 Zellen</i>	101
5.5	<i>Einfluß von Tumorpromotoren auf die 8-oxo-dGTPase in primären Rattenhepatozyten</i>	102
6	Diskussion	104
6.1	Bestimmung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität in Zellkulturen.....	105
6.1.1	<i>8-oxo-dGTPase-Assay</i>	105
6.1.2	<i>Charakterisierung der 8-oxo-dGTPase</i>	108
6.1.3	<i>Inhibitionsstudien</i>	109
6.2	Vergleich der Redoxregulation der 8-oxo-dGTPase mit der Redoxregulation der klassischen antioxidativen Enzymen CAT, SOD und GPx.....	110
6.2.1	<i>ROS-abhängige Induktion</i>	110
6.2.2	<i>Funktion von GSH bei der Regulation</i>	117
6.2.3	<i>Mediator-vermittelte Induktion</i>	119
6.3	Differenzierung	120
6.4	Tumorpromotion	123
6.5	Offene Fragen und Ausblick.....	126
7	Zusammenfassung	128
8	Summary	131
9	Literaturverzeichnis	133
10	Anhang	152
10.1	R- und S-Sätze	152
10.1.1	<i>Hinweise auf besondere Gefahren (R-Sätze)</i>	152
10.1.2	<i>Kombination der R-Sätze</i>	153
10.1.3	<i>Sicherheitsratschläge (S-Sätze)</i>	155
10.1.4	<i>Kombination der S-Sätze</i>	156
	Lebenslauf	158
	Danksagung	159

1 Abkürzungsverzeichnis

8-oxo-dGDP	8-Oxo-2'-deoxyguanosin-5'-diphosphat
8-oxo-dGMP	8-Oxo-2'-deoxyguanosin-5'-monophosphat
8-oxo-dGTP	8-Oxo-2'-deoxyguanosin-5'-triphosphat
8-oxo-dGTPase	8-Oxo-2'-deoxyguanosin-5'-triphosphat-pyrophosphohydrolase
A	Adenin
A. dest.	destilliertes Wasser
Ah-Rezeptor (AhR)	Aryl Hydrocarbon Rezeptor
ALP	Alkalische Phosphatase
AMP	Adenosinmonophosphat
ARE	Antioxidant Responsive Element
ARNT	Ah-Rezeptor Nuclear Translocator
ΔA	Änderung der Absorption
BHA	Butylhydroxyanisol
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
BTSO	Buthioninsulphoxim
C	Cytosin
CAT	Katalase
cdc 2	Cyclin-abhängige Kinase 2
CEA	Carcinoembryonic Antigen
CHO	Chinese Hamster Ovary
CIA	Chloroform-Isoamylalkohol
CRE	cyclic-AMP responsives Element
DAG	Diacylglycerin
Dea	Diethanolamin
DER	Dioxin responsives Element
FAD	Flavinadenindinukleotid (oxidierte Form)
dG	2'-Deoxyguanosin
dGDP	2'-Desoxyguanosin-5'-diphosphat
dGMP	2'-Desoxyguanosin-5'-monophosphat
dGTP	2'-Deoxyguanosin-5'-triphosphat
diff.	differenziert

DME	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DANN	Desoxyribonukleinsäure
DNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DTNB	5-5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure)
DTT	Dithiothreitol
EC	elktrochemisch
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
Fapy	Formamidopyrimidin
FCS	Fötales Kälberserum
G	Guanosin
G	Guanin
G6DP	Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
GAPDH	Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GMP	Guanosinmonophosphat
GPx	Glutathion-Peroxidase
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	γ -Glutamylcysteinylglycin, Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion (oxidiert)
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N'-2-ethane sulfoxid acid
hMTH1	human MutT Homologue 1
HNPCC	hereditary nonpolyposis colecteral cancer
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hsp	Heat Shock Protein
kDa	Kilodalton
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MWCOO	Molecular weight cut off

mRNA	messenger RNA
MUC	Mucin
NAC	N-Acetylcystein
NAD ⁺	Nicotin-Adenin-Dinucleotid (oxidierte Form)
NADH	Nicotin-Adenin-Dinucleotid (reduzierte Form)
NADP ⁺	Nicotin-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (oxidierte Form)
NADPH	Nicotin-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (reduzierte Form)
O ₂ ^{•-}	Superoxidradikalanion
OD	optische Dichte
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion (Polymerasekettenreaktion)
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROO [•]	Peroxyradikal
ROOH	organische Peroxide
ROS	Reactive Oxygen Species (reaktive Sauerstoffspezies)
RT	Reverse Transkription
SOD	Superoxid-Dismutase
SOD1	Kupfer/Zink-haltige SOD
SOD2	Mangan-haltige SOD
SSA	5-Sulfosalicylic acid
T	Thymin
TBA-OH	Tetrabutylammoniumhydroxid
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo[p]dioxin
Tea	Triethanolamin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TPA	o-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TRE	TPA responsives Element
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminoethan
Tris-HCl	Tris(Hydroxymethyl)aminoethanhydrochlorid
U	Units = Einheit

V/V	Volumenprozent
$v_{\max}$	Maximalgeschwindigkeit
V_s	Probenvolumen
V_t	Gesamtvolumen
WME	William's Medium E

2 Einleitung

Normales Attribut des aeroben Lebens ist die strukturelle Schädigung einer Vielzahl von Verbindungen – DNA, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide - durch Oxidation. Zu ihrer Verteidigung haben biologische Systeme während der Evolution enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidanssysteme entwickelt. Die oxidative Schädigung, die durch eine Überproduktion reaktiver Sauerstoffspezies, wie das Superoxidradikalanion ($O_2^{\bullet-}$), das Hydroxylradikal ($^{\bullet}OH$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sowie organische Peroxide und Peroxylradikale ($ROOH$, $ROO^{\bullet}$), oder durch ein Defizit der Antioxidans- und/oder Reparatursysteme hervorgerufen wird, wird oxidativer Streß genannt. Die Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies bei einer Reihe von biologischen Vorgängen, wie z.B. Entzündungen, Alterungsprozessen, photobiologischen Prozessen und Strahlenschädigungen, wird diskutiert. Auch die Entstehung von Krebserkrankungen, an denen weltweit jährlich Millionen Menschen erkranken und die neben Herz-Kreislaufkrankungen die zweithäufigste Todesursache der modernen westlichen Industriegesellschaft darstellen, wird durch reaktive Sauerstoffspezies beeinflusst. Besonders oxidative Schäden der DNA und ihre fehlerhafte Reparatur können zu einer Steigerung der Mutationsrate und damit zur genetischen Instabilität führen, die eng mit der Krebsentstehung in Verbindung gebracht wird.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Induzierbarkeit der 8-Oxo-2'-deoxyguanosin-5'-triphosphat-pyrophosphohydrolase (8-oxo-dGTPase), welche den Abbau eines potent mutagenen Substrates der DNA-Synthese (8-oxo-dGTP) katalysiert, durch reaktive Sauerstoffspezies im Vergleich zur Induzierbarkeit der klassischen antioxidativen Enzyme Katalase, Superoxid-Dismutase und Glutathion-Peroxidase. Darüber hinaus wird das Verhalten dieser Enzyme bei der zellulären Differenzierung und speziell die Rolle der 8-oxo-dGTPase bei der Tumorpromotion untersucht.

2.1 *Biochemie der antioxidativen Enzyme*

Die antioxidativen Enzyme Superoxid-Dismutase (SOD), Katalase (CAT), Glutathion-Peroxidase (GPx), Glutathion-Reduktase (GR) und Glucose-6-phosphat-dehydrogenase (G6PD) bilden zusammen ein Abwehrsystem, welches die Zelle vor reaktiven Sauerstoffspezies schützt, die durch endogene oder exogene Quellen gebildet werden. Eine Übersicht über das Zusammenspiel dieser antioxidativen Enzyme ist in **Abbildung 2-1** dargestellt.

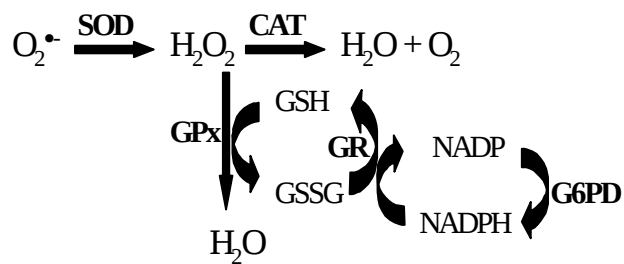


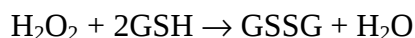
Abb. 2-1: Zusammenspiel der antioxidativen Enzyme

Der Abbau des Superoxidradikalanions ($\text{O}_2^{\bullet -}$) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird von der Superoxid-Dismutase (EC 1.15.1.1) katalysiert, die 1969 von McCord und Fridovich entdeckt wurde [McCord und Fridovich, 1969]. In Eukaryonten existieren 3 Isoformen der SOD: Cu/Zn-SOD, Mn-SOD und EC-SOD. Die Cu/Zn-SOD, deren kodierendes Gen beim Menschen auf dem Chromosom 21q22.1 liegt [McAlpine, 1988], hat ein Molekulargewicht von 32 kDa. Sie besteht aus zwei identischen Untereinheiten und ist im Zytosol lokalisiert [Fridovich, 1975]. Dem Enzym wird eine Rolle bei den pathologischen Symptomen des Down-Syndroms zugeschrieben. Bei dieser Erkrankung liegt eine angeborene Trisomie des Chromosoms 21 vor, die u. a. zu mentaler Retardierung und vorzeitigem Altern führt [Groner, 1990]. Die Mn-SOD mit einem Molekulargewicht von 88 kDa besteht aus vier identischen Untereinheiten und ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert [Fridovich, 1974]. Ihr kodierendes Gen liegt auf dem Chromosom 6q21 [McAlpine, 1988]. Die ebenfalls Cu/Zn-haltige EC-SOD hat ein Molekulargewicht von 135 kDa und ist aus vier Untereinheiten aufgebaut, die nicht kovalent miteinander verknüpft sind. Sie ist im Extrazellulärraum lokalisiert [Marklund, 1982 und 1984].

Das am längsten bekannte antioxidative Enzym ist die Katalase (EC 1.11.1.6), die bereits 1901 von Loew erwähnt wurde. Sie katalysiert den Abbau von H_2O_2 zu H_2O und O_2 . Die Katalase hat ein Molekulargewicht von 240 kDa und ist aus vier Protein-Untereinheiten aufgebaut, die je eine Hämgruppe (Fe(III)-protophosphorin) am aktiven Zentrum gebunden haben. Der Hauptanteil der Katalase (80%) ist in den Peroxisomen und ein geringerer Teil (20%) im Zytosol lokalisiert [Percy, 1984]. Das Gen, das für die Katalase kodiert, liegt auf dem Chromosom 11p13 [McAlpine, 1988].

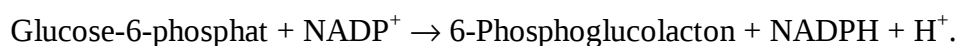
Ein weiteres Enzym, welches beim Abbau von H_2O_2 beteiligt ist, ist die Glutathion-Peroxidase (EC 1.11.1.9), die zuerst von Mills beschrieben wurde [Mills, 1957]. Es werden zwei Formen der Glutathion-Peroxidase voneinander unterschieden: Selen-abhängig und Selen-unabhängig. Die Selen-abhängige Form ist ein tetrameres Protein mit einem Molekulargewicht von 84 kDa, das sowohl im Zytosol (70%) als auch in den Mitochondrien (30%) vorkommt.

Sie katalysiert den Abbau von H_2O_2 bzw. organischen Peroxiden zu H_2O bzw. zum entsprechenden Alkohol und H_2O durch das Tripeptid Glutathion (GSH) [Mills, 1957]:



Das Gen, welches die Selen-abhängige GPx kodiert, ist auf dem Chromosom 3p13-q12 lokalisiert [McAlpine 1988]. Zu den Selen-unabhängigen Formen zählen die Glutathion-S-Transferasen (EC 2.5.1.18). Sie sind hauptsächlich an Biotransformationen von Xenobiotika [Jakoby, 1978] und an der Detoxifizierung von Kanzerogenen [Smith, 1977] beteiligt. Die dimeren Proteine mit einem Molekulargewicht von 50 kDa sind im Zytosol und in den Mitochondrien lokalisiert [Sun, 1989]. Die Gene, die für die Selen-unabhängige GPx kodieren, liegen auf den Chromosomen 6p12.2 und 11q13-qter [McAlpine, 1988].

Die bisher beschriebenen Enzyme CAT, SOD und GPx sind direkt am Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt und werden deshalb als primäre antioxidative Enzyme bezeichnet. Sie werden durch die sekundären antioxidativen Enzyme GR und G6PD unterstützt, indem diese den Spiegel an Reduktionsäquivalenten, wie GSH und NADPH, aufrechterhalten. So katalysiert die Glutathion-Reduktase (EC 1.6.4.2), die 1932 von Mann aus Kaninchenleber isoliert worden ist, die Reduktion von GSSG zu GSH unter Verbrauch von NADPH. Das Enzym, das im Zytosol und in den Mitochondrien lokalisiert ist, hat ein Molekulargewicht von ca. 120 kDa und ist aus 2 Untereinheiten aufgebaut, die FAD im aktiven Zentrum gebunden haben [Mann, 1932; Ray, 1975]. Das Gen, welches für die GR kodiert, liegt auf Chromosom 8p21.1 [McAlpine, 1988]. Der NADPH-Spiegel wird durch die Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (EC 1.1.1.49), die 1961 von Marks isoliert wurde, aufrechterhalten:



In humanen Erythrozyten besteht ein Gleichgewicht zwischen einer tetrameren Form mit einem Molekulargewicht von 210 kDa und einer dimeren Form mit einem Molekulargewicht von 105 kDa [Marks, 1961]. Das Gen, welches für dieses Enzym kodiert, liegt auf Chromosom Xq28 [McAlpine, 1988].

2.2 Chemische Kanzerogenese

Die Kanzerogenese, in dessen Verlauf aus einer Normalzelle ein klinisch manifester Tumor entsteht, wird heute als ein Mehrstufen-Prozeß angesehen, der sich über einen langen Zeitraum von mehreren Jahren bis Jahrzehnten hinzieht. Die Entwicklung von Neoplasien wird dabei auf genetisch bedingte Veränderungen in der Wachstumskontrolle zurückgeführt. In den meisten

Fällen handelt es sich dabei um DNA-Schäden, die entweder fehlerhaft oder gar nicht repariert werden, wodurch es nach der Replikation zu Mutationen kommt. Neben Punktmutationen werden auch Genamplifikationen oder chromosomale Translokationen beobachtet. Diese multiplen genetischen Veränderungen akkumulieren während des Prozesses der Kanzerogenese innerhalb der Zelle und werden mit einer zunehmenden Malignität in Verbindung gebracht [Sugimura, 1992; Marquardt, 1994]. Eng mit der Kanzerogenese verknüpft sind Mutationen in Proto-Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, wodurch es zu einer Fehlregulation von Wachstums- und Differenzierungs-Vorgängen kommt. So wurde in ca. 30% aller menschlichen Tumoren ein mutiertes *ras*-Onkogen und in bis zu 50% ein defektes p53-Tumorsuppressorgen diagnostiziert [Marx, 1994]. Die Aktivierung von Proto-Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressor-genen und Veränderungen der zellulären Signaltransduktion werden heute als der mögliche gemeinsame Wirkungsmechanismus genotoxischer und epigenetischer Kanzerogene angesehen [Marquardt, 1994].

Vereinfachend wird der Mehrstufen-Prozeß der Kanzerogenese in drei Phasen, Initiation, Promotion und Progression, eingeteilt [Marquardt, 1994]. Der schematische Ablauf der Kanzerogenese ist in **Abbildung 2-2** wiedergegeben.

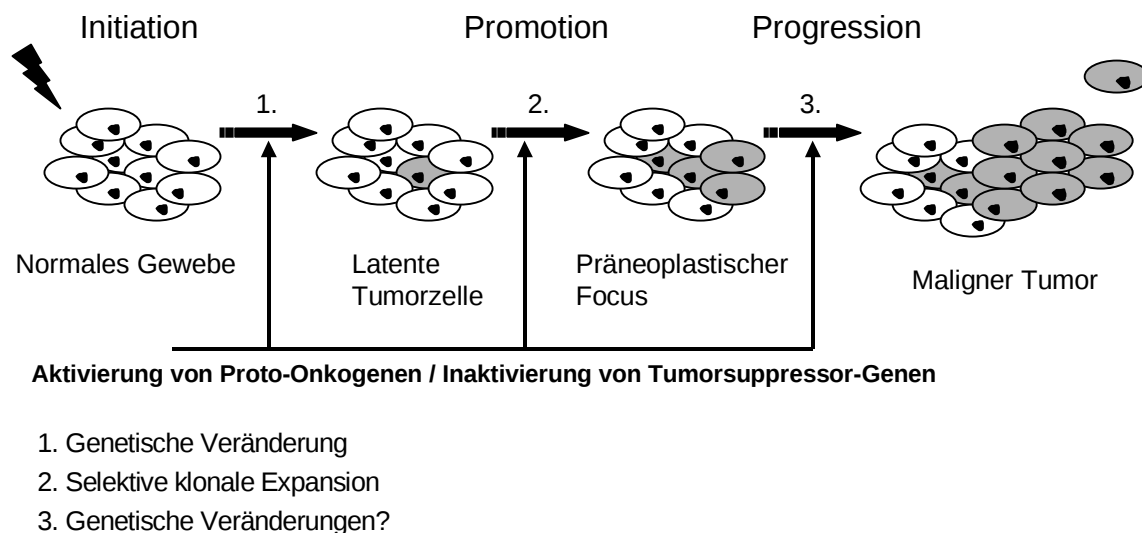


Abb. 2-2: Phasen der Kanzerogenese (Mehrstufen-Prozeß)

Während der Initiationsphase kommen die Zellen mit chemischen, physikalischen (z.B. Strahlung) oder mikrobiologischen (z.B. Viren) Kanzerogenen in Kontakt, die bei entsprechender Disposition zu genetischen Veränderungen führen können, wodurch eine Normalzelle irreversibel in einen „prämaligen“ Zustand konvertiert. Ohne Proliferations-Stimulus wird die initiierte Zelle durch die umgebenden Normalzellen unter Kontrolle gehalten [Marquardt, 1994].

In der teilweise reversiblen Promotionsphase wird die initiierte Zelle aufgrund eines zugrunde liegenden Proliferations-Stimulus, wie z.B. Wachstumsfaktoren, chemische Tumorpromotoren, Festkörper, Wunden sowie Zell- und Gewebetod, klonal amplifiziert. Diese präferentielle Vermehrung initiiert Zellen führt zum Auftreten von Zellklonen, den präneoplastischen Foci, die einen im Vergleich zum Normalgewebe anderen Phänotyp aufweisen und deshalb lichtmikroskopisch erkennbar sind. Durch weitere epigenetische oder genetische Faktoren entsteht in der letzten Phase, der Progression, der maligne Tumor. Er ist durch invasives und infiltratives Wachstum gekennzeichnet, was mit einer Destruktion des umliegenden Gewebes einhergeht. Ein weiteres Zeichen der malignen Neoplasie ist die Bildung von Tochtergeschwülsten durch Metastasierung. Dabei lösen sich Einzelzellen vom Primärtumor, infiltrieren in das Blut oder Lymphsystem, siedeln sich an einer anderen Stelle wieder an und beginnen sich dort autonom zu vermehren. Auf molekularer Ebene ist das finale Stadium der Progression durch eine zunehmende karyotypische Instabilität gekennzeichnet [Marquardt, 1994; Pitot, 1993].

2.2.1 Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies an der Kanzerogenese

Für eine Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies am Mehrstufen-Prozeß der Kanzerogenese existieren in der Literatur stichhaltige Anhaltspunkte. So werden reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Streß als möglicher gemeinsamer Wirkmechanismus nicht-genotoxischer Kanzerogene angesehen, wie z.B. Peroxisomen-Proliferatoren, Metalle (z.B. Fe, Cu, die aber nicht kanzerogen wirksam sind), Polyphenole/Chinone (z.B. BHA) und Tumorpromotoren (z.B. TPA, das aber nur schwach kanzerogen wirksam ist) [Klauning, 1995; Marquardt, 1994].

Eine Stimulation der Krebsentstehung durch reaktive Sauerstoffspezies kann sowohl auf der Stufe der Initiation als auch der Promotion und der Progression erfolgen. Reaktive Sauerstoffspezies induzieren vielfältige oxidative DNA-Schäden, die größtenteils durch generelle oder spezifische Reparaturmechanismen beseitigt werden (siehe **Abschnitt 2.3**). Nicht reparierte oxidative DNA-Schäden können zu permanenten Modifikationen des genetischen Materials führen und stellen somit ein wichtiges mutagenes Potential dar, das mit zunehmenden Alter akkumuliert. Die Mutagenität reaktiver Sauerstoffspezies wurde bereits in *Salmonella typhimurium* [Moody 1982] und Säugetierzellen [Cunningham, 1983] nachgewiesen. Dies und die Beobachtung, daß es eine Reihe von Initiatoren gibt, die entweder reaktive Sauerstoffspezies selber produzieren oder deren Produktion induzieren [Ames, 1991], führten zu dem Schluß, daß reaktive Sauerstoffspezies als Initiatoren angesehen werden können [Sun, 1990]. Die Beobachtungen, daß:

1. Tumorpromotoren, wie z.B. TPA (12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat), die ROS-Produktion stimulieren,
2. eine Reihe von ROS-produzierenden Verbindungen Tumorpromotoren sind,

3. Tumorpromotoren die Kapazität der antioxidativen Systeme beeinflussen können und
4. Antioxidantien Anti-Tumorpromotoren sind (**siehe 2.2.2**),

deuten auf eine Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies bei der Promotion hin. Die gleichzeitige Induktion der ROS-Produktion und Inhibition der antioxidativen Enzyme, die beim Tumorpromotor TPA beobachtet wurde, führt zu einem pro-oxidierenden Status der Zelle, der initiierte Zellen zum neoplastischen Wachstum promoviert [Cerutti, 1985]. Dabei wird angenommen, daß die promovierende Wirkung der reaktiven Sauerstoffspezies über eine direkte oder indirekte Regulation der Expression von Genen, die den Zelltod, die Zelldifferenzierung oder die Zellproliferation steuern, abläuft [Cerutti, 1985]. So bewirken reaktive Sauerstoffspezies eine starke Zunahme der zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration, indem sie zum einen Ca^{2+} aus intrazellulären Lagern mobilisieren und zum anderen den Einstrom von extrazellulären Ca^{2+} erhöhen [Dreher, 1995]. Diese Veränderung kann entweder direkt die Genexpression beeinflussen, wie z.B. die Induktion des *c-fos* Proto-Onkogens [Werlen, 1993], oder indirekt über die Aktivierung Ca^{2+} -abhängiger Proteinkinasen, die über Phosphorylierungskaskaden Transkriptionsfaktoren aktivieren, wodurch die Genexpression induziert wird [Larsson, 1989]. Eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren kann auch über eine Veränderung des intrazellulären Redoxstatus oder direkt durch reaktive Sauerstoffspezies erfolgen, wie im Falle des Transkriptionsfaktors NF κ B [Toledano, 1991]. Die Funktion reaktiver Sauerstoffspezies bei der Progression ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird jedoch angenommen, daß der in Tumorzellen nachgewiesene persistente oxidative Streß die genomische Instabilität erhöht, wodurch das metastasierende Potential erhöht wird [Toyokuni, 1995].

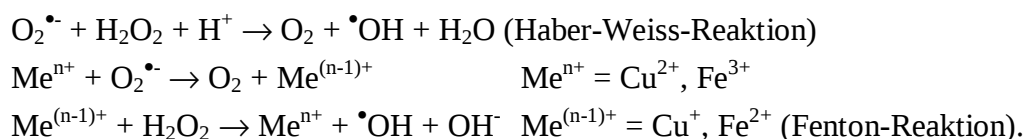
2.2.2 Rolle von Antioxidantien in der Kanzerogenese

Die enzymatischen Antioxidantien und eine Reihe von nicht-enzymatischen Antioxidantien bilden zusammen ein komplexes Zellschutzsystem, welches Zellen vor einer kontinuierlichen Belastung durch reaktive Sauerstoffspezies schützt. Zu den enzymatischen Antioxidantien werden u.a. die Enzyme Katalase, Superoxid-Dismutase, Glutathion-Peroxidase, Glutathion-S-Transferase, Glutathion-Reduktase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase gezählt (siehe **Abschnitt 2.1**). Zu den wichtigsten nicht-enzymatischen Antioxidantien zählen Ascorbat, α -Tocopherol, β -Karoten, Glutathion (GSH) und andere kleine Thiole, Harnsäure sowie Bilirubin [Zittermann, 1994; Kaul, 1993; Ames, 1993]. In der Literatur existieren eine Reihe von Daten, die eine inhibierende Wirkung von Antioxidantien auf die Kanzerogenese, besonders bei der Initiation und bei der Promotion, aufzeigen. So konnte z.B. die mutagene Wirkung von Bleomycin, das in hohem Ausmaß Superoxid bildet, durch den Zusatz von SOD blockiert werden [Cunningham, 1983]. In BALB/c 3T3-Zellen wurde die durch den Tumorpromotor TPA verstärkte Transformation durch den Zusatz von SOD und CAT unterbunden [Saito, 1987]. Diese Daten bestätigen eine Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies beim Prozeß der Kanzerogenese (siehe **Abschnitt 2.2.1**).

Tumorzellen zeichnen sich durch Abnormalitäten innerhalb der antioxidativen Enzyme aus. So sind humane Tumore durch eine sehr geringe Aktivität an Cu/Zn-SOD, Mn-SOD und CAT und mit einer höheren Aktivität an GPx, GR, GST und G6PD gekennzeichnet. Unklar ist bis heute, ob diese Abnormalitäten als Ursache oder Folge der neoplastischen Veränderungen anzusehen sind. Eine zu geringe Aktivität der antioxidativen Enzyme führt zu einer Akkumulation reaktiver Sauerstoffspezies, was eine Schädigung von DNA, RNA, Lipiden und Proteinen zur Folge hat, die schließlich zur Krebsentstehung führt. Auf der anderen Seite könnte die Abnormalität der antioxidativen Enzyme auch nur für den Erhalt des bereits erreichten malignen Status aufgefaßt werden [Sun, 1990].

2.3 Oxidative DNA-Schäden und ihre Reparatur

Neben Methylierungen, Deaminierungen und Depurinierungen stellt die Oxidation den wohl bedeutendsten endogenen Prozeß dar, der zu einer signifikanten Schädigung der DNA führt und als eine Hauptursache für die Entstehung einer Reihe von Erkrankungen, wie z.B. Krebs, sowie für den Alterungsprozeß angesehen wird [Beckman, 1997; Ames, 1991]. Die Rate der oxidativen DNA-Schäden ist relativ hoch und von der Stoffwechselrate und der Lebensdauer abhängig. In der Ratte wird die Anzahl der oxidativen DNA-Schäden pro Zelle und Tag auf 10^6 , im Menschen auf 10^4 geschätzt [Ames, 1991]. Für einen Großteil der oxidativen DNA-Schäden wird das äußerst reaktive Hydroxylradikal verantwortlich gemacht, welches in der Zelle aus $O_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 über die Haber-Weiss- und Fenton-Reaktion gebildet wird:



Innerhalb der Zelle wird deshalb die Bildung von $\bullet OH$ über die Regulation des H_2O_2 - und des $O_2^{\bullet-}$ -Spiegels und durch Bindung der Metallionen kontrolliert [Peskin, 1997; Olinski, 1992 und 1998].

Die Art einer oxidativen Schädigung der DNA ist meist komplex und kann sämtliche Bausteine der DNA betreffen. Dadurch kommt es zu Basenmodifikationen und Basenschädigungen sowie zu Strangbrüchen (Einzel- und Doppelstrang), Chromosomen-Aberrationen und sogenannten „cross-links“, d.h. kovalente Bindungen zwischen DNA und Proteinen bzw. zwischen DNA und DNA [Sies, 1986]. Der Angriff reaktiver Sauerstoffspezies an die Desoxyribose erfolgt entweder an der C1'-Position, wodurch basenfreie Regionen (apurinic sites) entstehen, oder an der C4'-Position, was eine Fragmentation der Desoxyribose zur Folge hat [Peskin, 1997]. Auch die vier Basen, Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin werden durch

reaktive Sauerstoffspezies an bevorzugten Stellen angegriffen, die in **Abbildung 2-3** wiedergegeben sind.

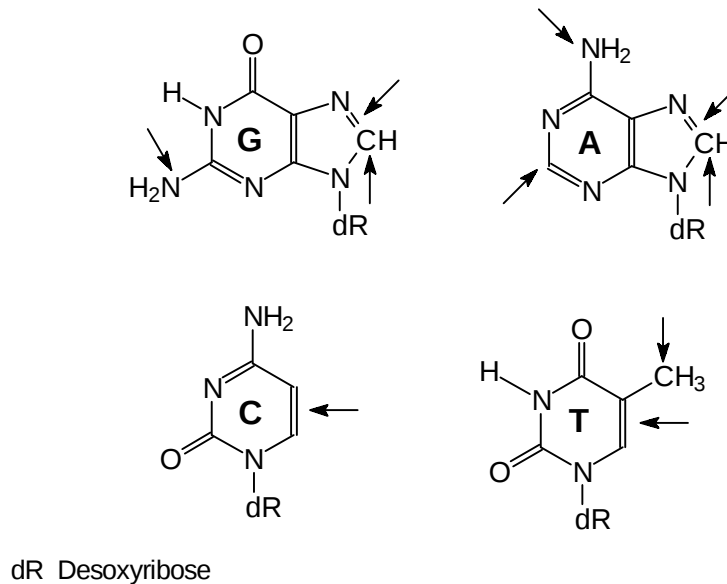


Abb. 2-3: Bevorzugte Angriffspunkte (→) oxidierender Agenzien innerhalb der Pyrimidine Cytosin (C) und Thymin (T) und der Purine Adenin (A) und Guanin (G).

Daraus wird ersichtlich, daß die Oxidation der Pyrimidine Thymin und Cytosin bevorzugt an der C5-C6 Position stattfindet, so daß es u.a. zur Bildung von Glykolen kommt. Die hydrolytische Deaminierung von Cytosinglycol führt zu Uracilderivaten, die bevorzugt Basenpaare mit Adenin bilden, wodurch es zu C:G → T:A Transversionen kommen kann [Olinski, 1992]. Dagegen erfolgt eine Oxidation der Purine Adenin und Guanin bevorzugt an der C8-Position und am Imidazolring. Der oxidative Angriff am Imidazolring führt zur Ringöffnung und Bildung von Formamidopyrimidinen. Durch Oxidation an C8-Position entsteht das stark mutagene 8-Oxoguanin, auf das in **Abschnitt 2.3.1** näher eingegangen wird. Daneben treten auch Deaminierungen auf, wodurch die ebenfalls mutagenen Basen Xanthin und Hypoxanthin entstehen [Olinski, 1998; Peskin, 1997; Sies, 1986]. Einige Strukturen oxidativ geschädigter Basen sind in **Abbildung 2-4** dargestellt.

Die Konsequenzen, die die einzelnen oxidativen DNA-Schäden zur Folge haben, sind sehr unterschiedlich: Thyminglycol und Formamidopyrimidine stellen Replikationsblockaden dar und sind somit zytotoxisch, 8-Oxoguanin dagegen ist ein starkes Mutagen.

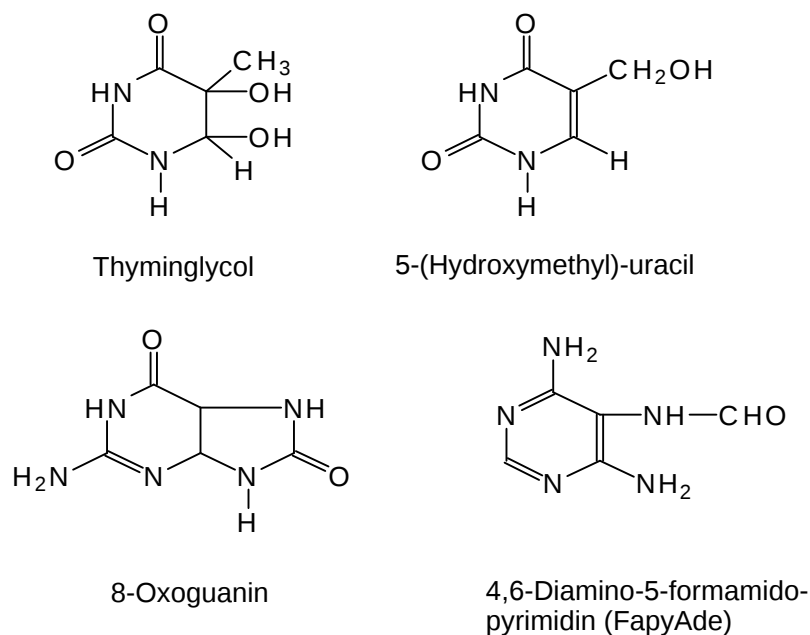


Abb. 2-4: Strukturen oxidativ geschädigter Basen

Um das Ausmaß der DNA-Schädigungen gering und damit die genetische Stabilität aufrecht zu erhalten, existieren eine Reihe genereller und spezieller Reparaturmechanismen, die in *E.coli* genau studiert wurden. Bei den generellen Reparaturmechanismen werden zwei Systeme voneinander unterschieden, die mismatch- und die Excision-Reparatur, die noch in die Basen- und in die Oligonukleotid-Excision-Reparatur untergliedert wird [Culotta, 1994]. Das mismatch-Reparatursystem, welches sich in *E.coli* aus den Genen MutH, MutL, MutS und MutU zusammensetzt, garantiert die Präzision der chromosomalen Replikation und der genetischen Rekombination, indem es fehlerhafte Basenpaarungen sowie den Extraeinbau eines oder zweier Nukleotide, was zu ungepaarten Basen innerhalb der DNA-Helix führen würde, erkennt und beseitigt. [Modrich, 1994].

Geschädigte Basen oder Oligonukleotide innerhalb der DNA werden vom Excision-Reparatursystem, zu dem in *E.coli* die Gene *uvrA*, *uvrB* und *uvrC* gezählt werden, repariert. Die Reparatur läuft in zwei Schritten ab: Eine geschädigte Base wird zunächst von einer DNA-Glykosylase aus der DNA entfernt, bevor dann die entstehende „AP site“ durch die AP-Endonuklease herausgeschnitten wird. Geschädigte Oligonukleotide werden zunächst aus der DNA entfernt, mit Hilfe des verbleibenden Komplementärstranges, der als template dient, wird dann die daraus resultierende Lücke wieder aufgefüllt und das neusynthetisierte Oligonukleotid mit dem alten Strang verbunden. Das herausgeschnittene und reparierte DNA-Fragment besteht in Prokaryonten aus 12 – 13 Nukleotiden, in Eukaryonten aus 27 – 29 Nukleotiden. Substrate des Excision-Reparatursystems sind neben methylierten Basen, wie z.B. O⁶-Methylguanin, auch große DNA-Addukte, wie z.B. Pyridindimere (a), Benzo[a]pyren-Guanin-Addukte (b) und *cis*-

Platin-Guanin-Addukte (c), deren Bildung durch UV-Strahlung (a), Rauchen (b) oder Chemotherapeutika (c) induziert bzw. verursacht wird. Eine Unterscheidung zwischen „richtigem“ DNA-Strang und „falschem“ DNA-Strand ist im Gegensatz zum mismatch-Reparatursystem allerdings nicht möglich, wodurch bestimmte Mutationen erst fixiert werden können [Sancar, 1994; Hanawalt, 1990; Dreher, 1996].

Die Notwendigkeit dieser beiden Reparaturmechanismen zur Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität spiegelt sich in der Tatsache wieder, daß Defekte innerhalb dieser Mechanismen mit einem erhöhten Krebsrisiko verbunden sind. So wird eine Störung der mismatch-Reparatur als eine Ursache von HNPCC (**h**ereditary **n**onpolyposis **c**olorectal **c**ancer) angesehen [Culotta, 1994; Modrich, 1994]. Beim *Xeroderma pigmentosum* Syndrom liegt eine Störung der Excision-Reparatur vor, so daß Pyridindimere nicht mehr repariert werden können, was mit einer stark erhöhten Hautkrebsinzidenz verbunden ist [Satoh, 1993, Culotta, 1994; Dreher, 1996].

Für eine Reihe von DNA-Schäden existieren auch spezielle Reparaturmechanismen, deren Inaktivierung in *E.coli* zu einer deutlichen Steigerung der spontanen oder ROS-induzierten Mutationsrate führt [Dreher, 1996; Demple, 1994]. Dabei handelt es sich meist um Glykosylasen mit hoher Substratspezifität, wie z.B. die Hypoxanthin-DNA-Glykosylase, die Uracil-DNA-Glykosylase und die Fapy-Glykosylase, deren Wirkungen von Endonukleasen mit oder ohne Glykosylase-Aktivität und Exonukleasen unterstützt werden [Peskin, 1997; Breimer, 1990; Olinski, 1998]. Auch für 8-Oxoguanin existiert ein spezielles Reparatursystem, auf das im folgenden **Abschnitt 2.3.1** näher eingegangen wird.

2.3.1 8-Oxoguanin

Von den in **Abschnitt 2.3** bereits erwähnten oxidativen Schädigungen der DNA scheint 8-Oxoguanin eine besondere Funktion in der Mutagenese und Kanzerogenese zu übernehmen [Kasai, 1986; Ames, 1991]. *In vivo* Untersuchungen ergaben einen direkten Zusammenhang zwischen der 8-Oxoguanin-Bildung und der Kanzerogenese [Floyd, 1990]. So wurden im p53-Gen und im *ras*-Protooncogen im Falle von Lungenkarzinomen und primärem Leberkrebs verstärkt G:C → T:A Transversionen gefunden [Hussain, 1994; Le Page, 1995], und der Gehalt an 8-Oxoguanin war in humanem Lungenkrebsgewebe deutlich höher als im umgebenden gesunden Lungengewebe [Olinski, 1992 und 1998]. Die besondere Bedeutung von 8-Oxoguanin in Bezug auf das mutagene Potential und die Kanzerogenese spiegelt sich auch in der Existenz eines synergistischen DNA-Reparatursystem für diese Basenmodifikation wieder [Dreher, 1996].

Die bevorzugte oxidative Schädigung von Guanin, z.B. durch Angriff des Hydroxylradikals ($\bullet\text{OH}$) an der C8-Position, führt zur Bildung von 8-Hydroxyguanin, welches in einer Art Keto-Enol-Tautomerie überwiegend als Carbonylverbindung (8-Oxoguanin) vorliegt [Demple, 1994; Gajewski, 1990]. 8-Oxoguanin kann nicht nur über seine anti-Konformation die typische

Watson-Crick-Basenpaarung mit Cytosin eingehen, sondern auch mit gleicher Wahrscheinlichkeit über seine syn-Konformation eine Fehlpaarung mit Adenin bilden (siehe **Abbildung 2-5**). Diese Fehlpaarung würde im Laufe der Replikation, sofern sie nicht repariert würde, zu G:C → T:A Transversionen führen (siehe **Abbildung 2-6**) [Shibutani, 1991; Mc Bride, 1991].

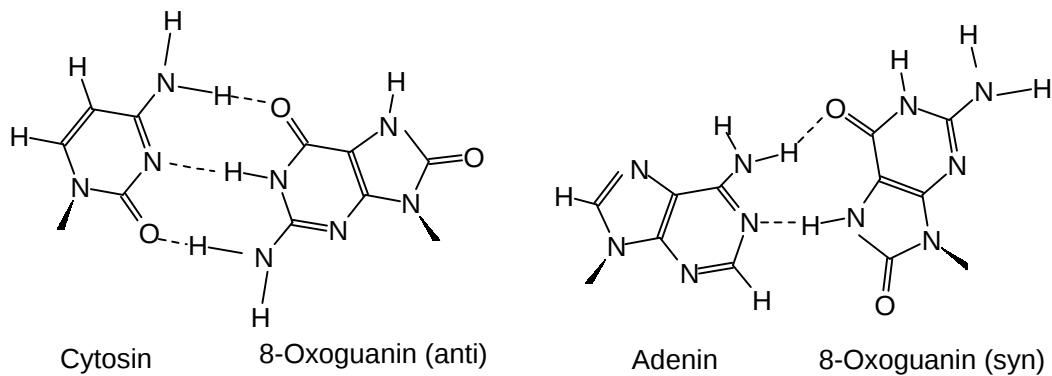
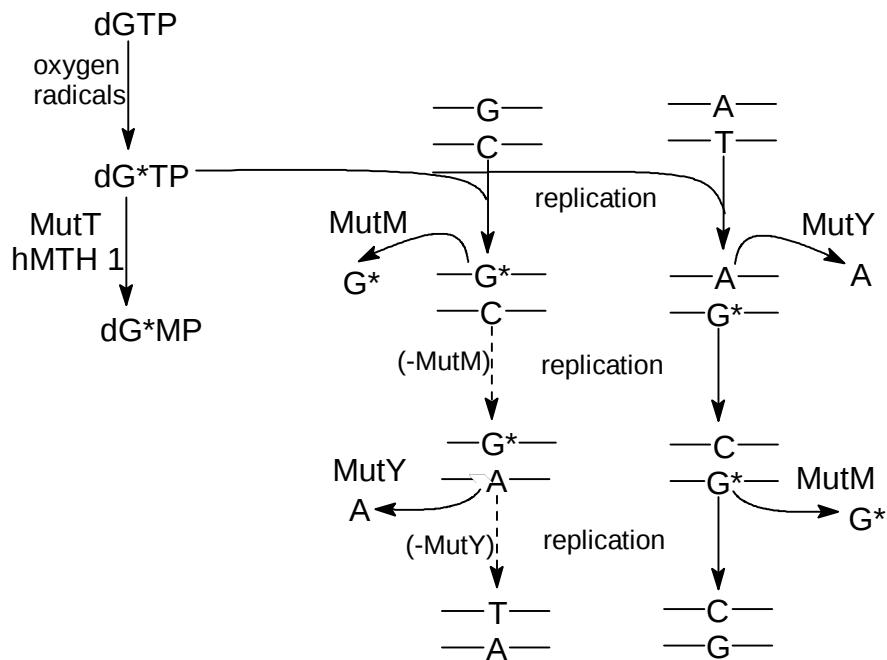


Abb. 2-5: Mögliche Basenpaare mit 8-Oxoguanin

8-Oxoguanin, welches mit einer relativ hohen Bildungsrate von ca. 178 pro Zelle und Tag entsteht [Shigenaga, 1989], kann dabei entweder durch einen direkten Angriff reaktiver Sauerstoffspezies auf Guanin in zellulärer DNA gebildet werden oder in replizierenden Zellen aus dem Einbau von 8-Oxo-7,8-dihydroguanosin-triphosphat (8-oxo-dGTP) aus dem freien Nukleotidpool stammen [Maki, 1992; Akiyama, 1989]. Dabei erfolgt die Oxidation von dGTP im Nukleotidpool wesentlich häufiger als die Oxidation von Guanin in zellulärer DNA [Kasai, 1991; Mo, 1992]. 8-Oxo-dGTP stellt ein äußerst potentes mutagenes Substrat für die DNA-Synthese dar, da es gegenüber Adenin und Cytosin der template-DNA eingebaut werden kann und somit G:C → T:A und A:T → C:G Transversionen induziert (siehe **Abbildung 2-6**) [Cheng, 1992]. Um die erforderliche hohe Genauigkeit der DNA-Replikation aufrecht zu erhalten und um Mutationen zu vermeiden, existiert deshalb in Zellen ein Reparatursystem, welches nicht nur 8-Oxoguanin aus der DNA entfernt, sondern auch Fehlpaarungen korrigiert und 8-oxo-dGTP im Nukleotidpool abbaut [Michaels, 1992]. Dieses System wurde zuerst in *E.coli* entdeckt und genau untersucht. Es setzt sich aus den drei Proteinen MutM, MutY und MutT (siehe **Abbildung 2-6**) zusammen.



G* 8-Oxoguanin

Abb. 2-6: Übersicht über die durch 8-Oxoguanin bedingte Mutagenese und ihre mögliche Vermeidung durch das Zusammenspiel der Enzyme MutM, MutY und MutT.

Bei dem MutM-Protein handelt es sich um die bereits seit längerem bekannte Fapy-DNA-Glykosylase, deren Substrat neben Formamidopyrimidinen (Fapy-Läsionen) auch 8-Oxoguanin ist. Dabei wird 8-Oxoguanin eher aus dem C:8-OHG-Paar entfernt als aus dem A:8-OHG Paar [Michaels, 1991b und 1992; Tchou, 1991; Chung, 1991; Cabrera, 1988]. Auch bei dem MutY-Protein handelt es sich um eine Glykosylase. Sie erkennt die A:8-OHG-Fehlpaarung und entfernt Adenin aus dem Basenpaar [Au, 1989; Nghiem, 1988]. Um einen Verlust der Geninformation bzw. einen Doppelstrangbruch zu vermeiden, bleibt MutY solange an der DNA gebunden, bis weitere Enzyme die Reparatur vervollständigen und verhindert somit, daß das 8-Oxoguanin von MutM erkannt und herausgeschnitten wird [Michaels, 1992c]. Diese Reparatur auf DNA-Ebene wird durch ein weiteres Enzym, MutT, unterstützt, welches den Abbau von 8-oxo-dGTP im Nukleotidpool katalysiert [Treffers, 1954]. Untersuchungen haben gezeigt, daß dabei eine nukleophile Substitution am eher selten angegriffenen β -Phosphat des 8-oxo-dGTPs erfolgt, wodurch es zur hydrolytischen Abspaltung von Pyrophosphat und zur Bildung des korrespondierenden Monophosphat (8-oxo-dGMP) kommt. Somit handelt es sich bei dem MutT Protein um eine Pyrophosphohydrolase (8-Oxo-2'-deoxyguanosin-5'-triphosphat-pyrophosphohydrolase) oder auch 8-oxo-dGTPase [Abeygunawardana, 1995; Maki, 1992; Fowler, 1997; Michaels 1992a und 1992b; Tajiri, 1995]. Da 8-Oxo-dGMP nicht wieder zum Triphosphat

rephosphoryliert werden kann, wird dadurch ein Einbau von 8-oxo-dGTP in die DNA vermieden. [Hayakawa, 1995; Sekiguchi, 1996]. Neuere Untersuchungen zeigten, daß auch in humanen Zellen ein homologes Reparatursystem existiert [Bessho, 1993; McGoldrick, 1995; Furuichi, 1994; Sekiguchi, 1996]. Das gebildete 8-oxo-dGMP wird in humanen Zellen durch ein weiteres Enzym, die 8-oxo-dGMPase, zum entsprechenden Nukleosid (8-oxo-dG) dephosphoryliert, welches rasch durch die Zellmembran transportiert wird. Extrazelluläre Nukleoside können im Urin ausgeschieden werden [Hayakawa, 1995].

2.3.2 8-Oxo-2'-deoxyguanosin-5'-triphosphat-pyrophosphohydrolase (8-oxo-dGTPase)

Der Abbau potenter mutagener Substrate der DNA-Synthese, wie z.B. 8-oxo-dGTP, stellt einen äußerst wichtigen Mechanismus zur Vermeidung von Replikationsfehlern, die dann zu Mutationen führen können, dar. In *E.coli* wird der Abbau des prämutagenen 8-oxo-dGTP von MutT katalysiert (siehe **Abschnitt 2.3.1**). MutT wird zu der Familie der „Nudix“-Hydrolasen gezählt, die alle die Hydrolyse von **Nukleosid-Diphosphaten**, die an einen Rest **X** gebunden sind hydrolysieren. Als Substrate der Nudix-Hydrolasen kommen neben NTPs, auch Coenzyme und NTP-Zucker etc. in Frage, die in verschiedenen metabolischen Stoffwechselwegen vertreten sind. Die Aufgabe dieser Nudix-Hydrolasen besteht darin, gefährliche Substanzen abzubauen, um eine Akkumulation, die zu einer Imbalance führen würde, zu vermeiden. Somit werden diese Enzyme auch zur Gruppe der „housecleaning“-Enzyme gezählt [Bessman, 1996].

Insgesamt sind bis jetzt sechs MutT verwandte Proteine - in *Proteus vulgaris*, *Streptococcus pneumoniae* [Kamath und Yanofsky, 1993; Bullions, 1994], Maus und Ratte [Kakuma, 1995; Cai, 1995] sowie im Menschen [Akiyama, 1987; Sakumi, 1993] - isoliert und identifiziert worden. Sie zeichnen sich neben derselben biologischen Funktion (8-oxo-dGTPase) durch eine ähnliche Größe und Aminosäuresequenz, die eine stark konservierte Region aufweist, aus. Kernresonanz-Spektren bestätigten die Annahme, daß es sich bei diesen 10 bis 23 identischen Aminosäuren dieser Region um das aktive Zentrum dieses Enzyms handelt [Weber, 1993]. Anhand ihrer Tertiärstruktur werden die 8-oxo-dGTPasen in die strukturelle Kategorie der $\alpha + \beta$ gefalteten Proteine eingeordnet. Eine β -Faltblattstruktur ist dabei in einer Art Sandwich zwischen zwei α -Helices angeordnet, die wiederum untereinander durch zwei lange Schleifen (loop I und loop II) miteinander verknüpft sind. Das für die Katalyse notwendige zweiwertige Kation wird in einem Cluster aus fünf Glutamatresten, die eine negativ geladene Tasche formen, gebunden. Daneben, in einer tiefen Spalte zwischen β -Faltblatt und loop I, wird 8-oxo-dGTP gebunden [Abeygunawardana, 1995]. Weitere Strukturanalysen zeigten, daß Lys38, Glu43, Arg51 und Glu52 in allen MutT-Homologen identisch und somit essentiell für die 8-oxo-dGTPase-Aktivität sind. Mutationen des Glu52 führen dazu, daß das divalente Kation (Mg^{2+}) nicht mehr gebunden werden kann, was mit einem Aktivitätsverlust verbunden ist [Cai, 1997; Yakushiji, 1997].

Das hMTH 1 Gen (**h**uman **MutT** **H**omologue) mit einer Größe von 9kb umspannt insgesamt 5 Exons und liegt auf dem Chromosom 7p22 [Furuichi, 1994; Oda, 1997]. Es wird in Abhängigkeit vom proliferierenden Status bzw. Replikationspotential des Gewebe- und Zelltyps exprimiert: Jurkat > HeLa > Testis > Thymus > Lunge > Leber > Niere und z.B. in der Haut Basalzellen > Suprabasalzellen [Oda, 1997; Wani, 1995]. Intrazellulär ist hMTH 1 im Zytosol und in der mitochondrialen Matrix lokalisiert [Kang, 1995]. Bei der Transkription entsteht zunächst eine prä-MTH 1 mRNA, die noch cis-Elemente enthält. Nach dem Spleißen wird überwiegend Typ I gebildet, der in den meisten Geweben vorliegt. Die intrazelluläre Lokalisation erfolgt über post-translationale Modifikationen. Welche Bedeutung die nachgewiesenen Polymorphismen haben, ist bis dato noch unklar [Oda, 1997; Kang, 1995]. Neue Untersuchungen haben gezeigt, daß im Gegensatz zum MutT-Protein von *E.coli* die humane 8-oxo-dGTPase nicht nur 8-oxo-dGTP, sondern auch zwei weitere oxidativ geschädigte Basen, 2-OH-dATP und 8-OH-dATP, zu den entsprechenden Monophosphaten abbaut. Dabei stellte sich heraus, daß die Affinität der humanen 8-oxo-dGTPase für 2-OH-dATP wesentlich höher ist als für 8-oxo-dGTP [Fujikawa, 1999]. Somit scheint die humane 8-oxo-dGTPase eine äußerst wichtige Schutzfunktion zu haben.

Die biologische Signifikanz der 8-oxo-dGTPasen spiegelt sich unter anderem darin wieder, daß bei MutT-negativen *E.coli*-Stämmen die Spontanmutationsrate um den Faktor 1000-10000 erhöht ist, wohingegen MutM-negative Stämme nur eine 10fach erhöhte Spontanmutationsrate aufweisen [Maki, 1992; Tajiri, 1995]. Ob auch Defekte im menschlichen hMTH 1 Gen (**h**uman **MutT** **h**omologue) oder im Genlocus mit einer höheren Mutationsrate und einem damit verbundenen erhöhten Krebsrisiko verbunden sind, bleibt in Zukunft zu klären.

3 Fragestellung

Wie in dem vorangegangenen Kapitel erläutert, spielen reaktive Sauerstoffspezies und Antioxidantien eine wichtige Rolle bei der Kanzerogenese. Eine oxidative Schädigung der DNA, 8-Oxoguanin, scheint dabei eine besondere Funktion zu übernehmen, was sich auch in der Existenz eines speziellen 8-Oxoguanin-Reparatursystems widerspiegelt. Neben der eigentlichen Reparatur des oxidativen Schadens und seiner Folgeschäden auf DNA-Ebene durch die beiden Glykosylasen MutM und MutY, ist besonders der Abbau des potenten mutagenen Substrates, 8-oxo-dGTP, durch die Pyrophosphatase MutT (8-oxo-dGTPase) von biologischer Signifikanz, was sich deutlich in der hohen Spontanmutationsrate von MutT-negativen *E.coli*-Stämmen zeigt. Dies deutet darauf hin, daß auch die humane 8-oxo-dGTPase eine wichtige Rolle bei der Mutagenese und Kanzerogenese spielen könnte.

In der vorliegenden Arbeit soll deshalb das Verhalten der humanen 8-oxo-dGTPase gegenüber oxidativen Streß untersucht werden. Dabei stehen folgende Fragen im Vordergrund:

- Wird die 8-oxo-dGTPase durch reaktive Sauerstoffspezies beeinflusst? Bewirken reaktive Sauerstoffspezies eine Induktion der hMTH1-Genexpression und/oder eine Steigerung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität?
- Handelt es sich dabei um adaptive Prozesse? Korreliert eine eventuelle Induktion mit der eingesetzten Konzentration? Welchen Einfluß hat die Zytotoxizität?
- Existieren Unterschiede im Verhalten der 8-oxo-dGTPase gegenüber den verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies? Bewirkt lediglich eine Veränderung des Redoxhaushaltes der Zelle eine Induktion der 8-oxo-dGTPase oder können nur spezifische reaktive Sauerstoffspezies die 8-oxo-dGTPase induzieren?
- Existieren zellspezifische Unterschiede?
- Ist eine Induktion der 8-oxo-dGTPase an die weiteren Enzyme der oxidativen Streßabwehr gekoppelt, wie. z.B. Katalase, Glutathion-Peroxidase und Superoxid-Dismutase? Existiert eventuell ein gemeinsamer Regulationsmechanismus?
- Welchen Einfluß haben Reduktionsmittel? Liegt eine Redoxregulation vor?

Der Einfluß der reaktiven Sauerstoffspezies auf die Expression der zu untersuchenden Gene soll mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR erfaßt werden. Dafür muß ein geeignetes PCR-Protokoll erstellt werden. Daneben soll auch die Aktivität der einzelnen Enzyme bestimmt werden. Um die 8-oxo-dGTPase Aktivität messen zu können, ist die Entwicklung eines geeigneten Verfahrens notwendig, welches eine sehr sensitive und spezifische Bestimmung der Aktivität direkt aus Zellkulturen erlaubt und somit für ein Screening und einen hohen Probendurchfluß geeignet ist. Nach einer genauen Charakterisierung der 8-oxo-dGTPase soll mit Hilfe des entwickelten Testsystems der Einfluß der Guanin-Nukleotide sowie ihrer 8-oxo-Derivate auf die 8-oxo-dGTPase-Aktivität ermittelt werden.

Die anderen Enzymaktivitäten (Katalase, Glutathion-Peroxidase, Superoxid-Dismutase) sollen mit bereits bestehenden Enzym-Assays bestimmt werden, die dafür auf eine Durchführung im Mikrotitermaßstab optimiert werden müssen. Veränderungen im Redoxhaushalt der Zelle sollen über die Bestimmung des Glutathion-Status erfaßt werden. Die Ermittlung der Zytotoxizität soll mit Hilfe des Trypanblau-Exklusionstests und der Bestimmung der extrazellulären Lactatdehydrogenase-Aktivität erfolgen.

Darüber hinaus soll die Rolle der 8-oxo-dGTPase bei der zellulären Differenzierung in der Zelllinie HT29 näher untersucht und mit denen der klassischen antioxidativen Enzyme verglichen werden. Dabei ist die Bearbeitung folgender Fragestellungen beabsichtigt:

- Wie verhalten sich die einzelnen Enzyme während der zellulären Differenzierung? Führt die Veränderung des Redoxhaushaltes der Zelle bei der zellulären Differenzierung zu einer Induktion der Genexpressionen und/oder der Enzymaktivitäten?
- Existieren Unterschiede in un- und ausdifferenzierten Zellen hinsichtlich der Aktivität und der Genexpression der zu untersuchenden Enzyme?

Ein weiterer Punkt soll sich mit dem Verhalten der 8-oxo-dGTPase gegenüber Tumorpromotoren beschäftigen. Diese Untersuchungen sollen in primären Rattenhepatozyten, die mit den Tumorpromotoren TPA und TCDD behandelt wurden, durchgeführt werden. Dabei stellen sich folgende Fragen:

- Bewirken Tumorpromotoren eine Induktion oder Repression der hMTH1-Genexpression und/oder der 8-oxo-dGTPase Aktivität? Ist dies vom jeweiligen Tumorpromoter abhängig?

Insgesamt soll diese Arbeit einen Beitrag dazu leisten, den Regulationsmechanismus der humanen 8-oxo-dGTPase aufzuklären, um dadurch die Funktion dieses Enzyms bei der Mutagenese und der Kanzerogenese besser zu verstehen.

4 Material und Methoden

Die verwendeten Substanzen mit Hinweisen zur Herkunft und Handhabung sind in Abschnitt 4.2 alphabetisch aufgeführt. Der Übersichtlichkeit halber werden sie in den einzelnen Abschnitten nicht wiederholt. Wenn nicht anders angegeben werden sämtliche Lösungen in A.dest. angesetzt.

4.1 Geräte

Robocycler Gradient 96	Stratagene, Heidelberg
Power Supply (E835)	Consort (Vertrieb: AGS GmbH, Heidelberg)
Speed Vac	Savant, Walter F.C. Ebel, Hamburg
Heizblock (Ori-Block OB-1)	Wesarg Medizintechnik, Hamburg
Elektrophoresekammer (GE-B2) mit Kamm (GE-B2-20c)	AGS GmbH, Heidelberg
ELISA-Reader (SLT-Spectra II)	SLT Labinstruments, Crailsheim
GelPrint 1000i-Dokumentationssystem	Biophotonics Corp., Ann Arbor, MI (USA)
Lichtmikroskop (Axioskop)	Carl Zeiss, Jena
Spectrophotometer (DU-64)	Beckman Instr. GmbH, München
Ultrazentrifuge (L8-70RUZ) mit Rotor SW-55TI	Beckman Instr. GmbH, München
Merck-Hitachi HPLC-Anlage: - Interface (D-6000) - UV/VIS Detektor (L-4200) - Intelligent Pump (L-6200) - Auto Sampler (655A-40)	Merck, Darmstadt
EC-Detektor (LC-1260)	ICI-Instruments, Victoria (AUS)
Plattenschüttler (MSI Minishaker)	IKA Works Inc., Wilmington; NC (USA)
Schüttler (4010)	Köttermann, Hänigsen
Zentrifuge (Biofuge 15R)	Heraeus Instr. GmbH, Hannover

4.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	R-Sätze	S-Sätze
Acetonitril	Merck, Darmstadt	11-23/24/25	16-27-45
Actinomycin D	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	45-46-61 26/27/28	45-36/37/39-22 -3/7/9
Äther	Merck, Darmstadt	12-19	9-16-29-33
Agarose	GIBCO, Eggenstein		
ALP-Detektion Kit	Sigma-Aldrich, Deisenhofen		
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt		
Ammoniumsulfat	Merck, Darmstadt		
Ascorbinsäure	Merck, Darmstadt		
Borsäure	Merck, Darmstadt	20/21/22-40-36/37/38	26-36-22
BSA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen		
BSA (PCR)	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio (USA)		
Buthioninsulphoxim	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	36/37/38	26-36
Butylhydroxianisol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	45-20/21/22-36/37/38	45-36/37/39-22
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen		
Catalase	Sigma-Aldrich, Deisenhofen		
Chloroform	Merck, Darmstadt	22-38-409-48/20/22	36/37
Collagenase (Typ II)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen		
Coomassie-Lsg.	Bio-Rad, München	10-20/22-34	7-26
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	26/27/28-36/37/38-63	45-26-22- 36/37/39
Diethanolamin	Merck, Darmstadt	36/38	26
DMSO	Merck, Darmstadt	36/38	26
DME	GIBCO, Eggenstein		
DNA-Leiter (123bp)	GIBCO, Eggenstein		
DTNB	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	36/37/38	26-36
DTT	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	36/37/38	26-36
EDTA	Merck, Darmstadt	22	
EGTA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen		
Eisen(II)chlorid	Merck, Darmstadt	22-38-41	26-39
Essigsäure	Merck, Darmstadt	10-35	23.2-26-45

Chemikalie	Hersteller	R-Sätze	S-Sätze
Ethanol	Merck, Darmstadt	11	7-16
Ethidiumbromid	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg	22/23-38-46	22-24/25-26
Fetales Kälberserum	GIBCO, Eggenstein		
Formaldehyd	Merck, Darmstadt	20/21/22-36/37/38-40-43	26-36/37-51
Gentamycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	61-20/21/22	45-36/37/39
Giemsa	Merck, Darmstadt	11-23/25	7-16-24-37-45
Glucose	Sigma-Aldrich, Deisenhofen		
Glutamin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen		
GSH	Sigma-Aldrich, Deisenhofen		
GSSG	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	36/37/38	26-36
GSH-Reduktase	Sigma-Aldrich, Deisenhofen		
Glycerol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	36	26-36
Guanidinthiocyanat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	20/21/22-31-36/37/38	26-36
dGMP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen		
dGDP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen		
dGTP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen		
HEPES	Merck, Darmstadt		
Isoamylalkohol	Merck, Darmstadt	10-20	24/25
Isopropanol	Merck, Darmstadt	11	7-16
KCl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	36/37/38	26-36
K ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt		
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt		
KIO ₄	Merck, Darmstadt	8	
KOH	Merck, Darmstadt	35	2-26-37/39
LDH-Detektion-Kit	Boehringer, Mannheim		
LDH	Boehringer, Mannheim		
May-Grünwald-Lsg.	Merck, Darmstadt	11-23/25	7-16-24-37-45
MgCl ₂ (PCR)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen		
MgCl ₂	Merck, Darmstadt		
MnCl ₂ · x 2H ₂ O	Merck, Darmstadt	22	
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt	22-24-36/37/38	23-26-36/37-45

Chemikalie	Hersteller	R-Sätze	S-Sätze
Methanol	Merck, Darmstadt	11-23/25	7-16-24-45
NAC	Sigma-Aldrich, Deisenhofen		
NADH	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	23/24/22-5-36/37/38	45-26-36-22
NADPH	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	23/24/22-5-36/37/38	45-26-36-22
Natriumacetat	Merck, Darmstadt		
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	46-26/27/28-32-5	45-36/37/39-22
Natriumbutyrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	20/21/22-36/37/38	26-36
NaCl	Merck, Darmstadt		
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen		
NaHCO ₃		36	22-26
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt		
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt		
NaOH	Merck, Darmstadt	35	2-26-37/39
dNTP	Pharmacia Biotech, Uppsala (S)		
Paraquat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	46-24/25	45-53-26-36/37/39
Penicillin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	20/21/22-42/43	36
Phenol	Amresco, Solon, Ohio (USA)	24/25-34	28.6-45
PMSF	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	26/27/28-34-15	45-36/37/39-22
Primer für die PCR	NAPS Göttingen GmbH, Göttingen		
Purpald	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	20/21/22-36/37/38	26-36
Random Hexamers	Pharmacia Biotech, Uppsala (S)		
RPMI-1640	GIBCO, Eggenstein		
Sacrosyl	Sigma-Aldrich, Deisenhofen		22-24/25
Salzsäure	Merck, Darmstadt	10-35	26-36/37/39-22
SOD	Sigma, Aldrich; Deisenhofen		
SSA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	22-36/37/38	26-36
Streptomycin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	61-20/21/22	45-36/37/39-22
Superscript II RNase H ⁻ -RT	Gibco, Eggenstein		
TCDD	Ökometra, Bayreuth	45-48-26/27/28	53-45-46-36/37/39
TBA-OH	Sigma-Aldrich, Deisenhofen		

Chemikalie	Hersteller	R-Sätze	S-Sätze
Thermoprime-DNA-Polymerase	Advanced Biotechnologies, Surrey (UK)		
TPA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	26/27/28-36/37/38-41-40	45-26-36/37/39
Triethanolamin	Merck, Darmstadt		
Tris	Merck, Darmstadt	36/38	
Tris (PCR)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	36/38	
Tris-HCl (PCR)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	36/38	
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	22-41	24-26-39
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	40	22-36/37
Trypsin-EDTA (10x)	GIBCO, Eggenstein	36/37/38-42	22-24-26-36/37
TNF α	Sigma-Aldrich, Deisenhofen		
2-Vinylpyridin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen	21-38	45-36/37/39-26-27
Wasserstoffperoxid	Merck, Darmstadt	34	3-26-36/37/39-45
WME	GIBCO, Eggenstein		
Xanthin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen		
Xanthin-Oxidase	Sigma-Aldrich, Deisenhofen		
Zitronensäure	Merck, Darmstadt		

4.3 Zellkultur

4.3.1 Isolierung humaner Hautfibroblasten

Die Gewinnung humaner Hautfibroblasten erfolgt aus der Vorhaut von Kindern bis zu 6 Jahren, die von der Kinderklinik des UKE (Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg) bezogen wird. Nach mehrmaligem Waschen mit sterilem Hanks-Puffer zur Entfernung der Erythrozyten wird das Gewebe in sehr kleine Stücke zerschnitten, die anschließend in eine mit RPMI-Vollmedium benetzte Zellkulturflasche (80 cm²) gebracht werden. Um die Wachstumsoberfläche zu bedecken, werden vorsichtig 5 ml RPMI-Vollmedium zugegeben, bevor die Zellkulturflasche bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert wird. Nach ein paar Tagen beginnen Fibroblasten aus dem Gewebe herauszuwachsen.

Die Gewebestücke werden nun vorsichtig entfernt, 20 ml RPMI-Vollmedium hinzugefügt und erneut bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert. Wenn sich stabile Kolonien gebildet haben, wird das Medium abgesaugt, die Hautfibroblasten mit 1 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (10x) abtrypsinisiert und die so erhaltene Zellsuspension auf 3 neue Flaschen mit frischem Medium verteilt.

