

## 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/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 Sauerstoffspezies (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  $\text{Ca}^{2+}$  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.  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sup>2+</sup> 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<sub>κ</sub>B, in the mechanisms of the gene regulation of antioxidative enzymes by oxidative stress, has to be proofed in further studies.