- Hanks-Puffer: 5.4 mM KCl, 0.7 mM KH₂PO₄, 13 mM NaHCO₃, 137 mM NaCl, 0.6 mM Na₂HPO₄; eingestellt auf pH 7.35 und autoklaviert
- RPMI-Vollmedium: 10% FCS, 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin in RPMI 1640

4.3.2 Kultivierung humaner Hautfibroblasten

Die humanen Hautfibroblasten werden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen (80 cm²) in RPMI-Vollmedium kultiviert. Das Medium wird alle 2 Tage erneuert. Bei Erreichen von 80 - 90% Konfluenz werden die Zellen passagiert. Nach Absaugen des alten Mediums werden die Zellen mit 1 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (10x) abtrypsinisiert und die so erhaltene Zellsuspension auf 3 neue Flaschen mit frischem Medium verteilt. Die humanen Hautfibroblasten können so bis zu einem Zeitraum von max. 7 - 8 Wochen in Kultur gehalten werden.

Zum Einfrieren werden 1 – 2 x10⁶ Zellen pro ml eiskaltem FCS mit 10% DMSO versetzt. Die Aufbewahrung der Zellen erfolgt bei –80°C (Kurzzeitlagerung) oder in flüssigem Stickstoff (Langzeitlagerung). Beim Auftauen werden die Zellen mit 20 ml warmem Medium gewaschen und dann in Kultur gebracht.

- RPMI-Vollmedium: 10% FCS, 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin in RPMI 1640

4.3.3 Isolierung primärer Rattenhepatozyten

Die Gewinnung primärer Rattenhepatozyten erfolgt nach einem modifizierten Protokoll von Seglen [Seglen, 1976]. Es werden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von ca. 200 g verwendet. Die Tiere werden dazu mit Äther betäubt. Nach Tränkung von Bauch und Brust mit Alkohol und Abtrennung des Fells wird der Bauchraum geöffnet, so daß Darm und Leber freiliegen. Der Darm wird zur Seite geräumt, so daß die Pfortader freiliegt, in die eine Flügelkanüle (21G) eingestochen wird.. Über diese wird mittels einer Peristaltikpumpe Ca²⁺- und Mg²⁺-freier Hanks-Puffer (Lösung I) mit einer Fließgeschwindigkeit von 20 ml/min. in die Leber gepumpt, bis diese deutlich erblaßt. Anschließend wird die Vena Cava unterhalb der Leber abgeklemmt und oberhalb der Leber geöffnet, so daß Blut und Perfusat abfließen können.

Nach 6 Minuten wird über dasselbe Schlauchsystem eine auf 37°C temperierte Collagenase-Lösung (Lösung II) zugeführt und mit einer Geschwindigkeit von 20 ml/min. für 12 Minuten perfundiert. Die nun sehr weiche Leber wird dem Tierkörper entnommen, in eine sterile Petrischale überführt und mit der restlichen Lösung II übergossen. Zur Dissoziation der Leberzellen wird die Kapsel vorsichtig eingeritzt und mit der Keimzelle entfernt. Die Zellen können nun mittels eines groben, sterilen Metallkammes abgekämmt werden. Nach mechanischer Entfernung der groben Teile und Filtration durch sterile Gaze wird für 5 Minuten bei 50 x g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Zellpellet in Williams-Medium E (WME) resuspendiert, erneut abzentrifugiert und anschließend in 40 ml WME-Vollmedium aufgenommen. Zur Bestimmung von Zellzahl und Vitalität der isolierten Rattenhepatozyten wird der Trypanblau-Exklusionstest [4.5.1] herangezogen.

- Hanks-Puffer: 5.4 mM KCl, 0.7 mM KH₂PO₄, 13 mM NaHCO₃, 137 mM NaCl, 0.6 mM Na₂HPO₄; eingestellt auf pH 7.35 und autoklaviert
- Lösung I: 0.5 M EGTA, 10 mM HEPES, 4 mM NaOH, 0.1% Glucose in Hanks-Puffer, steril filtriert durch 0.2µ Nalgene-Filter
- Lösung II: 20.000 U Collagenase, 10 mM HEPES, 4 mM NaOH in WME-Vollmedium; steril filtriert durch 0.2µ Nalgene-Filter
- WME-Vollmedium: 10% FCS, 2 mM Glutamin, 50 µg/ml Gentamycin in WME

4.3.4 Kultivierung primärer Rattenhepatozyten

Die primären Rattenhepatozyten werden in Zellkulturdishen (Ø 6 cm) mit einer Zelldichte von 10⁶ lebenden Zellen pro dish in 5 ml WME-Vollmedium ausplattiert. Nach einer Anwachszeit von 2 h bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit wird das Medium gewechselt, um Gewebereste und die im Medium schwimmenden toten Zellen zu entfernen. Danach werden die Rattenhepatozyten in die entsprechenden Untersuchungen eingesetzt.

4.3.5 Kultivierung von Jurkat-Zellen

Die Zelllinie Jurkat stammt ursprünglich aus einem Patienten mit einer T-Zell-Leukämie [Gillis und Watson, 1980]. Die Lymphoblast-ähnlichen Zellen werden in RPMI 1640-Vollmedium bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle 2 Tage werden die Zellen passagiert und dabei im Verhältnis 1 : 4 mit frischem Medium verdünnt.

Zum Einfrieren werden 1 – 2 x 10⁶ Zellen pro ml eiskaltem FCS mit 10% DMSO versetzt. Die Aufbewahrung der Zellen erfolgt bei –80°C (Kurzzeitlagerung) oder in flüssigem Stickstoff (Langzeitlagerung). Beim Auftauen werden die Zellen mit 20 ml warmem Medium gewaschen und dann in Kultur gebracht.

- RPMI-Vollmedium: 10% FCS, 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin in RPMI 1640

4.3.6 Kultivierung von HT29-Zellen

Die Zelllinie HT29 stammt aus einem humanen Colon Adenokarzinom. Die epithelial-ähnlichen Zellen werden als ein schwach differenzierter Grad II Tumor eingestuft [Fogh und Trempe, 1975].

Die Zellen werden in DME-Vollmedium bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert und bei Erreichen von 80 - 90% Konfluenz passagiert. Dafür wird das alte Medium entfernt, die Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA (10x) abtrypsinisiert und die so erhaltene Zellsuspension auf 2 neue Zellkulturflaschen (80 cm²) mit frischem Medium gebracht.

Um vollständig differenzierte HT29 Zellen zu erhalten, werden die Zellen über einen Zeitraum von 31 Tagen mit 5 mM Natriumbutyrat behandelt, wobei alle zwei Tage das Medium gewechselt wird und die Zellen am 11. und am 25. Tag im Verhältnis 1 : 3 passagiert werden. Die Zellen können nach diesem Zeitraum in DME-Vollmedium kultiviert werden. [Augeron, 1984]

Zum Einfrieren werden 1 – 2 x10⁶ Zellen pro ml eiskaltem FCS mit 10% DMSO versetzt. Die Aufbewahrung der Zellen erfolgt bei –80°C (Kurzzeitlagerung) oder in flüssigem Stickstoff (Langzeitlagerung). Beim Auftauen werden die Zellen mit 20 ml warmem Medium gewaschen und dann in Kultur gebracht.

4.4 Mikroskopie

HT29-Zellen werden mit einer Zelldichte von 5 x10⁵ Zellen pro well in 4 ml DME-Vollmedium in einem 6-well-dish (Ø 3 cm/well) auf coverslips (Thermanox, Ø 2.5 cm) ausplattiert. Nach einer Anwuchszeit von 24 h wird das Medium abgesaugt. Die Fixierung und Färbung der Zellen erfolgt nach Pappenheim mit May-Grünwald- und Giemsa-Lösung. Dafür wird May-Grünwald-Lösung für 3 min., dann das gleiche Volumen A.dest. für 1 min. auf die coverslips bzw. Objektträger gegeben. Nach Absaugen der Färbelösung wird Giemsa-Lösung für 15 min. aufgetragen und anschließend mit A.dest. gewaschen. Die Präparate werden an Luft getrocknet und am Zeiss-Mikroskop unter Verwendung eines 64T Diafilms für Kunstlicht (Kodak) fotografiert.

- DME-Vollmedium: 10% FCS, 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/ml Streptomycin in DME
- PBS: 135 mM NaCl, 9 mM NaH₂PO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl
- Giemsa-Lösung: 1Tr. Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung in 1 ml A.dest.

4.5 Zytotoxizitätsuntersuchungen

4.5.1 Trypanblau-Exklusionstest

Die Vitalität von Zellen kann mit dem Trypanblau-Exklusionstest bestimmt werden. Grundlage dieser Methode ist das unterschiedliche Verhalten toter und lebender Zellen gegenüber Trypanblau. Dieser makromolekulare saure Farbstoff kann durch die intakte Zellmembran lebender Zellen nicht penetrieren (Trypanblau-negative Zellen), hingegen dringt er in geschädigte oder tote Zellen ein und bindet sich dort an Proteine (Trypanblau-positive Zellen). Das Ergebnis der Vitalitätsprüfung wird durch viele Parameter, wie Färbedauer, Temperatur, Farbstoffkonzentration und pH-Wert (maximale Aufnahme bei pH 7.5) beeinflusst, so daß für eine bessere Vergleichbarkeit diese Parameter konstant gehalten werden müssen [Lindl und Bauer, 1994].

Für die Bestimmung der Vitalität und der Zellzahl werden zu 800 µl Medium, 100 µl Trypanblaulösung und 100 µl der Zellsuspension pipettiert. Die Auswertung erfolgt mikroskopisch bei einer 10fachen Vergrößerung mit einer Neubauer Zählkammer, wobei 4 Quadrate ausgezählt werden.

Die Anzahl der lebenden Zellen und die Vitalität lassen sich mit folgenden Formeln berechnen:

$$\frac{\text{lebende Zellen}}{\text{ml}} = \frac{(\text{Gesamtzellzahl} - \text{Trypanblau-positive Zellen})}{4} \times 10^4$$
$$\text{viability}(\%) = \frac{(\text{Gesamtzellzahl} - \text{Trypanblau-positive Zellen})}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$$

4.5.2 Messung der extrazellulären Lactatdehydrogenase-Aktivität

Die Lactatdehydrogenase ist ein stabiles zytoplasmatisches Enzym, welches in jeder Zelle vorkommt. Bei Zerstörung der Zellmembran wird es in den Extrazellulärraum freigesetzt und kann dort als ein Parameter für Zytotoxizität bestimmt werden. Die Bestimmung der extrazellulären LDH-Aktivität erfolgt mit einem LDH-Kit, dessen Testprinzip in **Abbildung 4-1** dargestellt ist.

Humane Hautfibroblasten werden in einem 6-well-dish mit einer Zelldichte von 5×10^5 Zellen in 4 ml phenolrotfreiem RPMI-Vollmedium ausplattiert. Nach 24 h werden die Zellen mit den entsprechenden Substanzen für 24 h bzw. mit 0.5% Triton X-100 als Positivkontrolle für 1 h inkubiert. Für die LDH-Bestimmung wird das Medium abgenommen, die Zellen werden abtrysiniert, abzentrifugiert und für die Bestimmung des Proteingehalts [4.6] in 100 µl PBS aufgenommen.

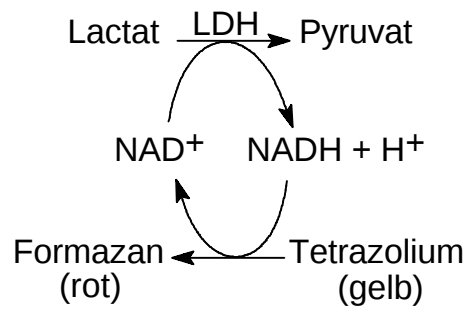


Abb. 4-1: Testprinzip der LDH-Aktivitätsbestimmung

Jurkat-Zellen werden mit einer Zelldichte von 1×10^6 in 5 ml phenolrotfreiem RPMI Vollmedium für 24 h mit den entsprechenden Substanzen bzw. mit 0.5% Triton X-100 als Positivkontrolle für 1 h inkubiert. Die Zellen werden durch Zentrifugation (5 min. bei $200 \times g$) vom Medium abgetrennt und für die Bestimmung des Proteingehalts [4.6] in 100 μ l PBS aufgenommen. Die LDH-Aktivität im Medium wird mit Hilfe eines LDH-Kits bestimmt. Dafür werden in einer 96-well-Mikrotiterplatte je 100 μ l Probe, blank (phenolrotfreies RPMI-Vollmedium) bzw. LDH-Standard (5.73 - 183.3 U/l) mit je 100 μ l Reaktionslösung für 7 min. im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 50 μ l 1N HCl je well erfolgt die Messung im ELISA-Reader bei 492 nm. Die so erhaltenen LDH-Werte werden auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe bezogen.

- RPMI- Vollmedium: 10% FCS, 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin, 50 μ g/ml Streptomycin in RPMI 1640 (ohne Phenolrot)
- PBS: 135 mM NaCl, 9 mM NaH₂PO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl
- Reaktionslösung 100 Tests: 125 μ l Lösung I + 5.63 ml Lösung II
(laut Hersteller): I = Katalysator, II = Farbstoff

4.6 Bestimmung des Proteingehalts nach Bradford

Proteinkonzentrationen können einfach, schnell und auch sensitiv (Nachweisgrenze: 5 μ g/ml) mit der von Bradford beschriebenen Methode bestimmt werden [Bradford, 1976]. Sie beruht darauf, daß sich das Nachweisreagenz Coomassie Brilliant Blue G-250 kovalent an die Sulfhydrylgruppen der Proteine bindet, wodurch sich das Absorptionsmaximum von 465 nach 595 nm verschiebt. Dabei ist die Menge des entstehenden Farbkomplexes proportional zur vorhandenen Proteinmenge.

Die Zellhomogenate werden im Verhältnis 1 zu 10 mit einer NaCl-Lösung verdünnt. Für die Kalibrierungskurve werden BSA-Lösungen der Konzentrationen 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 und 160 μ g/ml angesetzt.

Je well der 96-well-Mikrotiterplatte werden 50 µl Probe bzw. 50 µl 0.15 M NaCl (für den Nullabgleich) bzw. 50 µl der BSA-Eichlösung und 200 µl Coomassie-Lösung pipettiert. Nach 20 min. Inkubation im Dunkeln erfolgt die photometrische Messung bei 620 nm. Anhand der Kalibrierungskurve werden dann die Proteinkonzentrationen der Zellysate berechnet.

- NaCl-Lösung: 0.15 M NaCl in A.dest.
- Coomassie-Lösung: fertige Coomassie-Lösung 1:5 mit A.dest. verdünnt

4.7 Bestimmung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität

4.7.1 Synthese der 8-oxo-Guanin-Nukleotide

Die Synthese der 8-oxo-Guanin-Nukleotide 8-oxo-dGMP, 8-oxo-dGDP und 8-oxo-dGTP erfolgt nach einem modifizierten Protokoll von Kasai, Nishimura und Mo et. al. [Kasai und Nishimura, 1984; Mo et. al., 1992] 6 mM des jeweiligen Nukleotids dGMP, dGDP oder dGTP werden mit 30 mM Ascorbinsäure und 100 mM H₂O₂ in einem Natriumphosphatpuffer für 2 h bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Danach wird zum Abstoppen der Reaktion das Reaktionsgemisch bis zur weiteren Aufreinigung auf Eis gehalten.

- Natriumphosphatpuffer: 100 mM Na₂HPO₄, 100 mM Na₂HPO₄; pH 6.8

4.7.1.1 Aufreinigung von 8-oxo-dGMP und 8-oxo-dGDP

Die Abtrennung von 8-oxo-dGMP bzw. 8-oxo-dGDP vom Reaktionsgemisch erfolgt mittels HPLC. Als stationäre Phase wird ein Säulensystem bestehend aus einer PRP X-100 (100 x 4.1 mm, 10µ, Fa. Hamilton, Reno NV (USA)) und einer C18 Ultrasphere ODS-Säule (250 x 4.5 mm, 5µ, Fa. Beckman, München), als mobile Phase ein Citratpuffer verwendet. Das Injektions-volumen beträgt 100 µl, die Flußgeschwindigkeit 0.75 ml/min. bei der Aufreinigung von 8-oxo-dGMP und 1 ml/min. bei der Aufreinigung von 8-oxo-dGDP. Die Detektion der 8-oxo-Nukleotide erfolgt im UV bei 254 nm. Die Retentionszeiten betragen 20 min. für 8-oxo-dGMP, bzw. 32 min. für 8-oxo-dGDP. Die Fraktionen, die das jeweilige 8-oxo-Nukleotid enthalten, werden vereinigt und aufkonzentriert. Die so erhaltenen 8-oxo-Nukleotide werden mit einem weiteren HPLC-Reinigungsschritt entsalzt. Als stationäre Phase wird eine semipräparative C18 Ultrasphere ODS-Säule (250 x 10 mm, 5µ, Fa. Beckman, München) als mobile Phase 0.2% Essigsäure, 5% Methanol verwendet. Das Injektionsvolumen beträgt 1 ml, die Flußgeschwindigkeit 2.5 ml/min. Die Fraktionen mit dem jeweiligen Nukleotid werden erneut vereinigt und aufkonzentriert. Reinheit und Ausbeute der Präparation werden mittels elektrochemischer Messungen und UV-Spektrum-Analysen bestimmt. Die 8-oxo-Standards werden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

- Citratpuffer: 12.5 mM Zitronensäure, 25 mM Natriumacetat, 30 mM NaOH, 5% Methanol; pH 5.1

4.7.1.2 Aufreinigung von 8-oxo-dGTP

8-oxo-dGTP kann mittels der HPLC-Technik vom Reaktionsgemisch abgetrennt werden. Als stationäre Phase wird eine PRP X-100-Säule (100 x 4.1 mm, 10 μ , Fa. Hamilton, Reno NV (USA)), als mobile Phase 25 mM Zitronensäure, 7% Acetonitril (pH 5.4) verwendet. Das Injektionsvolumen beträgt 200 μ l und die Flußgeschwindigkeit 1 ml/min.. Die Detektion von 8-oxo-dGTP erfolgt im UV bei 254 nm bei einer Retentionszeit von 17 min.. Die Fraktionen mit 8-oxo-dGTP werden vereinigt, aufkonzentriert und über einen weiteren HPLC-Schritt entsalzt. Als stationäre Phase wird eine C18 Ultrasphere ODS-Säule (250 x 4.6 mm, 5 μ , Fa. Beckman, München), als mobile Phase 0.03% Ammoniumacetat, 5% Methanol verwendet. Die Flußgeschwindigkeit beträgt 1 ml/min. bei einem Injektionsvolumen von 100 μ l. Die 8-oxo-dGTP-Fractionen werden vereinigt und aufkonzentriert. Die Reinheit und die Ausbeute werden mittels elektrochemischer Messungen und UV-Spektrum-Analysen bestimmt.

4.7.2 Gewinnung des zellfreien Extraktes

4.7.2.1 Fällung mit Ammoniumsulfat

Als Grundlage für die Gewinnung des zellfreien Extraktes dienen die von Mo et. al. [1992] und Porter et. al. [1997] beschriebenen Methoden. Die gesamte Durchführung erfolgt bei 4°C. Die Zellpellets werden auf Eis aufgetaut und in 500 μ l Puffer A resuspendiert. Die Zellen werden durch viermaliges Passieren durch eine 25G Nadel und durch vier anschließende Einfrier- (Trockeneis: 3 min.) und Auftauzyklen (37°C: 3 min.) lysiert. Zum Ausfällen der Proteine werden 250 μ l einer gesättigten eiskalten Ammoniumsulfatlösung (pH 8.0) pipettiert und das Gemisch wird für 1 h auf Eis gehalten. Nach Zentrifugation bei 15.000 x g für 1 h wird zum Überstand 0.33 mg Ammoniumsulfat pro μ l Überstand gegeben und erneut für 30 min. auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 15.000 x g für 30 min. wird das Pellet in 400 μ l Puffer B resuspendiert und über Nacht gegen 500 ml Puffer B dialysiert (Dialysekassetten (10000 MWCO), Fa. Pierce Rockford IL (USA)). Das Dialysat (zellfreier Extrakt) wird bei 10.000 x g für 15 min. zentrifugiert und der Proteingehalt im Überstand mit der Bradford-Methode [4.6] bestimmt. Der Überstand wird bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

- Puffer A: 20 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 200 mM NaCl, 5% Glycerol, 0.5 mM PMSF; pH 8.0
- Puffer B: 20 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA, 2 mM DTT, 20 mM NaCl, 5 % Glycerol, 0.5 mM PMSF; pH 8.0

4.7.2.2 Ultrazentrifugation

Die Durchführung erfolgt bei 4°C. Die Zellpellets werden auf Eis aufgetaut und in 500 µl Tris-Puffer durch viermaliges Passieren durch eine 25G Nadel und vier Einfrier-Auftau-Zyklen (Trockeneis: 3 min, 37°C: 3 min.) lysiert. Die Zellysate werden für 2 h bei 150.000 x g und 4°C ultrazentrifugiert und anschließend über Nacht gegen 500 ml Tris-Puffer dialysiert (Dialysekassetten (10000 MCWO), Fa. Pierce Rockford IL (USA)).

Der Proteingehalt des zellfreien Extraktes wird nach der Methode von Bradford [4.6] bestimmt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

- Tris-Puffer: 20 mM Tris; pH 7.5 mit HCl eingestellt

4.7.3 8-oxo-dGTPase-Assay

Zur Abtrennung unspezifischer Phosphatasen, die die Bestimmungsmethode stören würden, werden 100 µl des unter 4.7.2.1 oder 4.7.2.2 gewonnenen zellfreien Extraktes in einem Zentrifugationsschritt bei 6000 x g für 30 min. durch eine 30 kDa cut-off Ultrafiltrationsmembran mit geringer Proteinbindung (Fa. Millipore) filtriert [Bialkowski, 1998].

Der eigentliche Assay wird bei 37°C durchgeführt. In einem totalen Volumen von 50 µl werden 5 mM MgCl₂, 0 – 40 µl Ultrafiltrat (Proteingehalt des zellfreien Extraktes: 0.15 – 1 mg/ml) in Tris-Puffer für 15 min. inkubiert. Die eigentliche Reaktion wird durch Zugabe von 8-oxo-dGTP [4.7.1] (Endkonzentration 40 µM) gestartet. Nach 5 - 120 min. werden 6 µl des Reaktionsgemisches entnommen und die Reaktion durch Zugabe einer EDTA-Lösung (molares Verhältnis: EDTA/Mg²⁺ = 3.3) abgestoppt. Die Proben werden im Verhältnis 1 : 50 mit H₂O (HPLC grade) verdünnt und bis zur analytischen Auftrennung bei 4°C gelagert.

- Tris-Puffer: 100 mM Tris; pH 8.0 mit HCl eingestellt

- EDTA-Lösung: 50 mM EDTA

4.7.4 HPLC-Analyse

Die analytische Auftrennung der unter 4.7.3 gewonnenen Proben erfolgt mittels HPLC. Als stationäre Phase wird eine C18 Ultrasphere ODS-Säule (250 x 4.6 mm, 5µ, Fa. Beckman, München), als mobile Phase Natriumphosphatpuffer verwendet. Das Injektionsvolumen beträgt 100 µl, die Flußgeschwindigkeit 1 ml/min.. Die Detektion erfolgt im UV bei 290 nm (sämtliche Nukleotide) und elektrochemisch bei +600 mV (nur 8-oxo-Nukleotide).

Zur quantitativen Auswertung wird im elektrochemischen Chromatogramm die 8-oxo-dGMP-Konzentration mittels der Software HPLC-Manager (Version 1.4 von Hitachi, Vertrieb über Merck, Darmstadt) ermittelt. Da die Empfindlichkeit des EC-Detektors schwankt, wird er vor jedem HPLC-Lauf mit 0.8 µmol 8-oxo-dGMP kalibriert. Zur Bestimmung der Aktivität wird die

8-oxo-dGMP-Konzentration gegenüber der jeweiligen Zeit (5 - 120 min.; siehe 4.7.3) aufgetragen und die Steigung berechnet. Die so erhaltenen Werte werden auf die Proteinkonzentrationen der zellfreien Extrakte bezogen.

- Natriumphosphatpuffer: 200 mM NaH₂PO₄, 200 mM Na₂HPO₄, 2.5 mM TBA-OH, 10% Methanol; pH 6.0

4.8 Aktivitätsbestimmung antioxidativer Enzyme

4.8.1 Messung der Katalase-Aktivität

Die Katalase-Aktivität wird nach der von Johansson beschriebenen Methode bestimmt, bei der die peroxidierende Funktion der Katalase ausgenutzt wird [Johanson, 1988]. Das Meßprinzip beruht darauf, daß in Gegenwart von Methanol als H-Donor Formaldehyd gebildet wird, welches mit dem Chromogen Purpald (4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol, I) zu einem bicyclischen Heterozyklus (II) reagiert, welcher bei 550 nm absorbiert.

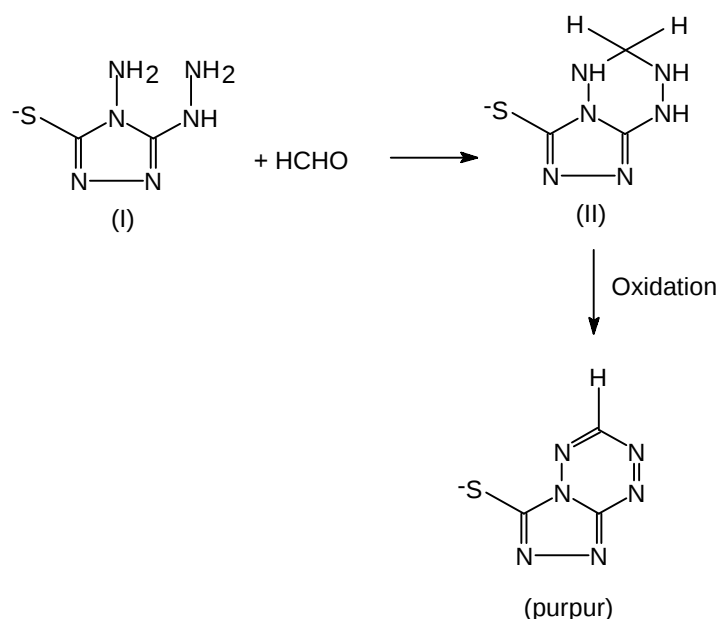


Abb. 4-2: Testprinzip der Katalase-Aktivitätsbestimmung nach Johansson

In einer 96-well-Mikrotiterplatte werden pro well 5 – 50 µl zellfreier Extrakt [4.7.2.2] (Proteinkonzentration: ~10µg), bzw. 50 µl Catalase-Standard (Konzentrationsbereich: 0.125 - 2 µg/ml) mit 25 µl Methanol, 6 µl H₂O₂ und 25 µl Puffer für 20 min. bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl KOH und 100 µl Purpald-Lösung wird für weitere

10 min. bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Danach werden je well 50 µl KIO₄-Lösung zugegeben und die Absorption bei 550 nm vermessen. Als Nullabgleich wird 50 µl Puffer an Stelle der Probe eingesetzt. Anhand der Catalase-Eichkurve werden die Catalase-Aktivitäten der Proben berechnet und auf die dazugehörige Proteinkonzentration [4.6] bezogen.

- Puffer: 25 mM NaOH, 25 mM KH₂PO₄; pH 7.0
- KOH: 7.8 M KOH in A.dest.
- Purpald-Lösung: 34.2 mM Purpald, 480 mM HCl in A.dest.
- KIO₄-Lösung: 65.2 mM KIO₄, 470 mM KOH in A.dest.
- H₂O₂: 20 mM H₂O₂ in A.dest.

4.8.2 Messung der Superoxid-Dismutase-Aktivität

Das Meßprinzip der von Paoletti beschriebenen Methode zur Messung der Superoxid-Dismutase-Aktivität beruht auf der Hemmung der durch Superoxid gesteuerten NADH-Oxidation in Gegenwart von Superoxid-Dismutase [Paoletti, 1986]. Dabei wird als Superoxid-generierendes System eine Lösung aus EDTA und MnCl₂ verwendet. Die photometrische Messung der Reaktionskinetik erfolgt bei 340 nm mittels des Programmes Spectra [Knüppel, 1995].

Zur Messung der SOD-Gesamtaktivität werden in einer 96-well-Mikrotiterplatte pro well 20 µl zelfreier Extrakt [4.7.2.2], bzw. SOD-Standard (Konzentrationsbereich 0 - 40ng) mit 150 µl Tea-Dea-Puffer, 8 µl NADH-Lösung und 5 µl EDTA/MnCl₂-Lösung für 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl Mercaptoethanol wird über einen Zeitraum von 20 min. mittels des Programmes Spectra die Änderung der Absorption bei 340 nm detektiert. Dabei werden für die Messung folgende Parameter ausgewählt:

- Schüttelmodus: kein Schütteln
- Zeit zwischen den Meßzyklen: 40 sec.
- Anzahl der Meßzyklen: 30
- Meßfilter: 340 nm

Für den Nullabgleich wird an Stelle der Probe 20 µl Tea-Dea-Puffer eingesetzt.

Zur Berechnung der Inhibitionsrate nach $(\text{sample rate} / \text{control rate}) \times 100 = \% \text{ Inhibition}$ wird die Änderung der Absorption 5 min. nach Zugabe des Mercaptoethanols über ein Zeitintervall von 8 min. herangezogen (15. - 30. Meßzyklus). Die Eichgerade wird erhalten, indem die entsprechende % Inhibition gegen den log der SOD-Standard-Konzentrationen aufgetragen wird. Anhand der Eichgeraden werden die SOD-Gesamtaktivitäten der Proben berechnet und auf die Proteinkonzentration [4.6] bezogen.

- Tea-Dea-Puffer: 100 mM Tea, 100 mM Dea; pH 7.4 mit HCl einstellen
- NADH-Lösung: 7.5 mM NADH in A.dest.
- EDTA/MnCl₂-Lösung: 100 mM EDTA, 50 mM MnCl₂ in A.dest.
- Mercaptoethanol: 10 mM Mercaptoethanol in A.dest.

4.8.3 Messung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität

Die Bestimmung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität wird nach einer Methode von Flohe und Günzler durchgeführt [Flohe und Günzler, 1984 und 1985]. Das Testprinzip ist in **Abbildung 4-3** dargestellt. Das bei der Glutathion-Peroxidase-Enzymreaktion (GPx) gebildete GSSG wird durch einen Überschuß an Glutathion-Reduktase (GR) im Reaktionsansatz wieder zu GSH reduziert. Die gleichzeitige Oxidation von NADPH wird photometrisch bei 340 nm verfolgt.

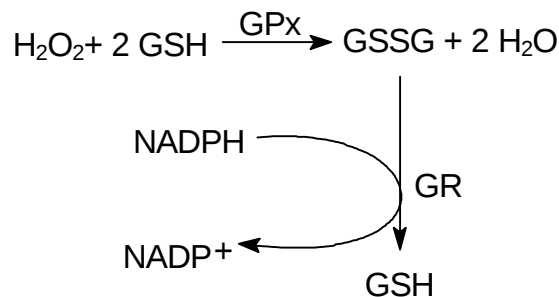


Abb. 4-3: Testprinzip der GPx-Aktivitätsbestimmung

Für die Bestimmung der Glutathion-Peroxidase-Aktivität werden in einer 96-well-Mikrotiterplatte je well 20 µl zellfreier Extrakt [4.7.2.2] mit 100 µl Phosphatpuffer, 20 µl GSH-Lösung und 20 µl Glutathion-Peroxidase-Lösung für 10 min. bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl NADPH-Lösung wird die H₂O₂-unabhängige Reaktion (A) über 3 min. bei 340 nm mittels des Programmes Spectra aufgenommen. Danach wird zu jedem well 20 µl H₂O₂-Lösung pipettiert und über 5 min. bei 340 nm die H₂O₂-abhängige Reaktion (B) mittels des Programmes Spectra aufgenommen. Dabei werden für die Messungen folgende Parameter ausgewählt:

- Schüttelmodus: kein Schütteln
- Zeit zwischen den Meßzyklen: 10 sec.
- Anzahl der Meßzyklen: 18 bei Aufnahme der Reaktion A
30 bei Aufnahme von Reaktion B
- Meßfilter: 340 nm

Zur Messung der nicht-enzymatischen Reaktion (C) wird an Stelle der Probe 20 µl Phosphatpuffer eingesetzt.

Für die Kalkulation wird die von der Glutathion-Peroxidase abhängige Reaktion (D) wie folgt berechnet: $A - (B + C) = D$.

Die Umrechnung in mU GPx / mg Protein erfolgt nach Maestro und McDonald [in Greenwald 1985] gemäß:

$$\frac{\text{mU GPx}}{\text{mg Protein}} = \frac{D \times V_t \times 2 \times 1000}{6.22 \times V_s \times (\text{Prot.} / \text{ml})}$$

mit D = GPx-abhängige Reaktion

V_t = Gesamtvolumen (200 µl)

V_s = Volumen der Enzymprobe (20 µl)

2 = 2 GSH pro NADPH

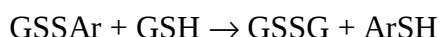
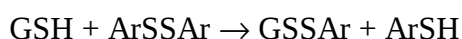
6.22 = millimolarer Extinktionskoeffizient von NADPH

1000 = Umrechnungsfaktor auf mU

- Phosphatpuffer: 0.1 M K_2HPO_4 , 0.1 M KH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 1 mM NaN_3 ; pH 7.0
- GSH-Lösung: 10 mM in A.dest.
- NADPH-Lösung: 1.5 mM NADPH in 0.1% NaHCO_3
- H_2O_2 : 1.5 mM H_2O_2 in A.dest.
- GSH-Reduktase (GR): 2.4 U/ml GR in Phosphatpuffer

4.9 Glutathionbestimmung

Geringe Mengen an Glutathion (oxidiert und reduziert) können nach einer kolorimetrischen Methode nach Vandeputte bestimmt werden [Vandeputte, 1994]. Die Methode beruht darauf, daß das Nachweisreagenz 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) in Gegenwart katalytischer Mengen GSH durch Zugabe von NADPH/ H^+ reduziert wird, wodurch eine Farbintensivierung bei 412 nm beobachtbar ist. Die Nachweisgrenze kann durch einen cyclischen Prozeß begünstigt werden. Dabei wird GSSG enzymatisch durch Zugabe von Glutathion-Reduktase zu GSH reduziert, das mit dem DTNB (auch ArSSAr) zu dem farbigen 5-Thio-2-nitrobenzoat-Ion (ArSH) und einem gemischten Disulfid (GSSAr) reagiert. Das gemischte Disulfid wird von GSH reduktiv gespalten, wobei ein weiteres farbiges Ion und GSSG entsteht, das erneut in den Zyklus eintreten kann [Owens, 1965; Baker, 1990]:



Durch eine indirekte kinetische Messung am ELISA-Reader mit Hilfe des Programmes Spectra wird die Rate der Farbproduktion, die proportional zur Gesamtglutathionkonzentration der Probe ist, über einen bestimmten Zeitraum gemessen.

Die Bestimmung des GSH und GSSG-Gehaltes erfolgt im nicht dialysierten zellfreien Extrakt [4.7.2.2]. Dafür werden 150 µl des zellfreien Extraktes mit HCl angesäuert (Endkonzentration 10 mM) und anschließend mit 50 µl SSA-Lösung zur Ausfällung der Proteine für 10 min. auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 2000 x g bei 4°C für 15 min. wird der Überstand abgenommen und bis zur Messung bei -20°C gelagert (max. 8 Tage).

Für die GSH-Bestimmung werden je well einer 96-well-Mikrotiterplatte 20 µl des Überstandes, bzw. der GSH-Standards (0.5 - 8 nmol/ml), 20 µl Puffer sowie 200 µl *daily reagent* pipettiert und für 2 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen. In der Zwischenzeit werden die Plattenbelegung für die spätere Auswertung am Computer und die Meßparameter für die Photometersteuerung im Programm „Spectra“ festgelegt. Dabei werden für alle Messungen folgende Parameter ausgewählt:

- Schüttelmodus: schwaches Schütteln außen
- Schüttelzeit: 5 sec.
- Zeit zwischen den Meßzyklen: 15 sec.
- Anzahl der Meßzyklen: 25
- Meßfilter: 405 nm

Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von 40 µl GSSG-Reduktase gestartet und die Platte sofort vermessen.

Für die GSSG-Bestimmung werden 100 µl des Überstandes mit 5 µl 2-Vinylpyridin zur Derivatisierung des vorhandenen GSH versetzt und 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Anschließend werden je well 40 µl des derivatisierten Überstandes bzw. des GSSG-Standards (0.25 – 4 nmol/ml) sowie 200 µl *daily reagent* pipettiert und nach rascher Zugabe von 40 µl GSSG-Reduktase die kinetische Messung gestartet. Als Nullabgleich wird bei beiden Messungen 40 µl Puffer an Stelle der Probe eingesetzt.

Zur Auswertung werden die erhaltenen Extinktionswerte gegenüber der Zeit aufgetragen und die Steigung des linearen Bereiches der für enzymatische Reaktionen typischen Michaelis-Menten-Kurve wird ermittelt. Die Glutathionkonzentrationen der Proben ergeben sich durch Einsetzen der ermittelten Steigungen in die entsprechende Eichgerade. Sie werden auf die Proteinkonzentration [4.6] der jeweiligen Probe bezogen. Zur Fehlerminimierung wird bei jeder Messung eine Eichgerade mit aufgenommen.

- Puffer: 143 mM NaH₂PO₄, 6.3 mM EDTA; pH 7.4 mit NaOH einstellen
- *daily reagent*: 0.4 mM NADPH, 1 mM DTNB in Puffer
- SSA-Lösung: 6.5% (w/v) SSA in A.dest.
- GSSG-Reduktase: 8.5 IU/ml in Puffer
- Standards: 0.5 – 8 nmol/ml GSH, bzw. 0.25 – 4 nmol/ml GSSG in 10 mM HCl, 1.3% SSA

4.10 Nachweis der Differenzierung in HT29-Zellen

Ein biochemisches Kennzeichen für die Differenzierung in HT29 Zellen ist die gesteigerte Alkalische Phosphatase (ALP) Aktivität.[*Tsao, 1982*] Diese kann mittels eines ALP-Detektions-Kits in der Probe bestimmt werden. Dabei wird gemäß:



die Bildung von p-Nitrophenol bei 405 nm photometrisch verfolgt. Die ALP-Aktivität der Probe ist dabei direkt proportional zur Zunahme der Absorption bei 405 nm [*Bowers und McComb, 1966*].

Für die Bestimmung der ALP-Aktivität werden in einer 96-well-Mikrotiterplatte 200 µl ALP-Reagenz mit 4 µl zellfreiem Extrakt [4.7.2.1 und 4.7.2.2] für 1 min. inkubiert und anschließend über 10 min. die Absorption bei 405 nm mittels des Programmes Spectra aufgenommen. Dabei werden für die Messung folgende Parameter ausgewählt:

- Schüttelmodus: schwaches Schütteln innen
- Schüttelzeit: 5 sec.
- Zeit zwischen den Meßzyklen: 30 sec.
- Anzahl der Meßzyklen: 20
- Meßfilter: 405 nm

Für den Nullabgleich wird an Stelle der Probe 4 µl A.dest. eingesetzt.

Zur Auswertung werden die erhaltenen Absorptionswerte gegenüber der Zeit aufgetragen und die Steigung des linearen Bereiches (ΔA per min.) bestimmt. Die ALP-Aktivität wird nach folgender Gleichung berechnet:

$$ALP(U/l) = \frac{\Delta A \text{ per min.} \cdot x V_t}{18.45 \cdot x V_s}$$

mit V_t = Gesamtvolumen (204 µl)

V_s = Probenvolumen (4 µl)

18.45 = millimolarer Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol bei 405 nm

Die so erhaltenen ALP-Aktivitäten werden auf den Proteingehalt [4.6] der Probe bezogen. Daneben kann auch die erhöhte ALP-Genexpression als ein Marker für Differenzierung in diesem Zellsystem herangezogen werden [zur Bestimmung siehe 4.11].

- ALP-Reagenz 16 mM p-Nitrophenyl-Phosphat, 274 mM Mannitol, 4 mM Mg^{2+} ,
(laut Hersteller): 0.05% NaN_3 in Puffer; pH 10.2

4.11 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

4.11.1 Isolierung von RNA aus Zellen

Die Isolierung von RNA aus den jeweiligen Zellkulturen (Jurkat [4.3.5], HT29 [4.3.6], Hautfibroblasten [4.3.2], primäre Rattenhepatozyten [4.3.4]) erfolgt nach einem modifizierten Protokoll von Chomczynski und Sacchi, bei dem mittels eines einzelnen Extraktionschrittes mit einem sauren Guanidin-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Gemisch die totale RNA aus Zellen oder Gewebe mit hoher Ausbeute gewonnen werden kann [Chomczynski und Sacchi, 1987].

Für die RNA-Isolierung werden je Ansatz die Zellen mit einer Dichte von $1-2 \times 10^6$ Zellen ausplattiert und nach einer Zeitspanne von 24 h bzw. 2 h bei den primären Rattenhepatozyten [4.3.4] mit den entsprechenden Testsubstanzen behandelt. Die geernteten Zellpellets werden mit 5 ml PBS gewaschen und anschließend mit 800 μ l Solution D lysiert. Nacheinander werden 80 μ l Natriumacetat-Lösung, 800 μ l Phenol und 160 μ l CIA-Lösung zugegeben, jeweils gut gemischt und anschließend für 30 min. auf Eis inkubiert. Zur Phasentrennung wird die Emulsion bei 4°C, 12.000 x g für 15 min. zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wird sauber abgenommen, mit demselben Volumen an eiskaltem Isopropanol vermischt und die RNA mindestens 1 h bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation bei 4°C und 12.000 x g für 15 min. wird der Überstand verworfen, das Pellet in 200 μ l Solution D gelöst, 200 μ l eiskaltes Isopropanol zugegeben und die RNA erneut für 45 min. bei -20°C gefällt. Danach wird wie nach der ersten Fällung zentrifugiert, das Pellet zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen und an der SpeedVac 6 min. getrocknet. Die RNA-Pellets werden in 10 - 20 μ l aqua ad iniectabilia aufgenommen und zum Lösen der RNA zunächst für 30 min. auf Eis gestellt, danach für 3 min. auf 65°C erhitzt und rasch wieder auf 0°C abgekühlt.

Die RNA-Proben können bis zu einem Jahr bei -80°C gelagert werden.

- Solution D: 6.3 M Guanidin-Thiocyanat, 40 mM Natriumcitrat (pH 7.0),
 0.8% Sarcosyl, 0.1 M DTT in aqua ad iniectabilia
- Natriumacetat-Lösung: 2 M Natriumacetat in aqua ad iniectabilia; pH 4.0; autoklaviert
- CIA-Lösung: $CHCl_3$: Isoamylalkohol 49:1 (V/V)
- Phenol: Phenol mit H_2O gesättigt; pH 4.5

4.11.2 Photometrische Bestimmung des RNA-Gehaltes

Zur photometrischen Gehalts- und Reinheitsbestimmung der RNA-Proben werden die UV-Spektren (260 - 350 nm) am Spektrophotometer mittels der Software Quant I, Programm 02 (Beckman, München), aufgenommen. Dafür werden 2 µl der unter **4.11.1** gewonnenen RNA im Verhältnis 1:100 mit aqua ad iniectabilia verdünnt, in Halbmikroliter-Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm pipettiert und vermessen. Eine Extinktion von 1.0 entspricht dabei ungefähr einer Konzentration von 40 µg/ml RNA [Maniatis, Fritsch und Sambrook, 1982]. Somit berechnet sich der RNA-Gehalt wie folgt:

$$\text{OD}_{260} \times 0.04 \text{ µg/µl} \times 100 = \text{µg RNA/µl}$$

Ein Maß für die Reinheit der RNA stellt das Verhältnis aus der Extinktion bei der Wellenlänge $\lambda = 280 \text{ nm}$ (OD_{280}) zur Extinktion bei der Wellenlänge $\lambda = 260 \text{ nm}$ (OD_{260}) dar. Er sollte größer als 1.5 sein.

4.11.3 Semiquantitative RT-PCR zur Bestimmung der Genexpression

Die Durchführung der RT-PCR erfolgt nach einem modifizierten Protokoll nach Maniatis et. al. und Gassen [Maniatis, Fritsch und Sambrook, 1982; Gassen, 1994].

4.11.3.1 Reverse Transkription (RT)

Die wie unter **4.11.1** beschriebene isolierte Gesamt-RNA wird mit Hilfe einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dafür werden in einem Gesamtvolumen von 50 µl 1 µg totale RNA mit 50 mM dNTPs, 250 pM random Hexamers und 100 U Superscript II RNase H⁻ reverse-Transkriptase in 1x PCR-Puffer I bei 37°C für 60 min. inkubiert. Danach wird das Enzym für 3 min. bei 94°C inaktiviert und der Reaktionsansatz auf 4°C abgekühlt. Die so erhaltene cDNA wird ohne weitere Aufarbeitung direkt in die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) eingesetzt [4.11.3.2] oder bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

- 10x PCR-Puffer I: 0.5 M KCl, 0.1 M Tris-HCl (pH 9.3), 0.03 M MgCl₂; 1 mg/ml BSA
in aqua ad iniectabilia

4.11.3.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die 1984 von Kary Mullis entwickelte Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, wobei spezifische DNA-Sequenzen *in vitro* in einem einzigen Reaktionszyklus mit hoher Ausbeute amplifiziert werden. Das Reaktionsprinzip der PCR entspricht der Replikation der DNA in der Zelle, bei der eine DNA-Polymerase neue DNA an einer vorhandenen Nucleinsäure-Matrize, nach Hybridisierung von spezifischen

Nukleotidsequenzen (Primern) als Startsignal, synthetisiert. Die gesamte Reaktion basiert auf drei Teilschritten, die ständig wiederholt werden:

1. **Denaturierung:** Bei 94°C wird die DNA in Einzelstränge aufgeschmolzen. Die Reassoziaton der Einzelstränge wird durch ein schnelles Abkühlen vermieden.
2. **Annealing:** Bei der optimalen Hybridisierungstemperatur (50 – 65°C) lagern sich die Oligonukleotidprimer an die komplementären DNA-Matrizenstränge an und dienen so als Startmoleküle für die DNA-Polymerase
3. **Extension:** Bei 72°C erfolgt in Anwesenheit von dNTPs die Neusynthese des DNA-Doppelstranges, wodurch sich in jedem Zyklus die Menge des von den Primern eingerahmten Matrizenfragments verdoppelt und im folgenden Zyklus zum Ausgangsmaterial wird.

Die theoretische Amplifizierung einer PCR wird im allgemeinen mit der Formel $A = A_0 \times 2^n$ beschrieben, wobei n die Anzahl der PCR-Zyklen, A die Konzentration und A_0 die Anfangskonzentration der Zielsequenz ist. Sie wird häufig durch den Parameter Effizienz E zu $A = A_0 \times (1 + e)^n$ korrigiert, der berücksichtigt, daß die DNA-Synthese durch verschiedene Faktoren, wie z.B. Zielsequenzlänge, thermodynamische Eigenschaften der Primer etc., beeinflusst wird. Eine typische Amplifikation verläuft zunächst exponentiell, dann praktisch linear und erreicht schließlich ein Plateau. Dieser Verlauf kann zum einen durch die fortschreitende Inaktivierung der DNA-Polymerase und zum anderen durch eine ineffiziente Primeranlagerung bei hoher Kopienzahl erklärt werden. Für die Quantifizierung von PCR-Produkten wird deshalb der lineare Bereich vor Erreichen der Plateau-Phase herangezogen, der bei einer Startkopienzahl von 12 – 4000 bis zum 45. Zyklus geht.

Die Sequenzen, der in dieser Arbeit untersuchten Gene ALP, SOD1, SOD2, CAT, GPx, GAPDH, hMTH1 und 8-oxo-dGTPase (Ratte) stammen aus den Datenbanken *embl* und *genbank*. Die entsprechenden Primerpaare werden mit dem Programm Oligo (Version 5.0, National Biosciences Inc., Plymouth, USA) ermittelt:

1. **GAPDH:**

Sequenzlänge 1268 bp

Referenz: *Tokunaga et. al., 1987*

verwendete Primer: 5' CCA TGG AGA AGG CTG GGG 3'
 5' CTA AGC AGT TGG TGG TGC A 3'

Produktlänge: 163 bp

Optimale Annealingtemperatur: 58°C

2. SOD2:

Sequenzlänge: 976 bp

Referenz: *Ho und Crapo, 1988*

verwendete Primer: 5' TCC CCG ACC TGC CCT ACG ACT 3'
 5' AAA CAA AGC CAA CCC CAA CCT 3'

Produktlänge: 373 bp

Optimale Annealingtemperatur: 59.1°C

3. SOD1:

Sequenzlänge: 874 bp

Referenz: *Hallewell et. al., 1985*

Verwendete Primer: 5' GAG TTA TGG CGA CGA AGG 3'
 5' AGT CTG GCA AAA TAC AGG TCA 3'

Produktlänge: 707 bp

Optimale Annealingtemperatur: 53.9°C

4. CAT:

Sequenzlänge: 2279 bp

Referenz: *Quan et. al., 1986*

Verwendete Primer: 5' GCT GAC ACA GTT CGG GAC CCT CGT G 3'
 5' CTG GGA AAG TCT CGC CGC ATC TTC A 3'

Produktlänge: 399 bp

Optimale Annealingtemperatur: 58,8°C

5. GPx:

Sequenzlänge: 1603 bp

Referenz: *Takahashi et. al., 1990*

Verwendete Primer: 5' GCC TCC CCT TAC AGT GCT TGT 3'
 5' TGA GCT TGG GGT CGG TCA TAA 3'

Produktlänge: 499 bp

Optimale Annealingtemperatur: 61.6°C

6. hMTH1:

Sequenzlänge: 676 bp

Referenz: *Sekiguchi 1993 und Sakumi et.al., 1993*

Verwendete Primer: 5' GAG CGG CGG TGC AGA ACC 3'
 5' CGG CTC TGC GCC ACT CAA 3'

Produktlänge: 588 bp

Optimale Annealingtemperatur: 61.9°C

7. ALP:

Sequenzlänge: 2463 bp

Referenz: *Lowe und Strauss, 1990*

Verwendete Primer: 5' CCC TTG ACA CCA CGC CCT TTG 3'
 5' CCC CAC CAC AGC AGC CTC CTT 3'

Produktlänge: 334 bp

Optimale Annealingtemperatur: 61.4°C

8. 8-oxo-dGTPase (Ratte):

Sequenzlänge: 868 bp

Referenz: *Cai et. al., 1995*

Verwendete Primer: 5' AGG GGC TGG TAT TTT CTG TTT 3'
 5' CGG GGT TCA TTT TGG GCT CAT 3'

Produktlänge: 293 bp

Optimale Annealingtemperatur: 55.1°C

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten RT-PCR werden sämtliche Gene aus derselben RNA-Isolierung, aber in getrennten Reaktionsansätzen amplifiziert. Als Ausgangsmaterial für die PCR dient die im RT-Mix enthaltene cDNA, die durch reverse Transkription aus 1 µg Gesamt-RNA gewonnen wurde [siehe **4.11.3.1**]. In einem Gesamtvolumen von 50 µl werden 4 µl RT-Mix mit 2.5 mM dNTPs, je 10 pM Primer und 1 U Taq-Polymerase in 1x PCR-Puffer II folgendem Amplifikationsschema unterworfen:

1. Denaturierung: 94°C / 1min.
2. Annealing: 58°C / 1min.
3. Extension: 72°C / 2min.

für 19 Zyklen.

Nach diesen 19 Zyklen wird das Amplifikationsschema dahingegen verändert, daß zusätzlich nach jedem Zyklus das Reaktionsgemisch für 20 sec. auf 6°C abgekühlt wird. Innerhalb dieser Zeit wird das Amplifikationsprogramm unterbrochen und 10 µl Aliquots des Reaktionsgemisches, abhängig vom linearen Bereich des zu untersuchenden Gens, zur späteren elektrophoretischen Auftrennung [4.11.3.3] entnommen.

Tabelle 4-1 gibt eine Übersicht über die Anzahl der Zyklen, bei der die Aliquots der Reaktionsgemische abhängig vom zu untersuchenden Gen und Zelltyp abgenommen werden.

Tab. 4-1: Anzahl der Zyklen, bei denen Aliquots der Reaktionsansätze zur elektrophoretischen Auftrennung entnommen werden

Gen	HT29	Jurkat	Hautfibroblasten	Rattenhepatozyten
GAPDH	20, 22, 24, 26	20, 22, 24, 26	20, 22, 24, 26	20, 22, 24, 26
SOD1	26, 28, 30, 32	26, 28, 30, 32	28, 30, 32, 34	---
SOD2	26, 28, 30, 32	24, 26, 28, 30	22, 24, 26, 28	---
CAT	22, 24, 26, 28	24, 26, 28, 30	22, 24, 26, 28	---
GPx	24, 26, 28, 30	28, 30, 32, 34	24, 26, 28, 30	---
hMTH1 8-oxo-dGTPase	30, 32, 34, 36	28, 30, 32, 34	26, 28, 30, 32	34, 36, 38, 40
ALP	32, 34, 36, 38	----	---	---

- 10x PCR-Puffer II: 0.5 M KCl, 0.1 M Tris-HCl (pH 9.3), 0.03 M MgCl₂, 1 mg/ml BSA, 10% Glycerol in aqua ad iniectabilia

4.11.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese eignet sich zum Nachweis kleiner, d.h. mehrere hundert Basenpaare langer DNA-Fragmente. Dabei wird ausgenutzt, daß die bei neutralem pH negativ geladene DNA zur Anode hin wandert und die elektrophoretische Beweglichkeit eines DNA-Fragments umgekehrt proportional zu seiner Länge ist.

Die elektrophoretische Auftrennung der unter 4.11.3.2 entnommenen Aliquots erfolgt in einem 2%igen Agarosegel mit 1x TBE als Puffersystem. Dafür werden in 100 ml 1x TBE 2 g Agarose eingerührt, 10 min. bei Raumtemperatur hydratisiert und in der Mikrowelle gelöst. Nach Abkühlung auf 60°C wird die Agarose-Lösung in das Geltablett, in das zur Formung der Probestaschen 4 Kämme (20 Taschen mit je einem Füllvolumen von 20 µl) eingesetzt sind, gegossen und für 1 h bei Raumtemperatur gehärtet. Das Gel wird in die Elektrophoresekammer gelegt und mit 1x TBE überschichtet. Die unter 4.11.3.2. entnommenen Aliquots werden mit 2 µl Ladepuffer versetzt und 10 µl davon pro Tasche aufgetragen.

Zur Größenbestimmung der einzelnen DNA-Amplifikate wird ein 123 bp DNA-Marker (Konzentration: 0.1 µg Marker pro mm Spurbreite) mitgeführt. Die Laufzeit der Elektrophorese beträgt 40 min. bei einer Spannung von 124 Volt (5 V/cm Elektrodenabstand). Anschließend wird das Gel für 7 min. in Ethidiumbromid-Lösung gefärbt, 30 min. mit A.dest. gewaschen und unter UV-Licht ausgewertet.

- 10x TBE-Puffer: 0.89 M Tris, 0.89 M Borsäure, 0.02 M EDTA; pH 8.3; autoklaviert
- Ladepuffer: 80% Glycerol (V/V), 0.25% Bromphenolblau in 1x TBE
- Ethidiumbromid-Lösung: 2 µg/ml Ethidiumbromid in 1x TBE

4.11.3.4 Auswertung und Dokumentation der Gele

Die Dokumentation der Gele erfolgt mit Hilfe des GelPrint 1000i Dokumentationssystems, wobei die CCD-Kamera die Fluoreszenz der mit Ethidiumbromid gefärbten DNA in Grauwerte umwandelt. Jedem Bildpunkt werden 8 Bit digitale Informationseinheiten zugeordnet, die mindestens 8 Bit schwarz und maximal 8 Bit weiß betragen, wodurch 256 Grautöne kodiert werden können.

Das Ethidiumbromid interkaliert nun über seine planare Gruppe mit der DNA, wodurch es zu einer verstärkten Emission bei 590 nm kommt. Dabei ist die Fluoreszenz umso stärker, je mehr Ethidiumbromid-DNA-Komplexe gebildet wurden, d.h. sie ist von der Konzentration der DNA abhängig. Eine Bande, die stark fluoresziert, enthält somit viel DNA. Sie erscheint im Schwarzbild der Kamera hell und erhält einen hohen Grauwert. Dagegen erhält eine schwächer fluoreszierende Bande einen niedrigeren Grauwert. Somit stellen die von der Kamera zugeordneten Grauwerte ein Maß für die Konzentration an DNA dar. Unter Verwendung der Software OneDscan (Version 1.0, Scanalytics, Billerica, USA) können die einzelnen Grauwerte der Banden als „Integrierte OD“ gemessen werden. Dazu scannt die Software die Spuren nach Festlegung ihrer Position und legt die Position der Banden fest, die manuell noch korrigiert werden können. Wenn die zu einer Bande gehörigen Bildpunkte einen anderen Grauwert als der Hintergrund der Spur besitzen, werden sie als Bande erkannt. Die Software mißt nun auf der gesamten Fläche der Bande die Grauwerte und berechnet die Gesamtheit aller Grauwerte über die Bandenfläche. Dieses Volumenintegral wird als „Integrierte OD“ bezeichnet und für die Auswertung der Gele herangezogen.

Zur Ermittlung der Induktion der Genexpression wird das Verhältnis zwischen den integrierten OD Werten der einzelnen Genbanden zu den GAPDH-Banden pro Zyklus gebildet. Das GAPDH-Gen kann dabei als Referenzgen verwendet werden, da es unabhängig von der durchgeführten Behandlung in den einzelnen Zelltypen konstant exprimiert wird. Wäre dies nicht der Fall, müßte ein anderes Gen als Referenz gewählt werden. Die so erhaltenen OD-Werte ($OD_{\text{Gen}} / OD_{\text{GAPDH}}$) werden anschließend noch auf die jeweilige Kontrolle (unbehandelte Zellen) der einzelnen Versuche normiert (relative Induktionsfaktoren).

5 Ergebnisse

Der erste Abschnitt der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit der Entwicklung eines Testsystems zur Bestimmung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität in Zellkulturen. Dafür wurde zunächst eine geeignete Analytik entwickelt, mit der es möglich war, innerhalb von 20 min. die Guanin-Nukleotide dGMP, dGDP und dGTP sowie ihre 8-oxo-Derivate 8-oxo-dGMP, 8-oxodGDP und 8-oxo-dGTP voneinander zu trennen und zu quantifizieren. Anschließend erfolgte der Aufbau des eigentlichen Testsystems und eine genauere Charakterisierung des Enzyms. Das Verhalten der 8-oxo-dGTPase gegenüber oxidativen Streß sowie bei verschiedenen zellulären Prozessen, wie z.B. der Zelldifferenzierung und der Tumorpromotion, wurde im zweiten Abschnitt analysiert und mit dem Verhalten der klassischen antioxidativen Enzyme (SOD, CAT, GPx) verglichen. Dafür wurde die Genexpression mittels der semiquantitativen RT-PCR und die Enzymaktivität bestimmt.

5.1 *Entwicklung eines Testsystems zur Bestimmung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität in Zellkulturen*

Um die Rolle der 8-oxo-dGTPase bei verschiedenen zellulären Prozessen studieren zu können, wurde ein Testsystem zur Messung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität entwickelt. Die bereits in der Literatur beschriebenen Methoden zur Messung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität erwiesen sich als ungeeignet, da sie zum einen nur mit dem isolierten und gereinigten Enzym durchführbar und somit nicht auf Zellysate übertragbar sind und zum anderen nur eine geringe Spezifität und Sensitivität aufwiesen.

5.1.1 HPLC-Analytik

Für die Entwicklung einer Methode zur Messung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität wurden zunächst die 8-oxo-Derivate der Guanin-Nukleotide 8-oxo-dGMP, 8-oxo-dGDP und 8-oxo-dGTP nach einem modifizierten Protokoll von Kasai, Nishimura und Mo et. al. hergestellt [4.7.1] und aufgereinigt [siehe 4.7.1.1 und 4.7.1.2] [Kasai und Nishimura, 1984; Mo, 1992]. Je 40 µM dieser 8-oxo-Derivate und 400 µM der Guanin-Nukleotide wurden zu einem Standard-Mix zusammenpipettiert, mit dessen Hilfe eine geeignete HPLC-Trennmethode ermittelt wurde. Neben der Detektion der Guanin-Nukleotide im UV bei 290 nm sollten die 8-oxo-Derivate durch einen in Reihe geschalteten EC-Detektor bei +600 mV detektiert werden, damit auch Konzentrationsänderungen im Femtomolbereich erfaßt werden können. Die meisten beschriebenen HPLC-Methoden zur Trennung von Nukleotiden basieren auf einem Ionengradienten in der mobilen Phase. Da die Stabilität des EC-Detektors jedoch vom Ionenmilieu stark abhängig ist, sollten Ionengradienten nicht verwendet werden. Daneben wird für die Trennung von Nukleotiden der Zusatz von quartären Aminen, meist Tetrabutylammoniumhydroxid (TBA), als Ionenpaar-Reagenz zur mobilen Phase vorgeschlagen. Die damit

erzielte gute Abtrennung der Nukleotide voneinander kann mit zwei unterschiedlichen Theorien beschrieben werden. Die erste Theorie setzt eine Ionenpaar-Bildung zwischen dem zugesetzten Reagenz und dem zu trennenden Stoff voraus, so daß ein großes nicht-polares Pseudomolekül mit einer maskierten Ladung in seinem Zentrum entsteht. Dieses kann dann mit der stationären Phase in Wechselwirkung treten und so länger zurückgehalten werden, wodurch eine Trennung erzielt wird. Bei der zweiten Theorie interagiert das Ionenpaar-Reagenz mit der stationären Phase, so daß eine Art Ionenaustauscher entsteht. Mit dieser modifizierten stationären Phase erfolgt dann die Trennung der Stoffe über ionische und nicht-ionische Wechselwirkungen. Da mit dieser Methode die Stabilität des EC-Detektors nicht beeinflußt wird, wurde sie für den weiteren Aufbau der HPLC-Analytik zu Grunde gelegt. Die schließlich verwendete HPLC-Methode mit einer genauen Zusammensetzung der mobilen Phase ist unter 4.7.4 beschrieben. Das HPLC-Chromatogramm in **Abbildung 5-1** zeigt die mit der entwickelten Methode erzielte Trennung der Guanin-Nukleotide und ihrer 8-oxo-Derivate.

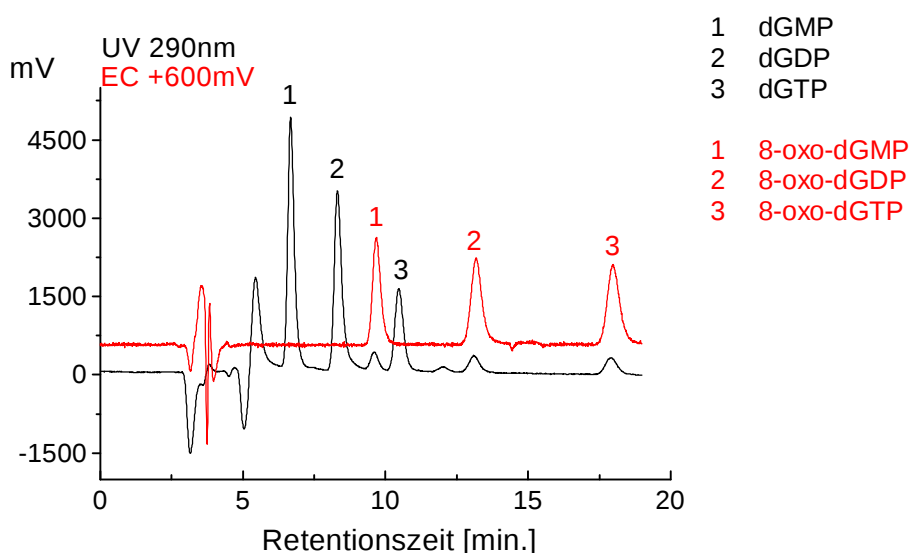


Abb. 5-1: HPLC-Chromatogramm der Guanin-Nukleotide dGMP, dGDP, dGTP und ihrer 8-oxo-Derivate 8-oxo-dGMP, 8-oxo-dGDP und 8-oxo-dGTP.

Je 0.8 μM 8-oxo-dGMP, 8-oxo-dGDP, 8-oxo-dGTP und je 8 μM dGMP, dGDP dGTP wurden zu einem Guanin-Nukleotid-Standard zusammenpipettiert. Für die Aufnahme des Chromatogramms wurden 100 μl des Guanin-Nukleotid-Standards mittels der HPLC aufgetrennt. Als stationäre Phase wurde eine C18 Ultrasphere ODS-Säule und als mobile Phase ein Natriumphosphatpuffer [siehe 4.7.4] verwendet. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min.. Die Detektion erfolgte im UV bei 290 nm und elektrochemisch bei +600 mV.

Basierend auf dieser HPLC-Trennmethode wurden für die einzelnen Guanin-Nukleotide folgende Retentionszeiten ermittelt:

- dGMP: 6.5 min.
- dGDP: 8.3 min.
- dGTP: 10.5 min.
- 8-oxo-dGMP: 9.2 min.
- 8-oxo-dGDP: 13 min.
- 8-oxo-dGTP: 18 min.

Wie aus **Abbildung 5-1** zu entnehmen ist, eignet sich die entwickelte HPLC-Methode nicht nur für die Bestimmung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität, bei der der Abbau des Substrates 8-oxo-dGTP zu 8-oxo-dGMP gemessen wird, sondern auch für das Studium anderer am Guanin-Nukleotid-Stoffwechsel beteiligter Enzyme. Desweiteren bietet sie die Möglichkeit eventuell auftretende unspezifische Abbauewege vom Substrat 8-oxo-dGTP zu detektieren.

5.1.2 8-oxo-dGTPase-Aktivitätsbestimmung

Nach Entwicklung der äußerst sensitiven HPLC-Methode zur simultanen Quantifizierung der Guanin-Nukleotide und ihrer 8-oxo-Derivate, wurden Verfahren getestet, mittels derer eine Aktivitätsbestimmung der 8-oxo-dGTPase direkt aus Zellysaten ohne vorherige Isolierung und Reinigung des Enzyms möglich sind. Sämtliche Untersuchungen wurden in Jurkat-Zellen durchgeführt, die im Vergleich zu anderen Zelllinien eine relativ hohe 8-oxo-dGTPase-Aktivität besitzen [Mo et. al., 1992]. Da in eukaryotischen Zellen die 8-oxo-dGTPase hauptsächlich im Zytosol und nur in geringerem Maße in den Mitochondrien lokalisiert ist [Kang, 1995] wurde ein zellfreier Extrakt hergestellt. Dies erfolgte entweder wie unter **4.7.2.1** beschrieben über eine fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat oder wie unter **4.7.2.2** beschrieben per Ultrazentrifugation. Um zu prüfen, ob diese zellfreien Extrakte für die Aktivitätsbestimmung geeignet sind, wurden sie mit 8-oxo-dGTP inkubiert [**4.7.3**]. Nach 0 – 40 min. wurden Aliquots des Reaktionsgemisches entnommen und mittels HPLC analysiert [**4.7.4**]

Es zeigte sich, daß bei Inkubation des zellfreien Extraktes mit 8-oxo-dGTP der Hauptanteil zu 8-oxo-dGDP abgebaut wurde und erst nach 40 min. 8-oxo-dGMP nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 5-2**). Bei einer Inkubation des zellfreien Extraktes mit 8-oxo-dGDP konnte kein Abbau nachgewiesen werden. Daraus wird ersichtlich, daß im zellfreien Extrakt neben der 8-oxo-dGTPase eine weitere Phosphatase hoher Aktivität enthalten sein muß, die 8-oxo-dGTP zu 8-oxo-dGDP abbaut und somit die eigentliche Messung stört.

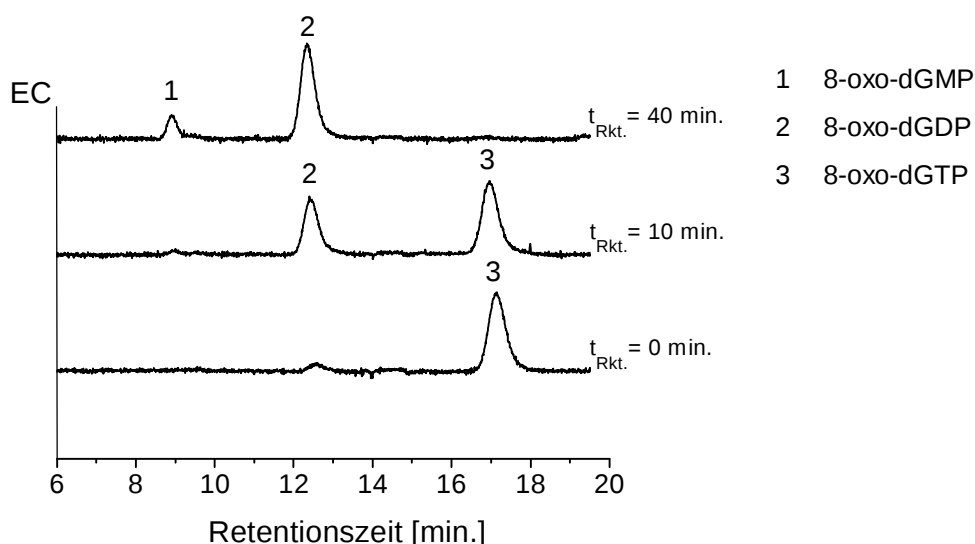


Abb. 5-2: HPLC-Chromatogramme von 8-oxo-dGTP nach Inkubation mit einem zellfreien Extrakt von Jurkat-Zellen. Die Abbauprodukte sind 8-oxo-dGDP und 8-oxo-dGMP.

5 μ l eines zellfreien Extraktes [4.7.2.2] von Jurkat-Zellen (Proteingehalt 1 mg/ml) wurde bei 37° C mit 40 μ M 8-oxo-dGTP inkubiert. Nach 0, 10 und 40 min. wurden je 6 μ l des Reaktionsgemisches abgenommen, mit 2 μ l EDTA versetzt und mit H₂O 1:50 verdünnt [4.7.3]. 100 μ l wurden mittels HPLC aufgetrennt [4.7.4]. Die Detektion erfolgte elektrochemisch bei +600 mV.

Demnach ist eine genaue 8-oxo-dGTPase-Aktivitätsbestimmung nur möglich, wenn entweder die Phosphatase spezifisch blockiert oder aus dem Reaktionsansatz entfernt wird. Eine spezifische Blockade kann aber nur erfolgen, wenn Struktur und Wirkungsweise der Phosphatase bekannt sind. Deshalb wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die störende Phosphatase aus dem Reaktionsansatz zu entfernen.

Die 8-oxo-dGTPase ist ein relativ kleines Enzym, mit einem Molekulargewicht von 18 kDa [Sakumi, 1993]. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den Phosphatasen um wesentlich größere Enzyme mit Molekulargewichten um 40 kDa [Mo et. al., 1992]. Diese Differenz der Molekulargewichte bietet die Möglichkeit, die störende Phosphatase aus dem Reaktionsansatz zu entfernen. Dafür wurde der zellfreie Extrakt durch eine 30 kDa cut-off Membran mit geringer Proteinbindung filtriert. Um zu klären, ob das erhaltene Ultrafiltrat für die Bestimmung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität geeignet ist und keine störende Phosphatase Aktivität mehr aufwies, wurde das Ultrafiltrat mit 8-oxo-dGTP inkubiert [4.7.3]. Nach 0 – 40 min. wurden Aliquots des Reaktionsgemisches entnommen und mittels der HPLC analysiert [4.7.4].

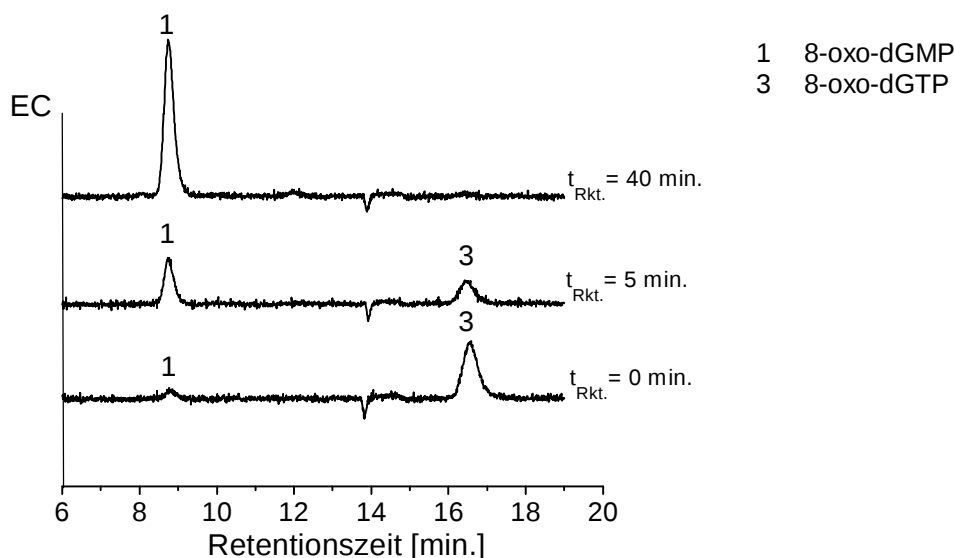


Abb.5-3: HPLC-Chromatogramme von 8-oxo-dGTP nach Inkubation mit einem Ultrafiltrat von Jurkat-Zellen. Das Abbauprodukt ist 8-oxo-dGMP.

100 µl zellfreier Extrakt [4.7.2.2] von Jurkat-Zellen (Proteingehalt 1 mg/ml) wurden durch eine 30 kDa cut-off Membran filtriert. 5 µl des Ultrafiltrats wurden mit 40 µM 8-oxo-dGTP inkubiert. Nach 0, 5 und 40 min. wurden 6 µl des Reaktionsgemisches entnommen, mit 2 µl EDTA versetzt und mit H₂O 1 : 50 verdünnt [4.7.3]. 100 µl wurden mittels HPLC aufgetrennt [4.7.4]. Die Detektion erfolgte elektrochemisch bei +600 mV.

Wie aus **Abbildung 5-3** ersichtlich ist, konnte keine Phosphatase Aktivität mehr nachgewiesen werden. Vielmehr erfolgte ein rascher Abbau des 8-oxo-dGTP zum 8-oxo-dGMP, was auf eine hohe 8-oxo-dGTPase-Aktivität schließen läßt. Ein Vergleich von **Abbildung 5-2** mit **Abbildung 5-3** deutet darauf hin, daß nicht nur die im zellfreien Extrakt noch vorhandene Phosphatase mit der 8-oxo-dGTPase um das Substrat 8-oxo-dGTP konkurriert, sondern auch, daß das gebildete 8-oxo-dGDP offenbar einen hemmenden Einfluß auf die 8-oxo-dGTPase-Aktivität hat. Somit ist für eine exakte Aktivitätsbestimmung eine Abtrennung der störenden Phosphatase unerlässlich.

5.2 Charakterisierung der 8-oxo-dGTPase

Jedes Enzym besitzt eine charakteristische Substratspezifität und katalytische Aktivität, die durch viele äußere Parameter beeinflusst wird. Im folgenden Abschnitt soll deshalb die 8-oxo-dGTPase-Aktivität in Jurkat-Zellen näher untersucht werden. Dazu wurde zunächst das pH-Optimum bestimmt und die Abhängigkeit der Enzymreaktion von Mg²⁺ näher untersucht. Danach wurden die charakteristischen kinetischen Parameter $v_{\max}$ und K_M ermittelt. Ein Vergleich dieser Parameter mit denen, die bereits für die isolierte und gereinigte 8-oxo-dGTPase vorliegen, erlaubt eine genaue Identifizierung.

Daneben wurde der Einfluß der anderen Guanin-Nukleotide auf die 8-oxo-dGTPase-Aktivität untersucht.

5.2.1 Bestimmung des pH-Optimums

Da jedes Enzym bei einem charakteristischen pH-Wert seine größte katalytische Aktivität besitzt, wurde das pH-Optimum der 8-oxo-dGTPase ermittelt. Dafür wurde aus 2×10^6 Jurkat-Zellen nach 4.7.2.2. der zellfreie Extrakt gewonnen und das Ultrafiltrat mit 8-oxo-dGTP bei unterschiedlichen pH-Werten (pH 5 - 11) inkubiert [4.7.3]. Nach 0 - 40 min. wurden Aliquots des Reaktionsgemisches entnommen, per HPLC analysiert und die Enzymaktivität berechnet [4.7.4].

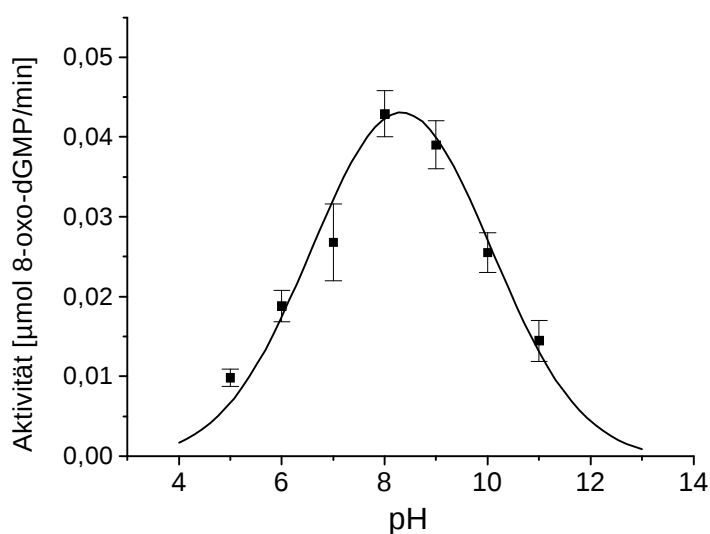


Abb.5-4: pH-Optimum der 8-oxo-dGTPase-Aktivität in Jurkat-Zellen.

Je 5 µl Ultrafiltrat (Proteingehalt des zellfreien Extraktes 1 mg/ml) wurden mit 40 µM 8-oxo-dGTP bei pH 5 – 11 inkubiert. Nach 0, 5, 10, 20 und 40 min. wurden je 6 µl des Reaktionsansatzes abgenommen, mit 2 µl EDTA versetzt und mit H₂O 1 : 50 verdünnt [4.7.3]. 100 µl wurden per HPLC aufgetrennt, elektrochemisch bei +600 mV detektiert und das entstandene 8-oxo-dGMP quantifiziert [4.7.4]. Die Aktivität wurde als µmol 8-oxo-dGMP/min. berechnet und gegenüber dem pH-Wert aufgetragen. Die Standardabweichung ergab sich aus zwei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen.

Die im Ultrafiltrat von Jurkat-Zellen gemessene 8-oxo-dGTPase-Aktivität durchläuft bei pH 8.3 ein Maximum (**Abbildung 5-4**). Deshalb sollte die Bestimmung der 8-oxo-dGTPase bei pH 8 – 8.5 erfolgen. Im Vergleich dazu liegt das pH-Optimum der rein isolierten 8-oxo-dGTPase bei 8.0 [Mo et. al., 1992]. Dieser Wert ist mit dem in dieser Arbeit bestimmten innerhalb der Fehlerbreite identisch.

5.2.2 Abhängigkeit von Mg²⁺

Die 8-oxo-dGTPase ist ein von Mg²⁺-Ionen abhängiges Enzym. Die höchste Aktivität wird in Gegenwart von 2 - 6 mM Mg²⁺ erreicht [Mo et. al., 1992]. Diese Abhängigkeit kann als ein weiteres Kriterium für eine eindeutige Identifizierung herangezogen werden. Zur Ermittlung

einer möglichen Mg^{2+} -Abhängigkeit wurde aus 2×10^6 Jurkat-Zellen nach 4.7.2.2. der zellfreie Extrakt gewonnen. Das Ultrafiltrat wurde entweder, wie unter 4.7.3 beschrieben, mit 8-oxo-dGTP inkubiert oder zusätzlich mit folgenden Veränderungen:

1. ohne Zusatz von $MgCl_2$,
2. vor Zugabe des 8-oxo-dGTP wird EDTA dem Reaktionsansatz zugesetzt.

Nach 0 - 40 min. wurden Aliquots des Reaktionsgemisches entnommen und per HPLC analysiert [4.7.4].

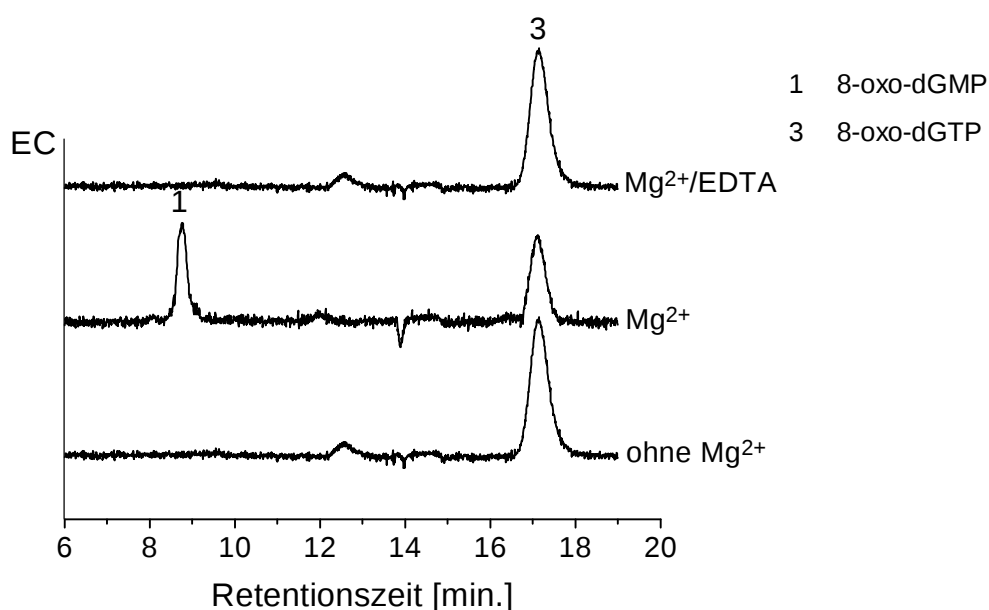


Abb.5-5: HPLC-Chromatogramme von 8-oxo-dGTP nach Inkubation mit einem Ultrafiltrat aus Jurkat Zellen in Abhängigkeit von Mg^{2+} .

100 μ l zellfreier Extrakt [4.7.2.2] von Jurkat-Zellen (Proteingehalt 1 mg/ml) wurden durch eine 30 kDa cut-off Membran filtriert. Je 5 μ l des Ultrafiltrats wurden mit 40 μ M 8-oxo-dGTP in An- oder Abwesenheit von 5 mM $MgCl_2$ oder in Anwesenheit von 5 mM $MgCl_2$ und 15 mM EDTA, inkubiert. Nach 0 - 40 min. wurden 6 μ l des Reaktionsgemisches entnommen, mit 2 μ l EDTA versetzt und mit H_2O 1 : 50 verdünnt [4.7.3] 100 μ l wurden mittels HPLC aufgetrennt [4.7.4]. Die Detektion erfolgte elektrochemisch bei +600 mV.

Nur in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen konnte ein Abbau von 8-oxo-dGTP zu 8-oxo-dGMP nachgewiesen werden (**Abbildung 5-5**). Diese Mg^{2+} -Abhängigkeit bestätigt wiederum die Annahme, daß es sich bei der rein isolierten 8-oxo-dGTPase und bei der im Ultrafiltrat vorkommende 8-oxo-dGTPase um dasselbe Enzym handelt.

Durch den Zusatz von EDTA im molaren Verhältnis $EDTA/Mg^{2+} = 3$ konnte keine 8-oxo-dGTPase-Aktivität mehr nachgewiesen werden. Deshalb kann EDTA zum Abstoppen der Enzymreaktion eingesetzt werden.

5.2.3 Bestimmung der kinetischen Parameter, K_M und $v_{\max}$

Um zu klären mit welchem Modell die Kinetik der Enzymreaktion der 8-oxo-dGTPase in Jurkat-Zellen beschrieben werden kann, wurde der Einfluß der Substratkonzentration auf die 8-oxo-dGTPase-Aktivität untersucht. Dazu wurde aus 2×10^6 Jurkat-Zellen der zellfreie Extrakt gewonnen [4.7.2.2]. Das Ultrafiltrat wurde mit verschiedenen Konzentrationen 8-oxo-dGTP inkubiert. Nach 0 – 40 min. wurden Aliquots der jeweiligen Reaktionsansätze entnommen [4.7.3] und mittels HPLC analysiert [4.7.4].

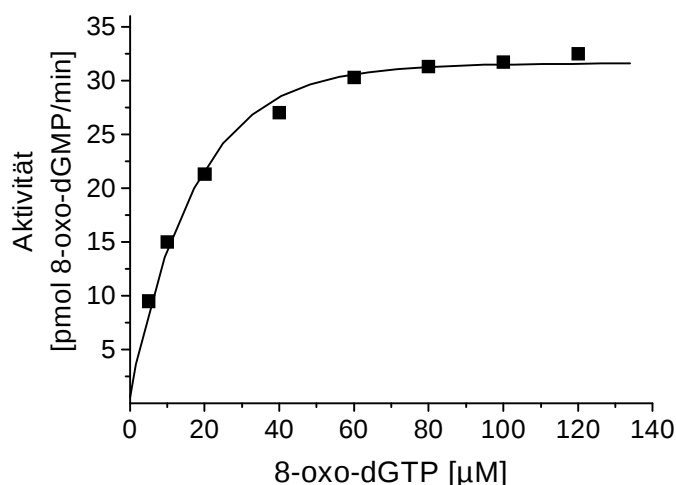


Abb.5-6: Einfluß der Substratkonzentration auf die 8-oxo-dGTPase-Aktivität von Jurkat-Zellen.

100 μ l zellfreier Extrakt [4.7.2.2] von Jurkat-Zellen (Proteingehalt 1 mg/ml) wurden durch eine 30 kDa cut-off Membran filtriert. Je 5 μ l des Ultrafiltrats wurden mit 5 – 120 μ M 8-oxo-dGTP inkubiert. Nach 0 - 40 min. wurden 6 μ l des Reaktions-gemisches entnommen, mit 2 μ l EDTA versetzt und mit H_2O 1 : 50 verdünnt [4.7.3] 100 μ l wurden mittels HPLC aufgetrennt und das entstandene 8-oxo-dGMP quantifiziert [4.7.4]. Die Detektion erfolgte elektrochemisch bei +600 mV. Die Aktivität wurde gegenüber der Substratkonzentration aufgetragen.

Bei konstanter Enzymkonzentration (8-oxo-dGTPase) steigt die Reaktionsgeschwindigkeit mit wachsender Substratkonzentration (8-oxo-dGTP) an, bis eine maximale Geschwindigkeit erreicht wird (**Abbildung 5-6**). Dieses Verhalten entspricht einer für Enzymreaktionen typischen Michaelis-Menten-Kinetik. Sie wird durch die folgende Formel beschrieben:

$$v = v_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_M}$$

v = Geschwindigkeit

$v_{\max}$ = Maximalgeschwindigkeit

$[S]$ = Substratkonzentration

K_M = Michaelis-Menten-Konstante

Die für das Enzym charakteristischen kinetischen Parameter, die Maximalgeschwindigkeit und die Michaelis-Menten-Konstante der Enzymreaktion, sind bei doppelreziproker Darstellung der Enzymkinetik im Lineweaver-Burk-Diagramm nach folgender Formel berechenbar:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_M}{v_{\max}} \times \frac{1}{[S]}$$

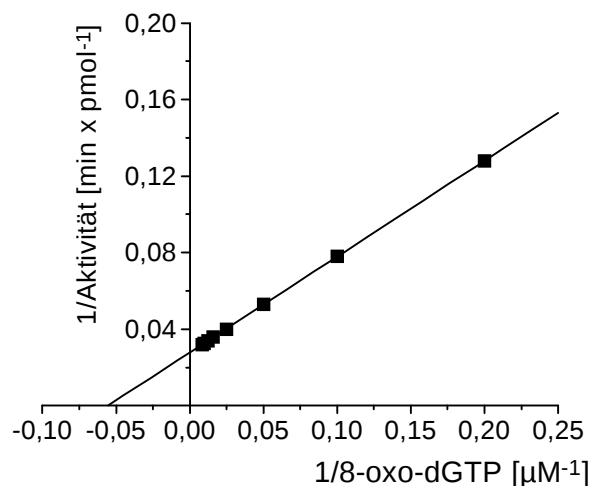


Abb.5-7: Lineweaver-Burk-Diagramm der 8-oxo-dGTPase-Aktivität in Jurkat-Zellen

Daraus ergibt sich für die durch die 8-oxo-dGTPase katalysierte Dephosphorylierung von 8-oxo-dGTP zu 8-oxo-dGMP in Jurkat-Zellen bei pH 8.0 und 37°C eine Maximalgeschwindigkeit von 36.49 pmol/min. und eine Michaelis-Menten-Konstante von 14.2 μM (**Abbildung 5-7**). Im Vergleich dazu liegt die Michaelis-Menten-Konstante der rein isolierten 8-oxo-dGTPase bei pH 8 bei 12.5 μM [Mo et. al., 1992]. Da der K_M -Wert eines Enzyms von verschiedenen Faktoren beeinflusst wird, wie pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke etc., kann dieser Unterschied durch unterschiedliche Meßbedingungen bedingt sein. So wurde z.B. nicht das rein isolierte Enzym sondern ein ultrafiltrierter zellfreier Extrakt eingesetzt.

5.2.4 Beeinflussung der katalytischen Aktivität durch Guanin-Nukleotide

Die Hemmung der enzymatischen Aktivität durch spezifische Substanzen stellt einen bedeutenden Kontrollmechanismus in biologischen Systemen dar. Im folgenden Abschnitt soll deshalb der Einfluß der Guanin-Nukleotide dGMP, dGDP, dGTP und ihrer 8-oxo-Derivate 8-oxo-dGMP und 8-oxo-dGDP auf die 8-oxo-dGTPase-Aktivität näher untersucht werden.

5.2.4.1 Einfluß von dGTP, dGDP und dGMP

Da die 8-oxo-dGTPase die Aufgabe hat, Replikationsfehler, die durch den Einbau von 8-oxo-dGTP in die DNA entstehen würden, zu vermeiden, ist anzunehmen, daß dieses Enzym in Abhängigkeit vom Zellzyklus reguliert wird. Diese Regulation könnte durch die Guanin-Nukleotide selbst erfolgen, die während des Zellzyklus in verschiedenen Konzentrationen vorliegen. Um den Einfluß von dGMP, dGDP und dGTP auf die 8-oxo-dGTPase-Aktivität näher zu untersuchen, wurde aus 2×10^6 Jurkat-Zellen, wie unter 4.7.2.2 beschrieben, der zellfreie Extrakt gewonnen und die 8-oxo-dGTPase-Aktivität in Gegenwart der Guanin-Nukleotide bestimmt [4.7.3 und 4.7.4].

Wie aus **Abbildung 5-8** zu entnehmen ist, beeinflussen die Guanin-Nukleotide die 8-oxo-dGTPase-Aktivität von Jurkat-Zellen.

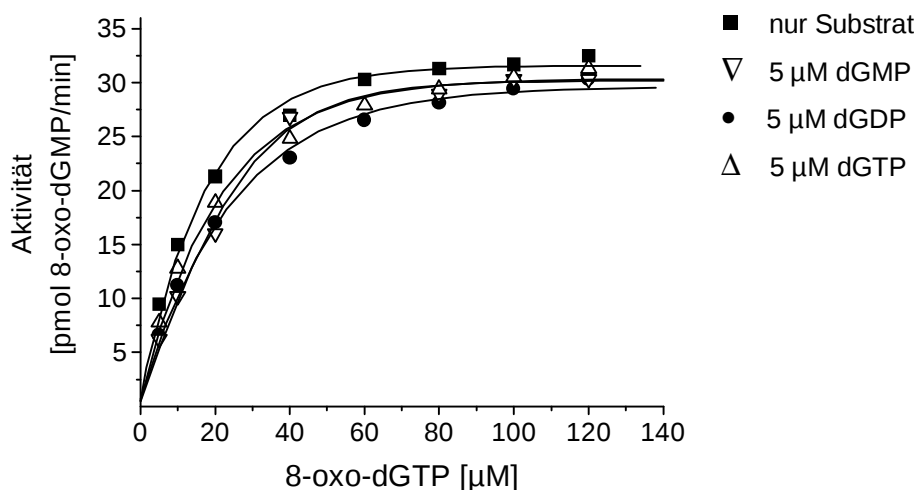


Abb.5-8: Abhängigkeit der 8-oxo-dGTPase-Aktivität in Jurkat-Zellen von der Substratkonzentration in Gegenwart von dGTP, dGDP oder dGMP.

100 µl zellfreier Extrakt [4.7.2.2] von Jurkat-Zellen (Proteingehalt 1 mg/ml) wurden durch eine 30 kDa cut-off Membran filtriert. Je 5 µl des Ultrafiltrats wurden in An- oder Abwesenheit von 5 µM dGTP, dGDP oder dGMP mit 5 - 120 µM 8-oxo-dGTP inkubiert. Nach 0 – 40 min. wurden 6 µl des Reaktionsgemisches entnommen, mit 2 µl EDTA versetzt und mit H₂O 1 : 50 verdünnt [4.7.3] 100 µl wurden mittels HPLC aufgetrennt und das entstandene 8-oxo-dGMP quantifiziert [4.7.4]. Die Detektion erfolgte elektrochemisch bei +600 mV. Die Aktivität wurde gegenüber der Substratkonzentration aufgetragen.

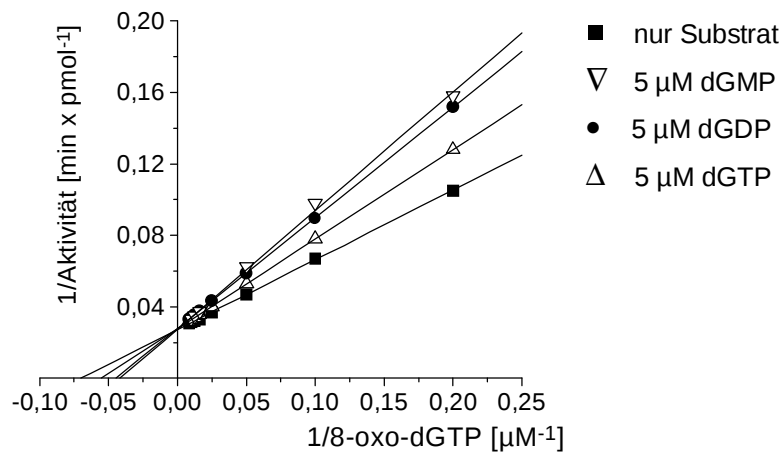


Abb.5-9: Lineweaver-Burk Darstellung der Abhängigkeit der 8-oxo-dGTPase-Aktivität in Gegenwart von dGTP, dGDP oder dGMP.

Veränderungen der Maximalgeschwindigkeit und der Michaelis-Menten-Konstante wurden anhand der entsprechenden Lineweaver-Burk Diagramme (**Abbildung 5-9**) ermittelt. Daraus wird ersichtlich, daß die Guanin-Nukleotide dGMP, dGDP und dGTP nur eine vernachlässigbar kleine Veränderung der Maximalgeschwindigkeit, aber eine Erhöhung des K_M -Wertes bewirkten, was auf eine kompetitive Hemmung der 8-oxo-dGTPase schließen läßt. Die einzelnen Werte sind in der **Tabelle 5-1** aufgeführt.

Tab. 5-1: K_M -Werte und $v_{\max}$ der 8-oxo-dGTPase in Abhängigkeit von dGMP, dGDP und dGTP.

Guanin-Nukleotid	$v_{\max}$ [pmol 8-oxo-dGMP/min]	K_M [μM]
-	36.49	14.2
dGMP	36.31	25.7
dGDP	35.97	22.3
dGTP	36.10	18.1

Aus **Tabelle 5-1** wird ersichtlich, daß die Nukleotide unterschiedlich starke kompetitive Inhibitoren der 8-oxo-dGTPase sind. Offenbar wird dGMP fester als dGDP und dGTP an das aktive Zentrum der 8-oxo-dGTPase gebunden und bewirkt so eine stärkere Hemmung.

5.2.4.2 Einfluß von 8-oxo-dGDP und 8-oxodGMP

Neben den Guanin-Nukleotiden selbst könnten auch ihre 8-oxo-Derivate 8-oxo-dGDP und 8-oxo-dGMP regulierende Funktionen auf die 8-oxo-dGTPase ausüben. Um diesen Einfluß auf die 8-oxo-dGTPase-Aktivität zu untersuchen, wurde aus 2×10^6 Jurkat-Zellen der zellfreie

Extrakt gewonnen [4.7.2.2] und das Ultrafiltrat in den 8-oxo-dGTPase Assay eingesetzt [4.7.3]. Die Analyse der entnommenen Aliquots erfolgte per HPLC [4.7.4].

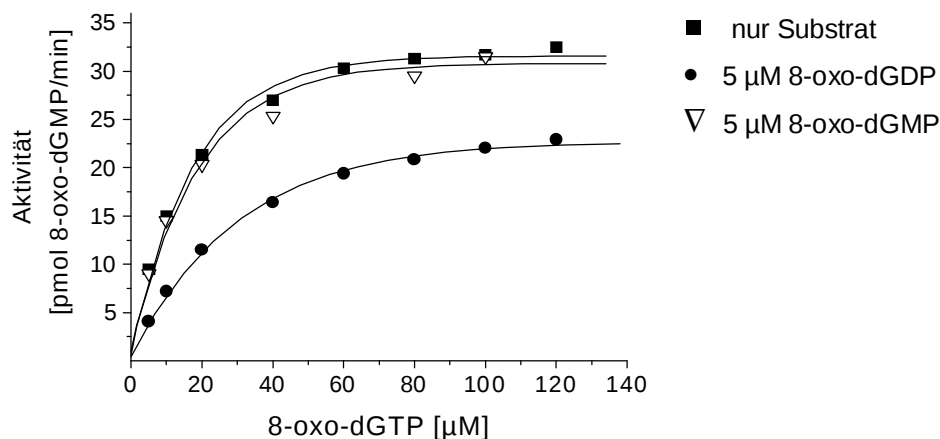


Abb.5-10: Abhängigkeit der 8-oxo-dGTPase-Aktivität in Jurkat-Zellen von der Substratkonzentration in Gegenwart von 8-oxodGMP oder 8-oxo-dGDP.

100 μ l zellfreier Extrakt [4.7.2.2] von Jurkat-Zellen (Proteingehalt 1 mg/ml) wurden durch eine 30 kDa cut-off Membran filtriert. Je 5 μ l des Ultrafiltrats wurden in An- oder Abwesenheit von 5 μ M 8-oxo-dGMP oder 8-oxo-dGDP mit 5 - 120 μ M 8-oxo-dGTP inkubiert. Nach 0–40 min. wurden 6 μ l des Reaktionsgemisches entnommen, mit 2 μ l EDTA versetzt und mit H₂O 1 : 50 verdünnt [4.7.3] 100 μ l wurden mittels HPLC aufgetrennt und das entstandene 8-oxo-dGMP quantifiziert [4.7.4]. Die Detektion erfolgte elektrochemisch bei +600 mV. Die Aktivität wurde gegenüber der Substratkonzentration aufgetragen.

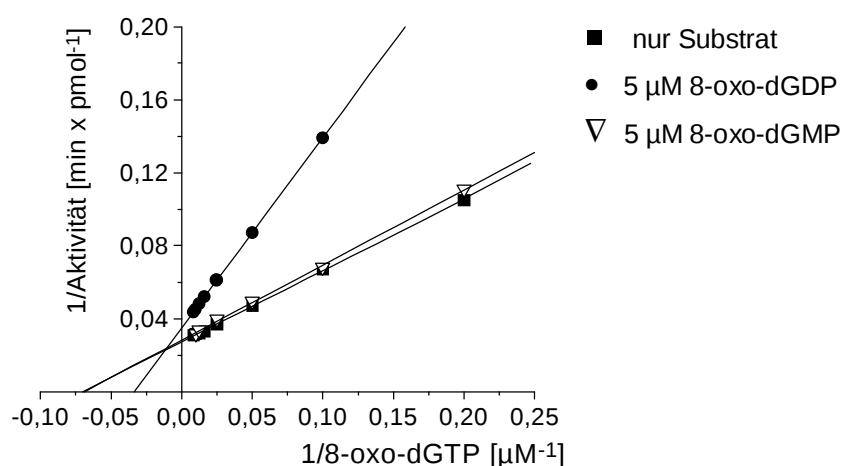


Abb.5-11: Lineweaver-Burk Darstellung der Abhängigkeit der 8-oxo-dGTPase von 8-oxo-dGDP und 8-oxo-dGMP.

Wie aus **Abbildung 5-10** ersichtlich wird, bewirkte nur 8-oxo-dGDP eine Veränderung der Enzymkinetik der 8-oxo-dGTPase. So wurde eine verminderte Maximalgeschwindigkeit und eine Erhöhung des K_M -Wertes beobachtet. Die genauen Werte wurden aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm (**Abbildung 5-11**) berechnet und sind in **Tabelle 5-2** aufgeführt.

Tab. 5-2: K_M -Werte und $v_{\max}$ der 8-oxo-dGTPase in Abhängigkeit von dGMP, dGDP und dGTP.

Guanin-Nukleotid	$v_{\max}$ [pmol 8-oxo-dGMP/min]	K_M [μ M]
8-oxo-dGMP	34.69	14.25
8-oxo-dGDP	28.73	30.0

Somit stellt 8-oxo-dGDP einen starken unkompetitiven Inhibitor der 8-oxo-dGTPase dar, womit die unter 5.1.2 aufgestellte Annahme, daß 8-oxo-dGDP offenbar die 8-oxo-dGTPase hemmt, bestätigt wird.

5.2.5 Bestimmung der 8-oxo-dGTPase-Halbwertszeit

Die Bestimmung der 8-oxo-dGTPase Halbwertszeit erlaubt Aussagen zur Stabilität des Enzyms, die eine entscheidende Rolle bei seiner Regulation spielen könnte. Da die folgenden Untersuchungen einen Beitrag dazu leisten sollen, die Funktion der 8-oxo-dGTPase bei verschiedenen zellulären Prozessen aufzuklären, wurde die Stabilität der 8-oxo-dGTPase näher untersucht. Dazu wurden 3×10^6 primäre Rattenhepatozyten [4.3.3] bis zu 48 h mit Actinomycin D oder Cycloheximid behandelt, wodurch die RNA- bzw. Protein-Neusynthese blockiert wurde. Anschließend wurde der zellfreie Extrakt [4.7.2.2] ultrafiltriert und die 8-oxo-dGTPase-Aktivität bestimmt [4.7.3 und 4.7.4].

Dabei stellte sich heraus, daß die 8-oxo-dGTPase-Aktivität in primären Rattenhepatozyten sowohl nach einer Blockade der RNA-Neusynthese mit Actinomycin D als auch bei einer Blockade der Protein-Neusynthese mit Cycloheximid im Vergleich zu unbehandelten Zellen abnimmt (**Abbildung 5-12**). Nach einer Inkubationszeit von 16 h wiesen die behandelten Zellen eine im Vergleich zu unbehandelten Zellen um 50% geringere Aktivität auf, somit liegt die Halbwertszeit des Enzyms bei 16 h. Dies bedeutet, daß ein konstanter Spiegel an 8-oxo-dGTPase-Aktivität über einen Zeitraum von 16 h nur durch eine Neusynthese aufrechterhalten werden kann.

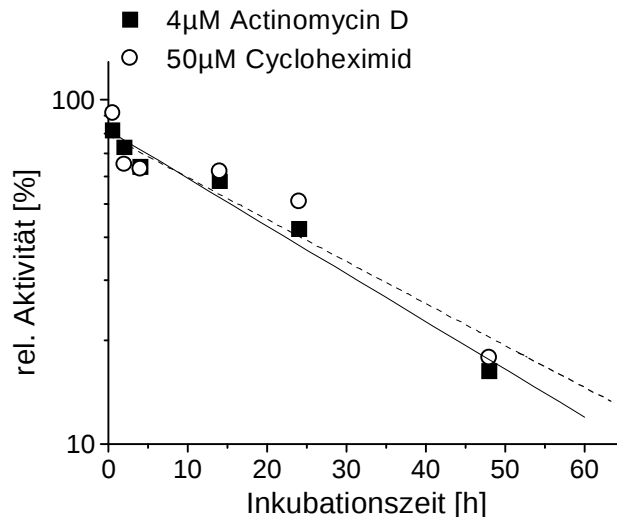


Abb.5-12: Stabilität der 8-oxo-dGTPase in primären Rattenhepatozyten nach Blockade der RNA- bzw. Protein-Neusynthese mit Actinomycin D und Cycloheximid

Primäre Rattenhepatozyten wurden wie unter 4.3.1 beschrieben gewonnen und kultiviert. 10^6 Zellen wurden in An- oder Abwesenheit von 4 μ M Actinomycin D zur Hemmung der RNA- oder 50 μ M Cycloheximid zur Hemmung der Protein-Neusynthese inkubiert. Nach 0.5 - 48 h wurden die Zellen geerntet, der zellfreie Extrakt (Proteingehalt: 0.8 mg/ml) hergestellt [4.7.2.2] und ultrafiltriert. Die Bestimmung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität erfolgte wie unter 4.7.3 und 4.7.4 beschrieben in 40 μ l Ultrafiltrat. Die 8-oxo-dGTPase-Aktivitäten der behandelten Zellen wurden auf die der unbehandelten bezogen und so als relative Aktivitäten gegenüber der Inkubationszeit aufgetragen.

5.2.6 Bestimmung von K_M und v_{max} in Hautfibroblasten

Da neben den Jurkat-Zellen primäre Hautfibroblasten als Vergleichszellen in den nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt werden sollten [siehe 4.3.1], war eine Charakterisierung der 8-oxo-dGTPase in primären Hautfibroblasten erforderlich, wozu die kinetischen Parameter K_M und v_{max} bestimmt wurden.

Für die Bestimmung wurden die Hautfibroblasten, wie unter 4.3.1 beschrieben, gewonnen und kultiviert [4.3.2]. Aus 2×10^6 Hautfibroblasten wurde der zellfreie Extrakt hergestellt [4.7.2.2] und im Ultrafiltrat die 8-oxo-dGTPase-Aktivität gemäß 4.7.3 und 4.7.4 bestimmt.

Die Berechnung von K_M und v_{max} erfolgte aus dem Lineweaver-Burk-Diagramm (Abbildung 5-13). Dabei ergaben sich bei pH 8 und 37°C folgende Werte:

$$K_M = 7.9 \mu\text{M}$$

$$v_{max} = 33.84 \text{ pmol 8-oxo-dGMP/min}$$

Im Vergleich dazu ist für humane Fibroblasten bei pH 8.5 ein K_M Wert von 8.5 μM berechnet worden [Bialkowski, 1998].

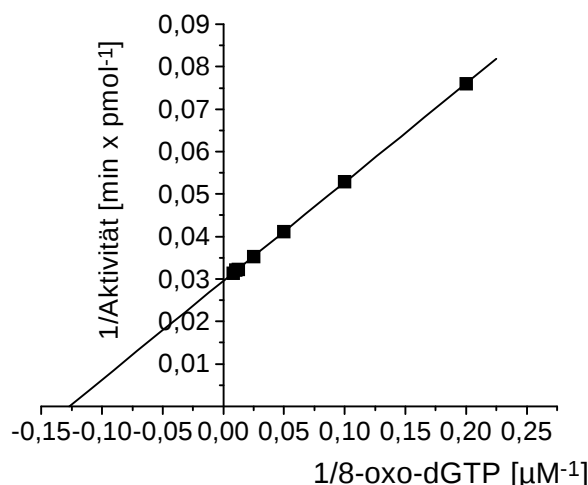


Abb.5-13: Lineweaver Burk Darstellung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität in primären Hautfibroblasten

Aus 2×10^6 Hautfibroblasten [4.3.1] wurde ein zellfreier Extrakt (Proteingehalt: 1.5 mg/ml) gewonnen [4.7.2.2] und ultrafiltriert. Je 10 μl Ultrafiltrat wurden mit 5 – 120 μM 8-oxo-dGTP inkubiert. Nach 0, 15, 30 und 60 min. wurden aus dem Reaktionsansatz 6 μl Aliquots entnommen, mit 2 μl EDTA versetzt und im Verhältnis 1 : 50 mit H_2O verdünnt [4.7.3]. 100 μl wurden mittels HPLC aufgetrennt und das entstandene 8-oxo-dGMP quantifiziert [4.7.4]. Es wurde die Aktivität gegenüber der Substratkonzentration doppelreziprok aufgetragen.

5.3 Untersuchungen zum Verhalten der 8-oxo-dGTPase bei oxidativem Streß

Da es nun möglich war die 8-oxo-dGTPase-Aktivität direkt aus Zellkulturen zu bestimmen, sollte die Induzierbarkeit der 8-oxo-dGTPase durch reaktive Sauerstoffspezies näher untersucht und mit denen der klassischen antioxidativen Enzyme, wie Katalase, Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase verglichen werden. Dabei sollte zum einen geklärt werden, ob die 8-oxo-dGTPase als ein Marker für oxidativen Streß verwendet werden kann, und zum anderen wie dieses Enzym möglicherweise reguliert wird. Dazu wurden zunächst geeignete Zellsysteme ausgewählt, die dann mit verschiedenen Substanzen, die in den Redoxhaushalt der Zelle eingreifen, behandelt wurden. Anschließend wurde die Genexpression und die Enzymaktivität analysiert.

5.3.1 Auswahl geeigneter Zellsysteme

Die meisten Untersuchungen der 8-oxo-dGTPase, die in der Literatur beschrieben worden sind, wurden in Jurkat-Zellen durchgeführt. Diese Zellen zeichnen sich durch einen sehr hohen Gehalt an 8-oxo-dGTPase im Vergleich zu anderen Zelllinien aus. Deshalb wurden die

nachfolgenden Untersuchungen in Jurkat-Zellen durchgeführt. Bei den Jurkat-Zellen handelt es sich um eine T-Zell-Leukämie-Zelllinie. Als weiteres Zellsystem wurden primäre Hautfibroblasten ausgewählt. Diese zeichnen sich ebenfalls durch einen hohen Gehalt an 8-oxo-dGTPase aus [Wani, 1996], der durch den ständigen oxidativen Streß, dem diese Zellen ausgeliefert sind, z.B. UV-Licht, begründet wird.

Der GSH-Status und die Grundaktivität der 8-oxo-dGTPase, Katalase, Superoxid-Dismutase und Glutathion-Peroxidase könnte ihre Induzierbarkeit beeinflussen. Deshalb wurde zunächst der GSH-Gehalt und die Aktivität der einzelnen Enzyme in beiden Zellsystemen bestimmt. Dazu wurden primäre Hautfibroblasten isoliert [4.3.1] und kultiviert [4.3.2]. Aus 2×10^6 Hautfibroblasten oder Jurkat-Zellen wurde der zellfreie Extrakt gewonnen [4.7.2.2]. Vor Dialyse der Proben wurde der GSH-Gehalt bestimmt [4.9]. Nach Dialyse der Proben wurden Katalase- [4.8.1], Superoxid-Dismutase- [4.8.2] und Glutathionperoxidase-Aktivität [4.8.3] bestimmt und auf den Proteingehalt der Probe bezogen. Aus dem Ultrafiltrat erfolgte die Bestimmung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität [4.7.3 und 4.7.4].

Tab. 5-3: Enzymaktivitäten und GSH-Gehalt in Jurkat-Zellen und primären Hautfibroblasten

Zellsystem	GSH ¹ [nmol/mg Prot.]	CAT ² [µg/mg Prot.]	SOD ³ [ng/mg Prot.]	GPx ⁴ [mU/mg Prot.]	8-oxo-dGTPase [(pmol/min)/mg Prot.]
Jurkat	46.02	17.45	22.79	39.22	19.34
Haut	39.23	9.77	22.02	27.03	12.32

¹Glutathion

²Katalase

³Superoxid-Dismutase

⁴Glutathion-Peroxidase

Wie aus **Tabelle 5-3** ersichtlich wird, unterscheiden sich die beiden Zellsysteme hinsichtlich ihres GSH-Status und der Enzymgrundaktivität. So besitzen Jurkat-Zellen eine um den Faktor 1.8 höhere Katalase-, um den Faktor 1.5 höhere Glutathionperoxidase- und um den Faktor 1.6 höhere 8-oxo-dGTPase-Aktivität als primäre Hautfibroblasten. Zudem ist der GSH-Spiegel in Jurkat-Zellen geringfügig höher. Lediglich die Superoxid-Dismutase-Aktivität ist in beiden Zellsystemen gleich. Demnach müßten primäre Hautfibroblasten gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies empfindlicher reagieren als Jurkat-Zellen, da ihre antioxidative Kapazität geringer ist. Ob dieser Unterschied hinsichtlich der Induzierbarkeit der einzelnen Enzyme eine Rolle spielt, wird sich in den folgenden Untersuchungen zeigen.

5.3.2 Einfluß von reaktiven Sauerstoffspezies

Als Vertreter der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) wurden Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Superoxidradikalanion ($O_2^{\bullet-}$) ausgewählt. Sie stellen nicht nur die Substrate zweier wichtiger antioxidativer Enzyme, Katalase (CAT) und Superoxid-Dismutase (SOD), dar, sondern ihnen

wird auch eine Beteiligung bei verschiedenen zellulären Prozessen und deren Regulation zugeschrieben. Eine durch H_2O_2 oder $\text{O}_2^{\bullet-}$ bedingte Induktion der zu untersuchenden Enzyme könnte einen Hinweis für deren mögliche Regulation liefern.

5.3.2.1 *Einfluß von H_2O_2 auf Genexpression und Enzymaktivität in Jurkat-Zellen*

Um den Einfluß von H_2O_2 auf die Genexpression und die Aktivität der Enzyme CAT, SOD, GPx und 8-oxo-dGTPase zu untersuchen, wurden Jurkat-Zellen für 24 h mit H_2O_2 behandelt. Die Bestimmung der Genexpression erfolgte mit der RT-PCR, wobei GAPDH als Referenzgen diente [4.11]. Die Bestimmung der einzelnen Enzymaktivitäten [4.8] erfolgte im zellfreien Lysat. Da der Redoxstatus der Zelle eine Rolle bei der Induzierbarkeit spielen könnte, wurde dieser durch Messung des GSH- und GSSG-Gehaltes der Proben im zellfreien Lysat bestimmt [4.9]. Der mögliche Einfluß der Zytotoxizität auf die Induzierbarkeit wurde durch Bestimmung der extrazellulären LDH-Aktivität, als ein Marker für Zytotoxizität, berücksichtigt [4.5.2].

Es zeigte sich, daß H_2O_2 sowohl die Genexpression als auch die Enzymaktivität der antioxidativen Enzyme CAT, SOD und GPx sowie die 8-oxo-dGTPase von Jurkat-Zellen in unterschiedlichem Maße beeinflusst (**Abbildung 5-14**). Dabei waren die beobachteten Induktionen der Genexpression bei allen Enzymen wesentlich geringer als die entsprechenden Induktionen der Enzymaktivitäten. Mit zunehmender H_2O_2 -Konzentration konnte eine erhöhte LDH-Freisetzung nachgewiesen werden (**A**). Wird diese durch H_2O_2 bedingte Freisetzung mit der durch Triton X-100, welches als Positivkontrolle eingesetzt wurde, bedingten LDH-Freisetzung verglichen, so ergibt sich, daß H_2O_2 -Konzentrationen im Bereich von 0.03 – 0.3 mM als nicht bis gering und eine Konzentration von 1 mM als zytotoxisch für Jurkat-Zellen einzustufen sind. Die Bestimmungen von GSH und GSSG (**B**) ergaben eine Verschiebung des Redoxgleichgewichtes in Jurkat-Zellen zur oxidierten Seite. So wurde mit zunehmender H_2O_2 -Konzentration eine Abnahme der GSH-Konzentration mit gleichzeitiger Zunahme der GSSG-Konzentration beobachtet. Bei einer H_2O_2 -Konzentration von 1 mM wurde wieder eine leichte Zunahme an GSH verbunden mit einer Abnahme an GSSG festgestellt. Diese Rekonstruktion der GSH-Vorräte ist wahrscheinlich durch eine gesteigerte Glutathion-Reduktase-Aktivität bedingt, die GSSG wieder zu GSH reduziert. Die CAT-Aktivität (**C**) zeigte eine konzentrationsabhängige Zunahme und konnte mit 1 mM H_2O_2 um das 10fache gesteigert werden. Im Gegensatz dazu durchlief die CAT-Genexpression bei 0.1 mM H_2O_2 mit einer 2fachen Induktion ihr Maximum. Die GPx-Aktivität (**D**) wurde bis 0.3 mM H_2O_2 um das 4fache und die GPx-Genexpression bis 0.1 mM H_2O_2 um das 2.5fache gesteigert. Die Abnahme des Induktionsfaktors bei höheren H_2O_2 -Konzentrationen ist durch die zunehmende Zytotoxizität bedingt.

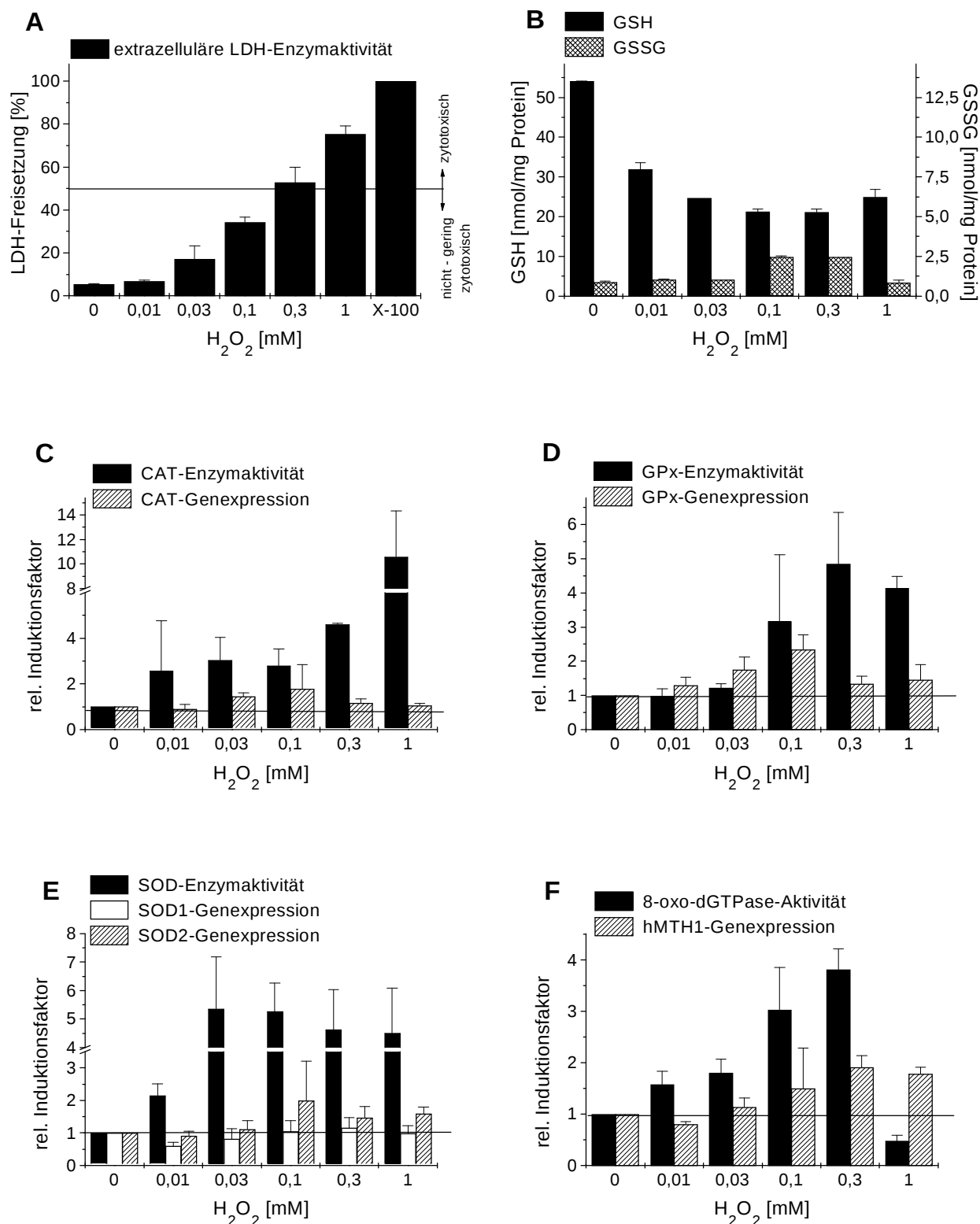


Abb.5-14: Einfluß von H_2O_2 auf die Freisetzung von LDH [A], den Glutathion-Status [B] sowie auf die Genexpression und Enzymaktivität von Katalase [C], Glutathion-Peroxidase [D], Superoxid-Dismutase [E] und 8-oxo-dGTPase in Jurkat-Zellen nach 24 h Inkubationszeit.

Für die Bstimmung der LDH-Aktivität wurden 10^6 Jurkat-Zellen ausplattiert und nach 24 h mit 0 – 1 mM H_2O_2 für 24 h, bzw. mit 0.5% Tritonx-100 als Positivkontrolle für 1 h behandelt. Die LDH-Aktivität wurde in 100 μ l Medium mit einem LDH-Kit bestimmt [4.5.2] und auf die Proteinkonzentration [4.6] bezogen. Die so erhaltenen Werte wurden auf die Positivkontrolle, die auf 100% gesetzt wurde, normiert. LDH-Freisetzungen > 50% wurden als zytopotxisch, < 50% als nicht bis gering zytopotxisch definiert. Für die Bestimmung der anderen

Parameter wurden 2×10^6 Jurkat-Zellen mit 0 - 1 mM H_2O_2 behandelt und nach 24 h der zellfreie Extrakt gewonnen [4.7.2.2.]. Die GSH-Bestimmung erfolgte in den nicht dialysierten Proben [4.9]. Die Bestimmung der SOD-Aktivität [4.8.2], der CAT-Aktivität [4.8.1] und der GPx-Aktivität [4.8.3] erfolgte in dialysierten Proben. Aus dem Ultrafiltrat wurde die 8-oxo-dGTPase-Aktivität [4.7.3 und 4.7.4] bestimmt. Sämtliche Parameter wurden auf die Proteinkonzentration [4.6] bezogen. Für die Bestimmung der Genexpression wurden 3×10^6 Jurkat-Zellen mit 0 - 1 mM H_2O_2 behandelt, nach 24 h die RNA isoliert [4.11.1] und der Gehalt spektralphotometrisch bestimmt [4.11.2]. 1 μ g RNA je Probe wurden in die RT-PCR eingesetzt [4.11.3]. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt [4.11.3.3] und die Ethidiumbromid gefärbten Gele mit dem GelPrint 1000i System dokumentiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software OneDScan [4.11.3.4]. Die dabei erhaltenen integrierten OD-Werte der jeweiligen Gene wurden auf die integrierten OD-Werte von GAPDH bezogen (normierte OD-Werte). Um die relativen Induktionsfaktoren zu erhalten, wurden die normierten OD-Werte und die Enzymaktivitäten der behandelten Zellen auf die der unbehandelten normiert. Die dargestellten Werte ergeben sich aus zwei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen.

Messungen der SOD-Aktivität (E) ergaben eine maximale Induktion (Faktor 5) bei 0.03 mM H_2O_2 , die mit steigender Konzentration nur geringfügig abnahm. Bei Untersuchung der Genexpression wurde die im Zytosol vorkommende Cu/Zn-haltige SOD1 von der in den Mitochondrien vorkommenden Mn-haltigen SOD2 unterschieden. Es zeigte sich, daß nur die SOD2 induziert werden konnte. Die maximale, 2fache Induktion wurde mit 0.1 mM H_2O_2 erreicht. Auch die 8-oxo-dGTPase (E) konnte mit H_2O_2 induziert werden, wobei die Aktivität bis 0.3 mM um das 4fache und die Genexpression um das 2fache gesteigert wurde. Die Abnahme beider Induktionsfaktoren bei 1 mM H_2O_2 kann durch die zunehmende Zytotoxizität erklärt werden.

5.3.2.2 Einfluß von H_2O_2 auf Genexpression und Enzymaktivität in humanen Hautfibroblasten

Nach 24 h Behandlung mit H_2O_2 konnte, wie im vorherigen Abschnitt gezeigt, die Genexpression und die Enzymaktivität der antioxidativen Enzyme CAT, SOD und GPx sowie der 8-oxo-dGTPase in Jurkat-Zellen dosisabhängig induziert werden. Dabei korrelierte die Induktion mit der Zytotoxizität, d.h. mit zunehmender Zytotoxizität wurde der Induktionsfaktor geringer. Eine Ausnahme bildete dabei die CAT-Aktivität. Es stellte sich nun die Frage, ob diese Beobachtungen für Jurkat-Zellen spezifisch oder auch auf andere Zellsysteme, wie z.B. Hautfibroblasten, übertragbar sind.

Dazu wurden primäre Hautfibroblasten für 24 h mit H_2O_2 behandelt. Die Bestimmung der Genexpression erfolgte mit der RT-PCR [4.11], wobei GAPDH als Referenzgen diente. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten [4.8] erfolgte im zellfreien Lysat. Der Redoxstatus der Zelle wurde durch Messung des GSH- und GSSG-Gehaltes bestimmt [4.9]. Als Zytotoxizitätsparameter diente die extrazelluläre LDH-Aktivität [4.5.2].

Wie aus **Abbildung 5-15** ersichtlich wird, konnte auch in Hautfibroblasten die Enzymaktivität der antioxidativen Enzyme und der 8-oxo-dGTPase sowie die Genexpression von SOD, CAT und hMTH1 durch 24 h Behandlung mit H_2O_2 induziert werden. Dabei ist der Einfluß auf die Genexpression im Verhältnis zum Einfluß auf die Enzymaktivität wesentlich geringer.

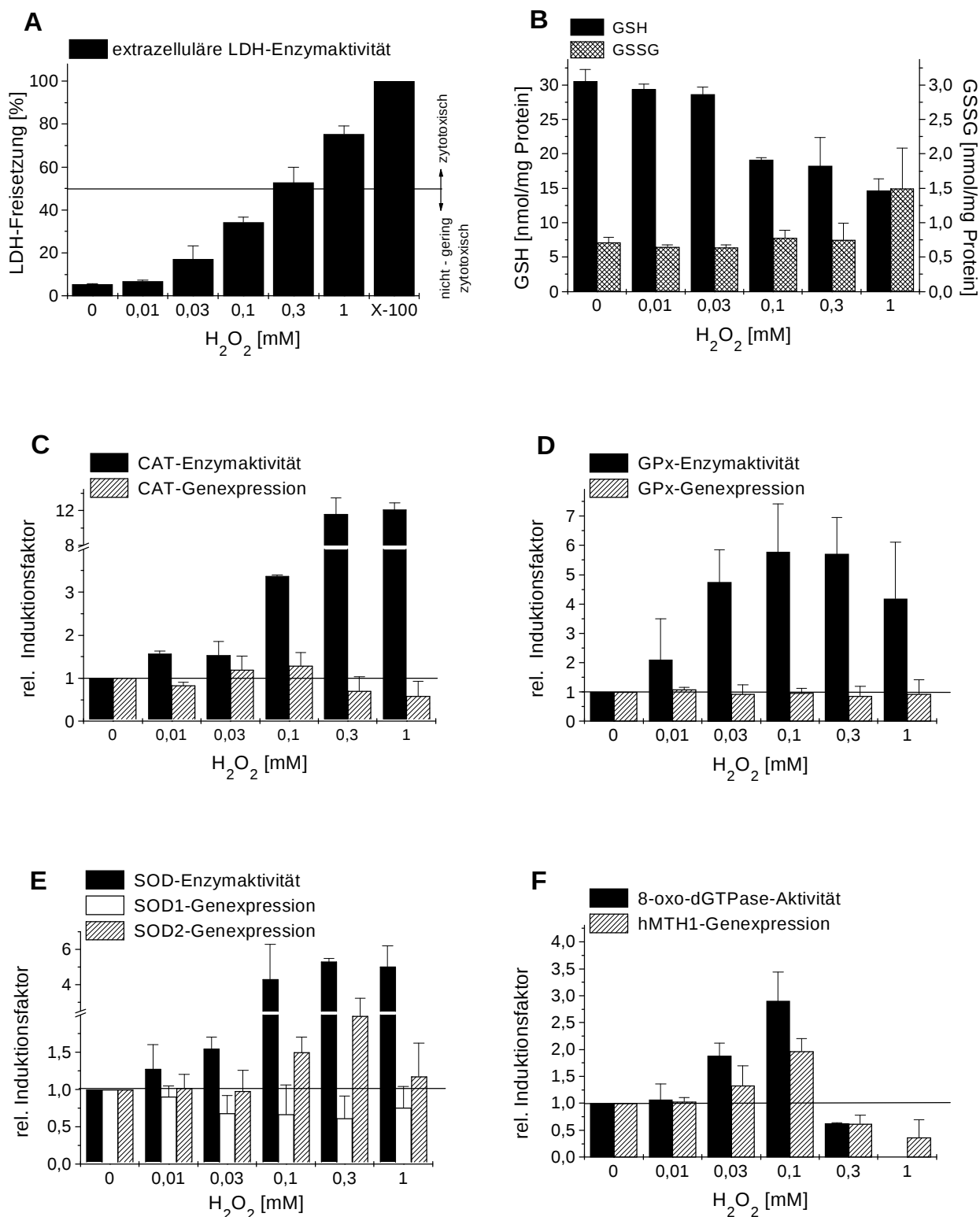


Abb.5-15: Einfluß von H₂O₂ auf die Freisetzung von LDH [A], den Glutathion-Status [B] sowie auf die Genexpression und Enzymaktivität von Katalase [C], Glutathion-Peroxidase [D], Superoxid-Dismutase [E] und 8-oxo-dGTPase [F] in humanen Hautfibroblasten nach 24 h Inkubationszeit.

Für die Bstimmung der LDH-Aktivität wurden 5×10^5 Hautfibroblasten ausplattiert und nach 24 h mit 0 – 1 mM H₂O₂ für 24 h, bzw. mit 0.5% Triton X-100 als Positivkontrolle für 1 h behandelt. Die LDH-Aktivität wurde in 100 µl Medium, wie unter Abb. 5-14 beschrieben, bestimmt. Die anderen Parameter wurden in 3×10^6 Hautfibroblasten, die für 24 h mit 0 – 1 mM H₂O₂ behandelt wurden, wie unter Abb. 5-14 beschrieben, bestimmt. Die dargestellten Daten ergaben sich aus zwei unabhängigen Versuchen.

Wie erwartet reagieren Hautfibroblasten wesentlich empfindlicher auf eine H_2O_2 Behandlung. So bewirkten schon geringere H_2O_2 -Konzentrationen eine stärkere LDH-Freisetzung (**A**) im Vergleich zu den Jurkat-Zellen. Nach Normierung auf die Positivkontrolle sind bei den Hautfibroblasten H_2O_2 -Konzentrationen bis 0.1 mM als nicht bis gering zytotoxisch und ab 0.3 mM als zytotoxisch einzustufen. Diese höhere Empfindlichkeit kann als eine Folge der im Vergleich zu den Jurkat-Zellen geringeren Basisaktivität der antioxidativen Enzyme und einer damit verbundenen geringeren antioxidativen Kapazität angesehen werden. Mit zunehmender H_2O_2 -Konzentration wurde eine Abnahme des GSH- mit einer gleichzeitigen Zunahme des GSSG-Spiegels beobachtet (**B**), was eine Veränderung des Redoxhaushaltes der Zelle zur Folge hat. Die CAT-Aktivität (**C**) wurde unabhängig zur Zytotoxizität, wie bei den Jurkat-Zellen auch, dosisabhängig induziert. Bei 1 mM betrug der Induktionsfaktor 12. Im Gegensatz dazu durchlief die Induktion der Genexpression bei 0.03 mM H_2O_2 mit einer 2fachen Induktion ein Maximum. Messungen der GPx-Aktivität (**D**) ergaben eine gute Korrelation mit der Zytotoxizität. Die maximale 6fache Induktion wurde mit 0.1 mM H_2O_2 erzielt. Dagegen konnte die GPx-Genexpression nach 24 h Behandlung mit H_2O_2 im Gegensatz zu den Jurkat-Zellen nicht induziert werden.

Bei der SOD-Aktivität (**E**) wurde mit 0.1 mM H_2O_2 eine 5fache Induktion festgestellt, die mit zunehmender H_2O_2 -Konzentration nur geringfügig abnahm. Wie schon bereits bei den Jurkat-Zellen nachgewiesen, konnte nur die SOD2-Genexpression induziert werden. Bei 0.3 mM H_2O_2 wurde die maximale 2fache Induktion festgestellt. Auch die 8-oxo-dGTPase-Aktivität (**F**) und die hMTH1-Genexpression konnten durch eine 24 h Behandlung mit H_2O_2 induziert werden. Die Ergebnisse korrelierten gut mit der Zytotoxizität. Die maximale Induktion, Faktor 3 bei der Aktivität und Faktor 2 bei der Genexpression, wurde mit 0.1 mM H_2O_2 erreicht. Zytotoxische Konzentrationen an H_2O_2 führten zur Hemmung der Genexpression und Verlust der Enzymaktivität.

5.3.2.3 Zeitlicher Verlauf der Genexpression und Enzymaktivität in humanen Hautfibroblasten nach H_2O_2 Behandlung

Wie in den vorangegangenen Abschnitten bereits gezeigt wurde, bewirkte H_2O_2 nur in Jurkat.-Zellen nach 24h eine Induktion der Genexpression und der Enzymaktivität von CAT, SOD, GPx und der 8-oxo-dGTPase. Zwar konnte in den primären Hautfibroblasten durch H_2O_2 auch eine Induktion der Enzymaktivitäten nachgewiesen werden, aber die GPx-Genexpression wurde nicht induziert. Dies warf die Frage auf, ob die Regulation dieser Enzyme koordiniert verläuft oder nicht. Der zeitliche Verlauf der Induktion von Genexpression und Enzymaktivität kann Hinweise über eine mögliche koordinierte Regulation dieser Enzyme liefern.

Es wurden primäre Hautfibroblasten mit 0.1 mM H_2O_2 behandelt. Diese Konzentration ruft noch keine toxischen Effekte hervor und eventuelle durch die Zytotoxizität bedingte Effekte können daher vernachlässigt werden.. In einem Zeitraum von 2 bis 48 h wurden die Zellen geerntet, die einzelnen Enzymaktivitäten [4.8] und die Genexpression mittels RT-PCR [4.11]

bestimmt. Die Kontrollzellen wurden über denselben Zeitraum in Kultur gehalten. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 5-16** dargestellt. Es zeigte sich, daß sich die einzelnen Enzyme im zeitlichen Verlauf ihrer Genexpression und ihrer Aktivität nach Behandlung mit H_2O_2 voneinander unterscheiden. Dies deutet auf eine unabhängige Regulation der einzelnen Enzyme hin.

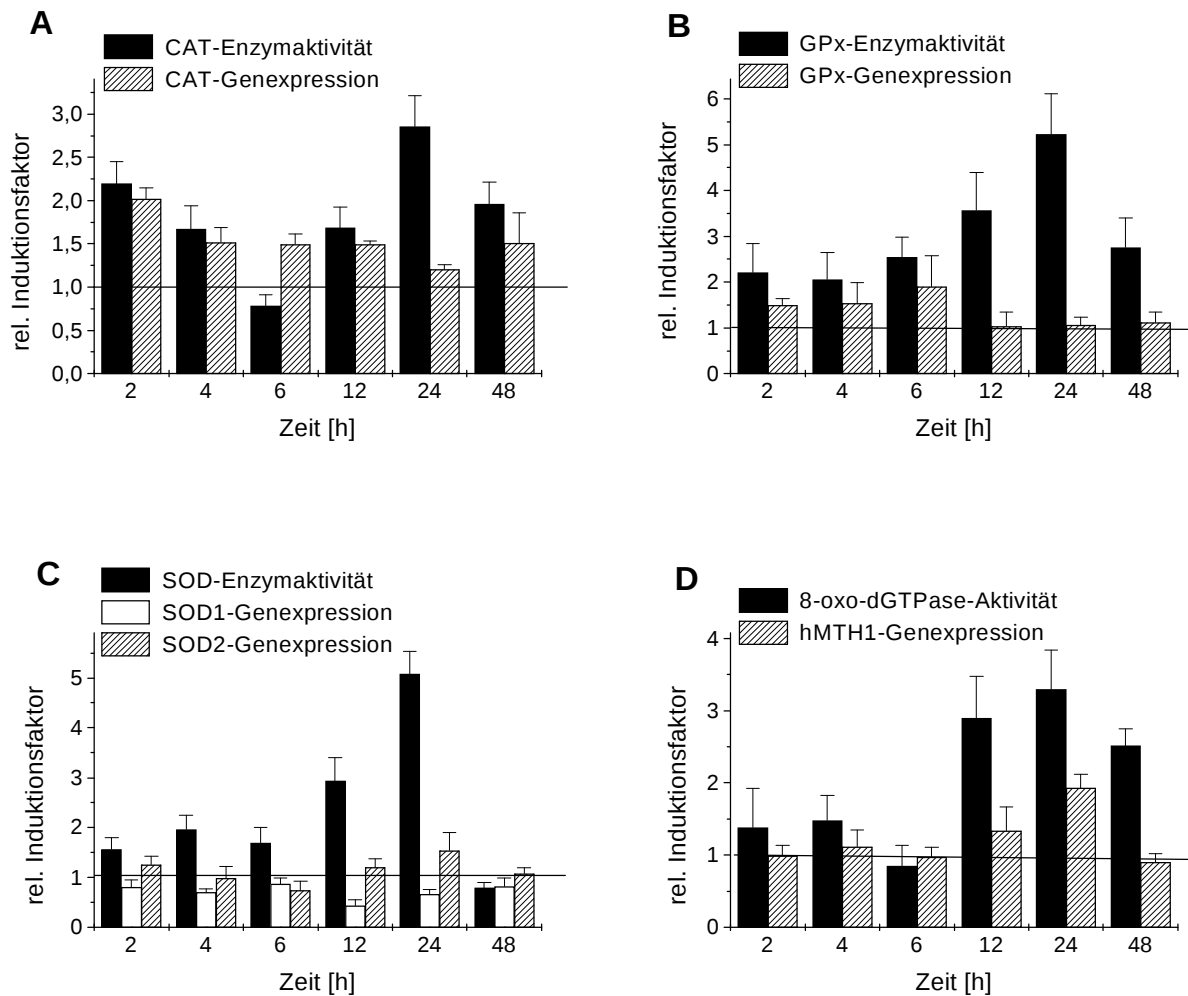


Abb.5-16: Zeitliche Änderung der Genexpression und Enzymaktivität von Katalase [A], Glutathion-Peroxidase [B], Superoxid-Dismutase [C] und 8-oxo-dGTPase [D] bei Inkubation mit 100 μM H_2O_2 in humanen Hautfibroblasten.

3×10^6 Hautfibroblasten wurden in An- oder Abwesenheit von 0.1 mM H_2O_2 über einen Zeitraum von 48 h inkubiert. Nach 2, 4, 6, 12, 24 und 48 h wurden die Zellen geerntet. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten und der Genexpression erfolgte wie unter Abb.5-14 bereits beschrieben. Die dargestellten Daten ergaben sich aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

Die CAT-Aktivität (**A**) wurde bereits 2 h nach Behandlung mit 0.1 mM H₂O₂ 2fach induziert. Nach 6 h war keine Induktion mehr nachweisbar. Nach 12 h kam es wieder zu einem Anstieg der CAT-Aktivität. Die maximale 3fache Induktion wurde nach 24 h erreicht. Offenbar gibt es eine schnelle und eine langsame Aktivierung der CAT-Enzymaktivität, die es der Zelle ermöglicht, sich gut an die äußeren Bedingungen anzupassen. Dagegen zeigte die CAT-Genexpression bereits nach 2 h ihre maximale 2fache Induktion, die über den Zeitraum von 48 h abnahm. Bei der GPx-Aktivität (**B**) konnte eine mit der Zeit zunehmende Induktion nachgewiesen werden, die nach 24 h ihr Maximum mit dem Faktor 5 erreicht. Dagegen nahm die GPx-Genexpression bis zu 6 h nach der H₂O₂-Behandlung um den Faktor 2 zu. Nach diesen 6 h konnte keine Induktion mehr nachgewiesen werden. Die SOD-Aktivität (**C**) und die SOD2-Genexpression zeigten nach 24 h die größte Induktion. Die SOD1-Genexpression wurde über den gesamten Zeitraum nicht induziert. Die 8-oxo-dGTPase-Aktivität (**D**) und die hMTH1-Genexpression wurden nach 12 h induziert und wiesen nach 24 h ihr Maximum auf. Nach 48 h konnte nur noch eine erhöhte 8-oxo-dGTPase-Aktivität festgestellt werden.

5.3.2.4 Untersuchungen zur Regulation der Genexpression durch H₂O₂ in Jurkat-Zellen

Die Induktion der Genexpression durch H₂O₂ kann als eine Konsequenz einer direkten Erhöhung der Transkriptionsrate, einer Verlängerung der mRNA-Halbwertszeit oder beider angesehen werden. Um zu klären, ob für die beobachteten Induktionen der Genexpression eine aktive mRNA-Synthese nötig ist, wurden Jurkat-Zellen mit Actinomycin D, einem starken Inhibitor der RNA-Neusynthese, in An- oder Abwesenheit von H₂O₂ behandelt. Daneben kann die Genexpression auch durch die Proteinsynthese beeinflusst werden. Um diesen Einfluß zu studieren, wurden Jurkat-Zellen mit Cycloheximid, einem starken Inhibitor der Protein-Neusynthese, in An- oder Abwesenheit von H₂O₂ inkubiert. Danach wurde mittels der RT-PCR die Genexpression analysiert. Als Referenzgen diente GAPDH, da es unter den gewählten Bedingungen konstant exprimiert wird.

In **Abbildung 5-17** ist der Einfluß von Actinomycin D und Cycloheximid auf die durch H₂O₂ bedingte Induktion der Genexpression von CAT, GPx, SOD2 und hMTH1 dargestellt. Da SOD1 durch H₂O₂ nicht beeinflusst wurde, erübrigt sich diese Untersuchung für SOD1.

Die Genexpression von SOD2, CAT, GPx und hMTH1 wurde durch eine Inkubation mit Actinomycin D [A] nicht beeinflusst. Sämtliche gemessenen Induktionsfaktoren schwankten um den Faktor 1. Die durch H₂O₂ bedingte Induktion der Genexpression [+] wurde bei SOD2, CAT, GPx und hMTH1 durch Koinkubation mit Actinomycin D [A+] unterbunden. Nach Behandlung von Jurkat-Zellen mit Cycloheximid [C] konnte bei SOD2 eine Induktion der Genexpression um den Faktor 1.7 festgestellt werden. Die leichte Erhöhung der Genexpression der übrigen Gene erwies sich dagegen als statistisch nicht signifikant, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Genexpression von CAT, GPx und hMTH1 durch Cycloheximid nicht beeinflusst wird.

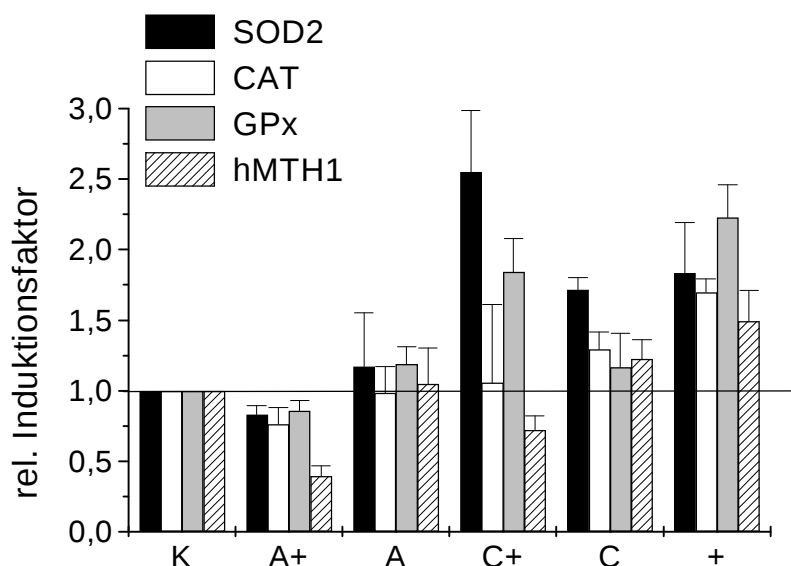


Abb.5-17: Einfluß von Actinomycin D [A] und Cycloheximid [C] auf die Genexpression von SOD2, CAT, GPx und hMTH1 in Jurkat-Zellen nach 24 h Inkubationszeit in Anwesenheit [+] von 0.1 mM H₂O₂.

Je 2×10^6 Jurkat-Zellen wurden mit Actinomycin D oder Cycloheximid in An- oder Abwesenheit von 0.1 mM H₂O₂ behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet, aus dem Zellpellet die RNA isoliert [4.11.1] und der Gehalt spektralphotometrisch bestimmt [4.11.2]. Je 1 µg RNA wurde in die RT-PCR eingesetzt [4.11.3]. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt [4.11.3.3] und die Ethidiumbromid gefärbten Gele mit dem GelPrint 1000i System dokumentiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software OneDScan [4.11.3.4]. Die erhaltenen Werte wurden auf die Kontrolle normiert und als relative Induktionsfaktoren graphisch dargestellt. Die dargestellten Werte ergaben sich aus zwei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen.

Die gleichzeitige Behandlung von Jurkat-Zellen mit 0.1 mM H₂O₂ und Cycloheximid [C+] führte bei SOD2 zu einer verstärkten Induktion der Genexpression (Faktor 2.5). Bei GPx wurde auch eine Induktion der Genexpression festgestellt, die im Rahmen der durch H₂O₂ bedingten Induktion lag. Bei hMTH1 wurde die durch H₂O₂ bedingte Induktion der Genexpression durch Koinkubation mit Cycloheximid verringert. Auch bei CAT konnte eine Abnahme der Genexpression festgestellt werden, wobei allerdings der Meßfehler sehr groß war.

5.3.2.5 Einfluß von Superoxid auf die Genexpression und Enzymaktivität in Jurkat-Zellen

Wie die vorherigen Untersuchungen gezeigt haben, bewirkte H₂O₂ eine von der Konzentration und der Zeit abhängige Induktion der Genexpression und der Enzymaktivität von CAT, SOD, GPx und 8-oxo-dGTPase. Dies warf die Frage auf, ob auch andere reaktive Sauerstoffspezies, wie das Superoxidradikalanion O₂^{•-}, diese Enzyme induzieren können und ob

Unterschiede zur H_2O_2 bedingten Induktion auftreten. Diese Untersuchungen könnten weitere Hinweise für eine Regulation der einzelnen Enzyme liefern.

Deshalb wurden Jurkat-Zellen mit Xanthin-Oxidase in Gegenwart von 50 μM Xanthin behandelt. Dieses System produziert in Abhängigkeit zur eingesetzten Xanthin-Oxidase-Konzentration Superoxidradikalanionen $\text{O}_2^{\bullet-}$. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die Genexpression mittels RT-PCR [4.11] und die Enzymaktivitäten der einzelnen Enzyme bestimmt [4.8]. Als Parameter für die Zytotoxizität wurde die extrazelluläre LDH-Aktivität herangezogen [4.5.2]. Das Verhältnis von GSH und GSSG spiegelt Veränderungen im Redoxhaushalt der Zellen wieder [4.9].

Wie aus **Abbildung 5-18** ersichtlich wird, konnte durch Inkubation der Jurkat-Zellen mit Xanthin/Xanthin-Oxidase die Genexpression und die Enzymaktivität induziert werden. Allerdings waren die gemessenen Induktionen der Genexpression wesentlich geringer als die der entsprechenden Enzymaktivitäten. Die Messungen der extrazellulären LDH-Aktivität ergaben, daß Konzentrationen von 50 mU/ml Xanthin-Oxidase für Jurkat-Zellen gering zytotoxisch sind (**A**). Mit zunehmender Xanthin-Oxidase-Konzentration war zwar eine GSH-Depletion beobachtbar, die aber nicht mit einer Erhöhung des internen GSSG-Gehalts einherging (**B**). Da eine Konjugation von GSH an reaktive Metabolite in diesem Zusammenhang eher unwahrscheinlich ist, wird angenommen, daß GSSG aus den Zellen in den Extrazellulärraum transportiert wurde. Zur genauen Klärung müßte jedoch der extrazelluläre GSSG-Spiegel bestimmt werden.

Die CAT-Genexpression konnte durch $\text{O}_2^{\bullet-}$ nach 24 h Behandlung nicht induziert werden. Dagegen wurde die CAT-Aktivität bis zu einer Xanthin-Oxidase-Konzentration von 15 mU/ml um den Faktor 6 gesteigert (**C**). Auch die GPx-Enzymaktivität wies bei dieser Konzentration ihre maximale Induzierbarkeit um den Faktor 8 auf. Die GPx-Genexpression konnte durch eine Xanthin-Oxidase Konzentration von 1.5 mU/ml 2fach induziert werden. Höhere Konzentrationen zeigten jedoch keine Änderungen der Genexpression (**D**). Wie im Falle von H_2O_2 wurde nur die SOD2-Genexpression von $\text{O}_2^{\bullet-}$ induziert. Die beobachtete Induktion erwies sich als konzentrationsunabhängig und schwankte über den gesamten Bereich um den Faktor 2. Die SOD1-Genexpression wurde nicht beeinflusst. Dagegen wurde für die SOD-Enzymaktivität eine konzentrationsabhängige Induktion festgestellt. Im Vergleich zu unbehandelten Zellen war die SOD-Enzymaktivität bei der höchsten Xanthin-Oxidase-Konzentration 8fach erhöht (**E**). Im Gegensatz dazu konnte für die 8-oxo-dGTPase nur bei einer Xanthin-Oxidase-Konzentration von 1.5 mU/ml eine 2fache Induktion nachgewiesen werden. Die leichten Erhöhungen der Genexpression bei niedrigen Xanthin-Oxidase-Konzentrationen erwiesen sich als statistisch nicht signifikant (**F**).

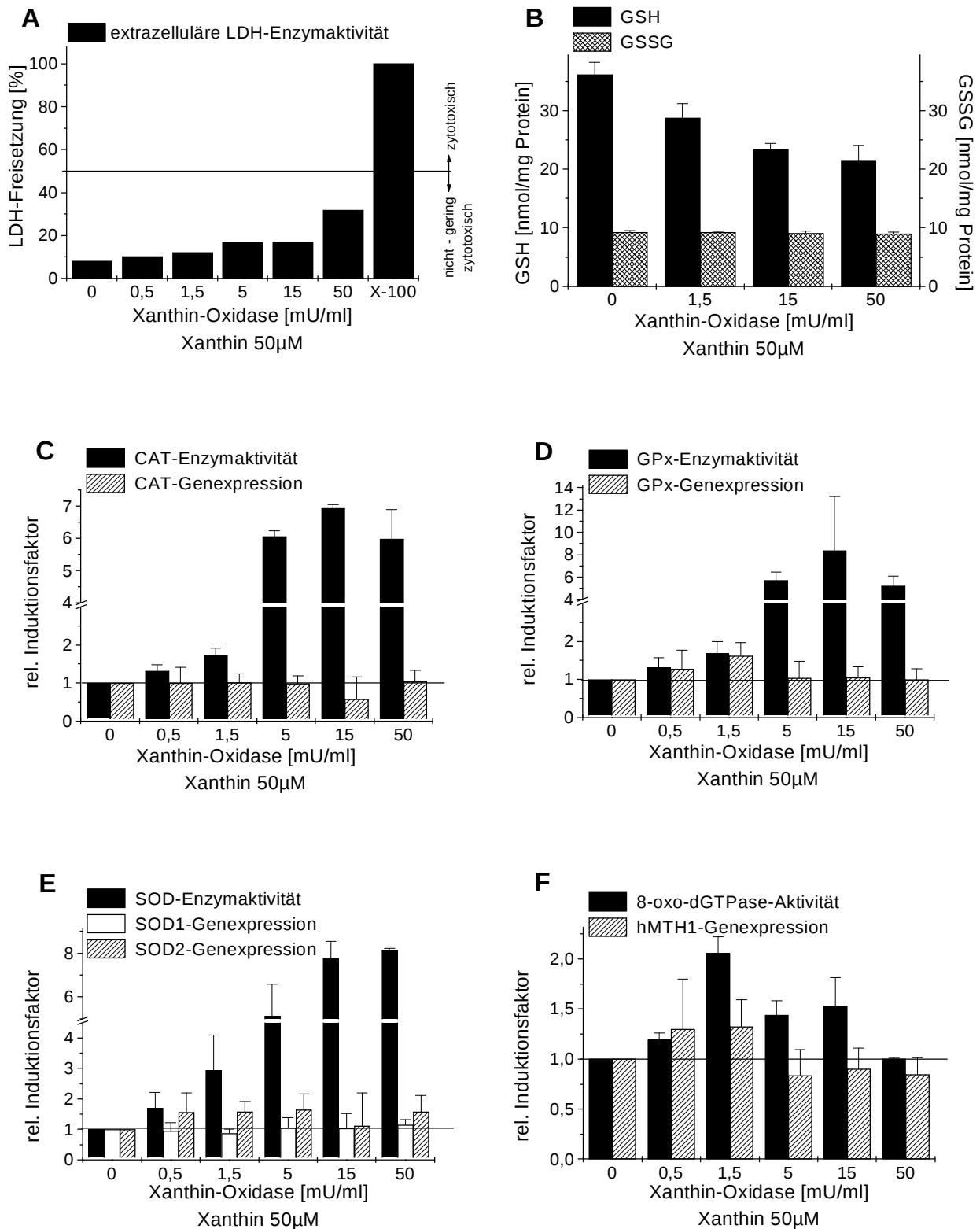


Abb. 5-18: Einfluß von Xanthin/Xanthin-Oxidase auf die Freisetzung von LDH [A], den GSH-Status [B] sowie auf die Genexpression und Enzymaktivität von Katalase [C], GSH-Peroxidase [D], Superoxid-Dismutase [E] und 8-oxo-dGTPase [F] in Jurkat-Zellen nach 24 h Inkubationszeit

Für die Bestimmung der LDH-Aktivität wurden 10^6 Jurkat-Zellen für 24 h mit 0 – 50 mU/ml Xanthin-Oxidase und 50 µM Xanthin, bzw. mit 0.5% Triton X-100 als Positivkontrolle für 1 h behandelt. Zur Analyse der anderen Parameter wurden 2×10^6 Jurkat-Zellen für 24 h mit 0 – 50 mM Xanthin-Oxidase und 50 µM Xanthin behandelt. Die einzelnen Bestimmungen erfolgten wie unter Abb. 5-14 beschrieben. Die Daten stammen aus zwei Versuchen.

5.3.2.6 *Einfluß von Superoxid auf die Genexpression und Enzymaktivität in primären Hautfibroblasten*

Primäre Hautfibroblasten wurden, wie unter 4.3.1 beschrieben, isoliert, kultiviert und mit Xanthin-Oxidase in Gegenwart von Xanthin behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die Enzymaktivitäten bestimmt. Die Genexpression wurde mit der RT-PCR ermittelt. Die extrazelluläre LDH-Aktivität diente als Zytotoxizitätsmarker. Veränderungen im Redoxhaushalt der Hautfibroblasten durch eine Behandlung mit Xanthin/Xanthin-Oxidase wurden über die Bestimmung von GSH und GSSG erfaßt.

Die Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen sind in **Abbildung 5-19** zusammengefaßt. Im Gegensatz zu den Jurkat-Zellen reagieren primäre Hautfibroblasten empfindlicher auf das $O_2^{\bullet -}$ generierende System Xanthin/Xanthin-Oxidase. Die Bestimmung der extrazellulären LDH-Aktivität ergab, daß Konzentrationen bis 5 mU/ml Xanthin-Oxidase als nicht zytotoxisch, 15 mU/ml als gering zytotoxisch und 50 mU/ml als zytotoxisch einzustufen sind (**A**). Zunehmende Konzentrationen an Xanthin-Oxidase bewirkten eine stärkere $O_2^{\bullet -}$ Produktion. Diese führte in primären Hautfibroblasten zu einer Verschiebung des Redoxhaushaltes zur oxidierten Seite. So konnte eine Abnahme des GSH- mit gleichzeitiger Zunahme des GSSG-Gehaltes in Abhängigkeit zur eingesetzten Xanthin-Oxidase-Konzentration nachgewiesen werden. Der geringere GSSG-Gehalt bei 50 mU/ml Xanthin-Oxidase könnte durch einen Transport von GSSG in den extrazellulären Raum bedingt worden sein (**B**). Zur genauen Klärung müßte jedoch der extrazelluläre GSSG-Gehalt bestimmt werden.

Während die CAT-Aktivität durch Xanthin/Xanthin-Oxidase konzentrationsabhängig induziert werden konnte, war bei der CAT-Genexpression kein Effekt nachweisbar (**C**). Die maximale Induktion der CAT-Enzymaktivität lag bei einer Xanthin-Oxidase-Konzentration von 15 mU/ml und hatte den Induktionsfaktor 3.5. Ein ähnlicher Effekt wurde auch bei der Glutathion-Peroxidase (GPx) beobachtet. Zunehmende Konzentrationen an Xanthin-Oxidase bewirkten eine Steigerung der GPx-Enzymaktivität, wohingegen die Genexpression konstant blieb. Die anscheinende Induktion der Genexpression erwies sich als statistisch nicht signifikant (**D**). Die maximale Induktion der GPx-Enzymaktivität mit einem Induktionsfaktor von 5 wurde bei einer Xanthin-Oxidase-Konzentration von 15 mU/ml gemessen. Die SOD-Enzymaktivität wurde konzentrationsabhängig induziert. Die maximale 5fache Induktion wurde mit einer Xanthin-Oxidase-Konzentration von 50 mU/ml erreicht. Dagegen konnte sowohl bei der SOD1 als auch bei der SOD2 keine Erhöhung der Genexpression nach Behandlung von primären Hautfibroblasten mit Xanthin/Xanthin-Oxidase festgestellt werden. Die berechneten Werte schwankten alle um 1 und entsprachen somit der gemessenen Genexpression in unbehandelten Zellen (**E**). Im Gegensatz zu den klassischen antioxidativen Enzymen CAT, GPx und SOD konnte nach Behandlung von Hautfibroblasten mit Xanthin/Xanthin-Oxidase nur eine geringe Induktion der 8-oxo-dGTPase-Aktivität (Faktor 1.5) und keine Induktion der hMTH1-Genexpression nachgewiesen werden (**F**).

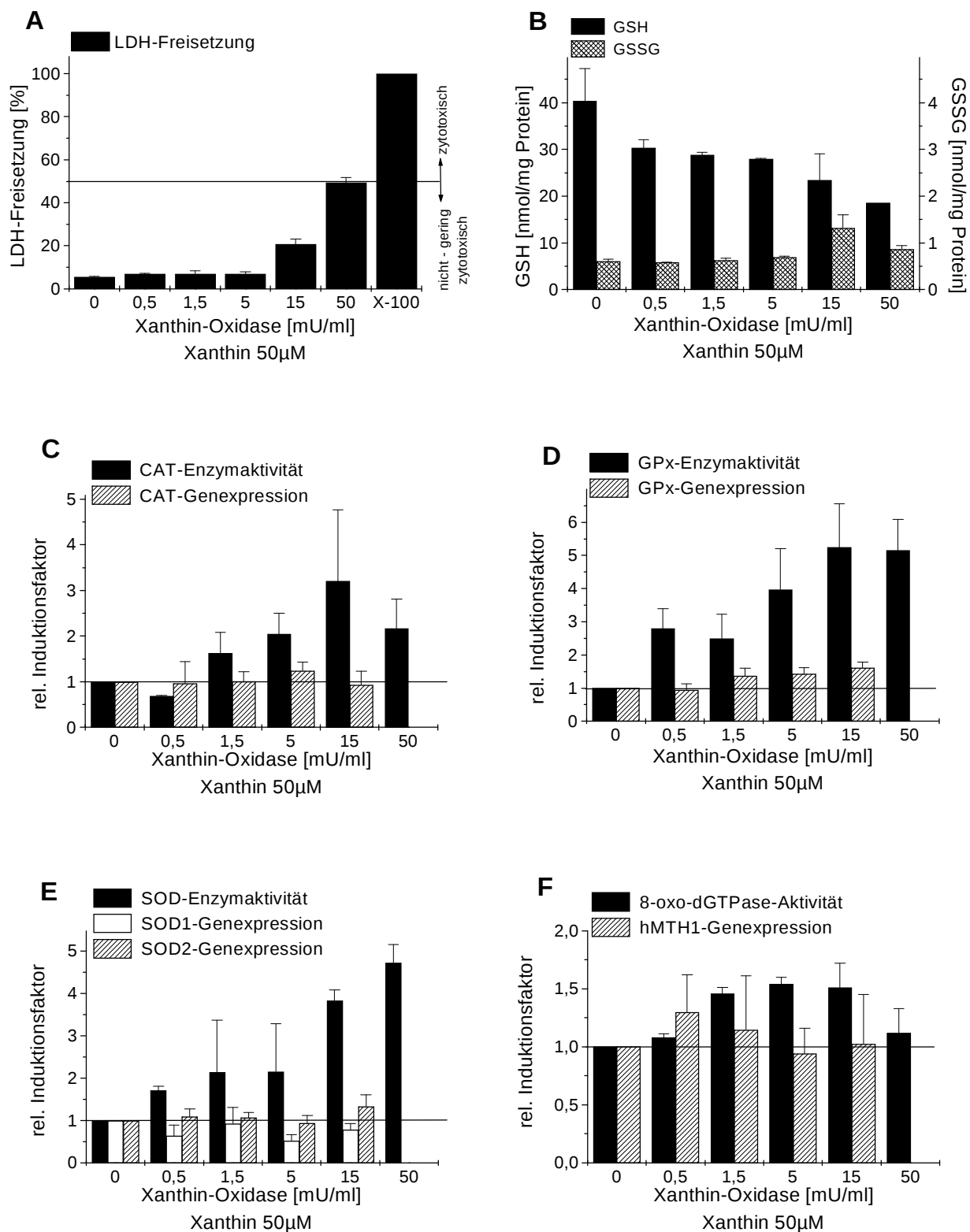


Abb. 5-19: Einfluß von Xanthin/Xanthin-Oxidase auf die Freisetzung von LDH [A], den GSH-Status [B] sowie auf die Genexpression und Enzymaktivität von Katalase [C], Glutathion-Peroxidase [D], Superoxid-Dismutase [E] und 8-oxo-dGTPase [F] in Hautfibroblasten nach 24 h Inkubationszeit

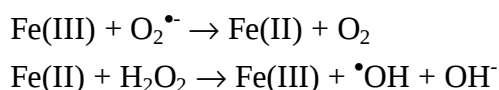
Für die Bestimmung der LDH-Aktivität wurden 5×10^5 Hautfibroblasten mit 0 - 50 mU/ml Xanthin-Oxidase und 50 µM Xanthin für 24 h, bzw. mit 0,5% Triton X-100 als Positivkontrolle für 1 h behandelt. Für die Analyse der anderen Parameter wurden 3×10^6 Hautfibroblasten für 24 h mit 0 - 50 mU/ml Xanthin-Oxidase und 50 µM Xanthin behandelt. Die einzelnen Bestimmungen erfolgte wie unter Abb. 5-14 beschrieben. Dargestellt sind die Daten zweier voneinander unabhängiger Versuche.

Diese Ergebnisse deuten nicht nur auf eine vom Oxidans abhängige Regulation der Genexpression hin, sondern auch auf eine zellspezifische Regulation. Der Redoxstatus der Zelle scheint nur eine untergeordnete Rolle bei der Regulation der einzelnen Enzyme zu spielen.

5.3.3 Einfluß von Übergangsmetallen

Bei der Entstehung von oxidativen Streß spielen Übergangsmetalle eine wichtige Rolle. So sind sie nicht nur direkt über einen dem Redoxcycling ähnlichen Mechanismus bei der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies beteiligt, sondern tragen auch indirekt als eine Art Katalysator zur vermehrten Schädigung von Makromolekülen bei. Diese beiden Mechanismen sind für alle Übergangsmetalle gleich. Das Ausmaß der Schädigung dagegen ist für die einzelnen Übergangsmetalle charakteristisch und hängt von der Löslichkeit, dem Transport, der Reaktivität, der Komplexbildungswahrscheinlichkeit und der Absorption ab.

Das wohl am meisten untersuchte Übergangsmetall ist Eisen. Eine Beteiligung von Eisen bei der Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies wird durch die Fenton-Reaktion beschrieben:



5.3.3.1 Einfluß von Fe^{2+} auf die Genexpression und Enzymaktivität in Jurkat-Zellen

Um den Einfluß von Übergangsmetallen auf die Genexpression und Enzymaktivität der antioxidativen Enzyme CAT, GPx, SOD sowie der 8-oxo-dGTPase zu studieren, wurden Jurkat-Zellen mit FeCl_2 behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die Enzymaktivitäten im zellfreien Lysat gemessen. Die Genexpression wurde mittels der RT-PCR bestimmt, wobei GAPDH als Referenzgen diente. Der Redoxstatus der Zellen wurde über Messung des GSH- und GSSG-Gehaltes analysiert. Als ein Parameter für Zytotoxizität wurde die extrazelluläre LDH-Aktivität herangezogen.

Aus **Abbildung 5-20** wird ersichtlich, daß FeCl_2 nur einen geringen Effekt auf die Genexpression und die Enzymaktivität der untersuchten Enzyme ausübt. Die eingesetzten Konzentrationen erwiesen sich, wie die Messung der extrazellulären LDH-Aktivität (**A**) ergab, als nicht bis gering zytotoxisch. Die nachgewiesene Zunahme der extrazellulären LDH-Aktivität mit zunehmender FeCl_2 -Konzentration war im Verhältnis zur Positivkontrolle mit Triton X-100 gering. Die Behandlung von Jurkat-Zellen mit FeCl_2 führte zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme des GSH-Gehaltes. Der GSSG-Gehalt blieb dagegen annähernd konstant und betrug $\sim 8 \text{ nmol/mg Protein}$. Dies könnte am Abtransport des GSSG in den extrazellulären Raum liegen, da eine GSH-Konjugation eher unwahrscheinlich ist. Somit bewirkt FeCl_2 eine Verschiebung des Redoxgleichgewichtes zur oxidierten Seite (**B**). Auf die CAT-Genexpression hatte FeCl_2 keinen Einfluß und auch auf die CAT-Aktivität konnte nur bei 0.3 mM FeCl_2 eine wenn auch geringe, aber statistisch signifikante Induktion um den Faktor 2 nachgewiesen werden (**C**).

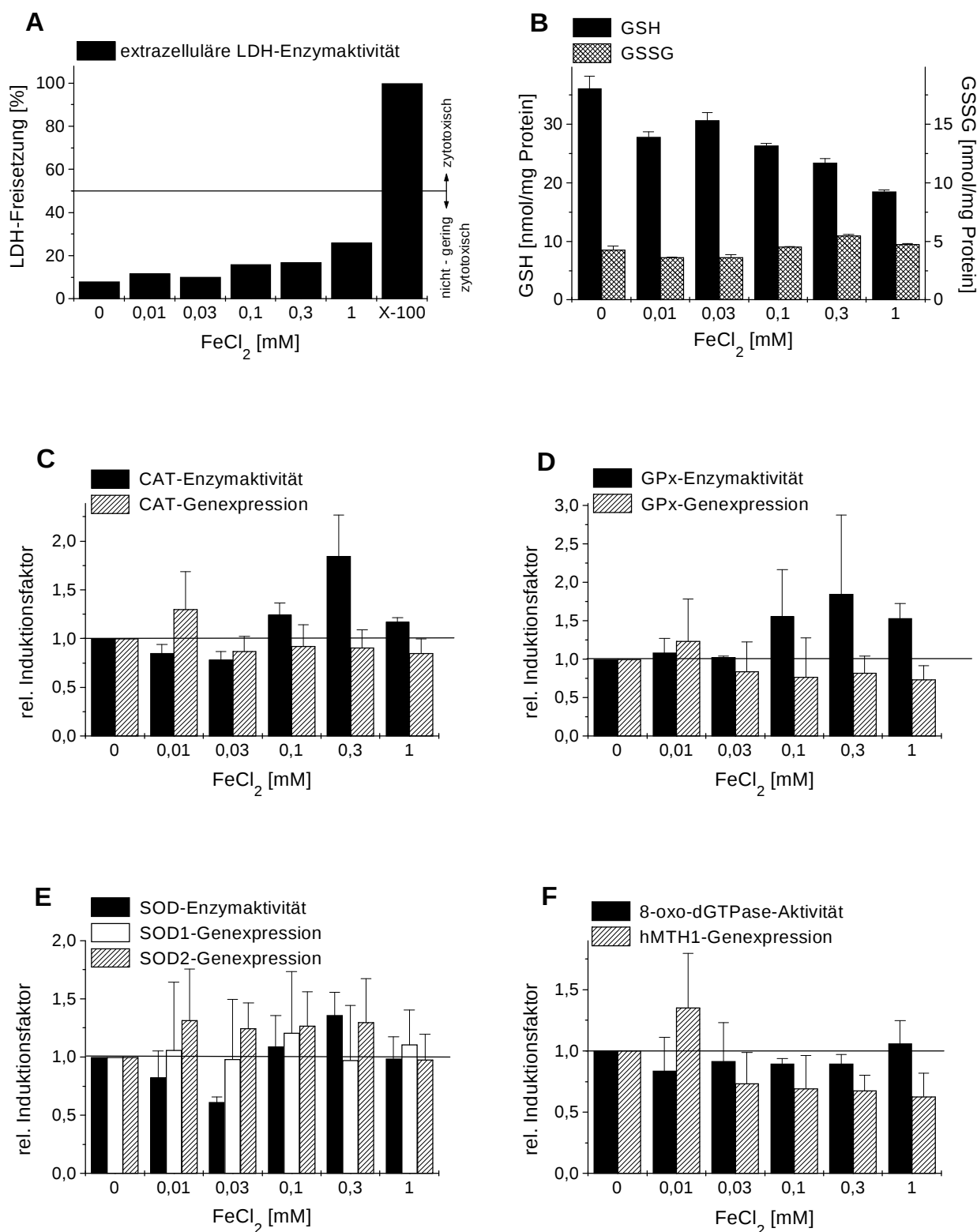


Abb. 5-20: Einfluß von FeCl₂ auf die LDH-Aktivität [A], den GSH-Status [B], sowie auf die Genexpression und Enzymaktivität von Katalase [C], Glutathion-Peroxidase [D], Superoxid-Dismutase [E] und 8-oxo-dGTPase [F] in Jurkat-Zellen nach 24 h Inkubationszeit.

Für die Bestimmung der LDH-Aktivität wurden 10⁶ Jurkat-Zellen für 24 h mit 0–1 mM FeCl₂, bzw. mit 0.5% Triton X-100 als Positivkontrolle für 1 h behandelt. Zur Analyse der anderen Parameter wurden 2x10⁶ Jurkat-Zellen für 24 h mit 0–1 mM FeCl₂ behandelt. Die einzelnen Bestimmungen erfolgten wie unter Abb. 5-14 beschrieben. Die Daten stammen aus zwei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen.

Ein ähnliches Verhalten zeigte die GPx. Die Genexpression wurde durch die FeCl₂ Behandlung nicht beeinflusst, wohingegen die GPx-Enzymaktivität bei 0.3 mM FeCl₂ eine um den Faktor 2 schwankende Induktion zeigte (**D**). Dagegen konnte kein Effekt bei der SOD-Enzymaktivität und der SOD-Genexpression festgestellt werden. Die berechneten Werte schwanken alle um den Faktor 1 (**E**). Die 8-oxo-dGTPase-Aktivität in Jurkat-Zellen wurde durch FeCl₂ nicht induziert. Bei der hMTH1-Genexpression wurde eine mit zunehmender FeCl₂-Konzentration abnehmende Tendenz festgestellt. So betrug der Induktionsfaktor bei 1 mM FeCl₂ nur noch 0.7, was auf eine verminderte Genexpression im Vergleich zu unbehandelten Jurkat-Zellen schließen läßt.

5.3.3.2 Einfluß von Fe²⁺ auf die Genexpression und Enzymaktivität in primären Hautfibroblasten

Der Einfluß von Übergangsmetallen auf die Genexpression und Enzymaktivität in Jurkat-Zellen sollte mit dem Einfluß in primären Hautfibroblasten verglichen werden, um eventuelle zellspezifische Unterschiede zu erfassen. Dazu wurden primäre Hautfibroblasten aus Vorhaut gewonnen [4.3.1], kultiviert [4.3.2] und mit FeCl₂ behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet. Aus einem Teil der Proben wurde die RNA isoliert, die dann zur Bestimmung der Genexpression in die RT-PCR eingesetzt wurde. Als Referenzgen diente GAPDH [4.11]. Aus den übrigen Proben wurde der zellfreie Extrakt [4.7.2.2] hergestellt, in dem die Enzymaktivitäten sowie der GSH- und GSSG-Gehalt bestimmt wurden [4.8]. In einem separaten Ansatz erfolgte die Messung der extrazellulären LDH-Aktivität, die als ein Parameter für Zytotoxizität herangezogen wurde.

Die Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen sind als relative Induktionsfaktoren in **Abbildung 5-21** dargestellt. Wie bereits die Untersuchungen in Jurkat-Zellen zeigten, war auch in primären Hautfibroblasten nur ein geringer Einfluß von Fe²⁺ auf die Genexpression und Enzymaktivität der CAT, SOD, GPx und 8-oxo-dGTPase nachweisbar. Die eingesetzten Konzentrationen erwiesen sich als nicht zytotoxisch. Eine vermehrte LDH-Freisetzung konnte nicht festgestellt werden (**A**). Zunehmende Konzentrationen an FeCl₂ führten zu einer Abnahme des GSH-Spiegels und einer geringen Zunahme des GSSG-Spiegels, was für eine Verschiebung des Redoxgleichgewichtes auf die oxidierte Seite spricht (**B**). Dies kann auch als Marker für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Fe²⁺-Ionen angesehen werden, die GSH zu GSSG oxidieren. Die CAT-Genexpression wurde durch eine Behandlung mit FeCl₂ nicht induziert. Dagegen konnte bei der CAT-Enzymaktivität eine geringe konzentrationsabhängige Induktion festgestellt werden. Bei 1 mM FeCl₂ wurde ein Induktionsfaktor von 2 erhalten (**C**). Die Glutathion-Peroxidase (GPx) in primären Hautfibroblasten wurde durch FeCl₂ nicht beeinflusst. Die ermittelten relativen Induktionsfaktoren von Genexpression und Enzymaktivität erwiesen sich als statistisch nicht signifikant (**D**).

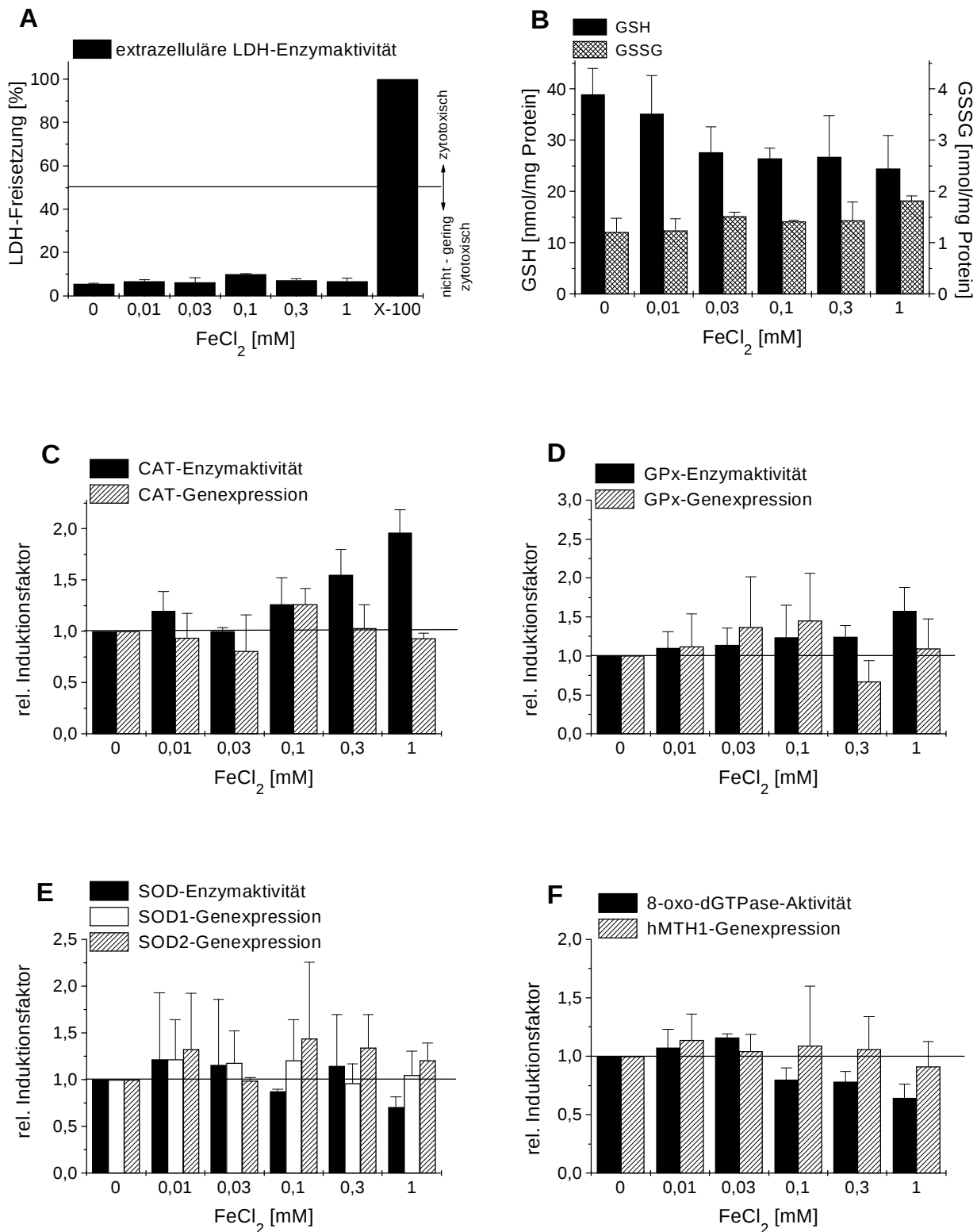


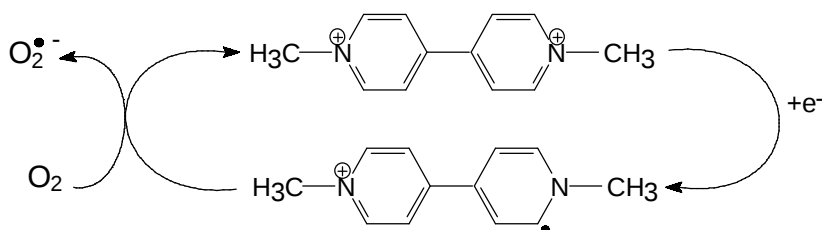
Abb. 5-21: Einfluß von FeCl₂ auf die Freisetzung von LDH [A], den GSH-Status [B] sowie auf die Genexpression und Enzymaktivität von Katalase [C], Glutathion-Peroxidase [D], Superoxid-Dismutase [E] und 8-oxo-dGTPase [F] in Hautfibroblasten nach 24 h Inkubationszeit

Für die Bstimmung der LDH-Aktivität wurden 5×10^5 Hautfibroblasten mit 0 - 1 mM FeCl₂ für 24 h, bzw. mit 0.5% Triton X-100 als Positivkontrolle für 1 h behandelt. Zur Analyse der anderen Parameter wurden 3×10^6 Hautfibroblasten für 24 h mit 0 - 1 mM FeCl₂ behandelt. Die einzelnen Bestimmungen erfolgten wie in Abb. 5-14 beschrieben. Die dargestellten Daten ergaben sich aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

Auch die Superoxid-Dismutase (SOD) wurde durch FeCl_2 nicht beeinflusst. Es konnte weder eine Induktion der Genexpression von SOD1 und SOD2 noch eine Induktion der Enzymaktivität nachgewiesen werden (E). Im Gegensatz dazu wurde bei der 8-oxo-dGTPase mit zunehmender FeCl_2 Konzentration eine abnehmende Aktivität beobachtet. Bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 1 mM FeCl_2 betrug der Induktionsfaktor 0.6. Dies entspricht 60% der in unbehandelten Hautfibroblasten gemessenen 8-oxo-dGTPase-Aktivität. Die hMTH1-Genexpression zeigte zwar bei den höheren FeCl_2 Konzentrationen eine tendenziöse Abnahme, die sich jedoch als statistisch nicht signifikant herausstellte (F). Ob höhere Konzentrationen an FeCl_2 dieser Tendenz folgend zu einer Repression der hMTH1-Genexpression führen, bleibt zu klären.

5.3.4 Rolle des Redoxcycling bei der Induktion von Genexpression und Enzymaktivität

Verschiedene Xenobiotika können über einen Prozeß, der Redoxcycling genannt wird, reaktive Sauerstoffspezies bilden und somit zur Schädigung der Makromoleküle beitragen. Eine Substanz, die auf diese Weise oxidativen Streß erzeugt, ist Paraquat, das als Herbizid eingesetzt wird. Paraquat bildet intrazellulär Superoxidradikalanionen ($\text{O}_2^{\bullet -}$) nach folgender Gleichung:



Das Elektron wird von verschiedenen Enzymsystemen, wie z.B. von der NADPH-Cytochrom c-Reduktase auf Paraquat übertragen.

Da mit dem u.a. $\text{O}_2^{\bullet -}$ generierenden System Xanthin/Xanthin-Oxidase bereits eine Induktion der Genexpression und der Enzymaktivität der antioxidativen Enzyme CAT, SOD und GPx sowie der 8-oxo-dGTPase nachgewiesen werden konnte [siehe 5.3.2], stellte sich die Frage, ob diese Induktion auch mit Paraquat zu erzielen wäre. Das Ausmaß des Redoxcyclings könnte bei der Induktion eine entscheidende Rolle spielen und somit für zellspezifische Unterschiede verantwortlich sein.

5.3.4.1 *Einfluß von Paraquat auf die Genexpression und Enzymaktivität in Jurkat-Zellen*

Um den Einfluß von Paraquat auf die Genexpression und Enzymaktivität der antioxidativen Enzyme CAT, SOD und GPx sowie der 8-oxo-dGTPase zu untersuchen, wurden Jurkat-Zellen mit Paraquat behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet. Die Bestimmung der Genexpression erfolgte aus RNA mittels RT-PCR, wobei GAPDH als Referenzgen eingesetzt wurde [4.11]. Die Bestimmung des GSH- und GSSG-Gehaltes, sowie der einzelnen Enzymaktivitäten erfolgte wie unter 4.8 beschrieben im zellfreien Lysat [4.7.2.2] der Proben. Die Bestimmung der extrazellulären LDH-Aktivität erfolgte in einem separaten Reaktionsansatz und diente als ein Parameter für Zytotoxizität [4.5.2].

Aus **Abbildung 5-22** wird ersichtlich, daß eine Behandlung von Jurkat-Zellen mit Paraquat zu einer Induktion sowohl der Genexpression als auch der Enzymaktivitäten der untersuchten Enzyme führt. Zunehmende Paraquat-Konzentrationen bewirkten eine vermehrte LDH-Freisetzung, was sich in einer erhöhten extrazellulären LDH-Aktivität widerspiegelte. Durch einen Vergleich dieser mit der durch die Postivkontrolle Triton X-100 hervorgerufenen LDH-Freisetzung, wurden Paraquat-Konzentrationen bis 0.5 mM als nicht bis gering und Konzentrationen ab 1.5 mM als zytotoxisch eingestuft (**A**).

Die deutliche konzentrationsabhängige Abnahme des GSH-Spiegels mit gleichzeitiger Zunahme des GSSG-Spiegels deuten auf eine durch Paraquat bedingte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies hin. Somit bewirkte Paraquat in Jurkat-Zellen eine Verschiebung des Redoxgleichgewichtes zur oxidierten Seite. Diese starke GSH-Oxidation könnte auch eine Ursache der durch Paraquat bedingten Zytotoxizität bei hohen Konzentrationen sein (**B**). Messungen der CAT-Aktivität ergaben eine mit steigender Paraquat-Konzentration zunehmende Aktivität, die bei 0.5 mM ein Maximum durchlief. Der maximale Induktionsfaktor lag bei 5.5. Die CAT-Genexpression zeigte denselben Verlauf mit einem maximalen relativen Induktionsfaktor von 2.5 bei einer Paraquat-Konzentration von 0.5 mM (**C**).

Auch für die GPx wurde ein ähnlicher Induktionsverlauf festgestellt. Die Aktivität durchlief bei einer Paraquat-Konzentration von 0.5 mM ein Induktionsmaximum, welches mit dem relativen Faktor von 2.5 beschrieben werden konnte. Der relative Induktionsfaktor der GPx-Genexpression schwankte dagegen im Bereich von 0.015 – 0.5 mM Paraquat um den Wert 2. Bei der zytotoxischen Konzentration von 1.5 mM konnte keine Induktion der Genexpression mehr nachgewiesen werden (**D**).

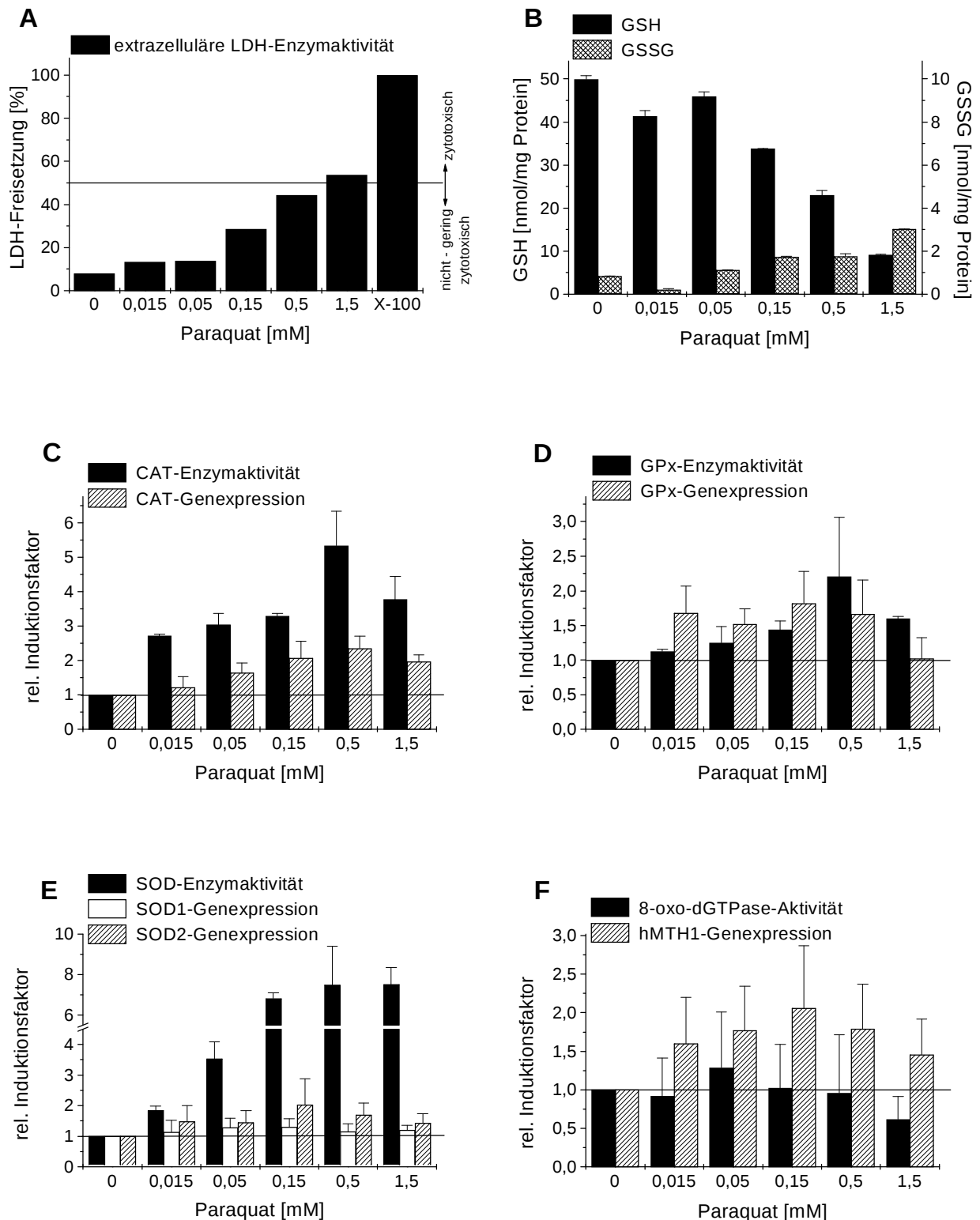


Abb. 5-22: Einfluß von Paraquat auf die LDH-Aktivität [A], den GSH-Status [B], sowie auf die Genexpression und Enzymaktivität von Katalase [C], Glutathion-Peroxidase [D], Superoxid-Dismutase [E] und 8-oxo-dGTPase [F] in Jurkat-Zellen nach 24 h Inkubationszeit.

Für die Bestimmung der LDH-Aktivität wurden 10^6 Jurkat-Zellen für 24 h mit 0 - 1,5 mM Paraquat, bzw. mit 0,5% Triton X-100 als Positivkontrolle für 1 h behandelt. Zur Analyse der anderen Parameter wurden 2×10^6 Jurkat-Zellen für 24 h mit 0 - 1,5 mM Paraquat behandelt. Die einzelnen Bestimmungen erfolgten wie in Abb. 5-14 beschrieben. Die Daten stammen aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

Während die SOD1-Genexpression durch Paraquat nicht induziert werden konnte, war bei der SOD2-Genexpression eine maximal 2fache Induktion bei einer Konzentration von 0.15 mM nachweisbar. Die SOD-Enzymaktivität nahm demgegenüber mit steigender Paraquat-Konzentration zu und erreichte bei 0.5 mM mit einem Induktionsfaktor um 7 einen Grenzwert (E). Die hMTH1-Genexpression zeigte bei einer Paraquat-Konzentration von 0.15 mM ihre maximale 2fache Induzierbarkeit. Erstaunlicher Weise konnte für die 8-oxo-dGTPase keine Induktion der Enzymaktivität nachgewiesen werden (F).

5.3.4.2 Einfluß von Paraquat auf die Genexpression und Enzymaktivität in primären Hautfibroblasten

Primäre Hautfibroblasten wurden, wie unter 4.3.1 beschrieben, gewonnen, kultiviert [4.3.2] und mit Paraquat behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und im zellfreien Lysat die einzelnen Enzymaktivitäten, sowie der GSH- und GSSG-Gehalt [4.8] gemessen. Die Genexpression wurde mittels der RT-PCR aus der RNA der Proben bestimmt [4.11]. Die extrazelluläre LDH-Aktivität wurde als Parameter für Zytotoxizität herangezogen.

Aus **Abbildung 5-23** wird ersichtlich, daß Paraquat-Konzentrationen ab 1.5 mM für Hautfibroblasten als zytotoxisch einzustufen sind (A). Paraquat bewirkte in Hautfibroblasten eine konzentrationsabhängige Oxidation von GSH zu GSSG, was auf eine Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies via Redoxcycling schließen läßt (B). Die untersuchten Enzyme CAT, GPx, SOD und 8-oxo-dGTPase zeigten nach Behandlung der Hautfibroblasten mit Paraquat alle ein ähnliches Induktionsmuster. Bei niedrigen Konzentrationen war eine Induktion der Enzymaktivität nachweisbar. Bis auf die CAT-Aktivität durchliefen alle anderen untersuchten Enzyme bei einer Paraquat-Konzentration von 0.05 mM ihre maximale Induzierbarkeit, die bei GPx (D) einen relativen Induktionsfaktor von 1.7, bei SOD (E) von 3 und bei 8-oxo-dGTPase (F) von 2 hatte. Die maximal 3.5fache Induktion der CAT-Aktivität (C) lag dagegen zwischen 0.15 und 0.05 mM. Auch die Genexpression zeigte unabhängig vom untersuchten Enzym denselben Verlauf. Ab einer Paraquat-Konzentration von 0.05 mM wurde eine Abnahme der Genexpression beobachtet. Aufgrund der hohen Zytotoxizität von 1.5 mM Paraquat in Hautfibroblasten, konnte nicht genügend RNA für den Einsatz in die RT-PCR isoliert werden, so daß für diese Konzentration keine Daten zur Genexpression vorlagen. Es wird aber eine weitere Abnahme der Genexpression angenommen. Die Abnahme der Genexpression und der Enzymaktivität stimmt gut mit der zunehmenden Zytotoxizität bei höheren Paraquat-Konzentrationen überein.

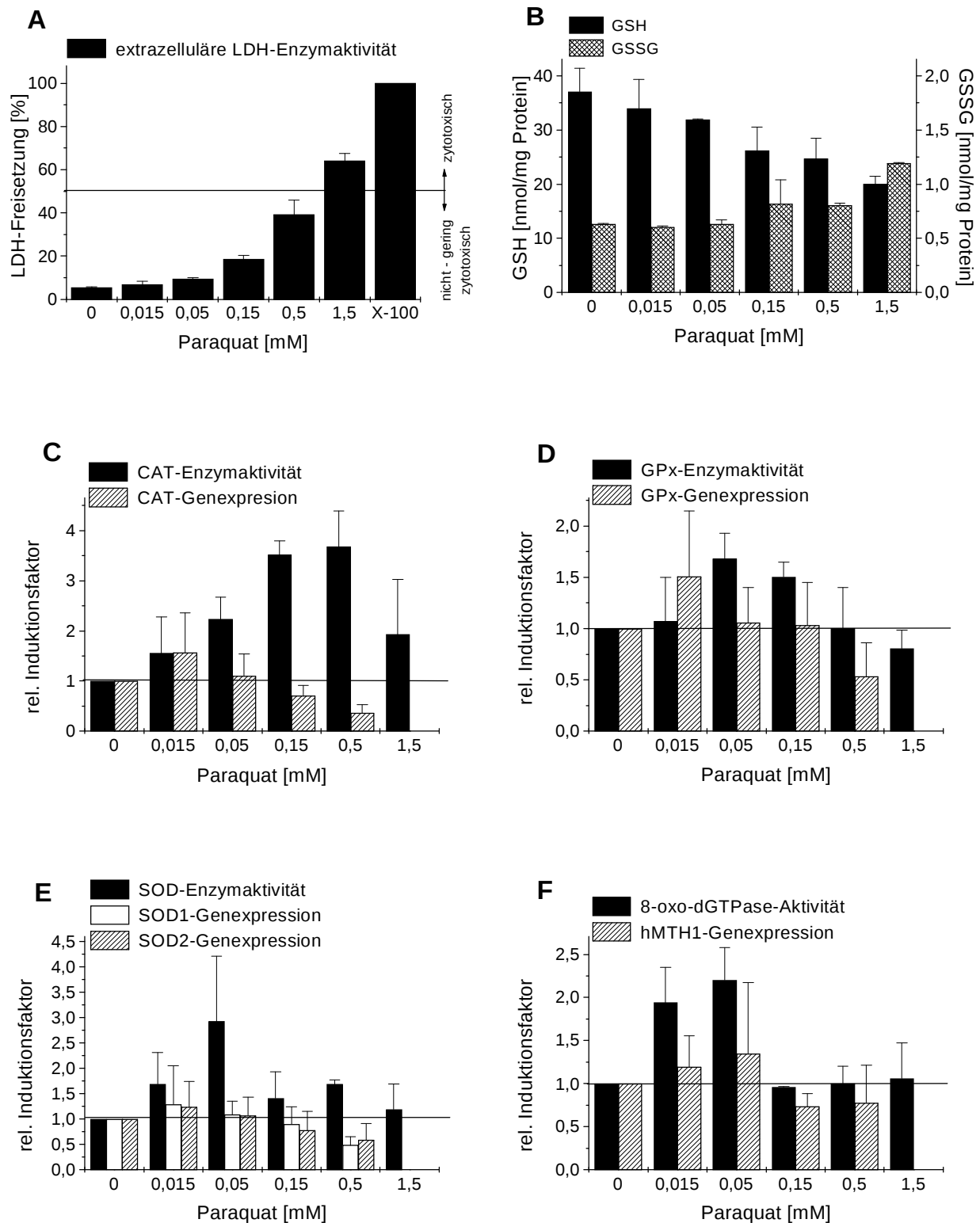


Abb. 5-23: Einfluß von Paraquat auf die Freisetzung von LDH [A], den GSH-Status [B] sowie auf die Genexpression und Enzymaktivität von Katalase [C], Glutathion-Peroxidase [D], Superoxid-Dismutase [E] und 8-oxo-dGTPase [F] in Hautfibroblasten nach 24 h Inkubationszeit

Für die Bestimmung der LDH-Aktivität wurden 5×10^5 Hautfibroblasten mit 0 - 1,5 mM Paraquat für 24 h, bzw. mit 0,5% Triton X-100 als Positivkontrolle für 1 h behandelt. Zur Analyse der anderen Parameter wurden 3×10^6 Hautfibroblasten für 24 h mit 0 - 1,5 mM Paraquat behandelt. Die einzelnen Bestimmungen erfolgten wie in Abb. 5-14 beschrieben. Dargestellt sind die Daten zweier voneinander unabhängiger Versuche.

5.3.5 Einfluß von Reduktionsmitteln

Wie die vorherigen Untersuchungen gezeigt haben, kann die Genexpression und die Enzymaktivität der antioxidativen Enzyme CAT, SOD und GPx sowie der 8-oxo-dGTPase durch oxidativen Streß induziert werden. Es stellte sich nun die Frage, wie sich die antioxidativen Enzyme sowie die 8-oxo-dGTPase unter reduktiven Bedingungen verhalten. Würde die Regulation dieser Enzyme über einen Redoxmechanismus, bzw. über die direkte Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies ablaufen, dann müßte in Gegenwart von Reduktionsmitteln eine Verminderung der Genexpression und Enzymaktivität nachweisbar sein.

Als Reduktionsmittel wurden Butylhydroxianisol (BHA) und N-Acetylcystein (NAC) eingesetzt.

5.3.5.1 Einfluß von Butylhydroxianisol (BHA) auf die Genexpression und Enzymaktivität von Jurkat-Zellen

Butylhydroxianisol stellt ein synthetisches, phenolisches Antioxidans dar, welches als Radikalfänger die Autooxidation von Lipiden unterbindet und deshalb häufig als Konservierungsmittel Nahrungsmitteln zugesetzt wird. Zum Studium des Einflusses von BHA auf die Genexpression und Enzymaktivität der antioxidativen Enzyme CAT, SOD und GPx sowie der 8-oxo-dGTPase, wurden Jurkat-Zellen mit 0 – 3 mM BHA behandelt.

Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und im zellfreien Lysat [4.7.2.2] der GSH-Status, sowie die Aktivität der oben genannten Enzyme bestimmt [4.8]. Parallel wurde die RNA isoliert und zur Bestimmung der Genexpression in die RT-PCR eingesetzt [4.11]. Eventuelle zytotoxische Einflüsse durch eine BHA-Behandlung wurden durch die Bestimmung der extrazellulären LDH-Aktivität erfaßt.

Die Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen sind in **Abbildung 5-24** dargestellt. Daraus wird ersichtlich, daß die eingesetzten BHA-Konzentrationen für Jurkat-Zellen nicht bis gering zytotoxisch waren. Die Zunahme der extrazellulären LDH-Aktivität erwies sich gegenüber der durch die Positivkontrolle bedingten Aktivitätssteigerung als gering (**A**). Messungen des GSH-Gehaltes zeigten eine leichte Zunahme. Dies könnte durch ein Abfangen der reaktiven Sauerstoffspezies, die beim natürlichen Stoffwechsel entstehen, bedingt sein (**B**). Mit zunehmender BHA-Konzentration konnte eine deutliche Abnahme der CAT-Aktivität festgestellt werden. Bei einer Konzentration von 3 mM BHA betrug der gemessene Induktionsfaktor nur noch 0.2, was einer CAT-Aktivität von 20% im Vergleich zu unbehandelten Zellen entspricht. Bei der CAT-Genexpression war tendenziell auch eine Abnahme zu verzeichnen. Sie schwankte um den Induktionsfaktor 0.7 (**C**). Die GPx-Enzymaktivität wurde dagegen von BHA nicht beeinflusst. Die leichten Erhöhungen der gemessenen Aktivitäten erwiesen sich als statistisch nicht signifikant. Bei der GPx-Genexpression konnte dagegen eine konzentrationsunabhängige Abnahme festgestellt werden, die um den Induktionsfaktor 0.6 schwankte (**D**).

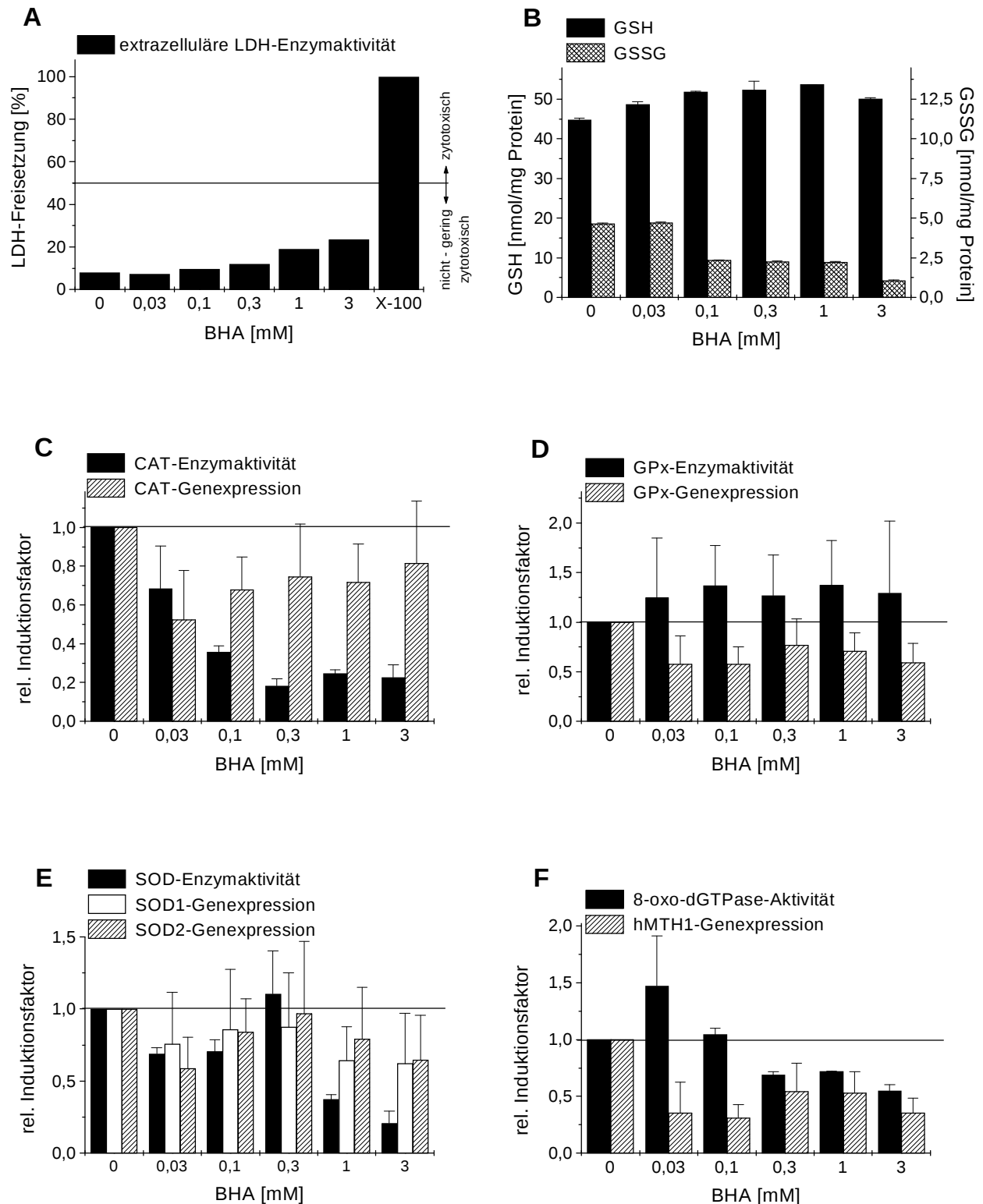


Abb. 5-24: Einfluß von Butylhydroxyanisol (BHA) auf die LDH-Aktivität [A], den GSH-Status [B], sowie auf die Genexpression und Enzymaktivität von Katalase [C], Glutathion-Peroxidase [D], Superoxid-Dismutase [E] und 8-oxo-dGTPase [F] in Jurkat-Zellen nach 24 h Inkubationszeit.

Für die Bestimmung der LDH-Aktivität wurden 10^6 Jurkat-Zellen für 24 h mit 0-3 mM BHA, bzw. mit 0.5% Triton X-100 als Positivkontrolle für 1 h behandelt. Zur Analyse der anderen Parameter wurden 2×10^6 Jurkat-Zellen für 24 h mit 0-3 mM BHA behandelt. Die einzelnen Bestimmungen erfolgten wie in Abb. 5-14 beschrieben. Die Daten stammen aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

Auch bei der SOD wurde bei hohen BHA-Konzentrationen eine verminderte Aktivität nachgewiesen. Bei der Genexpression waren sowohl bei SOD1 als auch SOD2 tendenzielle Abnahmen zu verzeichnen, die allerdings nicht so ausgeprägt waren wie bei den anderen untersuchten Genen (E). Die 8-oxo-dGTPase zeigte bei einer BHA-Konzentration von 0.03 mM zunächst einen, wenn auch geringen, Aktivitätsanstieg (relativer Induktionsfaktor 1.3). Zu höheren Konzentrationen war eine Reduktion der Aktivität zu verzeichnen, so daß bei einer BHA-Konzentration von 3 mM nur noch ein Induktionsfaktor von 0.5 nachgewiesen werden konnte. Dies entspricht einer 8-oxo-dGTPase-Aktivität von 50% im Vergleich zu der 8-oxo-dGTPase-Aktivität in unbehandelten Zellen. Dagegen war bei der hMTH1-Genexpression eine deutliche Abnahme festzustellen. Bei der höchsten BHA-Konzentration betrug der Induktionsfaktor 0.4, was auf eine deutliche Verminderung der hMTH1 mRNA schließen läßt (F). Diese Daten deuten darauf hin, daß der Redoxstatus der Zelle offenbar bei der Regulation der antioxidativen Enzyme CAT, SOD und GPx sowie bei der 8-oxo-dGTPase eine Rolle spielt.

5.3.5.2 *Einfluß von Butylhydroxianisol (BHA) auf die Genexpression und Enzymaktivität in primären Hautfibroblasten*

Um eventuelle zellspezifische Unterschiede zu erfassen, sollte der Einfluß von BHA auf die Genexpression und Enzymaktivität der antioxidativen Enzyme sowie der 8-oxo-dGTPase, in Jurkat-Zellen mit dem Einfluß in primären Hautfibroblasten verglichen werden. Dazu wurden primäre Hautfibroblasten, wie unter 4.3.1 beschrieben, aus Vorhaut gewonnen und kultiviert [4.3.2]. Nach 24 h Behandlung mit BHA wurden die Hautfibroblasten geerntet. Aus einem Teil der Proben wurde die RNA isoliert und zur Bestimmung der Genexpression in die RT-PCR eingesetzt. Als Referenzgen diente GAPDH [4.11]. Aus dem anderen Teil der Proben wurde der zellfreie Extrakt [4.7.2.2] hergestellt, der in die einzelnen Enzymbestimmungen und in die Glutathionmessung eingesetzt wurde [4.8]. Die Messung der extrazellulären LDH-Aktivität erfolgte in einem Parallelansatz und wurde zur Ermittlung der Zytotoxizität herangezogen [4.5.2]. In **Abbildung 5-25** sind die Ergebnisse zweier Versuche als relative Induktionsfaktoren dargestellt. Daraus wird ersichtlich, daß BHA in Hautfibroblasten einen anderen Einfluß auf die Genexpression und Enzymaktivität der antioxidativen Enzyme sowie der 8-oxo-dGTPase ausübt, als in Jurkat-Zellen. Die Bestimmungen der extrazellulären LDH-Aktivität ergaben, daß die hohen eingesetzten BHA-Konzentrationen, 1 und 3 mM, als gering zytotoxisch eingestuft wurden (A). Im Gegensatz zu den Jurkat-Zellen bewirkte BHA in Hautfibroblasten eine Verschiebung des Redoxgleichgewichtes zur oxidierten Seite. So war mit zunehmender BHA-Konzentration eine Abnahme des GSH- mit gleichzeitiger Zunahme des GSSG-Spiegels beobachtbar (B). Dies könnte durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies bedingt sein.

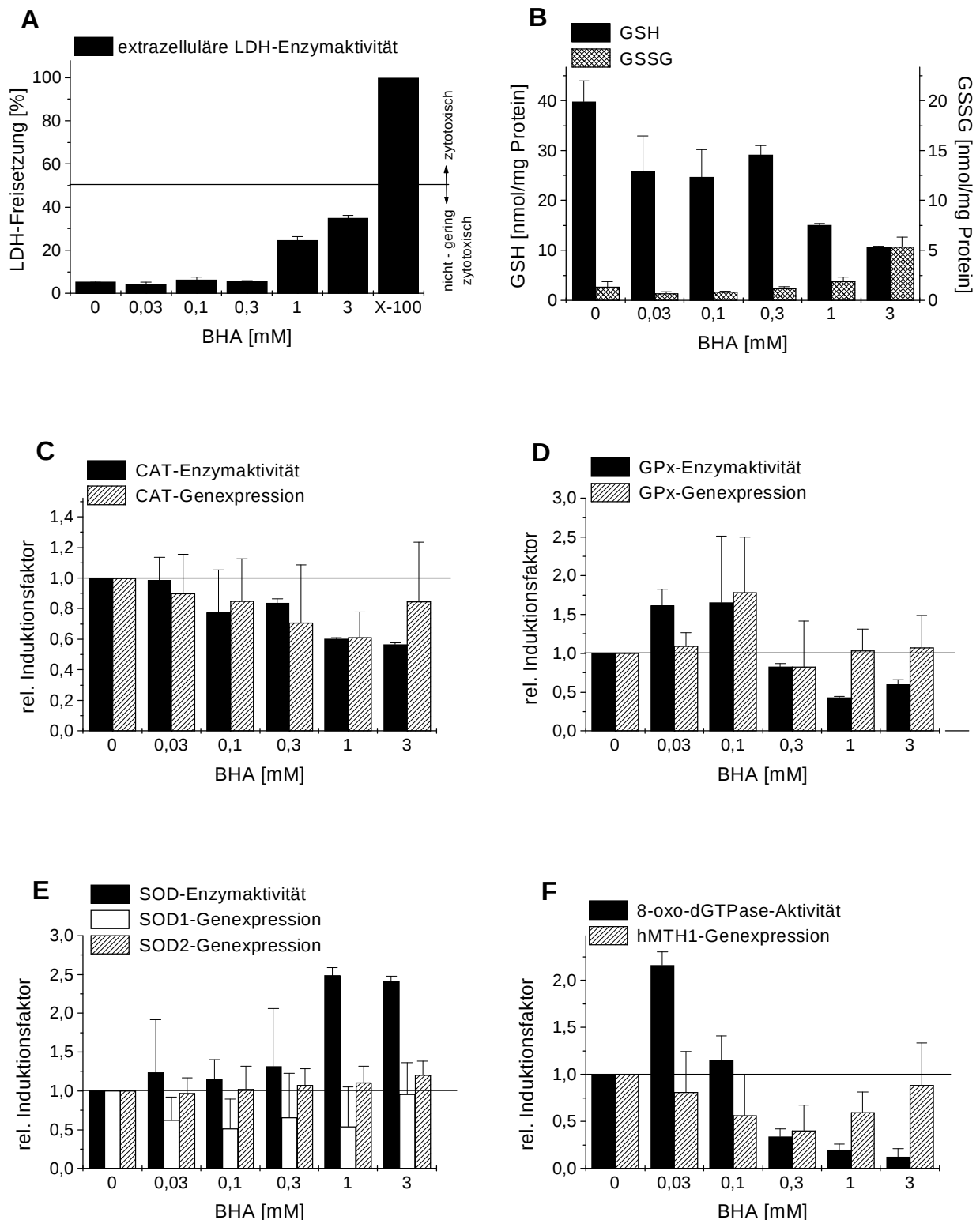


Abb. 5-25: Einfluß von Butylhydroxyanisol (BHA) auf die Freisetzung von LDH [A], den GSH-Status [B] sowie auf die Genexpression und Enzymaktivität von Katalase [C], Glutathion-Peroxidase [D], Superoxid-Dismutase [E] und 8-oxo-dGTPase [F] in Hautfibroblasten nach 24 h Inkubationszeit

Für die Bestimmung der LDH-Aktivität wurden 5×10^5 Hautfibroblasten mit 0–3 mM BHA für 24 h, bzw. mit 0,5% Triton X-100 als Positivkontrolle für 1 h behandelt. Zur Analyse der anderen Parameter wurden 3×10^6 Hautfibroblasten für 24 h mit 0–3 mM BHA behandelt. Die einzelnen Bestimmungen erfolgten wie in Abb. 5-14 beschrieben. Dargestellt wurden die Daten zweier voneinander unabhängiger Versuche.

Die bei der Katalase beobachtete Aktivitätsabnahme erwies sich in Hautfibroblasten im Vergleich zu der bei Jurkat-Zellen beobachteten Abnahme als nicht so ausgeprägt. Der relative Induktionsfaktor betrug 0.6. Die CAT-Genexpression nahm bis zu einer BHA-Konzentration von 1 mM leicht ab. Bei höheren Konzentrationen war wieder ein tendenzieller Anstieg zu verzeichnen (**C**). Dagegen bewirkten niedrige BHA-Konzentrationen (0.03 - 0.1 mM) einen leichten Anstieg in der GPx-Aktivität. Hohe BHA-Konzentrationen zeigten eine Verringerung der Aktivität im Vergleich zu unbehandelten Hautfibroblasten. Bei der GPx-Genexpression konnte ein ähnlicher Verlauf festgestellt werden (**D**). Die SOD-Genexpression konnte durch BHA weder eindeutig induziert noch inhibiert werden. Sämtliche Werte schwankten um 1. Die bei der SOD1-Genexpression leichte Abnahme erwies sich als statistisch nicht signifikant. Die SOD-Enzymaktivität wurde aber in Hautfibroblasten durch BHA der Konzentrationen 1 – 3 mM um den Faktor 2 bis 2.5 induziert (**E**). Ursache könnten, wie die GSH-Daten bereits vermuten lassen, reaktive Sauerstoffspezies sein.

Die Untersuchungen der 8-oxo-dGTPase zeigten keinen Unterschied zu den bereits bei den Jurkat-Zellen gemachten Beobachtungen. Bei einer BHA-Konzentration von 0.03 mM ließ sich eine Aktivitätszunahme um den Faktor 2 nachweisen. Hohe BHA-Konzentrationen führten zu einer deutlichen Aktivitätsverminderung. Der Induktionsfaktor betrug 0.2, was nur noch 20% der Aktivität in unbehandelten Zellen entspricht. Die hMTH1-Genexpression nahm zunächst ab. Bei hohen BHA-Konzentrationen war wieder eine leichte Zunahme bis zum Faktor 1 zu verzeichnen (**F**).

5.3.5.3 Einfluß von N-Acetylcystein (NAC) auf die Genexpression und Enzymaktivität von Jurkat-Zellen

N-Acetylcystein stellt nicht nur einen Precursor für die Synthese von GSH dar, sondern kann über seine freie Sulfhydrylgruppe selbst Schutzfunktionen übernehmen. So fängt NAC u.a. H_2O_2 und $\cdot\text{OH}$ ab und verhindert somit eine GSH-Oxidation.

Jurkat-Zellen wurden mit NAC behandelt. Nach 24 h wurde aus einem Teil der Proben das zellfreie Lysat gewonnen [4.7.2.2] und aus dem anderen Teil die RNA isoliert. Die Bestimmung der einzelnen Enzymaktivitäten und des GSH-Spiegels erfolgte wie unter 4.8 beschrieben. Die Genexpression wurde mit der RT-PCR, wie unter 4.11 beschrieben, bestimmt. Die erhaltenen Daten wurden auf die gemessenen Enzymaktivitäten bzw. Genexpressionen der unbehandelten Kontrollzellen bezogen und als relative Induktionsfaktoren ausgedrückt. Die Faktoren aus zwei Versuchen sind in **Abbildung 5-26** dargestellt. Die eingesetzten NAC-Konzentrationen erwiesen sich als nicht bis gering zytotoxisch, wie die Messung der extrazellulären LDH-Aktivität zeigte. (**A**). Die Bestimmung des GSH-Gehaltes ergab eine leichte Zunahme um 15 - 20% (**B**). Es wird angenommen, daß die Zunahme eher als Folge der reduktiven Versuchsbedingungen als einer gesteigerten GSH-Produktion durch NAC anzusehen ist.

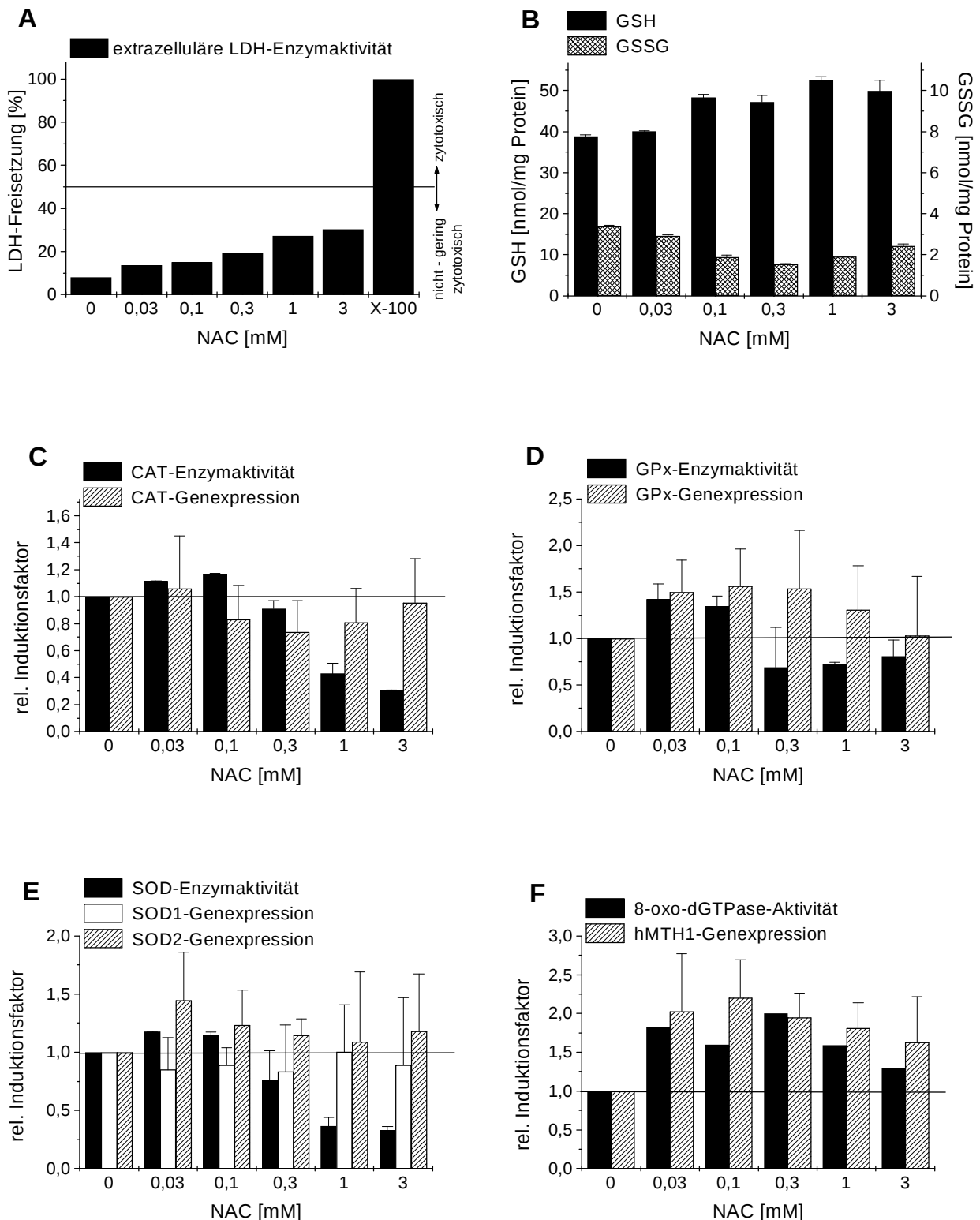


Abb. 5-26: Einfluß von N-Acetylcystein (NAC) auf die LDH-Aktivität [A], den GSH-Status [B], sowie auf die Genexpression und Enzymaktivität von Katalase [C], Glutathion-Peroxidase [D], Superoxid-Dismutase [E] und 8-oxo-dGTPase [F] in Jurkat-Zellen nach 24 h Inkubationszeit.

Für die Bestimmung der LDH-Aktivität wurden 10^6 Jurkat-Zellen für 24 h mit 0-3 mM NAC, bzw. mit 0.5% Triton X-100 als Positivkontrolle für 1 h behandelt. Zur Analyse der anderen Parameter wurden 2×10^6 Jurkat-Zellen für 24 h mit 0-3 mM NAC behandelt. Die einzelnen Bestimmungen erfolgten wie in Abb. 5-14 beschrieben. Die Daten stammen aus zwei Versuchen.

Wie auch schon die Behandlungen der Jurkat-Zellen mit BHA gezeigt haben, führten die durch NAC erzeugten reduktiven Versuchsbedingungen zu einer Abnahme der Katalase-Aktivität. Bei der höchsten NAC-Konzentration von 3 mM betrug der Induktionsfaktor 0.3, was 30% der Aktivität in unbehandelten Zellen entspricht. Die CAT-Genexpression wies nur geringe Änderungen im Vergleich zu unbehandelten Jurkat-Zellen auf, so daß davon ausgegangen wird, daß NAC eher keinen Einfluß ausübt (C). Die Messungen der Glutathion-Peroxidase-Aktivität ergaben bei NAC-Konzentrationen von 0.03 – 0.1 mM eine leichte Induktion gegenüber den Kontrollzellen (Induktionsfaktor 1.5). Bei NAC Konzentrationen von 0.3- 3 mM war die Aktivität dagegen geringer als in den Kontrollzellen und der Induktionsfaktor schwankte um 0.6. Die bei der Genexpression festgestellte leichte Induktion erwies sich als statistisch nicht signifikant (D).

Auch die SOD-Enzymaktivität wurde mit zunehmender NAC-Konzentration verringert. Bei der höchsten eingesetzten NAC-Konzentration von 3 mM betrug sie nur noch 25% der Aktivität in unbehandelten Zellen. Der Induktionsfaktor betrug 0.3. Die SOD-Genexpression wurde durch NAC nicht beeinflusst. Die erhaltenen Induktionsfaktoren schwankten um 1. (E). Die 8-oxo-dGTPase-Aktivität und die hMTH1-Genexpression zeigten in Abhängigkeit zur eingesetzten NAC Konzentration denselben Verlauf. Über den gesamten Konzentrationsbereich war sowohl die gemessene Aktivität als auch die Genexpression gegenüber unbehandelten Jurkat-Zellen erhöht. Mit zunehmender NAC-Konzentration zeichnete sich eine Abnahme der Induktion ab. Die höchsten Induktionsfaktoren wurden bei einer NAC-Konzentration um 0.1 mM ermittelt. Die Genexpression war um den Faktor 2.5 und die Aktivität um den Faktor 1.8 erhöht (F). Dieser Verlauf entsprach nicht dem, der nach den BHA-Untersuchungen zu erwarten war.

5.3.5.4 Einfluß von N-Acetylcystein auf die Genexpression und Enzymaktivität von primären Hautfibroblasten

Da die Untersuchungen mit BHA deutliche Unterschiede im Induktionsverhalten der untersuchten Enzyme zwischen Jurkat-Zellen und primären Hautfibroblasten zeigten, stellte sich die Frage, ob diese Unterschiede durch eine unterschiedliche Anpassung der beiden Zelltypen an das reduktive Milieu oder durch einen unterschiedlichen BHA-Metabolismus hervorgerufen werden. Deshalb wurden primäre Hautfibroblasten mit N-Acetylcystein behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet. Die Bestimmung der Enzymaktivitäten und des GSH-Spiegels erfolgte im zellfreien Lysat [4.7.2.2] der Proben wie unter 4.8 beschrieben. Die Messung der Genexpression erfolgte mit der RT-PCR aus der RNA der Proben [4.11]. Als Referenzgen wurde GAPDH gewählt, dessen Genexpression durch NAC nicht beeinflusst wird. Zur Überprüfung der Zytotoxizität wurde die Messung der extrazellulären LDH-Aktivität herangezogen. Es wurden zwei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt, deren Ergebnisse in **Abbildung 5-27** graphisch dargestellt sind.

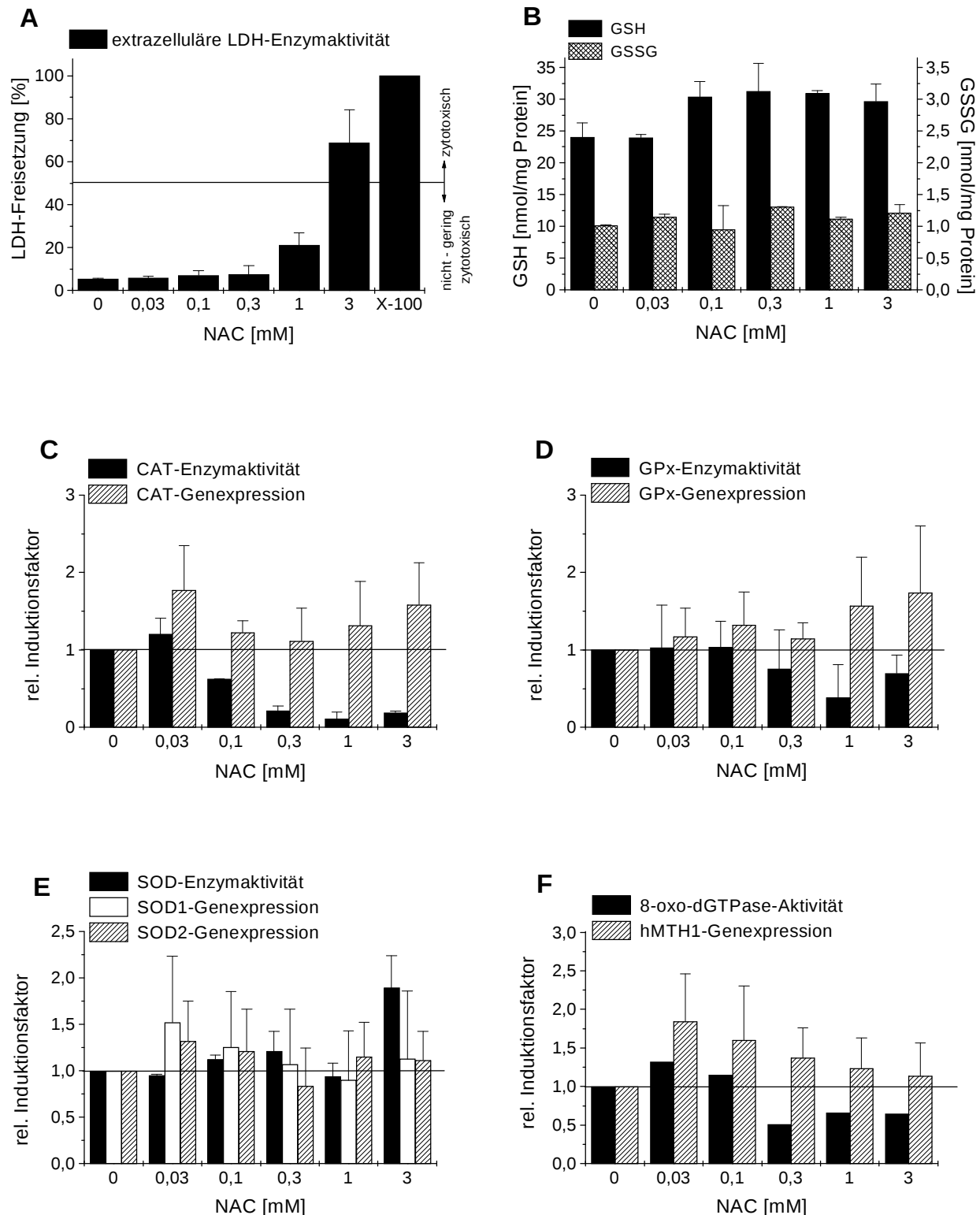


Abb. 5-27: Einfluß von N-Acetylcystein (NAC) auf die Freisetzung von LDH [A], den GSH-Status [B] sowie auf die Genexpression und Enzymaktivität von Katalase [C], Glutathion-Peroxidase [D], Superoxid-Dismutase [E] und 8-oxo-dGTPase [F] in Hautfibroblasten nach 24 h Inkubationszeit

Für die Bestimmung der LDH-Aktivität wurden 5×10^5 Hautfibroblasten mit 0–3 mM NAC für 24 h, bzw. mit 0,5% Triton X-100 als Positivkontrolle für 1 h behandelt. Zur Analyse der anderen Parameter wurden 3×10^6 Hautfibroblasten für 24 h mit 0–3 mM NAC behandelt. Die einzelnen Bestimmungen erfolgten wie in Abb. 5-14 beschrieben. Dargestellt wurden die Daten zweier voneinander unabhängiger Versuche.

Während niedrige NAC-Konzentrationen bis 0.3 mM nur zu einer geringen Steigerung der LDH-Freisetzung führten, war bei hohen NAC-Konzentrationen eine starke LDH-Freisetzung zu verzeichnen. NAC-Konzentrationen bis 0.3 mM sind daher als nicht, von 1 mM als gering und von 3 mM als zytotoxisch für Hautfibroblasten einzustufen (A). Offenbar reagieren die Hautfibroblasten wesentlich empfindlicher auf NAC als die Jurkat-Zellen. Messungen des GSH-Haushaltes zeigten eine leichte Zunahme von GSH und einen konstanten GSSG-Spiegel (B).

Diese Daten deuten eher auf ein reduktives Milieu. Dieses führte, wie erwartet, zu einer Abnahme der Katalase-Aktivität. Bei 3 mM NAC betrug der berechnete Induktionsfaktor nur noch 0.2. Dies entspricht 20% der Aktivität unbehandelter Hautfibroblasten. Die CAT-Genexpression zeigte bei einer NAC-Konzentration von 0.03 mM eine 1.8fache Induktion. Bei 0.1 und 0.3 mM NAC nahm diese Induktion leicht ab, bei 1 und 3 mM war wieder ein leichter Anstieg nachweisbar (C). Die Behandlung mit NAC führte auch zu einer leichten Abnahme der GPx-Aktivität. Bei der GPx-Genexpression war ab einer NAC-Konzentration von 1 mM eine leichte Zunahme zu beobachten (D). Die Messungen der SOD-Enzymaktivität ergaben lediglich bei der höchsten NAC-Konzentration eine leichte Induktion um den Faktor 1.8. Diese Konzentration erwies sich aber bereits als zytotoxisch. Die SOD-Genexpression wird durch NAC nicht induziert. Die Werte für SOD1 und SOD2 schwankten stark, so daß keine signifikanten Änderungen nachweisbar waren (E). Zunehmende NAC-Konzentrationen bewirkten in Hautfibroblasten eine Verminderung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität um 50%. Die hMTH1-Genexpression war bei einer NAC-Konzentration von 0.03 mM zwar noch um das 2fache erhöht, jedoch bewirkten höhere Konzentration eine Abnahme, so daß ab 1 mM keine Veränderung im Vergleich mit den unbehandelten Zellen mehr nachgewiesen werden konnte (F).

Diese Daten deuten darauf hin, daß der Redoxstatus der Zelle offenbar eine entscheidende Rolle bei der Regulation der antioxidativen Enzyme CAT, SOD und GPx sowie der 8-oxo-dGTPase spielt. So führt ein oxidatives Milieu eher zu einer Induktion der Enzyme, wohingegen ein reduktives Milieu eher zu einer Inhibition führt. Ob eine durch reaktive Sauerstoffspezies hervorgerufene Induktion durch den Zusatz eines Reduktionsmittels unterbunden werden kann oder nicht, bleibt zu überprüfen.

5.3.6 Einfluß des Glutathion-Status

Das Hauptthiol in biologischen Systemen ist Glutathion (GSH). Es ist nicht nur an vielen zellulären Prozessen beteiligt, sondern übernimmt auch wichtige Zellschutzfunktionen. So trägt es zur Detoxifizierung reaktiver Sauerstoffspezies bei, da es zum einen Cosubstrat der Glutathion-Peroxidase ist und zum anderen als Reduktionsäquivalent fungiert [Sies, 1985; Meister, 1985]. Da reaktive Sauerstoffspezies, wie die vorherigen Untersuchungen gezeigt haben, die Genexpression und Enzymaktivität der antioxidativen Enzyme CAT, GPx und SOD sowie der 8-oxo-dGTPase induzieren können und zu einer Oxidation von GSH führen, stellt sich

die Frage, welche Rolle der GSH-Status bei der beobachteten Induktion und der Regulation dieser Enzyme spielt.

Der GSH-Gehalt kann durch Buthioninsulphoxim (BTSO) reduziert werden. BTSO stellt nicht nur einen starken Inhibitor der γ -Glutamylcysteinsynthetase dar und verhindert somit die GSH-Neusynthese, sondern bewirkt auch einen Abtransport von GSH in den extrazellulären Raum.

5.3.6.1 Einfluß von Buthioninsulphoxim (BTSO) auf die Genexpression und Enzymaktivität von Jurkat-Zellen

Um die Rolle des Glutathion-Status bei der Induzierbarkeit der antioxidativen Enzyme CAT, GPX und SOD sowie der 8-oxo-dGTPase zu untersuchen, wurden Jurkat-Zellen mit Buthioninsulphoxim behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und aus einem Teil der zellfreie Extrakt nach 4.7.2.2 und aus dem anderen Teil die RNA, wie unter 4.11.1 beschrieben, gewonnen. Die Bestimmung der einzelnen Enzymaktivitäten und des GSH- und GSSG-Gehaltes erfolgte im zellfreien Extrakt, wie unter 4.8 beschrieben. Die Messung der Genexpression erfolgte mit der RT-PCR, wobei GAPDH als Referenzgen diente [4.11]. Zur Überprüfung der Zytotoxizität wurde die extrazelluläre LDH-Aktivität nach 4.5.2. in einem separaten Ansatz bestimmt. Die Ergebnisse aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen sind als relative Induktionsfaktoren in **Abbildung 5-28** graphisch dargestellt.

Wie die Messungen der extrazellulären LDH-Aktivität zeigten, erwiesen sich die eingesetzten BTSO-Konzentrationen in Jurkat-Zellen als nicht bis gering zytotoxisch. Der Anstieg der extrazellulären LDH-Aktivität mit zunehmender BTSO-Konzentration war im Gegensatz zur Positivkontrolle mit Triton X-100, gering (**A**). Der GSH-Spiegel nahm mit zunehmender BTSO-Konzentration drastisch ab. Ab einer BTSO-Konzentration von 1 mM konnte kein GSH mehr nachgewiesen werden. Auch der GSSG-Gehalt konnte bei den hohen BTSO Konzentrationen nicht mehr nachgewiesen werden, was mit dem Abtransport von GSSG in den extrazellulären Raum erklärt werden kann. Als Ursache für den Verlust an GSH werden die Syntheseblockade, der Abtransport von GSH in den Extrazellulärraum und der normale GSH Verbrauch angesehen (**B**). Die CAT-Genexpression wurde durch BTSO nicht beeinflusst. Die erhaltenen Induktionsfaktoren schwankten um den Wert 1. Die CAT-Enzymaktivität war dagegen ab einer Konzentration von 0.3 mM BTSO um den Faktor 2 erhöht. Diese 2fache Induktion der Enzymaktivität nahm zu höheren BTSO-Konzentrationen hin leicht ab, so daß bei 3 mM BTSO nur noch ein Induktionsfaktor von 1.5 erhalten wurde (**C**). Auch bei der Glutathion-Peroxidase wurde die Genexpression durch BTSO nicht beeinflusst. Die Messungen der GPx-Enzymaktivität zeigten bei einer BTSO-Konzentration von 0.1 mM eine leichte Induktion um den Faktor 1.7. Bei höheren BTSO-Konzentrationen wurde eine Abnahme der GPx-Enzymaktivität beobachtet. Ursache hierfür könnte der durch BTSO bedingte Verlust an GSH sein, wodurch dem Enzym das Co-Substrat entzogen wird (**D**).

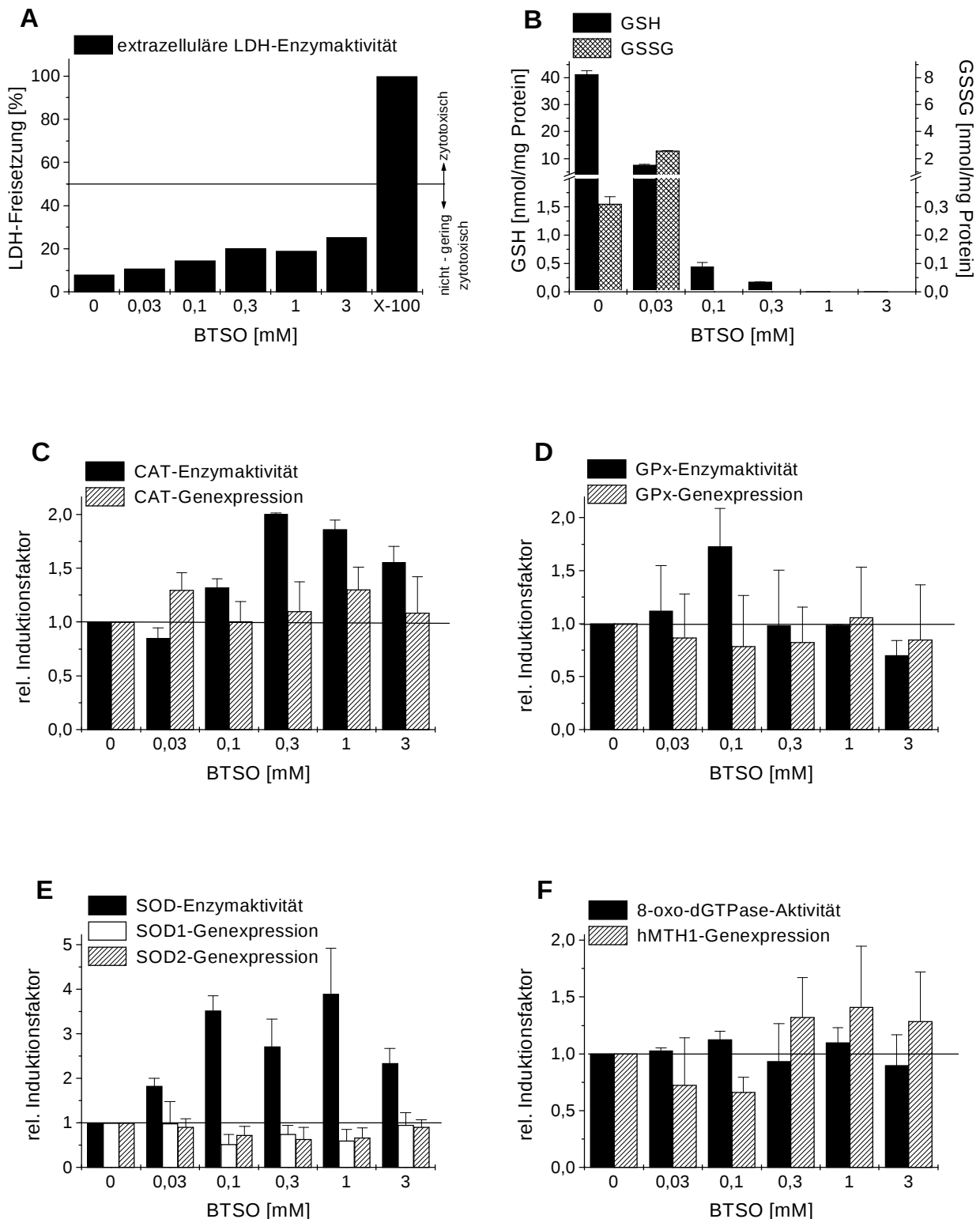


Abb. 5-28: Einfluß von Buthioninsulphoxim (BTSO) auf die LDH-Aktivität [A], den GSH-Status [B], sowie auf die Genexpression und Enzymaktivität von Katalase [C], Glutathion-Peroxidase [D], Superoxid-Dismutase [E] und 8-oxo-dGTPase [F] in Jurkat-Zellen nach 24 h Inkubationszeit.

Für die Bestimmung der LDH-Aktivität wurden 10^6 Jurkat-Zellen für 24 h mit 0-3 mM BTSO, bzw. mit 0,5% Triton X-100 als Positivkontrolle für 1 h behandelt. Zur Analyse der anderen Parameter wurden 2×10^6 Jurkat-Zellen für 24 h mit 0-3 mM BTSO behandelt. Die einzelnen Bestimmungen erfolgten wie in Abb. 5-14 beschrieben. Die Daten stammen aus zwei voneinander unabhängigen Versuchen.

Wie aus **Abbildung 5-28 E** ersichtlich wird, wurde weder die SOD1- noch die SOD2-Genexpression in Jurkat-Zellen durch BTSO beeinflusst. Dagegen wurde die SOD-Enzymaktivität durch BTSO induziert. Die maximale 4fache Induktion konnte bei einer BTSO-Konzentration von 1 mM nachgewiesen werden. Die hMTH1-Genexpression wurde durch BTSO nicht beeinflusst. Die geringe Induktion bei höheren BTSO-Konzentrationen erwies sich als statistisch nicht signifikant. Auch bei der 8-oxo-dGTPase-Aktivität konnte keine Beeinflussung durch BTSO festgestellt werden (**F**). Somit spielt der GSH-Status in Jurkat-Zellen offenbar keine Rolle bei der Regulation der Genexpression der untersuchten Gene. Er scheint aber einen Einfluß auf die Enzymaktivität der klassischen antioxidativen Enzyme CAT, GPx und SOD zu haben.

5.3.6.2 Einfluß von Buthioninsulphoxim (BTSO) auf die Genexpression und Enzymaktivität von primären Hautfibroblasten

Um zellspezifische Unterschiede hinsichtlich der Funktion des GSH-Spiegels bei der Regulation der antioxidativen Enzyme CAT, GPx und SOD sowie der 8-oxo-dGTPase zu erfassen, wurden primäre Hautfibroblasten mit BTSO behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und der zellfreie Extrakt [4.7.2.2] hergestellt, bzw. die RNA [4.11.1] isoliert. Im zellfreien Extrakt erfolgte die Messung der einzelnen Enzymaktivitäten sowie des GSH- und GSSG-Gehaltes, wie unter 4.8 beschrieben. Die RNA wurde zur Ermittlung der Genexpression in die RT-PCR eingesetzt [4.11]. Die Bestimmung der extrazellulären LDH-Aktivität als ein Parameter für Zytotoxizität erfolgte in einem separatem Ansatz [4.5.2]. Die erhaltenen Daten wurden auf die jeweiligen Kontrollen (unbehandelte Zellen) normiert und als relative Induktionsfaktoren in **Abbildung 5-29** graphisch dargestellt. Wie schon bei den Jurkat-Zellen festgestellt wurde, erwiesen sich die eingesetzten BTSO-Konzentrationen auch für die Hautfibroblasten als nicht bis gering zytotoxisch (**A**). Die Behandlung mit BTSO bewirkte in Hautfibroblasten eine drastische Abnahme des GSH-Gehaltes. Ab einer Konzentration von 0.1 mM BTSO war kein GSH mehr nachweisbar. Dieser GSH-Verlust wurde in Jurkat-Zellen erst bei einer Konzentration von 1 mM BTSO erreicht, was am höheren GSH-Spiegel der Jurkat-Zellen liegen könnte (**B**). Wie schon bei den Jurkat-Zellen festgestellt wurde, scheint der GSH-Spiegel bei der Regulation der Genexpression der untersuchten Gene keine Rolle zu spielen. Auch in den Hautfibroblasten konnte sowohl bei der Katalase (**C**), als auch bei der Glutathion-Peroxidase (**D**), der Superoxid-Dismutase (**E**) und der 8-oxo-dGTPase (**F**) keine Veränderungen der Genexpression durch eine Behandlung mit BTSO nachgewiesen werden. Die geringfügige Zunahme der GPx-Genexpression erwies sich als statistisch nicht signifikant.

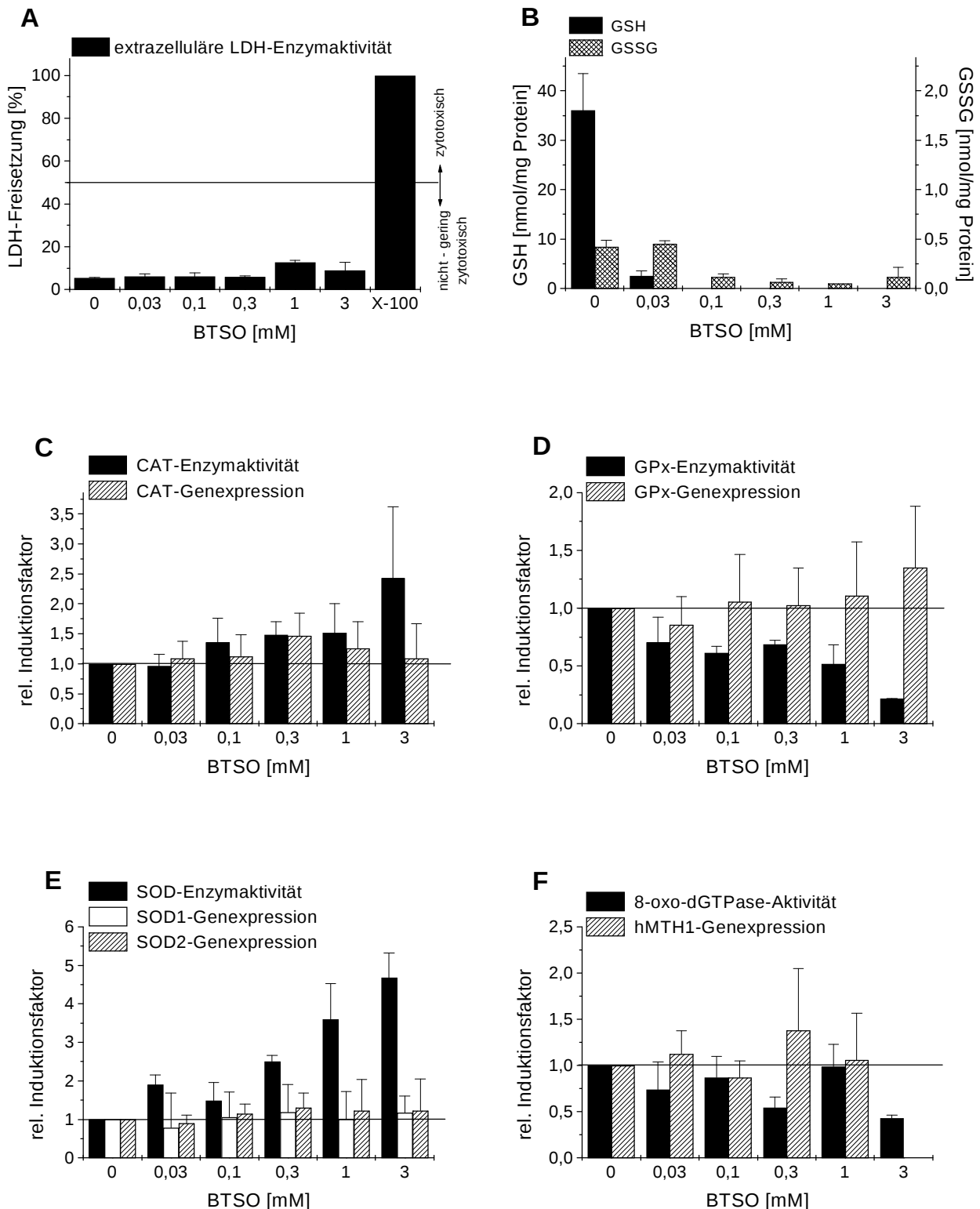


Abb. 5-29: Einfluß von Buthioninsulphoxim (BTSO) auf die Freisetzung von LDH [A], den GSH-Status [B] sowie auf die Genexpression und Enzymaktivität von Katalase [C], Glutathion-Peroxidase [D], Superoxid-Dismutase [E] und 8-oxo-dGTPase [F] in Hautfibroblasten nach 24 h Inkubationszeit

Für die Bestimmung der LDH-Aktivität wurden 5×10^5 Hautfibroblasten mit 0 - 3 mM BTSO für 24 h, bzw. mit 0.5% Triton X-100 als Positivkontrolle für 1 h behandelt. Zur Analyse der anderen Parameter wurden 3×10^6 Hautfibroblasten für 24 h mit 0 - 3 mM BTSO behandelt. Die einzelnen Bestimmungen erfolgten wie in Abb. 5-14 beschrieben. Dargestellt sind die Daten zweier voneinander unabhängiger Versuche.

Dagegen spielt der GSH-Spiegel aber offenbar eine Rolle bei der Enzymaktivität. So konnte mit zunehmender BTO-Konzentration eine Induktion der CAT-Aktivität festgestellt werden. Bei 3 mM BTO war die CAT-Aktivität 2.5fach induziert (C). Wie erwartet nahm die GPx-Enzymaktivität mit zunehmender BTO-Konzentration ab, so daß bei einer BTO-Konzentration von 3 mM nur noch ein Induktionsfaktor von 0.2 nachweisbar war. Dies entspricht nur noch 20% der Aktivität unbehandelter Hautfibroblasten (D). Auch die SOD-Aktivität wurde durch die Behandlung der Hautfibroblasten mit BTO gesteigert. Im Gegensatz zu den Jurkat-Zellen wurde die höchste Induktion mit dem Faktor 4.5 bei der höchsten eingesetzten BTO-Konzentration von 3 mM nachgewiesen (E). Die Messungen der 8-oxo-dGTPase ergaben keine Induktion der Enzymaktivität durch eine Behandlung mit BTO. Tendenziell war eine Verringerung der Grundaktivität zu beobachten, wobei allerdings kein Zusammenhang mit der eingesetzten BTO-Konzentration festgestellt werden konnte (F).

5.3.7 Einfluß von Botenstoffen (second-messenger)

Einige zelluläre Prozesse laufen über die Freisetzung von Botenstoffen, sogenannten *second-messenger* ab. Ein besonders bei entzündlichen Prozessen wichtiger second messenger ist $\text{TNF}\alpha$. Es konnte gezeigt werden, daß die Behandlung mit $\text{TNF}\alpha$ zur Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies führt. In primären Hautfibroblasten bewirkte die Stimulation mit $\text{TNF}\alpha$ die Freisetzung von Superoxid der Konzentration 5 nmol/h/10⁶ Zellen [Burdon, 1996].

Somit stellte sich die Frage, ob die Genexpression und Enzymaktivität der antioxidativen Enzyme CAT, SOD und GPx sowie der 8-oxo-dGTPase durch $\text{TNF}\alpha$ induziert werden kann oder nicht.

5.3.7.1 Einfluß des Tumornekrosefaktors α ($\text{TNF}\alpha$) auf die Genexpression und Enzymaktivität von Jurkat-Zellen

Um den Einfluß von $\text{TNF}\alpha$ auf die Genexpression und Enzymaktivität zu untersuchen, wurden Jurkat-Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ behandelt. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und der zellfreie Extrakt wie unter 4.7.2.2. gewonnen, bzw. die RNA nach 4.11.1 isoliert. Die Messungen der einzelnen Enzymaktivitäten sowie des GSH- und GSSG-Gehaltes erfolgte im zellfreien Lysat nach 4.8. Zur Bestimmung der Genexpression wurde die RNA in die RT-PCR eingesetzt. Als Referenzgen diente GAPDH [4.11]. Um den Einfluß der durch $\text{TNF}\alpha$ bedingten Zytotoxizität zu erfassen, wurde die extrazelluläre LDH-Aktivität in einem separaten Ansatz bestimmt. Sämtliche Enzymaktivitäten und Genexpressionen wurden auf die Werte der unbehandelten Jurkat-Zellen bezogen und als relative Induktionsfaktoren ausgedrückt. Die Ergebnisse zweier voneinander unabhängiger Versuche sind in **Abbildung 5-30** graphisch dargestellt.

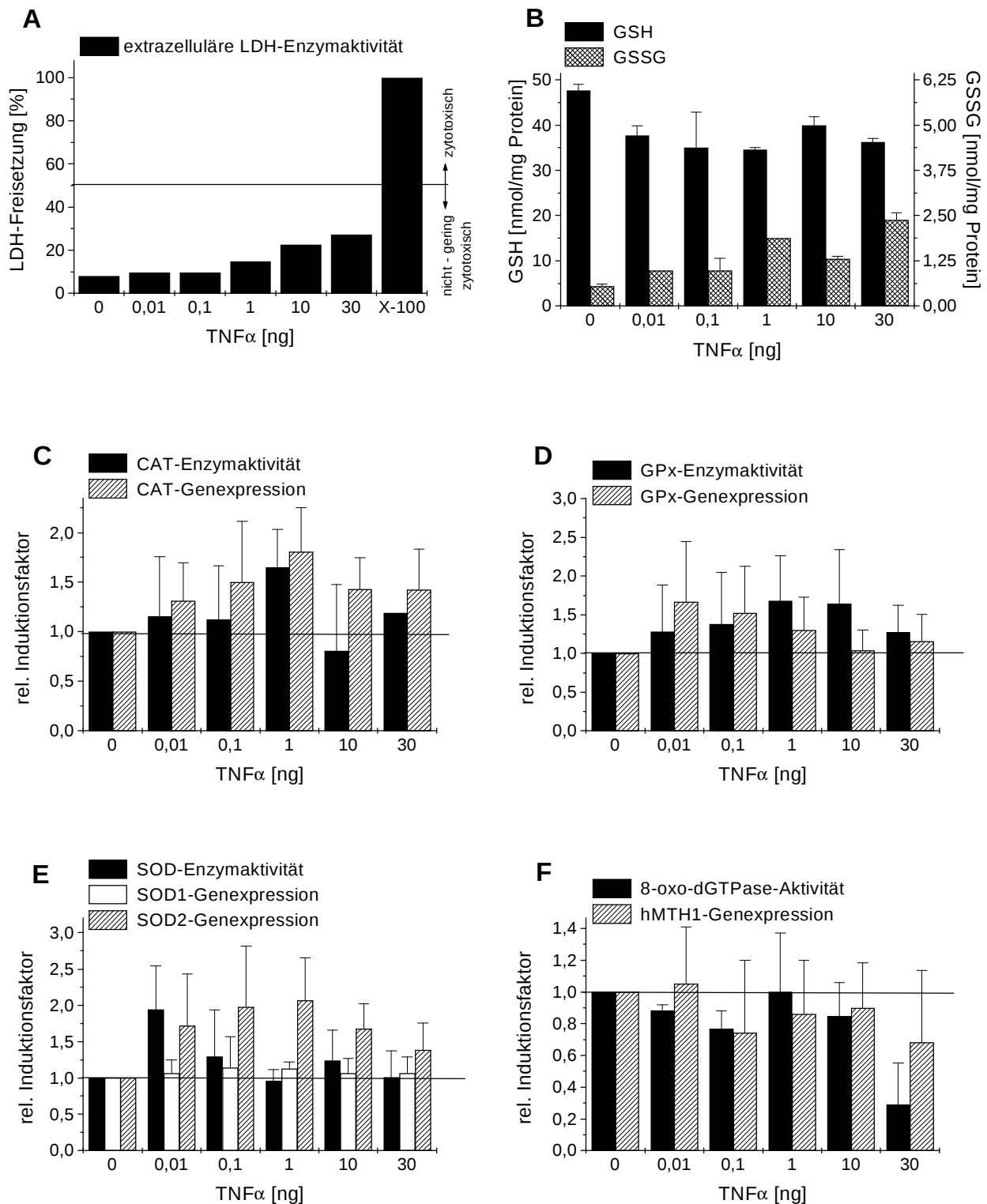


Abb. 5-30: Einfluß von TNF α auf die LDH-Aktivität [A], den GSH-Status [B], sowie auf die Genexpression und Enzymaktivität von Katalase [C], Glutathion-Peroxidase [D], Superoxid-Dismutase [E] und 8-oxo-dGTPase [F] in Jurkat-Zellen nach 24 h Inkubationszeit.

Für die Bestimmung der LDH-Aktivität wurden 10^6 Jurkat-Zellen für 24 h mit 0 - 30 ng TNF α , bzw. mit 0.5% Triton X-100 als Positivkontrolle für 1 h behandelt. Zur Analyse der anderen Parameter wurden 2×10^6 Jurkat-Zellen für 24 h mit 0 - 30 ng TNF α behandelt. Die einzelnen Bestimmungen erfolgten wie in Abb. 5-14 beschrieben. Die Daten stammen aus zwei Versuchen.

Mit zunehmender $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration war eine Erhöhung der extrazellulären LDH-Aktivität nachweisbar. Ein Vergleich mit der durch die Positivkontrolle Triton X-100 bedingten LDH-Freisetzung ergab, daß die gewählten $\text{TNF}\alpha$ -Konzentrationen als nicht bis gering zytotoxisch für Jurkat-Zellen einzustufen sind (**A**). Der leicht abnehmende GSH-Gehalt, der mit einer Zunahme des GSSG-Gehaltes einhergeht (**B**), läßt auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch die Behandlung der Jurkat-Zellen mit $\text{TNF}\alpha$ schließen. Sowohl die CAT-Enzymaktivität als auch die CAT-Genexpression durchliefen bei einer $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration von 1 ng ihre maximale Induzierbarkeit. Der Induktionsfaktor für die Genexpression lag bei 2, der für die Enzymaktivität bei 1.7. Höhere $\text{TNF}\alpha$ -Konzentrationen hatten auf die CAT-Enzymaktivität keinen Einfluß mehr. Die CAT-Genexpression blieb dagegen leicht erhöht (**C**). Die Messungen der GPx-Enzymaktivität ergaben eine leichte Aktivitätssteigerung nach $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung. Die größten Induktionsfaktoren von 1.7 wurden bei $\text{TNF}\alpha$ -Konzentrationen von 1 und 10 ng erhalten. Die GPx-Genexpression war dagegen nur bei kleinen $\text{TNF}\alpha$ -Konzentrationen leicht erhöht (relativer Induktionsfaktor 1.6). Diese Induktion nahm bei höheren Konzentrationen wieder ab (**D**). Obwohl eine konzentrationsabhängige Induktion der SOD-Aktivität erwartet wurde, konnte nur bei einer Konzentration von 0.01 ng $\text{TNF}\alpha$ eine 2fache Erhöhung der Aktivität festgestellt werden, die bei höheren Konzentrationen wieder abnahm. Die SOD2-Genexpression durchlief bei 0.1 und 1 ng $\text{TNF}\alpha$ ihre maximale Induzierbarkeit um den Faktor 2.5. Im Gegensatz dazu wurde die SOD1-Genexpression nicht beeinflusst (**E**). Sowohl die hMTH1-Genexpression als auch die 8-oxo-dGTPase-Aktivität in Jurkat-Zellen wurden von $\text{TNF}\alpha$ nicht induziert. Bei der höchsten gewählten Konzentration von 30 ng $\text{TNF}\alpha$ wurde eine deutliche Abnahme der Aktivität festgestellt. Der erhaltene Induktionsfaktor betrug bei dieser Konzentration nur noch 0.3. Diese abnehmende Tendenz ist auch bei der Genexpression zu beobachten (**F**).

5.3.7.2 Einfluß von $\text{TNF}\alpha$ auf die Genexpression und Enzymaktivität in primären Hautfibroblasten

Da die Stimulation von primären Hautfibroblasten mit $\text{TNF}\alpha$ zur Freisetzung von Superoxid führt und die vorherigen Untersuchungen gezeigt haben, daß die Genexpression und Enzymaktivität der antioxidativen Enzyme CAT, GPx und SOD sowie der 8-oxo-dGTPase in Hautfibroblasten durch verschiedene reaktive Sauerstoffspezies in unterschiedlichem Maße induziert werden können, stellte sich die Frage, ob $\text{TNF}\alpha$ diese Induktionen auch hervorrufen kann. Deshalb wurden primäre Hautfibroblasten mit $\text{TNF}\alpha$ behandelt. Nach 24 h wurde aus einem Teil der Zellen der zellfreie Extrakt hergestellt [4.7.2.2] und zur Bestimmung der einzelnen Enzymaktivitäten sowie zur Messung des GSH- und GSSG-Gehaltes verwendet [4.8].

Aus einem anderen Teil der Proben wurde die RNA isoliert und zur Bestimmung der Genexpression in die RT-PCR eingesetzt [4.11]. Als Parameter für Zytotoxizität wurde die extrazelluläre LDH-Aktivität [4.5.2] herangezogen.

Sämtliche Untersuchungen wurden in einem weiteren Ansatz wiederholt. In **Abbildung 5-31** sind die Ergebnisse als relative Induktionsfaktoren graphisch dargestellt.

Die Messungen der extrazellulären LDH-Aktivität ergaben, daß die eingesetzten $\text{TNF}\alpha$ -Konzentrationen nicht bis gering zytotoxisch für die Hautfibroblasten waren (**A**). Der GSH-Gehalt nahm mit steigender $\text{TNF}\alpha$ -Konzentration ab. Der GSSG-Spiegel blieb dagegen unverändert, was durch einen Abtransport von GSSG in den Extrazellulärraum bedingt worden sein könnte. Diese Daten sprechen für eine Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies durch $\text{TNF}\alpha$, die zur Oxidation von GSH führen (**B**). Trotz dieser nachgewiesenen Bildung reaktiver Sauerstoffspezies konnte für die CAT-Genexpression und für die CAT-Enzymaktivität keine Induktion nachgewiesen werden. Vielmehr zeigten beide Parameter eine tendenzielle Abnahme ihrer Induktionsfaktoren, was für eine Verringerung der Genexpression und Enzymaktivität im Vergleich zu unbehandelten Hautfibroblasten spricht (**C**). Auch die GPx-Genexpression wurde durch eine Behandlung der Hautfibroblasten mit $\text{TNF}\alpha$ nicht beeinflusst. Die erhaltenen Induktionsfaktoren schwankten stark um 1. Die GPx-Enzymaktivität konnte mit 10 ng $\text{TNF}\alpha$ 2fach gesteigert werden (**D**).

Wie erwartet wurde für die SOD-Enzymaktivität eine konzentrationsabhängige Zunahme nachgewiesen, deren Maximum bei 10 ng $\text{TNF}\alpha$ mit einem Induktionsfaktor von 8 liegt. Diese starke Induktion der SOD-Aktivität spricht für die durch $\text{TNF}\alpha$ bedingte Bildung von Superoxid, dem Substrat dieser Enzymfamilie. Auch die SOD2-Genexpression wurde durch $\text{TNF}\alpha$ induziert. Über den gesamten Konzentrationsbereich war die SOD2 in den behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Hautfibroblasten um den Faktor 1.5 - 2.5 erhöht. Die SOD1 wurde dagegen nicht induziert (**E**). Die Messungen der 8-oxo-dGTPase-Aktivität und der hMTH1-Genexpression lassen auf keine Beeinflussung durch $\text{TNF}\alpha$ schließen. Die erhaltenen Induktionsfaktoren schwankten um den Wert 1, was der Aktivität und Genexpression der 8-oxo-dGTPase in unbehandelten Hautfibroblasten entspricht (**F**).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß $\text{TNF}\alpha$ an der Regulation der 8-oxo-dGTPase nicht beteiligt ist und daß dieses Enzym bei Entzündungsprozessen wohl, wenn überhaupt, nur eine untergeordnete Rolle spielt. Dagegen scheint die SOD2 wichtig zu sein. Ob die Regulation über andere *second-messenger* vermittelt wird oder nicht bleibt zu überprüfen.

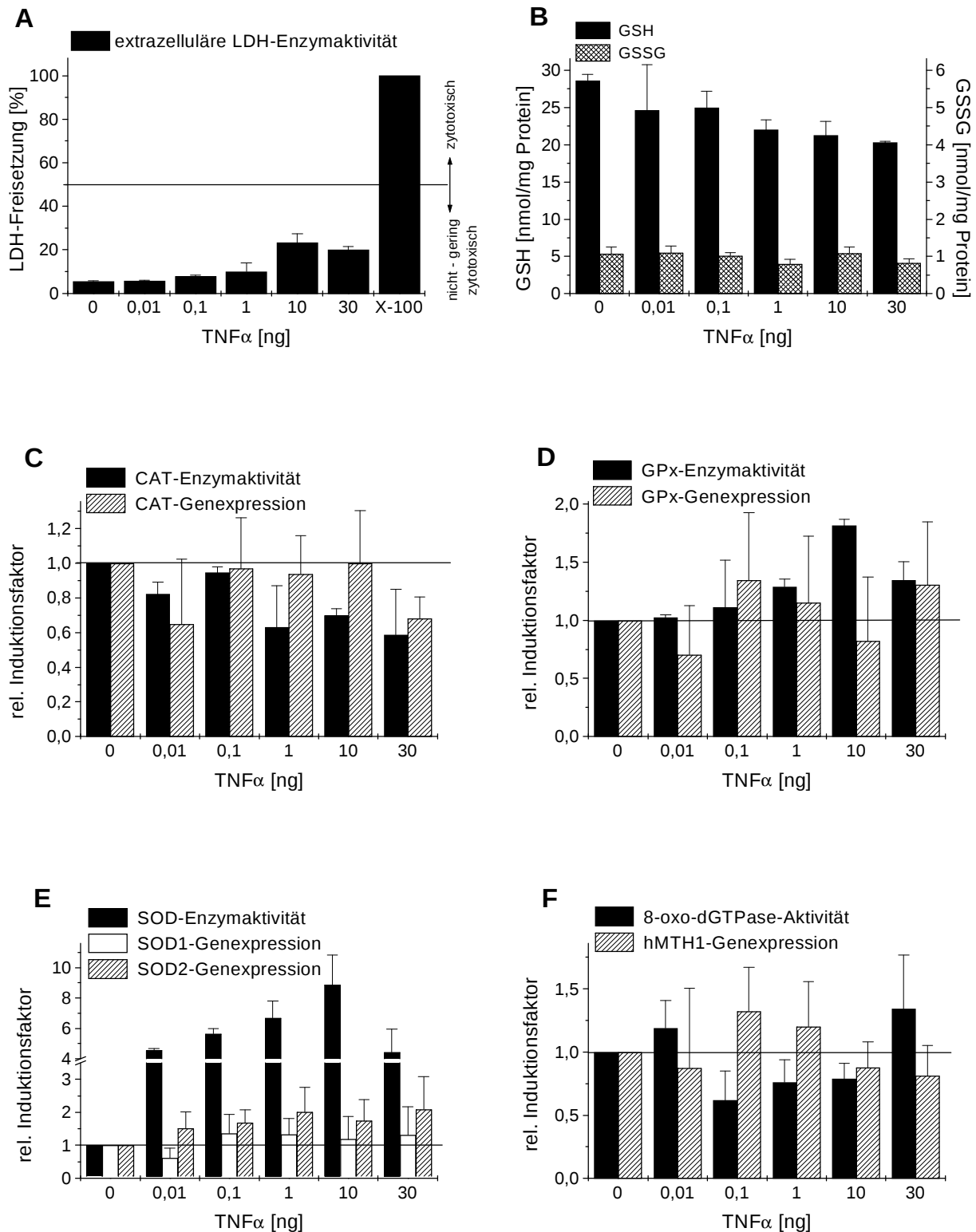


Abb. 5-31: Einfluß von TNF α auf die Freisetzung von LDH [A], den GSH-Status [B] sowie auf die Genexpression und Enzymaktivität von Katalase [C], Glutathion-Peroxidase [D], Superoxid-Dismutase [E] und 8-oxo-dGTPase [F] in Hautfibroblasten nach 24 h Inkubationszeit

Für die Bestimmung der LDH-Aktivität wurden 5×10^5 Hautfibroblasten mit 0 - 30 ng TNF α für 24 h, bzw. mit 0.5% Triton X-100 als Positivkontrolle für 1 h behandelt. Zur Analyse der anderen Parameter wurden in 3×10^6 Hautfibroblasten für 24 h mit 0 - 30 ng TNF α behandelt. Die einzelnen Bestimmungen erfolgte wie in Abb. 5-14 beschrieben. Die Daten zweier voneinander unabhängiger Versuche wurden dargestellt.

5.4 Untersuchungen zum Verhalten der 8-oxo-dGTPase bei der Zelldifferenzierung

Aus den in **Abschnitt 5.3** dargestellten Ergebnissen, die in der Diskussion ausführlicher erläutert werden, kann gefolgert werden, daß sowohl die Genexpression als auch die Enzymaktivität der 8-oxo-dGTPase durch reaktive Sauerstoffspezies in unterschiedlichem Ausmaß induziert werden kann. Die Regulation dieses Enzyms erfolgt dabei über die transkriptionelle und translationale Ebene und ist nicht mit den klassischen antioxidativen Enzymen, wie Katalase, Glutathion-Peroxidase und Superoxid-Dismutase, verknüpft.

Um zu klären, ob die Induktion der 8-oxo-dGTPase lediglich von der Konzentration der reaktiven Sauerstoffspezies in der Zelle und einer damit verbundenen Veränderung des Redoxhaushaltes abhängig ist oder ob sie an weitere Signale, wie z.B. Proliferationsreize, gekoppelt ist, wurde das Verhalten der 8-oxo-dGTPase während der Zelldifferenzierung untersucht. Bei diesem Prozeß werden unreife, proliferierende Vorläuferzellen in ausgereifte, sich nicht mehr teilende Zellen mit je nach Zelltyp und Gewebe festgelegter Funktion umgewandelt. Es wird postuliert, daß diese Umwandlung mit einer Veränderung des Redoxhaushaltes der Zelle durch eine erhöhte Bildung von Superoxid einhergeht, wodurch es zu einer Veränderung der Genexpression kommt [Sohal, 1986].

5.4.1 Charakterisierung des gewählten Zellsystems

Als ein Modellsystem für das Studium der zellulären Differenzierung wurde die Zelllinie HT29, die ursprünglich aus einem Colon Adenokarzinom stammte, gewählt. Sie wird als multipotent beschrieben und mit den intestinalen Stammzellen, aus der sich die unterschiedlichen Zelltypen im Darm entwickeln, gleichgesetzt. Durch die Wahl geeigneter Induktoren differenzieren die HT29-Zellen zu absorbierenden Enterozyten, Lysozym-produzierenden Paneth-Zellen, Mucin-produzierenden Goblet-Zellen oder enteroendokrinen Zellen. Diese unterschiedlichen Phänotypen werden durch spezifische intestinale Marker, wie z.B. Mucine (MUC 2 und 3), CEA (Carcinoembryonic Antigen) und ALP (Alkalische Phosphatase), charakterisiert. So ist die Zunahme der ALP-Aktivität mit der Bildung eines apikalen Bürstensaums, der für den Enterozyten-Phänotyp charakteristisch ist, assoziiert [Velcich, 1995].

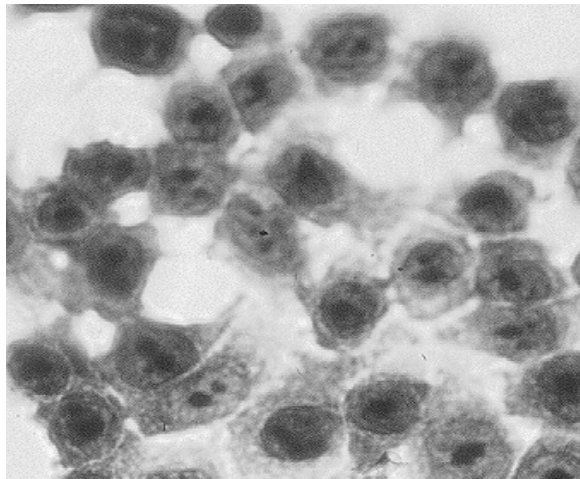
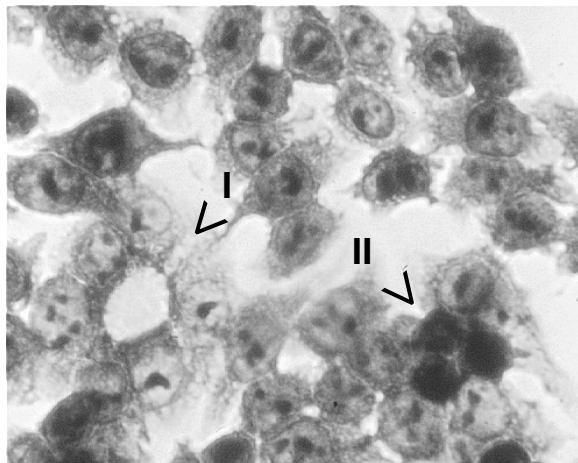
Durch die Behandlung von HT29-Zellen mit kurzkettigen Fettsäuren, insbesondere mit Natriumbutyrat, differenzieren diese zu absorbierenden Enterozyten, was anhand von ultrastrukturellen Untersuchungen bereits nachgewiesen wurde [Schroy, 1994]. Damit verbunden ist ein charakteristischer Anstieg der ALP-Aktivität und ALP-Genexpression. Durch die Wahl der Reaktionsbedingungen ist dieser Vorgang reversibel oder irreversibel.

Somit kann dieses Modell zum Studium des Differenzierungsprozesses und zum Vergleich un- und ausdifferenzierter HT29-Zellen herangezogen werden.

5.4.2 Morphologische Veränderungen von HT-29 Zellen nach Differenzierungsinduktion mit Natriumbutyrat

Die durch Natriumbutyrat induzierte Differenzierung der HT29 Zellen ist gekennzeichnet durch die Bildung zahlreicher intra- und interzellulärer Blasen. Daneben wird die Bildung vielkerniger Riesenzellen beobachtet, die sich durch ein großes Zytoplasma-Kern-Verhältnis auszeichnen. Gelegentlich werden auch Domformationen beobachtet [Rochette-Egly, 1988; Schroy, 1994].

Für die Analyse der morphologischen Veränderungen wurden undifferenzierte und vollständig ausdifferenzierte HT29 Zellen [4.3.5] kultiviert. Nach einer Anwachszeit von 24 h erfolgte die Färbung nach Pappenheim mit May-Grünwald- und Giemsa-Lösung [4.4] Repräsentative Ausschnitte der lichtmikroskopischen Aufnahmen der Präparate sind in **Abbildung 5-32** abgebildet..

A**B**

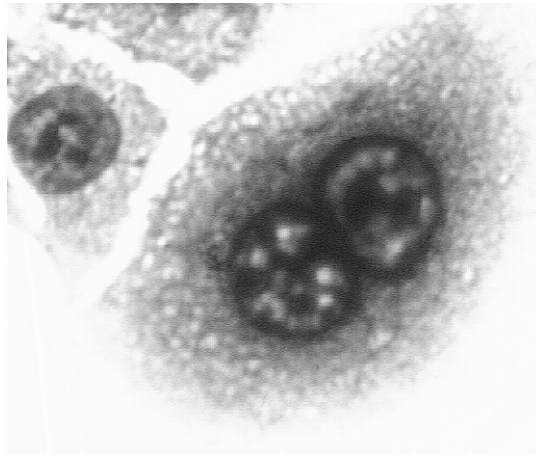
C

Abb. 5-32: Morphologische Veränderung in HT29-Zellen nach Differenzierungsinduktion mit 5 mM Natriumbutyrat

In einem 6-well-dish ($\varnothing$ 3 cm / well) wurden je well 5×10^5 Zellen in 4 ml DME Vollmedium auf coverslips ($\varnothing$ 2.5 cm) ausplattiert. Nach einer Anwachszeit von 24 h wurde das Medium entfernt und die Zellen nach Pappenheim gefärbt. Repräsentative Ausschnitte der Präparate wurden dann mit 60facher Vergrößerung fotografiert.

Die Differenzierung in den behandelten Zellgruppen (**B** und **C**) war deutlich an der Bildung von interzellulären Blasen (I), Dormformationen (II) und mehrkernigen Riesenzellen zu erkennen. Diese morphologische Veränderungen waren in den undifferenzierten HT29-Zellen (**A**) nicht erkennbar.

5.4.3 Veränderung der Genexpression und Enzymaktivität nach Differenzierungsinduktion in HT29 Zellen

Zum Studium der Genexpression und der Enzymaktivität der antioxidativen Enzyme Katalase (CAT), Glutathion-Peroxidase (GPx) und Superoxid-Dismutase (SOD) sowie der 8-oxo-dGTPase, während der zellulären Differenzierung, wurden postkonfluente HT29-Zellen mit Natriumbutyrat behandelt. Nach 6, 18, 24, 48 und 72 h wurden die Zellen geerntet. Aus einem Teil der Proben wurde die RNA isoliert und zur Messung der jeweiligen Genexpressionen in die RT-PCR eingesetzt [4.11]. Als Referenzgen wurde GAPDH gewählt. Aus dem anderen Teil der Proben wurde der zellfreie Extrakt, wie unter 4.7.2.1 beschrieben, gewonnen und für die Bestimmung der einzelnen Enzymaktivitäten eingesetzt. Als ein Marker für die Differenzierung wurde die Alkalische Phosphatase (ALP) Aktivität und Genexpression herangezogen. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 5-33** graphisch dargestellt.

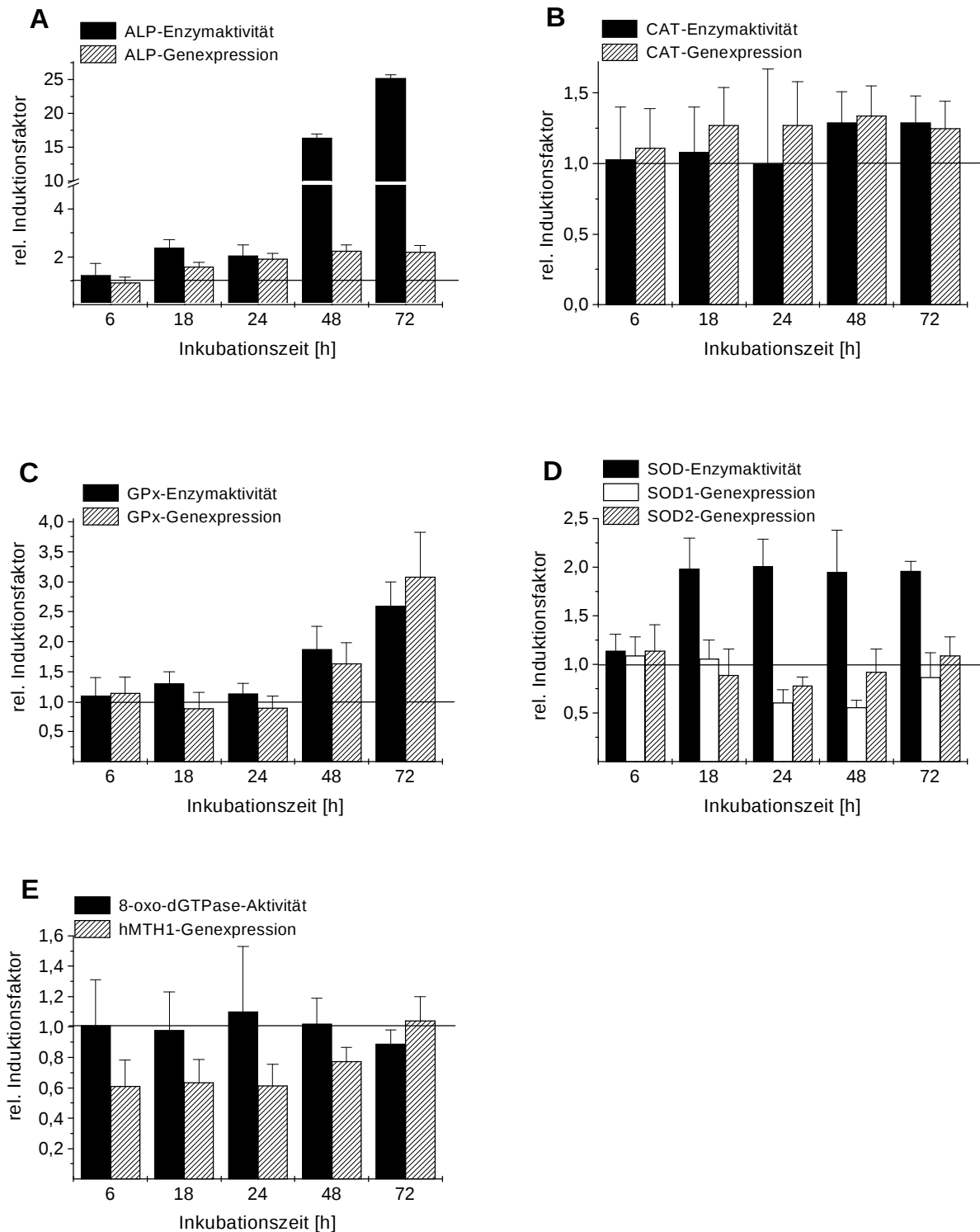


Abb. 5-33: Veränderung der Genexpression und Enzymaktivität von Alkaliner Phosphatase [A], Katalase [B], Glutathion-Peroxidase [C], Superoxid-Dismutase [D] und 8-oxo-dGTPase [E] in HT29-Zellen nach Differenzierungsinduktion mit Natriumbutyrat.

Für jeden Ansatz wurden 3×10^6 HT29-Zellen ausplattiert und nach Erreichen des Konfluenz mit 5 mM Natriumbutyrat für weitere 6 - 72 h behandelt. Aus einem Teil der Proben wurde der zellfreie Extrakt, wie unter 4.7.2.1 beschrieben, hergestellt. Die Bestimmung der ALP-Aktivität [4.10], SOD-Aktivität [4.8.2], der CAT-Aktivität [4.8.1] und der GPx-Aktivität [4.8.3] erfolgte in dialysierten Proben. Aus dem Ultrafiltrat wurde die 8-oxo-dGTPase-Aktivität [4.7.3 und 4.7.4] bestimmt. Sämtliche Parameter wurden auf die Proteinkonzentration

bezogen. Um die realtiven Induktionsfaktoren zu erhalten, wurden die Enzymaktivitäten der behandelten auf die der unbehandelten Zellen normiert. Für die Bestimmung der Genexpression wurden aus dem anderen Teil der Proben die RNA isoliert [4.11.1] und der Gehalt spektralphotometrisch bestimmt [4.11.2]. 1 µg RNA je Probe wurden in die RT-PCR eingesetzt [4.11.3]. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt [4.11.3.3] und die Ethidiumbromid gefärbten Gele mit dem GelPrint 1000i System dokumentiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software OneDScan [4.11.3.4]. Die erhaltenen Werte wurden auf die Kontrolle normiert und als relative Induktionsfaktoren graphisch dargestellt. Die dargestellten Werte ergaben sich aus zwei voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen.

Die Behandlung mit Natriumbutyrat bewirkte mit zunehmender Inkubationszeit eine deutliche Steigerung der ALP-Enzymaktivität. Nach 72 h wurde ein relativer Induktionsfaktor von 25 errechnet. Auch die ALP-Genexpression wurde durch die Behandlung der HT29-Zellen mit Natriumbutyrat 2.5fach gesteigert. Diese Steigerung spricht für eine Differenzierung der HT29-Zellen (**A**). Bei den Messungen der Katalase-Aktivität und Genexpression wurden keine Unterschiede zwischen behandelten und unbehandelten HT29-Zellen während des gesamten Zeitraumes beobachtet. Somit scheint die Katalase keine Rolle bei der zellulären Differenzierung in diesem Modellsystem zu spielen (**B**). Im Gegensatz dazu wurde bei der Glutathion-Peroxidase sowohl eine Induktion der Enzymaktivität als auch der Genexpression nachgewiesen. Dabei betrug der Induktionsfaktor für die GPx-Enzymaktivität 2.5 und für die Genexpression 3 nach 72 h Behandlungsdauer (**C**). Bei der SOD-Enzymaktivität wurde bereits nach 18 h eine leichte Steigerung um den Faktor 2 festgestellt. Die Genexpression von SOD1 und SOD2 zeigten dagegen keine Veränderungen. Somit scheint die SOD eine wichtige Rolle zu Beginn des Differenzierungsprozesses in diesem Modellsystem zu spielen. Die Regulation dieses Enzyms erfolgt dabei nicht auf transkriptioneller Ebene (**D**). Die 8-oxo-dGTPase-Aktivität und hMTH1-Genexpression wiesen keine deutlichen Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten HT29-Zellen auf. Somit scheint die 8-oxo-dGTPase bei der zellulären Differenzierung der HT29-Zellen keine Rolle zu spielen (**E**).

5.4.4 Vergleich der Genexpression und Enzymaktivität von un- und ausdifferenzierten HT29 Zellen

Wie die vorherigen Untersuchungen gezeigt haben, werden die antioxidativen Enzyme bei der zellulären Differenzierung in HT29-Zellen unterschiedlich beeinflusst. Die Induktion der SOD- und GPx-Aktivität sprechen für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies während des Differenzierungsprozesses. Da für ausdifferenzierte Zellen bereits ein stärker pro-oxidierender Redoxhaushalt postuliert wurde [Sohal, 1986], stellt sich die Frage, ob Unterschiede hinsichtlich der Enzymaktivität und der Genexpression zwischen un- und ausdifferenzierten HT29-Zellen nachweisbar sind.

Um vollständig ausdifferenzierte HT29-Zellen zu erhalten, wurden 2×10^6 Zellen ausplattiert und über einen Zeitraum von 30 Tagen mit Natriumbutyrat nach dem im **Abschnitt 4.3.6** beschriebenen Behandlungsschema inkubiert. Die so erhaltenen Zellen werden im folgenden als HT29 diff. bezeichnet. Zum Studium der Genexpression und der Enzymaktivität der

antioxidativen Enzyme CAT, GPx und SOD sowie der 8-oxo-dGTPase wurden je Ansatz 2×10^6 HT29-Zellen oder 2×10^6 HT29 diff.-Zellen ausplattiert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die RNA [4.11.1] isoliert, bzw. der zellfreie Extrakt [4.7.2.1] gewonnen. Zur Bestimmung der Genexpression wurde die RNA in die RT-PCR eingesetzt, wobei GAPDH als Referenzgen eingesetzt wurde [4.11]. Im zellfreien Extrakt erfolgte die Messung der einzelnen Enzymaktivitäten wie unter 4.8 beschrieben. Die Bestimmung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität erfolgte im Ultrafiltrat. Die ALP-Enzymaktivität und die ALP-Genexpression wurde als Differenzierungsmarker herangezogen. In **Abbildung 5-34** sind die Ergebnisse der Genexpressionsstudien und in **Abbildung 5-35** die der Enzymaktivitätsmessungen graphisch wiedergegeben.

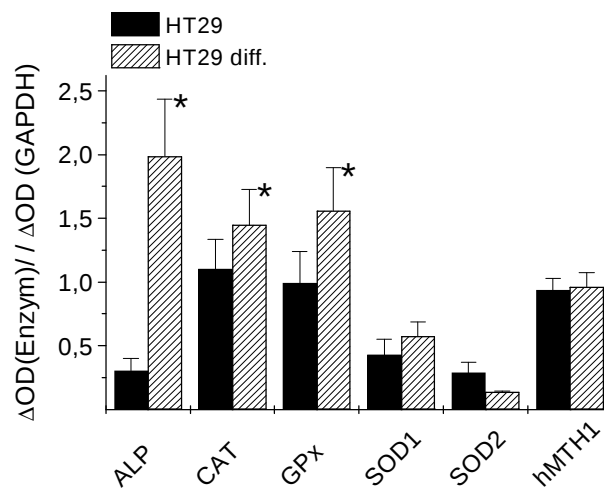


Abb. 5-34: Vergleich der Genexpression von Alkalischer Phosphatase (ALP), Katalase (CAT), Glutathion-Peroxidase (GPx), Superoxid-Dismutase (SOD) und 8-oxo-dGTPase (hMTH1) in un- und aus-differenzierten HT29-Zellen.

Je Ansatz wurden 2×10^6 HT29 bzw. HT29 diff. Zellen ausplattiert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und die RNA isoliert [4.11.1] und der Gehalt spektralphotometrisch bestimmt [4.11.2]. 1 µg RNA je Probe wurden in die RT-PCR eingesetzt [4.11.3]. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt [4.11.3.3] und die Ethidiumbromid gefärbten Gele mit dem GelPrint 1000i System dokumentiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software OneDScan [4.11.3.4]. In der Abbildung sind die Quotienten der integrierten OD-Werte des jeweiligen Gens und der integrierten OD von GAPDH wiedergegeben. Zur Beurteilung der Daten wurde ein t-Test durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden Daten mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ gewertet.

Wie erwartet, war die ALP-Genexpression in den HT29 diff.-Zellen gegenüber den HT29-Zellen erhöht. Somit handelt es sich bei den HT29 diff.-Zellen um einen stärker differenzierten Phänotyp. Nur bei der Katalase und Glutathion-Peroxidase konnte eine geringfügige, aber statistisch signifikante (* t-Test: $p < 0.05$) Erhöhung der Genexpression in HT29 diff.-Zellen gegenüber HT29-Zellen nachgewiesen werden. Dagegen waren bei der Superoxid-Dismutase 1 und 2, sowie bei der 8-oxo-dGTPase (hMTH1), keine Unterschiede feststellbar.

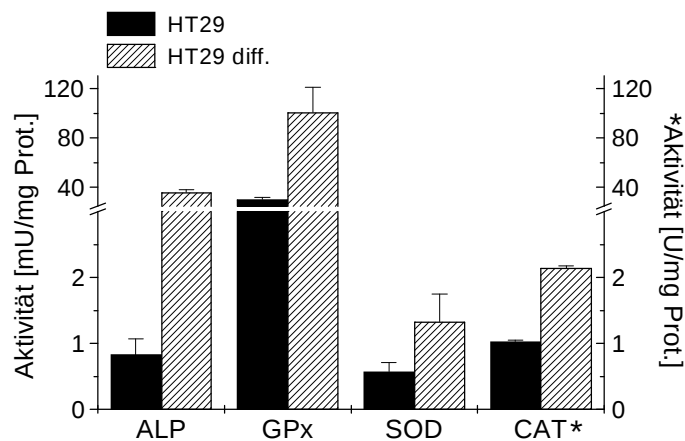


Abb. 5-35: Vergleich der Enzymaktivitäten von Alkalischer Phosphatase (ALP), Glutathion-Peroxidase (GPx), Superoxid-Dismutase (SOD) und Katalase (CAT) in un- und ausdifferenzierten HT29-Zellen.

Je Ansatz wurden 2×10^6 HT29 bzw. HT29 diff. Zellen ausplattiert. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und der zellfreie Extrakt gewonnen [4.7.2.1]. Die Bestimmung der ALP-Aktivität [4.10], der SOD-Aktivität [4.8.2], der CAT-Aktivität [4.8.1] und der GPx-Aktivität [4.8.3] erfolgte in dialysierten Proben. Sämtliche Parameter wurden auf die Proteinkonzentration bezogen.

Auch die Messungen der ALP-Enzymaktivität deuteten darauf hin, daß es sich bei den HT29 diff.-Zellen um einen stärker differenzierten Phänotyp im Vergleich zu den HT29-Zellen handelt. So wurde in den HT29 diff. Zellen eine extrem gesteigerte Enzymaktivität nachgewiesen. Da bei der 8-oxo-dGTPase keine Aktivitätsunterschiede zwischen den beiden Zelltypen festgestellt werden konnten, wurde auf eine graphische Darstellung verzichtet. Die HT29 diff. Zellen zeichneten sich gegenüber den HT29-Zellen durch eine gesteigerte GPx-, CAT und SOD-Aktivität aus. Werden die in den HT29-Zellen gemessenen Enzymaktivitäten auf die in HT29-Zellen gemessenen Aktivitäten bezogen, so ist die Katalase 2fach, die Superoxid-Dismutase 2.5fach und die Glutathion-Peroxidase 2.7fach erhöht. Da in differenzierten Zellen ein stärker pro-oxidierender Redoxhaushalt im Vergleich zu undifferenzierten Zellen postuliert wurde, kann diese gemessene Aktivitätssteigerung als eine Anpassung an die vorliegenden Bedingungen angesehen werden. Ein Vergleich der Genexpression der antioxidativen Enzyme mit der Enzymaktivität in HT29 diff. Zellen zeigt, daß die Genexpression von CAT und GPx mit der Enzymaktivität korreliert, wohingegen dies bei der SOD nicht der Fall ist. Dies legt den Schluß nahe, daß die Regulation der GPx und der CAT während der Differenzierung auf transkriptioneller Ebene erfolgt, wohingegen die SOD über post-transkriptionelle Mechanismen reguliert wird. Die 8-oxo-dGTPase wird dagegen durch die alleinige Veränderung des Redoxhaushaltes, die während der zellulären Differenzierung auftritt, nicht induziert.

5.5 *Einfluß von Tumorpromotoren auf die 8-oxo-dGTPase in primären Rattenhepatozyten*

Beim Prozeß der Tumorpromotion wird eine Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies diskutiert. Dies wird zum einen durch die Tatsache gestützt, daß die klassischen Tumorpromotoren, wie TPA oder auch TCDD die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies stimulieren. Zum anderen sind reaktive Sauerstoffspezies an der Regulation von Genen beteiligt, die das Wachstum der Zellen kontrollieren.

Für die Rolle der 8-oxo-dGTPase bei der Tumorpromotion können zwei verschiedene Hypothesen aufgestellt werden. Die erste Hypothese basiert auf der Tatsache, daß in Tumorgewebe ein sehr hoher Gehalt an 8-oxodG nachgewiesen wurde und daß diese Basenmodifikation auch verstärkt in proto-Oncogenen und Tumorsuppressorgenen auftrat, wodurch diese aktiviert bzw. inaktiviert wurden. Ursache dieser verstärkten Bildung von 8-oxo-dG könnte die Hemmung der 8-oxo-dGTPase sein. Dadurch würde 8-oxo-dGTP, welches als Folge einer erhöhten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch TPA oder TCDD vermehrt gebildet wird, verstärkt in die DNA eingebaut werden. Das warf die Frage auf, ob die klassischen Tumorpromotoren TCDD und TPA eine Hemmung der 8-oxo-dGTPase bewirken.

Die zweite Hypothese basiert darauf, daß eine mögliche Induktion der 8-oxo-dGTPase auf genetischer und enzymatischer Ebene mit einer erhöhten Toleranz gegenüber oxidativem Streß verbunden sein könnte, was als ein Selektionsvorteil angesehen werden kann. Diese Hypothese wird auch durch die Tatsachen gestützt, daß in renalen Tumoren bereits eine erhöhte hMTH1-Genexpression gegenüber normalen Gewebe festgestellt wurde [Okamoto, 1996] und daß die vorherigen Untersuchungen bereits auf eine Redoxregulation der 8-oxo-dGTPase hindeuten.

Um den Einfluß der Tumorpromotoren TPA und TCDD auf die Genexpression und Enzymaktivität der 8-oxo-dGTPase näher zu untersuchen, wurden Hepatozyten aus dem Lebergewebe männlicher Wistar Ratten isoliert. [4.3.3] und mit TCDD bzw. TPA behandelt. Nach 6, 24 und 48 h wurden die Zellen geerntet und aus einem Teil der Proben die RNA isoliert [4.11.1] und aus dem anderen Teil der Proben der zellfreie Extrakt [4.7.2.1] hergestellt. Die Bestimmung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität erfolgte im Ultrafiltrat [4.7.3]. Die RNA wurde in die RT-PCR [4.11] zur Bestimmung der hMTH1-Genexpression eingesetzt. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 5-36** und **Abbildung 5-37** graphisch dargestellt.

Es zeigte sich, daß keiner der gewählten Tumorpromotoren eine Inhibition der 8-oxo-dGTPase in Rattenhepatozyten bewirkte. Tendenziell war bei allen Versuchen eine Induktion sowohl der 8-oxo-dGTPase-Aktivität als auch der hMTH1-Genexpression erkennbar, wobei der Einfluß auf die Genexpression größer war als auf die Enzymaktivität.

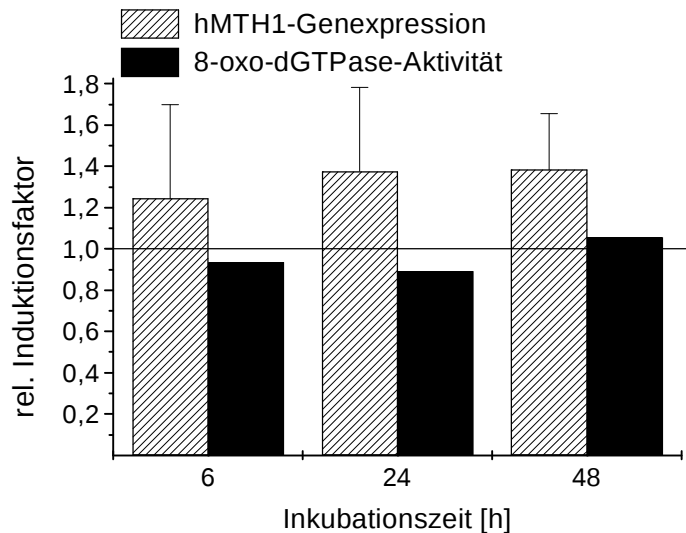


Abb. 5-36: Einfluß von 10^{-7} M TPA auf die Genexpression und Enzymaktivität der 8-oxo-dGTPase in primären Rattenhepatozyten.

Die Rattenhepatozyten wurden, wie unter 4.3.3 beschrieben, isoliert. Je Ansatz wurden 10^6 Zellen ausplattiert und nach einer Anwachszeit von 2 h mit 10^{-7} M TPA behandelt. Nach 6, 24 und 48 h wurden die Zellen geerntet, der zellfreie Extrakt gewonnen [4.7.2.2] oder die RNA isoliert [4.11.1] und der Gehalt spektralphotometrisch bestimmt [4.11.2]. 1 µg RNA je Probe wurden in die RT-PCR eingesetzt [4.11.3]. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt [4.11.3.3] und die Ethidiumbromid gefärbten Gele mit dem GelPrint 1000i System dokumentiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software OneDScan [4.11.3.4]. Im Ultrafiltrat des zellfreien Extraktes wurde die 8-oxo-dGTPase-Aktivität bestimmt [4.7.3] und auf die Proteinkonzentration [4.6] bezogen. Sämtliche Werte wurden auf die unbehandelten Zellen normiert und als relative Induktionsfaktoren graphisch dargestellt.

Im Gegensatz zu TCDD bewirkte eine Behandlung der Rattenhepatozyten mit TPA keine statistisch signifikanten Veränderungen. Die 8-oxo-dGTPase-Aktivität schwankte um den Induktionsfaktor 1 und entsprach somit der Aktivität der unbehandelten Zellen. Die hMTH1-Genexpression erwies sich gegenüber der in unbehandelten Zellen als leicht erhöht. Die Induktionsfaktoren lagen im Mittel bei 1.4. Diese leichte Erhöhung erwies sich jedoch als nicht statistisch signifikant. Durch eine Behandlung der Rattenhepatozyten mit TCDD konnte eine Induktion der hMTH1-Genexpression und der 8-oxo-dGTPase-Aktivität erzielt werden. Diese nachgewiesene Induktion war von der eingesetzten TCDD-Konzentration abhängig und war nach einer Inkubationszeit von 24 h am größten. Im Falle von 10^{-12} M TCDD war die Genexpression 2.2fach und die Aktivität 1.5fach und im Falle von 10^{-10} M TCDD 3.2fach bzw. 2fach erhöht.

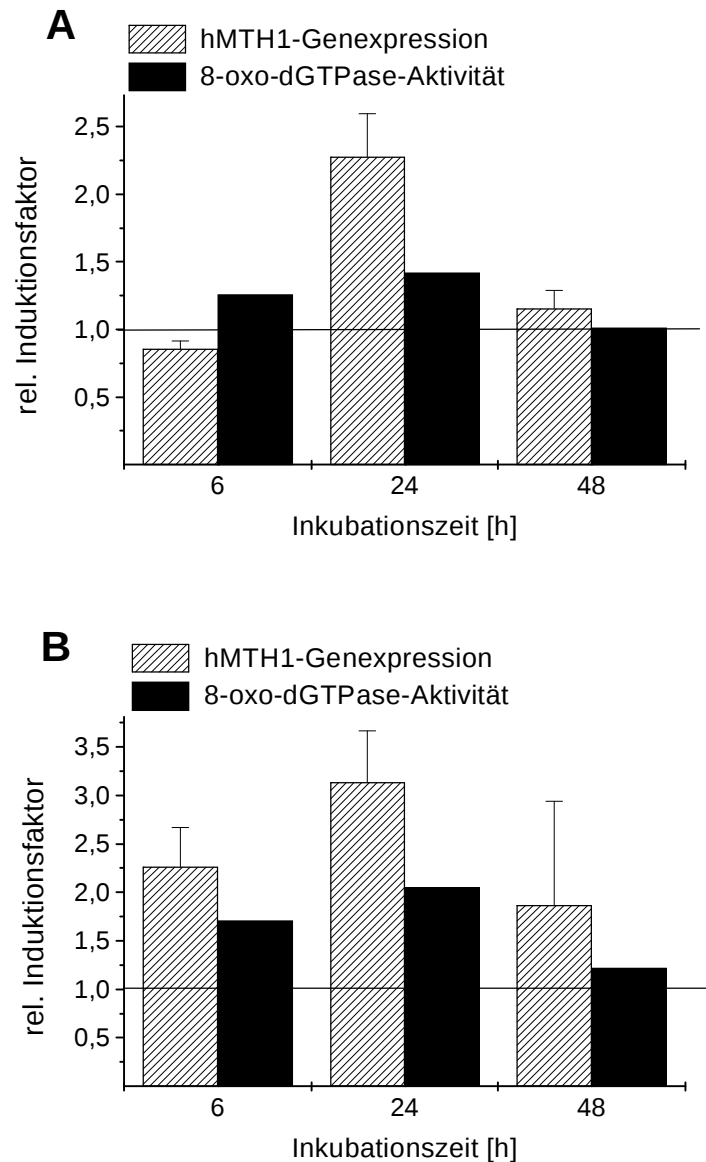


Abb. 5-37: Einfluß von 10^{-12} M [A] und 10^{-10} M [B] TCDD auf die Genexpression und Enzymaktivität der 8-oxo-dGTPase in primären Rattenhepatozyten

Rattenhepatozyten wurden, wie unter 4.3.3 beschrieben, isoliert. Je Ansatz wurden 10^6 Zellen ausplattiert und nach einer Anwuchszeit von 2 h mit 10^{-12} und 10^{-10} M TCDD behandelt. Nach 6, 24 und 48 h wurden die Zellen geerntet, der zellfreie Extrakt gewonnen [4.7.2.2] oder die RNA [4.11.1] isoliert. Die Bestimmung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität bzw. der hMTH1-Genexpression erfolgte wie unter Abbildung 5-36 beschrieben.

Diese Daten bestätigen somit eher die zweite Hypothese. Um allerdings genauere Aussagen machen zu können, müßten die Versuche zur besseren statistische Absicherung wiederholt werden.

6 Diskussion

Im folgenden Abschnitt wird neben der Induzierbarkeit der 8-oxo-dGTPase durch reaktive Sauerstoffspezies und ihrer möglichen Regulation die Funktion dieses Enzyms bei der Differenzierung und Tumorpromotion diskutiert.

6.1 Bestimmung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität in Zellkulturen

6.1.1 8-oxo-dGTPase-Assay

Um die 8-oxo-dGTPase-Aktivität in Zellkulturen bestimmen zu können, war zu Beginn der experimentellen Arbeiten der Aufbau eines geeigneten Testverfahrens erforderlich. Grundsätzlich gilt, daß eine exakte Bestimmung von Enzymaktivitäten nur dann möglich ist, wenn folgende Voraussetzungen erfüllt sind:

1. Substrat und mögliche Produkte müssen in hoher Reinheit vorliegen und
2. mögliche Reaktionsprodukte müssen spezifisch und äußerst sensitiv detektiert und quantifiziert werden.

Für die Herstellung der 8-oxo-Guanin-Nukleotide 8-oxo-dGMP, 8-oxo-dGDP und 8-oxo-dGTP sind bereits zwei verschiedene Synthesewege beschrieben worden. Bei der chemischen Synthese wird ausgehend vom 2'-Deoxyguanosine zunächst das 8-Bromo-Derivat gebildet, das zum 8-Benzyloxy-Derivat umgesetzt wird, welches dann phosphoryliert wird. Aus dem erhaltenen 8-(Benzyloxy)-2'-Deoxyguanosin-5'-monophosphat wird anschließend das Natriumsalz von 8-oxo-dGMP hergestellt, welches als Ausgangsprodukt für die Synthese von 8-oxo-dGDP und 8-oxo-dGTP dient. Ausgehend vom 2'-Deoxyguanosine beträgt die Ausbeute für 8-oxo-dGMP 1%. Die Ausbeute für 8-oxo-dGDP und 8-oxo-dGTP, ausgehend vom 8-oxo-dGMP, liegt bei 7% [Porter, 1996]. Bei der Direktsynthese werden die Guanin-Nukleotide dGMP, dGDP und dGTP durch ein ROS-generierendes System an C8-Position hydroxyliert. Als ROS-generierende Systeme sind dabei Ascorbinsäure/EDTA/ Fe^{2+} [Cheng, 1992; Kasai und Nishimura, 1984], Ascorbinsäure/ O_2 / Fe^{2+} [Hatahet, 1993], Ascorbinsäure/EDTA/ O_2 / Fe^{2+} [Purmal, 1994] und Ascorbinsäure/ H_2O_2 [Mo, 1992] verwendet worden. Die Schwierigkeit bei allen beschriebenen Methoden zur Direktsynthese der 8-oxo-Guanin-Nukleotide besteht in der Abtrennung der 8-oxo-Derivate vom Reaktionsgemisch. In der Literatur wurden meist Kombinationen bestehend aus einer Niederdruck-Chromatographie über eine DEAE-Sephadex-Säule (Anion-Austauscher) gefolgt von einer 2-stufigen HPLC (reverse Phase) [Cheng, 1992; Hatahet, 1993; Purmal, 1994] oder eine HPLC (Spherisorb SAX-Säule; Anion-Austausch) gefolgt von einer Niederdruck-Chromatographie über eine DEAE-MemSep-Säule (Anion-Austausch) [Mo, 1992] verwendet. Der Vorteil, den die Direktsynthese gegenüber der chemischen Synthese bietet, besteht darin, daß sie relativ einfach, schnell und in jedem Laboratorium durchführbar ist.

Der Nachteil der Direktsynthese liegt in der aufwendigen Abtrennung der 8-oxo-Derivate vom Reaktionsgemisch und ihrer anschließenden Aufreinigung, wodurch die Synthesemenge begrenzt ist. Daneben wird die Ausbeute durch eine Weiteroxidation zu unspezifischen Reaktionsprodukten geschmälert, sofern keine rasche Abtrennung der 8-oxo-Derivate erfolgt. Trotz dieser Nachteile wurden die 8-oxo-Derivate nach einem modifizierten Protokoll von Kasai und Mo [Kasai und Nishimura, 1984; Mo, 1992] direkt aus den jeweiligen Nukleotiden hergestellt. Für die Abtrennung der 8-oxo-Derivate und ihre anschließende Aufreinigung wurde eine neue 2-stufige HPLC-Methode entwickelt. Im ersten Schritt erfolgte die Abtrennung der 8-oxo-Derivate vom Reaktionsgemisch. Dies gelang bei 8-oxo-dGMP und 8-oxo-dGDP mit einem Citratpuffer als mobile Phase und einer Kombination aus einer PRP X-100-Säule (Anion-Austausch) mit einer C18 ODS-Säule (reverse Phase), die in Reihe geschaltet wurden, als stationäre Phase. Bei 8-oxo-dGTP gelang dies mit Zitronensäure/Acetonitril als mobile Phase und einer PRP X-100-Säule (Anion-Austausch) als stationäre Phase. Im zweiten Schritt erfolgte dann die Aufreinigung der 8-oxo-Guanin-Nukleotide über eine C18 ODS-Säule. Trotz dieser Neuentwicklung erwies sich die Abtrennung und Aufreinigung der 8-oxo-Derivate weiterhin als sehr aufwendig und zeitintensiv. Die Synthesemenge wurde vom geringen Injektionsvolumen (100 – 200 µl) und der Laufdauer (20 – 35 min.) pro Injektion begrenzt. Diese Limitierung könnte durch den Einsatz semipräparativer Säulen herabgesetzt werden. Die Ausbeute an 8-oxo-Derivaten, ausgehend vom jeweiligen Nukleotid, betrug 26% für 8-oxo-dGMP und jeweils 7% für 8-oxo-dGDP und 8-oxo-dGTP und ist im Vergleich zur chemischen Synthese als relativ hoch anzusehen. Bei einer neueren vielversprechenden Alternative wurde die Reaktion durch Zusatz von Katalase zum Reaktionsgemisch beendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Filtration durch einen 0.2 µ Nalgene-Filter über eine DEAE-Zellulose-Säule mit einem TEAB-Ionengradienten [Bialkowski, 1998].

Die älteste, bisher am meisten eingesetzte Methode zur Bestimmung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität verwendete [α - ^{32}P]8-oxo-dGTP als Substrat. Nach Trennung der einzelnen 8-oxo-Derivate per Dünnschichtchromatographie erfolgte die Quantifizierung des Reaktionsproduktes [α - ^{32}P]8-oxo-dGMP mittels Autoradiographie [Mo, 1992; Maki, 1992; Akiyama, 1989]. Die Nachteile dieser Methode sind in der ständigen Neusynthese des radioaktiv markierten Substrates 8-oxo-dGTP und in der ungenauen Autoradiographie zu sehen. Zudem erfordert das Arbeiten mit ^{32}P -markierten Substanzen besondere Schutzmaßnahmen. Bei einer neueren Methode erfolgte die Trennung der 8-oxo-Guanin-Nukleotide und ihre Quantifizierung per HPLC mit elektrochemischer Detektion. Als stationäre Phase wurde dabei eine reverse Phase und als mobile Phase ein Phosphatpuffer eingesetzt [Porter, 1996; 1997]. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der älteren ist im Einsatz des elektrochemischen Detektors zu sehen, der nicht nur das radioaktiv-freie Arbeiten, sondern auch eine äußerst sensitive Quantifizierung des Produktes 8-oxo-dGMP ermöglicht. Der Nachteil dieser Methode bestand darin, daß eine gleichzeitige Auftrennung der Guanin-Nukleotide dGMP, dGDP und dGTP sowie ihrer 8-oxo-Derivate 8-oxo-dGMP, 8-oxo-dGDP und 8-oxo-dGTP nicht möglich war.

Lediglich eine Auftrennung von 8-oxo-dGMP und 8-oxo-dGTP sowie von dGMP und dGTP konnte nach Veränderung der Zusammensetzung der mobilen Phase erzielt werden. Zur gleichzeitigen Bestimmung der Guanin-Nukleotide und ihrer 8-oxo-Derivate wurde deshalb eine neue HPLC-Methode entwickelt. Als stationäre Phase wurde eine reverse Phase und als mobile Phase ein Phosphatpuffer, dem Tetrabutylammoniumhydroxid (TBA) als Ionenpaar-Reagenz zugesetzt wurde, verwendet. Die Detektion erfolgte im UV bei 290 nm und elektrochemisch bei +600 mV. Ein Vorteil dieser Methode ist, wie das Chromatogramm in **Abbildung 5-1** zeigt, daß die exakte Auftrennung der Guanin-Nukleotide und ihrer 8-oxo-Derivate innerhalb von 20 min. erzielt wird. Die elektrochemische Detektion der 8-oxo-Guanin-Nukleotide bei +600 mV erlaubt zudem eine sehr sensitive Quantifizierung des Reaktionsproduktes 8-oxo-dGMP. Da sehr viele elektrochemisch aktive Substanzen im Reaktionsansatz die Stabilität des EC-Detektors beeinträchtigen, empfiehlt es sich entweder diese Substanzen aus dem Reaktionsansatz zu entfernen (z.B. durch Dialyse) oder zu Lasten der Sensitivität einen Photodiode-Array UV/VIS Detektor einzusetzen [Bialkowski, 1998; 1999].

Ein weiteres Problem bei der Entwicklung eines geeigneten Testsystems bestand darin, daß sämtliche zu der Zeit bekannten Methoden zur Messung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität vom rein isolierten Enzym ausgingen. Eine vorherige Isolierung des Enzyms wäre jedoch für ein Screening-Verfahren und für *in vivo* Untersuchungen ungeeignet. Die Methoden, die für das gereinigte Enzym bestanden, waren zudem, wie **Abbildung 5-2** zeigt, nicht auf Zell- oder Gewebeextrakte übertragbar. Wurde der zellfreie Extrakt mit dem Substrat 8-oxo-dGTP inkubiert, so wurde als Hauptprodukt 8-oxo-dGDP gebildet. Dieser Abbau wird von unspezifischen Phosphatasen katalysiert, die im zellfreien Extrakt vorliegen und somit mit der 8-oxo-dGTPase um das Substrat konkurrieren. Daneben haben die unter 5.2.4 dargestellten Inhibitionsstudien gezeigt, daß 8-oxo-dGDP ein starker unkompetitiver Inhibitor der 8-oxo-dGTPase ist (siehe **Abbildung 5-10**). In Gegenwart von 5% 8-oxo-dGDP wurde die 8-oxo-dGTPase-Aktivität bereits um 50% verringert [Bialkowski, 1998]. Um eine exakte Bestimmung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität in Zell- oder Gewebe-Extrakten durchführen zu können, müssen deshalb nicht nur die störenden Phosphatasen aus dem Extrakt entfernt werden, sondern die 8-oxo-dGTP-Präparationen müssen auch frei von 8-oxo-dGDP sein. Ein nicht-enzymatischer Abbau von 8-oxo-dGTP zu 8-oxo-dGDP, wie er in der Literatur beschrieben worden ist [Bialkowski, 1998; 1999], konnte selbst nach einem Jahr Lagerung der Präparationen bei -20°C nicht festgestellt werden.

Im Gegensatz zu den konkurrierenden Phosphatasen, die eine Molekülgröße > 40 kDa besitzen [Mo, 1992], ist die Molekülgröße der 8-oxo-dGTPase relativ klein. Sie wurde im Menschen [Mo, 1992], in der Maus [Kakuma, 1995] und in der Ratte [Cai, 1995] mit 18 kDa bestimmt. Durch diesen Größenunterschied konnten die störenden Phosphatasen von der 8-oxo-dGTPase durch Filtration durch eine 30 kDa cut-off-Membran abgetrennt werden [Bialkowski, 1998].

Wurde das dadurch erhaltene Ultrafiltrat mit dem Substrat 8-oxo-dGTP inkubiert, so konnte nur noch der von der 8-oxo-dGTPase katalysierte Abbau zu 8-oxo-dGMP nachgewiesen werden (siehe **Abbildung 5-3**). Diese Abtrennung der 8-oxo-dGTPase von anderen störenden Phosphatasen erlaubte nicht nur die exakte Bestimmung der 8-oxo-dGTPase in Zell- oder Gewebeextrakten, sondern auch Studien zur Enzymkinetik. Allerdings sollte dabei bedacht werden, daß die Ultrafiltration nicht die perfekte Lösung darstellt. So können u.U. die Phosphatasen nicht vollständig abgetrennt werden, oder ein Teil der 8-oxo-dGTPase könnte an die Filtrationsmembran binden, was in beiden Fällen zu einer geringeren Aktivität führen würde. Daneben wird die Effizienz durch die Anzahl der Makromoleküle, die sich an die Membran lagern, bestimmt und die Kapazität auch von individuellen Membranunterschieden beeinflusst. Da der Ultrafiltrationsschritt entscheidend für die Reproduzierbarkeit der 8-oxo-dGTPase-Aktivitätsmessung ist, sollten zum einen große Unterschiede im Proteingehalt der Proben vermieden und zum anderen Mehrfachbestimmungen durchgeführt werden. Deshalb wurde vor jedem Ultrafiltrationsschritt der Proteingehalt der Zellextrakte bestimmt und eine Doppelbestimmung durchgeführt.

6.1.2 Charakterisierung der 8-oxo-dGTPase

Die im Extrakt von Jurkat-Zellen enthaltene 8-oxo-dGTPase besaß eine Molekülgröße < 30 kDa. Ihre maximale Enzymaktivität lag, wie **Abbildung 5-4** zeigt, bei pH 8.3 und war von Mg^{2+} abhängig, wie aus **Abbildung 5-5** ersichtlich wird. Die Enzymreaktion ließ sich mit dem Modell von Michaelis-Menten beschreiben und wurde bei pH 8 durch einen K_M -Wert von $14.2 \mu M$ und einer Maximalgeschwindigkeit von 36.49 pmol/min (siehe **Abbildung 5-6** und **5-7**) charakterisiert. Die im Extrakt von primären humanen Hautfibroblasten identifizierte 8-oxo-dGTPase konnte mit einem K_M -Wert von $7.9 \mu M$ und einer Maximalgeschwindigkeit von 33.84 pmol/min . (siehe **Abbildung 5-13**) beschrieben werden. Von einigen Arbeitsgruppen wurde bereits die 8-oxo-dGTPase in verschiedenen Zelltypen charakterisiert. Ihre Ergebnisse sind in **Tabelle 6-1** zusammengefaßt. Ein Vergleich der dort aufgeführten Ergebnisse, mit denen in dieser Arbeit dargestellten, zeigt, daß es sich um ein und dasselbe Enzym handelt. Da der K_M -Wert eines Enzyms von verschiedenen Faktoren, wie pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke etc., beeinflusst wird [Stryer, 1988], kann der Unterschied der K_M -Werte durch die unterschiedlichen Meßbedingungen bedingt sein. Aus diesem Grunde sollten kinetische Studien und die Berechnung der kinetischen Parameter K_M und $v_{\max}$ nur an rein isolierten Enzymen durchgeführt werden.

Tab. 6-1: Charakteristika der 8-oxo-dGTPase in verschiedenen Zelltypen

Veröffentlichung	Zelltyp		MW ^{*1}	pH-Optimum	Mg ²⁺ abhängig	K _M -Wert
Sakumi, 1993	Jurkat	isoliert	18 kDa	--	--	--
Cai, 1995	Ratte	isoliert	18 kDa	--	--	--
Kakuma, 1995	Maus	isoliert	18 kDa	--	--	--
Mo, 1992	Jurkat	isoliert	18 kDa	8.0	+	12.5 µM
Bialkowski, 1998	CHO ^{*2}	Extrakt	< 30 kDa	8.5	+	9.3 µM
	Fibroblasten	Extrakt	< 30 kDa	8.5	+	8.5 µM

^{*1} Molekulargewicht

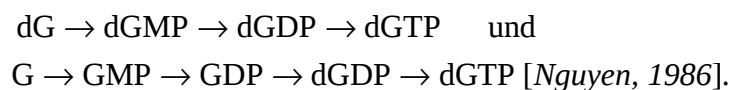
^{*2} chinese hamster ovary

-- nicht untersucht

+ trifft zu

6.1.3 Inhibitionsstudien

Die Hemmung der enzymatischen Aktivität durch spezifische Substanzen stellt einen bedeutenden Kontrollmechanismus in biologischen System dar [Stryer, 1988]. In der Enzymkinetik werden verschiedene Inhibitionsmechanismen voneinander unterschieden. Bei der kompetitiven Hemmung konkurriert der Inhibitor reversibel mit dem Substrat um die Bindungsstellen im aktiven Zentrum. Reagiert der Inhibitor reversibel nur mit dem Enzym-Substrat-Komplex, aber verhindert nicht seine Bildung, so handelt es sich um eine unkompetitive Hemmung. Bei der nicht-kompetitiven Hemmung kann der Inhibitor reversibel sowohl an das Enzym als auch an den Enzym-Substrat-Komplex binden und somit die Produktbildung hemmen. Daneben kann ein Enzym auch irreversibel gehemmt werden [Michal, 1999]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Inhibitionsstudien zeigten, daß die Guanin-Nukleotide dGMP, dGTP und dGDP die 8-oxo-dGTPase kompetitiv hemmen (siehe 5.2.4.1). Dabei nahm der hemmende Einfluß der Guanin-Nukleotide in folgender Reihenfolge zu: dGTP < dGDP < dGMP. Im Gegensatz dazu stellte 8-oxo-dGDP einen potenten unkompetitiven Inhibitor der 8-oxo-dGTPase dar. 8-oxo-dGMP hatte keinen hemmenden Einfluß (siehe 5.2.4.2). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Zusammensetzung des Nukleotidpools bei der Regulation der 8-oxo-dGTPase eine Rolle spielt. Die Größe und Zusammensetzung des Nukleotidpools wird über Dephosphorylierungen und Phosphorylierungen der de novo synthetisierten Nukleotide reguliert („substrate cycle model“) [Nicander und Reichard, 1985; Bianchi, 1986; Höglund, 1991]. Dabei wird der dGTP-Pool über folgende Synthesewege aufgebaut:



Eine oxidative Schädigung kann auf jeder Stufe der Synthese erfolgen. Da aber 8-oxo-dGMP und 8-oxo-GMP nicht zum entsprechenden Diphosphat umgesetzt werden und 8-oxo-GDP auch nicht zum 8-oxo-dGDP reduziert werden kann [Hayakawa, 1995; 1999], kann 8-oxo-dGTP nur aus 8-oxo-dGDP oder durch direkte Oxidation von dGTP gebildet werden. Somit ist neben dGDP der dGTP-Pool entscheidend für das Ausmaß der 8-oxo-dGTP-Bildung. Untersuchungen des dGTP-Pools in Abhängigkeit vom Zellzyklus ergaben eine 6 bis 12fache Zunahme von dGTP in der S-Phase. Der dGTP-Gehalt in der G1-Phase wurde mit 0.16 pmol/ μ g DNA und in der S-Phase 0.76 pmol/ μ g DNA angegeben [Bjursell, 1980]. Die Wahrscheinlichkeit einer oxidativen Schädigung von dGTP wäre somit in der S-Phase am größten. Dies legt die Vermutung nahe, daß auch die Aktivität der 8-oxo-dGTPase in der S-Phase am größten ist. Um diese Theorie zu unterlegen, müßte die 8-oxo-dGTPase-Aktivität in den verschiedenen Stadien des Zellzyklus bestimmt werden.

Neben 8-oxo-dGTP stellen auch die Nukleotide dATP und dGTP Substrate der 8-oxo-dGTPase dar. Allerdings war der K_M -Wert für dGTP als Substrat von 870 μ M um den Faktor 70 höher als der K_M -Wert für 8-oxo-dGTP, der bei 12.5 μ M lag [Mo, 1992]. Unter der Voraussetzung, daß die Dissoziation des Enzym-Substrat-Komplexes schneller abläuft als die Bildung von Enzym und Produkt, stellt der K_M -Wert ein Maß für die Affinität dar. Ein hoher K_M -Wert spiegelt unter dieser Voraussetzung eine schwache Bindung, ein niedriger eine feste Bindung wieder. Somit ist die Affinität für dGTP wesentlich geringer als für 8-oxo-dGTP. Da dGTP auch ein Substrat der 8-oxo-dGTPase darstellt, könnte dies auch die Ursache für die nachgewiesene schwache kompetitive Hemmung sein. Die stärkere Hemmung durch dGMP könnte in diesem Zusammenhang als feedback-Regulation angesehen werden. Da 8-oxo-dGMP durch die 8-oxo-dGMPase rasch weiter zu 8-oxo-dG abgebaut wird, welches nach Transport durch die Zellmembran ausgeschieden wird [Hayakawa, 1995], ist eine feedback-Regulation unwahrscheinlich.

6.2 Vergleich der Redoxregulation der 8-oxo-dGTPase mit der Redoxregulation der klassischen antioxidativen Enzymen CAT, SOD und GPx

6.2.1 ROS-abhängige Induktion

Die 8-oxo-dGTPase wurde ebenso wie die klassischen antioxidativen Enzyme Katalase (CAT), Glutathion-Peroxidase (GPx) und Superoxid-Dismutase (SOD) durch oxidativen Streß induziert. Dabei war das Ausmaß der beobachteten Induktion zum einen vom gewählten Oxidans und zum anderen auch vom Zelltyp abhängig. Die Ergebnisse sind in **Tabelle 6.2** und **Tabelle 6.3** zusammengefaßt. Mit keiner der eingesetzten Substanzen konnte eine Induktion der SOD1-Genexpression nachgewiesen werden.

In der Literatur wurde vielfach beschrieben, daß die SOD1 durch oxidativen Streß nicht beeinflußt wird [Strålin, 1994; Shull, 199; Housset, 1982; Jensen, 1992]. Allerdings konnte auch eine leicht verstärkte SOD1-Aktivität in bestimmten Zelltypen nachgewiesen werden [Kong, 1992; Nicotera, 1985]. Dieser Unterschied könnte am starken (>10fach) Unterschied der SOD1-Aktivität in verschiedenen Geweben und Zelltypen liegen [Marklund, 1984; 1982]. Da in der vorliegenden Arbeit zwischen der SOD1- und der SOD2-Aktivität nicht unterschieden wurde, kann keine Aussage darüber gefällt werden, ob auch die SOD1-Aktivität durch die verschiedenen Oxidantien induziert wurde und ob es hierbei zellspezifische Unterschiede gibt.

Tab. 6-2: Einfluß verschiedener ROS auf die Induktion der Genexpression und Enzymaktivität von CAT, GPx, SOD und 8-oxo-dGTPase in Jurkat-Zellen

		SOD		CAT		GPx		8-oxo-dGTPase		
		Akt.	Gen-1	Gen-2	Akt.	Gen	Akt.	Gen	Akt.	Gen
H ₂ O ₂		↑	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Xanthin Xanthin-Oxidase		↑	-	↑	↑	-	↑	↑	↑	↑
Paraquat		↑	-	↑	↑	↑	↑	↑	-	↑
Fe(II)		-	-	-	(↑)	-	(↑)	-	-	-
Akt.	Enzymaktivität						CAT	Katalase		
↑	Induktion						SOD	Superoxid-Dismutase		
(↑)	schwache Induktion						GPx	Glutathion-Peroxidase		
(↓)	schwache Repression						Gen-1	SOD1-Genexpression		
-	keine Änderung						Gen-2	SOD2-Genexpression		
Gen	Genexpression									

Tab. 6-3: Einfluß verschiedener ROS auf die Induktion der Genexpression und Enzymaktivität von CAT, GPx, SOD und 8-oxo-dGTPase in Hautfibroblasten

	Akt.	SOD Gen-1	Gen-2	Akt.	CAT Gen	Akt.	GPx Gen	Akt.	8-oxo-dGTPase Gen
H ₂ O ₂	↑	-	↑	↑	↑	↑	-	↑	↑
Xanthin Xanthin-Oxidase	↑	-	↑	↑	-	↑	-	↑	↑
Paraquat	↑	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑	(↑)
Fe(II)	-	-	-	(↑)	-	-	-	(↓)	-

Die selektive Induktion der mRNA der antioxidativen Enzyme in Abhängigkeit vom Oxidans und Zelltyp wurde von mehreren Arbeitsgruppen bestätigt. So konnte z.B. in HTE-Zellen mit H₂O₂ eine 3fache Induktion der CAT-Genexpression und eine 2fache Induktion der SOD2-Genexpression nachgewiesen werden. Wohingegen die SOD1-Genexpression nicht und die GPx-

Genexpression gering induziert wurden. Mit dem System Xanthin/Xanthin-Oxidase wurde dagegen nur eine 3fache Induktion der SOD2-Genexpression erzielt [Shull, 1991].

Auch der zeitliche Verlauf der H_2O_2 bedingten Induktion von Genexpression und Enzymaktivität (siehe **Abbildung 5-16**) in Hautfibroblasten deutet darauf hin, daß die untersuchten Enzyme zwar beim Abbau von ROS, wie z.B. H_2O_2 , zusammenarbeiten, aber unterschiedlich reguliert werden. Während die GPx-, die SOD- und die 8-oxo-dGTPase-Aktivität mit der Zeit zunahmen und nach 24 h ihr Maximum aufwiesen, war die maximale Induktion der CAT-Aktivität bereits nach 2 h erreicht. Im Laufe der weiteren Inkubationszeit nahm die CAT-Aktivität zunächst ab und durchlief nach 24 h ihr zweites Maximum. Auch die CAT-Genexpression wies nach 2 h ihr Maximum auf und nahm mit zunehmender Inkubationszeit wieder ab. Die GPx-Genexpression war dagegen lediglich die ersten 6 h erhöht. Die hMTH1- und SOD2-Genexpressionen zeigten erst nach 12 h Inkubationszeit eine leichte Induktion und hatten bei 24 h ihr Maximum. Die SOD1-Genexpression wurde durch H_2O_2 nicht induziert. Ähnliche Zeitverläufe für CAT- und SOD2-Genexpression wurden auch in HTE-Zellen nach Inkubation mit Xanthin/Xanthin-Oxidase erzielt [Schull, 1991]. Somit scheint die CAT die erste Stufe einer komplexen antioxidativen Abwehrstrategie zu sein.

Um Aussagen über einen möglichen Mechanismus der unterschiedlichen Regulation der antioxidativen Enzyme sowie der 8-oxo-dGTPase treffen zu können, wurden Jurkat-Zellen in An- oder Abwesenheit des Transkriptionshemmers Actinomycin D bzw. des Translationshemmers Cycloheximid behandelt. Die nachgewiesene Zunahme der mRNA könnte als Folge einer direkten Zunahme der Transkriptionsrate, einer Verlängerung der mRNA-Halbwertszeit oder beider angesehen werden [Visner, 1990; Shull, 1991]. Die Versuche der Transkriptionshemmung durch Actinomycin D ergaben, daß die durch H_2O_2 bedingte Induktion der SOD2-, GPx-, CAT- und hMTH1-Genexpression in Jurkat-Zellen über eine Erhöhung der Transkriptionsrate reguliert wird. Da durch Zusatz von Actinomycin D die durch H_2O_2 bewirkte Induktion vollständig aufgehoben wurde, wird angenommen, daß die mRNA-Halbwertszeit nicht verlängert wurde. Daneben könnte die nachgewiesene Zunahme der mRNA auch von der Translation abhängig sein. So sind Proteinkomponenten nicht nur an der Regulation der Genexpression, sondern auch an der Stabilisierung und an der turnover-Rate der mRNA beteiligt [Osborn, 1989; Visner, 1990]. Die Versuche mit Cycloheximid, welches die Translation hemmt, ergaben, daß eine Proteinsynthese keine bzw. nur eine untergeordnete Rolle bei der durch H_2O_2 bedingten Induktion der CAT- und GPx-Genexpression spielt. Für die hMTH1-Genexpression ist dagegen die Proteinsynthese erforderlich. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Versuchen mit Actinomycin D kann gefolgert werden, daß Proteine eher an der Regulation der hMTH1-Genexpression beteiligt sind und nicht die Stabilität der mRNA erhöhen. Auch für die SOD2-Genexpression ist eine Proteinsynthese erforderlich. Die erhaltenen Ergebnisse lassen auf die Beteiligung einer Proteinkomponente an der turnover-Rate der mRNA schließen. Ursache für die beobachtete Zunahme der SOD2-Genexpression durch Inkubation mit Cycloheximid und die durch Inkubation mit H_2O_2 /Cycloheximid hervorgerufene Superinduktion der SOD2 könnte

entweder ein Repressor-Protein mit kurzer Halbwertszeit sein, welches die Konzentration an SOD2-mRNA reguliert, oder ein Protein mit RNase-Aktivität. Durch Hemmung der Proteinsynthese würde die durch diese Proteine bewirkte Repression der SOD2-mRNA aufgehoben werden, was eine Akkumulation bzw. Superinduktion zur Folge hätte [Wen, 1989; Osborn, 1989]. Dieser Mechanismus der Regulation der SOD2-Genexpression wurde auch schon in einigen Veröffentlichungen beschrieben, wie bei der Behandlung von Lungenepithelzellen mit Lipopolysaccharid (LPS) [Visner, 1990] oder bei der Behandlung von HTE-Zellen mit Xanthin/Xanthin-Oxidase [Shull, 1991]. Dagegen werden in der Literatur für die Regulation der CAT-Genexpression verschiedene Mechanismen angenommen. Die Induktion der CAT-Genexpression durch Behandlung mit H_2O_2 in H4IIE-Zellen war von der Transkription und der Translation abhängig. In primären Rattenhepatozyten wurde dagegen eine Beteiligung der Transkription bei der turnover-Rate der CAT-mRNA postuliert. Regulatorische RNA-Moleküle oder Nukleasen scheinen dabei die Stabilität der CAT-mRNA zu beeinflussen [Röhrdanz, 1998]. In den Lungengewebe von neonatalen Ratten, die einer Hyperoxie ausgesetzt waren, wurde die Beteiligung eines redox-sensitiven mRNA-Bindungsprotein bei der Induktion der CAT-Genexpression vorgeschlagen [Clerch, 1995].

Untersuchungen in *E.coli* haben gezeigt, daß die zelluläre Antwort bei oxidativem Streß über das OxyR- und das SoxRS-Regulon kontrolliert wird, über die ein spezifisches Set an „defence“-Genen angeschaltet wird [Guyton, 1996; Hildago, 1994; Demple, 1991]. Durch H_2O_2 wird spezifisch das OxyR-Regulon aktiviert, wobei angenommen wird, daß dies durch eine direkte Oxidation und eine damit verbundene Konformationsänderung erfolgt [Storz, 1990]. Über das OxyR-Regulon wird die Expression der Katalase und 7 weiterer Gene reguliert, die die Zelle vor oxidativen Schäden schützen. Dagegen wird das SoxRS-Regulon spezifisch von $O_2^{\bullet -}$ aktiviert. Auch Xenobiotika, die über „Redox-Cycling“ ROS produzieren, wie z.B. Paraquat, aktivieren das SoxRS-Regulon [Schreck, 1992; Storz, 1990; 1992; Hildago, 1994]. Ähnliche Mechanismen wurden auch in Hefen entdeckt, wo die koordinierte Regulation über yAP1, yAP2 und MAC1 abläuft [Pahl, 1994]. Zwar wurde in Eukaryonten bis jetzt kein entsprechendes System nachgewiesen, doch existieren Hinweise, daß spezifische Transkriptionsfaktoren bzw. regulatorische Elemente bei der zellulären Antwort auf oxidativen Streß eine bedeutende Rolle spielen. So wurde in der 5'-Region der Glutathion-S-Transferase Ya-Untereinheit der Ratte und in der NAD(P)H:Chinon-Reduktase das „antioxidant-responsive element“ (ARE) identifiziert. Dieses „cis-acting“ regulatorische Element reagiert auf oxidativen Streß und ist für die Induktion der Genexpression dieser Enzyme durch H_2O_2 und phenolische Antioxidantien, die Redoxcycling eingehen, verantwortlich [Rushmore, 1991; Waleh, 1998]. Auch die Regulation der Aktivität zweier wichtiger Transkriptionsfaktoren, NF κ B und AP-1, erfolgt über Redoxmechanismen [Abate, 1990; Anderson, 1994; Meyer, 1994; Pinkus, 1996].

Der Transkriptionsfaktor NF κ B wurde als Kernprotein entdeckt, welches an einen Enhancer für die κ -Kette von Immunglobulinen in B-Lymphozyten bindet und dadurch dessen Transkription reguliert [Sen und Baltimore, 1986]. In inaktivem Zustand liegt NF κ B an ein

Inhibitorprotein I κ B gebunden im Cytoplasma vor. Auf ein Aktivierungssignal hin wird I κ B phosphoryliert und durch Proteasomen abgebaut. Das nun aktivierte NF κ B, ein p65/p50-Dimer, wandert in den Kern, bindet dort an seine Erkennungssequenz und induziert dadurch die Transkription seiner Zielgene [Schreck, 1992]. NF κ B wird durch viele verschiedene externe Stimuli aktiviert, bevorzugt aber durch Peroxide. Dies deutet darauf hin, daß NF κ B eher mit dem in Bakterien vorhandenen OxyR-System übereinstimmt als mit dem SoxRS-System. Somit können wahrscheinlich auch in Eukaryonten diese beiden Signalwege, Peroxid- oder O₂^{•-}-vermittelt, voneinander unterschieden werden [Schreck, 1992]. Im SOD2-Gen und im Thioredoxin-Gen wurden Bindungsstellen für NF κ B in der Nähe der Promoterregion identifiziert, so daß angenommen wird, daß diese Gene über NF κ B reguliert werden [Wong, 1988; Fujii, 1991; Holmgren, 1989; Tagaya, 1989].

Bei dem aktivierten Transkriptionsfaktor AP-1 handelt es sich auch um einen dimeren Proteinkomplex, dessen Komponenten Jun und Fos von den proto-Oncogenen *c-fos* und *c-jun* kodiert werden. Das Jun/Fos-Dimer interagiert mit spezifischen regulatorischen Elementen der DNA, wie mit dem „TPA responsive element“ (TRE) oder dem „cyclic-AMP responsive element“ (CRE), und induziert dadurch die Transkription seiner Zielgene [Meyer, 1994; Abate, 1990]. Wie NF κ B kann auch AP-1 durch viele Substanzen aktiviert werden. Devary et. al. wiesen eine schwache Aktivierung von AP-1 in HeLa-Zellen durch H₂O₂ nach [Devary, 1991]. Pinkus et. al. konnten durch Chinone und durch eine GSH-Depletion AP-1 schwach aktivieren [Pinkus, 1996]. Andere Arbeitsgruppen konnten dagegen eine starke Aktivierung von AP-1 nur mit Antioxidantien, wie z.B. N-Acetylcystein, erzielen [Meyer, 1994; Abate, 1990]. Welche Rolle nun AP-1 in der zellulären Antwort auf oxidativen Streß und insbesondere bei der Regulation der antioxidativen Enzyme spielt, ist noch unklar. Neuere Arbeiten haben gezeigt, daß auch weitere Faktoren, die bei der Genexpression eine Rolle spielen, wie z.B. Ets, Sp-1, egr-1 und AhR/ARNT, über Redoxmechanismen reguliert werden [Sun, 1996]. In der 5'-Region des hMTH1-Gens, welches die 8-oxo-dGTPase kodiert, wurden in der Nähe der Initiationsstelle der Transkription Bindungsstellen für Ets und Sp-1 nachgewiesen [Oda, 1997]. Dies deutete darauf hin, daß bei der Regulation der Transkription der hMTH1-Genexpression Ets und Sp-1 beteiligt sein könnten. Da aber *in vitro* Studien zu dem Schluß führten, daß Oxidationsmittel (H₂O₂) die Bindung von Ets und Sp-1 an die DNA verringern [Wasylyk, 1993; Ammendola, 1994], stellt sich die Frage, in welchem Zusammenhang diese Ergebnisse mit der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Induktion der Genexpression durch Oxidationsmittel (H₂O₂, Paraquat, Xanthin/Xanthin-Oxidase) stehen.

Obwohl die verschiedenen eingesetzten Oxidantien nicht immer eine Induktion der Genexpression hervorriefen, war dennoch eine Erhöhung der Enzymaktivität nachweisbar. Eine Ausnahme bildete die in Jurkat-Zellen beobachtete Induktion der hMTH1-Genexpression durch Paraquat, die nicht mit einer Erhöhung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität einherging. Dies deutet darauf hin, daß die antioxidativen Enzyme nicht nur über die Transkription sondern auch über post-transkriptionelle Mechanismen reguliert werden. Denkbar wären eine gesteigerte

Proteinbiosynthese, eine Erhöhung der Proteinstabilität sowie post-translationale Modifikationen. Ursache für die Erhöhung der Genexpression ohne gleichzeitige Steigerung der Proteinmenge oder Enzymaktivität könnte eine translationale Blockade sein, die auch schon bei anderen antioxidativen Enzymen, wie z.B. CAT, diskutiert wurde [Czaja, 1994; Klausner, 1989]. Eine Beteiligung von ROS bei der Stimulation von Protein-Phosphorylierungen, wodurch es zu einer In- bzw. Aktivierung von Enzymen kommt, wurde in der Literatur bereits postuliert [Suzuki, 1997]. Neben Phosphorylierungen könnte auch die Oxidation von Sulfhydrylgruppen und eine damit verbundene Konformationsänderung zu einer Aktivitätssteigerung bzw. zu einer Verminderung führen. Ob Oxidationen oder Phosphorylierungen auch bei der In- bzw. Aktivierung der antioxidativen Enzyme eine Rolle spielen, ist bis dato noch nicht geklärt.

Erstaunlicher Weise wurden die antioxidativen Enzyme und die 8-oxo-dGTPase durch die Inkubation mit Fe(II) kaum beeinflusst. Dies ist insofern verwunderlich, da Fe(II) die Bildung des äußerst reaktiven Hydroxylradikals, welches für einen Großteil der oxidativen Schäden verantwortlich gemacht wird, katalysiert (Fenton-Reaktion). Auch für die hohe Zytotoxizität von Paraquat wird Fe(II) mitverantwortlich gemacht. So bewirkt Paraquat die Freisetzung von Fe(II) aus Ferritin [Ryan, 1992]. Diese Interaktion von Paraquat mit Fe-Komplexen wird neben dem Redoxcyclin als Ursache für den durch Paraquat induzierten oxidativen Streß in biologischen Systemen angesehen [Puntarulo, 1989; Burkitt, 1993]. Da in beiden Zellsystemen eine Abnahme des GSH-Spiegels mit zunehmender Fe(II)-Konzentration beobachtet wurde, kann davon ausgegangen werden, daß Fe(II) die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies induziert. Die geringe Induktion der antioxidativen Enzyme könnte damit erklärt werden, daß das Ausmaß der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Fe(II) gering ist und diese dann durch GSH abgefangen werden. Ob höhere Fe(II)-Konzentrationen, als die in dieser Arbeit verwendeten, zu einer Induktion führen würden, bleibt zu überprüfen. Strålin et. al. konnten im selben Konzentrationsbereich auch keine Induktion der antioxidativen Enzyme feststellen [Strålin, 1994].

Weitere Anhaltspunkte für eine zellspezifische Redoxregulation der antioxidativen Enzyme Katalase, Glutathion-Peroxidase und Superoxid-Dismutase sowie der 8-oxo-dGTPase ergeben sich aus den durchgeführten Untersuchungen mit den beiden Reduktionsmitteln Butylhydroxianisol (BHA) und N-Acetylcystein (NAC). In Jurkat-Zellen bewirkte BHA sowohl eine geringe Abnahme der Genexpression als auch eine Abnahme der Enzymaktivität aller untersuchten Enzyme. Die gleichzeitige leichte Zunahme des GSH-Gehaltes könnte durch das Abfangen der beim normalen Stoffwechsel anfallenden reaktiven Sauerstoffspezies durch BHA hervorgerufen worden sein. Im Gegensatz dazu wurde in Hautfibroblasten eine Oxidation von GSH durch BHA festgestellt. Bei hohen BHA-Konzentrationen war zudem ein deutlicher Anstieg der SOD-Aktivität zu verzeichnen, was als ein Anzeichen für die Bildung von Superoxid angesehen werden kann. BHA an sich hat keine O₂-aktivierenden Eigenschaften [Kahl, 1989; Nagai, 1996], sondern übt eher einen antioxidativen Effekt aus, indem es H₂O₂ abfängt, PhaseII-Enzyme induziert, PhaseI-Enzyme und die Lipidperoxidation inhibiert [Wattenberg, 1986; Yu, 1997]. Der Metabolismus von BHA führt aber neben Dimerisierungs-, Konjugations- und

O-Demethylierungsprodukten zur Bildung des tert-Butylhydrochinon [Verhagen, 1991]. Dieses kann durch Autoxidation ins tert-Butylchinon übergehen und somit in den Prozeß des Redoxcycling eintreten, wobei es verstärkt zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies kommt [Yu, 1997; Kahl, 1989; Schildermann, 1995]. So wurde in Rattenleber-Mikrosomen durch BHA eine 10fach gesteigerte Superoxidbildung nachgewiesen [Kahl, 1989]. Die in dieser Arbeit beobachteten Unterschiede nach Behandlung mit BHA könnten demnach durch den zellspezifischen Metabolismus verursacht worden sein. In den Jurkat-Zellen wird BHA offenbar nicht zum tert-Butylhydrochinon metabolisiert, sondern kann als Antioxidans fungieren, was sich im leicht erhöhten GSH-Gehalt und in der Abnahme der antioxidativen Enzyme widerspiegelt. Dagegen können Hautfibroblasten BHA metabolisieren, wodurch es zur Bildung von ROS kommt, was sich in der Oxidation von GSH und in der Zunahme der SOD-Aktivität widerspiegelt. Da allerdings die anderen antioxidativen Enzyme durch BHA nicht induziert wurden, wird angenommen, daß das Ausmaß des Redoxcyclings gering ist.

Wie erwartet, führte auch die Behandlung mit NAC zu einer Abnahme der CAT-, SOD- und GPx-Aktivität in beiden Zelltypen. Als Ursache hierfür werden die durch NAC erzeugten reduktiven Bedingungen angesehen. Frühere *in vitro* Untersuchungen haben gezeigt, daß NAC sowohl H_2O_2 , HOCl und $\bullet OH$ abfängt [Aruoma, 1989], als auch den GSH-Spiegel aufrechterhält. Dies kann entweder durch eine Steigerung der GSH-Syntheserate erfolgen, wobei allerdings NAC zuerst zum Cystein deacetyliert werden muß [Anderson, 1998], oder indirekt über die freie Sulfhydrylgruppe des NAC [Sprong, 1998]. Die leichte Zunahme des GSH-Gehaltes spricht für diese protektive Wirkung von NAC. Da in der Literatur darauf hingewiesen wird, daß NAC zu Interferenzen bei der GSH-Bestimmung mit DTNB führt, wurde dem Nullabgleich NAC zugesetzt.

Hohe NAC-Konzentrationen bewirkten bei den Hautfibroblasten, im Gegensatz zu den Jurkat-Zellen, eine leichte Erhöhung der SOD-Aktivität. Wird dabei zugrunde gelegt, daß eine Beteiligung von reaktiven Sauerstoffspezies, insbesondere H_2O_2 und $O_2\bullet^-$; als second messenger bei verschiedenen zellulären Prozessen diskutiert wird [Dreher, 1996], so könnte die SOD-Aktivitätssteigerung dazu dienen, den H_2O_2 -Spiegel, der durch NAC reduziert wird, aufrechtzuerhalten. Erstaunlicher Weise bewirkte die Behandlung von Jurkat-Zellen mit NAC eine Induktion der 8-oxo-dGTPase-Aktivität und der hMTH1-Genexpression. Dies konnte in den Hautfibroblasten nicht bestätigt werden. Kleine Thiole können sowohl als Antioxidantien, als auch als Pro-Oxidantien fungieren wobei ist die pro-oxidierende Wirkung von Übergangsmetallen abhängig ist [Munday, 1989; Nath, 1993; Park, 1994]. So können Thiole als e^- -Donor für die Metall-katalysierte Bildung von $\bullet OH$ dienen, die dann zur Schädigung von biologischen Strukturen führen. Ob dies die Ursache der beobachteten Induktion der 8-oxo-dGTPase ist, ist jedoch sehr fraglich, da keine weiteren Anzeichen für die Bildung von $\bullet OH$ festzustellen waren.

6.2.2 Funktion von GSH bei der Regulation

Die bisher diskutierten Ergebnisse deuten auf eine Redoxregulation der antioxidativen Enzyme Katalase, Glutathion-Peroxidase und Superoxid-Dismutase sowie der 8-oxo-dGTPase hin. Der Redoxhaushalt einer Zelle wird zum einen über die Kapazität der antioxidativen Enzyme reguliert und zum anderen über die Konzentrationen der nicht-enzymatischen Antioxidantien. Dabei nimmt Glutathion (GSH, γ -Glutamylcysteinylglycin) als wichtigstes zelluläres Antioxidans mit einer Konzentration von 0.5 – 10 mM [Sies, 1985; Anderson, 1997] eine Sonderstellung ein. Es ist nicht nur beim Metabolismus, Transport und der Katalyse (Coenzym) von Xenobiotika beteiligt, sondern hält die Sulfhydrylgruppen in Proteinen und die reduzierte Form weiterer Moleküle, wie z.B. Coenzym A und Cystein aufrecht. Daneben spielt es als Reduktionsäquivalent bei der DNA-Synthese eine wichtige Rolle und reguliert weitere Antioxidantien, wie z.B. Ascorbinsäure [Anderson, 1997 und 1998; Meister, 1983; Bailey, 1998; Knüppel, 1995]. Der „key-step“ bei der Synthese von Glutathion, der von der γ -Glutamylcystein-Synthetase katalysiert wird, kann durch spezifische Inhibitoren, wie z.B. Buthioninsulphoxim (BTSO), gehemmt werden. Dadurch kommt es zu einer Abnahme des GSH-Spiegels und zu einer Veränderung des Redoxhaushaltes der Zelle [Griffith, 1979; Griffith und Meister, 1979], der wiederum die antioxidativen Enzyme beeinflussen könnte.

Obwohl die Behandlung der Hautfibroblasten und Jurkat-Zellen für 24 h mit BTSO zu einer drastischen Abnahme des GSH-Gehaltes sogar bis unter das Detektionslimit führte (siehe 5.3.6), erwiesen sich sämtliche eingesetzte BTSO-Konzentrationen als nicht bis gering zytotoxisch. Daß eine akute GSH-Depletion nicht zwangsweise mit einer erhöhten Zytotoxizität verknüpft ist, wurde auch von anderen Arbeitsgruppen festgestellt [Meister, 1991; Spitz, 1991]. Diese Beobachtung könnte mit einer Aktivitätssteigerung der antioxidativen Enzyme erklärt werden, die die durch die GSH-Depletion hervorgerufene Imbalance im Redoxhaushalt der Zelle ausgleicht. Diese Hypothese konnte mit den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen bestätigt werden. Sowohl in den Jurkat-Zellen als auch in den Hautfibroblasten wurde nach Behandlung mit BTSO eine Aktivitätssteigerung der Katalase und der Superoxid-Dismutase nachgewiesen. Allerdings konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der CAT- bzw. SOD-Aktivität und der eingesetzten BTSO-Konzentration nur in Hautfibroblasten festgestellt werden (siehe 5.6.2). Auch die bei 0.1 mM BTSO leicht erhöhte GPx-Aktivität in Jurkat-Zellen könnte als eine Art Kompensation aufgefaßt werden. Der GSH-Verlust bei höheren BTSO-Konzentrationen wird vermutlich die Ursache der beobachteten GPx-Aktivitätsminderung sein, da das für die Enzymaktivität wichtige Co-Substrat entzogen wurde. Eine zeitabhängige Aktivitätszunahme der antioxidativen Enzyme nach akuter GSH-Depletion wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beobachtet. So wiesen Strålin et. al. eine 3fache Induktion der SOD2-Aktivität nach 4 Tagen in primären Hautfibroblasten nach. Die SOD1-Aktivität wurde nicht induziert [Strålin, 1994]. Im Gegensatz dazu konnte in HA1-Zellen (chin. Hamster Fibroblasten) nach 6 h keine Induktion der antioxidativen Enzyme nachgewiesen werden. Nach 12 h wurde nur eine Zunahme der SOD1-Aktivität beobachtet [Spitz, 1991]. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, daß die

koordinierte Regulation antioxidativer Proteine ein Merkmal von Säugetierzellen darstellt [Freeman, 1990].

Die in der aktuellen Arbeit nachgewiesene Induktion der Enzymaktivitäten durch GSH-Depletion korrelierte nicht mit einer entsprechenden Induktion der Genexpression. Zwischen der Expression der untersuchten Gene in den behandelten Zellen und in den unbehandelten Zellen konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Sämtliche berechneten Induktionsfaktoren schwankten somit um den Wert 1 (siehe 5.3.6). Daraus wird ersichtlich, daß zum einen die nachgewiesene Steigerung der Enzymaktivitäten durch post-transkriptionelle Modifikationen erfolgen muß. Neben einer Regulation auf translationaler Ebene durch Erhöhung der Proteinsyntheserate wäre auch eine Regulation auf post-translationaler Ebene denkbar (siehe 6.2.1). Zum anderen scheint für die Induktion der Genexpression der antioxidativen Enzyme GSH nötig zu sein. Untersuchungen der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1, von denen angenommen wird, daß sie an der differenzierten Regulation der Genexpression der antioxidativen Enzyme beteiligt sind, zeigten, daß zwar eine Verminderung des GSH-Spiegels für die Aktivierung von AP-1 nötig ist [Pinkus, 1996], daß aber eine optimale Aktivierung von NF κ B nur in Gegenwart von GSH erzielt werden kann [Ginn-Pease, 1996]. Die gestörte Genexpression könnte auch Ursache der bei chronischer Gabe von BTSO beobachteten drastischen Abnahmen der CAT-, GPx- und SOD-Aktivitäten [Thanislass, 1995] und einer damit verbundenen Schädigung der Mitochondrien sein [Martenson, 1989 und 1991].

Im Gegensatz zu den klassischen antioxidativen Enzymen Katalase, Glutathion-Peroxidase und Superoxid-Dismutase bewirkte die GSH-Depletion keine Induktion der 8-oxo-dGTPase-Aktivität. Dies ist insofern verwunderlich, da auch für die 8-oxo-dGTPase im Rahmen dieser Arbeit eine Redoxregulation angenommen wurde. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß GSH nicht nur an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist [Kosower, 1978], sondern auch, daß eine GSH-Depletion durch BTSO zu einer Inhibition der Zellproliferation [Poot, 1988a,b] führt. Diese Inhibition ist die Folge eines permanenten Arrestes in der späten G2-Phase des Zellzyklus. Für einen vollständigen Durchlauf der G2- und S-Phase wurde die Notwendigkeit einer de novo Synthese von GSH postuliert [Poot, 1995]. Die in NIH 3T3-Zellen verminderte DNA-Synthese nach GSH-Depletion durch BTSO [Shaw, 1986; Chou, 1986] und ein veränderter Nukleotidpool in Lymphozyten [Kavanagh, 1990] führten zu der Schlußfolgerung, daß der essentielle Schritt der DNA-Synthese, der von der Ribonukleotid-Reduktase katalysiert wird, von GSH abhängig ist. Wird durch BTSO GSH depletiert, ist ein Durchlaufen des Zellzyklus nicht mehr möglich [Poot, 1995]. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse aus den Inhibitionsstudien deuten bereits auf eine Regulation der 8-oxo-dGTPase in Abhängigkeit vom Zellzyklus hin. Somit könnte die hier beobachtete fehlende Induktion der 8-oxo-dGTPase-Aktivität als Folge einer Inhibition der Zellproliferation aufgefaßt werden. Ob die durch BTSO hervorgerufene GSH-Depletion auch die Zellproliferation in Jurkat-Zellen und Hautfibroblasten hemmt, müßte in weiteren Untersuchungen erst noch nachgewiesen werden, zumal neuere Untersuchungen in

Mausfibroblasten gezeigt haben, daß eine Behandlung mit BTSO nicht automatisch zu Veränderungen in der DNA-Synthese und in der Zellproliferation führen müssen [Spyron, 1996].

6.2.3 Mediator-vermittelte Induktion

Eine Reihe von physiologischen Effekten, wie Entzündungen, Cachexia, septischer Schock und Zytotoxizität wird durch die Wechselwirkung des Zytokins Tumornekrosefaktor α (TNF α), welches von aktivierten Monozyten und Makrophagen freigesetzt wird [Vasalli, 1992], mit spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche hervorgerufen [Heller, 1994]. Der Mechanismus der durch TNF α induzierten Zytotoxizität ist noch nicht vollständig aufgeklärt, aber es wird angenommen, daß die durch TNF α bedingte erhöhte Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies ($O_2^{\bullet-}$ und H_2O_2) eine wesentliche Rolle dabei spielt [Beyart, 1994; Matthews, 1987; Burdon, 1996]. Dabei wird die Anfälligkeit bestimmter Zellen gegenüber TNF α von der Kapazität der antioxidativen Enzyme Katalase, Superoxid-Dismutase und Glutathion-Peroxidase bestimmt [Wong, 1988].

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen haben gezeigt, daß die eingesetzten TNF α -Konzentrationen sowohl für Jurkat-Zellen als auch für primäre humane Hautfibroblasten nicht zytotoxisch waren (siehe 5.3.7). Die Ursache hierfür könnte im Vergleich zu den Neutrophilen in der geringen Produktion von ROS in Fibroblasten nach Stimulation mit TNF α [Meier, 1989] und in der Kapazität der antioxidativen Enzyme liegen. Für eine geringe Produktion reaktiver Sauerstoffspezies nach Stimulation mit TNF α spricht, daß die in beiden Zellsystemen beobachtete Abnahme des GSH-Gehaltes gering war im Verhältnis zu der, die mit H_2O_2 oder $O_2^{\bullet-}$ nachgewiesen wurde.

Obwohl die Ergebnisse aus den GSH-Messungen auf eine, wenn auch geringe, Bildung von ROS hindeuten, konnte bei den Jurkat-Zellen nur eine geringe Induktion der CAT-Aktivität und CAT-Genexpression sowie der SOD-Aktivität und SOD2-Genexpression nachgewiesen werden (siehe 5.3.7.1). In den Hautfibroblasten wurde zwar bei 10 ng TNF α eine leichte Erhöhung der Glutathion-Peroxidase festgestellt, aber nur für die SOD2-Genexpression und die SOD-Aktivität eine konzentrationsabhängige Induktion beobachtet (siehe 5.3.7.2). Diese spezifische Induktion der SOD2-Genexpression wurde auch von einigen anderen Arbeitsgruppen in unterschiedlichen Zellsystemen festgestellt [Wong, 1988; Visner, 1990]. Allerdings korrelierte sie nicht immer mit einer SOD2-Aktivitätssteigerung. So wurde eine spezifische Zunahme der SOD2-Aktivität in Fibroblasten nach Stimulation mit TNF α , deren Maximum bei 1 ng/ml lag, festgestellt [Marklund, 1992], wohingegen in MCF7-Zellen zwar eine Induktion der SOD2-Genexpression, aber keine Zunahme der SOD-Gesamtaktivität durch Stimulation mit TNF α festgestellt werden konnte [Briehl, 1997]. Ursache für diese spezifische Induktion der SOD2 könnte eine durch TNF α stimulierte Produktion von $O_2^{\bullet-}$ speziell in den Mitochondrien sein [Hennet, 1993; Goossens, 1995]. Diese Hypothese wird durch die Tatsachen gestützt, daß zum einen Zellen, deren SOD2-Synthese oder SOD2-Induktion blockiert wurde, wesentlich empfindlicher auf TNF α reagieren. Wohingegen eine Überproduktion der SOD2 die Empfindlichkeit der Zellen

gegenüber $\text{TNF}\alpha$ herabsetzt [Wong, 1989]. Zum anderen konnte durch den Zusatz von Antioxidantien, wie NAC und BHA, die durch $\text{TNF}\alpha$ bedingte Zytotoxizität vermindert werden [Matthews, 1987; Brekke, 1994]. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, daß $\text{TNF}\alpha$ zwar SOD2 spezifisch induziert, aber die $\text{O}_2^{\bullet-}$ -Produktion in Mitochondrien nicht stimuliert [Gardner, 1996]. Eine mögliche Erklärung für diese paradoxe Beobachtung liefern Liochev und Fridovich [Liochev und Fridovich, 1997]:

$\text{TNF}\alpha$ induziert die Aktivität der Phospholipase A_2 [Levrat, 1996], wodurch es zu einer verstärkten Freisetzung von Arachidonsäure aus der Zellmembran kommt. Die Arachidonsäure kann entweder durch die Cyclooxygenase weiter metabolisiert werden oder durch die Lipoxygenase zum korrespondierenden Lipidhydroperoxid oxidiert werden [Chang, 1992]. In Gegenwart von Fe(II) , welches aus $[4\text{Fe-4S}]$ -Clustern von Dehydratasen durch die Wirkung von $\text{O}_2^{\bullet-}$ stammt [Liochev, 1996], wird das Lipidhydroperoxid in einer Art Fenton-Reaktion zum entsprechenden Alkoxyradikal umgesetzt, welches die Lipidperoxidation initiieren kann [Tappel, 1972]. Durch Induktion der SOD2 wird die Freisetzung von Fe(II) durch $\text{O}_2^{\bullet-}$, welches verstärkt bei der mitochondrialen Respiration anfällt, herabgesetzt. Diese Hypothese wird durch die Beobachtungen gestützt, daß zum einen Eisenchelatoren und zum anderen Inhibitoren der mitochondrialen Respiration zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber $\text{TNF}\alpha$ führten [Schulze-Osthoff, 1992]. Die in den Jurkat-Zellen und Hautfibroblasten beobachtete Oxidation von GSH und die bei 10 ng $\text{TNF}\alpha$ erhöhte Glutathion-Peroxidase-Aktivität in Hautfibroblasten könnte im Sinne der oben beschriebenen Hypothese als Folge einer vermehrten Produktion von Lipidhydroperoxiden angesehen werden, die von der Glutathion-Peroxidase unter Oxidation von GSH abgebaut werden. Die Oxidation von GSH durch die Wirkung von $\text{TNF}\alpha$ wurde auch von anderen Arbeitsgruppen festgestellt [Marcho, 1991].

6.3 Differenzierung

Beim Prozeß der zellulären Differenzierung werden unreife, proliferierende Vorläuferzellen in ausgereifte, sich nicht mehr teilende Zellen mit je nach Zelltyp und Gewebe festgelegter Funktion umgewandelt. Dies ist mit einem Austritt aus dem Zellzyklus und dem Eintritt in einen alternativen Weg verknüpft, der zu einem anderen Phänotyp mit anderer Funktion führt [Barnard, 1993]. Es wurde postuliert, daß die zelluläre Differenzierung mit einer erhöhten ROS-Produktion (besonders H_2O_2 und $\text{O}_2^{\bullet-}$) und mit Veränderungen der enzymatischen und nicht-enzymatischen Antioxidantien verknüpft ist. Dies führt zu einer Verschiebung des Redoxhaushaltes der Zelle auf die stärker pro-oxidierende Seite [Sohal, 1986] und zu Modulationen der Genexpression [Allen, 1991]. So wurde in humanen Monozyten in vitro eine Zunahme der H_2O_2 -Konzentration während der Differenzierung festgestellt [Nakagawara, 1981]. Bernard et. al. zeigten, daß zu Beginn der Differenzierung der GSH-Spiegel drastisch abnahm und folgerten daraus, daß dies als Initiationsschritt anzusehen sei [Bernard, 1997].

Ein in der Literatur häufig verwendetes Modellsystem zum Studium der zellulären Differenzierung stellt die Zelllinie HT29 dar. Die HT29-Zellen werden mit den intestinalen Stammzellen gleichgesetzt, aus denen sich die unterschiedlichen Phänotypen, absorbierende Enterozyten, Lysozym-produzierende Paneth-Zellen, Mucin-produzierende Goblet-Zellen und enteroendokrine Zellen, entwickeln [Velcich, 1995]. Kurzkettige Fettsäuren, die aus nicht absorbierten Kohlenhydraten durch Fermentation im Darmlumen von den anaeroben Darmbakterien gebildet werden, stellen die wichtigste Energie- und Kohlenstoffquelle von Kolonepithelzellen (wie HT29-Zellen) dar. Sie liegen in einer Konzentration von 100 – 240 mM in der wäßrigen Phase vor, wobei sich der Hauptanteil aus C4-Ketten meist n-Butyrat (~ 90%) zusammensetzt. *In vivo* und *in vitro* Studien haben gezeigt, daß diese kurzkettigen Fettsäuren eine wichtige Rolle bei der zellulären Differenzierung spielen [Heerdt, 1991]. Als Ursachen hierfür werden zum einen eine veränderte Glykosylierung von bestimmten Glykoproteinen auf der Zelloberfläche [Wice, 1985] diskutiert. Damit könnte auch die Differenzierung von HT29-Zellen nach Veränderung der Kohlenstoffquelle, wie z.B. durch den Zusatz von Galaktose [Pinto, 1982] oder die Kultivierung ohne Glucose und Fructose [Wice, 1985] erklärt werden. Zum anderen moduliert Natriumbutytrat die Expression von Genen, die für das Zellwachstum nötig sind [Barnard, 1993]. So wurde in Caco2-Zellen, die mit Natriumbutytrat behandelt wurden, eine veränderte c-myc-Genexpression durch einen post-translationalen Abbau der mRNA nachgewiesen [Soulemani, 1993]. Das Proto-Oncogen c-myc kodiert für einen Transkriptions-faktor, der an der Regulation der Proliferation sowie der Differenzierung beteiligt ist. So bewirkt das Myc-Protein ein Fortschreiten der Zelle im Zellzyklus, wodurch die Proliferation gefördert und die Differenzierung blockiert wird [DePinho, 1991]. Daneben wurde die Hypothese aufgestellt, daß es spezifische „Regulons“ gibt, die die zelluläre Differenzierung steuern [Blau, 1991]. Solche Regulons sind aber bis jetzt noch nicht in Kolonepithelzellen identifiziert worden, aber es gibt Hinweise auf „cis-acting“-Sequenzen [Gordon, 1989].

Die zelluläre Differenzierung der HT29-Zellen, die erst nach Erreichen der Konfluenz auftritt [Zweibaum, 1991], ist - abhängig vom eingesetzten Agens - durch charakteristische morphologische und biochemische Veränderungen charakterisiert [Kim, 1980; Velcich, 1995]. Durch eine Behandlung von HT29-Zellen mit 5-Fluorouracil differenzieren diese zum Goblet-Phänotyp, der durch eine erhöhte Mucinsekretion charakterisiert ist. Dies wurde durch eine verstärkte Genexpression von Muc2 und Muc3 nachgewiesen [Lesuffleur, 1991; Velcich, 1993 und 1995]. Dagegen bewirkt Natriumbutytrat eine Differenzierung zum Enterozyten-Phänotyp, der durch die Aktivität und Genexpression spezifischer Enzyme des Bürstensaums charakterisiert ist. Dies spiegelt sich in einer erhöhten von CEA- und ALP-Genexpression und einer gesteigerten ALP-Aktivität wieder [Niles, 1988; Saini, 1990; Tsao, 1982 und 1983; Gum, 1987; Morita, 1982; Schroy, 1994; Heerdt, 1994; Barnard, 1993].

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigten, daß der Prozeß der zellulären Differenzierung mit Veränderungen der Genexpression und Aktivität der antioxidativen Enzyme, aber nicht der 8-oxo-dGTPase verknüpft ist. Zu Beginn der zellulären Differenzierung konnte

eine Erhöhung der SOD- und der GPx-Aktivität nachgewiesen werden. Im Falle der GPx war dies auch mit einer Steigerung der GPx-Genexpression verbunden (siehe 5.33). In HT29-Zellen, die mit 5-Fluorouracil (FUra) behandelt worden waren und die als FUra-adaptierte Zellen während des Wachstum differenzieren, wurde ebenfalls eine Induktion der GPx- und SOD2-Aktivität festgestellt [Bravard, 1994]. Die Induktion dieser beiden Enzyme könnte durch eine erhöhte Produktion von $O_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 bedingt worden sein, wie sie für die zelluläre Differenzierung postuliert wurde. Daneben stellten Hachiya et. al. die Hypothese auf, daß die Zunahme der Größe und Anzahl von Mitochondrien während der zellulären Differenzierung als Ursache für die Induktion mitochondrialer Enzyme, wie z.B. der SOD2, angesehen werden kann [Hachiya, 1997]. Vollständig ausdifferenzierte HT29-Zellen zeichneten sich durch eine erhöhte SOD2-, CAT- und GPx-Aktivität aus (siehe 5.35), was für eine Anpassung an den stärker pro-oxidierenden Redoxhaushalt, der für differenzierte Zellen postuliert wurde, spricht. Dagegen konnte nur für die CAT- und die GPx-Genexpression eine geringe, aber statistisch signifikante Induktion nachgewiesen werden (siehe 5.34). Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß während der zellulären Differenzierung die SOD auf post-transkriptioneller Ebene und die CAT und die GPx auch auf transkriptioneller Ebene reguliert werden. Ob diese Induktion der Genexpression über Natriumbutyrat-responsive Elemente in der Promoterregion, wie sie z.B. für das ALP-Gen bereits vermutet wurde [Deng, 1992], abläuft oder über andere Mechanismen bleibt zu überprüfen. In Caco2-Zellen, die aus einem Kolon-Adenokarzinom isoliert worden waren und ebenfalls zu Enterozyten differenzieren können, wurde auch eine Aktivitätssteigerung dieser Enzyme nachgewiesen. Eine Erhöhung der Genexpression konnte dagegen nur für die CAT festgestellt werden [Baker, 1997]. Dies könnte durchaus zellspezifische Ursachen haben. Stein et.al zeigten, daß auch die Glutathion-S-Transferase, ein weiteres wichtiges Enzym der Detoxifizierungs-maschinerie, durch Natriumbutyrat in Caco2-Zellen induziert wird [Stein, 1996]. Diese Stimulation der antioxidativen Enzyme sowie die Stimulation der DNA-Reparatur und des Energie-turn-overs wird als Ursache für die durch Natriumbutyrat bedingte geringere Empfindlichkeit von Kolonzellen gegenüber H_2O_2 angesehen [Abrahamse, 1999].

Obwohl die Aktivitätssteigerung der antioxidativen Enzyme für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies spricht, wurde die 8-oxo-dGTPase nicht beeinflußt. Dies könnte daran liegen, daß der Prozeß der zellulären Differenzierung mit einem Austritt aus dem Zellzyklus verknüpft ist. So bewirkt Natriumbutyrat einen Stop in der G1-Phase des Zellzyklus [Winterberger, 1983]. Wie schon die vorangegangenen Versuche gezeigt haben, scheint aber die Genexpression der 8-oxo-dGTPase mit dem vollständigen Durchlaufen durch den Zellzyklus verknüpft zu sein. Dies könnte im Zusammenhang mit der auf dem hMTH1-Gen nachgewiesenen Ets-Bindungsstelle in der Nähe der Initiationsstelle stehen. Die Familie der Ets-Transkriptionsfaktoren spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der Transkription im Zusammenhang mit verschiedenen mitogenen Signalen [Hipskind, 1991; Lai, 1992, Dhulipal, 1997].

6.4 Tumorpromotion

Die beiden Tumorpromotoren TPA und TCDD üben, wie die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche an primären Rattenhepatozyten gezeigt haben, einen unterschiedlichen Einfluß auf die hMTH1-Genexpression und die 8-oxo-dGTPase-Aktivität aus. Während mit TPA keine statistisch signifikante Induktion der 8-oxo-dGTPase erzielt werden konnte, bewirkte TCDD eine von der eingesetzten Konzentration abhängige Induktion sowohl der hMTH1-Genexpression als auch der 8-oxo-dGTPase-Aktivität. Die maximale Induktion wurde dabei nach 24 h Behandlungsdauer festgestellt. Dieser Unterschied ist insofern erstaunlich, da die bisher diskutierten Ergebnisse dieser Arbeit auf eine Regulation der 8-oxodGTPase in Abhängigkeit vom Redoxhaushalt und mitogenen Signalen hindeuten und es in der Literatur für beide Tumorpromotoren zahlreiche Hinweise für die Erzeugung von oxidativen Streß und eine Stimulation der Zellproliferation gibt. So stellten Stohs et. al. eine Zunahme der Lipidperoxidation, eine Abnahme von GSH und der Membranfluidität sowie eine Zunahme an DNA-Strangbrüchen in der Leber von Ratten, die mit TCDD behandelt worden waren, fest [Stohs, 1990]. Nohl et. al. wiesen einen durch TCDD induzierten erhöhten Spiegel an H_2O_2 und $\text{O}_2^{\bullet}$ in Mitochondrien nach [Nohl, 1989]. PLC-Zellen (Makrophagenvorläufer) wurden durch TCDD in Abhängigkeit zur eingesetzten Konzentration und Zeit zur $\text{O}_2^{\bullet}$ -Produktion angeregt [Alsharif, 1994]. In primären Rattenhepatozyten wurde durch TCDD *in vitro* das Wachstum stimuliert [Schrenk, 1992; Wölflle, 1993]. Auch TPA stimulierte die intrazelluläre ROS-Produktion [Trush, 1991], was sich auch in einer Zunahme des GSSG-Gehaltes widerspiegelte [Perchellet, 1986]. Daneben inhibierte TPA die Aktivität der klassischen antioxidativen Enzyme, wie CAT, SOD und zum Teil auch GPx [Solanki, 1981; Nakamura, 1988].

Es wird angenommen, daß der koordinierte Verlust von SOD und CAT dabei nicht über eine durch TPA bedingte down-Regulation der entsprechenden Gene erfolgte, sondern über einen Stabilitätsverlust der mRNA [Amstad, 1990]. Dieser pro-oxidierende Status, der initiierte Zellen zum neoplastischen Wachstum stimuliert [Sun, 1990], wird unter anderem bei der promovierenden Wirkung von TPA diskutiert, ist aber wahrscheinlich nicht ausschlaggebend [Fischer, 1987]. Eine Erklärung für den dennoch beobachteten Unterschied hinsichtlich der Induktion der 8-oxo-dGTPase könnten die unterschiedlichen Signalkaskaden liefern, die durch TPA bzw. TCDD ausgelöst werden.

Derzeit wird angenommen, daß der Wirkmechanismus von TCDD auf einem rezeptorvermittelten Prozeß beruht, der in **Abbildung 6-1** schematisch dargestellt ist. TCDD und andere planare Moleküle, die eine Fläche von $1.0 \times 0.3 \text{ nm}$ bzw. $1.4 \times 0.7 \text{ nm}$ besitzen, binden an einen cytosolischen Rezeptor, dessen physiologische Funktion noch nicht bekannt ist. Aufgrund seiner hohen Affinität zu polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen wurde dieser Rezeptor Ah-Rezeptor (Aryl Hydrocarbon Rezeptor) genannt [Oesch, 1994]. Im Cytoplasma ist der Ah-Rezeptor mit den Heatshock-Proteinen Hsp 50, 70, 90, der c-Src-Tyrosin-Kinase sowie mit weiteren noch unbekannten Proteinen assoziiert [Enan, 1996; Matsumara, 1994]. Diese werden durch die Bindung von TCDD an den Ah-Rezeptor abgespalten und können ihrerseits

weitere Signalkaskaden aktivieren. Der TCDD/Ah-Rezeptorkomplex wandert in den Kern und dimerisiert dort mit dem ARNT-Protein (**A**h-**R**ezeptor **N**uclear **T**ranslocator) [Oesch, 1994; Enan, 1996]. Dieses Heterodimer ist dann in der Lage, die spezifische DNA-Sequenz 5'-GCGTG-3', die DRE (**D**ioxin **R**esponsive **E**lement) oder auch XRE (**X**enobiotic **R**esponsive **E**lement) genannt wird und in den DNA-Promoterregionen verschiedener Gene lokalisiert ist, zu erkennen und daran zu binden. Dadurch wird die Expression dieser Gene entweder induziert, wie z.B. die Cytochrom P450 Enzyme (Cyp1A1, Cyp1A2), die Glutathion-S-Transferase (GST) und die NAD(P)H:Menadion-Reduktase (Nmo-1), oder reduziert, wie z.B. Phosphoenolpyruvat Carboxykinase [Nebert, 1990; Marotzki, 1997].

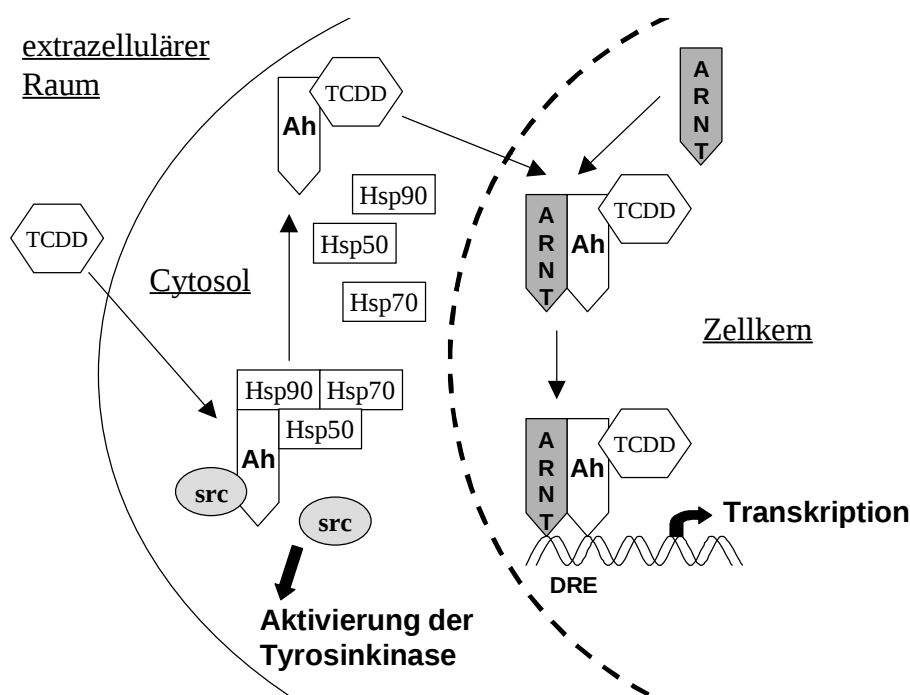


Abb. 6-1: Schematische Darstellung der von TCDD induzierten Signalkaskaden

Eine besondere Bedeutung scheint die mit dem Ah-Rezeptor assoziierte c-Src-Tyrosinkinase zu besitzen, die nach Bindung von TCDD an den Ah-Rezeptor über noch unbekannte Mechanismen aktiviert wird [Enan, 1996]. Dieser Kinase wird eine zentrale Rolle bei Signaltransduktionen von Proliferationsprozessen zugeschrieben [Matsumura, 1994]. So bewirkt eine Aktivierung der c-Src-Tyrosin-Kinase eine Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinase cdc2 [Taylor, 1993]. Diese ist mit dem Cyclin A assoziiert, welches für die Progression der S-Phase und der G2-Phase während des Zellzyklus nötig ist [Shackelford, 1999]. Nachfolgend und zeitlich verzögert werden auch Serin-Threonin-Kinasen, wie z.B. der Proteinkinase C (PKC), aktiviert, die weitere Signalkaskaden über Protein-Phosphorylierungen aktivieren [Matsumura, 1994].

Der Wirkmechanismus von TPA basiert auf der Ähnlichkeit von TPA und anderen Phorbolestern mit Diacylglycerin (DAG). Die Struktur von TPA ist in **Abbildung 6-2** wiedergegeben. DAG ist ein wichtiger intrazellulärer Messenger der Phosphoinositidkaskade, die in vielen Zelltypen eine Fülle von Antworten auslöst. So wird z.B. die Histaminsekretion durch Mastzellen auf diesem Wege gesteuert [Stryer, 1988]. Die Funktion des DAG besteht unter anderem darin, die Protein-Kinase C (PKC) zu aktivieren. Dieses 77-kd-Enzym setzt sich aus einer katalytischen und einer regulatorischen Domäne zusammen. Die Bindung von DAG hebt die Hemmung auf, die der regulatorische Teil des Enzyms bewirkte, und hebt die Ca^{2+} -Affinität stark an, wodurch dieses Enzym bei physiologischen Ca^{2+} -Konzentrationen aktiv wird [Berridge, 1984; Huang, 1990; Farago, 1990]. Die aktivierte PKC phosphoryliert Serin- und Threoninreste in vielen Zielproteinen und löst dadurch weitere Signalkaskaden aus. Unter anderem wird durch die PKC die S6-Kinase aktiviert, die bei der Zellproliferation eine Rolle spielt [Larsson, 1988]. Auch einige für den Zellzyklus wichtige Cyclin-abhängige Kinasen werden durch PKC aktiviert [Shackelford, 1999], wodurch die Zellteilung stimuliert wird. Daneben ist die PKC auch an Phosphorylierungskaskaden beteiligt, die zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren führen. Diese beeinflussen die Expression von Genen, die für die Steuerung der Proliferation und den Zelltod verantwortlich sind [Dreher, 1996].

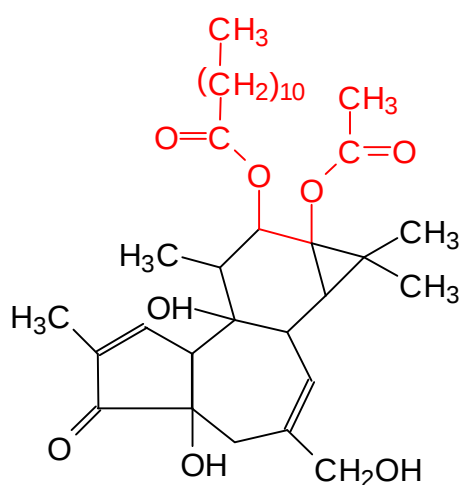


Abb. 6-2: Struktur von 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA)
Die farblich markierte Region im Molekül soll die Strukturähnlichkeit mit Diacylglycerin (DAG) verdeutlichen.

Der Unterschied zwischen der von TCDD und TPA ausgelösten Signalkaskaden besteht zum einen darin, daß nur TCDD über einen direkten Weg die Expression bestimmter Gene induzieren kann (Kerntranslokations-Modell). Zum anderen beeinflussen sowohl TCDD als auch TPA die Genexpression über einen indirekten Weg, indem beide spezifische Protein-Kinasen aktivieren.

Dabei aktiviert TCDD nicht nur wie TPA die PKC, sondern primär die c-Src-Tyrosin-Kinase. Da es keine Hinweise dafür gibt, daß die 8-oxo-dGTPase ein Bestandteil der „Ah Gene Battery“ ist, kann die durch TCDD bedingte Stimulation der hMTH1-Genexpression nur über indirekten Wege erfolgt sein. Oda et. al. vermuteten, daß an der Regulation der hMTH1-Genexpression die beiden Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Sp1 beteiligt sind, da sie in der Nähe der Promoterregion entsprechende Bindungssequenzen nachweisen konnten [Oda, 1997]. Studien über die Funktion der Ets-Oncogene führten zu dem Schluß, daß die Ets-Proteine nur unter bestimmten Voraussetzungen die Genexpression induzieren können [Dhulipal, 1997]. So scheint eine Kooperation mit anderen gebundenen Transkriptionsfaktoren für eine transkriptionelle Aktivierung erforderlich zu sein. Solche Protein-Protein Interaktionen wurden unter anderem zwischen Ets-1 und Sp-1 nachgewiesen [Gegonne, 1993]. Daneben spielen offenbar auch Phosphorylierungen eine wichtige Rolle. So konnte zwar auch das nicht-phosphorylierte Ets-1 Protein an die entsprechende DNA-Sequenz binden, aber nur das phosphorylierte Ets-1 Protein stimulierte auch die Transkription. Interessanter Weise scheint die Phosphorylierung von Ets-1 zwar von Ca^{2+} abhängig zu sein, erfolgt aber nicht nach Aktivierung der Protein-Kinase C [Koizumi, 1990; Murakami, 1993]. Da, im Gegensatz zu TPA, TCDD auch die c-Src-Tyrosin-Kinase aktiviert, könnte über diesen Weg Ets-1 phosphoryliert worden sein, was zu einer Stimulation der hMTH1-Genexpression führte. Ob dabei die Tyrosin-Kinase direkt Ets-1 phosphoryliert oder indirekt über weitere Protein-Phosphorylierungskaskaden und welche Rolle Ca^{2+} dabei spielt, bleibt zu überprüfen.

6.5 Offene Fragen und Ausblick

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche sprechen für eine differenzierte Redoxregulation der klassischen antioxidativen Enzyme Katalase, Glutathion-Peroxidase und Superoxid-Dismutase sowie der 8-oxo-dGTPase. Obwohl für den Abbau der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine enge Zusammenarbeit der antioxidativen Enzyme erforderlich ist, erfolgt die Regulation der einzelnen Enzyme nach unterschiedlichen Mechanismen. Die Regulation erfolgt dabei auf transkriptioneller, translationaler und post-translationaler Ebene. Auf transkriptioneller Ebene wird derzeit die Beteiligung von redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren diskutiert, die analog zu den in Prokaryonten nachgewiesenen OxyR und SoxR/S Regulons die koordinierte Regulation der Genexpression steuern [Schreck, 1992; Guyton, 1994]. So scheint die SOD2-Genexpression über den Transkriptionsfaktor NF κ B reguliert zu werden [Wong, 1988]. Ob NF κ B oder andere Transkriptionsfaktoren auch bei der transkriptionellen Regulation der anderen antioxidativen Enzymen eine Rolle spielen, bleibt zu überprüfen. Die Aufklärung der hMTH1-Genesequenz führte zu dem Schluß, daß die beiden Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Sp-1 die Genexpression kontrollieren könnten [Oda, 1997]. Da aber in *in vitro* Studien gezeigt werden konnte, daß Oxidationsmittel (H_2O_2) die Bindung von Ets und Sp-1 an die DNA verringern [Wasylyk, 1993; Ammendola, 1994], stellt sich die Frage, in

welchem Zusammenhang diese Ergebnisse mit der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Induktion der Genexpression durch Oxidationsmittel (H_2O_2 , Paraquat, Xanthin/Xanthin-Oxidase) stehen. Bei der Beantwortung dieser Frage sollte berücksichtigt werden, daß ROS viele verschiedene Signaltransduktionswege beeinflussen, wie z.B. die Ca^{2+} -Homöostase, Protein-Phosphorylierungen (Tyrosin- und Serin-Threonin-Kinasen und Phosphatasen), über die indirekt die Genexpression induziert werden könnte. So scheint die Aktivität des Transkriptionsfaktors Ets-1 von Ca^{2+} und Phosphorylierungen abhängig zu sein [Dhulipal, 1997].

Im Gegensatz zu den klassischen antioxidativen Enzymen ist die Regulation der 8-oxo-dGTPase nicht nur von ROS sondern auch von mitogenen Stimuli abhängig. Es stellte sich heraus, daß eine Induktion der 8-oxo-dGTPase nur bei vollständigen Durchlaufen des Zellzyklus erfolgte. Um herauszufinden, welche Phase des Zellzyklus entscheidend ist, sollte die hMTH1-Genexpression und die 8-oxo-dGTPase in Abhängigkeit vom Zellzyklus untersucht werden. Die Bedeutung der einzelnen Phasen dabei könnten durch gezielte Blockaden des Zellzyklus ermittelt werden.

Neben der Aufklärung des Regulationsmechanismus der 8-oxo-dGTPase ist auch die Entwicklung von Tiermodellen mit veränderter Enzymaktivität (hMTH1-knock-out Maus) erforderlich, um die Rolle und Funktion der 8-oxo-dGTPase bei der Kontrolle von spontanen Mutationen und bei der Kanzerogenese aufzuklären.

7 Zusammenfassung

Die zentrale Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, die humane 8-oxo-dGTPase bei oxidativem Streß, der zellulären Differenzierung und bei der Tumorpromotion im Hinblick auf ihre Genexpression und Enzymaktivität zu untersuchen und mit den klassischen antioxidativen Enzymen Katalase, Superoxid-Dismutase und Glutathion-Peroxidase, zu vergleichen. Diese Untersuchungen sollten einen Beitrag dazu leisten, den Regulationsmechanismus der humanen 8-oxo-dGTPase aufzuklären, um dadurch die Rolle und Funktion dieses Enzyms bei der Mutagenese und Kanzerogenese zu evaluieren.

Während des normalen zellulären Metabolismus entstehen eine Reihe von reaktiven Sauerstoffspezies, die, sofern sie nicht von den enzymatischen bzw. nicht-enzymatischen Antioxidanssystemen abgefangen werden, zu einer Schädigung der Makromoleküle führen können. Von besonderer Bedeutung für die Krebsentstehung sind oxidative Schädigungen der DNA und ihre fehlerhafte Reparatur, da sie die Mutationsrate erhöhen können und somit zur genetischen Instabilität führen. Die in dieser Arbeit untersuchte 8-oxo-dGTPase kommt von Bakterien bis zum Menschen in sämtlichen Organismen vor. Sie katalysiert den Abbau des Promutagens 8-oxo-dGTP, welches durch die Reaktion von dGTP mit reaktiven Sauerstoffspezies im Nukleotidpool der Zelle gebildet werden kann, zu 8-oxo-dGMP und verhindert dadurch die Bildung von A:T nach C:G und G:C nach T:A Transversionen, die durch Fehlpaarung von 8-oxo-dGTP während der DNA-Replikation oder DNA-Reparatur mit Adenin entstehen können.

Um die 8-oxo-dGTPase Enzymaktivität direkt aus dem Zellysat bestimmen zu können, galt es zunächst, ein geeignetes Testsystem zu entwickeln. Dafür wurden die Guanin-Nukleotide dGMP, dGDP und dGTP durch Verwendung von Ascorbinsäure/H₂O₂ als ROS-generierendes System direkt an C8-Position hydroxyliert. Die Abtrennung der jeweiligen 8-oxo-Derivate 8-oxo-dGMP, 8-oxo-dGDP und 8-oxo-dGTP aus dem Reaktionsgemisch und ihre Aufreinigung erfolgte per semipräparativer HPLC in zwei Schritten. Die erforderliche Trennung und Quantifizierung sämtlicher Guanin-Nukleotide und ihrer 8-oxo-Derivate gelang per HPLC (Ionenpaar-Chromatographie) mit Detektion im UV und elektrochemisch, wodurch auch Konzentrationsänderungen im Femtomolbereich erfaßt werden konnten. Diese Trennungsmethode ermöglicht neben einer äußerst sensitiven Bestimmung der 8-oxo-dGTPase Aktivität auch die Bestimmung anderer am Guanin-Nukleotid-Stoffwechsel beteiligter Enzyme. Als entscheidend für eine exakte Messung der 8-oxo-dGTPase-Aktivität stellte sich die Abtrennung der 8-oxo-dGTPase aus dem Zellysat per Filtration durch eine 30 kDa cut-off Membran heraus, da die im Zellysat vorhandenen Phosphatasen das Substrat 8-oxo-dGTP unspezifisch zu 8-oxo-dGDP abbauen,

welches, wie die Inhibitionsstudien zeigten, ein unkompetitiver Inhibitor der 8-oxo-dGTPase ist. Zur Charakterisierung der 8-oxo-dGTPase wurden die Molekülmasse, das pH-Optimum sowie die kinetischen Parameter (Maximalgeschwindigkeit, Michaelis-Menten-Konstante) der Enzymreaktion und die Halbwertszeit des Enzyms bestimmt.

Um den Einfluß von oxidativem Streß auf die Genexpression und Enzymaktivität der 8-oxo-dGTPase sowie der klassischen antioxidativen Enzyme zu untersuchen, wurden Jurkat-Zellen und primäre Hautfibroblasten mit acht verschiedenen Substanzen, die in den Redoxhaushalt der Zelle eingreifen, behandelt. Ebenso wie die klassischen antioxidativen Enzyme war auch die 8-oxo-dGTPase durch oxidativen Streß induzierbar, wobei zellspezifische und Oxidans-spezifische Unterschiede auftraten. Unterschiede im zeitlichen Verlauf der durch H_2O_2 bedingten Induktion von Genexpression und Enzymaktivität sowie die Oxidans-spezifischen Unterschiede lassen auf eine voneinander unabhängige Regulation der untersuchten Enzyme schließen, die, wie auch die Untersuchungen mit Actinomycin D und Cycloheximid gezeigt haben, auf der Ebene der Transkription erfolgt. Die aufgetretene Diskrepanz zwischen Enzymaktivität und Genexpression deuten auf post-transkriptionelle Regulationsmechanismen hin. Ob es sich dabei um eine gesteigerte Proteinbiosynthese, eine Erhöhung der Proteinstabilität oder post-translationale Modifikationen handelt, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Reduktive Bedingungen führten zu einer Repression der Genexpression und Enzymaktivität, was auf eine Redoxregulation der untersuchten Enzyme schließen läßt. Im Gegensatz zu den klassischen antioxidativen Enzymen korrelierten die nachgewiesenen Induktionen der Genexpression und der Enzymaktivität der 8-oxo-dGTPase mit der Zytotoxizität, d. h. unter zytotoxischen Bedingungen konnte eine Inhibition der Genexpression und eine Abnahme der Enzymaktivität bis hin zum Verlust der Aktivität nachgewiesen werden. Somit eignet sich die 8-oxo-dGTPase als ein Marker für oxidativen Streß.

Die Studien zur zellulären Differenzierung erfolgten in der humanen Zelllinie HT-29 als Modellsystem. Im Gegensatz zu den klassischen antioxidativen Enzymen wurde die 8-oxo-dGTPase nicht induziert. Offenbar spielt nicht nur eine Veränderung des Redoxhaushaltes der Zelle bei der Regulation der 8-oxo-dGTPase eine Rolle, sondern auch einzelne Phasen des Zellzyklus. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse aus den Inhibitionsstudien scheint das Durchlaufen der S-Phase für die Regulation entscheidend zu sein. Ob dies der Fall ist, bleibt zu überprüfen.

Der Einfluß der beiden Tumorpromotoren TCDD und TPA auf die Genexpression und die Enzymaktivität der 8-oxo-dGTPase wurde in primären Rattenhepatozyten untersucht. Obwohl für beide Tumorpromotoren bereits nachgewiesen wurde, daß sie oxidativen Streß erzeugen und

die Zellproliferation stimulieren, bewirkte nur TCDD in dem betrachteten Zeitintervall eine Induktion der 8-oxo-dGTPase-Genexpression und Enzymaktivität. Es wird angenommen, daß an der Regulation der 8-oxo-dGTPase spezifische Protein-Kinasen beteiligt sind, die über die durch TCDD induzierte Signalkaskade aktiviert werden.

Die vorliegenden Untersuchungen im Zellkultursystem haben gezeigt, daß die antioxidativen Enzyme, obwohl sie beim Abbau der reaktiven Sauerestoffspezies (ROS) eng zusammenarbeiten, durch verschiedenen Mechanismen auf der Ebene der Transkription und der Translation sowie post-translational reguliert werden. Unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse und den bereits in der Literatur bekannten Daten, kann für die Regulation der 8-oxo-dGTPase folgender Mechanismus postuliert werden:

Die Regulation der 8-oxo-dGTPase-Genexpression erfolgt wahrscheinlich über die beiden Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Sp-1, die in Abhängigkeit vom Redoxstatus der Zelle an die DNA binden und durch Phosphorylierung in Gegenwart von Ca^{2+} aktiviert werden. In diesem Zusammenhang bleibt festzuhalten, daß die Phosphorylierung nicht über die Proteinkinase C erfolgt, sondern wahrscheinlich über Tyrosin-Kinasen, die auch für die Progression des Zellzyklus nötig sind. Ob die Transkription der 8-oxo-dGTPase tatsächlich über diesen postulierten Mechanismus abläuft oder nicht und welche Rolle andere redox-sensitive Transkriptionsfaktoren, wie z. B. NF_κB , bei der Regulation der antioxidativen Enzyme spielen, bleibt in Zukunft zu klären.

8 Summary

The aim of this present study was to elucidate the involvement of human 8-oxo-dGTPase in carcinogenesis and mutagenesis. Therefore, the gene expression and enzyme activity of the human 8-oxo-dGTPase during oxidative stress, cellular differentiation and tumorpromotion was studied and compared with the gene expressions and enzyme activities of the antioxidative enzymes, such as catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase.

Reactive oxygen species (ROS) are continually formed during normal cellular metabolism. To minimize oxidative damage of important macromolecules, cells possess an antioxidative defense system, including enzymes as well as low molecular weight substrates. Oxidative damaged DNA and inadequate DNA repair processes play a pivotal role in carcinogenesis as leading to high mutation rate and genetic instability. 8-Oxo-dGTPase is an enzyme present in all organisms from bacteria to humans. It catalyzes the hydrolyzation of 8-oxo-dGTP, a promutagenic substrate derived from dGTP by reaction with oxygen radicals in the nucleotide pool of a cell, to 8-oxo-dGMP. During DNA replication or DNA repair synthesis 8-oxo-dGTP can pair with cytosine as well as with adenine at almost equal efficiency, leading to A:T to C:G and G:C to T:A transversions. Therefore, sufficient activity of 8-oxo-dGTPase is apparently necessary prerequisite for accurate DNA synthesis in replicating cells and for maintaining a low incidence of spontaneous mutations induced by oxidations.

To determine the 8-oxo-dGTPase activity in cultured cells a reliable enzymatic assay has to be developed. All the 8-oxo-dG-5'phosphates were prepared using the same procedure based on oxidation of the corresponding dG-5'-phosphates at C8-position by the oxygen radical generating system ascorbic acid / hydrogen peroxide. The 8-oxo-derivates were separated from parent compounds and byproducts from the reaction by a two step semipreparative HPLC purification. The dG-5'-phosphates and their corresponding 8-oxo-derivates were definitively separated by using ion-pairing chromatography (HPLC). For the detection and quantification of these compounds a UV-VIS detector and a highly sensitive electrochemical detector (detection limit: femtomol) was used. This application allows further studies of the 8-oxo-dGTPase as well as other enzymes involved in the metabolic pathway of guanine nucleotides. Upon incubation with cell extracts, 8-oxo-dGTP is hydrolyzed by unspecific phosphatases to 8-oxo-dGDP. This activity drastically lowers the substrate concentration for the 8-oxo-dGTPase in the reaction mixture. Moreover, 8-oxo-dGDP is a strong inhibitor of the 8-oxo-dGTPase activity. In order to be accurately determined, the 8-oxo-dGTPase must be separated from the cell extract by using a 30 kDa cut-off ultrafiltration membrane. To characterized the 8-oxo-dGTPase the molecular mass, the pH-optimum as well as the kinetic parameters, such as $v_{\max}$ and K_M , of the enzymatic reaction and the enzyme stability were determined.

The response of the enzyme activity and gene expression of the 8-oxo-dGTPase, as well as of the antioxidative enzymes, to oxidative stress caused by various substances altering the intracellular redox status, was investigated in Jurkat cells and in primary human skin fibroblasts.

The antioxidative enzymes just as the 8-oxo-dGTPase could be induced by oxidative stress in a cell-specific and ROS-specific manner. Besides this, different time course of induction of various antioxidative enzymes in response to H_2O_2 could be observed. These results implies that the antioxidative enzymes and the 8-oxo-dGTPase are differentially regulated. Furthermore, the results obtained with actinomycin D and cycloheximid, indicate a regulation of these enzymes at the transcriptional level. Discrepancies between the induction of gene expression and enzyme activities leading to the conclusion that the antioxidative enzymes, as well as the 8-oxo-dGTPase, are additionally regulated at the post-transcriptional level. Whether an increase in protein biosynthesis or protein stability or post-translational modifications may be involved in the regulation of these enzymes has to be considered in further studies. Antioxidants caused an inhibition of gene expression and enzyme activity, suggesting redox-regulation of the antioxidative enzymes and the 8-oxo-dGTPase. In contrast to the antioxidative enzymes, a close relationship between the gene expression and enzyme activity of the 8-oxo-dGTPase and the cytotoxicity could be observed. Cytotoxic concentrations of all tested substances lead to an almost complete loss of enzyme activity and inhibition of 8-oxo-dGTPase gene expression. These parameters can thus be used as a marker of oxidative stress.

The role of the 8-oxo-dGTPase and the antioxidative enzymes during cellular differentiation was studied in the HT29 model system. In contrast to the antioxidative enzymes, no induction of the 8-oxo-dGTPase enzyme activity and gene expression could be observed. Apparently, the regulation of the 8-oxo-dGTPase gene depends not only on the redox-status of the cell but also on various phases of the cell cycle. It might be possible that the 8-oxo-dGTPase gene expression is coupled with the progression through the S-phase of the cell cycle as indicated in the inhibition studies. Further experiments are necessary to elucidate this regulatory process.

The influence of the tumorpromoters TCDD and TPA on the gene expression and enzyme activity of the 8-oxo-dGTPase was studied in primary rat hepatocytes. Although TCDD and TPA generate oxidative stress and stimulate cell proliferation, induction of 8-oxo-dGTPase gene expression and enzyme activity could only be observed after treatment with TCDD. These observations suggest that specific protein kinases which are activated by a signal transduction pathway triggered by TCDD, are involved in the regulation of the 8-oxo-dGTPase gene.

In conclusion, the present study in a cell culture system has demonstrated that the antioxidative enzymes are differentially regulated at the transcriptional, translational and post-translational level. The 8-oxo-dGTPase gene expression might be regulated by the transcription factors Ets-1 and Sp-1, which bind to the DNA in response to the redox-status of the cell and stimulate transcription after phosphorylation in a Ca^{2+} dependent fashion. It has to be pointed out that Ets-1 and SP-1 are phosphorylated after activation of tyrosine kinases but not after activation of protein kinase C. Tyrosine kinases play a pivotal role in cell cycle progression. Whether the 8-oxo-dGTPase gene expression is regulated in this way or not, as well as the role of other redox-sensitive transcription factors, such as $NF_{\kappa}B$, in the mechanisms of the gene regulation of antioxidative enzymes by oxidative stress, has to be proofed in further studies.

9 Literaturverzeichnis

- Abate, C., Patel, L., Rauscher, F. J., Curran, T. (1990) Redox regulation of Fos and Jun DNA-binding activity in vivo. *Science* **249**: 1157-1161
- Abeygunawardana, C., Weber, D. J., Gittis, A. G., Frick, D. N., Lin, J., Miller, A.-F., Bessman, M. J., Mildvan, A. S. (1995) Solution structure of the MutT enzyme, a nucleoside triphosphate pyrophosphohydrolase. *Biochemistry* **34**: 14997-15005
- Abrahamse, S. L., Pool-Zobel, B. L., Rechkemmer, G. (1999) Potential of short fatty acids to modulate the induction of DNA damage and changes in the intracellular calcium concentration by oxidative stress in isolated rat distal colon cells. *Carcinogenesis* **20**: 629-634
- Akiyama, M., Maki, H., Sekiguchi, M., Horiuchi, T. (1989) A specific role of MutT protein: To prevent mispairing in DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3949-3952
- Allen, R. G. (1991) Oxygen-reactive species and antioxidant responses during development: The metabolic paradox of cellular differentiation. *P.S.E.B.M.* **196**: 117-129
- Alsharif, N. Z., Lawson, T., Stohs, S. J. (1994) Oxidative stress induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin is mediated by the aryl hydrocarbon (Ah) receptor complex. *Toxicology* **92**: 39-51
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K. (1993) Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 7915-7922
- Ames, B. N., Swirsky Gold, L. (1991) Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat. Res.* **250**: 3-16
- Ammendola, R., Mesuraca, M., Russo, T., Cimino, F. (1994) The DNA-binding efficiency of Sp1 is affected by redox changes. *Eur. J. Biochem.* **225**: 483-489
- Amstad, P., Cerutti, P. (1990) Genetic modulation of the cellular antioxidant defence capacity. *Environ. Health Persp.* **88**: 77-82
- Anderson, M. T., Staal, F. J. T., Gitler, C., Herzenberg, L. A. (1994) Separation of oxidant-initiated and redox-regulated steps in the NF- κ B transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 11527-11531
- Anderson, M. E. (1997) Glutathione and glutathione delivery compounds. *Adv. Pharmacol.* **38**: 65-78
- Anderson, M. E. (1998) Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. *Chemico-Biological Interactions* **111-112**: 1-14
- Aruoma, O. I., Halliwell, B., Hoey, B. M., Beutler, J. (1989) The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hydrochloric acid. *Free Radic. Biol. Med.* **6**: 593-597
- Au, K. G., Clark, S., Miller, J. H., Modrich, P. (1989) Escherichia coli mutY gene encodes an adenine glycosylase active on G-A mispairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 8877-8881

- Augeron, C., Labois, C. L. (1984) Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res.* **44**: 3961-3969
- Bailey, H. H. (1998) L-S,R-buthionine sulfoximine: historical development and clinical issues. *Chemico-Biological Interactions* **111-112**: 239-254
- Baker, S. S., Baker, R. D. (1992) Antioxidant enzymes in the differentiated Caco-2 cell line. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **28A** (9-10): 643-647
- Baker, A. M., Oberley, L. W., Cohen, M. B. (1997) Expression of antioxidant enzymes in human prostatic adenocarcinoma. *Prostate*. **13**: 5122-31
- Barnard, J. A., Warwick, G. (1993) Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells. *Cell Growth & Differentiation* **4**: 495-501
- Beckman, K. B., Ames B. N. (1997) Oxidative decay of DNA. *J. Biol. Chem.* **272**: 19633-19636
- Bernard, O., Balasubramanian, K. M. (1997) Modulation of glutathione level during butyrate-induced differentiation in human colon derived HT-29 cells. *Mol. Cell. Biochem.* **170** (1-2): 109-114
- Berridge, M. J. (1984) Inositol triphosphate and diacylglycerol as second messengers. *Biochem. J.* **220**: 345-360
- Bessho, T., Tano, K., Kasai, H., Ohtsuka, E., Nishimura, S. (1993) Evidence of two repair enzymes for 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxo-guanine) in human cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 19416-19421
- Bessman, M. J., Frick, D. N., O'Handley, S.F. (1996) The MutT proteins or ,nudix' hydrolase, a family of versatile, widely distributed ,housecleaning' enzymes. *J. Biol. Chem.* **271**: 25059-25062
- Beyart, R., Fier, W. (1994) Molecular mechanisms of tumor necrosis factor-induced cytotoxicity. What do we understand and what we do not. *FEBS Lett.* **340**: 9-16
- Bialkowski, K., Kasprzak, K. (1998) A novel assay of 8-oxo-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate pyrophosphohydrolase (8-oxo-dGTPase) activity in cultured cells and its use for evaluation of cadmium(II) inhibition of this activity. *Nucleic Acids Res.* **26** (13): 3194-3201
- Bialkowski, K., Bialkowska, A., Anderson, L. M., Kasprzak, K. S. (1999) Higher activity of 8-oxo-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate pyrophosphohydrolase (8-oxo-dGTPase) coincides with lower background levels of 8-oxo-2'-deoxyguanosine in DNA of fetal compared with maternal mouse organs. *Free Radic. Biol. Med.* **27** (1-2): 90-94
- Bianchi, V., Pontis, E., Reichard, P. (1986) Interrelations between substrate cycles and de novo synthesis of pyrimidine deoxyribonucleoside triphosphates in 3T6 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**: 986-990
- Bjursell, G., Skoog, L. (1980) Control of nucleotide pools in mammalian cells. *Antibiotics Chemother.* **28**: 78-85

- Blau, H. M. (1991) Differentiation requires continuous active regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **61**: 1213-1230
- Bowers, G. N., McComb, R. B. (1966) A continuous spectrophotometric method for measuring the activity of serum alkaline phosphatase. *Clin. Chem.* **12**: 70-73
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-258
- Bravard, A., Beaumatin, J., Dussaulx, E., Lesuffleur, T., Zweibaum, A., Luccioni, C. (1994) Modifications of the anti-oxidant metabolism during proliferation and differentiation of colon tumor cell lines. *Int. J. Cancer* **51**: 843-847
- Breimer, L. H. (1990) Molecular mechanism of oxygen radical carcinogenesis and mutagenesis: the role of DNA base damage. *Mol. Carcinogenesis* **3**: 188-197
- Brekke, O. L., Espevik, T., Bjerve, K. S. (1994) Butylated hydroxyanisole inhibits tumor necrosis factor-induced cytotoxicity and arachidonic acid release. *Lipids* **29**: 91-102
- Briehl, M. M., Baker, A. F., Siemankowski, I. W., Morreale, J. (1997) Modulation of antioxidative response during apoptosis. *Oncol. Res.* **9**: 281-285
- Bullions, L. C., Mejean, V., Claverys, J.-P., Bessman, M. J. (1994) Purification of the MutX protein of *Streptococcus pneumoniae*, a homologue of *Escherichia coli* MutT. *J. Biol. Chem.* **269**: 12339-12344
- Burdon, R. H. (1995) Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic. Biol. Med.* **18**: 775-794
- Burkitt, M. J., Kadiiska, M. B., Hanna, P. M., Jordan, S. J., Mason, R. P. (1993) Electron spin resonance spin-trapping investigation into the effects of paraquat and desferrioxamine on hydroxyl radical generation during acute iron poisoning. *Mol. Pharmacol.* **43**: 257-263
- Cabrera, M., Nghiem, Y., Miller J. H. (1988) MutM, a second mutator locus in *Escherichia coli* that generates G:C→T:A transversions. *J. Bacteriol.* **170**: 5405-5407
- Cai, J.-P., Kakuma, T., Tsuzuki, T., Sekiguchi, M. (1995) cDNA and genomic sequences for rat 8-oxo-dGTPase that prevents occurrence of spontaneous mutations due to oxidation of guanine nucleotides. *Carcinogenesis* **16**: 2343-2350
- Cerutti, P. A. (1985) Prooxidant states and tumor promotion. *Science* **227**: 375-381
- Chang, D. J., Ringold, G. M., Heller, C. a. (1992) Cell killing and induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor- α is mediated by lipoxygenase metabolites of arachidonic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**: 538-546
- Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S., Loeb L. A. (1992) 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G→T and A→C substitutions. *J. Biol. Chem.* **267**: 166-172

- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**: 156-159
- Chung, M. H., Kasai, H., Jones, D. S., Inoue, H., Ishikawa, H., Ohtsuka, E., Nishimura, S. (1991) An endonuclease activity of *Escherichia coli*, that specifically removes 8-hydroxyguanine residues from DNA. *Mutat. Res.* **254**: 1-12
- Clerch, L. B. (1995) A 3' untranslated region of catalase mRNA composed of a stem-loop and dinucleotide repeat elements binds a 69-kDa redox-sensitive protein. *Arch. Biochem. Biophys.* **317**: 267-274
- Culotta, E. (1994) DNA repair works its way to the top. *Science* **266**: 1926-1929
- Cunningham, M. L., Lokesh, B. R. (1983) Superoxide anion generated by potassium superoxide is cytotoxic and mutagenic to chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.* **121**: 299-304
- Czaja, M. J., Schilsky, M. L., Xu, Y., Schmiedeberg, P., Compton, A., Ridnour, L., Oberley, L. W. (1994) Induction of MnSOD gene expression in hepatic model of TNF α toxicity does not result in increased protein. *Am. J. Physiol.* **259**: L506-L512
- Demple, B., Amabile-Cuevas, C. F. (1991) Redox redux: the control of oxidative stress response. *Cell* **67**: 837-839
- Demple, B., Harrison, L. (1994) Repair of oxidative damage to DNA: Enzymology and biology. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 915-948
- Deng, G., Liu, G., Hu, L., Gum, J. R., Kim, Y. S. (1992) Transcriptional regulation of the human placental-like alkaline phosphatase gene and mechanisms involved in its induction by sodium butyrate. *Cancer Res.* **52**: 3378-3383
- DePinho, R. A., Schreiber-Agus, N., Alt, F. W. (1991) *myc* family oncogenes in the development of normal and neoplastic cells. In: van de Woude, G. F., Klein, G. (eds.). *Advances in Cancer Research*. Academic Press, San Diego, CA: 1-38
- Devary, Y., Gottlieb, R. A., Lau, L. F., Karin, M. (1991) Rapid and preferential activation of the c-jun gene during mammalian UV response. *Mol. Cell. Biol.* **11**: 2804-2811
- Dhulipal, P. D. K. (1997) Ets oncogene family. *Ind. J. Exp. Biol.* **35**: 315-322
- Dreher, D., Junod, A. F. (1995) Role of oxygen free radicals in cancer development: a review. *Eur. J. Cancer* **32A(1)**: 30-38
- Enan, E., Matsumura, F. (1996) Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochem. Pharmacol.* **52**: 1599-1612
- Farago, A., Nishizuka, Y. (1990) Protein kinase C in transmembrane signalling. *FEBS Lett.* **268**: 171-178

- Fischer, S. M., Baldwin, J. K., Jasheway, D. W., Patrick, K. E. (1987) Possible dissociation of phorbol ester-induced oxidant response and tumor promotion in the F1 offspring of SSIN X C57 BL/6J mice. *Carcinogenesis* **8**: 1521-1524
- Flohe, L., Günzler, W. (1985) Glutathione peroxidase. In: Greenwald, R. (ed.), Handbook of methods for oxygen radical research. CRC Press, Boca Raton, FL: 285-290
- Flohe, L., Günzler, W. A. (1984) Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* **105**: 114-121
- Floyd, R. A. (1990) The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* **11**: 1447-1450
- Fogh, J., Trempe, G. (1975) In: Fogh, J. (ed.). Human tumor cells in vitro. Plenum Press, New York: 115-159
- Fowler, R. G., Schaaper, R. M. (1997) The role of the mutT gene of Escherichia coli in maintaining replication fidelity. *FEMS Microbiology Reviews* **21**: 43-54
- Freeman, M. I., Meredith, M. J., Eisert, D. J. (1990) Failure of chronic glutathione elevation to reduce cytotoxicity produced by exposure to cis-diamminedichloroplatinum (II), ionizing radiation, or hyperthermia. *Cancer Res.* **50**: 5296-5300
- Fridovich, I. (1974) Superoxide dismutase. In: Meister, A. (ed.). Advances in enzymology, Vol. 41, New York: John Wiley Sons Inc.: 35-97
- Fridovich, I. (1975) Superoxide dismutases. *Ann. Rev. Biochem.* **44**: 147-159
- Fujii, J., Taniguchi, N. (1991) Phorbol ester induces manganese-superoxide dismutase in tumor necrosis factor resistance cells. *J. Biol. Chem.* **266**: 23142-23146
- Fujikawa, K., Kamiya, H., Yakushiji, H., Fujii, Y., Nakabeppu, Y., Kasai, H. (1999) The oxidized forms of dATP are substrates for the human MutT homologue, the MTH1 protein. *J. Biol. Chem.* **274**: 18201-18205
- Furuichi, M., Yoshida, M. C., Oda, H., Tajiri, T., Nakabeppu, Y., Tsuzuki, T., Sekiguchi, M. (1994) Genomic structure and chromosome location of the human mutT homologue MTH1 encoding 8-oxo-dGTPase for prevention of A:T to C:G transversion. *Genomics* **24**: 485-490
- Gajewski, E., Dizdaroglu, M. (1990) Hydroxyl radical induced cross-linking of cytosine and tyrosine in nucleohistone. *Biochemistry* **29**: 977-980
- Gardner, P. R., White, C. W. (1996) Failure of tumor necrosis factor and interleukin-1 to elicit superoxide production in the mitochondrial matrices of mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **334**: 158-162
- Gassen, H.-G., Sachse, G. E., Schulte, A. (1994) Grundlagen und Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion. Gustav Fischer Verlag Stuttgart
- Gegonne, A., Bosselut, R., Bailly, A., Ghysdael, J. (1993) Synergistic activation of the HTLV1 LTR Ets-responsive region by transcription factors Ets1 and Sp1. *EMBO J.* **12**: 1169-

- Gillis, S., Watson, J. (1980) Biochemical and biological characterization of lymphocyte regulatory molecules: Identification of an IL-2 producing human leukemia T-cell-line. *J. Exp. Med.* **152**: 1709-1719
- Ginn-Pease, M. E., Whisler, R. L. (1996) Optimal NF κ B mediated transcriptional responses in Jurkat T cells exposed to oxidative stress are dependent on intracellular glutathione and costimulatory signals. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **226**: 695-702
- Goossens, V., Grooten, J., deVoss, K., Fiers, W. (1995) Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 8115-8119
- Gordon, J. I. (1989) Intestinal epithelial cell differentiation: new insights from chimeric and transgenic mice. *J. Cell Biol.* **108**: 1187-1194
- Griffith, O. W., Anderson, M. E., Meister A. (1979) Inhibition of glutathione biosynthesis by prothionine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine), a selective inhibitor of γ -glutamylcysteine synthetase. *J. Biol. Chem.* **254**: 1205-1210
- Griffith, O. W., Meister, A. (1979) Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J. Biol. Chem.* **254**: 7558-7560
- Gum, J. R., Kam, W. K., Burd, J. C., Hicks, J. W., Sleisenger, M. H., Kim, Y. S. (1987) Effects of sodium butyrate on human colonic adenocarcinoma cells: induction of placental-like alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* **262**: 1092-1097
- Guyton, K. Z., Xu, Q., Holbrook, N. J. (1996) Induction of the mammalian stress response gene GADD153 by oxidative stress: role of AP-1 element. *Biochem. J.* **314**: 547-554
- Hachiya, M., Shimizu, S., Osawa, Y., Akashi, M. (1997) Endogenous production of tumour necrosis factor is required for manganese superoxide dismutase expression by irradiation in human monocytic cell line THP-1. *Biochem. J.* **328**: 615-623
- Hallewell, R. A., Masiarz, F. R., Najarian, R. C., Puma, J. P., Smith, B., Steimer, K. S., Mullenbach, G. T. (1985) Human Cu/Zn superoxide dismutase cDNA: isolation of clones synthesising high levels of active or inactive enzyme from an expression library. *Nucleic Acids Res.* **13**(6): 2017-2034
- Hanawalt, P. C. (1990) Selective DNA repair in active genes. *Acta Biol. Hung.* **41**(1-3): 77-91
- Hatahet, Z., Purmal, A. A., Wallace, S. S. (1993) A novel method for site specific introduction of single model oxidative DNA lesions into oligodeoxyribonucleotides. *Nucleic Acids Res.* **21**: 1563-1568
- Hayakawa, H., Hofer, A., Thelander, L., Kitajima, S., Cai, Y., Oshiro, S., Yakushiji, H., Nakabeppu, Y., Kuwano, M., Sekiguchi, M. (1999) Metabolic fate of oxidized guanine ribonucleotides in mammalian cells. *Biochemistry* **38**: 3610-3614
- Hayakawa, H., Taketomi, A., Sakumi, K., Kuwano, M., Sekiguchi, M. (1995) Generation and elimination of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine-5'-triphosphate, a mutagenic substrate for DNA synthesis, in human cells. *Biochemistry* **34**: 89-95

- Heerdt, B. G., Augenlicht, L. H. (1991) Effects of fatty acids on expression of genes encoding subunits of cytochrome c oxidase and cytochrome c oxidase activity in HT29 human colonic adenocarcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **266**: 19120-19126
- Heller, R. A., Krönke, M. (1994) Tumor necrosis factor receptor-mediated signalling pathways. *J. Cell Biol.* **126**: 5-9
- Hennet, T., Richter, C., Peterhans, C. (1993) Tumour necrosis factor- α induces superoxide generation in mitochondria of L-929 cells. *Biochem. J.* **289**: 587-592
- Hildago, E., Demple, B. (1994) An iron-sulphur centre essential for transcription activation by redox sensing SoxR protein. *EMBO J.* **13**: 138-146
- Hipskind, R. A., Rao, V. N., Mueller, C. G. F., Reddy, E. S. P., Nordheim, A. (1991) Ets-related protein Elk-1 is homologous to the c-fos regulatory factor p62TCF. *Nature* **354**: 531-535
- Ho, Y.-S., Crapo, J. D. (1988) Isolation and characterization of complementary DNAs encoding human manganese-containing superoxide dismutase. *FEBS Lett.* **229**: 256-260
- Höglund, L., Pontis, E., Reichard, P. (1991) Deoxyribonucleotide metabolism in hydroxyurea-resistant V79 hamster cells. *Eur. J. Biochem.* **196**: 239-245
- Holmgren, A. (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* **264**: 13963-13966
- Housset, B., Junod, A. F. (1982) Effects of culture conditions and hyperoxia on antioxidant enzymes in pig pulmonary artery and aortic endothelium. *Biochim. Biophys. Acta* **716**: 283-289
- Huang, K.-P. (1990) Role of protein kinase C in cellular regulation. *Biofactors* **2**: 171-178
- Hussain, S. P., Aguilar, F., Amstad, P., Cerutti, P. (1994) Oxy-radical induced mutagenesis of hotspot codons 248 and 249 of the human p53 gene. *Oncogene* **9**: 2277-2281
- Jakoby, W. B. (1978) The glutathione S-transferases: a group of detoxification proteins. In: Meister, A. (ed.). *Advances in enzymology*, Vol. 46, New York: John Wiley Sons Inc.: 383-414
- Jensen, J. C., Pogrebinak, H. W., Pass, H. I., Buresch, C., Merino, M. J., Kauffman, D., Venzon, D., Langstein, H. N., Norton, J. A. (1992) Role of tumor necrosis factor in oxygen toxicity. *J. Appl. Physiol.* **72**: 1902-1907
- Johansson, L. H., Borg, H. (1988) A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal. Biochem.* **174**: 331-336
- Kahl, R., Weinke, S., Kappus, H. (1989) Production of reactive oxygen species due to metabolic activation of butylated hydroxyanisole. *Toxicology* **59(2)**: 179-194
- Kakuma, T., Nishida, J., Tsuzuki, T., Sekiguchi, M. (1995) Mouse MTH1 protein with 8-oxo-7,8-dihydro 2'-deoxyguanosine 5'-triphosphatase activity that prevents transversion mutations. *J. Biol. Chem.* **270**: 25942-25948

- Kamath, A. V., Yanofski, C. (1993) Sequence and characterization of mutT from *Proteus vulgaris*. *Gene* **134**: 99-102
- Kang, D., Nishida, J., Iyama, A., Nakabeppu, Y., Furuichi, M., Fujiwara, T., Sekiguchi, M., Takeshige, K. (1995) Intracellular localization of 8-oxo-dGTPase in human cells, with special reference to the role of the enzyme in mitochondria. *J. Biol. Chem.* **270**: 14659-14665
- Kasai, H., Crain, P. F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Ootsuyama, A., Tanooka, H. (1986) Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis* **7**: 1849-1851
- Kasai, H., Nishimura, S. (1984) Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res.* **12**(4): 2137-2145
- Kasai, H., Nishimura, S. (1991) In: Sies, H. (ed.). *Oxidative stress: Oxidants and Antioxidants*, Academic Press, London: 99-116
- Kaul, N., Siveski-Iliskovic, N., Hill, M., Slezak, J., Singal, P. K. (1993) Free radicals and the heart. *JPM* **30**: 55-67
- Kavanagh, T. J., Grossmann, A., Jaecks, E. P., Jinneman, J. C., Eaton, D. L., Martin, G. M. (1990) Proliferative capacity of human peripheral blood lymphocytes sorted on the basis of glutathione content. *J. Cell. Physiol.* **145**: 472-480
- Kim, Y. S., Tsao, D., Siddiqui, B., Whitehead, J. S., Arnstein, P., Bennett, J., Hicks, J. (1980) Effects of sodium butyrate and dimethylsulfoxide on biochemical properties of human colon cancer cells. *Cancer* **45**: 1185-1192
- Klauning, J. E.; Xu, Y., Bacowski, S., Ketcham, C. A., Isenberg, J. S., Kolaja, K. L., Baker, T. K. Walborg, E. F., Stevenson, D. E (1995) Oxidative stress in nongenotoxic carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* **82/83**: 683-691
- Klausner, R. D., Harford, J. B. (1989) Cis-trans models for post-transcriptional gene regulation. *Science* **246**: 870-872
- Knüppel, F. (1995) Bestimmung der Oxidation von Glutathion und Lipiden in Leberzellen durch Anthrachinone. Diplomarbeit im Fachbereich Chemie der Universität Hamburg
- Koizumi, S., Fisher, R. J., Fujiwara, S., Jorcyk, C., Bhat, N. K., Seth, A., Papas, T. S. (1990) Isoforms of the human ets-1 protein: generation by alternative splicing and differential phosphorylation. *Oncogene* **5**: 675-81
- Kong, X.-J., Fanburg, B. L. (1992) Regulation of Cu,Zn-superoxide dismutase in bovine pulmonary artery endothelial cells. *J. Cell Physiol.* **153**: 470-478
- Kosower, N. S., Kosower, E. M. (1978) The glutathione status of cells. *Int. Rev. Cytol.* **54**: 110-160
- Lai, Z. C., Rubin, G. M. (1992) Negative control of photoreceptor development in *Drosophila* by the product of the yan gene, an Ets domain protein. *Cell* **70**: 609-20

- Larsson, R., Cerutti, P. (1988) Oxidants induced phosphorylation of ribosomal protein S6. *J. Biol. Chem.* **263**: 17452-17458
- Larsson, R., Cerutti, P. (1989) Translocation and enhancement of phosphotransferase activity of protein kinase C following exposure in mouse epidermal cells to oxidants. *Cancer Res.* **49**: 5627-5632
- Le Page, F., Marot, A., Grollman, A. P., Saragasin, A., Gentil, A. (1995) Mutagenicity of a unique 8-oxoguanine in a human Ha-ras sequence in mammalian cells. *Carcinogenesis* **16**: 2779-2784
- Lesuffleur, T., Kornowski, A., Augeron, C., Dussaulx, E., Barbat, A., Labois, C. (1991) Increased growth adaptability to 5-fluorouracil and methotrexate of HT-29 sub-populations selected for their commitment to differentiation. *Int. J. Cancer* **49**: 731-737
- Levrat, C., Louisot, P. (1996) Increase of mitochondrial PLA₂-released fatty acids is an early event in tumor necrosis factor alpha-treated WEHI-164 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **221**: 531-538
- Lindl, T., Bauer, J. (1994) Zell- und Gewebekultur. Gustav Fischer Verlag Stuttgart, Jena, New York: 189ff
- Liochev, S. I., Fridovich, I. (1997) How does superoxide dismutase protect against tumor necrosis factor: A hypothesis informed by effect of superoxide on „free“ iron. *Free Radic. Biol. Med.* **23**: 668-671
- Lowe, M. E., Strauss, A. W. (1990) Expression of a Nagao-type, phosphatidylinositol-glycan anchored alkaline phosphatase in human choriocarcinomas. *Cancer Res.* **50**(13): 3956-3962
- Maki, H., Sekiguchi, M. (1992) MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* **355**: 273-275
- Maniatis, Fritsch and Sambrook (1982) Molecular Cloning, A laboratory manual. Cold Spring Harbor, New York
- Mann, P. J. G. (1932) The reduction of glutathione by a liver system. *Biochem. J.* **26**: 785-790
- Marcho, Z., White, J. E., Higgins, P. J., Tsan, M. F. (1991) Tumor necrosis factor enhances endothelial cells susceptibility to oxygen toxicity: role of glutathione. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **5**: 556-562
- Marklund, S. L., Westman, G., Lundgren, E., Roos, G. (1982) Copper- and zinc-containing superoxide dismutase, manganese-containing superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase in normal and neoplastic human cell lines and normal human tissues. *Cancer Res.* **42**: 1955-1961
- Marklund, S. L. (1984) Extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in tissue from nine mammalian species. *Biochem J.* **222**: 649-655
- Marklund, S. L. (1992) Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **267**: 6696-6701

- Marklund, S. L. (1984) Extracellular superoxide dismutase in human tissues and human cell lines. *J. Clin. Invest.* **74**: 1398-1403
- Marklund, S. L., Holme, E., Hellner, L. (1982a) Superoxide dismutase in extracellular fluids. *Clin. Chim. Acta* **126**: 41-51
- Marks, P. A., Szeinberg, A., Banks, J. (1961) Erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase of normal and mutant human subjects: properties of purified enzymes. *J. Biol. Chem.* **236**: 10-17
- Marotzki, S. (1997) Molekularbiologische und zellbiologische Mechanismen der Tumorpromotion durch polychlorierte aromatische Kohlenwasserstoffe, Dissertation im Fachbereich Biologie der Universität Hamburg
- Marquardt, H. (1994) Chemische Kanzerogenese. In: Marquardt, H. und Schäfer, S.G. (Hrsg.). Lehrbuch der Toxikologie, Wissenschaftsverlag Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich: 124-147
- Martenson, J., Meister, A. (1989) Mitochondrial damage in muscle occurs after marked depletion of glutathione and is prevented by giving glutathione monoester. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 471-475
- Martenson, J., Meister, A. (1991) Inhibition of glutathione synthesis in newborn rat: A model for endogenously produced oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 9360-9364
- Marx, J. (1994) Oncogenes reach a milestone. *Science* **266**: 1942-1944
- Matsumara, F. (1994) How important is the protein phosphorylation pathway in the toxic expression of dioxin-type chemicals? *Biochem. Pharmacol.* **48** (2): 215-224
- Matthews, N., Neale, M. L., Jackson, S. K., Stark, J. M. (1987) Tumour cell killing by tumour necrosis factor: inhibition by anaerobic conditions, free radical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism. *Immunology* **62**: 153-155
- McAlpine, P. J., Boucheix, C., Pakstis, A. J., Stranc, L. C., Berent, T. G., Shows, T.B. (1988) The 1988 catalogue of mapped genes and report of the nomenclature committee. *Cytogenet. Cell Genet.* **49**: 4-38
- McBride, T. J., Preston, B. D., Loeb, L. A. (1991) Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals. *Biochemistry* **30**: 207-213
- McCord, J. M. und Fridovich, I. (1969) Superoxide Dismutase. An enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**: 6049-6055
- McGoldrick, J. P., Yeh, Y. C., Solomon, M., Essigmann, J. M., Lu, A. L. (1995) Characterization of a mammalian homolog of Escherichia coli MutY mismatch repair protein. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 989-996
- Meister, A., Anderson, M. E. (1983) Glutathione. *Annu. Rev. Biochem.* **52**: 711-760
- Meister, A. (1991) Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; Applications in research and therapy. *Pharmacol. Ther.* **51**: 155-194

- Meister, A. (1985) Methods for the selective modification of glutathione metabolism and study of glutathione transport. *Methods in Enzymology* **113**: 571-585
- Meyer, M., Pahl, H. L., Baeuerle, P. A. (1994) Regulation of the transcription factors NF-kB and AP-1 by redox changes. *Chemico-Biol. Interact.* **91**: 91-100
- Michaels, M. L., Cruz, C., Grollman, A.P., Miller, J. H. (1992a) Evidence that MutM and MutY combine to prevent mutations by oxidatively damaged form of guanine in DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 70212-70215
- Michaels, M. L., Miller, J. H. (1992b) The GO system protects organisms from the mutagenic effect of spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). *J. Bacteriol.* **174**: 6321-6325
- Michaels, M. L., Pham, L., Cruz, C., Miller, J. H. (1991) MutM, a protein that prevents G:C→T:A transversions, is formamidopyrimidine-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res.* **19(13)**: 3629-3632
- Michaels, M. L., Tchou, J. Grollman, A. P. Miller, J. H. (1992c) A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. *Biochemistry* **31**: 10964-10968
- Michael, G. (1999) Biochemical Pathways. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin: 9-12
- Mills, G. C. (1957) Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* **229**: 189-197
- Mo, J.-Y., Maki, H. Sekiguchi, M. (1992) Hydrolytic elimination of a mutagenic nucleotide, 8-oxo-dGTP, by human 18-kilodalton protein: Sanitization of nucleotide pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 11021-11025
- Modrich, P. (1994) Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science* **266**: 1959-1960
- Moody, C. S., Hassan, H. M. (1982) Mutagenicity of oxygen free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 2855-2859
- Morita, A., Tsao, D., Kim, Y. S. (1982) Effect of sodium butyrate on alkaline phosphatase in HRT-18, a human rectal cancer cell line. *Cancer Res.* **42**: 4540-4545
- Munday, R. (1989) Toxicity of thiols and disulphides: involvement of free-radical species. *Free Radic. Biol. Med.* **7**: 659-673
- Murakami, K., Mavarothalassitis, G., Bhat, N. K., Fisher, R.J. Paps, T. S. (1993) Human ERG-2 protein is phosphorylated DNA-binding protein—a distinct member of the ets family. *Oncogene* **8**: 1559-1565
- Nagai, F., Okubo, T., Ushiyama, K., Satoh, K. Kano, I. (1996) Formation of 8-hydroxyguanosine in calf thymus DNA treated with tert-butylhydroquinone, a major metabolite of butylated hydroxyanisole. *Toxicol. Lett.* **89(2)**: 163-167

- Nakagawara, A., Nathan, C. F., Cohn, Z. A. (1981) Hydrogen peroxide metabolism in human monocytes during differentiation in vitro. *J. Clin. Invest.* **68**: 1243-1252
- Nakamura, Y., Gindhart, T., Winterstein, D., Tomita, I., Seed, J., Colburn, N. (1988) Early superoxide dismutase-sensitive event promotes neoplastic transformation in mouse epidermal JB6 cells. *Carcinogenesis* **9**: 203-207
- Nath, K. A., Salahudeen, A. K. (1993) Autoxidation of cysteine generates hydrogen peroxide: cytotoxicity and attenuation by pyruvate. *Am. J. Physiol.* **264**: F306-F314
- Nebert, D. W., Petersen, D-D., Fornace, A. J. (1990) Cellular responses to oxidative stress: The Ah gene battery as a paradigm. *Environ. Health Persp.* **88**: 13-25
- Nghiem, Y., Cabrera, M., Cupples, C. G., Miller, J. H. (1988) The mutY gene: A mutator locus in *Escherichia coli* that generates G:C→T:A transversions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2709-2713
- Nguyen, B. T., Sadee, W. (1986) Compartmentation of guanine nucleotide precursors for DNA synthesis. *Biochem J.* **234**: 263-269
- Nicander, B., Reichard, P. (1985) Evidence for the involvement of substrate cycles in the regulation of deoxyribonucleoside triphosphate pools in 3T6 cells. *J. Biol. Chem.* **260**: 9216-9222
- Nicotera, T. M., Block, A. M., Gibas, Z., Sandberg, A. A. (1985) Induction of superoxide dismutase, chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges by paraquat in Chinese hamster fibroblasts. *Mutat. Res.* **151**: 263-268
- Niles, R. M., Wilhelm, S. A., Thomas, P., Zamcheck, N. (1988) The effect of sodium butyrate and retinoic acid on growth and CEA production in a series of human colorectal tumor cell lines representing different states of differentiation. *Cancer Invest.* **6**: 39-45
- Nohl, H., de Silva, D., Summer, K. H. (1989) 2,3,7,8 tetrachlorodibenzo-p-dioxin induces oxygen associated with cell respiration. *Free Radic. Biol. Med.* **6(4)**: 369-74
- Oda, H., Nakabeppu, Y., Furuichi, M., Sekiguchi, M. (1997) Regulation of expression of the human MTH1 gene encoding 8-oxo-dGTPase. *J. Biol. Chem.* **272**: 17843-17850
- Oesch, F., Diener, B. (1994) Rational species extrapolation of toxic effects. *Arch. Toxicol. Suppl.* **16**: 161-8
- Okamoto, K., Toyokuni, S., Kim, W.-J., Ogawa, O., Kakehi, Y., Arao, S., Hiai, H., Yoshida, O. (1996) Overexpression of human mutT homologue gene messenger RNA in renal-cell carcinoma: evidence of persistent oxidative stress in cancer. *Int. J. Cancer* **65**: 437-441
- Olinski, R., Jaruga, P., Zastawny, T. H. (1998) Oxidative DNA base modifications as factors in carcinogenesis. *Acta Biochim. Pol.* **45(2)**: 561-572
- Olinski, R., Zastawny, T., Budzbon, J., Skokowski, J., Zegarski, W., Dizdaroglu, M. (1992) DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues. *FEBS Lett.* **309**: 193-198

- Osborn, L., Kunkel, S., Nable, G. J. (1989) Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 2336-2340
- Owens, C. W., Belcher, R. V. (1965) A colorimetric mikro method for the determination of glutathione. *Biochem. J.* **94**: 705-711
- Pahl, H. L., Bauerle, P. A. (1994) Oxygen and the control of gene expression. *BioEssays* **16**: 497-502
- Paoletti, F., Aldinucci, D., Mocali, A., Caparrini, A. (1986) A sensitive spectrophotometric method for determination of superoxide dismutase in tissue extracts. *Anal. Biochem.* **154**: 536-541
- Park, J. W., Floyd, R. A. (1994) Generation of strand breaks and formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by a thiol/ $\text{Fe}^{3+}/\text{O}_2^-$ catalyzed oxidation system. *Arch. Biochem. Biophys.* **312**: 285-291
- Perchellet, J.-P., Perchellet, E., Orten, D., Schneider, B. (1986) Decreased ratio of reduced/oxidized glutathione in mouse epidermal cells treated with tumor promoters. *Carcinogenesis* **7**: 503-506
- Percy, M. E. (1984) Catalase: an old enzyme with a new role? A review. *Can. J. Biochem. Cell. Biol.* **62**: 1006-1014
- Peskin, A. V. (1997) Interaction of reactive oxygen species with DNA: a review. *Biochemistry (Moscow)* **62(12)**: 1341-1347
- Pinkus, R., Weiner, L. M., Daniel, V. (1996) Role of oxidants and antioxidants in the induction of AP-1, NF- κ B, and glutathione S-transferase gene expression. *J. Biol. Chem.* **271**: 13422-13429
- Pinto, M., Appay, M. D., Simon-Assmann, P., Chevalier, G., Dracopoli, N., Fogh, J., Zweibaum, A. (1982) Enterocytic differentiation of cultured human colon cancer cells by replacement of glucose by galactose in the medium. *Biol. Cell* **44**: 193-196
- Pitot, H.C. (1993) The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer* **72**: 962-970
- Poot, M., Verkerk, A., Koster, J. F., Esterbauer, H., Jongkind, J. F. (1988a) Reversible inhibition of DNA and protein synthesis by cumene hydroperoxide and 4-hydroxy-nonanal. *Mech. Ageing. Dev.* **43**: 1-9
- Poot, M., Esterbauer, H., Rabinovitch, P. S., Hoehn, H. (1988b) Disturbance of cell proliferation by two model compounds of lipid peroxidation contradicts causative role in cellular senescence. *J. Cell. Physiol.* **137**: 421-429
- Poot, M., Teubert, H., Rainovitch, P. S., Kavanagh, T. J. (1995) De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle. *J. Biol. Physiol.* **163**: 555-560

- Porter, D. W., Nelson, V. C., Fivash, M. J., Kasparzak, K. (1996) Mechanistic studies of the inhibition of mutT dGTPase by the carcinogenic metal Ni(II). *Chem. Res. Toxicol.* **9**: 1315-1381
- Porter, D. W., Yakushiji, H., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M., Fivash, M. J., Kasparzak, K. (1997) Sensitivity of *Escherichia coli* (mutT) and human (MTH1) 8-oxo-dGTPase to in vitro inhibition by the carcinogenic metals, nickel(II), copper(II), cobalt(II) and cadmium(II). *Carcinogenesis* **18**: 1785-1791
- Puntarulo, S., Cederbaum, A. I. (1989) Interactions between paraquat and ferric complexes in the microsomal generation of oxygen radicals. *Biochem. Pharmacol.* **38**: 2911-2918
- Purmal, A. A., Kow, Y. W., Wallace, S.S. (1994) 5-Hydroxypyrimidine desoxynucleoside triphosphates are more efficiently incorporated into DNA by exonuclease-free Klenow fragment than 8-oxopurine deoxynucleoside triphosphates. *Nucleic Acid Res.* **22**: 3930-3935
- Quan, F., Korneluk, R. G., Tropak, M. B., Gravel, R. A. (1986) Isolation and characterization of the human catalase gene. *Nucleic Acids Res.* **14**(13): 5321-5335
- Ray, L. E., Prescott, J.M. (1975) Isolation and some characteristics of glutathione reductase from rabbit erythrocytes. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **148**: 402-409
- Röhrdanz, E., Kahl, R. (1998) Alterations of antioxidant enzyme expression in response to hydrogen peroxide. *Free Radic. Biol. Med.* **24**: 27-38
- Rushmore, T. H., Morton, M. R., Pickett, C. B. (1991) The antioxidative responsive element. *J. Biol. Chem.* **266**: 11632-11639
- Ryan, T. P., Aust, S. D. (1992) The role of iron in oxygen-mediated toxicities. *Crit. Rev. Toxicol.* **22**: 119-141
- Saini, K., Steele, G., Thomas, P. (1990) Induction of carcinoembryonic-antigen-gene expression in human colorectal carcinoma by sodium butyrate. *Biochem. J.* **272**: 541-544
- Saito, M., Tannaka, N., Ohkawa, Y., Inui, N. (1987) Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-enhanced transformation in vitro by radical scavengers. *Cancer Lett.* **35**: 167-170
- Sakumi, K., Furuichi, M., Tsuzuki, T., Kakuma, T., Kawabata, S., Maki, H., Sekiguchi, M. (1993) Cloning and expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis. *J. Biol. Chem.* **268**: 23542-23530
- Sancar, A. (1994) Mechanisms of DNA excisions repair. *Science* **266**: 1954-1956
- Satoh, M. S., Jones C. J., Wood, R. D., Lindahl, T. (1993) DNA excision-repair defect of xeroderma pigmentosum prevents removal of a class of oxygen free radical-induced base lesions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6335-6339
- Schildermann, P. A. E. L., Rhijnsburger, E., Zwingmann, I., Kleinjans, J. C. S. (1995) Induction of oxidative DNA damage and enhancement of cell proliferation in human lymphocytes in vitro by butylated hydroxyanisole. *Carcinogenesis* **16**: 507-512

- Schreck, R., Albermann, K., Baeuerle, P. A. (1982) Nuclear factor kB: An oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Rad. Res. Comms.* **17(4)**: 221-237
- Schrenk, D., Karger, A., Lipp, H.-P., Bock, K. H. (1992) 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin and ethinylestradiol as co-mitogens in cultured rat hepatocytes. *Carcinogenesis* **13(3)**: 453-456
- Schroy, P. C., Rustgi, A. K., Ikonomu, E., Liu, X. P., Polito, J., Andry, C., O'Keane, J. C. (1994) Growth and intestinal differentiation are independently regulated in HT29 colon cancer cells. *J. Cell. Physiol.* **161**: 11-123
- Schulze-Osthoff, K., Bakker, A. C., Vanhaesebroeck, B., Beyart, R., Jacob, W. A., Fiers, W. (1992) Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J. Biol. Chem.* **267**: 5317-5323
- Seglen, P. O. (1976) Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Biol.* **13**: 29-83
- Sekiguchi, M. (1993) Direct submission to embl, genbank
- Sekiguchi, M. (1996) MutT-related avoidance mechanism for DNA synthesis. *Genes Cells* **1**: 139-145
- Sen, R., Baltimore, D. (1986) Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* **46**: 705-716
- Shackelford, R. E., Kaufmann, W. K., Paules, R. S. (1999) Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ. Health Perspect.* **107**: 5-24
- Shaw, J. P., Chou, I.-N. (1986) Elevation of intracellular glutathione content associated with mitogenic stimulation of quiescent fibroblasts. *J. Cell. Physiol.* **129**: 193-198
- Shibutani, S., Takeshita, M., Grollman, A. P. (1991) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* **349**: 431-434
- Shigenaga, M. K., Gimeno, C. J., Ames, B. N. (1989) Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as biomarker of in vivo oxidative DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 9697-9701
- Shull, S., Heintz, N. H., Periasamy, M., Manohar, M., Janssen, Y. M. W., Marsh, J. P., Mossman, B. T. (1991) Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J. Biol. Chem.* **266**: 24398-24403
- Sies, H. (1985) Oxidative Stress, Academic Press London
- Sies, H. (1986) Biochemie des oxidativen Streß. *Angew. Chem.* **98**: 1061-1075
- Smith, G. T., Ohl, V. S., Litwack, G. (1977) Ligandin, the glutathione S-transferases, and chemical induced hepatocarcinogenesis: a review. *Cancer Res.* **37**: 8-14
- Sohal, R. S., Allen, R. G., Nations, C. (1986) Oxygen free radicals play a role in cellular differentiation: an hypothesis. *J. Free Radic. Biol. Med.* **2(3)**: 175-181

- Solanki, V., Rana, R., Slaga, T. (1981) Diminution of mouse epidermal superoxide dismutase and catalase activities by tumor promoters. *Carcinogenesis* **2**: 1141-1146
- Soulemani, A., Asselin, C. (1993) Regulation of c-myc expression by sodium butyrate in the colon carcinoma cell line Caco-2. *FEBS Lett.* **326**: 45-50
- Spitz, D. R., Sullivan, S. J., Malcom, R. R., Roberts, R. J. (1991) Glutathione dependent metabolism and detoxification of 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radic. Biol. Med.* **11**: 415- 423
- Sprong, R. C., Miranda, A., Winkelhuyzen-Janssen, L., Aarsman, C. J. M., van Oirschot, J. F., van der Bruggen, T., van Asbeck, B. S. (1998) Low-dose N-Acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high dose increases mortality. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**: 1283-1293
- Spyrou, G., Holmgren, A. (1996) Desoxyribonucleoside triphosphate pools and growth of glutathione-depleted 3T6 mouse fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Comms.* **220**: 42-46
- Stein, J., Schroder, O., Bonk, M., Oremek, G., Lorenz, M., Caspary, W. F. (1996) Induction of glutathione S-transferase-pi by short-chain fatty acids in the intestinal cell line Caco-2. *Eur. J. Clin. Invest.* **26**: 84-87
- Stohs, S. J., Shara, M. A., Alsharif, N. Z., Wahba, Z. Z., Al-Bayati, Z. A. F. (1990) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-Induced oxidative stress in female rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **106**: 126-135
- Storz, G., Tartaglia, I. A., Ames, B. N. (1990) Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: Direct activation by oxidation. *Science* **248**: 189-194
- Storz, G., Tartaglia, I. A. (1992) OxyR: A regulator of antioxidant genes. *J. Nutrition* **122**: 627-630
- Stralin, P., Marklund, S. L. (1994) Effects of oxidative stress on expression of extracellular superoxide dismutase, CuZn-superoxide dismutase and Mn-superoxide dismutase in human dermal fibroblasts. *Biochem. J.* **298**: 347-352
- Stryer, L. (1988) Lehrbuch der Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, New York: 1021-1024
- Sugimura, T. (1992) Multistep carcinogenesis: a 1992 perspective. *Science* **258**: 603-607
- Sun, Y., Oberley, L. W. (1996) Redox regulation of transcriptional activators. *Free Radic. Biol. Med.* **21(3)**: 335-348
- Sun, Y. (1989) Free radicals, antioxidant enzymes, and carcinogenesis. *Free Radical Biology & Medicine* **8**: 583-599
- Suzuki, Y. J., Forman, H. J., Sevanian, A. (1997) Oxidants as stimulators of signal transduction, *Free Rad. Biol. Med.* **22**: 269-285

- Tagaya, Y., Maeda, Y., Mitsui, A., Kondo, N., Matsui, H., Hamuro, J., Brown, N., Arai, K.-I., Yokota, H., Wakasugi, H., Yodoi, J. (1989) ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin; possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. *EMBO J.* **8**: 757-764
- Taijiri, T., Maki, H., Sekiguchi, M. (1995) Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* **336**: 257-267
- Takahashi, K., Akasaka, M., Yamamoto, Y., Kobayashi, C., Mizoguchi, J., Koyama, J. (1990) Primary structure of human plasma glutathione peroxidase deduced from cDNA sequences. *J. Biochem.* **108**(2): 145-148
- Tappel, A. L. (1972) Vitamin E and free radical peroxidation of lipids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **203**: 12-28
- Taylor, S. S., Marcote, M. J., Knighton, D. R., Basi, g., Sowadski, J. M., Brambilla, P., Draetta, G. (1993) A three-dimensional model of the cdc2 protein kinase: Localization of cyclin- and SUC1-binding regions and phosphorylation site. *Mol Cell Biol* **13**: 5122-31
- Tchou, J., Kasai, H., Shibutani, S., Chung, M.-H., Laval, J., Grollman, A. P., Nishimura, S. (1991) 8-Oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 4690-4694
- Thanislass, J., Raveendran, M., Devaraj, H. (1995) Buthionine sulfoximine-induced glutathione depletion: Its effect on antioxidants, lipid peroxidation and calcium homeostasis in the lung. *Biochem. Pharmacol.* **50**: 239-234
- Tokunaga, K., Nakamura, Y., Sakata, K., Fujimori, K., Ohkubo, M., Sawada, K., Sakiyama, S. (1987) Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers. *Cancer Res.* **47**(21): 5616-5619
- Toledano, M. D., Leonard, W. J. (1991) Modulation of transcription factor NF-kappaB binding activity by oxidation-reduction in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 4328-4332
- Treffers, H. P., Spinelli, V., Belser, N. O. (1954) A factor (or mutator gene) influencing mutation rates in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **40**: 1064-1071
- Trush, M. A., Kensler, T. W. (1991) An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **10**: 211-216
- Tsao, D., Morita, A., Bella, A., Luu, P., Kim, Y. S. (1982) Differential effects of sodium butyrate, dimethylsulfoxide and retinoic acid on membrane associated antigen, enzymes and glycoproteins of human rectal adenocarcinoma cells. *Cancer Res.* **42**: 1052-1058
- Tsao, D., Shi, Z.-R., Wong, A. Kim, Y. S. (1983) Effect of sodium butyrate on carcinoembryonic antigen production by human colonic adenocarcinoma cells in culture. *Cancer Res.* **43**: 1217-1222
- Tyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J., Hiai, H. (1995) Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Lett.* **358**: 1-3

- Vandeputte, C., Guizon, I., Genestie-Denis, I., Vannier, B., Lorenzon, G. (1994) A microtiter plate assay for total glutathione and glutathione disulfide contents in cultured/isolated cells: Performance study of a new miniaturized protocol. *Cell Biol. Toxicol.* **10**: 415-421
- Vasalli, P. (1992) The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.* **10**: 411-452
- Velcich, A., Augenlicht, L. (1993) Regulated expression of an intestinal mucin gene in HT29 colonic carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 13956-13961
- Velcich, A., Palumbo, L., Jarry, A., Labois, C., Racevskis, J., Augenlicht, L. (1995) Patterns of expression of lineage-specific markers during the in vitro induced differentiation of HT29 colon carcinoma cells. *Cell Growth & Differentiation* **6**: 749-757
- Verhagen, H., Schilderman, P. A. E. L., Kleinjans, J. C. S. (1991) Butylated hydroxyanisole in perspective. *Chem. Biol. Interactions* **80**: 109-134
- Visner, G. A., Dougall, W. C., Wilson, J. M., Burr, I. A., Nick, H. S. (1990) Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. *J. Biol. Chem.* **265**: 2856-2864
- Waleh, N. S., Calaoagan, J., Murphy, B. J., Knapp, A. M., Sutherland, R. M., Laderoute, K.R. (1998) The redox-sensitive human antioxidant responsive element induces gene expression under low oxygen conditions. *Carcinogenesis* **19(8)**: 1333-1337
- Wani, G., Milo, G. E., D'Ambrosio, S. M. (1998) Enhanced expression of the human 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanosine triphosphatase gene in human breast tumor cells. *Cancer Lett.* **125**: 123-30
- Wani, G., D'Ambrosio, S. M. (1995) Cell type-specific expression of human 8-oxo-7,8-dihydroguanosine triphosphatase in normal human breast and skin tissues in vivo. *Carcinogenesis* **16**: 277-283
- Wasylyk, C., Wasylyk, B. (1993) Oncogenic conversion of Ets affects redox regulation in vivo and in-vitro. *Nucleic Acid. Res.* **21(3)**: 523-529
- Wattenberg, L. W. (1986) Protective effects of 2(3)-tert-butyl-hydroxyanisole on chemical carcinogenesis. *Food Chem. Toxicol.* **24(10-11)**: 1099-1102
- Weber, D. J., Bhatnagar, S. K., Bullions, L. C., Bessman, M. J., Mildvan, A. S. (1993) NMR and isotopic exchange studies of the site of bond cleavage in the MutT reaction. *J. Biol. Chem.* **267**: 16939-16942
- Wen, D., Rowland, A., Deryneck, R. (1989) Expression and secretion of gro/MSA by stimulated human endothelial cells. *EMBO J.* **8**: 1761-1766
- Werlen, G., Belin, D., Conne, B., Roche, E., Lew, D. P., Prentke, M. (1993) Intracellular Ca^{2+} and the regulation of early response gene expression in HL-60 myeloid leukemia cells. *J. Biol. Chem.* **268**: 16596-16601

- Wice, B. M., Trugnan, G., Pinto, M., Rousset, M., Chevalier, G., Dussaulx, E., Lacroix, B., Zweibaum, A. (1985) The intracellular accumulation of UDP-N-acetylhexosamines is concomitant with the inability of human colon cancer cells to differentiate. *J. Biol. Chem.* **260**: 139-146
- Winterberger, E., Mudrak, I., Winterberger, U. (1983) Butyrate inhibits mouse fibroblasts at a control point in the G1 phase. *J. Cell. Biochem.* **21**: 239-247
- Wölflé, D., Becker, E., Schmutte C. (1993) Growth stimulation of primary rat hepatocytes by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Cell Biol. Toxicol.* **9(1)**:15-31
- Wong, G. H. W., Goeddel, D. V. (1988) Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* **242**: 941-944
- Wong, G. H. W., Elwell, J. H., Oberley, L. W., Goeddel, D. V. (1989) Manganous superoxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* **58**: 923-931
- Yakushiji, H., Maraboeuf, F., Takahashi, M., Deng, Z.-S., Kawabata, S.-i., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M. (1997) Biochemical and physicochemical characterization of normal and variant forms of human MTH1 protein with antimutagenic activity. *Mutat. Res.* **384**: 181-194
- Yu, R., Tan, T.-H., Kong, A.-N. T. (1997) Butylated hydroxyanisole and its metabolite tert-butylhydroquinone differentially regulate mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* **272**: 28962-28970
- Zittermann, A., Kling-Steines, B. (1994) Antioxidative and prooxidative Lebensmittel-inhaltsstoffe. *DAZ* **32**: 23-24
- Zweibaum, A., Laburthe, M., Grasset, E., Louvard, D. (1991) Use of cultured cell lines in studies of intestinal cell differentiation and functions. In: Field, M. and Frizzell, R. A. (eds.), *Handbook of physiology: The gastrointestinal system, Vol. IV: Intestinal absorption and secretion*. Am. Physiol. Soc., Bethesda, MD: 223-255

10 Anhang

10.1 R- und S-Sätze

10.1.1 Hinweise auf besondere Gefahren (R-Sätze)

R 1	In trockenem Zustand explosionsgefährlich.
R 2	Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen explosionsgefährlich.
R 3	Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen besonders explosionsgefährlich.
R 4	Bildet hochempfindliche explosionsgefährliche Metallverbindungen.
R 5	Beim Erwärmen explosionsfähig.
R 6	Mit und ohne Luft explosionsfähig.
R 7	Kann Brand verursachen.
R 8	Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen.
R 9	Explosionsgefahr bei Mischung mit brennbaren Stoffen.
R 10	Entzündlich.
R 11	Leichtentzündlich.
R 12	Hochentzündlich.
R 14	Reagiert heftig mit Wasser.
R 15	Reagiert mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase.
R 16	Explosionsgefährlich in Mischung mit brandfördernden Stoffen.
R 17	Selbstentzündlich an Luft.
R 18	Bei Gebrauch Bildung explosionsfähiger/leichtentzündlicher Dampf-Luftgemische möglich.
R 19	Kann explosionsfähige Peroxide bilden.
R 20	Gesundheitsschädlich beim Einatmen.
R 21	Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut.
R 22	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken.
R 23	Giftig beim Einatmen.
R 24	Giftig bei Berührung mit der Haut.
R 25	Giftig beim Verschlucken.
R 26	Sehr giftig beim Einatmen.
R 27	Sehr giftig bei Berührung mit der Haut.
R 28	Sehr giftig beim Verschlucken.
R 29	Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase.
R 30	Kann bei Gebrauch leicht entzündlich werden.
R 31	Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase.
R 32	Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase.
R 33	Gefahr kumulativer Wirkungen.
R 34	Verursacht Verätzungen.
R 35	Verursacht schwere Verätzungen.
R 36	Reizt die Augen.

R 37	Reizt die Atmungsorgane.
R 38	Reizt die Haut.
R 39	Ernste Gefahr irreversiblen Schadens.
R 40	Irreversibler Schaden möglich.
R 41	Gefahr ernster Augenschäden.
R 42	Sensibilisierung durch Einatmen möglich.
R 43	Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich.
R 44	Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluß.
R 45	Kann Krebs erzeugen.
R 46	Kann vererbare Schäden verursachen.
R 48	Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition.
R 49	Kann Krebs erzeugen beim Einatmen.
R 50	Sehr giftig für Wasserorganismen.
R 51	Giftig für Wasserorganismen.
R 52	Schädlich für Wasserorganismen.
R 53	Kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben.
R 54	Giftig für Pflanzen.
R 55	Giftig für Tiere.
R 56	Giftig für Bodenorganismen.
R 57	Giftig für Bienen.
R 58	Kann längerfristig schädliche Wirkungen auf die Umwelt haben.
R 59	Gefährlich für die Ozonschicht.
R 60	Kann die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen.
R 61	Kann das Kind im Mutterleib schädigen.
R 62	Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen.
R 63	Kann das Kind im Mutterleib möglicherweise schädigen.
R 64	Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen.
R 65	Gesundheitsschädlich: Kann beim Verschlucken Lungenschäden verursachen.

10.1.2 Kombination der R-Sätze

R 14/15	Reagiert heftig mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase.
R 15/29	Reagiert mit Wasser unter Bildung giftiger und hochentzündlicher Gase.
R 20/21	Gesundheitsschädlich beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
R 20/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken.
R 20/21/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut.
R 21/22	Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.
R 23/24	Giftig beim Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
R 23/25	Giftig beim Einatmen und Verschlucken.
R 23/24/25	Giftig beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut.
R 24/25	Giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.

R 26/27	Sehr giftig Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
R 26/28	Sehr giftig Einatmen und Verschlucken.
R 26/27/28	Sehr giftig Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut.
R 27/28	Sehr giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken.
R 36/37	Reizt die Augen und die Atmungsorgane.
R 36/38	Reizt die Augen und die Haut.
R 36/37/38	Reizt die Augen, Atmungsorgane und die Haut.
R 37/38	Reizt die Atmungsorgane und die Haut.
R 39/23	Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen.
R 39/24	Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut.
R 39/25	Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Verschlucken.
R 39/23/24	Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
R 39/23/25	Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und Verschlucken.
R 39/24/25	Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken
R 39/23/24/25	Giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
R 39/26	Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen.
R 39/27	Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut.
R 39/28	Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Verschlucken.
R 39/26/27	Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung der Haut.
R 39/26/28	Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen und durch Verschlucken.
R 39/27/28	Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
R 39/26/27/28	Sehr giftig: ernste Gefahr irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
R 40/20	Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen.
R 40/21	Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut.
R 40/22	Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Verschlucken.
R 40/20/21	Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
R 40/20/22	Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen und Verschlucken.
R 40/21/22	Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
R 40/20/21/22	Gesundheitsschädlich: Möglichkeit irreversiblen Schadens durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
R 42/43	Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich.
R 48/20	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen.
R 48/21	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition bei Berührung mit der Haut.
R 48/22	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Verschlucken.
R 48/20/21	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Ein-

	atmen und bei Berührung mit der Haut.
R 48/20/22	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und Verschlucken.
R 48/21/22	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition bei Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
R 48/20/21/22	Gesundheitsschädlich: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen, Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
R 48/23	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen.
R 48/24	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition bei Berührung mit der Haut.
R 48/25	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Verschlucken.
R 48/23/24	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und bei Berührung mit der Haut.
R 48/23/25	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Einatmen und Verschlucken.
R 48/24/25	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition durch Berührung mit der Haut und durch Verschlucken.
R 48/23/24/25	Giftig: Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition .
R 50/53	Sehr giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkung haben.
R 51/53	Giftig für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkung haben.
R 52/53	Schädlich für Wasserorganismen, kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkung haben.

10.1.3 Sicherheitsratschläge (S-Sätze)

S 1	Unter Verschuß aufbewahren.
S 2	Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen.
S 3	Kühl aufbewahren.
S 4	Von Wohnplätzen fernhalten.
S 5	Unter .. aufbewahren (geeignete Flüssigkeit vom Hersteller anzugeben).
S 6	Unter ... aufbewahren (inertes Gas vom Hersteller anzugeben).
S 7	Behälter dicht geschlossen halten.
S 8	Behälter trocken halten.
S 9	Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren.
S 12	Behälter nicht gasdicht verschließen.
S 13	Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten.
S 14	Von ... fernhalten (inkompatible Substanzen sind vom Hersteller anzugeben).
S 15	Vor Hitze schützen.
S 16	Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen.
S 17	Von brennbaren Stoffen fernhalten.
S 18	Behälter mit Vorsicht öffnen und handhaben.
S 20	Bei der Arbeit nicht essen und trinken.
S 21	Bei der Arbeit nicht rauchen.
S 22	Staub nicht einatmen.
S 23	Gas/Dampf/Rauch/Aerosol nicht einatmen /geeignete Bezeichnung(en) vom Hersteller anzugeben.

- S 24 Berührung mit der Haut vermeiden.
- S 25 Berührung mit den Augen vermeiden.
- S 26 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren.
- S 27 Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen.
- S 28 Bei Berührung mit der Haut sofort mit viel ... abspülen (vom Hersteller anzugeben).
- S 29 Nicht in die Kanalisation gelangen lassen.
- S 30 Niemals Wasser hinzugießen.
- S 33 Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladung treffen.
- S 34 Nicht definiert!
- S 35 Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden.
- S 36 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen.
- S 37 Geeignete Schutzhandschuhe tragen.
- S 38 Bei unzureichender Belüftung Atemschutzgerät anlegen.
- S 39 Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
- S 40 Fußboden und verunreinigte Gegenstände mit ... reinigen (vom Hersteller anzugeben).
- S 41 Explosions- und Brandgase nicht einatmen.
- S 42 Bei Räuchern/Versprühen geeignetes Atemschutzgerät anlegen (geeignete Bezeichnung vom Hersteller anzugeben).
- S 43 Zum Löschen ... verwenden (vom Hersteller anzugeben; wenn Wasser die Gefahr erhöht anfügen: "Kein Wasser verwenden").
- S 45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich diese Etikett vorzeigen).
- S 46 Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen.
- S 47 Nicht bei Temperaturen über ... °C aufbewahren (vom Hersteller anzugeben).
- S 48 Feucht halten mit ... (vom Hersteller anzugeben).
- S 49 Nur im Originalbehälter aufbewahren.
- S 50 Nicht mischen mit ... (vom Hersteller anzugeben).
- S 51 Nur in gut belüfteten Bereichen verwenden.
- S 52 Nicht großflächig für Wohn- und Aufenthaltsräume verwenden.
- S 53 Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.
- S 56 Diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen.
- S 57 Zur Vermeidung einer Kontamination der Umwelt geeigneten Behälter verwenden.
- S 59 Information zur Wiederverwendung/Wiederverwertung beim Hersteller/Lieferanten erfragen.
- S 60 Dieser Stoff und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen.
- S 61 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen/Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen.
- S 62 Bei Verschlucken kein Erbrechen herbeiführen. Sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder dieses Etikett vorzeigen.

10.1.4 Kombination der S-Sätze

- S 1/2 Unter Verschuß und für Kinder unzugänglich aufbewahren.
- S 3/7 Behälter dicht geschlossen halten und an einem kühlen Ort aufbewahren.

S 3/9	Behälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort aufbewahren.
S 3/9/14	An einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von ... aufbewahren (die Stoffe, mit denen Kontakt vermieden werden muß, sind vom Hersteller anzugeben).
S 3/9/14/49	Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort, entfernt von ... aufbewahren (die Stoffe, mit denen Kontakt vermieden werden muß, sind vom Hersteller anzugeben).
S 3/9/49	Nur im Originalbehälter an einem kühlen, gut gelüfteten Ort aufbewahren.
S 3/14	An einem Kühlen, von ... entfernten Ort aufbewahren (die Stoffe, mit denen Kontakt vermieden werden muß, sind vom Hersteller anzugeben).
S 7/8	Behälter trocken und dicht geschlossen halten.
S 7/9	Behälter dicht geschlossen und an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren.
S 7/47	Behälter dicht geschlossen und nicht bei Temperaturen über ...°C aufbewahren (vom Hersteller anzugeben).
S 20/21	Bei der Arbeit nicht essen, trinken, rauchen. Diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfall-entsorgung zuführen.
S 24/25	Berührungen mit den Augen und der Haut vermeiden.
S 29/56	Nicht in die Kanalisation gelangen lassen. Diesen Stoff und seinen Behälter der Problemabfall-entsorgung zuführen.
S 36/37	Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen.
S 36/37/39	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
S 36/39	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
S 37/39	Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen.
S 47/49	Nur im Originalbehälter bei einer Temperatur von nicht über ...°C (vom Hersteller anzugeben) aufbewahren.

Lebenslauf

Persönliche Daten:	Frauke Meyer, geb. Knüppel geb. am 20. Oktober 1970 in Hamburg
Schulbildung:	
1975 – 1980	Vor- und Grundschule Stübenhofer Weg in Hamburg
1980 – 1986	Gymnasium Neuwiedenthal in Hamburg
1986 – 1989	Oberstufenzentrum Süderelbe (Gymnasium) in Hamburg Abitur: Mai 1989
Hochschulausbildung:	
10/90 – 12/95	Chemiestudium an der Universität Hamburg Studienschwerpunkt: Biochemie
13.02.1992	Vordiplom Thema der Diplomarbeit : „Bestimmung der Oxidation von Glutathion und Lipiden in Leberzellen durch Anthrachinone“, angefertigt von 6/95 – 12/95 in der Abteilung für Toxikologie der Universität Hamburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. J. Westendorf
15.12.1995	Abschluß: Diplomchemiker
seit 10/96	Aufbaustudium der Molekularbiologie an der Universität Hamburg
Promotion:	
seit 8/96	Promotion angefertigt in der Fraunhofer Arbeitsgruppe für Toxikologie und Umweltmedizin und in der Abteilung für Toxikologie der Universität Hamburg, Leitung Herr Prof. Dr. H. Marquardt. Betreuung der Promotion von Herrn Prof. Dr. J. Westendorf Thema der Arbeit: „Untersuchungen zur Induktion der 8-oxo-dGTPase - ein Enzym der oxidativen Streßabwehr“
Auslandsaufenthalte:	
09/97 - 03/98	Forschungsaufenthalt im Labor von Herrn Dr. E. Fiala, American Health Foundation, Valhalla, NY, USA
Berufliche Fortbildung:	
19.10.1995	abgelegte Sachkenntnisprüfung nach § 5 der Chemikalienverbotsverordnung
seit 1996	Weiterbildung zur Fachtoxikologin der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie (DGPT)
Veröffentlichungen:	
	F. Knueppel , J. Westendorf „Determination of 8-Oxo-dGTPase activity in cultured cells by HPLC with electrochemical detection“ 5 th Annual Meeting of The Oxygen Society 1998
	Knüppel, F., Westendorf, J. „Bestimmung der 8-Oxo-2'-deoxyguanosin-5'-triphosphat-pyrophosphohydrolase Aktivität in Zellkulturen mit Hilfe der hochauflösenden Flüssigkeitschromatographie und elektrochemischer Detektion“ (Kurzvortrag) 40. Frühjahrstagung der DGPT 1999
	F. Meyer, E. Fiala, J. Westendorf „Induction of 8-oxo-dGTPase activity in human lymphoid cells and normal fibroblasts by oxidative stress“ Toxicology (in press)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Fraunhofer Arbeitsgruppe für Toxikologie und Umweltmedizin und in der Abteilung für Toxikologie des Universitätskrankenhauses Eppendorf der Universität Hamburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Westendorf. Bei ihm möchte ich mich besonders für die Überlassung des Themas sowie für die Anregungen und die Diskussionsbereitschaft bedanken, aber auch dafür, daß ich mich im Rahmen meines Themas frei entfalten konnte.

Herrn Prof. Dr. H. Marquardt danke ich für die Überlassung des Arbeitsplatzes und für die kontinuierliche Förderung meiner Weiterbildung.

Herrn Dr. Emerich Fiala und Herrn Hongshan Li (American Health Foundation, Valhalla NY, USA) danke ich für die außerordentlich liebenswürdige, persönliche und wissenschaftliche Aufnahme in ihren Arbeitskreis und für die hilfreiche Unterstützung bei der Entwicklung der HPLC-Analytik zur Messung der 8-oxo-dGTPase Aktivität in Zellkulturen.

Bei allen Kollegen und Kolleginnen, die durch ihre Hilfsbereitschaft und Diskussionsbereitschaft zum Gelingen dieser Arbeit beitragen, möchte ich mich herzlich bedanken. Ganz besonders möchte ich mich bei Frau Sabine Schröder bedanken für ihre ständige Hilfsbereitschaft auf experimenteller Ebene, besonders beim Arbeiten mit Zellkulturen.

Ein ganz großes Dankeschön möchte ich meinem lieben Studienkollegen Herrn Dipl.-Chem. Rüdiger Harmel aussprechen für seine moralische Unterstützung und für seine stets aufbauenden und aufmunternden Worte.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern für die Unterstützung während meiner Ausbildung. Bei meiner Schwester Dörte möchte ich mich für ihren unerschütterlichen Glauben am Gelingen dieser Arbeit sowie für ihre geduldigen Aufmunterungen bedanken.

Zu guter Letzt danke ich Helge, der auf seine liebevolle Art sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat