

**Zur Bedeutung von etheno-(ϵ)-DNA-Addukten
in der Karzinogenese : Ihre genspezifische
Induktion und Reparatur**

Dem Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“ eingereichte

Dissertation

vorgelegt von
Dipl.-Chem. Boris Alejandro Zielinski
aus Guayaquil / Ecuador

Kaiserslautern, 21 Februar 2001

Meinen Eltern
und
meinem wissenschaftlichen Ziehvater

Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt ...

... Herrn Prof.Dr.H.Bartsch für das interessante Thema und das entgegengebrachte Vertrauen.

... Herrn Prof.Dr.G.Eisenbrand für die Vertretung dieser Arbeit vor dem Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern.

... Herrn Prof.Dr.Ernst für die Übernahme des Vorsitzes des Prüfungsausschuß
... in ganz besonderem Maße Dr.M.Hergenhahn für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit, seine stete Diskussionsbereitschaft, sein Vertrauen und sein stets offenes Ohr.

... Frau Dr.M.Hollstein für ihre Unterstützung und die sehr wertvollen Tips bei der Entwicklung verschiedener Methoden im Rahmen dieser Arbeit.

... Herrn Dr.J.Nair für die Bereitstellung seiner HPLC-Systeme, Standardlösungen und für manchen hilfreichen Tip bei der Entwicklung der HPLC-Methode.

... Frau A.Weninger für die Einführung in die Tücken der Zellkultur, Ihre Hilfe beim kultivieren meiner Zellen und vor allem für die schöne und oft sehr witzige Zeit im Labor.

... Frau U.Schmitt für ihre Hilfe, ihre stets witzige aufmunternde Art und ganz besonders den kollegialen Streichen, die den Laboralltag stets erhellen.

... Herrn K.-R.Mühlbauer für seine Hilfe beim Sequenzieren meiner Proben und seine kollegiale Unterstützung.

... Dr.C.Wörth für seine Freundschaft und seinen Zuspruch in Zeiten des Mißerfolgs.

... Herrn Benner (Abt. Biostatistik) für die statistische Auswertung meiner Daten.

Weiterhin gilt mein Dank ...

... Frau I.Hofmann, Frau C.Ditrich, Herrn G.Würtele, Herrn O.Zelesny, Herrn R.Owen und allen anderen nicht erwähnten Kollegen der Abteilungen Toxikologie und Krebsrisikofaktoren sowie Genetische Veränderungen in der Karzinogenese für die schöne Zeit am DKFZ.

... und nicht zuletzt Ulrike.

Inhalt :**Abkürzungsverzeichnis**

1.	Einleitung	1
2.	Theoretischer Hintergrund	4
2.1	Theorie zu DNA Addukten	4
2.1.1	Chemische Karzinogenese	4
2.1.2	Metabolische Aktivierung chemischer Karzinogene	7
2.1.3	DNA Addukte	8
2.1.3.1	Exogen erworbene DNA Addukte	10
2.1.3.2	Endogen erworbene DNA Addukte	13
2.1.4	ϵ -DNA Addukte	16
2.1.4.1	Geschichte der etheno (ϵ)-DNA-Addukte	16
2.1.4.2	Promutagenes Potential von etheno (ϵ)-DNA-Addukten	17
2.1.4.3	Bildung von etheno-DNA-Addukten in vivo	19
2.1.4.4	Endogen gebildete etheno-DNA-Addukte	21
2.1.4.5	Reparatur von etheno-DNA-Addukten	25
2.2	Theorie zu Mitochondrien	26
2.2.1	Aufbau und Biologie der Mitochondrien	26
2.2.2	Die mitochondriale Atmungskette (oxidative Phosphorylierung)	28
2.2.3	Das mitochondriale Genom (mtDNA)	30
2.2.4	Mitochondriale DNA, Krankheit und Altern	32
2.2.5	Mitochondriale Mutationen und Krebs	36
2.2.6	Mitochondrien und Apoptose	37
2.2.7	DNA-Reparatur in Mitochondrien	39
3.	Aufgabenstellung	42

4.	Material und Methoden	44
4.1	Allgemeine Materialien und Methoden	44
4.1.1	Materialien und Geräte	44
4.1.2	Allgemeine Methoden	46
4.1.3	Statistische Auswertung	51
4.2	DNA Adduktanalytik	51
4.2.1	Enzymatische DNA - Hydrolyse von 2-Chloracetaldehyd oder Zigarettenrauch behandelten Raji Zellen	51
4.2.2	Messung von Nukleosiden nach enzymatischer Hydrolyse aus DNA von 2-Chloracetaldehyd oder Zigarettenrauch behandelten Raji Zellen mittels UV-HPLC	52
4.2.3	Messung von etheno - (ϵ) - desoxyadenosin - Addukten aus DNA von 2-Chloracetaldehyd oder Zigarettenrauch behandelten Raji Zellen mittels F-HPLC	52
4.2.4	Messung von etheno - (ϵ) - desoxyadenosin - Addukten aus mtDNA von 2-Chloracetaldehyd (100 μ M) behandelten Raji Zellen mittels F - HPLC	53
4.3	Genspezifischer Nachweis von etheno-(ϵ)-DNA-Addukten in mitochondrialen Genen	53
4.3.1	Nachweis von etheno-(ϵ)-dA-Addukten in einem mitochondrialen Gen mittels SELBIODD (<u>S</u> election of <u>b</u> iotinylated <u>d</u> amaged <u>D</u> NA) Test	53
4.4	Mutationsanalytik	55
4.4.1	Auswahl der mitochondrialen Zielsequenz	55
4.4.2	Bestimmung des Gehaltes an mtDNA in Raji Zellen durch kompetitive PCR mit anschließendem Restriktionsenzymverdau	56
4.4.3	Restriktionstellen Mutations-Test (RSM Test)	56
4.4.4	DPD Test	57
4.4.5	DNA Sequenzierung	58
4.4.6	Deletionsanalyse für die "Common Deletion _{4977 bp} " in mtDNA	58

5.	Ergebnisse	59
5.1	Einfluß von 2-Chloracetaldehyd auf Wachstum, DNA-Replikation, -Reparatur und mitochondriale Aktivität von Raji-Zellen	59
5.1.1	Wachstumskurven von Raji-Zellen nach Exposition mit 2-Chloracetaldehyd	59
5.1.2	Nachweis von BrdU-Einbau nach 2-Chloracetaldehyd-Inkubation (UDS Test)	60
5.1.3	2-Chloracetaldehyd-abhängige Bildung von DNA-Quervernetzungen in Raji Zellen. Nachweis durch den `Comet-Assay` (Einzelzell-Mikrogelelektrophorese)	62
5.1.4	MTT-Test zur Überprüfung der mitochondrialen Aktivität	62
5.1.5	Zusammenfassung des Einflusses von 2-Chloracetaldehyd auf Wachstum, DNA-Replikation, -Reparatur und mitochondriale Aktivität von Raji-Zellen	64
5.2	DNA Adduktanalytik	64
5.2.1	Etablierung einer HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion zur Bestimmung von etheno-Desoxyadenosin-Addukten aus DNA	64
5.2.2	Bestimmung des Detektionslimits der verwendeten HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion	65
5.2.3	Analyse und Quantifizierung von etheno-Desoxyadenosin-Addukten in zellulärer DNA nach Inkubation mit 2-Chloracetaldehyd	67
5.2.4	Analyse und Quantifizierung von etheno-Desoxyadenosin-Addukten in zellulärer DNA nach Inkubation mit Zigarettenrauchlösung (CS)	68
5.2.5	Qualitativer Nachweis von etheno-Desoxyadenosin-DNA-Addukten in mitochondrialer DNA	70
5.2.6	Zusammenfassung der Ergebnisse der etheno-Desoxyadenosin-DNA-Adduktanalytik	72
5.3	Nachweis der genspezifischen Induktion von etheno-DNA-Addukten in mitochondrialen Genen	73
5.3.1	Nachweis von etheno-(ϵ)-dA-Addukten in einem mitochondrialen Gen mittels SELBIODD (<u>S</u> election of <u>b</u> iotinylated <u>d</u> amaged <u>D</u> NA) Test	73

5.3.2	Zusammenfassung der Ergebnisse zum Nachweis der genspezifischen Induktion von etheno-DNA-Addukten in mitochondrialer DNA	76
5.4	Mutationsanalytik	77
5.4.1	<u>R</u> estriktion <u>s</u> chnittstellen <u>M</u> utations - Test (RSM-Test)	77
5.4.2	" <u>D</u> ouble <u>P</u> CR <u>D</u> igestion" (DPD) - Test	80
5.4.2.1	Bestimmung des Detektionslimits des DPD-Tests	82
5.4.2.2	Ergebnisse des DPD-Tests nach 2-Chloracetaldehyd-Inkubation	84
5.4.2.3	Ergebnisse des DPD-Tests nach Zigarettenrauch-Inkubation (Pilotexperiment)	86
5.4.3	Deletionsanalyse, Detektion der 4977 bp-Deletion in mitochondrialer DNA von mehrfach 2-Chloracetaldehyd inkubierten Raji-Zellen	88
5.4.4	Zusammenfassung der Mutationsanalysen	91
6	Diskussion	92
6.1	Diskussion des Einflusses von 2-Chloracetaldehyd auf Wachstum, DNA-Replikation, -Reparatur und mitochondriale Aktivität von Raji Zellen	92
6.2	Diskussion der DNA-Adduktanalytik	93
6.3	Diskussion der genspezifischen Induktion von etheno-DNA-Addukten in mitochondrialen Genen	95
6.4	Diskussion der Mutationsanalytik	97
7	Zusammenfassung	99
8	Literaturverzeichnis	101

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin	mut	mutiert
Abb.	Abbildung	MW	Mittelwert
ag	Attogramm (10^{-18} g)	nDNA	nukleäre DNA
AP	alkalische Phosphatase	ND1	Gen für NADH-Dehydrogenaseuntereinheit 1
ATP	Adenosintriphosphat	ND2	Gen für NADH-Dehydrogenaseuntereinheit 2
B[a]P	Benzo[a]pyren	ND3	Gen für NADH-Dehydrogenaseuntereinheit 3
bp	Basenpaare		
BrdU	Brom-desoxyuridin		
C	Cytosin		
CAA	2-Chloracetaldehyd	ng	Nanogramm (10^{-9} g)
CS	Zigarettenrauchlösung	nM	Nanomolar (10^{-9} Mol/l)
dA	Desoxyadenosin	NP1	Nuklease P1
dC	Desoxycytidin	nt	Nukleotid
dG	Desoxyguanosin	PCR	Polymerasenkettenreaktion
dT	Desoxythymidin	pg	Picogramm (10^{-12} g)
DNA	Desoxyribonukleinsäure	pH	potentia hydrogenii
DPD	Double PCR Digestion assay	pM	Picomolar (10^{-12} Mol/l)
ϵ	etheno	RNA	Ribonukleinsäure
ϵ A	etheno-Adenosin	mRNA	message-RNA
ϵ dA	etheno-Desoxyadenosin	tRNA	transfer RNA
EtOH	Ethanol	rRNA	ribosomale RNA
fg	Femtogramm (10^{-15} g)	RSM	Restriction Site Mutation assay
fM	Femtomolar (10^{-15} Mol/l)	SD	Standardabweichung
G	Guanin	SELBIODD	Selection of biotinylated damaged DNA
HAP1	humane AP-Endonuklease 1	T	Thymin
HE	2,3-Epoxy-4-hydroxynonanal	UDS-Test	unscheduled DNA synthesis Test
HPLC	high performance liquid chromatography	UV	ultraviolet-
IPPA	Immunaffinity purification- 32 P-Postlabelling analysis	wt	Wild Typ
M	molar (1 mol/l)		
mg	Milligramm (10^{-3} g)		
mM	Millimolar (10^{-3} Mol/l)		
μ g	Mikrogramm (10^{-6} g)		
μ l	Mikroliter (10^{-6} l)		
μ M	Mikomolar (10^{-6} Mol/l)		
MPG	3-Methyladenin-Gykosylase		
mtDNA	mitochondriale DNA		

1 Einleitung

In modernen westlichen Industrienationen ist Krebs nach Erkrankungen des Herz- / Kreislaufsystems die zweithäufigste Todesursache. So sterben pro Jahr in Deutschland rund 210000 Personen - rund ein Viertel aller Todesfälle - an bösartigen Neubildungen [1], während die Zahl der Neuerkrankungen rund 340000 pro Jahr beträgt. Die hohe Zahl der Todesfälle belegt, daß die Situation in der Krebsfrüherkennung und -therapie nach wie vor unbefriedigend ist. Hauptverantwortlich für die Krebsentstehung ist die Exposition gegenüber exogenen Faktoren, die in drei Kategorien eingeteilt werden können :

- physikalische Faktoren wie UV und / oder ionisierende Strahlung
- biologische Faktoren durch bestimmte Viren, Bakterien und chronische Entzündungen
- chemische Faktoren

Schätzungsweise sind 80 - 90 % aller Krebsfälle auf vermeidbare Expositionen zurückzuführen, während der Teil der genetisch bedingten Krebserkrankungen auf 5 bis 10 % geschätzt wird [1,2]. Als Hauptrisikofaktoren gelten neben Tabakkonsum (25 bis 30 %), Ernährungsgewohnheiten (20 bis 42 %), Alkoholmissbrauch (3 %) und berufliche Exposition (4 bis 8%) [1]. Somit stehen die Möglichkeiten der Krebsprävention vermehrt im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Allein durch die Aufgabe des Rauchens könnten in Deutschland jährlich 36000 bis 46000 krebsbedingte Todesfälle vermieden werden [1]. Nach heutigem Wissensstand ist die Krebsentstehung ein mehrstufiger Prozeß, bei dem die Schädigung des Erbgutes eine zentrale Rolle einnimmt [1-3]. Eine besondere Rolle fällt dabei chemischen Substanzen, genotoxischen Agentien, zu. So werden über 500 Chemikalien (20% aller chronisch - toxikologisch getesteten Substanzen) im Tierexperiment als krebsauslösend eingestuft [3]. 90 % aller beim Menschen als krebsauslösend eingestuft Substanzen bilden dabei spontan oder durch metabolische Aktivierung kovalente Modifikationen der DNA (*deutsch* : Desoxyribonukleinsäure (DNS) *engl.* : deoxyribonucleic acid), sogenannte DNA - Addukte [4]. Diese strukturellen Ver-

änderungen der Erbsubstanz stellen oftmals den ersten Schritt im Mehrstufenprozeß der chemischen Karzinogenese dar. Das Wissen, ob eine Chemikalie DNA-Addukte ausbildet und wenn in welchem Ausmaß, kann einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung von Krebsursachen und zu mechanistischen Betrachtungen der Krebsentstehung leisten. DNA-Addukte dienen dabei als interne individuelle Dosimeter für die Exposition eines Organismus gegenüber genotoxischen Substanzen und seine zellspezifische metabolische Kapazität, d.h. das Ausmaß der Umsetzung eines Karzinogens zu (einem) DNA-bindenden Metaboliten. Sie beschreiben daher letztendlich die biologisch effektive Dosis einer DNA - schädigenden Substanz [5]. Somit eignen sich DNA-Addukte als Biomarker für die Expositionskontrolle, was sie in den Mittelpunkt molekularepidemiologischer Studien rückt, die eine Abschätzung des Krebsrisikos in Abhängigkeit der Lebensgewohnheiten zum Ziel haben [1,5] oder im Sinne der Krebsprävention gefährdete Individuen finden und Gegenmaßnahmen einleiten wollen. Desweiteren können manche DNA-Addukte (vorallem große DNA-Addukte, von polyaromatischen Kohlenwasserstoffen) auch als Risikomarker nach dem Konzept der kumulativen unreparierten DNA-Schäden angesehen werden [5a]. Strukturelle Veränderungen des Erbgutes spielen, neben der Krebsentstehung, auch eine Rolle im Prozeß des Alterns und bei der Entwicklung von degenerativen Erkrankungen, besonders dann, wenn bei diesem Vorgang ein weiterer Teil des menschlichen Genoms, das mitochondriale Genom, betroffen wird [6].

DNA - Addukte treten *in vivo* nur in äußerst geringen Konzentrationen auf, da nur ein Bruchteil der Nukleotide innerhalb der DNA modifiziert werden und diese nur zu einem Teil DNA - Reparaturmechanismen entgehen. Die auf diesem Wege der DNA-Reparatur entgangenen DNA-Addukte können, aufgrund eines Fehleinbaus von Nukleotiden bei der Replikation, zu Mutationen führen. Typischerweise findet man 10 bis 1000 DNA - Addukte (z.B. Benz[a]pyren-Addukte) in einer Zelle. Für eine diploide Zelle mit ca. 6×10^9 Nukleotiden ergibt sich somit ein Adduktspiegel von 1 Addukt auf 10^6 bis 10^8 unmodifizierten Nukleotiden [7]. In Verbindung mit dem Umstand, daß biologisches Material in der Regel nur in sehr begrenztem Maße zur Verfügung steht, stellt die Untersuchung dieser prämutagenen Läsionen höchste Ansprüche an die Sensitivität der analytischen Methoden. Darüber hinaus ergibt sich aus der Summe der unterschiedlichen genotoxischen Substanzklassen und ihrer verschiedenen metabolischen Aktivierungswege eine Vielzahl möglicher DNA - Addukte [8]. Analog

zu den analytischen Methoden, die der Bestimmung von DNA - Adduktspiegel dienen, müssen auch molekularbiologische Methoden eine entsprechend hohe Sensitivität aufweisen, um die biologische Konsequenz dieser prämutagenen Läsionen aufzuklären. Abschließend bemerkt, werden DNA - Addukte als Biomarker in großangelegte molekularepidemiologische Studien miteinbezogen, was einen entscheidenden Beitrag zur Aufklärung und zum Verständnis der Entstehung von Krebs und degenerativen Erkrankungen sowie zur Aufklärung von lebensgewohnheitsbedingten Risikofaktoren, bedeuten könnte [14,22].

2 Theoretischer Hintergrund

2.1 Theoretischer Hintergrund zu DNA-Addukten

2.1.1 Chemische Karzinogenese

Der Arzt und Naturforscher *Paracelsus* beschrieb um 1500 vermutlich erstmals den Zusammenhang zwischen einer chemischen Substanz und Krebs, indem er eine Verbindung zwischen dem Lungenkrebs von Bergleuten und Rauschrot (As_4S_4 oder Realgar) vermutete [3]. Der Engländer *Percival Pott* beschrieb den Ruß als Ursache für den Hautkrebs an Scrotum und Oberschenkeln der Londoner Schornsteinfeger und war damit der erste, der eine chemische Substanz als Krebsursache einer Berufsgruppe zuordnete [9]. Anfang des 20. Jahrhunderts brachte der Beginn der experimentellen Krebsforschung die Bestätigung der Beobachtungen *Potts*, indem der japanische Pathologe *Yamagiwa* erstmals einen Krebs (Teerkrebs der Haut) im Tierexperiment chemisch induzieren konnte [10].

Entsprechend ihrem Wirkmechanismus werden heutzutage chemische Karzinogene in zwei Gruppen unterteilt [3] :

- Gruppe der genotoxischen Karzinogene
Diese Gruppe umfaßt DNA-reaktive Substanzen, die mit der DNA interagieren und dadurch mutagen wirken [11,12]. Hierbei kann man zwischen direkten Karzinogenen, die ohne metabolische Aktivierung mit der DNA interagieren (z.B. Nitrosamide [3]) und indirekten Karzinogenen, deren Karzinogenität erst einer metabolischen Aktivierung bedarf [13], unterscheiden. Zu dieser Klasse gehören zum Beispiel polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe [14,15], aromatische Amine [16-18], Nitrosamine [19] und Naturstoffe wie manche Pilzgifte [20].
- Gruppe der nicht-genotoxischen Karzinogene
Diese Gruppe umfaßt „epigenetische Karzinogene“ wie zum Beispiel Asbest, DDT, Östradiol, deren Wirkung vermutlich auf zytotoxischen, tumorpromovierenden oder pseudohormonellen Mechanismen beruht. In letzter Konsequenz beruht die karzinogene Wirkung dieser epigenetischen Karzinogene auf einer gesteigerten Mutationsrate, oxidativer Schädigung der

DNA, Veränderung der Genexpression oder Erhöhung der Proliferationsrate [21-25].

Es ist mittlerweile anerkannt, daß die Entstehung von Krebserkrankungen ein mehrstufiger Prozeß ist, bei dem die Schädigung der Erbsubstanz eine zentrale Stellung einnimmt. 1949 beschrieben *Berenblum* und *Shubik* ein Zwei-Stufen-Modell der chemischen Karzinogenese [26], welches aus somatischen Mutationen als tumorinitiierendem Schritt und der Tumorpromotion durch ein epigenetisches Ereignis zur Stimulation der Zellteilung besteht. Dabei proliferiert die initiierte Zelle unter Ausbildung eines Zellklons, der als benigner Tumor beschrieben wird. Dieses klassische Modell wurde durch den Begriff der Progression, des Vorgangs, der die Umwandlung des benignen Tumors zu einem invasiven und danach zu einem metastasierenden Tumor durch eine Anhäufung von verschiedenen genetischen Veränderungen beschreibt, erweitert. Auch das dreistufige Modell der chemischen Karzinogenese hat sich mittlerweile als zu einfach erwiesen, so daß es durch ein Modell ersetzt wurde, daß bis zu sechs voneinander unabhängige genetische und epigenetische Ereignisse beschreibt [2,27]. Dieses Mehrstufenmodell ist in Abbildung 1 dargestellt. Dabei wird dem Umstand Rechnung getragen, daß Krebs durch eine Akkumulation von strukturellen Veränderungen der DNA (Punkt-mutationen durch Karzinogen-DNA-Wechselwirkungen ausgelöst, Translokationen, chromosomale Verluste, somatische Rekombination oder DNA-Methylierung) oder durch Veränderung der Expression verschiedener Schlüsselgene entsteht [21, 27-30]. Eine zentrale Stellung nehmen dabei Protoonkogene (z.B. *ras*) und Tumorsuppressorgene (z.B. *p53*), sogenannte kritische Zielgene, ein [27,31]. Diese Gene kodieren für Proteine, die den Zellzyklus und das Zellwachstum regulieren. Fehlgeleitete Aktivierung von Protoonkogenen kann dabei zur Überexpression wachstumsfördernder Proteine, die die Zelle zu übermäßiger Vermehrung anregen, führen. Durch diese Dysregulation des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung erhöht sich das Risiko neoplastischer Transformationen. Demgegenüber tragen Tumorsuppressorgene zur Krebsentstehung bei, wenn diese inhibiert werden. Als Folge verliert die Zelle wichtige Proteine, die als Wachstumsbremsen fungieren und sie normalerweise an einer unangemessenen Vermehrung hindern [32]. Dies geschieht teils durch inhibierte Expression, teils durch Konformationsänderungen, die eine Inhibierung der Proteinaktivität zur Folge haben.

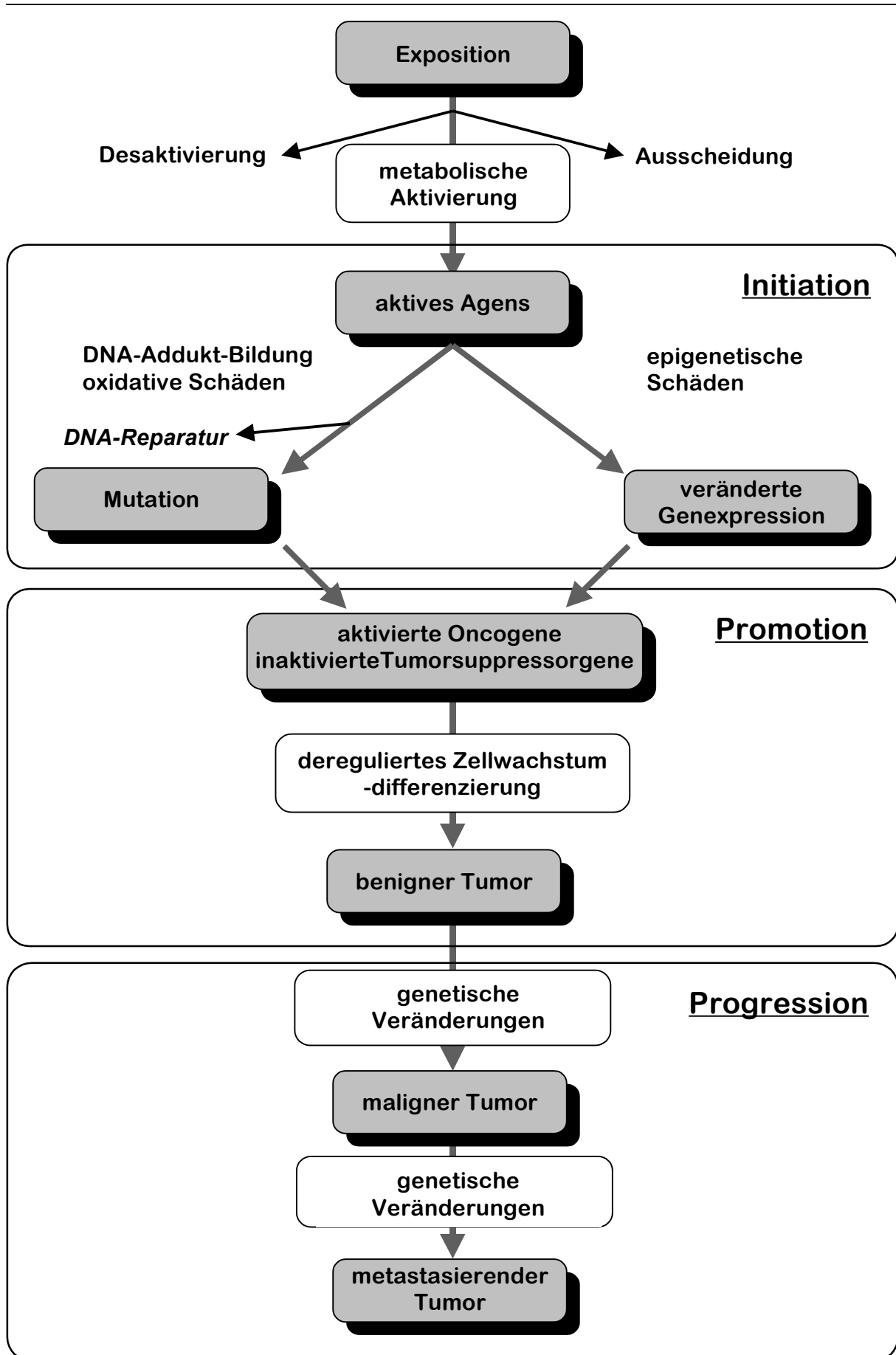


Abb. 1: Mehrstufenmodell der chemischen Karzinogenese [2].

2.1.2 Metabolische Aktivierung chemischer Karzinogene

Wie im Abschnitt 2.1.1 beschrieben, werden chemische Karzinogene in zwei Gruppen unterteilt. Der weitaus größere Teil dieser krebsauslösenden Substanzen gehört zu den genotoxischen Karzinogenen, die entweder direkt oder nach metabolischer Aktivierung mit zellulären Makromolekülen, insbesondere der DNA, interagieren und damit ihre mutagene Wirkung entfalten. Verantwortlich für die metabolische Aktivierung eines Karzinogenes sind vor allem Enzyme, die die Biotransformation von xenobiotischen Substanzen katalysieren. Dabei werden karzinogene Chemikalien als „Prokarzinogene“ durch metabolische Aktivierung in „proximale“ und letztendlich in „ultimale“ Karzinogene umgewandelt. Die so aktivierten elektrophilen Spezies reagieren mit nukleophilen Zentren wie DNA-Basen oder Proteinen unter Ausbildung kovalenter Modifikationen.

Allgemein kann man fremdstoffmetabolisierende Enzyme in zwei Klassen einteilen [33] : Der Phase-I-Metabolismus überführt unpolare, lipophile Stoffe in polare, hydrophilere Stoffe. Dies kann reduktiv durch Nitroreduktion oder Carbonylreduktion oder oxidativ durch Epoxidierung, Hydroxylierung, N- oder S-Desalkylierung geschehen. Wichtigste Vertreter dieses Metabolismus-Systems sind Enzyme der Cytochrom P450 – Familie. Es existieren mindestens 40 unterschiedliche Cytochrom P450-Enzyme in jeweils einer Spezies [8]. Einen Überblick über die Aktivierung von Karzinogenen durch Cytochrom P450-Enzyme gibt Abbildung 2.

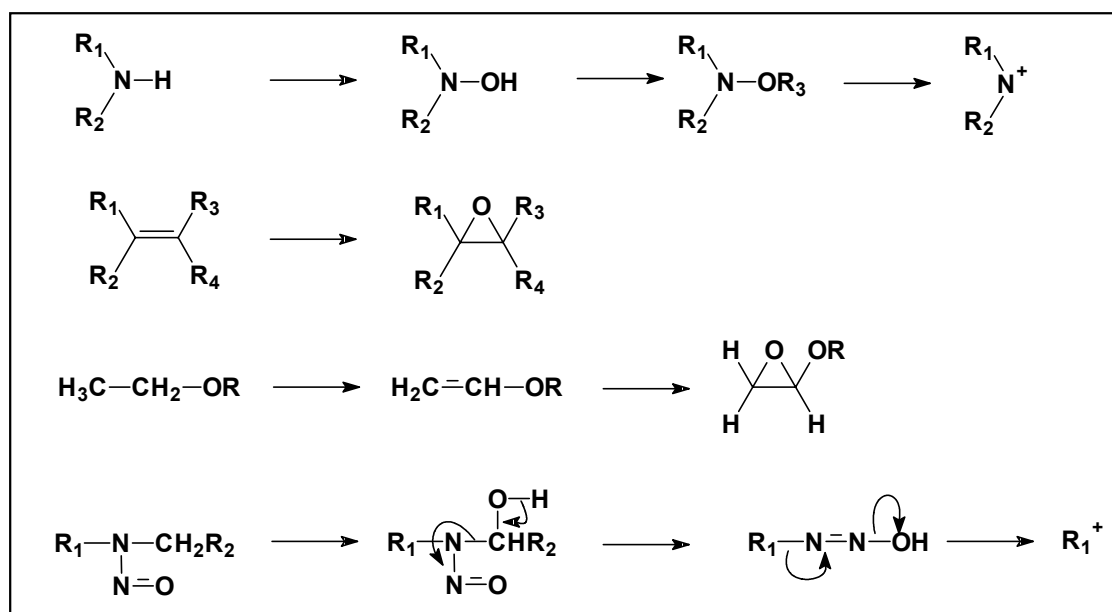


Abb.2 : Aktivierung von Chemikalien (sekundäre Amine, Alkene, Ether, N-Nitosamine) durch Cytochrom P450-Enzyme [7].

Enzyme des *Phase-II*-Metabolismus konjugieren Fremdstoffe oder *Phase-I*-Metabolite an hoch hydrophile, endogene Moleküle durch Glutathionkonjugation, Glucoronidierung, Acetylierung oder Sulfatierung, wodurch die Ausscheidung der Konjugate über die Niere oder Galle ermöglicht wird. Allerdings können auch Konjugate des *Phase-II*-Metabolismus aktivierte Spezies darstellen und als Elektrophile DNA-Addukte bilden. Ein Beispiel ist die Bildung eines N7-Guanyl-Adduktes durch die Aktivierung von Ethylendibromid durch Konjugation mit Glutathion, katalysiert durch die Glutathion-S-Transferase [8].

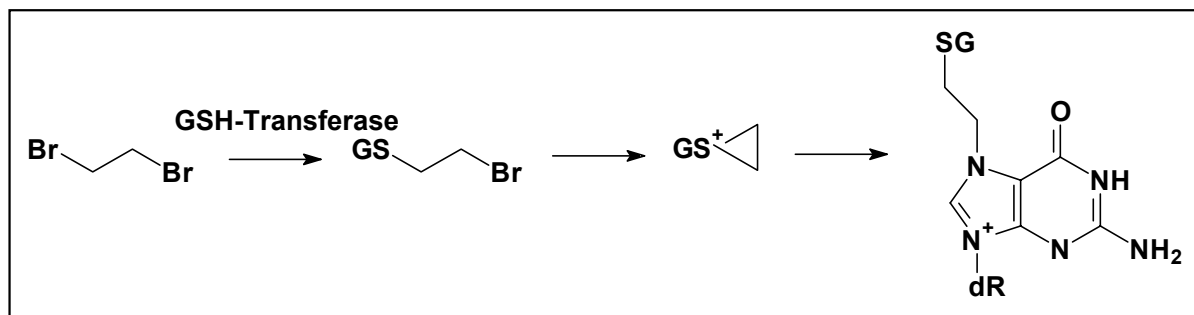


Abb. 3 : Aktivierung von Ethylendibromid durch Phase-II-Metabolismus. (GSH = Glutathion, dR = Desoxyribose) [8].

2.1.3 DNA Addukte

Auerbach et al. [11] beschrieben 1947 bei Untersuchungen der Mutagenität von Senfgas in *Drosophila* die DNA als Zielmolekül dieser Chemikalie. *Brookes* und *Lawley* [34] zeigten 1964 die Bindung polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe an Nucleinsäuren von Mäusen und *Miller* [12] beschrieb 1970, daß aromatische Amine ebenfalls kovalent mit der DNA reagieren. Die Reaktionsprodukte der DNA mit Chemikalien werden als DNA-Addukte bezeichnet. Diese DNA-Addukte gelten als Vorläufer von Mutationen, da es im Zuge der Replikation an den Positionen der Modifikation oder in deren unmittelbaren Nähe zu Basensubstitutionen, Deletionen oder Leserasterverschiebungen kommen kann [35-40]. Reaktionen von chemischen Karzinogenen mit der DNA können zu einer Vielzahl von unterschiedlichen DNA-Modifikationen führen. Für alkylierende Agentien kommen zum Beispiel 12 Positionen an den Nucleobasen und am Zucker-Phosphat-Rückgrat für die Alkylierung eines DNA-Stranges in Frage. Abbildung 4 gibt einen Überblick über die vier wichtigsten Möglichkeiten der DNA-Adduktbildung und die jeweiligen Angriffspunkte an den nucleophilen Zentren der vier Nucleobasen.

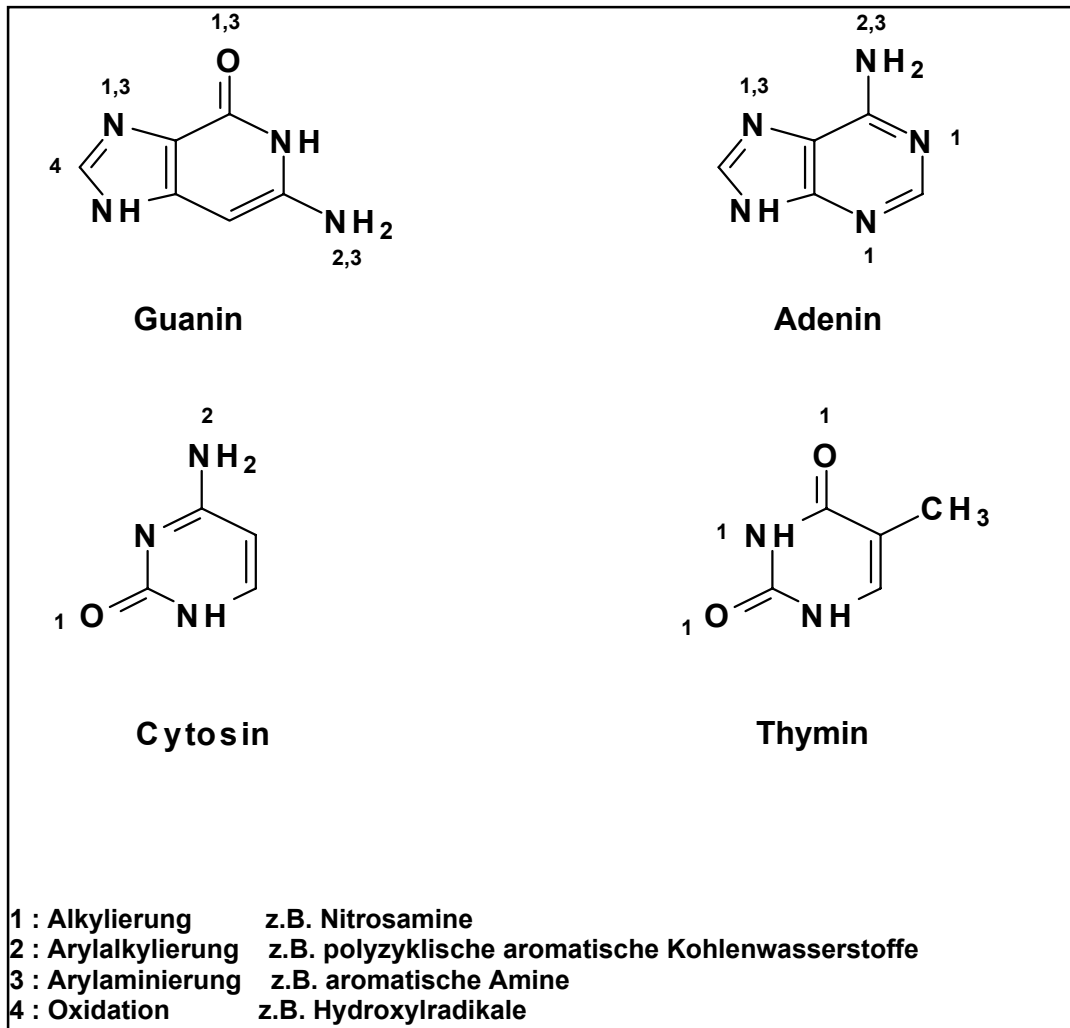


Abb. 4 : Wichtige Adduktierungsreaktionen und die entsprechenden Angriffszentren der DNA-Basen.

DNA-Addukt-bildende Substanzen können entsprechend ihres Ursprungs in endogene oder exogene Risikofaktoren unterteilt werden [41]. Zu Beginn der DNA-Addukt-forschung standen in erster Linie exogene Faktoren wie zum Beispiel Umweltgifte im Mittelpunkt des Interesses. Aufgrund einer stetigen Weiterentwicklung von Nachweismethoden ist es heute sogar möglich, DNA-Addukte genotoxischer Nebenprodukte des normalen Metabolismus zu detektieren. Eine eindeutige Trennung zwischen exogenen und endogenen Faktoren ist allerdings nicht immer möglich, da zum Beispiel manche Nitrosamine sowohl endogen gebildet werden, als auch exogen (z.B. in Zigarettenrauch) vorkommen können [3].

2.1.3.1 Exogen erworbene DNA Addukte

Die wichtigsten Vertreter dieser Klasse sind :

1. *Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) :*

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe sind Umweltschadstoffe, die bei der unvollständigen Verbrennung von organischem Material entstehen. Sie sind zum Beispiel in Teer, Ruß, Petroleum, Ölen, Autoabgasen und Tabakrauch enthalten. Der wichtigste Vertreter dieser Klasse ist das Benzo[a]pyren (B[a]P), welches oxidativ durch das Cytochrom-P450 Enzymsystem in vier optisch aktive 7,8,9,10-Tetrahydrobenzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxide metabolisiert werden kann, die dann als ultimative Karzinogene mit der DNA zu N²-, N7-Guanyl oder N⁶-Adenyl-Addukten reagieren können [3,8]. Weitere Vertreter dieser Klasse sind auch 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen, 3-Methylcholanthren, und 5-Methylchrysen. Die krebsauslösende Wirkung dieser Substanzklasse, durch die Induktion von Mutationen (z.B. im *ras*-Protoonkogen), und die Bedeutung von PAH-Addukten bei Tumoren der Lunge als Folge von Zigarettenrauch sind mittlerweile allgemein anerkannt [14,40].

2. *Aromatische Stickstoffverbindungen :*

Diese Substanzklasse läßt sich in folgende Unterklassen aufteilen :

- Arylamine
- heterozyklische aromatische Amine
- aromatische Nitroverbindungen

Arylamine kommen nicht natürlich vor, sondern werden als Farbstoffe für die Arzneimittelherstellung und als Antioxidantien synthetisch hergestellt. Zu ihnen gehören zum Beispiel Anilin und 4-Aminobiphenyl.

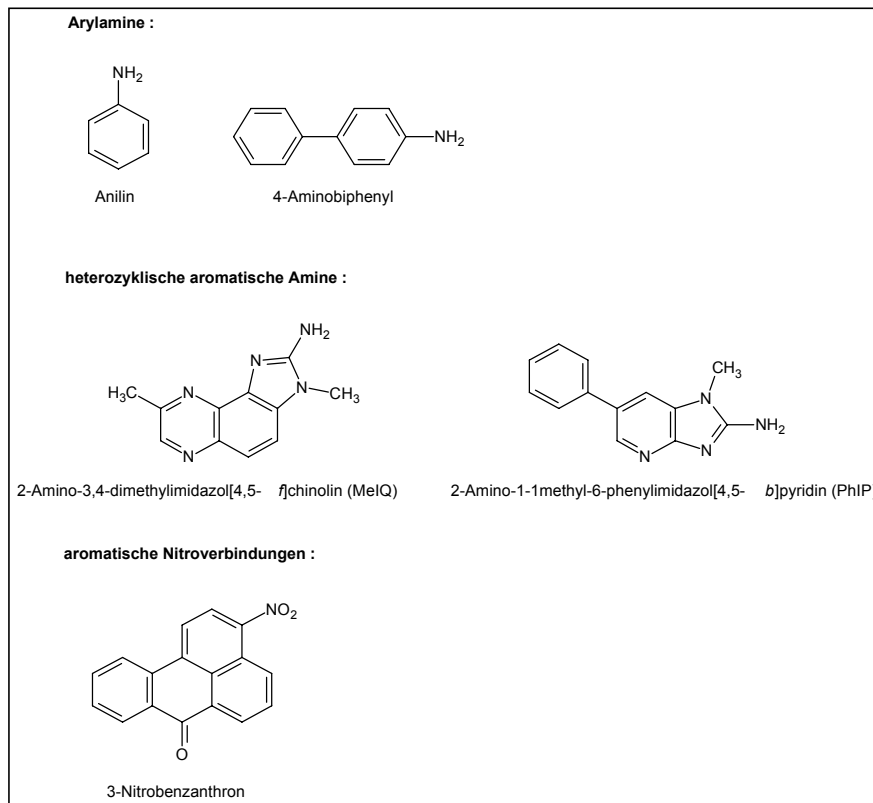


Abb. 5 : Genotoxische aromatische Stickstoffverbindungen [3].

Die metabolische Aktivierung erfolgt über eine Cytochrom-P450-katalysierte N-Hydroxylierung [8]. Die gebildeten N-Hydroxylamine bilden in sauren Medien direkt, nach erfolgter Sulfatierung durch Sulfotransferasen oder nach Acetylierung durch Acetyltransferasen elektrophile Nitreniumionen, die als ultimative Karzinogene die DNA an den Basen angreifen können.

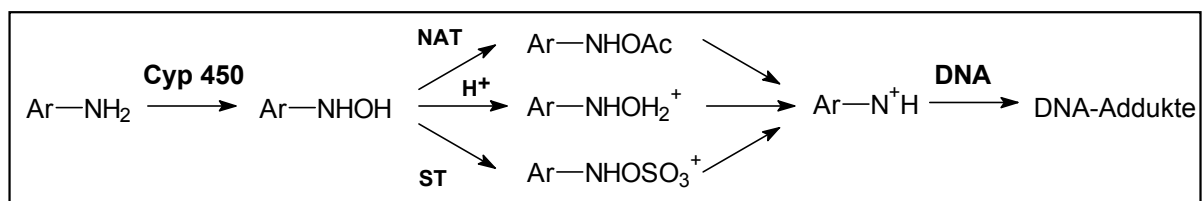


Abb. 6 : Metabolische Aktivierung aromatischer Amine (NAT = N-Acetyltransferase, ST = Sulfotransferase) [3].

Eine besondere Stellung im Hinblick auf den Zusammenhang zwischen Krebserkrankungen und Lebensgewohnheiten nehmen heterozyklische Amine ein [43]. Diese Substanzklasse, deren quantitativ wichtigster Vertreter 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridin (PhIP) ist, entsteht durch die Pyrolyse von Aminosäuren beim Braten von Fisch und Fleisch. Die mutagene Wirkung von

gebratenem Fisch und Rindfleisch ist bereits vor 20 Jahren im Ames-Test nachgewiesen worden [44,45]. Auch hier erfolgt der Angriff an die DNA-Basen durch ein Nitreniumion. Die bis heute charakterisierten Addukte heterozyklischer aromatischer Amine sind ausschließlich N²- und C8-Guanyl-Addukte [43]. Besonderes Interesse erlangte in jüngster Vergangenheit 3-Nitrobenzanthron als Umweltgift in Dieselabgasen. Diese Substanz zeigte im Ames-Test die höchste bisher gemessene Mutagenität aromatischer Mono-Nitroverbindungen [46]. *In vitro* erfolgt die Bildung ihrer Addukte durch reduktive Aktivierung mittels Zink, Xanthinoxidase oder eines Rattenleberhomogenates (S9-Mix) [47].

3. Alkylantien

DNA-alkylierende Substanzen finden während der Chemotherapie von Krebspatienten eine Anwendung. So beruht die therapeutische Wirkung des Chemotherapeutikums cis-Platin (Diamino-dichlorplatin(II)) auf der kovalenten Modifikation von Nukleobasen, indem es an die N7-Position von Guanin und Adenosin bindet [48,49]. Aufgrund der Quervernetzung zweier DNA-Stränge durch dieses Agens kommt es zu Strangbrüchen und einer Inhibierung der DNA-Replikation [50,51]. Alkylantien sind auch als Umweltgifte von Bedeutung. Einen Überblick über die alkylierende Wirkung von N-Nitrosoverbindungen (z.B. aus Lösungsmitteln, Zigarettenrauch und Lebensmitteln) nach metabolischer Aktivierung gibt Abbildung 7 [4,19].

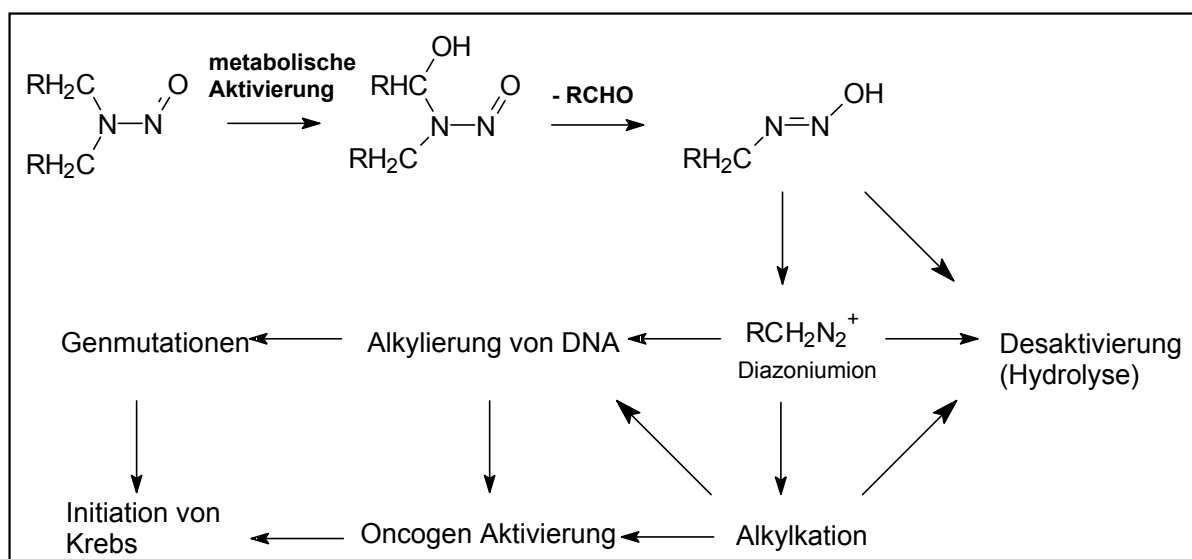


Abb. 7 : Metabolismus und Adduktbildung von N-Nitrosodialkyl-Verbindungen (in Teilen aus: Eisenbrand, Metzler, Toxikologie für Chemiker, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York 1994)

4. *Naturstoffe*

Einige der potentesten Karzinogene werden durch Mikroorganismen und Pilz gebildet. So ist das Stoffwechselprodukt des Schimmelpilzes *Aspergillus flavus* Aflatoxin B₁ eines der wirksamsten Leberkarzinogene. Nach Epoxidierung durch das Cytochrom P450-Enzymsystem kommt es zur kovalenten Bindung an die DNA. Dabei entfallen in einem zellfreien *in vitro* System ungefähr 90 % der gesamten Aflatoxin B₁-DNA-Bindung auf das N7-Guanyl-Addukt [52], welches zu einer stärker persistierenden Pyrimidin-Form hydrolysiert werden kann [53]. Zu den pflanzlichen Karzinogenen werden unter anderem Safrol und Aristolochiasäure, ein Inhaltsstoff der *Aristolochiaceen* (*Osterluzei*), gezählt. Letztere wird reduktiv durch Nitroreduktasen metabolisch aktiviert [54] und bildet N6-Adenin und N2-Guanin-Addukte [55]. Diese Addukte sind in der Lage, in der Ratte Mutationen im Protoonkogen H-ras zu induzieren [56] und eine tumorauslösende Wirkung in Niere und Harnleiter beim Menschen wird aktuell diskutiert [57].

2.1.3.2 Endogene DNA-Addukte

Durch Verbesserungen auf dem Gebiet der DNA-Addukt-Analytik stehen chemische Modifikationen der DNA-Basen ausgelöst durch normale physiologische Prozesse vermehrt im wissenschaftlichen Interesse. Substanzen endogenen Ursprungs umfassen :

- Oxidantien
- Reaktive Stickstoffspezies
- Oxidationsprodukte von Fettsäuren
- Intermediate unterschiedlicher Metabolisierungswege [41].

So wurden bei Untersuchungen der Karzinogenität von Vinylchlorid und Ethylcarbammat (Urethan) strukturell verwandte DNA-Addukte in Kontrolltieren detektiert [58]. Auch wenn viele endogene Substanzen kein akutes toxisches Potential besitzen, wird ihr schädigender Beitrag aufgrund der lebenslangen Exposition diskutiert [59].

a) *DNA-Schädigung durch endogene Oxidantien*

Oxidative Schädigung der DNA liefert den Hauptteil der endogenen DNA-Schädigungen [60]. Die ausgeschiedene Menge an oxidierten Nukleobasen in der Ratte beträgt 70000 Addukte pro Zelle pro Tag [61]. Diese oxidativen Veränderungen werden vermutlich durch Superoxidanionradikale ($O_2^{\bullet-}$) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2) hervorgerufen [41], die als Nebenprodukte der Zellatmung entstehen können. So kann H_2O_2 zum Beispiel auch durch Monoaminoxidasen des Neurotransmitterkatabolismus gebildet werden [62]. In *Escherichia coli* konnte auch gezeigt werden, daß Mutanten, die defizient an sauerstoffabfangenden Proteinen wie Superoxiddismutase oder Katalase sind, eine erhöhte Rate an Spontanmutationen aufweisen [63-65]. Ein Hauptprodukt oxidativer DNA-Schädigungen ist 8-Oxo-2'-desoxyguanin (8-oxo-dGua) [60] aber auch 2-Hydroxy-2'-desoxyadenin (2-OH-dAde) [66] und 5-Hydroxy-2'-desoxycytidin und seine Desaminierungsprodukte 5-Hydroxyuracil und Uracilglycol konnten nachgewiesen werden [67].

b) *DNA-Schädigung durch Fettsäureoxidation*

Ungesättigte Fettsäuren stellen im Vergleich zur DNA bedeutend bessere Zielmoleküle für Oxidantien dar. Die Reaktion von Fettsäuren mit Oxidantien löst allerdings eine autokatalysierte Reaktionskaskade aus, bei der zahlreiche genotoxische Substanzen gebildet werden können [68]. Unter diesen Fettsäuremetaboliten nehmen Malondialdehyd und verschiedene 4-Hydroxyalkenale (z.B. *trans*-4-Hydroxy-2-nonenal) oder 2-*trans*-alkenale (z.B. Acrolein, Crotonaldehyd und Hexenal) eine bedeutende Stellung ein. In Anwesenheit von Hydroperoxiden können diese Enale epoxidiert werden und exozyclische DNA-Addukte (z.B. Etheno- und Propano-DNA-Addukte) mit Guanin, Adenin, und Cytosin bilden [69,70].

c) *DNA-Methylierung*

Die einzige natürlich vorkommende Modifikation von DNA in Eukaryonten ist die Methylierung der Position 5 von Cytosin unter der Bildung von 5-Methylcytosin [71]. Die Methylierung von Cytosin erfolgt enzymatisch unmittelbar nach der DNA-Synthese durch die (Cytosin-5)-methyltransferase (Mtase) [72]. Allerdings ist die Lage des 5-Methylcytosins nicht beliebig, sondern man findet es vorrangig, wenn das C direkt einem G vorangeht. Etwa 70% dieser CpG-Sites sind in eukaryontischer DNA methyliert [71,72]. Daraus ergibt sich ein Gesamtgehalt an 5-Methylcytosin von

3 – 10% aller Cytosine in Säuger-DNA [73]. Dem Methylierungsgrad wird eine bedeutende Funktion in der Genexpression und der Zelldifferenzierung zugesprochen, denn der Anteil an 5-Methylcytosin in aktiv transkribierten Genen wie dem Globin-Gen ist deutlich niedriger. Die niedrigere Methylierung aktiv transkribierter Gene bewirkt wahrscheinlich eine veränderte DNA-Struktur, so daß sie für aktivierende Proteine leichter zugänglich wird [74,75]. Da das Methylierungsmuster in verschiedenen Geweben bei einer hohen interindividuellen Übereinstimmung unterschiedlich ist, geht man davon aus, daß die Bedeutung der Methylierung mit der Aufrechterhaltung des jeweiligen Differenzierungsstatus einher geht [78]. Die Analyse von DNA aus Tumorgewebe ergab, daß sowohl epigenetische als auch genetische Veränderungen an den Zielsequenzen der Mtase zwei der häufigsten und konsistentesten Veränderungen von Tumorzellen darstellen [79-81]. Der Gehalt von mRNA der Mtase sowie deren Enzymaktivität ist in Tumorzellen deutlich höher als in normalen Zellen [82]. Dennoch findet man in Tumorzellen sowohl Hypo- als auch Hypermethylierung [83]. Als genetische Veränderungen findet man erhöhte Mutationsraten an CpG-Sites in *p53*- und *p16*-Genen [84]. Darüber hinaus wird davon ausgegangen, daß zirka 30% aller ererbten Keimbahnmutationen sich in CpG-Sites befinden [80]. Abbildung 8 gibt einen Überblick der möglichen genetischen Änderungen.

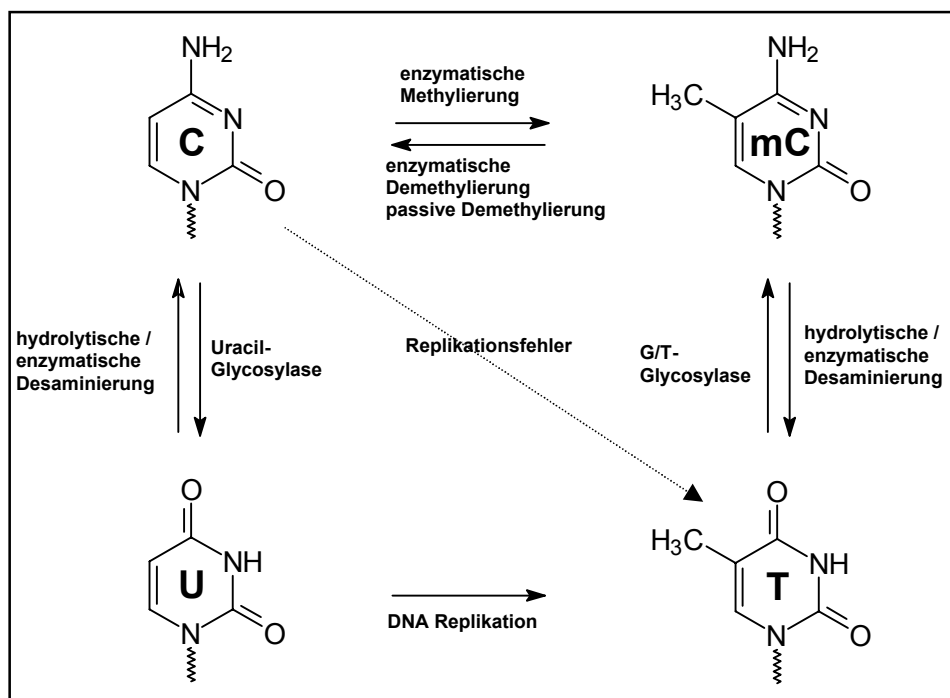


Abb. 8 : Genetische Veränderungen durch DNA-Methylierung ; C = Cytosin, mC = 5-Methylcytosin, T = Thymidin, U = Uracil [72].

2.1.4 Etheno (ϵ)-DNA-Addukte

2.1.4.1 Geschichte der etheno (ϵ)-DNA-Addukte

Etheno-DNA-Addukte sind exozyklische DNA-Addukte, die aufgrund einer Exposition der DNA mit exogenen Karzinogenen, wie Vinylchlorid oder Ethylcarbammat (Urethan) entstehen. Sie wurden erstmals im Jahre 1971 von *Kochetkov et al.* als Reaktionsprodukt der DNA Basen Adenin und Cytidin mit 2-Chloracetaldehyd beschrieben [85]. Etheno-DNA-Addukte resultieren aus der Reaktion von Nucleobasen mit etheno-Addukt-bildenden Karzinogenen direkt oder nach metabolischer Aktivierung, unter Bildung eines neuen Imidazol-Ringes. Es können vier mögliche etheno-DNA-Addukte gebildet werden : 1,N⁶-Ethenoadenosin (ϵ A), 3,N⁴-Ethenocytidin (ϵ C), N²,3-Ethenoguanosin und 1,N²-Ethenoguanosin (Abbildung 9).

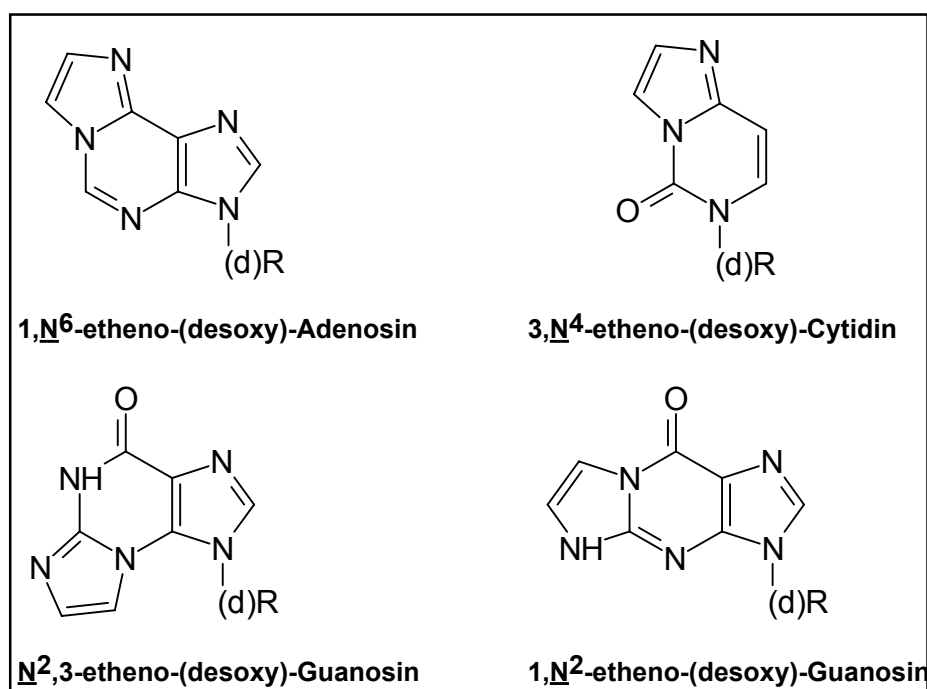


Abb. 9 : Strukturen der vier möglichen etheno (ϵ)-DNA-Addukten.

Im Jahre 1974 traten etheno-DNA-Addukte in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses, als gezeigt wurde, daß das Angiosarkom der Leber (ASL) , eine normalerweise sehr seltene Krebsart, durch Vinylchlorid, ausgelöst werden kann [86].

Auch in Nagern zeigte sich der karzinogene Effekt von Vinylchlorid, das wie in Menschen hauptsächlich Angiosarkome der Leber erzeugte [87]. Diese Ergebnisse hatten weltweit verschiedene Studien zur Folge, die zeigten, daß Vinylchlorid in Bakterien und anderen Organismen ein genotoxisches Potential aufweist [88,89]. Mutagenitätstests in *Salmonella typhimurium* zeigten im sogenannten Ames-Test, in Anwesenheit von Lebermikrosomen von Säugern, daß Basensubstitutionsmutationen induziert wurden [90]. Später zeigte sich, daß die Mutagenität von Chlorethylenoxid, dem ultimativen karzinogenen Metabolit von Vinylchlorid, auf fehlerkodierende DNA-Addukte zurückzuführen war und daß in erster Linie GC → AT Transitionen und in geringerem Ausmaß AT → TA Transversionen ausgelöst wurden [91,92]. Neben diesen Basensubstitutionen können aber auch weitere genotoxische Effekte wie mitotische Rekombination, chromosomale Aberrationen und Zelltransformationen auftreten [89]. Später wurden diese Beobachtungen von *Ballering et al.* bestätigt, indem sie ähnliche Ergebnisse bei Mutagenitätstests in *Drosophila* beobachten konnten [93,94]. Demgegenüber untersuchten *Chiang et al.* den genotoxischen Einfluß von Vinylchlorid und seiner Metaboliten Chlorethylenoxid und Chloracetaldehyd im *HPRT*-Gen in einer B-lymphoiden Zelllinie. Sie fanden, daß 10% der durch Vinylchlorid, 18% der durch Chlorethylenoxid und 45% der durch Chloracetaldehyd ausgelösten Mutationen Deletionen waren [95]. Es zeigte sich auch ein erhöhter Spiegel an Mutationen in *HPRT*-Gen in zirkulierenden Lymphozyten von Arbeitern, die hoch mit Vinylchlorid exponiert waren [96]. Diese Tatsache eröffnete die Möglichkeit, das Mutationsspektrum von Vinylchlorid und seinen Metaboliten auch im Menschen zu studieren.

2.1.4.2 Promutagenes Potential von etheno (ε)-DNA-Addukten

Die ersten Studien, die sich mit dem promutagenen Potential von etheno-DNA-Addukten beschäftigten, wurden mittels Transkriptions- beziehungsweise Replikations-Genauigkeitstests unter Zuhilfenahme von synthetischen, mit Chlorethylenoxid oder Chloracetaldehyd behandelten Polynukleotiden durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen, daß εdA einen Fehleinbau von G und A und εdC einen Fehleinbau von T und A zur Folge haben [97-99]. Eine Übersicht der promutagenen Eigenschaften von etheno-DNA-Addukten gibt Tabelle 1.

Läsion	DNA in vitro	in E.coli	in Säugorzellen
<i>εdA</i>	A→G, A→T > A→C	A→G > A→C, A→T	A→G > A→T, A→C
<i>εdC</i>	C→A, C→T > C→G	C→T, C→A	C→A, C→T > C→G
<i>N²,3-εdG</i>	G→A	G→A	---
<i>1,N²-εdG</i>	G→T, G→C	G→T, G→C, G→A	G→A > G→T

Tabelle 1 : Art der Basensubstitutionen ausgelöst von etheno-DNA-Addukten [100].

Viele weitere Studien sind mittlerweile durchgeführt worden, um das promutagene Potential von etheno-DNA-Addukten besser zu charakterisieren. In diesen Studien wurden sowohl „*Primer-extension-assays*“ als auch „*site-directed-mutagenesis assays*“ verwendet, in welchen ein einzelnes etheno-DNA-Addukt in ein Plasmid an einer definierten Stelle verwendet wurde. Nach dem Einführen des Plasmids und Replikation in einer Bakterie oder Säugorzelle wurden Sequenzveränderungen mittels DNA-Sequenzierung untersucht. Es zeigte sich, daß *εdA* sowohl in *E.coli* als auch in Nierenzellen von Affen überwiegend A→G Transitionen als auch in geringerem Maße A→T und A→C Transversionen zur Folge hat. *εdC* generiert C→A und C→T Mutationen und in geringerem Ausmaß auch C→G Mutationen. Zusätzlich hat *εdC* auch Deletionen von einer beziehungsweise zwei Basen zur Folge [101-104]. *N²,3-εdG* zeigte ausschließlich G→A Transitionen *in vitro* und in *E.coli* [105,106]. *1,N²-εdG* induziert verschiedene Typen von Mutationen. Es werden sowohl Basen Substitutionen als auch Leserasterverschiebungen um ein oder 2 Basen beobachtet [107]. Durch den Gebrauch eines intrachromosomalen „Site-specific“-Mutagenese Systems in chinesischen Hamsterovarien zeigten *Akasaka et al.* [108], daß neben den Basenaustauschmutationen auch zusätzlich noch Deletionen, Umlagerungen, Doppelmutanten und Basenaustauschmutationen in der Nähe des *1,N²-εdG*-Adduktes, aber nicht an der Stelle des Adduktes entstehen. Die mutagene Effektivität dieser exozyklischen DNA-Läsionen wird aber auch durch die Natur der Polymerase [107, 109] und durch den Sequenzkontext um das entsprechende Addukt herum bestimmt [110].

2.1.4.3 Bildung von etheno-DNA-Addukten *in vivo*

Bisher wurden drei etheno-DNA-Addukte *in vivo* detektiert. Dabei handelt es sich um ϵ dA, ϵ dC und $N^{2,3}$ - ϵ dG. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die *in vivo* in verschiedenen Geweben und Spezies detektierten etheno-DNA-Addukte.

Spezies und Gewebe	Exposition	(ϵdA/A) $\times 10^{-8}$	(ϵdC/C) $\times 10^{-8}$
Ratte - Leber	Kontrollen	0.02 – 10	0.03 - 24
	Vinylchlorid	5.5 \pm 1.0	8.3 \pm 1.2
	LEC Ratte	8.5 \pm 1.7	8.5 \pm 3.0
	Eisen + CCl ₄	2.5 \pm 1.0	3.0 \pm 2.0
Ratte - Lymphozyten	Kontrollen	4.3 \pm 1.2	4.8 \pm 1.4
	Vinylchlorid	6.2 \pm 2.1	13.3 \pm 6.0
Maus - Leber	Kontrollen	2.2 – 1.3	0.3 – 1.5
	Vinylcarbammat	6.2 \pm 1.3	3.7 \pm 0.8
Maus - Lunge	Kontrollen	0.2 – 1.5	0.1 – 1.2
	Vinylcarbammat	6.5 \pm 1.9	4.9 \pm 1.2
Mensch - Leber	Kontrollen	< 0.05 – 3.0	< 0.05 – 4.0
	Wilson's Syndrom	6.1 \pm 0.8	9.2 \pm 3.6
	Hämochromatose	4.7 \pm 3.3	6.4 \pm 1.2
Mensch – Leukozyten (Frauen)	MUFA – Diät (einfach ungesättigte Fettsäuren)	0.3 – 25	0.6 – 8.6
	PUFA - Diät (mehrfach ungesättigte Fettsäuren)	1.3 - 901	0.6 - 716

Tabelle 2 : *In vivo* detektierte etheno-DNA-Addukt-Level (ϵ dA und ϵ dC) in Nager und Mensch [100].

Kovalente Bindung von Vinylchlorid oder Ethylcarbammat an zelluläre Makromoleküle ist von der metabolischen Aktivierung dieser Substanzen durch ein Enzym der Cytochrom-P450 Monooxygenasen-Familie abhängig. Im Menschen und der Ratte wird Vinylchlorid durch das Enzym CYP 2E1 zu Chlorethylenoxid, das sich spontan zu Chloracetaldehyd umlagern kann, oxidiert. Diese Reaktion findet hauptsächlich in der Leber statt [111]. *In vitro* können sowohl Chlorethylenoxid als auch

Chloracetaldehyd mit der DNA unter Bildung von etheno-DNA-Addukten reagieren, wobei das Chlorethylenoxid als der ultimative, alkylierende, mutagene und karzinogene Metabolit von Vinylchlorid beschrieben wird [112]. Ethylcarbammat ist ein sehr potentes Karzinogen in Nagern, daß unter anderem zu Tumoren in Leber, Lunge und Haut führen kann [113,114]. Ethylcarbammat wird von CYP 2E1 in zwei Schritten metabolisiert. Der erste Schritt ist die Umsetzung zu der ungesättigten Verbindung Vinylcarbammat, die wiederum durch zu Vinylcarbamatoxid weiteroxidiert wird [115]. Ethylcarbammat bildet nach metabolischer Aktivierung dieselben DNA-Addukte wie Vinylchlorid. Den ersten Hinweis darauf, daß Ethylcarbammat zu etheno-DNA-Addukten reagieren kann, gaben *Ribovich et al.*, die ϵ A und ϵ C in Leber-RNA aus Mäusen, die mit Ethylcarbammat behandelt waren, nachwiesen [116]. Einen Überblick über die metabolische Aktivierung von Vinylchlorid und Ethylcarbammat und deren Reaktion zu etheno-DNA-Addukten gibt Abbildung 10.

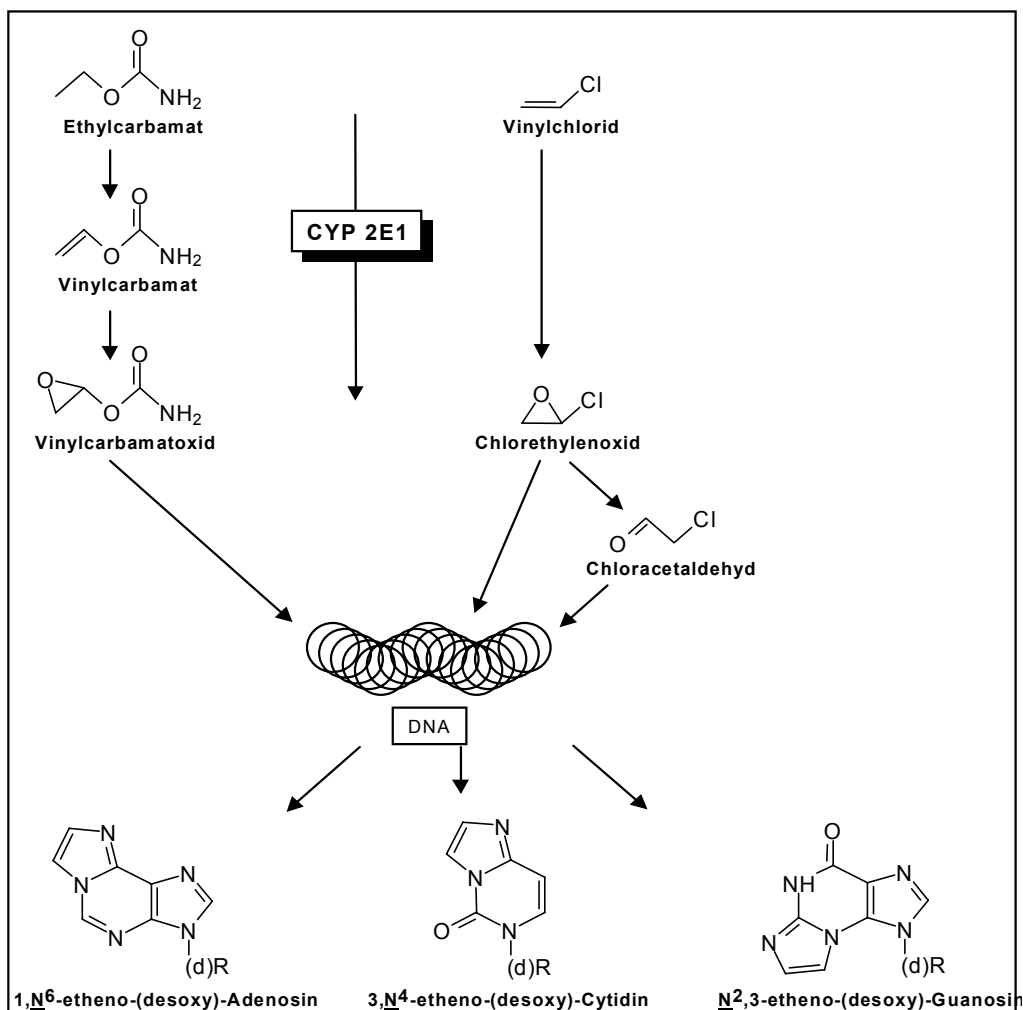


Abb. 10 : Metabolische Aktivierung und Reaktionen von Vinylchlorid und Ethylcarbammat (Guengerich et al. 1994).

2.1.4.4 Endogene Bildung von etheno-DNA-Addukten

Die Entwicklung von sehr sensitiven Methoden zur Analyse von DNA-Addukten, wie zum Beispiel Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) [117], High performance liquid chromatography / Radioimmunoassays (HPLC/RIA) [118] und Immunaффinitäts gekoppeltes ^{32}P -Postlabelling (IPPA) [119,120], erlaubte es, die Bildung von etheno-DNA-Addukten und deren Reparatur *in vivo* zu untersuchen. In den 90er Jahren erfuhren etheno-DNA-Addukte erneute Aufmerksamkeit, denn aufgrund der sensitiven Methoden, die zur Verfügung standen, konnte man den Hintergrund von etheno-DNA-Addukten in nicht exponierten Menschen und Nagern nachweisen. Diese Ergebnisse ließen einen alternativen endogenen Bildungsmechanismus dieser DNA-Addukte vermuten. Dieser Hintergrund an DNA-Addukten wird durch verschiedene Einflüsse beeinflusst (Abbildung 11).

- Ernährungseinflüsse :

Es wurde gezeigt, daß eine hohe Aufnahme von ω -6-mehrfachungesättigten-Fettsäuren (ω -6-PUFAs) in Frauen eine Erhöhung von etheno-DNA-Addukten, als Folge von erhöhter Lipidperoxidation (LPO), in Leukozyten zur Folge hatte [121].

- Genetische Einflüsse :

Desweiteren wurden erhöhte Level an etheno-DNA-Addukten in DNA der Leber bei Patienten mit genetischer Prädisposition für oxidativen Streß , erhöhte Lipidperoxidation aufgrund von Metallspeicherkrankheiten der Leber (Wilson's Syndrom und Hämochromatose), gefunden [122].

- Infektionen und entzündliche Einflüsse :

Entzündungen haben zur Folge, daß eine Kaskade von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffintermediaten gebildet wird, die direkt oxidative Schäden der DNA und / oder eine erhöhte Lipidperoxidation zur Folge haben, die wiederum zu erhöhten etheno-DNA-Addukt-Werten, über die Reaktion mit *trans*-4-Hydroxyalkenalen und deren Epoxiden, führt [123,124].

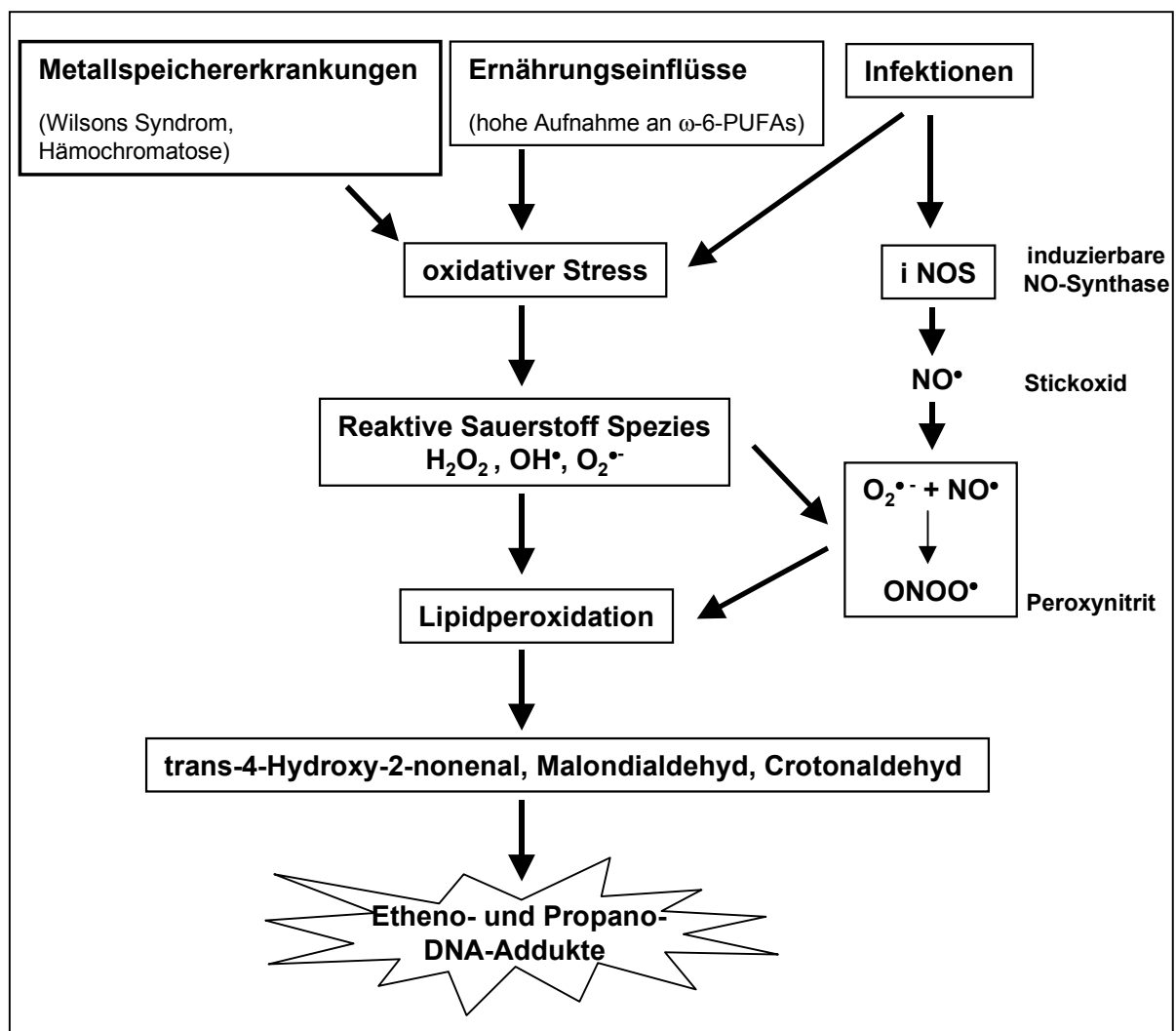


Abb. 11 : Hypothetisches Schema für karzinogene Faktoren, die zu endogenen reaktiven Spezies und exozyklischen DNA-Addukten führen [125].

Den ersten Hinweis, daß Lipidperoxidationsprodukte etheno-DNA-Addukte bilden können, zeigten *Sodum* und *Chung* [126]. Direkte Michael-Addition von *trans*-4-Hydroxy-2-nonenal mit den Nukleobasen erzeugten exozyklische, substituierte propano-DNA-Addukte. Zusätzlich identifizierten sie 1,N²-etheno-desoxyguanosin als Reaktionsprodukt von Desoxyguanosin mit *trans*-4-Hydroxy-2-nonenal (HNE), wenn der Reaktionsmischung ein Hydroperoxid zugegeben wurde. Man vermutete als reaktives Intermediat das 2,3-Epoxy-4-hydroxynonanal (HE). Nach und nach wurden weitere exocyclische-DNA-Addukte, unter ihnen auch substituierte Etheno- und Ethano-Derivate als Reaktionsprodukte der Nukleoside mit 2,3-Epoxy-4-hydroxynonanal charakterisiert [69]. Etheno-DNA-Addukte können auch in Reaktionen mit α,β - ungesättigten Aldehyden wie *trans*-4-Hydroxy-2-nonenal mit Nukleosiden (dA, dG) in Anwesenheit von Sauerstoff erhalten werden [127]. Diese

Reaktion suggeriert einen Reaktionsweg, der die Autoxidation dieser Enale beinhaltet. Modellsysteme der Lipidperoxidation brachten weitere Hinweise, daß etheno-DNA-Addukte *in vitro* und *in vivo* gebildet werden können. Abbildung 12 gibt einen Überblick über diesen Mechanismus.

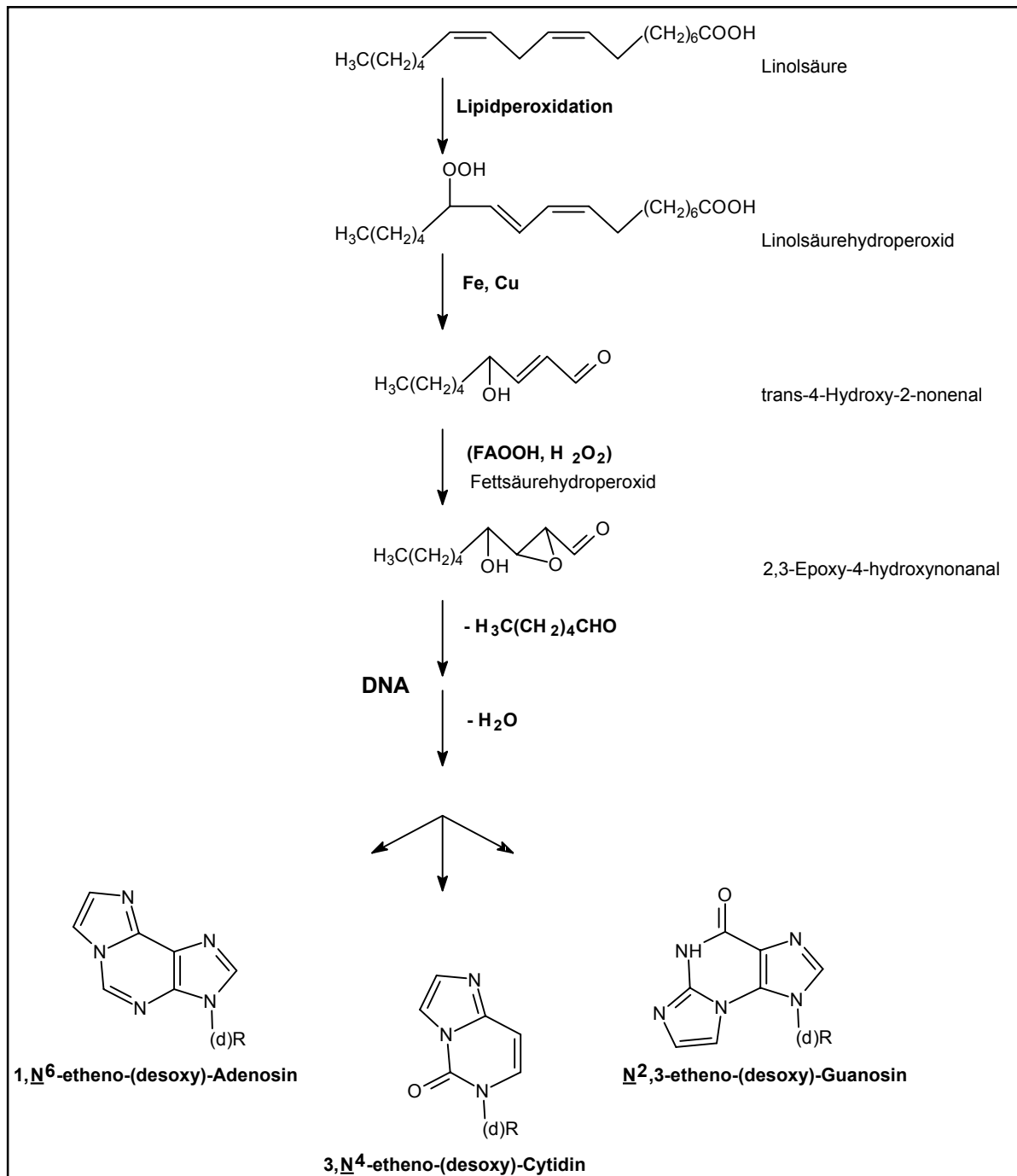


Abb. 12 : Mechanismus der etheno-DNA-Adduktbildung beim Prozeß der Lipidperoxidation [125].

Lipidperoxidations-induzierende Agentien wie zum Beispiel eine Überladung mit Eisen unter gleichzeitiger Gabe von Tetrachlorkohlenstoff (CCl₄), lösten erhöhte Werte an ϵ dA und ϵ dC in Ratten aus [125]. Diese Erhöhung an etheno-DNA-Addukten ist wahrscheinlich auf metallkatalysierte Fenton – oder Haber-Weiss-Reaktionen zurückzuführen. Unter diesen Bedingungen bilden sich Hydroxylradikale, die wiederum Lipidperoxidation auslösen, was die Bildung von Enalen wie *trans*-4-Hydroxy-2-nonenal zur Folge hat. Die Relevanz von etheno-DNA-Addukten in der Leberkarzinogenese zeigte sich an einem Tiermodell, der LEC-Ratte, für eine menschliche Metallspeicherkrankheit (Wilson's Syndrom) [128]. Diese Tiere zeigen eine Anreicherung von Kupfer in der Leber, was zu einer Hepatitis führt, die von einer erhöhten Lipidperoxidation in der Leber begleitet wird. Letztendlich entwickeln diese Tiere als Folge dieser Funktionsstörung hepatozelluläre Karzinome. Patienten, die an dem Wilson's Syndrom leiden, zeigen eine Akkumulation von Kupfer in der Leber aufgrund einer Mutation in einem Gen für ein Kupfer-bindendes Protein, was wiederum zu erhöhter Lipidperoxidation und letztendlich zu Leberschäden führt, falls sie nicht einer chelatisierenden Therapie unterzogen werden. *Nair et al.* untersuchten etheno-DNA-Addukt-Level in hepatischer DNA von Patienten mit Wilson'scher Krankheit und Hämochromatose, einer anderen vererbten Metallspeicherkrankheit, die sich durch Akkumulation von Eisen in der Leber auszeichnet. Beide Krankheiten haben ein stark erhöhtes Krebsrisiko der Leber zur Folge. Etheno-DNA-Addukt-Level in der Leber-DNA waren in diesen Patienten um Faktor drei bis vier mal höher als bei DNA aus gesunden Menschen. Die Spiegel an etheno-DNA-Addukten korrelierten mit dem Kupfergehalt in der Leber. Es wurde damit zum ersten Mal gezeigt, daß die Bildung von promutagenen etheno-DNA-Addukten mit vererbten Metallspeichererkrankungen der Leber und damit auch mit induzierter Lipidperoxidation assoziiert ist. Damit könnten diese exozyklischen DNA-Addukte neben den oxidativen DNA-Schäden für das erhöhte Leberkrebsrisiko bei diesen Patienten verantwortlich sein [122].

Die Überproduktion von Stickoxid (NO) findet unter pathophysiologischen Bedingungen statt, die bei Infektionen oder chronischen Entzündungen vorliegen [124]. Sowohl Infektionen als auch chronische Entzündungen gelten als Risikofaktoren für verschiedene Krebsarten. Die hierbei auftretenden DNA-Schäden, inklusive oxidierter DNA-Basen, ist auf das Hydroxylradikal und Peroxynitrit

zurückzuführen, das bei einer Reaktion von Stickoxid mit Superoxidanionen entsteht (siehe auch Abbildung 11). In einem Mausmodell wurde gezeigt, daß die Bildung von etheno-DNA-Addukten als Konsequenz der Stickoxidüberproduktion *in vivo* auftritt [123]. Diese Ergebnisse legen nahe, daß diese DNA-Schäden in der Entwicklung von Krebs, in Verbindung mit chronischen Entzündungen und persistierenden viralen, bakteriellen oder parasitären Infektionen eine Rolle spielen können [124].

2.1.4.5 Reparatur von etheno-DNA-Addukten

Es gibt klare Hinweise auf Reparatur von etheno-DNA-Addukten *in vitro* via Basen-Exzisions-Mechanismus. Der erste Hinweis kam von *Oesch et al.*, die die Exzision der Basen ϵ A und $N^2,3\text{-}\epsilon$ G aus Chloracetaldehyd-behandelter DNA nach Inkubation mit einem zellfreien Extrakt aus einer Rattenhirn-Tumorzelllinie beobachteten [129]. *Rydberg et al.* fanden, daß zellfreie Extrakte aus Menschen ein Protein enthielten, das eine starke Affinität zu ϵ dA in doppelsträngigen Oligonukleotiden aufwies [130]. Nach und nach gab es weitere Berichte, daß Zellhomogenate aus mononuklearen Blutzellen des Menschen eine ϵ A-Basen-freisetzende Aktivität besitzen [131], und daß humane Zellextrakte alle vier möglichen etheno-Basen aus Chloracetaldehyd-behandelter DNA ausschneiden können [132]. Die weitere Isolierung und Charakterisierung der DNA-Glykosylasen wurde von den Gruppen B. Singer in Berkeley und J. Laval in Villejuif vorangetrieben. *Singer et al.* demonstrierten, daß ein Protein, das an ϵ dA-Stellen bindet, dieselben Aktivitäten zeigt wie die isolierte humane 3-Methyladenin-DNA Glykosylase (MPG-Protein), die ebenfalls ϵ A aus DNA entfernt [133]. Saparbaev et al. bestätigten diese Beobachtung, daß das MPG-Protein die Base ϵ A aus DNA entfernt [134]. Diese Autoren zeigten, daß die analogen Proteine aus Ratten, Hefe (MAG-Protein) und *E.coli* (AlkA-Protein = 3-Methyladenin-Glycosylase II), alle in der Lage sind, ϵ A aus DNA zu entfernen, wobei die Proteine aus Säugern effizienter sind als die Analoga aus Hefe und *E.coli*. 1996 isolierten *Hang et al.* zwei verschiedene Glykosylasen aus zellfreien Extrakten von HeLa-Zellen, wobei die eine Glykosylase ϵ A und die andere ϵ C aus DNA freisetzt [135]. Saparbaev und Laval zeigten dann, daß die rekombinante humane Thymidin-DNA-Glykosylase und die Doppelstrang-Uracil-DNA-Glycosylase aus *E.coli* aus DNA ϵ C mittels einer Glykosylaseaktivität entfernen [136].

Die Aufreinigung dieser ϵ C-spezifischen Aktivität aus HeLa-Zellen bestätigte, daß es sich hierbei um die Thymin-DNA-Glykosylase (hTDG-Protein) handelt [137]. Erst kürzlich wurde gezeigt, daß ϵ dA-Schäden sowohl via den „short-“ als auch über den „long-patch-base-exision“ Mechanismus repariert werden [138]. Glykosylasen, die eine Aktivität gegenüber $N^2,3\text{-}\epsilon$ dG besitzen, wurden bis heute noch nicht charakterisiert. Allerdings fand man bei dem AlkA-Protein aus *E.coli* eine Aktivität gegenüber $N^2,3\text{-}\epsilon$ dG [139]. Abgesehen von den beschriebenen Fortschritten sind die Reparaturmechanismen für etheno-DNA-Addukte *in vivo* und deren Regulation noch nicht voll aufgeklärt und werden in den nächsten Jahren im Fokus der DNA-Reparaturforschung stehen.

2.2 Theoretischer Hintergrund zu Mitochondrien

Die Erforschung von Genetik und Funktion von Mitochondrien hat in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen. Verschiedene Forschungszweige, von der molekularen Biologie bis hin zur Medizin, beschäftigen sich mit diesem Forschungsgebiet. Es zeigte sich, daß Mitochondrien nicht nur für den Energiemetabolismus der Zelle verantwortlich sind, sondern auch, daß mitochondriale Fehlfunktionen bei der Entwicklung verschiedener gesundheitlicher Störungen, wie z.B. beim Prozeß des Alterns, bei der Entwicklung von neurodegenerativen Erkrankungen bis hin zu Krebs, eine wichtige Rolle spielen.

2.2.1 Aufbau und Biologie der Mitochondrien

Mitochondrien sind bakterienähnliche Zellorganellen mit einem Durchmesser von 0,5 bis 2 μm , die je nach Gewebe in unterschiedlicher Kopienzahl (~ 20 Mitochondrien / Spermatozoe, ~ 2000 Mitochondrien / Leberzelle) vorliegen. Sie machen, je nach Gewebe, bis zu 20% des Zelltrockengewichts, bis zu 35% des Gesamtzellproteins, bis 25% der Gesamtlipide (davon 2/3 Phospholipide) und etwa 10% des RNA-Bestandes, aus. Dabei nehmen sie in manchen Zellen bis zu 80% des Zellvolumens ein (z.B. in Photorezeptorzellen des Auges) [140, 141]. Mitochondrien liefern dabei immerhin etwa 90% der Energie, die Zellen für ihre Funktion brauchen [6].

Zusätzlich enthalten Mitochondrien ein 16569 bp großes zirkuläres Genom, das in mehrfacher Kopienanzahl (2 bis 10 Kopien / Mitochondrium) vorliegt und dabei 37 Gene, 13 Gene für Untereinheiten der Atmungskettenproteine, 22 t-RNAs und 2 rRNAs, kodiert. Abbildung 13 stellt den schematischen Aufbau eines Mitochondriums dar.

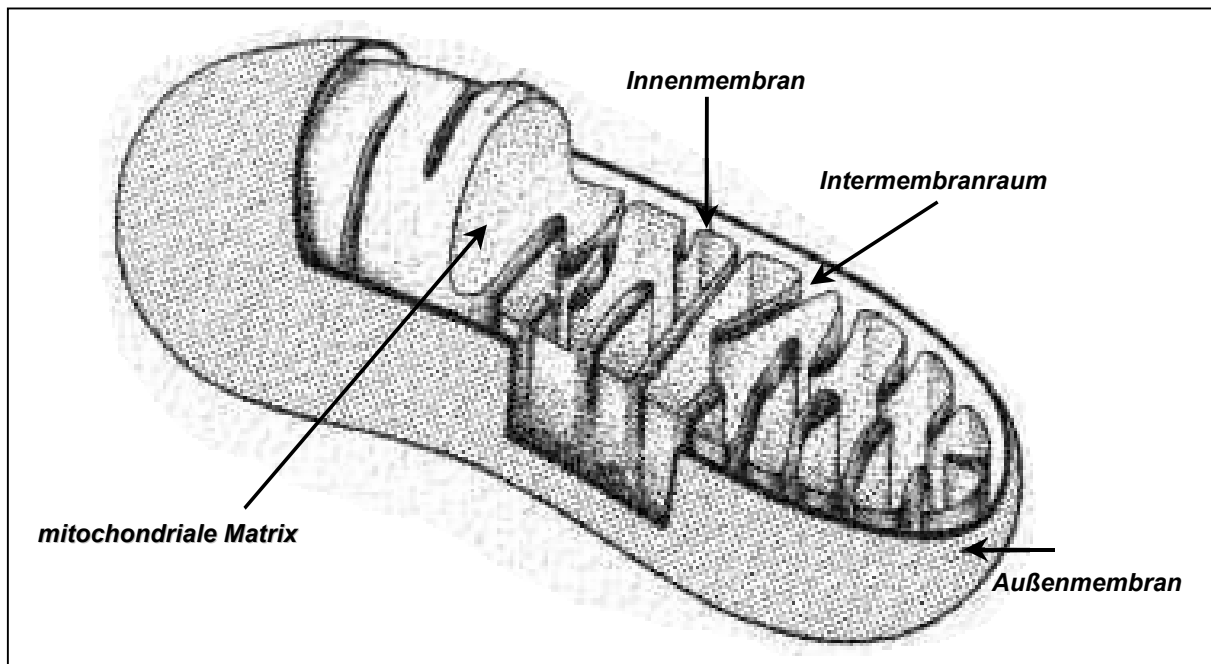


Abb. 13 : Schematischer Aufbau eines Mitochondriums

- *mitochondriale Matrix* :

Die mitochondriale Matrix enthält ein hochkonzentriertes Gemisch aus hunderten von Enzymen deren Erbinformation im Zellkern vorliegt, darunter auch diejenigen, die für die Oxidation von Fettsäuren, den Zitronensäure-Zyklus und die Pyruvat-Oxidation benötigt werden. Desweiteren enthält sie mehrere Kopien des mitochondrialen Genoms, spezielle mitochondriale Ribosomen, tRNAs und Proteine, die für die Expression der mitochondrialen Gene notwendig sind.

- *innere mitochondriale Membran* :

Die Innenmembran enthält große Mengen des Phospholipids *Cardiolipin*, dessen Fettsäurezusammensetzung zu über 80% aus Linolsäure besteht. Die Membran ist in zahlreiche *Cristae* gefaltet, die ihre Gesamtoberfläche vergrößern. Sie enthält Proteine aus drei verschiedenen Funktionskreisen :

-
- Proteine, die die Oxidationsreaktionen der Atmungskette durchführen,
 - einen Enzymkomplex namens ATP-Synthase, der in der Matrix ATP aus ADP und Phosphat synthetisiert,
 - spezifische Transportproteine, die den Transport von Metaboliten in die Matrix hinein und aus ihr heraus regulieren. Da über der Membran bei der oxidativen Phosphorylierung ein elektrochemischer Gradient gebildet wird, ist es unerlässlich, daß die Membran für die meisten kleinen Ionen undurchlässig ist.
 - *äußere mitochondriale Membran* :
Die äußere mitochondriale Membran enthält viele Moleküle *Porin*, ein Transportmembranprotein mit einer großen Pore, das für Moleküle einer Größe von < 5kDa durchlässig ist. Zu den anderen Proteinen dieser Membran gehören Enzyme der mitochondrialen Lipid-Synthese und Enzyme, die Lipid-Substrate in Formen umwandeln, die dann in der mitochondrialen Matrix verarbeitet werden können.
 - *Intermembranraum*
Hier sind mehrere Enzyme lokalisiert, die das aus der Matrix entlassene ATP zur Phosphorylierung anderer Nukleotide verwenden [142,143].

2.2.2 Die mitochondriale Atmungskette (oxidative Phosphorylierung)

Die Atmungskette in der inneren Mitochondrien-Membran enthält 5 Enzymkomplexe (Abbildung 14), von denen drei die hauptsächliche Funktion der Elektronenübertragung vom NADH zum Sauerstoff übernehmen. Diese sind der NADH-Dehydrogenase-Komplex (Komplex I), der Cytochrom b-c₁-Komplex (Komplex III) und der Cytochrom-Oxidase-Komplex (Komplex IV). Jeder dieser drei Komplexe arbeitet als „elektronenbetriebene Protonenpumpe“. Der Succinat-Dehydrogenase-Komplex (Komplex II) und der ATP-Synthase-Komplex (Komplex V), vervollständigen die Komplexe der Atmungskette. Die Übertragung der Elektronen zwischen den einzelnen Komplexen wird durch die mobilen Elektronen-Träger Ubichinon und Cytochrom c bewerkstelligt. Auf die einzelnen Komplexe wird im Folgenden etwas detaillierter eingegangen [142,143].

a) *NADH-Dehydrogenase (Komplex I)*

Er katalysiert den Elektronentransport von NADH auf Ubichinon. Dabei wird je ein Elektron von NADH freigesetzt und über ein Flavin und fünf Eisen-Schwefel-Zentren an Ubichinon weitergeleitet, das seine Elektronen dann auf Komplex III überträgt.

b) *Succinat-Dehydrogenase (Komplex II)*

Er katalysiert die Elektronenübertragung von Succinat auf Ubichinon. Auch hier werden die Elektronen über ein Flavin / Eisensystem übertragen.

c) *Cytochrom b-c₁ (Komplex III)*

Dieser Komplex katalysiert die Elektronenübertragung von Ubichinon auf Cytochrom c. In diesem Komplex werden die Elektronen über an Cytochrome gebundene Hämgruppen und einen Eisen-Schwefelkomplex übertragen.

d) *Cytochrom Oxidase (Komplex IV)*

Hier wird die Elektronenübertragung von Cytochrom c auf Sauerstoff katalysiert. Die Elektronen werden dabei über ein Cytochrom a/a₃-System und über ein Kupferprotein übertragen.

e) *ATP-Synthase (Komplex V)*

Durch den Protonenrückfluß aus dem Intermembranraum in die Matrix durch die ATP-Synthase wird die ATP-Synthese katalysiert.

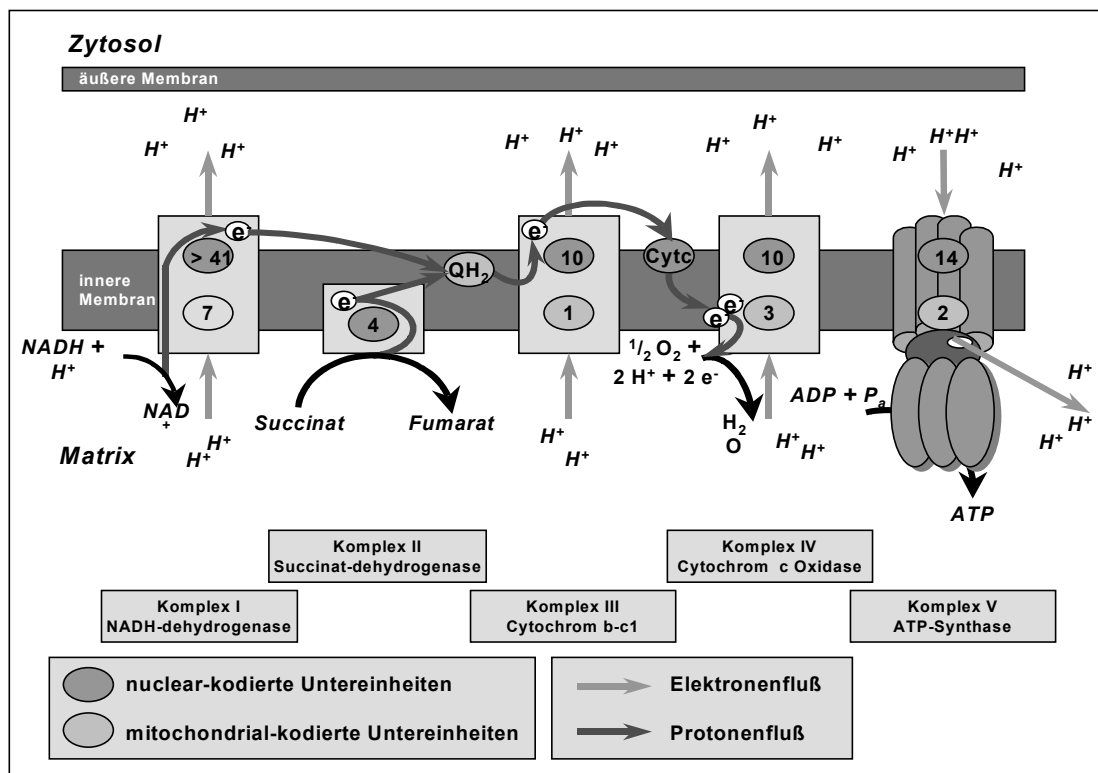


Abb.14 : Schematische Darstellung der Atmungskette.

In Mitochondrien wird ca. 90% des zellulären Sauerstoffs verbraucht. Da etwa 3% des Sauerstoffs der kompletten Reduktion zu Wasser entkommt und als O_2^{\bullet} freigesetzt wird, werden Mitochondrien als hauptsächliche Quelle intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (z.B. : $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , OH^{\bullet}), beziehungsweise als Quelle des oxidativen Streß im allgemeinen, angesehen. Bei einer Inhibierung der Atmungskette zum Beispiel durch Rotenon akkumulieren die Elektronen besonders in Komplex I und Ubichinon. Von hier aus können die Elektronen mit molekularem Sauerstoff zum Superoxidationradikal ($O_2^{\bullet-}$) reagieren. Das hier entstandene Superoxidationradikal wird durch die mitochondriale Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD) zu H_2O_2 umgesetzt, das wiederum durch die Katalase weiter metabolisiert wird. H_2O_2 wird in Anwesenheit von reduzierten Übergangsmetallen wie Fe^{2+} , Cu^{1+} zu Hydroxylradikalen (OH^{\bullet}) nach der *Fenton*-Reaktion umgesetzt. Chronische Exposition von reaktiven Sauerstoffspezies kann zu oxidativen Schäden an mitochondrialen und zellulären Proteinen, Lipiden (in Mitochondrien ist besonders Cardiolipin ein Zielmolekül) und Nukleinsäuren führen. Zusätzlich können in diesem Prozeß auch die Eisen-Schwefel-Zentren in den Komplexen der Atmungskette betroffen werden, was zu einem Zusammenbruch der mitochondrialen Energieproduktion führen kann [144].

2.2.3 Das mitochondriale Genom (mtDNA)

Mitochondrien besitzen ihr eigenes Genom, die mitochondriale DNA (mtDNA), welche in der mitochondrialen Matrix vorkommt. Jedes Mitochondrium besitzt mehrere Kopien dieses Genoms. Dieses Genom wird ausschließlich mütterlich vererbt, da in Spermien von Säugern nur wenige mtDNA Kopien (~50-75) enthalten sind, während die Eizelle eine sehr hohe Anzahl an mtDNAs enthält ($>10^5$). Nach der Befruchtung der weiblichen Eizelle wird die väterliche mtDNA aus dem Spermium aktiv abgebaut [148]. Die Konsequenz ist eine rein mütterliche Vererbung der mtDNA. Daher können Männer, die Mutationen in der mtDNA tragen, diesen genetischen Defekt nicht vererben. MtDNAs, die Deletionen tragen, werden wenn überhaupt nur von Müttern mit einem klinischen Erscheinungstyp an ihre Kinder weitergegeben [149]. Im Gegensatz dazu vererben Mütter, die eine heteroplasmische (sog. cytoplasmische Mischerbigkeit) Punktmutation in ihrer mtDNA tragen, diese Punktmutation in unterschiedlichen Anteilen auf ihre Kinder [150]. Neben dieser

Variabilität im Gehalt an mutierter mtDNA zeigten verschiedene Studien für die meisten pathogenen mtDNA-Mutationen, daß Mütter mit einem hohen Anteil dieser Mutationen öfter klinisch betroffene Kinder haben als Mütter mit einem geringeren Anteil an mtDNA Mutationen [149,151]. Die mtDNA ist ein zirkuläres doppelsträngiges Genom mit einer Länge von 16569 Basenpaaren (bp) und kodiert 37 Gene. Die beiden DNA-Stränge können anhand ihrer Basenzusammensetzung in einen leichten und einen schweren Strang unterteilt werden. Das mitochondriale Genom zeigt auch eine besonders effektive, ökonomische Anordnung der Gene. Ihre Gene besitzen keine Introns und bis auf die Kontrollregion besitzt die mtDNA keine intergenetischen, beziehungsweise nur sehr kurze, Sequenzen [145]. Abbildung 15 gibt einen Überblick über die Anordnung der Gene auf der mtDNA. 28 von 37 Genen befinden sich auf dem schweren Strang und kodieren Gene für 2 rRNAs, 14 tRNAs und 13 Proteinuntereinheiten der Atmungskette. Auf dem leichten Strang sind Gene für 8 tRNAs und ein Gen für eine Proteinuntereinheit der Atmungskette vorhanden. Zudem besitzt die mtDNA keine schützenden Histone, kein effektives Reparatursystem für manche Läsionen und der Einfluß der benachbarten Atmungskette mit den dort entstehenden Sauerstoffradikalen macht die mtDNA verletzlich, was sich in einer 10 bis 20 fach höheren Mutationsrate als in der nuklearen DNA niederschlägt [170].

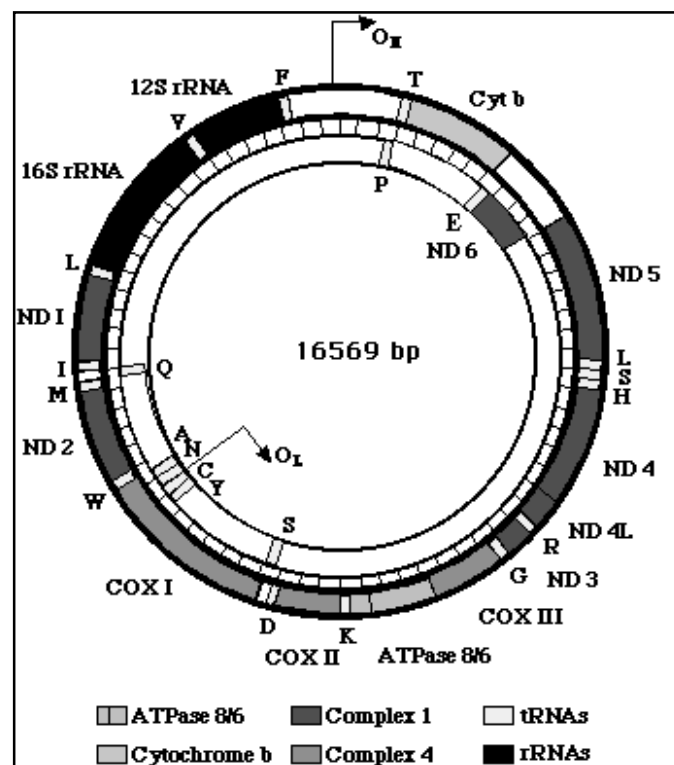


Abb. 15 : Das mitochondriale Genom und die Anordnung seiner Gene.

Nachdem 1981 die Sequenz der humanen mtDNA bekannt wurde [146], wurden Abweichungen vom normalen genetischen Code und Verwendung von anderen Codons als in der nuklearen DNA gefunden. Zum Beispiel wird in mtDNA das Codon TGA als Tryptophan-Codon, anstatt als Stop-Codon wie in nuklearer DNA verwendet. In Säugerzellen enthalten eine große Anzahl der mtDNAs eine kurze DNA-Triplexstruktur, die man D-Loop-Region bezeichnet. In dieser Region ersetzt ein kurzes DNA-Fragment, das komplementär zum leichten Strang der mtDNA ist, den schweren Strang. Diese Region hat sich als Kontrollregion für die mtDNA-Expression herausgestellt, die den Replikationsursprung des leichten Stranges und die Promotoren der Transkription enthält [145].

2.2.4 Mitochondriale DNA, Krankheit und Altern

Es bestehen zwei fundamentale Unterschiede zwischen nuklearer und mitochondrialer DNA, die in der Entwicklung mitochondrial genetischer Krankheiten eine Rolle spielen.

- *Heteroplasmie und der Schwellenwert-Effekt*

Menschliche Zellen enthalten bis zu mehreren tausend Kopien der mtDNA. Bei gesunden Menschen sind alle Kopien der mtDNA identisch. Menschen, die an einer mitochondrial genetisch bedingten Krankheit leiden, beherbergen sehr häufig normale (Wildtyp) und mutierte mtDNAs. Dieses Phänomen beschreibt man als Heteroplasmie (frei übersetzt : cytoplasmische Mischerbigkeit) [150]. Bevor sich ein meßbarer Effekt im Sinne eines mitochondrialen Defektes bemerkbar macht [152], muß der Anteil der mutierten mtDNAs einen gewissen Schwellenwert übersteigen (> 70%), allerdings ist die Relation zwischen dem Anteil der mutierten mtDNA und klinischem Erscheinungsbild in verschiedenen Organen noch unklar. Man findet auch unterschiedliche Mengen an mutierten mtDNAs in verschiedenen Organen, selbst in verschiedenen Zellen eines Organs können quantitative Unterschiede an mutierten mtDNAs auftreten. Diese Variabilität im Gehalt an mutierten mtDNAs, gekoppelt mit gewebespezifischen Unterschieden im Schwellenwert und die Abhängigkeit verschiedener Gewebe vom oxidativen Metabolismus , erklärt, warum verschiedene Gewebe (z.B. Skelettmuskulatur, zentrales Nervensystem, Auge,

Herz) in Patienten mit mitochondrialen Erkrankungen, bevorzugt betroffen werden [153].

- *Mütterliche Vererbung von mtDNA Mutationen*
siehe Abschnitt 2.2.3

Seit der Erstbeschreibung von Mutationen in der mtDNA im Jahre 1988 sind annähernd 100 weitere pathogene Mutationen beschrieben worden. Diese krankheitsrelevanten Mutationen lassen sich in drei Hauptgruppen unterteilen [156].

- *Längenmutationen*

Deletionen, Duplikationen, Insertionen treten meist sporadisch auf, sind immer heteroplasmisch und können viele Abschnitte der mtDNA betreffen. Die bekannteste, die 4977 bp lange „Common Deletion“ betrifft etwa ein Drittel der mtDNA und hat den Verlust von Genen für Komplex I, IV und V sowie für fünf tRNAs zur Folge. Phenotypisch kann sie zu verschiedenen Erkrankungen führen, die ineinander übergehen können [154].

- *tRNA-Defekte*

Bei Mutationen in tRNAs (hauptsächlich Punktmutationen, aber auch Insertionen und Deletionen einzelner Nukleotide) findet man eine große Variabilität im klinischen Erscheinungsbild. Diese Mutationen treten meist heteroplasmisch auf und führen somit zu einer Beeinträchtigung der mitochondrialen Translation. Ein Beispiel dafür ist die Mutation an der Nukleotidposition 3243 in der tRNA^{Leu(UUR)}, die sogenannte MELAS-Mutation (**M**itochondriale **E**nzephalomyopathie mit **L**actat-**A**zidose und **s**chlaganfallähnlichen Episoden). Diese Mutation wurde ursprünglich mit diesen Erkrankungsbildern assoziiert, allerdings konnte sie mittlerweile auch mit anderen Symptomen in Verbindung gebracht werden [154].

- *Defekte in Protein-kodierenden Genen*

Diese Mutationen, in den meisten Fällen missense-Mutationen, betreffen proteinkodierende Gene und haben Codonveränderungen, die wiederum zu einem Aminosäureaustausch im entsprechenden Protein führen, zur Folge. Drei verschiedene missense Mutationen sind für über 90% der Fälle von LHON (**L**ebersche **H**ereditäre **O**ptische **N**euroopathie) verantwortlich. LHON Mutationen sind in der Regel homoplasmisch. Warum diese in allen Geweben

vorkommenden Mutationen in den Komplex I Genen sich hauptsächlich am *Nervus opticus* manifestieren und ausschließlich zu LHON führen, ist bisher unklar [154].

Einen Überblick über mtDNA-Mutationen und deren dadurch ausgelöste Krankheitsbilder gibt Tabelle 3.

<i>betroffenes Gen</i> <i>(proteinkodierende Gene)</i>	<i>Mutation</i>	<i>Erkrankungsbild</i>
ND1	T3308C	MELAS
	G3460A	LHON ± MS
ND4	A11696G	LHON
	G11778A	LHON
ND5	G13513A	MELAS
ND6	G14459A	LHON
	T14484C	LHON
COX III	T9957C	MELAS
ATPase 6	T8993C	NARP
	T9101C	LHON
<i>(tRNA-kodierende Gene)</i>		
tRNA ^{Lys}	A8344G	MERRF
	T8356C	MERRF-MELAS overlap
tRNA ^{Leu}	A3243G	MELAS
		KSS
		Diabetes
<i>(Längenmutationen)</i>		
	Del. 4977	CPEO
		KSS

Tabelle 3 : Überblick über verschiedene mtDNA-Mutationen und deren Erkrankungsbilder [155].

(MELAS : Mitochondriale Enzephalomyopathie mit Lactat Azidose und schlaganfallähnlichen Episoden, LHON : Lebersche Hereditäre Optische Neuropathie, NARP : Neurogene Muskelschwäche, Retinitis Pigmentosa, MERRF : mitochondriale Enzephalomyopathie mit ragged red fibres, KSS : Kearns-Sayre-Syndrom, CPEO : Chronisch progrediente externe Ophthalmoplegie).

Gelegentlich sind ererbte genetische Defekte der mtDNA auch mit präsenilen Formen von Krankheiten assoziiert, die normalerweise in der älteren Bevölkerung auftreten. Darunter fallen zum Beispiel Erkrankungen wie Alters-Diabetes, Taubheit, Herzleiden, Muskelschwäche und geistiger Verfall (Demenz).

Wie sich unter anderem auch herausgestellt hat, verursachen bestimmte Mutationen der mtDNA einen gewissen Prozentsatz von Alzheimer-Erkrankungen, Dystonie (Störung der Bewegungsabläufe) und andere degenerative Erkrankungen des Nervensystems. Da man einige altersbedingte Verfallskrankheiten mit einer Aktivitätsabnahme der zur Energieproduktion erforderlichen Proteinkomplexe in Verbindung gebracht hat, ergibt sich der Verdacht, daß das Nachlassen der mitochondrialen Energieproduktion zu Altersvorgängen und damit zu verschiedenen altersbedingten degenerativen Erkrankungen beiträgt [6]. Mehrere Faktoren können ein solches Nachlassen bewirken. Zum einen dürfte die Exposition gegenüber bestimmten Umweltgiften dazu beitragen, denn viele Schadstoffe sind in der Lage, die mitochondriale Energieproduktion zu stören, indem sie die Aktivität einzelner Komplexe der Atmungskette herabsetzen. Ein weiterer Faktor dürften die im Laufe des Lebens erworbenen somatischen Mutationen sein, diese könnten, wie schon erwähnt (Abschnitt 2.2.2), auf erhöhten oxidativen Streß zurückzuführen sein. Auf diese Weise könnten somatische Mutationen, in Verbindung mit einer schadstoffbedingten Hemmung der mitochondrialen Funktion, zu normalen Alterserscheinungen beitragen. War die Energieproduktion schon von Anfang an gestört, sei es durch ererbte Mutationen oder andere Faktoren, sinkt sie bei späteren somatischen Mutationen der mtDNA schneller unter einen kritischen Schwellenwert. Entsprechend früher als normal würden diese Symptome auftreten und sich zu einem ausgeprägten Krankheitsbild entwickeln. Auch bei manchen chronisch-degenerativen Erkrankungen des Nervensystems und der Muskulatur, die sich erst im späteren Leben bemerkbar machen, spielt die Anhäufung von somatischen Mutationen wahrscheinlich eine Rolle. Zum Beispiel verlieren Patienten, die unter Huntington-Chorea leiden, normalerweise zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr die motorische Kontrolle und ihre kognitiven Fähigkeiten. Die Ursache dieser auch als Veitstanz bezeichneten Krankheit ist eine bestimmte ererbte Mutation der nuklearen DNA. Im Hirngewebe solcher Patienten findet man allerdings auch einen erhöhten Anteil an deletierten mtDNAs als bei gleichaltrigen Gesunden, ein Hinweis auf eine erhöhte

Mutationsrate in der mtDNA. Wie schon kurz erwähnt, wird auch ein gewisser Prozentsatz von Alzheimer-Erkrankungen vererbten Mutationen der mtDNA zugesprochen. Da diese Mutationen die Krankheit nicht direkt auslösen, kann man davon ausgehen, daß auch hier erworbene somatische Mutationen, die die Auswirkungen der ererbten Mutation verstärken, eine Rolle spielen. Tatsächlich findet man in Hirngewebe von Alzheimerkranken einen erhöhten Anteil an mutierten mtDNAs [6].

2.2.5 Mitochondriale Mutationen und Krebs

Warburg et al. beschrieben erstmals Änderungen in der mitochondrialen Physiologie in Krebszellen [157] und argumentierten, daß Krebszellen eine reduzierte oxidative Phosphorylierung aufgrund mitochondrialer Dysfunktionen aufweisen [158]. Es gibt einige Hinweise, daß morphologische und funktionelle Veränderungen in Mitochondrien bei Krebszellen beobachtet wurden [159,160]. Desweiteren wurden Veränderungen in Größe und Struktur bei der mtDNA, inklusive Deletionen und Insertionen, beobachtet [161,162]. Diese Veränderungen scheinen in vielen aber nicht allen Tumorzellen vorzuliegen [163-165]. Nichtsdestotrotz bleibt es zu untersuchen, ob diese mitochondrialen Veränderungen die Ursache oder die Konsequenz des Krebsentstehungsprozesses sind. Es ist schwierig, zwischen Onkogenmutationen und ergänzenden somatischen Mutationen der mtDNA zu unterscheiden, beziehungsweise die Ursache und den Effekt voneinander zu trennen, da Krebs verschiedene genetische Ereignisse im Sinne von Veränderungen erfordert.

In Karzinomen des Kolons wurden die gleichen Mutationen wie in aus ihnen gewonnenen Zelllinien gefunden [167]. Andere Studien, die über somatische Mutationen der mtDNA berichteten, schlossen Missensemutationen, Kettenabbruchmutationen [167], Basensubstitutionsmutationen und Leserasterverschiebungen in Kolonkarzinomen [168,169] und Adenokarzinomen des Magens mit ein [169]. Es wurden 17 mitochondriale „Mutations-Hot-Spots“ in menschlichen Geweben, Tumoren und Zellkulturen identifiziert [170,194]. Die Mutationsrate dieser „Hot-Spots“ nahm linear mit den Zellteilungsvorgängen zu. Interessanterweise zeigte sich, daß in Zellkulturen das Verhältnis von A→G zu G→A Transitionen um den Faktor 5 bis 10 mal niedriger war als in normalen menschlichem Gewebe und

dazugehörigen Tumoren. Diese quantitativen Unterschiede lassen auf verschiedene Mechanismen der Mutagenese *in vivo* und *in vitro* schließen.

2.2.6 Mitochondrien und Apoptose

Mitochondrien scheinen bei verschiedenen Schlüsselereignissen der Apoptose eine Rolle zu spielen. Darunter fallen unter anderem die Abgabe von Caspase Aktivatoren wie zum Beispiel Cytochrom c, Veränderungen im Elektronentransport, Verlust des mitochondrialen Transmembranpotentials, verändertes zelluläres Redoxpotentials und die Teilnahme von pro- bzw. antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie im Prozess der Apoptose. Diese verschiedenen Signale, die Apoptose induzieren bzw. Inhibieren, legen nahe, daß verschiedene Reaktionswege im Prozess der Apoptose vorhanden sind. In den letzten Jahren zeigte sich, daß Caspasen (intrazelluläre Cystein-Proteasen) eine der Hauptrollen im Prozess der Apoptose spielen. Inhibierung von Caspasen führt aber nicht notwendig zu einem Überleben der Zelle, sondern die Zelle stirbt aufgrund der inaktivierung der Caspasen einen langsameren Zelltod, bekannt als Nekrose. Es werden drei hauptsächliche Mechanismen beschrieben, die Mitochondrien mit dem Prozess der Apoptose verbinden :

- Störung des Elektronentransports und damit verbunden Störung der oxidativen Phosphorylierung und der ATP-Produktion,
- Abgabe von Proteinen, die für die Aktivierung von Caspasen verantwortlich sind,
- Veränderung des zellulären Redoxpotentials.

Die Störung des Elektronentransports wurde schon vor Jahren als frühes Ereigniss im Prozeß des Zelltodes identifiziert. γ -Strahlung löst Apoptose in Thymozyten und eine Störung des Elektronentransports aus. Ceramid, ein sekundäres Signalprotein, löst ebenfalls eine Störung des Elektronentransports aus. Die Abgabe von Caspase-aktivierenden Proteinen ist ein weiterer wichtiger Mechanismus im Prozess der Apoptose. In zellfreien Systemen zeigte sich, daß Bcl-2-inhibierbare nukleare Kondensation und DNA-Fragmentierung während der Apoptose das vorhandensein

von Mitochondrien nötig ist. Während der Apoptose wird Cytochrom c von Mitochondrien abgegeben, was durch das antiapoptotische Protein Bcl-2 inhibiert werden kann. Cytosolisches Cytochrom c spielt eine wichtige Rolle in der Bildung der "Apoptosomen", einem Proteinkomplex, der aus Cytochrom c, Apaf-1 und Procaspase-9 besteht. Das Ergebnis dieser Komplexbildung ist die Aktivierung von Caspase-9, die selbst weitere Caspasen im apoptotischen Prozess aktiviert und in letzter Konsequenz zu dem apoptotischen Zelltod führt. Wird Cytochrom c erst mal von den Mitochondrien abgegeben, dann stirbt die Zelle entweder auf dem schnellen apoptotischen Wege, der die Apaf-1 abhängige Caspase-aktivierung beinhaltet oder die Zelle stirbt auf dem nekrotischen Wege aufgrund der Störung des Elektronentransports als Folge der Cytochrom c-Abgabe. Eine weitere Rolle spielen die PT-Poren der mitochondrialen Membran. Öffnet sich diese Pore, so führt das zum Anschwellen der mitochondrialen Matrix aufgrund des hyperosmotischen Effekts. Das hat zur Konsequenz, daß die äußere mitochondriale Membran reißt und damit Caspase-aktivierende Proteine freigesetzt werden. Faktoren, die das Öffnen der PT-Pore direkt beeinflussen, sind Oxidantien und pathologisch erhöhte Ca^{2+} -Spiegel im Cytosol. In vielen Fällen scheint dieser Mechanismus eine Hauptrolle im Prozeß der Apoptose zu spielen. Eine weitere Verbindung zwischen Apoptose und Mitochondrien ist das Vorhandensein von Proteinen der Bcl-2-Familie in der mitochondrialen Membran. Viele aber nicht alle dieser Proteine sind an die äußere mitochondriale Membran gebunden. Zwei dieser Proteine (Bcl-2, Bcl-x_L) verhindern den Verlust von mitochondrialem Ca^{2+} , der durch Inhibitoren der Zellatmung ausgelöst wird. Zum anderen fördern diese Proteine die Abgabe von Protonen, um die Pufferkapazität von Ca^{2+} in Mitochondrien zu erhöhen [166 und darin zitierte Referenzen]. Einen Überblick über die Mechanismen der Apoptose, bei denen Mitochondrien involviert sind, gibt Abbildung 16.

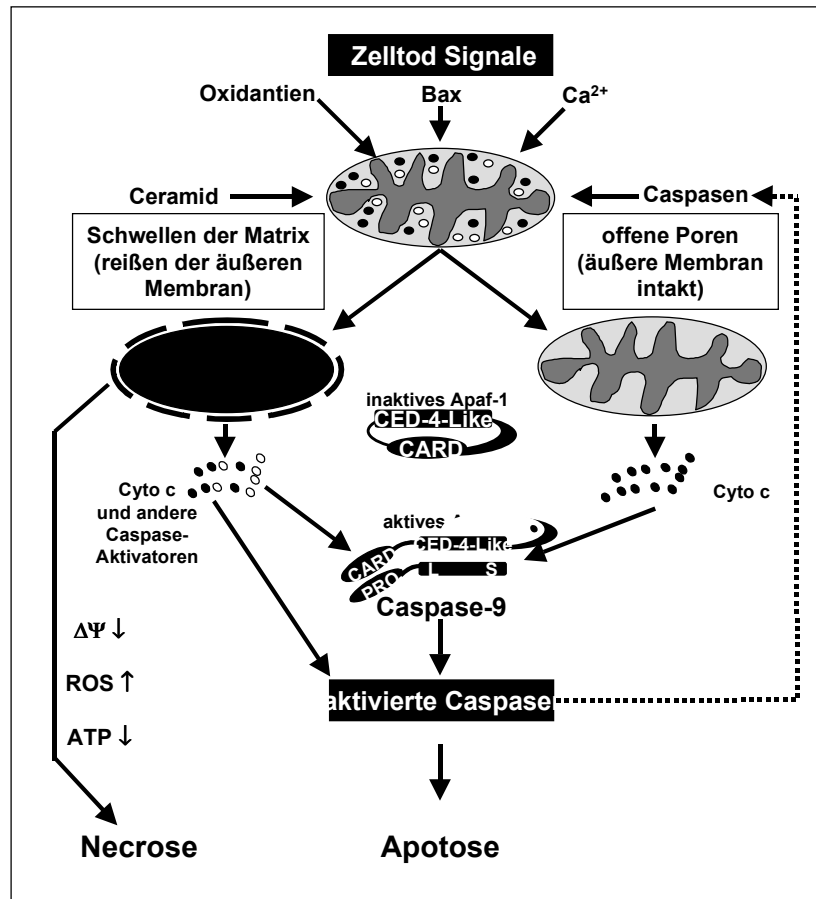


Abb. 16 : Apoptotische Mechanismen, bei denen Mitochondrien involviert sind [166].

2.2.7 DNA-Reparatur in Mitochondrien

Clayton et al. untersuchten 1974 erstmals die DNA-Reparatur in Mitochondrien. Die Tatsache, daß durch UV-Licht induzierte DNA-Schäden in Mitochondrien nicht repariert werden, führte zu dem Dogma, daß Mitochondrien ein Reparatur-System fehle [171]. Trotzdem häuften sich in den letzten Jahren die Hinweise, daß verschiedene DNA-Schäden auch in Mitochondrien repariert werden. Diese Studien verglichen die Schadenshäufigkeit direkt nach der spezifischen Behandlung mit der Schadenshäufigkeit nach ein paar Stunden. Sie zeigten eine zeitabhängige Abnahme einiger Typen von DNA-Schäden, die nicht auf mitochondriale Replikation und damit auf einen Verdünnungseffekt zurückzuführen ist. Manche Schäden werden schnell, manche langsam und manche gar nicht repariert. Oxidative mtDNA-Schäden und Einzelstrangbrüche werden in Ratten und menschlicher mtDNA innerhalb von vier bis neun Stunden repariert [172-179]. Dagegen werden N-Methylpurine und Cis-Platin Vernetzungen von DNA-Strängen in Mitochondrien nur langsam repariert (70

– 77% innerhalb von 24 Stunden) [180-183]. Große DNA-Schäden wie Pyrimidin-Dimere, Aflatoxin B1-Addukte und Cis-Platin Vernetzungen desselben Strangs werden in Mitochondrien überhaupt nicht repariert [171,182,184,185]. Im folgenden werden verschiedene Reparaturmechanismen näher betrachtet.

- Nukleotid-Exzisionsreparatur
- Basen-Exzisionsreparatur und
- Mismatch-Reparatur.

- *Nucleotid-Exzisions-Reparatur (NER)*

Der Verdacht, daß verschiedene Schäden wie Aflatoxin B1-Addukte und Cis-Platin Vernetzungen von DNA-Strängen nicht aus mtDNA repariert werden, lassen vermuten, daß in Mitochondrien der Mechanismus, der als Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) bezeichnet wird, nicht vorhanden ist. Allerdings gibt es Hinweise, daß die Schäden aus der mtDNA entfernt werden, ohne daß der Gesamtprozeß, zum Beispiel das Auffüllen der entstandenen DNA-Lücke, zu Ende geführt werden kann [186,187]. Diese Beobachtungen führen zu dem Ergebnis, daß weitere Studien notwendig sind, um diesen Mechanismus in Mitochondrien weiter aufzuklären.

- *Basen-Exzisions-Reparatur (BER)*

Dieser Mechanismus ist folgendermaßen definiert : die beschädigte Base wird ausgeschnitten, die an dieser Stelle entstandene AP-Stelle (AP = Apurin) wird von einer AP-Endonuklease zu einem Strangbruch mit einer freien 3'-OH-Gruppe konvertiert, der durch eine DNA-Polymerase wieder aufgefüllt wird. Abschließend wird das Zucker-Phosphat-Rückgrat durch eine DNA-Ligase wieder zusammengefügt [188]. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die in Mitochondrien entdeckten BER-Enzyme.

Enzym	Name
AP Endo	AP-Endonuklease
hOGG	humane 8-OHdG-DNA-Glycosylase
hNTH1	
mtEndoG	mitochondriale Endonuklease G
hUDG	Uracil-DNA-Glycosylase
mtODEndo	DNA-Glycosylase für mitochondriale oxidative Schäden
O^6 -Me-Transferase	O^6 -Methyl-Transferase

Tabelle 4 : Mitochondriale Basen-Exzisions-Reparatur-Enzyme. (In Teilen aus D.E.Sawyer et al. 1999)

- *Mismatchreparatur*

Dieser Reparaturmechanismus wurde beim Menschen noch nicht beschrieben. Allerdings könnte die Abwesenheit dieses Mechanismus die erhöhte spontane Mutationsrate der mitochondrialen DNA aufgrund von Replikationsfehlern der DNA-Polymerase γ erklären.

3 Aufgabenstellung

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte ein Beitrag zur Frage geleistet werden, welche Bedeutung etheno-(ϵ)-DNA-Addukte in der Karzinogenese und bei chronisch degenerativen Erkrankungen haben könnten. Dazu sollten etheno-DNA-Addukte mit CAA, einem Metaboliten von Vinylchlorid und des Zytostatikums Ifosfamid [208,209], in einem humanen B-lymphoiden Zellsystem (Raji Zellen) induziert werden. Weiter sollte ein Zusammenhang zwischen etheno-DNA-Addukten und einer erhöhten Mutationsrate in mindestens einem spezifischen Gen in Raji Zellen hergestellt werden. Zunächst mußte der subtoxische Bereich dieser Verbindung in diesem Zellsystem mittels Wachstumskurven ermittelt werden. Die weitere Arbeit verteilte sich daraufhin auf drei Teilprojekte.

1. Detektion und Quantifizierung von etheno-Desoxyadenosin.
Hierzu sollte eine einfache, nicht-radioaktive Methode auf der Basis von High performance liquid chromatography (HPLC) mit Fluoreszenzdetektion entwickelt werden. Diese Methode sollte dazu genutzt werden, um etheno-Desoxyadenosin in Gesamt-DNA aus CAA-behandelten Raji Zellen zu detektieren und zu quantifizieren.
2. Nachweis der genspezifischen Induktion von etheno-DNA-Addukten in mitochondrialer DNA.
Aufgrund der Tatsache, daß mitochondriale DNA in mehrfachen Kopien / Zelle (200 – 5000 Kopien je nach Gewebe) vorliegt und nicht durch Histone geschützt ist, bietet sie sich als Ziel für solche Untersuchungen an. Weiterhin ist zu erwarten, daß etheno-DNA-Addukte aufgrund eines erhöhten oxidativen Streß über den Vorgang der Lipidperoxidation und damit z.B. über das trans-4-Hydroxynonenal in mitochondrialer DNA gebildet werden. Der Nachweis von ϵ dA in der mitochondrialen Zielsequenz sollte durch Modifikation einer in dieser Abteilung entwickelten genspezifischen Methode zur Untersuchung von DNA-Schäden [189] erreicht werden.

3. Nachweis von CAA-induzierten Mutationen in einer "Hot-Spot"-Region im mitochondrialen Genom.

Um nichtselektierte Mutationen in mitochondrialer DNA nachzuweisen, mußten Methoden verwendet werden, die eine Mutation unter $> 10^5$ unmutierten Sequenzen detektieren. Dazu sollte der Restriktionsschnittstellen-Mutations-Test (RSM-Test [190-192]) verwendet und weiterentwickelt werden.

4 Material und Methoden

4.1 Allgemeine Methoden

4.1.1 Materialien und Geräte

- *Chemikalien und allgemeine Verbrauchsmaterialien :*

Agarose	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Biotin-16-dUTP	Roche Diagnostics (Mannheim)
2-Chloracetaldehyd 50% wäßrige Lösung	Sigma-Aldrich (Steinheim)
CentriSep Säulen	Perkin Elmer (Weiterstadt)
Chroma Spin™ Säulen	Clontech (Heidelberg)
DNA Marker (50bp – 1kb)	Research Genetics (Huntsville, USA)
DNA-Marker (1 kb)	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
DynaBeads M280	Dynal (Hamburg)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco Life Sciences (Eggenstein)
HEPES (20mM)	Gibco Life Sciences (Eggenstein)
Loading Dye	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Methanol	Merck (Darmstadt)
MTT (3,(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
PCR – Primer	Perkin Elmer (Weiterstadt)
Penicillin /Streptomycin	Gibco Life Sciences (Eggenstein)
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Sigma-Aldrich (Steinheim)
RPMI 1640 Medium	Sigma (Deisenhofen)

- *Enzyme :*

Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics (Mannheim)
Humane AP-Endonuklease	Dr.Ulrike Hardeland (IMR, Universität Zürich, Schweiz)
Klenow Enzym	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
MPG-Protein	PharMingen (Heidelberg)
Nuclease P1	Roche Diagnostics (Mannheim)
<i>Pfu</i> -Polymerase	Stratagene (Heidelberg)
Restriktionsenzyme (Rsa I, Spe I, Taq I)	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Taq-Polymerase	Qiagen (Hilden)

- *verwendete Kits :*

Big-Dye™ Terminator cycle Sequencing	Perkin Elmer (Weiterstadt)
Ready Reaction Kit	Perkin Elmer (Weiterstadt)
Blood & Cell Culture DNA Kit	Qiagen (Hilden)
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Comet Assay-Kit	Trevigen (xxxxxx)
Immunfluoreszenz-Test zum Nachweis von 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) Inkorporation	Roche Diagnostics (Mannheim)

- *verwendete Puffer :*

Ammoniumacetat Lösung	(7,5M NH ₄ OAc)
Ammoniumphosphat Puffer	(17mM (NH ₄) ₃ PO ₄ , pH 5)
Biotin / Streptavidin Bindungs Puffer	(2M NaCl, 10mM Tris x HCl, 1mM EDTA)
Isolationspuffer für Mitochondrien :	
Puffer 1	(10mM Tris x HCl, pH 7,4 , 5mM MgCl ₂ , 250mM Sucrose)
Puffer 2	(10mM Tris x HCl, pH 7,4 , 5mM MgCl ₂ , 320mM Sucrose)
Puffer 3	(10mM Tris x HCl, pH 7,4 , 5mM MgCl ₂ , 250mM Sucrose, 0,1% NP - 40)
Natriumacetat Puffer	(20mM NaOAc , pH 6,8)
Natriumphosphat Puffer	(50mM NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄ , pH 5,5)
PBS	(137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na ₂ HPO ₄ , 1,4mM KH ₂ PO ₄)
PBSG	(137mM NaCl, 2,7mM KCl, 4,3mM Na ₂ HPO ₄ , 1,4mM KH ₂ PO ₄ , 0,4% Glukose)
SSC Puffer (20x)	(3M NaCl, 330mM Na ₃ Citrat)
TBE Puffer	(45mM Tris-Phosphat, 1mM EDTA)
TE Puffer	(10mM Tris x HCl, 1mM EDTA)
Zell-Lyse-Puffer	(100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 25 mM EDTA pH 8, 0,5 % Natrium-dodecyl-sulfat (SDS), 0,3 mg/ml Proteinase K)

- *Geräte :*

HPLC – UV	(Autosampler, Detektor, Pumpe HP 1050 Ti Serie)
HPLC – Fluoreszenz	(Pumpe HP 1100, Fluoreszenzdetektor HP 1046 A)
Trennsäulen	Lichrospher 100 RP 18E 5µm (Bischoff, Leonberg)

PCR Cycler	Master Cycler Eppendorf MiniCycler™ PTC 150, MJResearch
Densitometer	Kamera Herolab E.A.S.Y 429 K, EasyWin 32 Software (Herolab, Wiesloch)
Photometer	Uvikon Spektrophotometer 931, (Kontron Instruments)
Fluoreszenzmikroskop	Olympus BX50, Software Leica Quantimet 500 (Leica Bensheim)
Elisa-Reader	SpectraMAX 340 PC, (Molecular Devices, Sunnyvale, USA)
Zentrifuge für Zellkultur	Heraeus Minifuge T (Heraeus, Hanau)
Ultrazentrifuge	L5-50B Ultrazentrifuge, (Beckmann)
DNA Sequenzierer	ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, (Perkin Elmer, Weiterstadt)

4.1.2 Allgemeine Methoden

- *Zellkultur :*

Alle Experimente wurden mit einer B-lymphoiden Zelllinie durchgeführt (Raji Zellen). Die Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (Sigma, Deisenhofen), mit 10% FCS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 2 mM L-Glutamin , bei 37 °C und 5 % CO₂ in Kultur gehalten. Das Passagieren der Zellen erfolgte zweimal in der Woche.

- *Rotenonselektion zur Anreicherung von mutierten Mitochondrien :*

Raji Zellen wurden nach 2-Chloracetaldehyd-Inkubation (30, 60 und 100 µM) wie oben kultiviert. Dem Medium wurde 400 nM Rotenon als Inhibitor des Atmungskomplex I zugesetzt. Die Zellen wurden für 6 Monate auf diese Weise in Kultur gehalten.

- *Inkubation von Raji Zellen mit 2-Chloracetaldehyd :*

Von einer 50 %igen CAA-Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim) wurden Verdünnungsreihen (1 M, 100 mM, 10 mM, 1 mM, 100 µM) erstellt. 2 x 10⁶ Zellen / Probe wurden im doppelten Ansatz in PBS suspendiert und mit 2-Chloracetaldehyd-Lösung mit Effektivkonzentrationen von 10, 30, 60 und 100 µM in einem Gesamtvolumen von 2,5 ml für 15 bis 60 min bei T = 37 °C inkubiert. Je nach

Applikation wurden die Zellen entweder in Kultur gesetzt oder die DNA wurde direkt nach Inkubation isoliert.

- *Mehrfachinkubation von Raji Zellen mit 2-Chloracetaldehyd zur Induktion von Mutationen :*

Raji Zellen wurden wie oben beschrieben 2 x in der Woche am Tag nach der Passage mit 10, 30 und 100 μM CAA für 15 min. bei 37 °C inkubiert und für einen Zeitraum von drei Wochen in Kultur gehalten. Nach jeder Woche wurde ein Aliquot von Zellen geerntet und die DNA isoliert. Diese auf diese Weise behandelten Zellen wurden für Mutationsuntersuchungen verwendet.

- *Inkubation von Raji Zellen mit Zigarettenrauchlösung*

Zigarettenrauchlösung wurde mittels einer kommerziellen Rauchmaschine hergestellt, indem der Rauch durch PBSG durchgeleitet wurde [215]. 2×10^7 Zellen pro Probe wurden in RPMI 1640 Medium mit der Zigarettenrauchlösung bei drei verschiedenen Konzentrationen (1:10, 1:30, 1:100) versetzt und für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und je nach Applikation wieder in Kultur gesetzt oder die DNA wurde direkt isoliert.

- *Inkubation von Raji Zellen mit Zigarettenrauchlösung*

Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit Zigarettenrauchlösung in den Verdünnungen 1:30 und 1:100 inkubiert und für ein bis drei Wochen in Kultur gehalten. Nach jeder Woche wurde ein Aliquot von Zellen geerntet und die DNA wurde daraus isoliert.

- *Standard DNA – Isolation :*

Raji - Zellen wurden mit 0,3 ml ($< 3 \times 10^7$ Zellen) bzw. 1 ml ($> 3 \times 10^7$ Zellen) Zell-Lysepuffer bei 50 °C über Nacht inkubiert. Danach wurde die DNA zweimal mit gleichen Volumina Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 / 24 / 1) extrahiert. Die DNA wurde aus der wässrigen Phase mit 0,75 Volumenanteilen NH_4OAc (7,5M) und 2 Volumenanteilen EtOH (100 %) gefällt, danach mit 70 % EtOH gewaschen und anschließend in 0,1 X TE (pH 7) gelöst. Die Konzentration und die Reinheit der DNA wurden mittels UV bei 260 / 280 nm bestimmt.

- *DNA Isolation für die Bestimmung von ϵ dA aus behandelten Zellen mittels HPLC :*

Die DNA für die ϵ dA – Bestimmung wurde mittels eines Qiagen Blood & Cell Culture DNA Midi Kits, nach dem entsprechenden Protokoll mit leichten Modifikationen, isoliert. Nach der DNA - Isolation wurde die DNA in einem NaOAc - Puffer (20 mM / pH 5,5) gelöst. Die Konzentration und die Reinheit der DNA wurden mittels UV bei 260 / 280 nm bestimmt. Die Ausbeute an DNA betrug im allgemeinen 150 - 200 μ g DNA aus 2×10^7 Zellen mit einem 260 / 280 nm Verhältnis von $\sim 2,0$.

- *Wachstumskurven :*

Zellen wurden wie oben beschrieben mit CAA behandelt. Nach der Inkubation wurden die Zellen 2 mal in PBS gewaschen und mit 2,5 ml RPMI 1640 Medium in Kultur gehalten. Die Zellzahlen und der Prozent-Satz lebender Zellen wurden nach 24, 48 und 72 h bestimmt. Die Versuche wurden je zweimal mit Doppelbestimmungen durchgeführt.

- *Polymerase Ketten Reaktion (PCR) (Standardbedingungen) :*

Die gewünschten mitochondrialen Gene (ND1, ND2 , ND3) wurden in einem 50 μ l Reaktionsansatz amplifiziert. Der Ansatz enthielt 100 ng DNA-Template, 200 μ M dNTP's, 1 U Taq - Polymerase oder *Pfu* - Polymerase , 15 pmol von jedem Primer, 10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl (pH 8,3) beziehungsweise bei *Pfu* - Polymerase 20 mM Tris-HCl (pH 8,8), 2 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 1 % Triton X-100, 0,1 mg / ml BSA.

Alle Komponenten wurden in den Reaktionsansatz gegeben, dieser wurde dann 5 min bei T = 95 °C denaturiert und danach wurden Taq- oder *Pfu*- Polymerase zugegeben. Nach der Zugabe der Polymerase wurde die Reaktion in einem MJ Research Mini Cycler™ Modell PTC-150 oder Eppendorf Master Cycler durchgeführt (Primersequenzen und PCR – Bedingungen siehe Tabelle 5).

5 μ l der Reaktionsprodukte wurden auf einem mit Ethidiumbromid (17,5 μ g EtBr / 35 ml Gel) versetzten Agarosegel getrennt und photographiert.

Amplifiziertes Produkt	Primer	Primersequenz	Zyklusbedingungen	
			Temp.[°C]	Zeit [min]
ND1 _{1095 bp}	mtB1	GATGGCAGAGCCCGGTAATCGC	95 - 3	30x
			95 - 1	
	mtB2	AGAAATAAGGGGGTTTAAGCTCC	59 - 1	
			72 - 3	
			72 - 5	
ND2 _{1134 bp}	mtB3	CGGGCCCATACCCCGAAAATGTTG	95 - 3	30x
			95 - 1	
	mtB4	CTTACTGAGGGCTTTGAAGGCTC	59 - 1	
			72 - 3	
			72 - 5	
ND3 _{572 bp}	mtB5	GAAGCCGCCGCCTGATACTGGCATT	95 - 3	30x
			95 - 1	
	mtB6	GTAAATGAGGGGCATTTGGTA	55 - 1	
			72 - 2	
			72 - 5	
ND3 _{234 bp}	mtB5	GAAGCCGCCGCCTGATACTGGCATT	95 - 3	30x
			95 - 1	
	mtB6A	AGCCGTTGAGTTGTGGTAGTCA	55 - 1	
			72 - 2	
			72 - 5	
Deletionsanalyse Common Deletion _{4977 bp}	mtDel1	TACTCCTTACACTATTCCTCATCAC	94 - 5	40x
			94 - 40 s	
	mtDel2	CCTGTGAGGAAAGGTATTCCTGCTA	65 - 40 s	
			72 - 50 s	
			72 - 7	

Tabelle 5 : Standard PCR Bedingungen

Spezielle PCR - Bedingungen werden bei den einzelnen Tests angegeben.

- Comet Assay

4 x 10⁵ Raji Zellen wurden wie oben beschrieben mit 10 und 100 µM CAA inkubiert. Der Comet Assay wurde mit dem `Comet Assay-Kit` nach dem Herstellerprotokoll (Trevigen) durchgeführt. 51 Zellen pro Probe wurden zufällig ausgewählt und analysiert. Dieser Versuch wurde zwei Mal mit Doppelwerten durchgeführt, und mit

einem Olympus-Fluoreszenz-Mikroskop und Software von Perceptive Instruments ausgewertet.

- *BrdU-Einbautest (UDS-Test)*

Raji Zellen wurden wie oben beschrieben mit CAA (10 μ M, 100 μ M) inkubiert und nach der Inkubation 2 mal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen für 0, 23 und 47 Stunden in Kultur gesetzt. Negativkontrollen wurden in doppelten Ansätzen mit PBS und PBSG unter gleichen Bedingungen inkubiert. Nach diesen Zeiten wurden je ein Ansatz der Negativkontrollen für eine Stunde mit Hydroxyharnstoff (10mM) behandelt (Positivkontrollen). Danach wurden alle Proben mit RPMI 1640 Medium gewaschen und mit Medium, das mit 10 μ M BrdU versetzt wurde, für 30 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. 4 x 10⁵ Zellen pro Probe wurden nach der Inkubation auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger zentrifugiert, und mit 70 % Ethanol in 50 mM Glycin für 20 Minuten bei - 20 °C fixiert und nach der Fixierung dreimal mit PBS gewaschen. Danach wurde nach dem Protokoll des Herstellers (Roche Diagnostics Mannheim) vorgegangen. Die Proben wurden mit Hilfe eines Olympus Fluoreszenzmikroskops fotografiert und mit Leica Quantimet 500 Software ausgewertet.

- *MTT-Test zur Überprüfung der mitochondrialen Aktivität*

Raji Zellen wurden wie oben beschrieben mit 30, 60 und 100 μ M CAA inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen für verschiedene Zeitpunkte (0, 1, 2, 3, 4, 24 Stunden) wieder bei 37 °C und 5 % CO₂ in Kultur gesetzt. Nach diesen Zeitpunkten wurden 2 x 10⁴, 4 x 10⁴ und 8 x 10⁴ Zellen pro Probe in 200 μ l RPMI 1640 Medium aufgenommen und mit 50 μ l MTT-Lösung (5 mg / ml) versetzt (End-konzentration 1 mg / ml) und für zwei Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach der Inkubation wurde ein Zell-Lyse-Puffer (20 % SDS in 50% DMF / H₂O, pH 4,7) zugegeben und die Intensität des gebildeten MTT-Formazans wurde mittels eines Elisa-Readers bei 595 nm gemessen.

- *Isolation von Mitochondrien aus Raji Zellen*

Mit CAA (100 μ M) behandelte Zellen aus zwei 100 ml Zellkulturflaschen (~ 1 x 10⁸ Zellen pro Flasche) wurden bei 1000 U / min für 10 Minuten abzentrifugiert, einmal mit PBS bei Raumtemperatur und einmal mit eisgekühltem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen unter gleichen Bedingungen erneut abzentrifugiert. Die auf diese

Weise erhaltenen Sedimente wurden mit 4 ml Puffer 1 versetzt (siehe oben), 5 Minuten auf Eis ruhen gelassen und erneut zentrifugiert. Jetzt wurden die Zellpellets mit 4 ml Puffer 3 aufgenommen und 15 Minuten auf Eis gelagert. Danach wurden die Zellen mit einem eisgekühlten Homogenisator vorsichtig homogenisiert. Um zu überprüfen, ob alle Zellen homogenisiert waren, wurde ein Tropfen dieser Suspension mit Hämatoxylin versetzt und unter einem Mikroskop überprüft, wobei mindestens 80 % der Zellkerne frei sein sollten. Diese Suspension wurde danach vorsichtig auf 4 ml gekühlten Puffer 2 pipettiert, wobei eine Durchmischung der Puffer vermieden werden sollte. Jetzt wurden die Zellkerne bei 2000 U / min für 8 Minuten abzentrifugiert. Diese Zentrifugation wurde danach noch zweimal wiederholt, um möglichst alle Zellkerne zu entfernen. Der Überstand wurde gesammelt und bei 15000 U / min für 90 Minuten zentrifugiert, um die Mitochondrien zu sedimentieren. Die Mitochondrien waren als grünliches Sediment erkennbar.

4.1.3 Statistische Auswertung

Statistische Auswertungen wurden durch Herrn Benner (Abteilung Biostatistik, DKFZ Heidelberg) unter Verwendung des statistischen t-Tests und des Jonkhre-Terpstra-Trend-Tests durchgeführt.

4.2 DNA Adduktanalytik

4.2.1 Enzymatische DNA - Hydrolyse von 2-Chloracetaldehyd oder Zigarettenrauch behandelten Raji Zellen

20 µg DNA aus CAA- beziehungsweise Zigarettenrauch-behandelten Raji Zellen wurden in einem NaOAc - Puffer (20 mM, pH 6,8) gelöst und über Nacht mit 7,5 Einheiten Nuklease P1 bei 60 °C verdaut. Danach wurden 1,5 µl Dephosphorylierungspuffer (0,5 M Tris, 1 mM EDTA, pH 8,5) und eine Einheit Alkalische Phosphatase zugegeben und die Verdauung für weitere zwei Stunden fortgesetzt. Das Gesamtvolumen betrug 155 µl. Bei großen DNA-Mengen wurde der Ansatz verdoppelt.

4.2.2 Messung von Nukleosiden nach enzymatischer Hydrolyse aus DNA von 2-Chloracetaldehyd oder Zigarettenrauch behandelten Raji Zellen mittels UV - HPLC

Raji Zellen wurden, wie oben unter 4.1.2 beschrieben, mit CAA (30, 60, 100 μM) behandelt und die Zellen für verschiedene Zeitintervalle (0, 1, 2, 3, 24 Stunden) wieder in Kultur gesetzt, die DNA isoliert und nach Quantifizierung mittels UV (260 / 280 nm) enzymatisch hydrolysiert. Bei Proben, die mit Zigarettenrauch behandelt waren, wurde die DNA direkt nach der Inkubation isoliert. Die Effizienz der enzymatischen Hydrolyse von DNA aus CAA behandelten Raji Zellen wurde mittels HPLC und UV-Detektion bei 260 nm bestimmt. Die Nukleoside wurden auf einer Lichrospher 100 RP 18 E 5 μm Säule mit einem von Dr. J. Nair entwickelten HPLC-System (50 mM NaH_2PO_4 / Na_2HPO_4 - Puffer (pH 5,5) / Methanol (9 : 1) bei 1 ml / min.) getrennt. Die Quantifizierung erfolgte über einen Vergleich der Peakflächen mit einer Nukleosid Standardmischung.

4.2.3 Messung von etheno - (ϵ) - desoxyadenosin - Addukten aus DNA von 2-Chloracetaldehyd oder Zigarettenrauch behandelten Raji Zellen mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion

Etheno - Desoxyadenosin wurde mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion aus der enzymatischen DNA-Hydrolyse von CAA- oder Zigarettenrauch- behandelten Raji Zellen bestimmt und über einen Vergleich der Peakflächen mit einem etheno Adenosin / etheno Desoxyadenosin - Standard quantifiziert. Die Peaks wurden bei einer Extinktion von 230 nm und einer Emission von 410 nm detektiert. Die Trennung erfolgte über eine Lichrospher 100 RP 18 E 5 μm Säule mit einem linearen Gradienten aus einem $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$ - Puffer (17 mM, pH 5) / Methanol (9:1 \rightarrow 8:2) über 30 Minuten bei 1 ml / min. Die Daten werden als relative Adduktspiegel ($\epsilon\text{dA} / \text{dA} \times 10^5$) angegeben.

4.2.4 Detektion von etheno -(ε)- desoxyadenosin - Addukten aus mtDNA von 2-Chloracetaldehyd (100µM) behandelten Raji Zellen mittels HPLC und Fluoreszenzdetektion

2 x 10⁸ Zellen wurden wie oben beschrieben mit CAA inkubiert und für verschiedene Zeitintervalle (0, 1, 3, 6 Stunden) wieder in Kultur gesetzt. Die Mitochondrien wurden wie oben beschrieben isoliert und daraus wurde die DNA nach Standardbedingungen gewonnen. Die HPLC-Analytik wurde unter normalen Bedingungen durchgeführt.

4.3 Genspezifischer Nachweis von etheno-(ε)-DNA-Addukten in mitochondrialen Genen

4.3.1 Nachweis von etheno-(ε)-dA-Addukten in einem mitochondrialen Gen mittels SELBIOODD (Selection of biotinylated damaged DNA) Test

Raji Zellen wurden wie oben beschrieben mit CAA inkubiert und die DNA isoliert.

- Depurinierung und Induktion von DNA - Einzelstrangbrüchen

1 µg gesamt Raji - DNA wurde mit 200 ng MPG - Protein in 50 µl MPG - Verdaupuffer (20 mM KCl, 14 mM Hepes-KOH (pH 7,5), 0,1 mM EDTA, 1 mM β - Mercaptoethanol und 1 % Glycerin) für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, um etheno - Desoxyadenosin - DNA - Addukte in AP - Sites zu überführen. Danach wurde diese Reaktionslösung mit 0,1 N NaOH versetzt und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert oder alternativ 1 µl MgCl₂ (250 mM, Endkonzentration 5 mM) und 650 ng HAP 1 - Enzym (humane AP - Endonuklease 1) zugegeben und für weitere 15 Minuten bei 37 °C inkubiert, um die im ersten Schritt induzierten AP - Sites in DNA - Einzelstrangbrüche zu konvertieren. Die auf diese Weise prozessierte DNA wurde danach über ChromaSpin - 100 - Säulen gereinigt, um die Enzyme und Salze zu entfernen.

- *Biotin - 3'-Endlabeling*

Die gesamte DNA wurde in 60 µl End - Labeling - Puffer (50 mM Tris - HCl (pH 8), 5 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 33µM jeweils dATP, dGTP, dTTP, 1 nmol Biotin-16-dUTP und 1 Einheit Klenow - Enzym) über Nacht bei 37 °C inkubiert und nach der Inkubation erneut über ChromaSpin - 100 - Säulen gereinigt, um nichtinkorporiertes biotinyliertes Nukleotid, Salze und das Enzym zu entfernen.

- *Restriktionsenzymverdau (Taq I)*

Die aus dem vorherigen Schritt erhaltene DNA wurde in 60 µl Taq I - Verdaupuffer (10 mM Tris x HCl (pH 8), 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA) mit 10 Einheiten Taq I bei 65 °C für eine Stunde verdaut, die Verdauprodukte über ein 2,5% Agarosegel elektrophoretisch getrennt und die Zielregion (~ 270 bp) aus dem Gel mittels des QiaEx II™ Gelisolationskit isoliert.

- *Binden der biotinylierten Fragmente an Streptavidin beschichtete magnetische Partikel*

20 µl der Suspension der magnetischen Partikel wurden zweimal mit Biotin / Streptavidin - Bindungspuffer (siehe oben) gewaschen, die aus der Gelisolation erhaltene DNA Lösung mit einem gleichen Volumen des Bindungspuffers versetzt und zusammen mit den magnetischen Partikeln eine Stunde bei 40 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden die Proben 3 mal mit dem Bindungspuffer und 3 mal mit 0,1 x TE - Puffer gewaschen. Die auf diese Weise erhaltenen magnetischen Partikel wurden danach direkt in eine Multiplex PCR überführt.

- *Multiplex PCR zur Detektion von MPG - sensitiven Stellen in mitochondrialer DNA*

Diese PCR wurde unter Standardbedingungen für das ND3_{234 bp} Fragment (siehe PCR Standardbedingungen) mit dem Unterschied durchgeführt, daß zwei zusätzliche reverse Primer der Reaktionslösung zugegeben wurde, um eine Lokalisation von MPG-sensitiven Stellen möglich zu machen. Die Primer hatten die folgenden Sequenzen und führten zu folgenden zusätzlichen Produkten :

mtB6B : GGCTAGGAGGGTGTGATTA	189 bp
mtB6C : ACTCGTAAGGGTGGATTTTCT	262 bp

4.4 Mutationsanalytik

4.4.1 Auswahl der mitochondrialen Zielsequenz

Als Zielsequenz wurde ein Bereich der mitochondrialen DNA ausgewählt, der Restriktionsschnittstellen für die im Folgenden verwendeten Restriktionsenzyme enthält. Diese Zielsequenz befindet sich im Bereich zwischen Nukleotid 9912 und Nukleotid 10147 der mitochondrialen Sequenz und kodiert die tRNA^{Gly} und eine Untereinheit des Komplexes I (ND3). Ein Teil dieser Region wurde von *Khrapko et al.* als "Mutations-Hot-Spot"-Region beschrieben [194]. Abbildung 18 zeigt den ausgewählten Sequenzbereich und die Restriktionsschnittstellen (10008 - 10012 Rsa I, 10028 - 10034 Spe I).

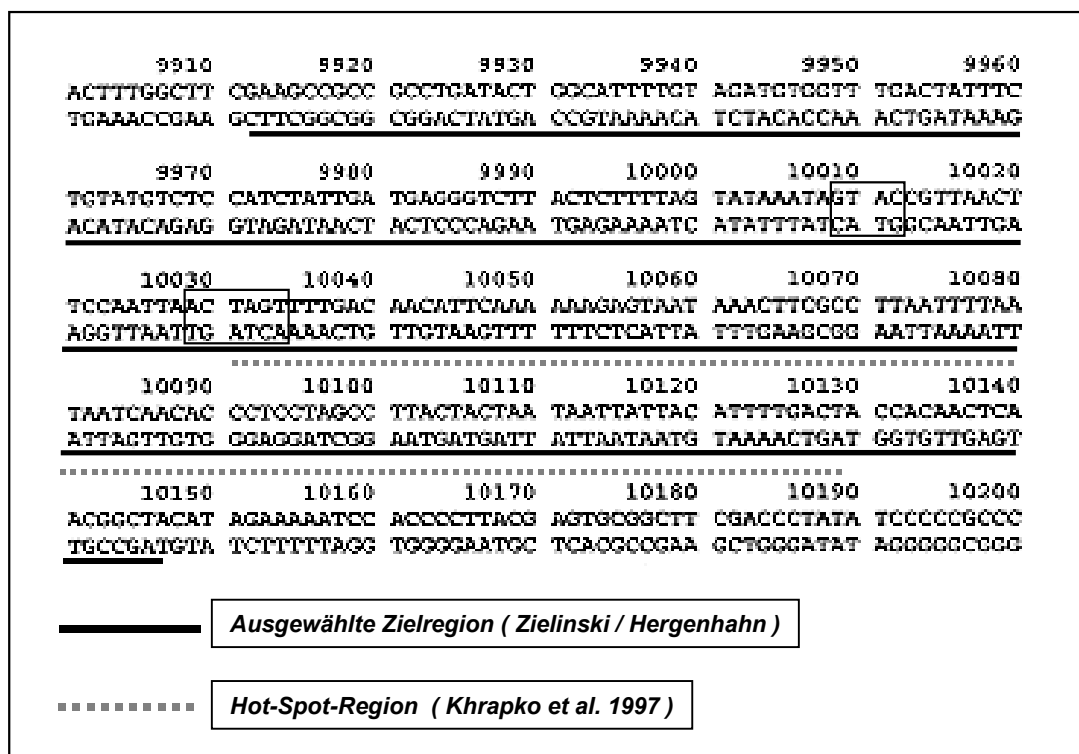


Abb. 17 : Mitochondriale Zielsequenz mit Restriktionsschnittstellen für Rsa I und Spe I (umrahmt)

Um Kreuzkontaminationen zu verhindern, wurden die PCR-Reaktionen in einem mit UV-Licht bestückten Plexiglasbox vorbereitet. Vorbereitung und Analytik der PCR-Reaktionen wurden in unterschiedlichen Labors durchgeführt.

4.4.2 Bestimmung des Gehaltes an mtDNA in Raji Zellen durch kompetitive PCR mit anschließendem Restriktionsenzymverdau

100 ng DNA aus unbehandelten Raji Zellen wurden mit aufsteigenden Kopienzahlen eines in der Spe I - Schnittstelle mutierten ND3_{234 bp}-PCR-Fragments [10 ag (40 Kopien) bis 1 ng (4×10^9 Kopien)] (Dr. M. Hergenahn) unter Standardbedingungen für das ND3_{234 bp} - Fragment amplifiziert, mittels ChromaSpin Säulen gereinigt und nach der PCR mit Spe I verdaut. Die auf diese Weise erhaltenen Produkte wurden auf einem 2,5 %igem Agarosegel getrennt und densitometrisch analysiert. Die Kopienzahl an mitochondrialer DNA wurde durch einen Vergleich der Spe I-resistenten Bande (zugesetztes mutiertes Fragment) mit der geschnittenen wt-Bande bestimmt.

4.4.3 Restriktionsschnittstellen Mutations - Test (RSM-Test)

- *Vorgehensweise beim RSM-Test :*

400 ng genomische DNA aus einfach CAA-behandelten und Rotenon selektierter Zellen wurden mit 40 U Taq I in einem Taq I-Verdaupuffer (10 mM Tris x HCl (pH 8), 5 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,1 mg/ml BSA) in einem Gesamtvolumen von 40 µl für 24 Std. bei 65°C geschnitten und die 270 bp Zielregion (ND3) aus einem 2,5 %igem Agarosegel isoliert. Danach wurde die Ziel DNA mit je 20 U Rsa I bzw. Spe I in einem für diese Restriktiosenzyme notwendigen Puffer (33 mM Tris-Acetat (pH 7,9), 10 mM Mg-Acetat, 66 mM K-Acetat, 0,1 mg / ml BSA) für weitere 24 Std. bei 37 °C verdaut. Die auf diese Weise erhaltenen DNA Fragmente wurden erneut über ein 2,5 %iges Agarosegel getrennt und die verbleibenden 270 bp Fragmente aus dem Gel isoliert. Diese Fragmente wurden mittels PCR nach Standardbedingungen für das ND3_{234 bp}-Fragment amplifiziert und mit dem entsprechenden Restriktionsenzym (Rsa I / Spe I) nachverdaut, um eventuell dem ersten enzymatischen Schnitt entkommende wt - Fragmente zu eliminieren. Die erhaltenen Rsa I / Spe I resistenten Banden wurden unter den oben beschriebenen PCR - Bedingungen nachamplifiziert und sequenziert.

4.4.4 Double PCR Digestion (DPD) - Test

- *Vorgehensweise beim Festphasen-DPD-Test*

Die erste PCR wurde nach Standardbedingungen für das ND3_{234 bp}-Fragment durchgeführt mit den Modifikationen, daß der Primer mtB5 am 5'-Ende mit Biotin gelabelt war, daß 200 ng DNA (aus mehrfach inkubierten Proben) in die PCR eingesetzt wurden und daß die PCR nur über 20 Zyklen lief. 20 µl der Suspension der magnetischen Partikel wurden zweimal mit Biotin / Streptavidin-Bindungspuffer (siehe oben) gewaschen, die aus dem Endlabeling erhaltene DNA Lösung mit einem gleichen Volumen des Bindungspuffers versetzt und zusammen mit den magnetischen Partikeln eine Stunde bei 40 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurden die Proben 3 mal mit dem Bindungspuffer und 3 mal mit 0,1 x TE - Puffer gewaschen. Die auf diese Weise erhaltenen magnetischen Partikel wurden danach direkt in den Restriktionsenzymverdau überführt. Die an den magnetischen Partikel gebundenen Zielsequenzen wurden mit 10 U Rsa I bzw. Spe I in einem für diese Restriktionsenzyme notwendigen Puffer (33 mM Tris-Acetat (pH 7,9), 10 mM Mg-Acetat, 66 mM K-Acetat, 0,1 mg / ml BSA) über Nacht bei 37 °C verdaut. Am nächsten Tag wurde die Verdaulösung ersetzt und der Verdau für mehrere Stunden (2 - 6 Stunden) weitergeführt. Die magnetischen Partikel wurden nach dem Verdau erneut dreimal mit 0,1 x TE gewaschen und danach in die zweite PCR überführt. Diese PCR wurde unter den oben angegebenen Standardbedingungen durchgeführt. 40 µl der auf diese Weise erhaltenen PCR-Produkte wurden unter den gleichen Bedingungen wie oben erneut verdaut, die Produkte wurden gelelektrophoretisch auf einem 2,5 %igem Agarosegel getrennt, die restriktionsenzymresistenten Banden aus dem Gel isoliert und danach sequenziert.

- *Bestimmung der Nachweisgrenze des DPD-Tests*

Dieses Experiment wurde analog zu dem DPD-Test durchgeführt. Dazu wurden 100 ng DNA aus unbehandelten Raji Zellen mit einer zunehmenden Kopienzahl eines in der Rsa I - Schnittstelle mutierten ND3_{234 bp}-PCR-Fragments [10 ag (40 Kopien) bis 1 ng (4 x 10⁹ Kopien)], das durch Dr. M. Hergenbahn zur Verfügung gestellt wurde, gemischt und unter den oben beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

4.4.5 DNA Sequenzierung

Die PCR-Produkte werden über ChromaSpin 100 Säulen gereinigt. 100 bis 150 ng des zu sequenzierenden PCR-Produktes werden mit 3,2 pmol des Sequenzierprimers (ND3_{234 bp} : mtB5 bzw. mtB6A) und 3 µl Big-Dye™ Terminator-Mix in einem Gesamtvolumen von 20 µl zusammengegeben und in einem PCR-Cycler die Sequenzierungsreaktion durchgeführt. Dabei waren die Bedingungen die folgenden :

96 °C - 30 sek., 55 °C - 15 sek., 60 °C - 4 min., für insgesamt 25 Zyklen.

Nach der Sequenzierungsreaktion wurden die Proben über CentriSep Säulen gereinigt, 4 µl des gereinigten Sequenzierungsprodukts mit 20 µl TSR-Puffer gemischt, bei 90 °C für 5 min. denaturiert und dann in einem ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer analysiert.

4.4.6 Deletionsanalyse für die "Common Deletion_{4977 bp}" in mtDNA

Die Analyse der sogenannten "Common Deletion" wurde analog *Meissner et al.* mit kleinen Modifikationen durchgeführt [195]. Die hier verwendeten PCR-Bedingungen findet man in Tabelle 5. Es wurden 200 ng DNA aus mehrfach mit CAA-behandelten Zellen und Taq-Polymerase eingesetzt. Ansonsten entsprach der Ansatz den Standardbedingungen. Die PCR-Produkte (109 bp) wurden auf einem 2,5 %igem Agarosegel getrennt und mittels eines Densitometers quantifiziert. Die Nachweisgrenze dieses Versuches wurde mittels eines Plasmids , daß die "Common Deletion" enthielt, bestimmt. Dieses Plasmid wurde freundlicherweise von Frau Dr. N. von Wurmb und Herrn Prof. G. Cortopassi (University of California, Davis, CA95616, USA) zur Verfügung gestellt.

5 Ergebnisse

5.1 Einfluß von 2-Chloracetaldehyd auf Wachstum, DNA-Replikation, -Reparatur und mitochondriale Aktivität von Raji Zellen

5.1.1 Wachstumskurven von Raji Zellen nach Exposition mit 2-Chloracetaldehyd

Wachstumskurven von Raji Zellen wurden in Abhängigkeit von der CAA-Konzentration erstellt, um den subtoxischen Bereich dieser Substanz einzugrenzen, denn CAA sollte in den folgenden Versuchen zur Induktion von etheno-DNA-Addukten in Raji Zellen dienen. Raji Zellen wurden wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben mit 30, 60 und 100 μM CAA behandelt. Der Effekt von CAA auf Raji Zellen war sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig. Das Zellwachstum nach einer 15-minütigen Inkubation wurde in Abhängigkeit von der CAA Konzentration in den ersten 24 Stunden um 23 (30 μM)- 39% (100 μM) inhibiert. Der Anteil an lebenden Zellen zu diesem Zeitpunkt betrug $84 \pm 9\%$ (30 μM), $83 \pm 6\%$ (60 μM) und $77 \pm 5\%$ (100 μM). Es zeigte sich weiter, daß der Effekt von CAA auf Raji Zellen mit zunehmender Inkubationszeit deutlich zunahm. Die Zellzahl nach einer 60-minütigen Inkubation mit CAA war nach 24 Stunden um 19 - 33% geringer, was mit den 15-Minuten Werten vergleichbar ist. Der Anteil an lebenden Zellen betrug jedoch nur noch $83 \pm 5\%$ (30 μM), $70 \pm 12\%$ (60 μM) und $54 \pm 24\%$ (100 μM). Dieser konzentrations- und zeitabhängige Effekt trat also besonders ab einer Konzentration von 60 μM auf. Abbildung 18 stellt die Wachstumskurven in Abhängigkeit von der CAA-Konzentration und der Inkubationsdauer dar.

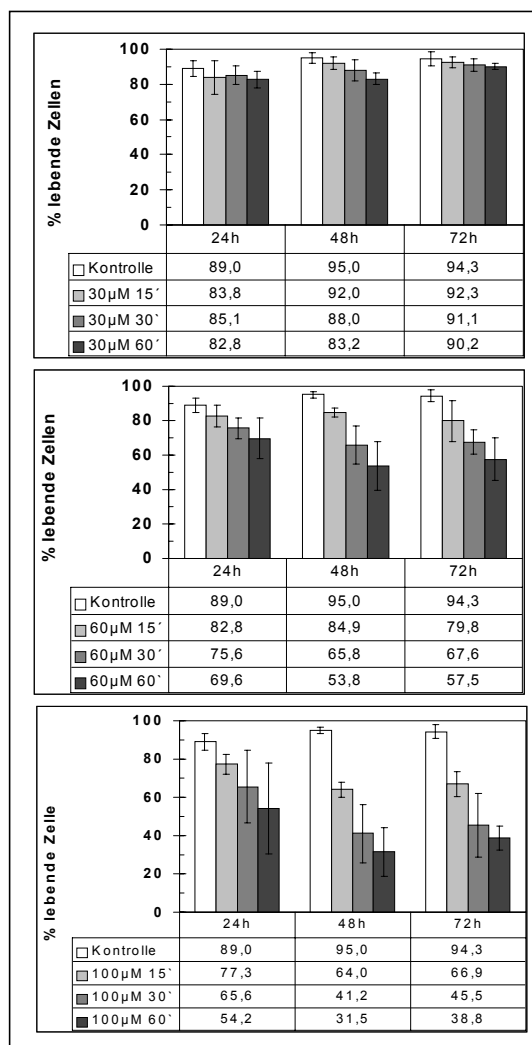


Abb. 18 : Zellzahl von Raji Zellen in Abhängigkeit von der CAA-Konzentration (30, 60 und 100 µM) und der Inkubationsdauer (15, 30 und 60 Minuten). Die Diagramme geben den Anteil lebender Zellen in % wieder (MW \pm SD, n = 2 mit Duplikaten).

5.1.2 Nachweis von BrdU-Einbau nach 2-Chloracetaldehyd-Inkubation (UDS Test)

Der BrdU-Einbau-Test wurde ursprünglich von Gratzner et al. (1982) entwickelt, um DNA-Replikation in geringem Ausmaß auf zellulärer Ebene nachzuweisen [196]. Der Einbau von BrdU wird immunzytochemisch mit einem anti-BrdU-Antikörper nachgewiesen, der Fluorescein-markiert ist. In diesem Test findet man nach 24 und 48 Stunden eine dosisabhängige Abnahme des Einbaus von BrdU in zelluläre DNA nach CAA-Behandlung. Die Behandlung mit 100 µM CAA führte zu einer niedrigen Einbaurate an BrdU, ähnlich den Positiv-Kontrollen (10 mM Hydroxyharnstoff-behandelte Zellen, zur Hemmung der DNA-Replikation). Selbst die Behandlung der

Zellen mit 10 μM CAA hatte einen reduzierten Einbau an BrdU zur Folge, wenn auch nicht in demselben Ausmaß wie in den mit 100 μM behandelten Proben. Abbildung 19 gibt die Ergebnisse dieser Versuche wieder. Als Maß für die Höhe des BrdU-Einbaus wurden die relative Fluoreszenz-Intensität und die Größe der fluoreszierenden Areale benutzt. Die Linksverschiebung der Signale zu geringeren Flächen und Intensitäten gibt die Einbauhemmung von BrdU wieder. Alles in allem resultierte die Behandlung mit CAA in einer starken Hemmung des BrdU-Einbaus verglichen mit den unbehandelten Kontrollen.

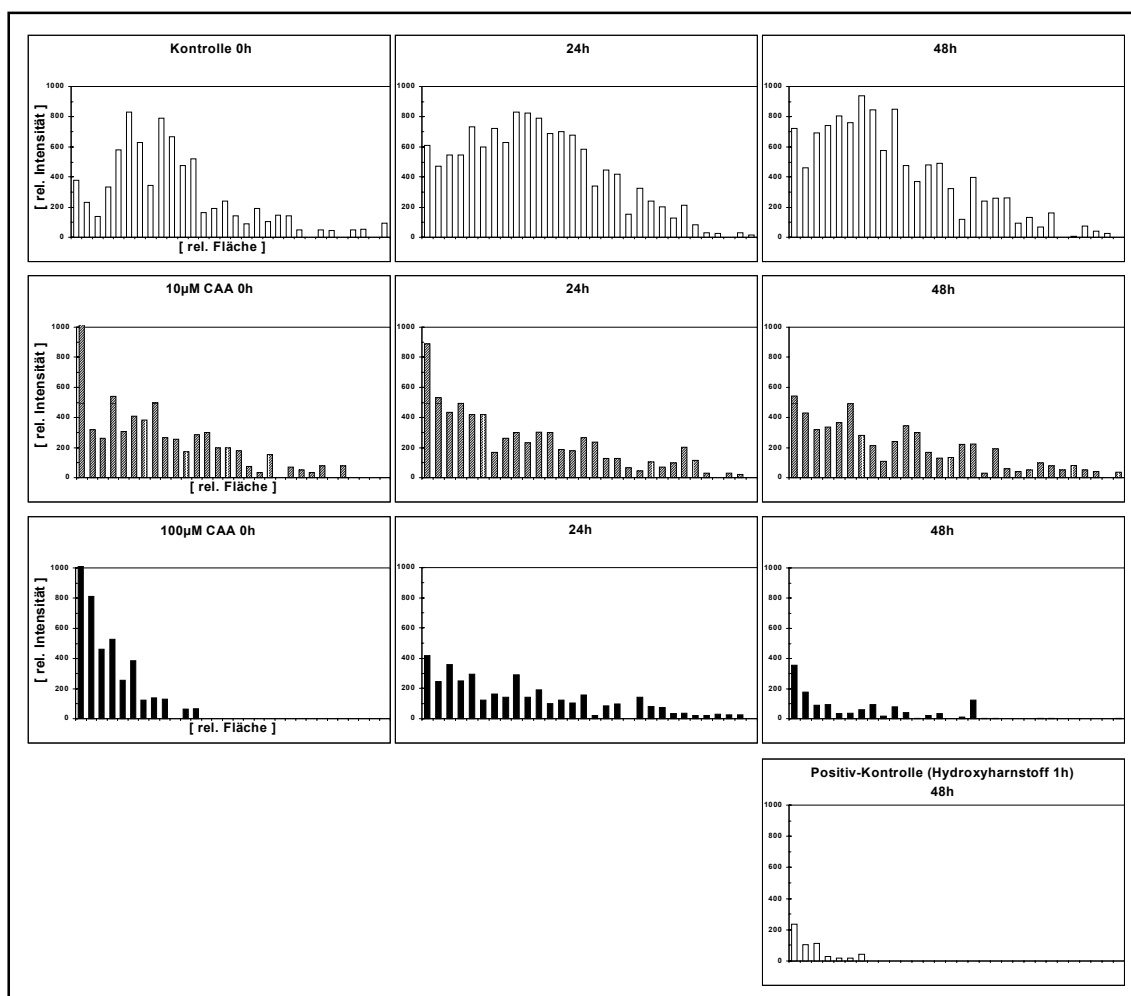


Abb. 19 : Ergebnisse des BrdU-Tests nach CAA-Behandlung (10, 100 μM). Die Daten sind als relative Fluoreszenzen gegen die relative Größe der fluoreszierenden Areale dargestellt. Oben : Kontrollen (0, 24 und 48 h), Mitte : 10 μM -behandelte Proben (0, 24 und 48 h), Unten : 100 μM -behandelte Proben (0, 24 und 48 h), einzelnes Bild unten : Positive Kontrolle (einstündig 10 mM Hydroxyharnstoff zur Hemmung der DNA-Replikation in einer unbehandelten Kontrolle nach 48 h). Die Balken beschreiben Mittelwerte aus 2 Experimenten mit Doppelbestimmungen.

5.1.3 2-Chloracetaldehyd-abhängige Bildung von DNA-Quervernetzung in Raji Zellen. Nachweis durch den 'Comet Assay' (Einzelzell-Mikrogelelektrophorese)

Der 'Comet Assay' wurde 1984 von Östling et al. zur Bestimmung von DNA-Schäden in einzelnen Zellen etabliert [197]. Nach Behandlung von Raji Zellen mit CAA wären DNA-Schäden - erkennbar als 'Kometenschweife' - zu erwarten gewesen, falls CAA unmittelbar, oder indirekt durch DNA-Reparatur, Einzel- oder Doppelstrangbrüche in der DNA induziert hätte. Tatsächlich aber resultierte die Behandlung von Raji Zellen mit 10 und 100 µM CAA in einem reduzierten Olive-Tail-Moment (OTM = % der DNA im Schweif x Schweiflänge [198]) und einer reduzierten Schweiflänge in Relation zu den unbehandelten Kontrollen (Tabelle 6). Es konnten keine zeitabhängigen Unterschiede in diesen Parametern zwischen 0 und 24 Stunden festgestellt werden. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit Ergebnissen, die von anderen bei 1,1 - 11,5 mM CAA erhalten wurden [199], obwohl hier niedrigere Konzentrationen an CAA und kürzere Inkubationszeiten verwendet wurden.

<i>Probe</i>	<i>Kontrolle (PBS)</i>	<i>10 µM CAA</i>	<i>100 µM CAA</i>
Olive Tail Moment	11,9 ± 10,3	8,4 ± 7,2	6,4 ± 6,8
Schweiflänge [µm]	187 ± 76	160 ± 56	158 ± 59

Tabelle 6 : Ergebnisse des Comet Assay nach CAA Behandlung von Raji Zellen. Pro Objektträger wurden 51 Zellen zufällig ausgewählt und ausgewertet. Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 2 mit Doppelbestimmungen = 4 x 51 Zellen).

5.1.4 MTT-Test zur Überprüfung der mitochondrialen Aktivität

Dieser Test wurde ursprünglich von Mosman [200] entwickelt, um damit Zellwachstum beziehungsweise das Absterben von Zellen zu untersuchen. Er beruht auf der Tatsache, daß das 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid in Zellen zu dem farbigen Produkt Formazan umgesetzt wird, welches man spektrophotometrisch bestimmen kann. Bis dato geht man davon aus, daß Mitochondrien in dem Prozeß der Formazanbildung involviert sind, aber man kann

nicht ausschließen, daß cytosolische Dehydrogenaseaktivitäten ebenfalls einen Beitrag zur Formazan-Bildung leisten. Hier sollte überprüft werden, ob CAA die Aktivität von Komplexen der Atmungskette beeinträchtigt, wie es bei der Modifikation von Proteinen durch CAA zu erwarten wäre. Die Konvertierung von 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid zu dem farbigen Produkt Formazan ist abhängig von der Zellzahl, weswegen Ansätze mit verschiedenen Zellzahlen (2×10^5 , 4×10^5 und 8×10^5 Zellen) durchgeführt wurden, um eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen und den Einfluß von technischen Fehlern zu minimieren. Wir verwendeten eine Modifikation dieses Tests, die von Hansen et al. entwickelt wurde [201]. In einem Zeitraum bis vier Stunden nach der Inkubation mit CAA konnte man eine Tendenz zur Abnahme an der Formazan-Bildung bei den behandelten Proben feststellen, die auf eine Interaktion von CAA mit Mitochondrien hinweist. Eine signifikante Dosis-Wirkungs-Beziehung ließ sich allerdings nicht feststellen. Überraschenderweise zeigten die Werte der Formazankonzentration der 30 μM behandelten Zellen nach 24 Stunden eine Tendenz zu höheren Werten als die der Kontrollzellen.

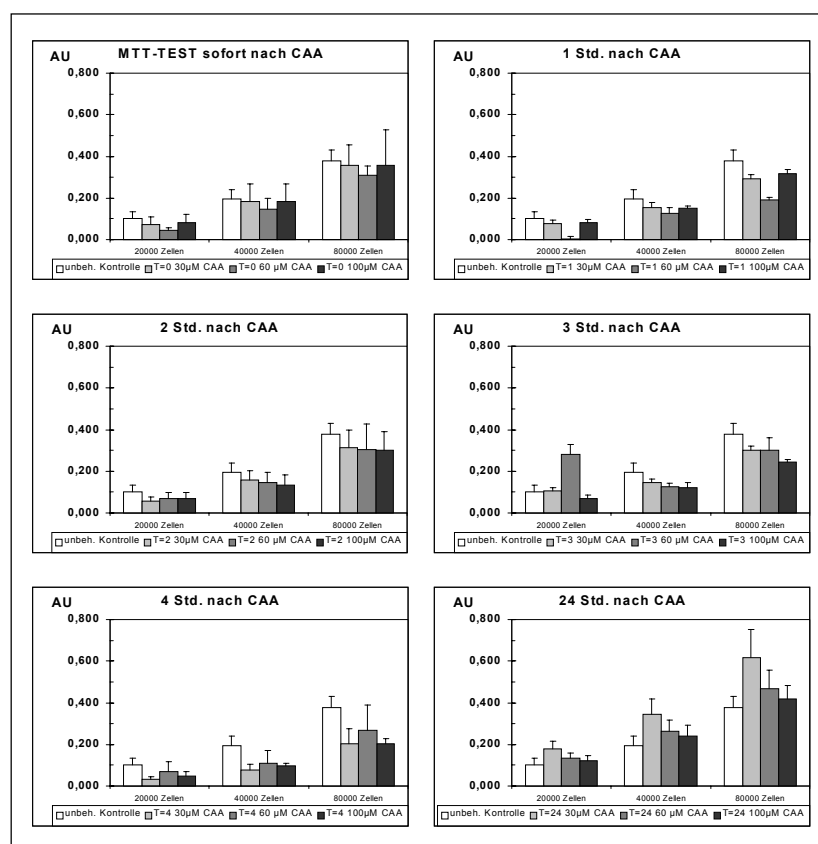


Abb. 20 : Ergebnisse des MTT-Tests nach Behandlung von Raji Zellen mit 30, 60 und 100 μM CAA zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Inkubation. Die dargestellten Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm Extremwerte aus zwei Versuchen, davon einer mit Doppelbestimmungen.

5.1.5 Zusammenfassung des Einflusses von 2-Chloracetaldehyd auf Wachstum, DNA-Replikation, -Reparatur und mitochondriale Aktivität von Raji Zellen

Das cytotoxische Potential von CAA wurde mittels Wachstumskurven untersucht, der subtoxische Konzentrationsbereich wurde auf den Bereich unter 100 µM CAA eingegrenzt. Die weiteren Versuche wie der BrdU-Einbau-Test, Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) und der MTT-Test dienten zur weiteren mechanistischen Aufklärung des cytotoxischen Potentials von CAA. Wie in Abschnitt 5.1.1 gezeigt, hat CAA in den verwendeten Konzentrationen einen relativ großen Einfluß auf das Wachstumsverhalten von Raji Zellen. Dieser Einfluß beruht unter anderem auf der Hemmung der DNA-Replikation und DNA-Reparatur (Abschnitt 5.1.2). Diese Beobachtungen konnten mittels des 'Comet Assay' bestätigt werden (Abschnitt 5.1.3), denn die Reduktion des Olive-Tail-Moments und der Länge der Kometen beruht auf einer CAA-abhängigen Kondensation der zellulären DNA, was in erster Linie auf DNA-DNA- Quervernetzungen zurückzuführen ist. Neben den bisher beschriebenen Schäden scheint CAA auch einen schädigenden Einfluß auf Mitochondrien zu haben. In Abschnitt 5.1.4 wurde die CAA-abhängige Abnahme der Formazanbildung über einen Zeitraum bis zu 24 Stunden nach Inkubation beschrieben.

5.2 DNA Adduktanalytik

5.2.1 Etablierung einer HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion zur Bestimmung von etheno-Desoxyadenosin-Addukten aus DNA

Eines der Ziele dieser Arbeit war die Entwicklung einer einfachen und nicht-radioaktiven Alternative zur Immunaффinitäts-³²P-Postlabelling-Methode von Nair et al. [119]. Die Anforderungen an diese Methode waren, daß man mit ihrer Hilfe etheno-Desoxyadenosin-Adduktspiegel in physiologischen Bereichen bestimmen könne [121], wobei es wichtig war, mit möglichst wenig DNA auszukommen. Daher wurde DNA aus behandelten Raji Zellen (CAA oder Zigarettenrauchlösung) enzymatisch mit einer Kombination aus Nuklease P1 und alkalischer Phosphatase (NP1 / AP) zu Nukleosiden hydrolysiert; danach wurde sofort mittels HPLC / Fluoreszenzdetektion

der Gehalt an etheno-Desoxyadenosin bestimmt. Der Quotient aus der Menge (50 fmol) der injizierten Standardlösung und den gemessenen Peakflächen betrug über alle Versuche $0,265 \pm 0,02$ (MW \pm SD). Der Anteil der unmodifizierten Nukleotide wurde mittels HPLC / UV-Detektion ermittelt, daraus wurden die relativen Adduktraten errechnet und als $\epsilon\text{dA} / 10^5 \text{ dA}$ dargestellt.

5.2.2 Bestimmung des Detektionslimits der verwendeten HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion

Nach Etablierung der Methode mußte das Detektionslimit mit Hilfe einer Standardlösung aus etheno-Adenosin und etheno-Desoxyadenosin bestimmt werden, die von Dr. J.Nair (Abt. Toxikologie und Krebsrisikofaktoren, DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurde (Abbildung 21).

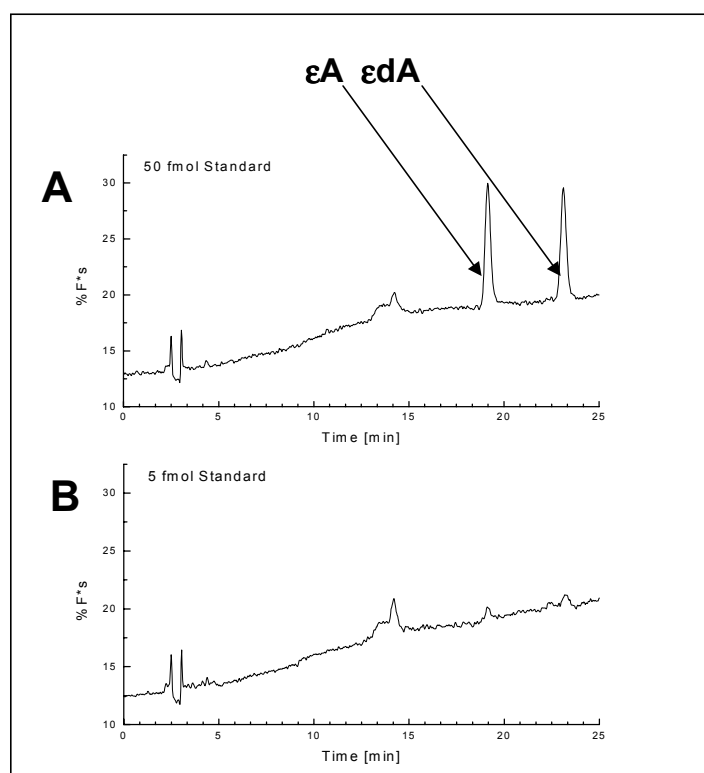


Abb. 21 : Beispiele für Chromatogramme der etheno-Adenosin- / etheno-Desoxyadenosin-Standardlösungen bei A : 50 fmol ϵA / ϵdA , B : 5 fmol ϵA / ϵdA pro Injektion.

Wie aus den dargestellten Chromatogrammen zu entnehmen ist, befindet sich das Detektionslimit der Methode in einem Bereich um 5 fmol ϵdA . Daraus ergibt sich ein theoretisches Detektionslimit von $\sim 2,8 \epsilon\text{dA} / 10^7 \text{ dA}$ ausgehend von 20 μg DNA.

Damit ist es möglich, etheno-dA-Spiegel in der Größenordnung publizierter pathophysiologischer Spiegel zu bestimmen [119-123,125]. Abbildung 22 zeigt den linearen Verlauf von Standardkurven in Abhängigkeit der injizierten Menge an dA und ϵ dA über einen Bereich von 5 bis 50 fmol.

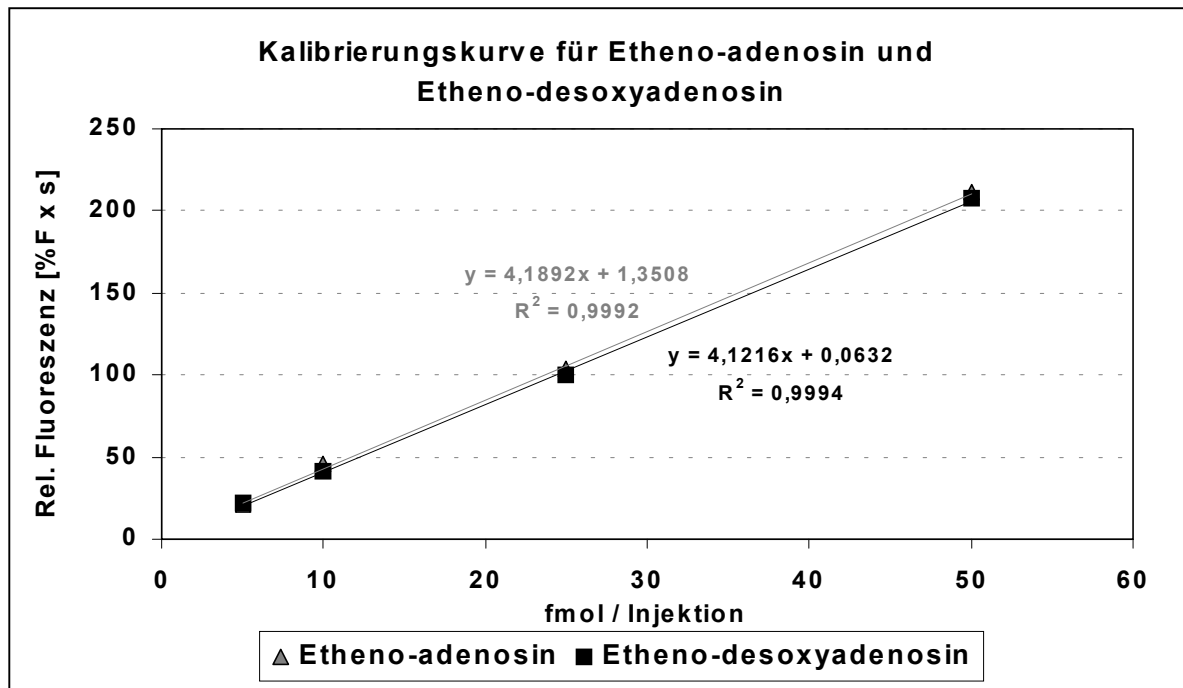


Abb. 22 : Standardkurven von etheno-Adenosin (ϵ A) und etheno-Desoxyadenosin (ϵ dA). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm Extremwerte. Wo die Fehlerbalken nicht sichtbar sind, ist der Fehler kleiner als der dargestellte Datenpunkt.

Diese HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion zur Bestimmung von etheno-Desoxyadenosin-DNA-Addukten sollte im Folgenden für zwei Applikationen genutzt werden :

- Bestimmung von etheno-Desoxyadenosin aus DNA von CAA behandelten Raji Zellen und
- Bestimmung von etheno-Desoxyadenosin aus DNA von Raji Zellen, die mit Zigarettenrauchlösung behandelt waren: es ist berichtet worden, daß Zigarettenrauch Lipidperoxidation auslösen kann und als Folge davon exozyklische-DNA-Addukte aus den entstehenden Metaboliten gebildet werden [69,70].

5.2.3 Analyse und Quantifizierung von etheno-Desoxyadenosin-Addukten in zellulärer DNA nach Inkubation mit 2-Chloracetaldehyd

Raji Zellen wurden wie im Abschnitt 4.1.2 beschrieben mit 30, 60 und 100 μM CAA inkubiert und danach für 0,1,2,3 und 24 Stunden wieder in Kultur gesetzt, um die Kinetik der Adduktbildung beziehungsweise die DNA-Reparatur in den Raji Zellen in einem Zeitraum von bis zu 24 Stunden untersuchen zu können. Abbildung 23 gibt die Ergebnisse dieser Experimente wieder.

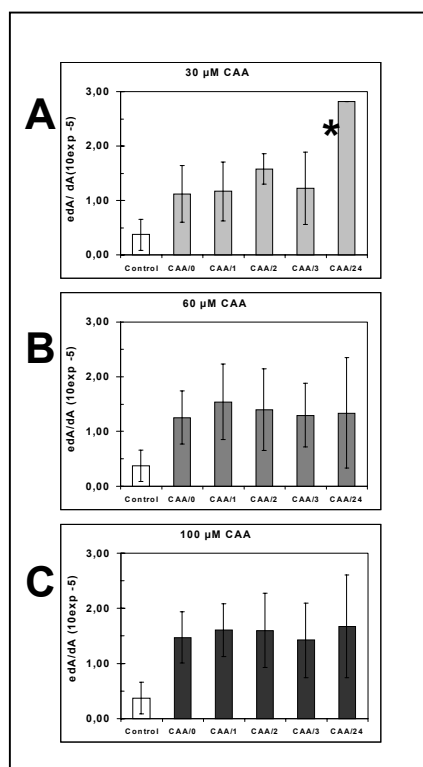


Abb. 23 : Kinetik der ϵdA Adduktbildung von Raji Zellen in Abhängigkeit von der CAA-Konzentration. A : Kinetik nach Inkubation von Raji Zellen mit 30 μM CAA (Reihenfolge der Proben : unbehandelte Kontrolle, Proben nach 0, 1, 2, 3 und 24 Stunden nach Inkubation, [* dieser Wert konnte nur einmal bestimmt werden]). B : Inkubation mit 60 μM CAA, C : Inkubation mit 100 μM CAA. Die Daten sind als relative Adduktwerte dargestellt ($\epsilon\text{dA} / 10^5 \text{dA}$). Mittelwerte \pm Extremwerte aus drei Experimenten.

Wie man aus Abbildung 23 entnehmen kann, bleiben die Adduktraten bei allen drei Konzentrationen über einen Zeitraum von 24 Stunden nahezu konstant. Da kein zeitlicher Einfluß auf die Adduktraten feststellbar war, wurden die einzelnen Werte der jeweiligen Konzentrationen zusammengefaßt, um den konzentrationsabhängigen Einfluß von CAA zu bestimmen. Dieses Ergebnis ist in Abbildung 24 dargestellt.

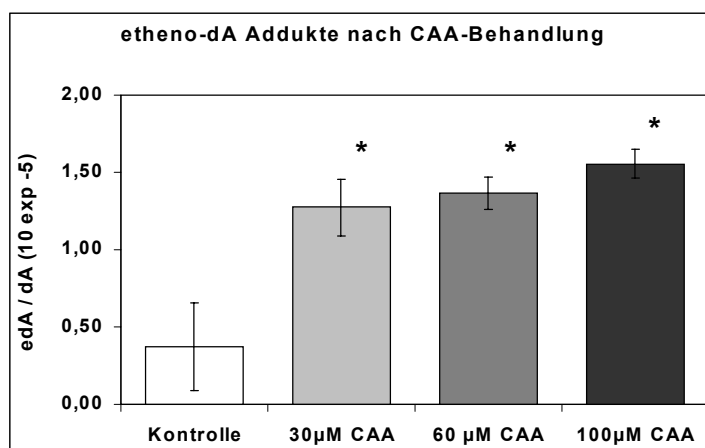


Abb. 24 : Abhängigkeit der Adduktspiegel von der CAA-Konzentration. Mittelwerte \pm Standardabweichung (*p < 0,05 gegenüber Kontrolle ; n = 3).

Wie aus Abbildung 24 zu entnehmen ist, nahmen die etheno-Desoxyadenosin-Adduktspiegel um den Faktor 3,4 (30 µM CAA), 3,6 (60 µM CAA) und 4,1 (100 µM CAA) gegenüber den unbehandelten Kontrollen zu. Die etheno-Desoxyadenosin-Adduktraten (edA / 10^5 dA) betragen dabei $0,38 \pm 0,29 \times 10^{-5}$ (Kontrollen), $1,27 \pm 0,18 \times 10^{-5}$ (30 µM CAA), $1,37 \pm 0,10 \times 10^{-5}$ (60 µM CAA), $1,55 \pm 0,10 \times 10^{-5}$ (100 µM CAA).

5.2.4 Quantifizierung von etheno-Desoxyadenosin-Addukten in zellulärer DNA nach Inkubation mit Zigarettenrauchlösung (CS)

Raji Zellen wurden wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben mit Zigarettenrauchlösung inkubiert, die DNA wurde direkt nach der Inkubation isoliert und danach mittels Nuklease P1 und alkalischer Phosphatase zu Nukleosiden hydrolysiert. Mit Hilfe der hier verwendeten HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion gelang es tatsächlich, etheno-Desoxyadenosin-Addukte in DNA aus Raji Zellen nach Inkubation mit Zigarettenrauchlösung zu detektieren. Die Identität der Peaks bei der Retentionszeit für etheno-Desoxyadenosin wurde durch einen Vergleich der Fluoreszenzspektren der behandelten Proben mit einem etheno-Desoxyadenosin-Standard bestätigt. Abbildung 25a zeigt Ausschnitte aus Chromatogrammen nach Behandlung von Raji Zellen mit Zigarettenrauchlösung. Abbildung 25b gibt die dazugehörigen Online-Fluoreszenzspektren des Standards und einer CS 1:100-behandelten Probe wieder.

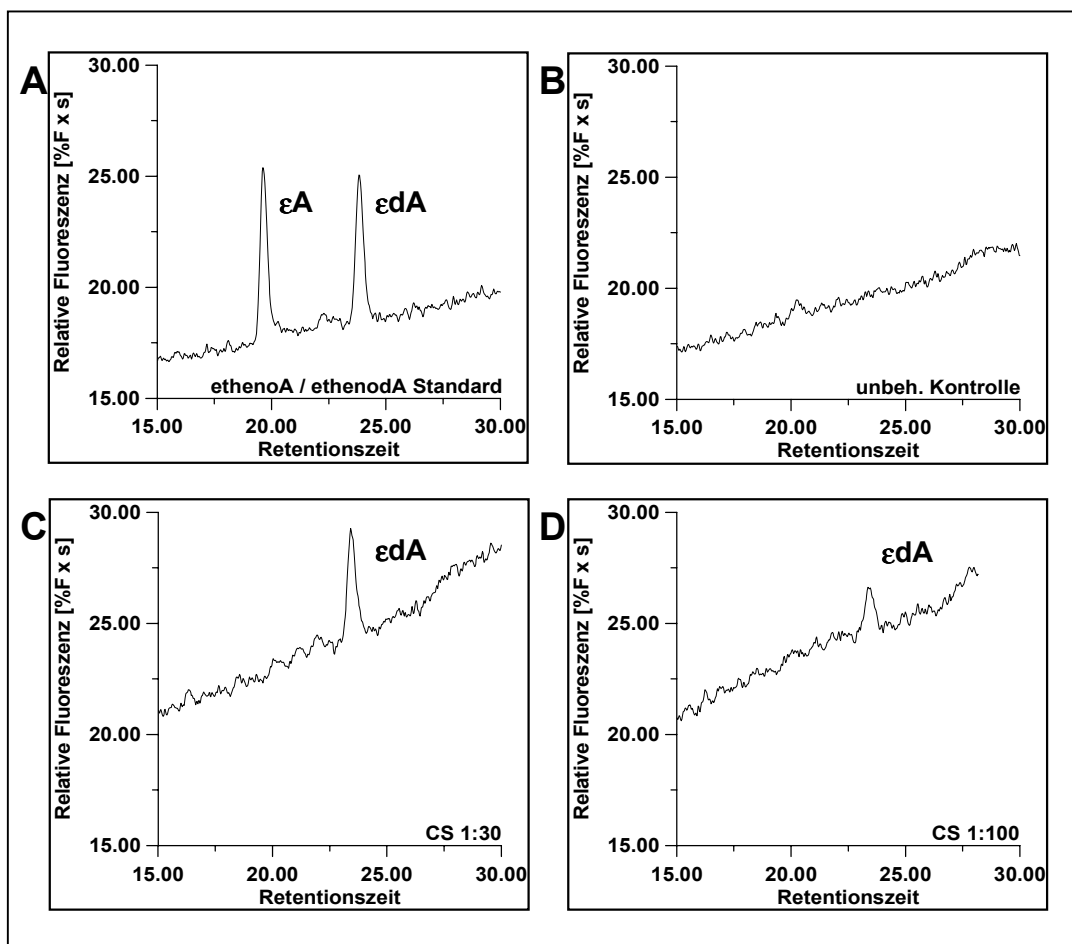


Abb. 25a : Ausschnitte aus Chromatogrammen der ϵ dA-Bestimmung aus Raji Zellen nach Inkubation mit Zigarettenrauchlösung. (A: Standard, B: unbeh. Kontrolle, C: CS 1:30, D: CS 1:100)

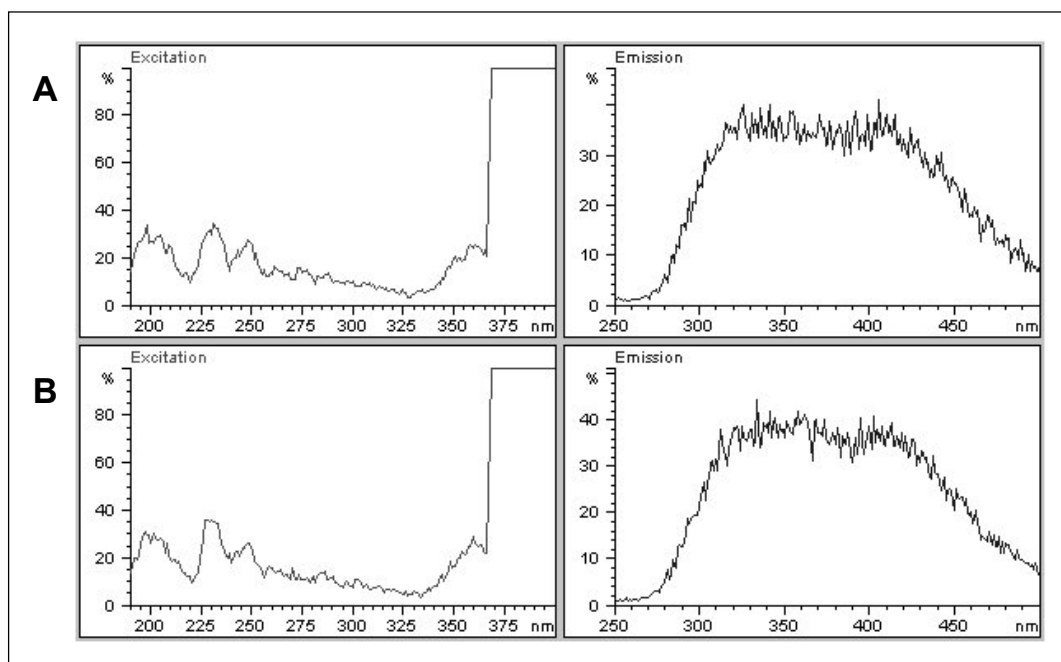


Abb. 25b : Online Fluoreszenzspektren zur Bestimmung der Identität der Peaks bei der Retentionszeit für ϵ dA (A : Fluoreszenzspektren eines ϵ dA - Standards, B : CS 1:100).

Die etheno-Desoxyadenosin-Adduktrate ($\text{edA} / \text{dA} \times 10^{-5} \text{ MW} \pm \text{SD}$) betragen dabei $0,19 \pm 0,11 \times 10^{-5}$ (Kontrollen), $0,48 \pm 0,21 \times 10^{-5}$ (CS 1:100), $0,45 \pm 0,20 \times 10^{-5}$ (CS 1:30) und $0,43 \pm 0,28 \times 10^{-5}$ (CS 1:10) direkt nach der Inkubation mit Zigarettenrauchlösung. Ein Konzentrationseinfluß auf die Bildung von etheno-Desoxyadenosin-DNA-Addukten konnte bei den verwendeten Verdünnungen der Zigarettenrauchlösung (1:100, 1:30 und 1:10) also nicht festgestellt werden. Diese Experimente wurden zweimal mit insgesamt acht Meßwerten durchgeführt. Abbildung 26 gibt das Ergebnis dieser Experimente wider.

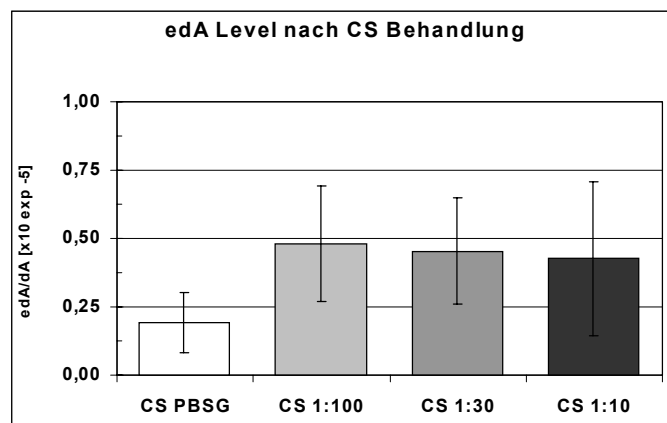


Abb. 26 : Etheno-Desoxyadenosin-Addukte nach Behandlung von Raji Zellen mit Zigarettenrauchlösung in den Verdünnungen 1:100, 1:30 und 1:10. (MW \pm SD; $p = 0,01$ nach Berechnung mit dem Jonckheere-Terpstra Trendtest, $n = 2$).

5.2.5 Qualitativer Nachweis von etheno-Desoxyadenosin-DNA-Addukten in mitochondrialer DNA

Raji Zellen wurden mit $100 \mu\text{M}$ CAA behandelt, für Zeiträume von 1, 3 und 6 Stunden in Kultur gesetzt und nach diesen Zeiten wurden die Mitochondrien isoliert. Die mitochondriale DNA wurde daraufhin isoliert. Anhand einer PCR-Lightcycler-Analyse (Bestimmung von β -Actin) wurde die Reinheit der mitochondrialen DNA überprüft. Es wurde festgestellt, daß die mtDNA nur mit vernachlässigbaren Mengen an Kern DNA verunreinigt war. Je $16,5 \mu\text{g}$ der mtDNA wurden daraufhin mittels Nuklease P1 und alkalischer Phosphatase zu Nukleosiden verdaut und mittels HPLC auf etheno-Desoxyadenosin untersucht. Abbildung 27 zeigt Ausschnitte der Chromatogramme dieses Versuches.

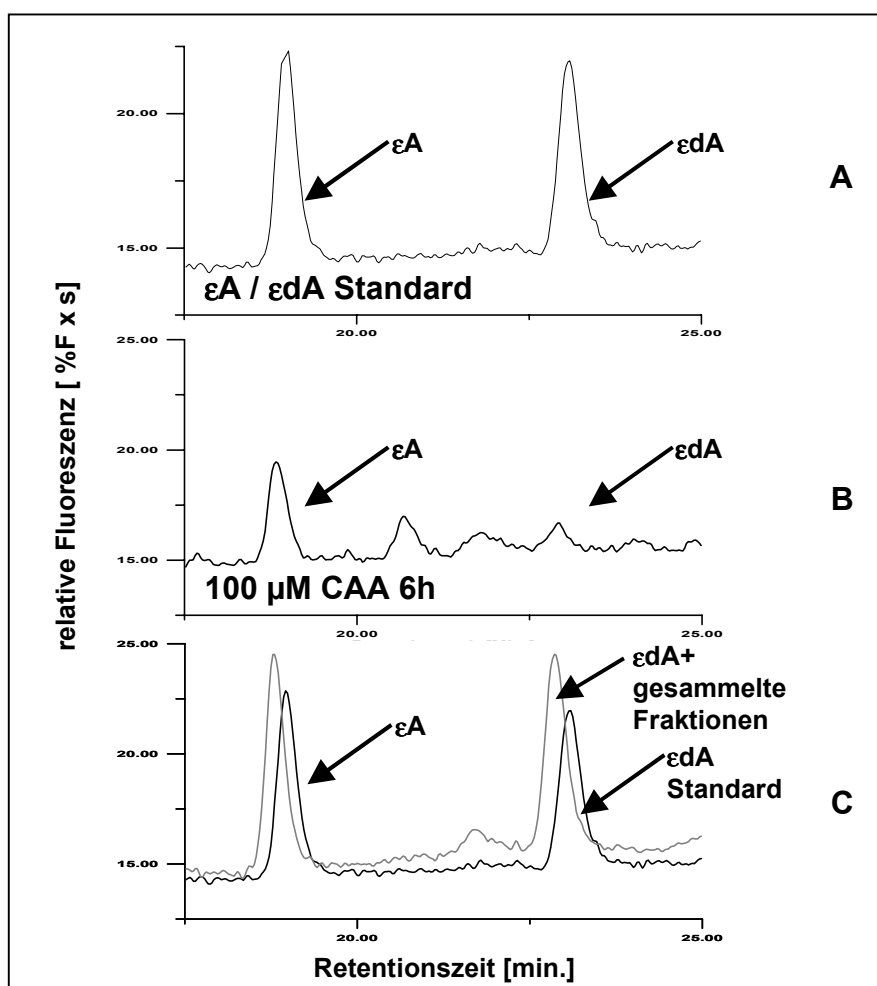


Abb. 27 : Chromatogramme der etheno-Desoxyadenosin Bestimmung aus mitochondrialer DNA. Reihenfolge der Chromatogramme : A : ϵA / ϵdA - Standard (50 fmol), B : mtDNA aus 100 μM behandelten Raji Zellen, C : Überlagerungschromatogramm eines ϵA / ϵdA - Standard (50 fmol) und gesammelten Fraktionen aus mehreren HPLC-Läufen.

Da der Gehalt an etheno-Desoxyadenosin-Addukten sich im Bereich des Detektionslimits der verwendeten HPLC-Methode bewegte (Abb. 27 B), wurden aus mehreren Läufen Fraktionen im Bereich der Retentionszeiten von ϵA / ϵdA (~20 - 23 min.) gesammelt, aufkonzentriert und nochmals analysiert. Der Nachweis von etheno-Desoxyadenosin-Addukten in mitochondrialer DNA gelang durch Koelution mit einer ϵA / ϵdA - Standardlösung, die einem Aliquot der gesammelten ϵdA -Fraktionen zugesetzt wurde und zu einer Verschiebung der Peakverhältnisse zwischen ϵA und ϵdA führte. Dieses Experiment wurde einmal durchgeführt.

5.2.6 Zusammenfassung der Ergebnisse der etheno-Desoxyadenosin-DNA-Adduktanalytik

Die in den Abschnitten 5.2.2 und 5.2.3 beschriebenen Ergebnisse zeigen die Möglichkeiten der in dieser Arbeit entwickelten HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion auf. Das Detektionslimit dieser Methode liegt bei $\sim 2,8 \text{ } \mu\text{dA} / 10^7 \text{ dA}$ ausgehend von $20 \text{ } \mu\text{g}$ DNA. Verglichen mit dem bisher zur Analytik von etheno-DNA-Addukten verwendeten ^{32}P -Postlabelling mit vorgeschalteter Immunaффinitätschromatographie [119] liegt das Detektionslimit der hier beschriebenen Methode um den Faktor ~ 600 höher, wobei das Potential dieser Methode noch nicht voll ausgeschöpft wurde: durch Erhöhung der verwendeten DNA-Mengen und durch den Einsatz einer vorgeschalteten Immunaффinitätschromatographie ließe sich das Detektionslimit sicherlich noch um den Faktor 10 - 100 verbessern. Die hier beschriebene Methode wurde für zwei Applikationen verwendet :

- Detektion von etheno-Desoxyadenosin-Addukten nach Behandlung von Zellen mit CAA und
- Detektion von etheno-Desoxyadenosin-DNA-Addukten nach Behandlung von Raji Zellen mit Zigarettenrauchlösung.

Der Hintergrund an etheno-Desoxyadenosin-Addukten in Raji Zellen lag in einem Bereich von $\sim 1,9 - 3,8 \times 10^{-6} \text{ } \mu\text{dA} / \text{dA}$, was möglicherweise auf Lipidperoxidation-induzierte etheno-DNA-Addukte in Raji Zellen zurückzuführen ist. Zum ersten Mal gelang es, etheno-DNA-Addukte in Raji Zellen nach Exposition mit Zigarettenrauchlösung nachzuweisen, wobei es offen bleibt, ob diese Addukte durch Zigarettenrauch-ausgelöste Lipidperoxidation oder durch direkte Reaktion mit Inhaltsstoffen des Zigarettenrauchs gebildet wurden.

5.3 Nachweis der genspezifischen Induktion von etheno-DNA-Addukten

5.3.1 Nachweis von etheno-(ϵ)-dA-Addukten in mitochondrialen Genen mittels SELBIODD (Selection of biotinylated damaged DNA) Test

Diese in unsere Abteilung entwickelte Methode dient zum genspezifischen Nachweis von DNA-Läsionen [189]. Sie beruht darauf, daß DNA-Läsionen wie DNA-Addukte durch DNA-Reparaturenzyme spezifisch zu Apurin Stellen (AP - Sites) konvertiert werden. Diese werden dann mittels NaOH beziehungsweise mittels humaner AP-Endonuklease (zur Verringerung des NaOH-induzierten Hintergrunds) in DNA-Einzelstrangbrüche überführt, die danach am 3'-Ende mit Biotin - 16 - dUTP markiert werden. Diese markierten Fragmente werden zusammen mit dem unmarkierten DNA-Hintergrund mit Restriktionsenzymen verdaut, über ein Agarosegel getrennt und die gewünschte Zielsequenz wird zusammen mit anderen Sequenzen der selben Größe aus dem Gel isoliert. DNA-Fragmente, die ein biotinyliertes Nukleotid an der Stelle des ϵ dA-Adduktes tragen, werden an Streptavidin-beschichtete magnetische Partikel gebunden und mittels PCR nachgewiesen. Diese Methode mußte auf die jetzige Fragestellung hin modifiziert und weiterentwickelt werden. Abbildung 28 zeigt die prinzipielle Vorgehensweise für den Nachweis von etheno - (ϵ) - Desoxyadenosin.

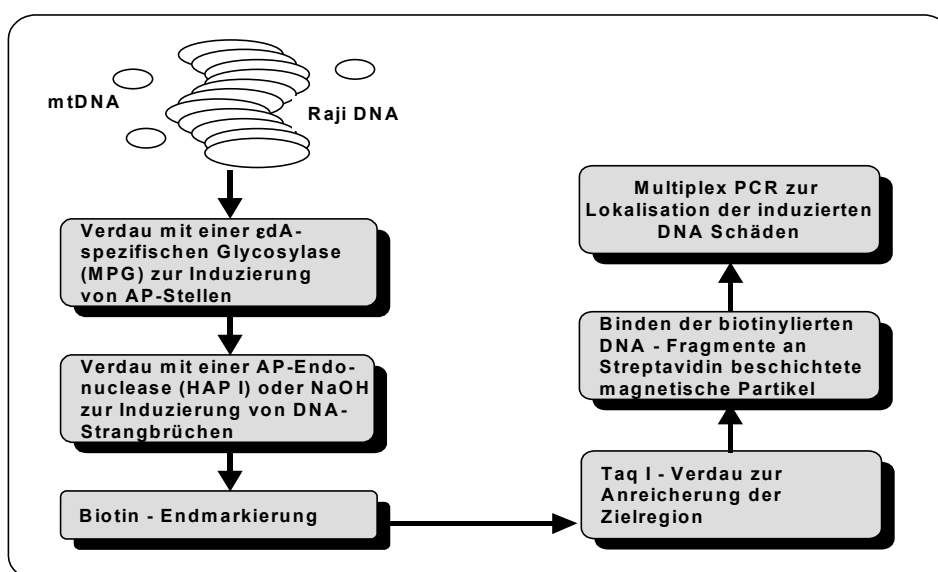


Abb. 28 : Diagramm des etheno - Desoxyadenosin spezifischen SELBIODD - Tests.

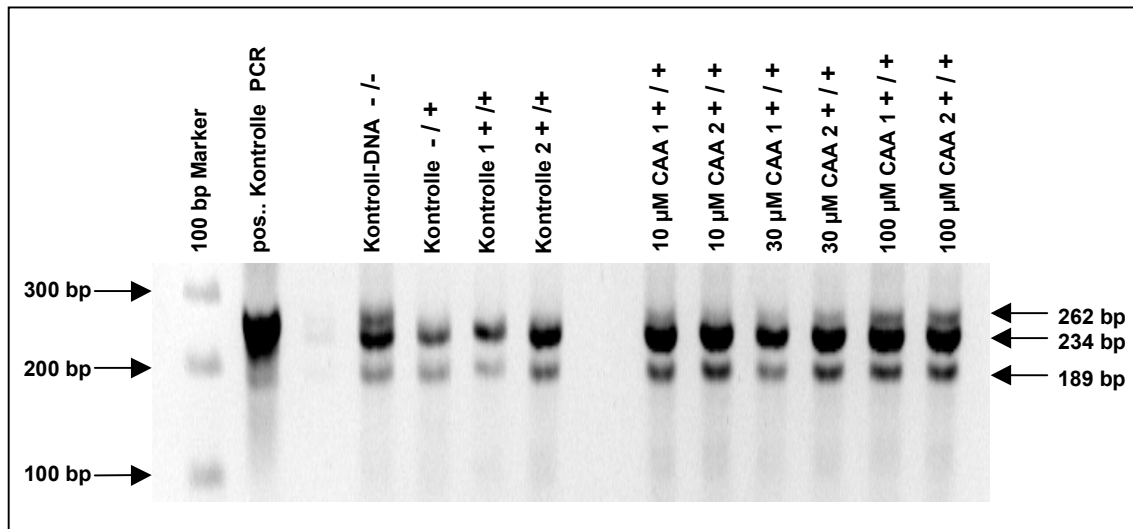


Abb. 29 : Repräsentatives Gel des SELBIODD-Tests. Es wurden 5 µg DNA aus Raji Zellen pro Probe eingesetzt (-/- : Kontroll-DNA, -/+ Partikel-gebundene Probe mit NaOH behandelt, +/+ Partikel-gebundene Probe behandelt mit MPG/NaOH).

Abbildung 29 zeigt ein repräsentatives Gel des SELBIODD-Tests nach Behandlung der Proben mit MPG / NaOH. Man erkennt eine leichte Zunahme der Bandenintensitäten der mit CAA-behandelten und an magnetische Partikel-gebundenen Proben gegenüber den entsprechend behandelten Kontrollen. Abbildung 30 gibt die quantitative Auswertung dieser Tests wieder.

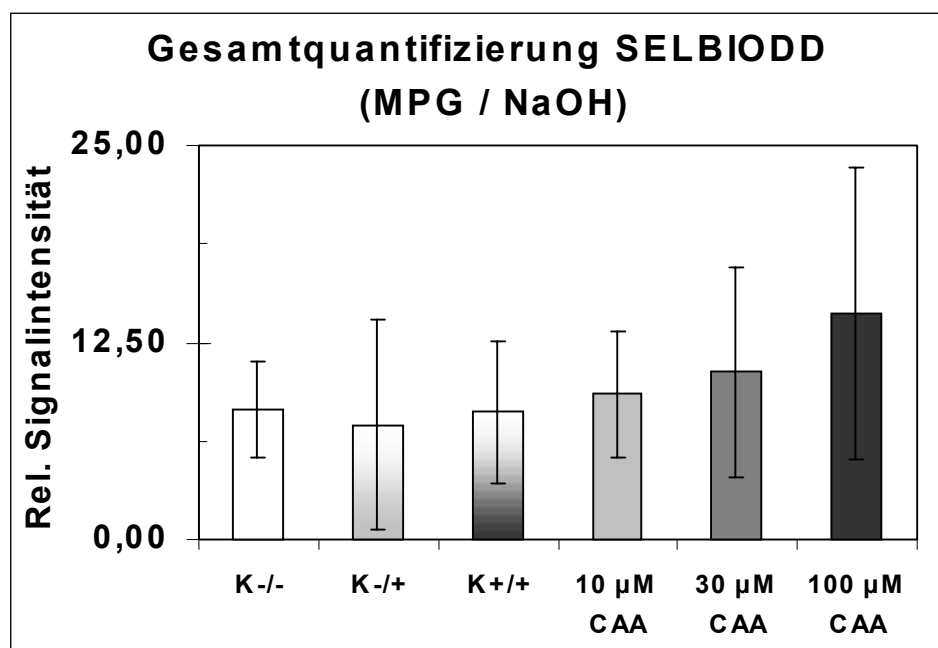


Abb. 30 : Quantitative Auswertung der SELBIODD-Tests nach einer Behandlung der Proben mit MPG / NaOH (-/- : unbeh. Kontrolle, -/+ NaOH beh. Kontrolle, +/+ MPG/NaOH beh. Kontrolle, [MW \pm SD aus 4 Experimenten mit Doppelbestimmungen]).(p<0,05 nach Jonckhere-Terpstra-Test).

Die quantitative Auswertung des SELBIODD-Tests zeigt einen Trend zur konzentrationsabhängigen Zunahme der MPG-sensitiven Stellen in den CAA-behandelten Proben gegenüber den Kontrollen (Abbildung 30), was als Hinweis auf etheno-Desoxyadenosin-Addukte in der Zielregion der mitochondrialen DNA gewertet werden kann. Die verschiedenen Kontrollen reflektieren den endogenen Hintergrund an DNA-Einzelstrangbrüchen und AP-Stellen in der mitochondrialen Zielregion.

Derselbe Test wurde dann mit MPG-Protein und der humanen AP-Endonuklease I (HAP I) durchgeführt, das bei AP-Stellen DNA-Einzelstrangbrüche herstellen soll. Abbildung 31 zeigt ein repräsentatives Gel des SELBIODD-Tests nach Behandlung der Proben mit MPG / HAP1.

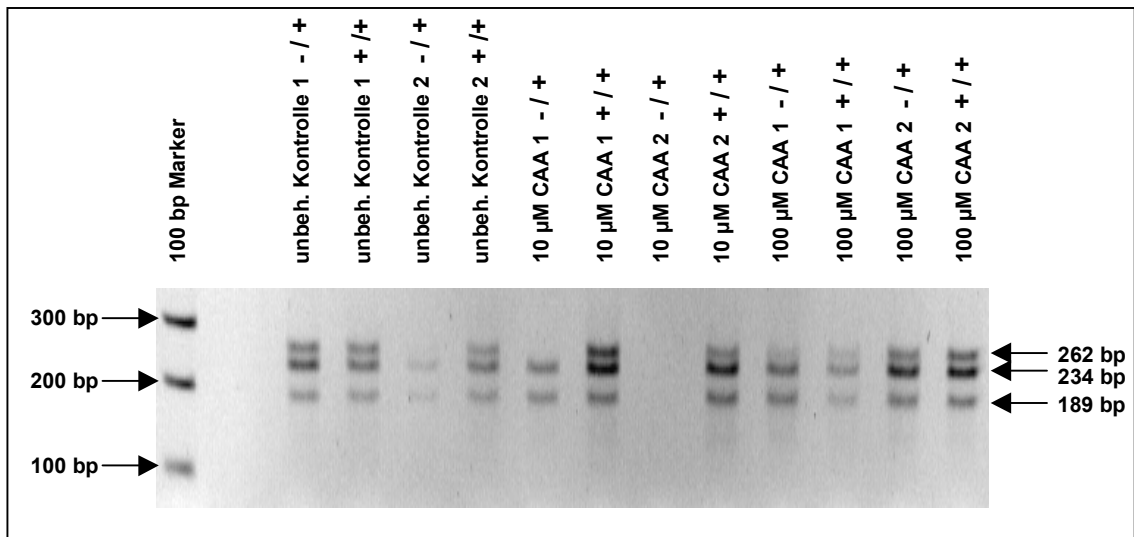


Abb. 31 : SELBIODD-Test : Es wurden 2 µg mtDNA aus Raji Zellen pro Probe eingesetzt (-/+ Probe mit HAP1 behandelt, +/+ Probe behandelt mit MPG/HAP1).

In diesem Test kann man einen Trend zu einer leichten Zunahme der Bandenintensitäten der MPG / HAP1 behandelten Proben gegenüber den nur mit HAP1 behandelten Proben feststellen, was einen weiteren Hinweis auf etheno-Desoxyadenosin-Addukten in der Zielregion der mitochondrialen DNA liefert. Abbildung 32 gibt die quantitative Auswertung dieser Tests wieder.

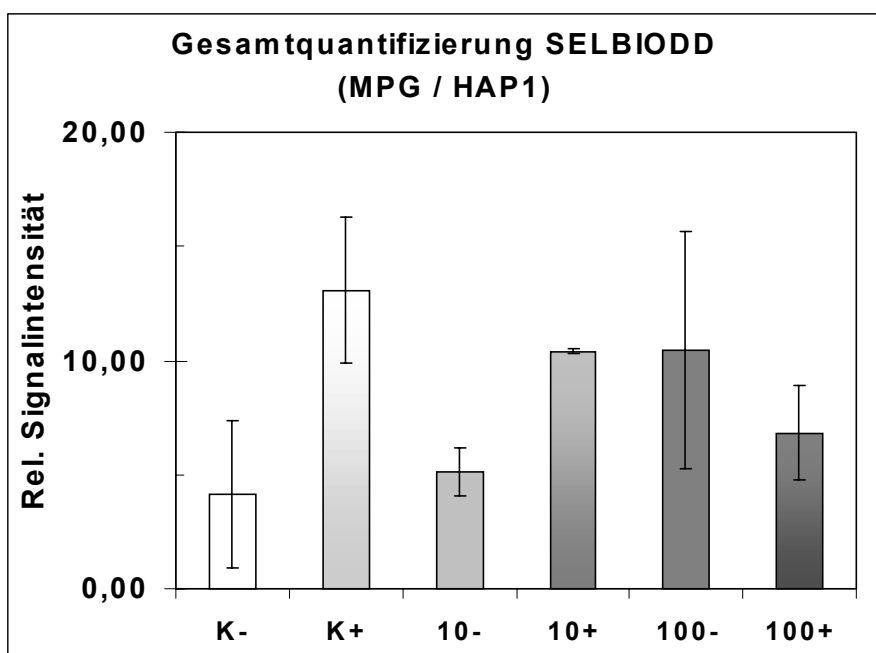


Abb. 32 : Quantitative Auswertung des SELBIODD-Tests (- : HAP1-Behandlung, + : MPG / HAP1-Behandlung). Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung aus zwei Experimenten mit Doppelbestimmungen dargestellt.

Abbildung 32 zeigt einen Trend zu einer Zunahme der MPG-sensitiven Stellen in mitochondrialer DNA sowohl bei den Kontrollen als auch bei den mit 10 μ M CAA behandelten Proben. Dies spricht dafür, daß etheno-Desoxyadenosin-Addukte in der verwendeten mtDNA vorhanden waren. Die 100 μ M behandelten Proben weisen diesen Trend nicht auf, was mit vermehrten DNA-DNA-Quervernetzungen und damit einer schlechteren Effizienz der humanen AP-Endonuklease bei den mit 100 μ M behandelten Proben erklärbar wäre.

5.3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse zum Nachweis der genspezifischen Induktion von etheno-DNA-Addukten in mitochondrialer DNA

Die in Abschnitt 5.3.1 beschriebenen Ergebnisse liefern deutliche Hinweise auf das Vorhandensein von etheno-Desoxyadenosin-DNA-Addukten in mitochondrialer DNA. Der Austausch von NaOH gegen HAP I hatte eine Reduktion des Hintergrunds in den unbehandelten Kontrollen zur Folge, allerdings auch, daß die Effektivität der Umwandlung von AP-Stellen in DNA-Einzelstrangbrüche in den CAA behandelten Proben abnahm. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß die humane AP-

Endonuklease 1 (HAP1) in den mit 100 µM CAA-behandelten Proben die AP-Stellen aufgrund von DNA-DNA-Quervernetzungen nicht mehr effektiv genug prozessieren kann. Zusammen mit dem Ergebnis aus Abschnitt 5.2.4 (Nachweis von etheno-Desoxyadenosin in mitochondrialer DNA) bestätigen die in Abschnitt 5.3 dargestellten Ergebnisse das Vorhandensein von etheno-Desoxyadenosin-DNA-Addukten in der Zielregion der mitochondrialen DNA.

5.4 Mutationsanalytik

5.4.1 Restriktionsschnittstellen Mutations - Test (RSM-Test)

Nach dem Nachweis von εdA in der mitochondrialen Zielregion sollte die mögliche Induktion von Mutationen in dieser Region nachgewiesen werden. Dazu sollte der Restriktionsstellen-Mutationstest (RSM-Test) verwendet werden, der theoretisch die Empfindlichkeit haben sollte, eine Mutation unter 10^6 Wildtyp Kopien zu detektieren. Der RSM-Test wurde ursprünglich von drei Gruppen parallel entwickelt [190-192]. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, daß eine Restriktionsschnittstelle in einem Gen von Interesse gewählt wird, die als Ziel für Mutationen untersucht wird. Normalerweise ist diese Restriktionsschnittstelle durch das entsprechende Restriktionsenzym schneidbar. Erfolgt jedoch eine Mutation (meist Punktmutationen) in dieser Restriktionsschnittstelle, dann wird diese nicht mehr von dem Restriktionsenzym erkannt und damit auch nicht geschnitten. Auf dieser Basis lassen sich einige wenige mutierte Sequenzen unter einem großen Überschuß an Wild-Typ-Sequenzen anreichern, die danach mittels PCR nachweisbar sind. Einige für diesen Test sehr wichtige Punkte sind jedoch zu beachten :

- Die Effizienz der ausgewählten Restriktionsenzyme sollte bei nahezu 100% liegen, da ansonsten nach der PCR falsch-positive Signale detektiert werden.
- Es sollte eine Polymerase eingesetzt werden, bei der bekannt ist, daß sie eine "proofreading" Aktivität besitzt, um polymeraseinduzierte Mutationen möglichst gering zu halten.
- Die Anzahl der Zyklen bei der Amplifikation sollte möglichst gering gehalten werden, um Polymerase-induzierte Mutationen zu vermeiden, die in der Regel bei späten Zyklen entstehen.

Abbildung 33 gibt einen Überblick über die in dieser Methode verwendeten Schritte.

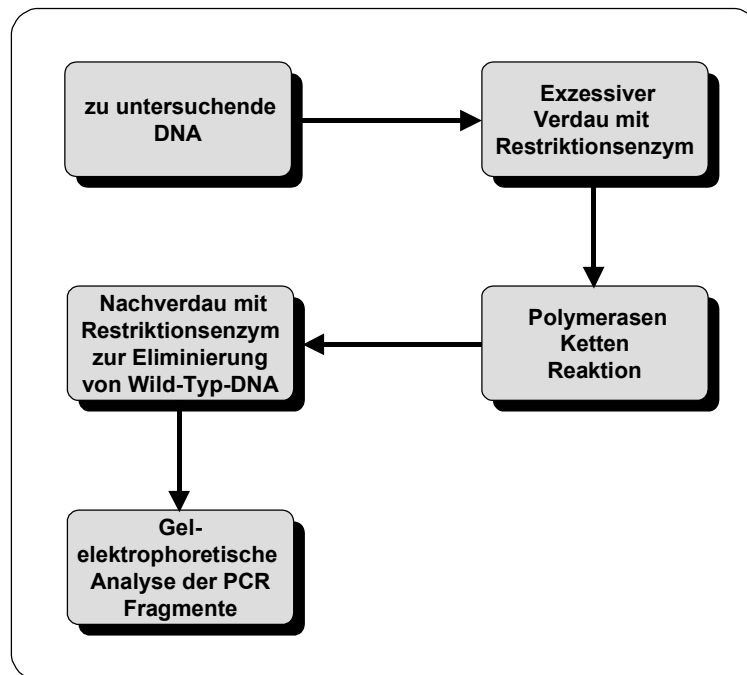


Abb. 33 : Schema des Restriktionsschnittstellen-Mutations-Tests (RSM-Test).

- *Schwächen und Weiterentwicklung des RSM-Tests :*

Als Schwäche dieses Tests bei der hier verwendeten Applikation stellte sich die Effektivität des Restriktionsenzymverdau im ersten Schritt heraus. Die Folge war ein hoher Hintergrund an Wildtyp (wt)-Fragmenten, die dem ersten Verdau entkommen waren. Dies geschah wohl aufgrund der Tatsache, daß in genomischer DNA eine Vielzahl von Schnittstellen der hier verwendeten Restriktionsenzyme enthalten ist und diese mit den Schnittstellen in der mtDNA kompetitieren. Um dieses Problem zu umgehen, wurde ein Selektionsschritt diesem Test vorgeschaltet. Dieser bestand darin, daß die eingesetzte DNA mit einem weiteren Restriktionsenzym (Taq I) vorbehandelt wurde, dessen Schnittstellen die ausgewählte Region flankieren, um die Zielsequenz nach Trennung über ein Agarosegel anzureichern. Das auf diese Weise angereicherte Zielfragment besitzt eine Länge von 270 bp. Als weitere Schwäche stellte sich heraus, daß die wt-Fragmente nach dem Restriktionsenzymverdau in der PCR als "Megaprimer" wirkten und damit wt-Sequenzen reamplifiziert wurden. Dieses Problem wurde durch gelelektrophoretische Trennung der verdauten Fragmente und Isolation der nicht geschnittenen Sequenzen aus den Gelen umgangen. Zu Beginn dieser Arbeit wurden die folgenden mitochondrialen Gene für die Mutationsanalytik ausgewählt :

- ND1 (nt 3235-4330)	NADH-Dehydrogenase-Untereinheit 1	1095 bp	Rsa I, Spe I
- ND2 (nt 4426-5560)	NADH-Dehydrogenase-Untereinheit 2	1134 bp	Rsa I
- ND3 (nt 9912-10146)	NADH-Dehydrogenase-Untereinheit 3	234 bp	Rsa I, Spe I

Hinweise auf Restriktionsenzym-resistente Banden in CAA-behandelten Zellen ergaben sich nur aus der ND3-Region, so daß im weiteren Verlauf der Arbeit das Hauptaugenmerk auf diese 'Hot-Spot'-Region gelegt wurde. Abbildung 34 zeigt Gele der ND3 Region nach dem mehrfachen Durchlaufen der gesamten Prozedur des RSM-Tests mit Schnittstellen für Spe I und Rsa I.

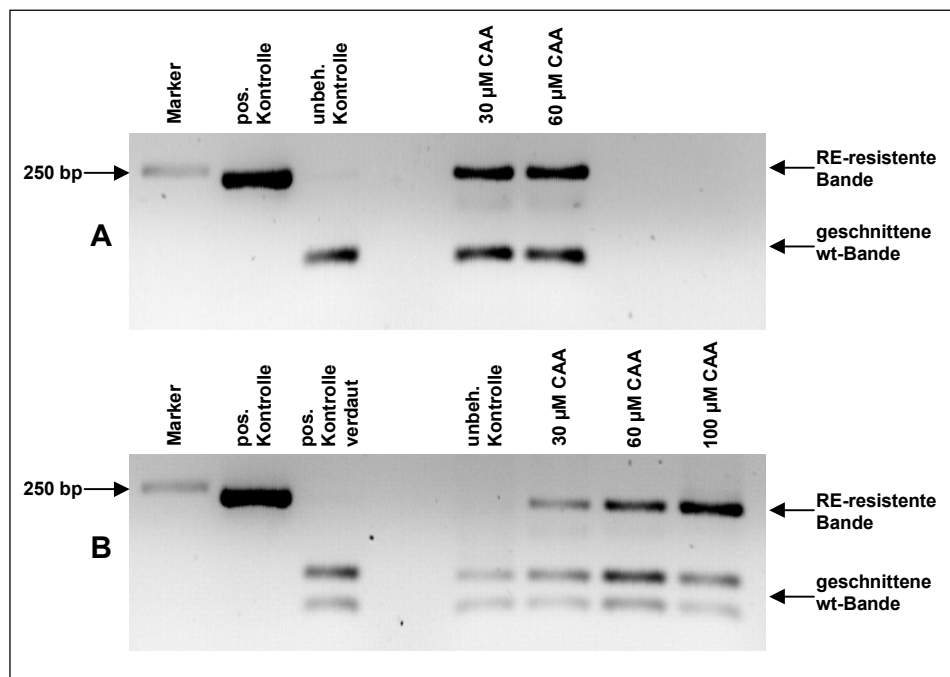


Abb. 34 : A : Gel des RSM-Tests nach Spe I - Verdau. B : Gel des RSM-Tests nach Rsa I - Verdau. Die erhaltenen RE-resistenten Banden wurden isoliert, nachamplifiziert und später kloniert.

Die aus diesen Versuchen erhaltenen resistenten Banden wurden isoliert mittels PCR nachamplifiziert, erneut mit den Restriktionsenzymen geschnitten und später kloniert (Dr. M. Hergenahn). Die auf diese Weise erhaltenen Klone wurden sequenziert und zeigten folgende Mutationen. Abbildung 35 zeigt die erhaltenen Sequenzen der mutierten Klone.

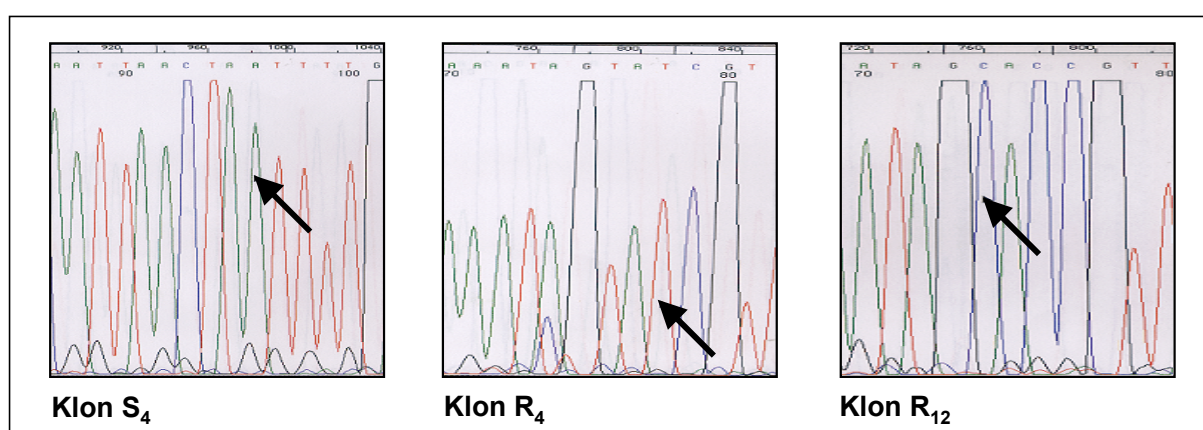


Abb. 35 : Ausschnitte aus den Sequenzen der mutierten Klone. Die Pfeile zeigen die Mutation an.

<i>mut. Klone</i>	<i>Sequenz Rsa I Schnittstelle</i>	<i>Sequenz Spe I Schnittstelle</i>
Wild Typ	GTAC	ACTAGT
S₄		ACTA <u>A</u> T
R₄	GTAT <u>I</u>	
R₁₂	G <u>C</u> AC	

Tabelle 7 : Aus dem RSM-Test erhaltene mutierte Sequenzen nach Klonierung der Restriktionsenzym-resistenten Banden. Die mutierten Basen sind fett und unterstrichen dargestellt.

Die aus dem RSM-Test erhaltenen mutierten Klone wurden nach PCR-Standardbedingungen für das ND3_{234 bp} - Fragment amplifiziert und in späteren Experimenten als interne mutierte Standards eingesetzt. Quantitative Ergebnisse konnten in diesen Experimenten aufgrund von hohem wt-Hintergrund und geringer Mutationsrate nicht erhalten werden.

5.4.2 "Double PCR Digestion" (DPD) - Test

Diese Methode ist eine Variante des bereits beschriebenen RSM - Tests, bei dem einige wenige mutierte DNA-Zielsequenzen in einem großen Überschuß von nichtmutierten Sequenzen angereichert aber nicht quantifiziert werden [193]. Diese Methode wurde von *Palotti et al.* entwickelt, um Punktmutationen im mitochondrialen Genom zu detektieren. Abbildung 36 zeigt das Prinzip dieser Methode.

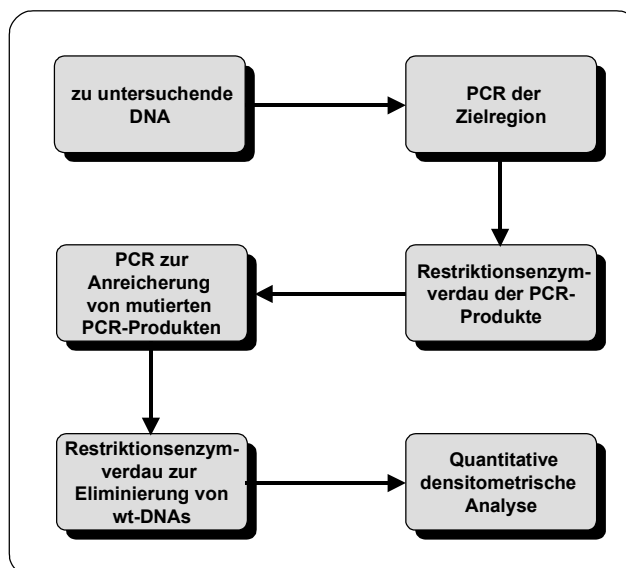


Abb. 36 : Schematische Darstellung des DPD - Tests [193]

In diesem Test wird nach der Auswahl einer Zielregion mit einer geeigneten Restriktionsschnittstelle im ersten Schritt eine PCR zur Amplifizierung dieser Region, mit die Restriktionsschnittstelle flankierenden Primern, durchgeführt. Die auf diese Weise erhaltenen PCR - Produkte werden mit dem entsprechenden Restriktionsenzym exzessiv verdaut. An diesem Punkt werden die verdauten Produkte erneut mit dem gleichen Primerpaar amplifiziert. In diesem Schritt werden nur die nicht verdauten Fragmente, mutierte - und dem Verdau entkommene wt - Fragmente, amplifiziert. Durch das Restriktionsenzym geschnittene Fragmente können nicht mehr amplifiziert werden, da die Hybridisierungsstellen der Primer physisch getrennt sind. Nach der zweiten PCR wird der Ansatz erneut verdaut, um eventuell immer noch vorhandene wt - Fragmente zu eliminieren. An dieser Stelle können durch den Vergleich der Ausbeuten an mutierten Sequenzen der behandelten Proben mit mutierten Sequenzen der Kontrollen quantifiziert und die Zunahme an mutierten Sequenzen errechnet werden.

- *Schwächen und Weiterentwicklung des DPD-Tests :*

Diese Methode verwendet im ersten Schritt eine PCR, was die Selektion der Zielsequenz durch einen Verdau mit Taq I -Enzym (Siehe RSM-Test) unnötig macht. Allerdings bestand auch in diesem Test das prinzipielle Problem, daß die Fragmente aus dem Restriktionsenzymverdau als "Megaprimer" fungieren konnten und auch hier in der zweiten PCR wt-Sequenzen reamplifiziert werden konnten. Um das relativ aufwendige und zeitintensive Trennen der verschiedenen Produkte mittels

Gelelektrophorese zu umgehen, wurde dieser Test in dieser Arbeit zu einem Festphasen-Test weiterentwickelt. Dazu wurde in der ersten PCR ein am 5'-Ende mit Biotin markierter forward primer verwendet, und die auf diese Weise markierten PCR-Produkte wurden an Streptavidin-beschichtete Magnetpartikel gebunden. Durch diesen Schritt wurde es sehr einfach, geschnittene PCR-Fragmente durch Austauschen der Verdaulösung zu eliminieren und den Test durch die Einsparung von 2 gelelektrophoretischen Trennungen deutlich zu beschleunigen. Außerdem stellt die Bindung von PCR-Produkten an Partikel eine wirksame Maßnahme gegen kreuzweise Verunreinigung der Proben dar.

5.4.2.1 Bestimmung des Detektionslimits des DPD-Tests

Um das Detektionslimit dieses Tests bestimmen zu können, mußte in einem ersten Schritt der Anteil an mitochondrialer DNA in 100 ng Gesamt-DNA aus Raji Zellen bestimmt werden (Abbildung 37). Die Anzahl der mitochondrialen DNA-Kopien wurde durch kompetitive PCR mit anschließendem Restriktionsenzymverdau unter Zuhilfenahme von zunehmenden Kopienzahlen des mutierten Standards bestimmt.

Die Kopienzahl an mitochondrialer DNA in Raji Zellen lag als Mittelwert von zwei Versuchen bei ~ 3920 . Dies entspricht ~ 390 Mitochondrien pro Zelle, was mit Literaturdaten vereinbar ist [150]. In einem zweiten Schritt wurden 100 ng (1×10^8 Kopien mtDNA) genomische DNA aus unbehandelten Raji Zellen mit abnehmenden Mengen ($1 \text{ ng} \cong 4 \times 10^9$ Kopien - $10 \text{ ag} \cong 40$ Kopien) des mutierten Standards (S4) (erhalten aus dem RSM-Test) versetzt und der Prozedur des DPD-Tests unterzogen. Abbildung 38 gibt das Ergebnis dieses Versuches wieder. Wie man aus der Abbildung 38 entnehmen kann, steigen die densitometrischen Signale der PCR-Produkte ab einer Menge von 100 ag (entsprechen 400 Kopien des mutierten Standards) bis zu einem Wert von 10 pg (entsprechen 4×10^7 Kopien des mutierten Standards) an. Ab einer ursprünglichen Kopienzahl von 4×10^7 läuft das densitometrische Signal des PCR-Produktes in den Sättigungsbereich der PCR bzw. des Densitometers.

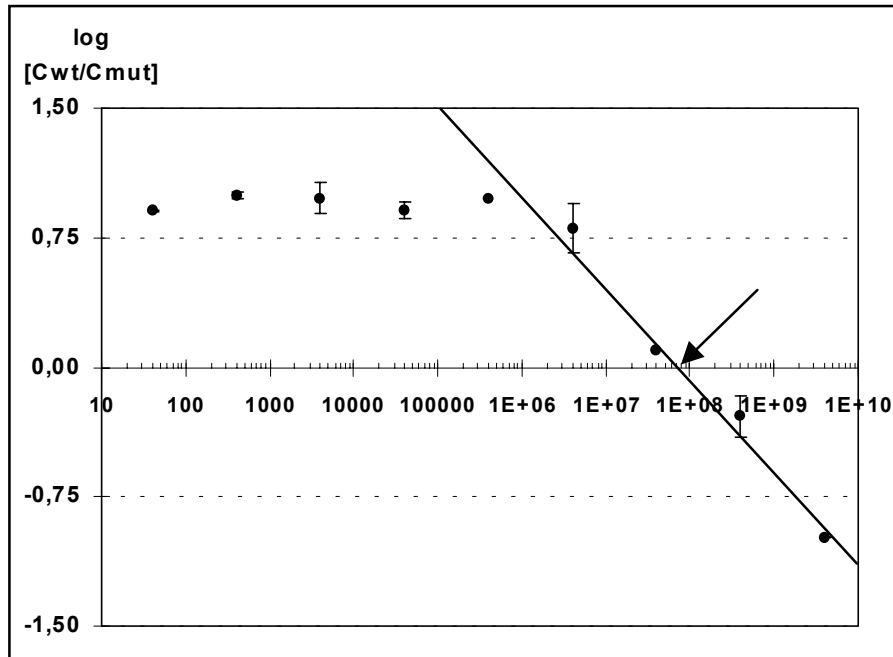


Abb. 37 : Bestimmung des Anteils von mtDNA in 100 ng gesamt DNA aus Raji Zellen (MW aus 2 Experimenten).

Berechnung der Kopienzahl an mtDNA :

Eingesetzte DNA Menge : 100 ng (= 1×10^{-7} g) DNA Menge / Zelle (diploid) : $5,6 \times 10^{-12}$ g
 $\Rightarrow 1 \times 10^{-7}$ [g] / $5,6 \times 10^{-12}$ [g / Zelle] = 17857 Zellen
 Äquivalenzpunkt kompetitive PCR : 7×10^7 Kopien (siehe Pfeil in Abb. 37)
 $\Rightarrow 7 \times 10^7$ [Kopien] / 17857 [Zellen] = 3920 Kopien mtDNA / Zelle

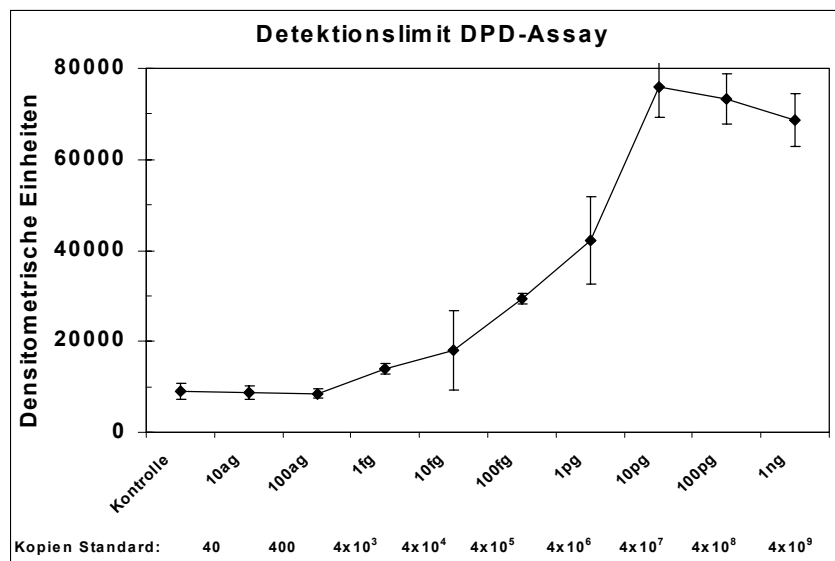


Abb. 38 : Detektionslimit des DPD-Tests in Abhängigkeit von der eingesetzten Kopienzahl eines mutierten Standards (S4).

5.4.2.2 Ergebnisse des DPD-Tests nach 2-Chloracetaldehyd-Inkubation

Wie in Abschnitt 5.4.1 beschrieben, war es nicht möglich, quantitative Mutationsdaten mit Hilfe des RSM-Tests unter Verwendung 1 x CAA-inkubierter und Rotenon selektierter Raji Zellen zu erhalten. Daraufhin wurden Raji Zellen mehrfach mit CAA inkubiert, um eine Steigerung der Mutationsrate zu erzielen (Abschnitt 4.1.2). Die quantitative Mutationsanalyse wurde daraufhin mit Hilfe des weiterentwickelten Festphasen-DPD-Tests fortgeführt. Abbildung 39 zeigt ein repräsentatives Bild eines Gels nach dem Festphasen-DPD-Test. Die quantitativen Ergebnisse dieser Experimente sind in Abbildung 40 dargestellt.

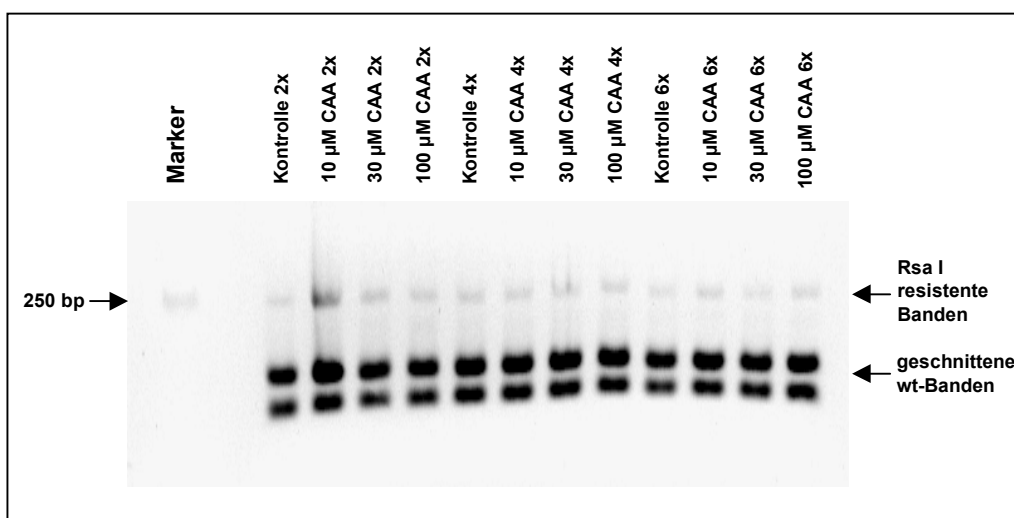


Abb. 39 : Repräsentatives Bild eines Gels nach dem DPD-Test mit DNAs aus mehrfach inkubierten Raji Zellen.

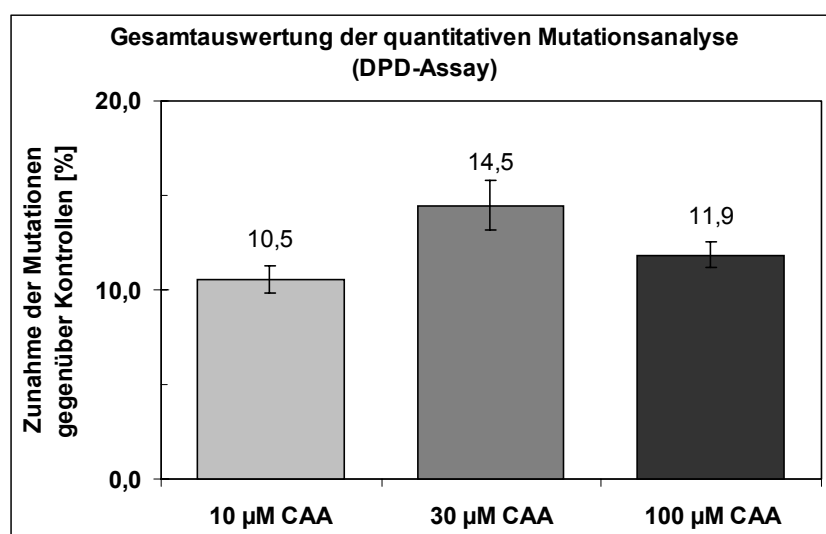


Abb. 40 : Quantitative Ergebnisse des DPD-Tests mit DNAs aus mehrfach inkubierten Raji Zellen. Dargestellt sind die Zunahmen der Mutationen gegenüber den unbehandelten Kontrollen (= 100 %). Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus fünf Experimenten.

Die mehrfach mit CAA behandelten Proben zeigten eine Zunahme an Mutationen gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Die Zunahme der Mutationen betrug $10,5 \pm 0,7 \%$ ($10 \mu\text{M}$ CAA), $14,4 \pm 1,3 \%$ ($30 \mu\text{M}$ CAA) und $11,9 \pm 0,6 \%$ ($100 \mu\text{M}$ CAA) bezogen auf die Kontrollen (100%). Eine Zunahme der Mutationen in Abhängigkeit von der CAA-Konzentration und in Abhängigkeit von der Zahl der Inkubationen konnte nicht festgestellt werden. Die Art der Mutationen wurde durch Sequenzierung bestimmt (Abbildung 41).

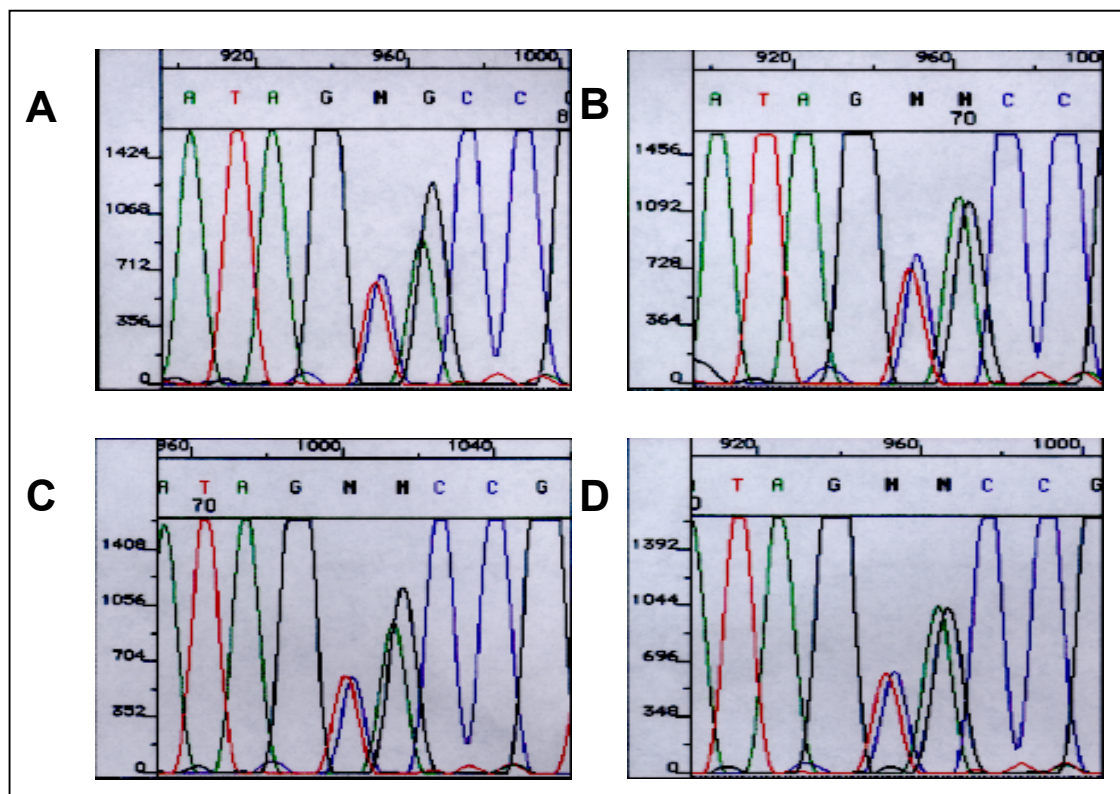


Abb. 41 : Durch Sequenzierung identifizierte Mutationen (A: unbeh. Kontrolle, B: CAA $10\mu\text{M}$, C: CAA $30\mu\text{M}$, D: CAA $100\mu\text{M}$).

Tabelle 8 gibt die identifizierten Mutationen aus den Festphasen-DPD-Tests wieder.

<i>Probe</i>	<i>Sequenz der Rsa I-</i>	
	<i>Schnittstelle</i>	<i>Basensubstitution</i>
Wild-Typ	G T A C	
unbeh. Kontrolle	G <u>C</u> A C, G T <u>G</u> C	T → C, A → G
10 µM CAA (ND3 234 bp)	G <u>C</u> A C, G T <u>G</u> C	T → C, A → G
30 µM CAA (ND3 234 bp)	G <u>C</u> A C, G T <u>G</u> C	T → C, A → G
100 µM CAA (ND3 234 bp)	G <u>C</u> A C, G T <u>G</u> C	T → C, A → G

Tabelle 8 : Durch Sequenzierung bestimmte Punktmutationen in der Rsa I-Schnittstelle nach dem DPD-Test mit DNA aus CAA-behandelten Zellen.

In allen Fällen wurden Mutationen der zweiten und dritten Base der Restriktionsschnittstelle identifiziert. Es handelte sich jeweils um A → G und T → C Transitionen.

5.4.2.3 Ergebnisse des DPD-Tests nach Zigarettenrauch-Inkubation (Pilotexperiment)

In einem Pilotexperiment wurde das mutagene Potential einer einmaligen Behandlung mit Zigarettenrauchlösungen mittels des DPD-Tests untersucht. Abbildung 42 gibt das Ergebnis dieses Experimentes wieder.

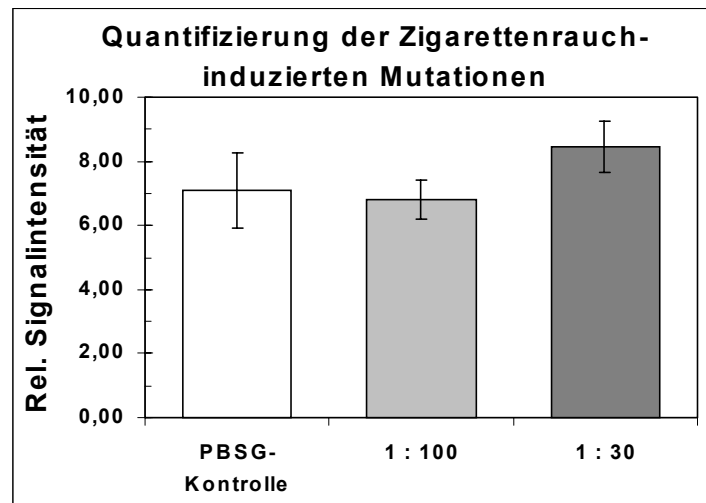


Abb. 42 : Ergebnis des DPD-Tests aus Raji Zellen nach einmaliger Inkubation mit Zigarettenrauchlösung .

In diesem Experiment konnte kein quantitativer Unterschied in der Mutationsrate zwischen Kontrollen und behandelten Proben festgestellt werden. Abbildung 43 zeigt die in diesem Experiment erhaltenen Sequenzen.

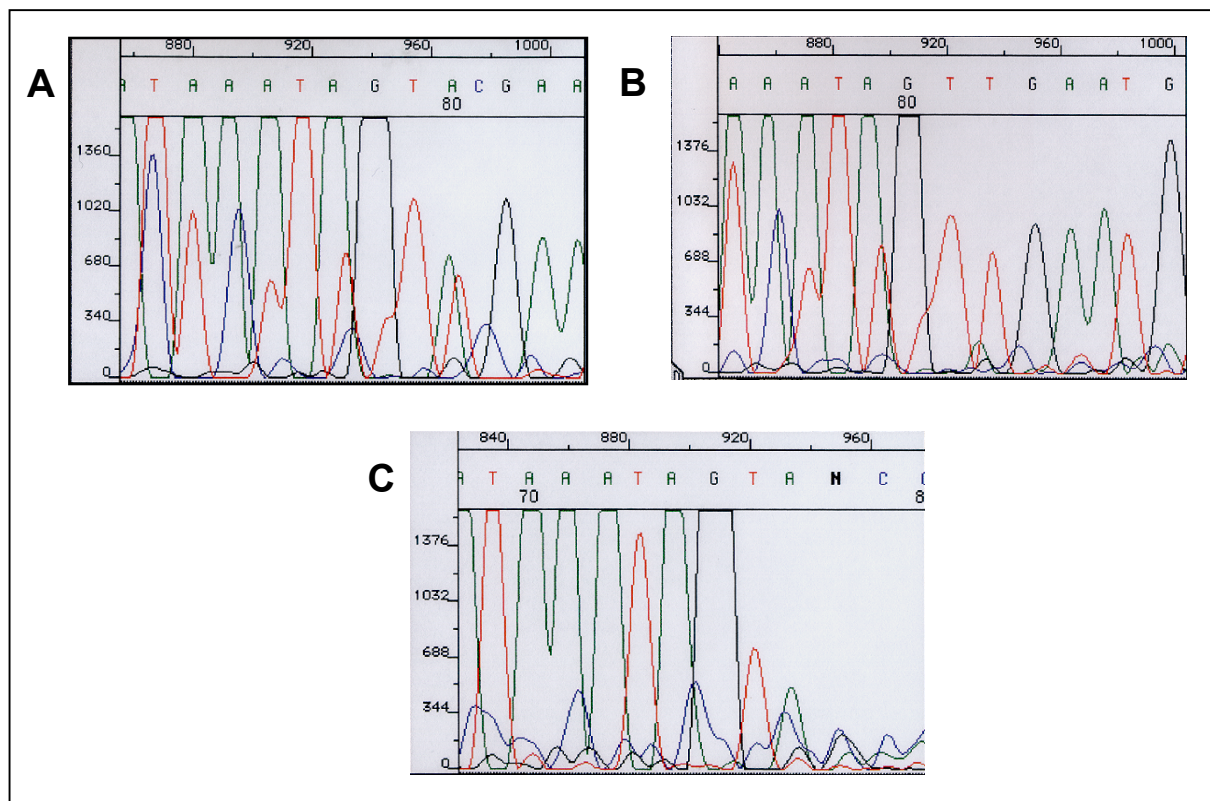


Abb. 43 :Sequenzen der Proben nach Inkubation mit Zigarettenrauch A : unbeh. Kontrolle, B : CS 1:30, C : CS 1:100.

Tabelle 9 stellt die Ergebnisse der Sequenzierung dieser Proben dar.

<i>Probe</i>	<i>Sequenz der Rsa I-Schnittstelle</i>	<i>Basensubstitution</i>
Wild-Typ	G T A C	
unbeh. Kontrolle	G T <u>I</u> C	A → T
CS 1 : 100 (ND3 234 bp)	G T A <u>G</u> , G T <u>C</u> C	C → G, A → C
CS 1 : 30 (ND3 234 bp)	G T <u>I</u> C, G C A <u>G</u> ,	A → T, C → G
100 µM CAA (ND3 234 bp)	G <u>C</u> A C, G T <u>G</u> C	T → C, A → G

Tabelle 9 : Durch Sequenzierung bestimmte Punktmutationen in der Rsa I-Schnittstelle nach dem DPD-Test mit Zigarettenrauchlösung-behandelter Zellen.

Wie man aus den Tabellen 8 und 9 entnehmen kann, unterscheiden sich die Mutationen in DNA von CAA- und Zigarettenrauchlösung-behandelten Zellen. Während bei den 2-CAA A → G Transitionen bevorzugt auftraten, konnte man bei den Zellen, die mit Zigarettenrauchlösung behandelt wurden, kein einheitliches Mutationsspektrum feststellen.

5.4.3 Deletionsanalyse, Detektion der 4977 bp-Deletion in mitochondrialer DNA von mehrfach 2-Chloracetaldehyd-inkubierten Raji Zellen

Neben der Analyse von CAA ausgelösten Punktmutationen wurde im Rahmen dieser Arbeit auch getestet, ob CAA als bifunktionelles Agens neben Punktmutationen auch Deletionen auslösen könne [93,94]. Um diese Analysen durchführen zu können, mußte in einem ersten Schritt die Nachweisgrenze und die Empfindlichkeit der auf PCR basierenden Methode überprüft werden. Dazu wurden Standard-DNAs

eingesetzt, die freundlicherweise von Prof.G.Cortopassi (Davis, California, USA) zur Verfügung gestellt wurden. Abbildung 44 gibt einen Überblick über diese Versuche.

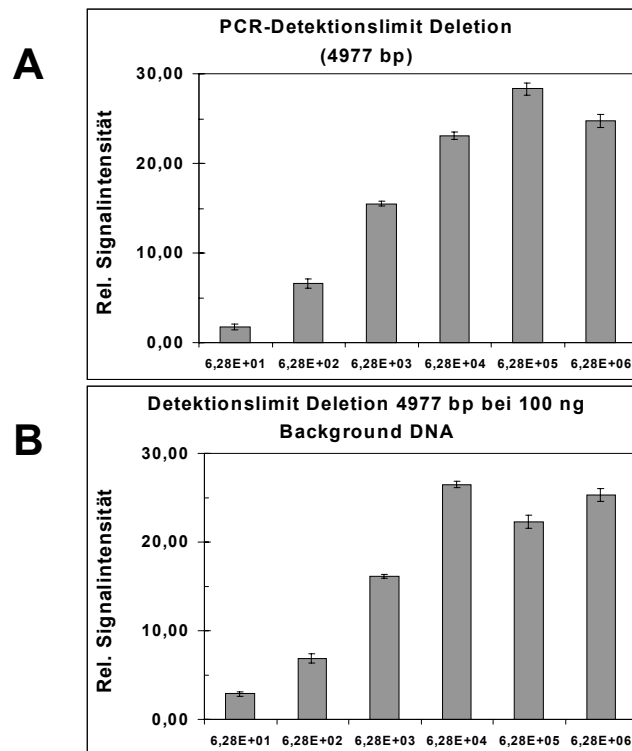


Abb. 44 : A : Zunahme der densitometrischen Signale in Abhängigkeit von der eingesetzten Kopienzahl des Deletionsstandards. B : Zunahme der densitometrischen Signale in Abhängigkeit der eingesetzten Kopienzahl des Deletionsstandards zusammen mit 100 ng Raji-DNA.

Wie aus der Abbildung 44 zu ersehen ist, nimmt das PCR-Produkt des deletierten Standards in einem Bereich von ~ 63 bis $6,3 \times 10^5$ eingesetzter Kopien linear zu (Abb.44A). Nach Zugabe von 100 ng unbehandelter Raji-DNA wurde der Sättigungsbereich der PCR-Reaktion schon bei einer Zahl von $6,3 \times 10^4$ eingesetzter Kopien erreicht (Abb.44B). Abbildung 45 zeigt ein Gel der Deletionsanalyse.

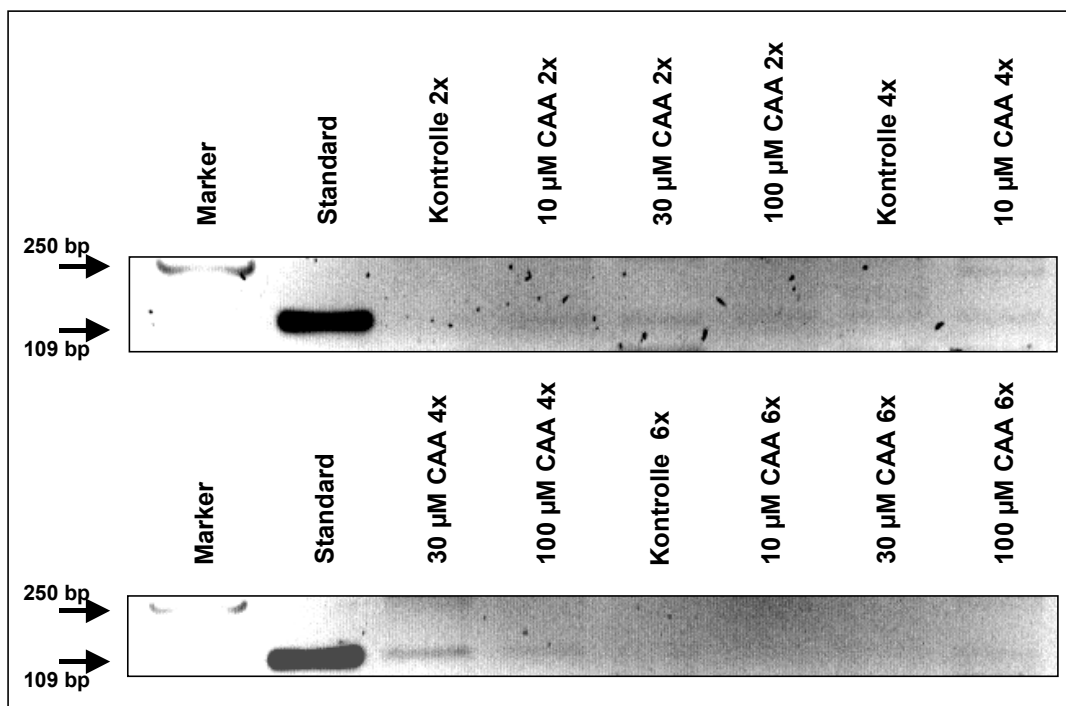


Abb. 45 : Repräsentatives Gel der Deletionsanalyse. Das Fragment der Größe von 109 bp zeigt die Deletion an.

Abbildung 46 stellt die aus diesem Test erhaltenen Ergebnisse von mehrfach CAA-inkubierten Raji Zellen dar.

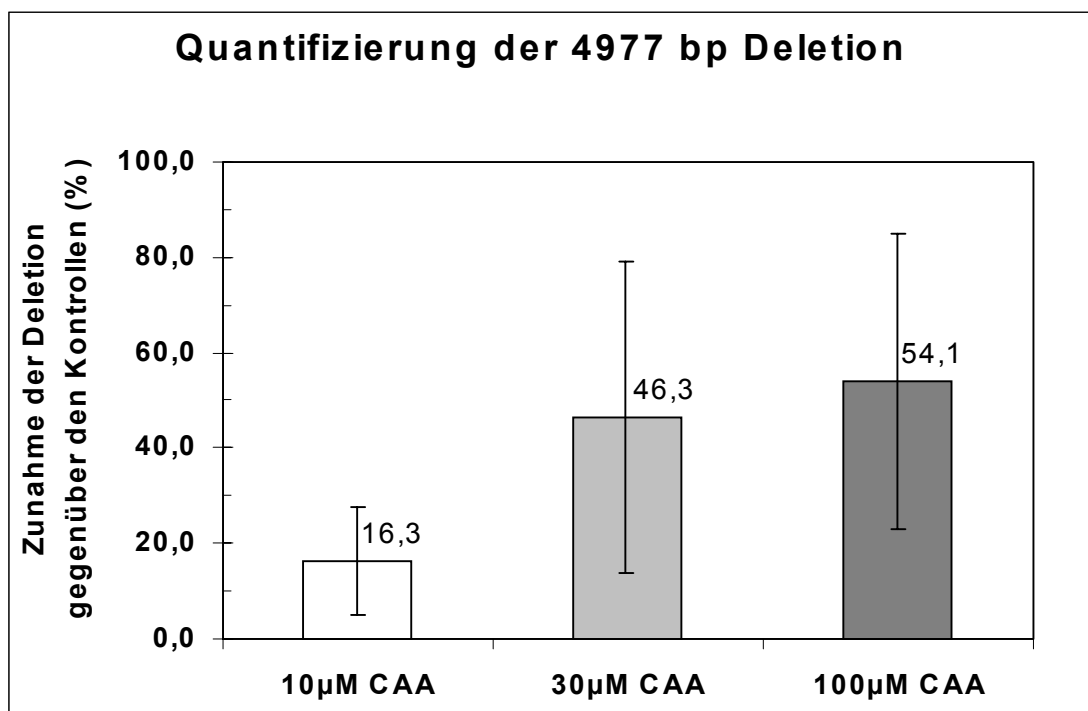


Abb. 46 : Quantitative Ergebnisse des Deletionsanalyse mit DNAs aus mehrfach inkubierten Raji Zellen. Zunahme der Deletionen gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Die Ergebnisse repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen aus vier Experimenten mit Doppelwerten.

Wie man aus Abbildung 46 entnehmen kann, nahm das Signal der 4977 bp Deletion mit zunehmender CAA-Konzentration zu. Die statistische Auswertung der Zunahme der Deletionen gegenüber den unbehandelten Kontrollen mit dem t-Test erreichte ein nahezu signifikantes Niveau ($p = 0,07$).

5.4.4 Zusammenfassung der Mutationsanalysen

In Abschnitt 5.4 wurde der Einfluß von CAA auf die Mutationsraten in mitochondrialer DNA aus Raji Zellen untersucht. Dabei stellte sich heraus, daß CAA sowohl Punktmutationen als auch Deletionen auslöst. Der Zunahme an Punktmutationen lag bei 10,5 bis 14,5 % in einer Hot-Spot-Region des mitochondrialen Genoms. Dabei wurden ausschließlich A → G Transitionen detektiert. Ein Pilotexperiment mit Zigarettenrauch inkubierter Zellen lieferte keine quantitativen Daten für die Zunahme von Mutationen gegenüber den unbehandelten Kontrollen, aber zeigte, daß das Mutationsspektrum von Zigarettenrauch sich deutlich von dem Mutationsspektrum von CAA unterschied. Neben den Punktmutationen löste CAA zusätzlich noch 4977 bp-Deletionen ('common deletion') in einem Ausmaß zwischen 16 und 54 % in mitochondrialer DNA von CAA behandelten Raji Zellen aus.

6 Diskussion

6.1 Diskussion des Einflusses von 2-Chloracetaldehyd auf Wachstum, DNA-Replikation, -Reparatur und mitochondriale Aktivität von Raji Zellen

2-Chloracetaldehyd ist einer der beiden Metaboliten von Vinylchlorid und des Krebstherapeutikums Ifosfamid; er wird für die neuro- und nephrotoxischen Nebenwirkungen des Krebstherapeutikums verantwortlich gemacht [202,203,204]. Das cytotoxische Potential von CAA zeigt sich in der Induktion eines relativ weiten Schadensspektrums. Wie in Abschnitt 5.1.1 gezeigt wurde, hat CAA einen deutlichen Einfluß auf das Wachstum der B-lymphoiden Zelllinie Raji. Dieser Einfluß könnte unter anderem auf einer Hemmung der DNA-Replikation (5.1.2) die auch von anderen gezeigt worden war [205], aufgrund irreversibler Vernetzung von DNA und Proteinen beruhen [206]. Neben der Hemmung der DNA-Replikation zeigt sich auch eine deutliche Abnahme des Glutathion-Gehaltes in Lymphozyten von Patienten, die mit Ifosfamid behandelt wurden [207] und eine deutliche Reduktion von Protein-Thiolen in CAA-behandelten Hepatozyten aus Ratten [208,209]. Desweiteren hatte CAA einen geringen Einfluß auf die Atmungskette der Mitochondrien (5.1.4). Das mitochondriale Schadensspektrum in Abhängigkeit von 2-Chloracetaldehyd umfaßt nicht nur die Inhibierung des Komplexes I der mitochondrialen Atmungskette (NADH-Dehydrogenase-Komplex), der unter anderem für die Konvertierung von MTT zum Formazan verantwortlich ist [200]) durch die Hemmung der Oxidation von NADH. Zusätzlich sind auch eine Abnahme des ATP-Gehaltes, eine Abnahme des mitochondrialen Calcium-Gehaltes, Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials und Induktion von Lipidperoxidation in Hepatozyten von Ratten beschrieben worden [208,209]. Neben der Reaktion mit Proteinen reagiert CAA mit den Nukleobasen der DNA zu alkylierten Basen [90], etheno-DNA-Addukten [85] und DNA-DNA-Quervernetzungen (5.1.3) [210]. Alle diese Effekte haben einen Einfluß auf die cytotoxischen [208,209] und mutagenen [90] Eigenschaften von CAA. Die in Abschnitt 5.1 erarbeiteten Ergebnisse hatten zur Folge, daß der subtoxische Bereich von CAA auf Konzentrationen unter 100 µM eingegrenzt werden konnte. Dieser Bereich entspricht der Konzentration an CAA, die unter anderem in Blut und Plasma von Patienten nach Gabe von 5 mg / m² Ifosfamid gemessen wurde [202,211,212].

6.2 Diskussion der DNA-Adduktanalytik

Diese Arbeit beschreibt eine wesentlich verbesserte HPLC-Methode mit Fluoreszenzdetektion zur Detektion von ϵ dA. Das Detektionslimit der neuen Methode liegt bei $\sim 2,8 \text{ } \epsilon\text{dA} / 10^7 \text{ dA}$, ausgehend von einem Detektionslimit von $5 \text{ fmol} / \text{Injektion}$ und einem Einsatz von $20 \text{ } \mu\text{g}$ DNA. Damit liegt das Detektionslimit dieser Methode um den Faktor 200 niedriger, und braucht etwa 50 - 100 mal weniger DNA, als die bisher beschriebenen HPLC-Methoden mit Fluoreszenzdetektion zum Nachweis von etheno-DNA-Addukten [213,214]. Die verbesserte Sensitivität dieser Methode könnte auf der besseren Empfindlichkeit moderner Fluoreszenz-Detektoren beruhen. Verglichen mit dem Detektionslimit der ultrasensitiven ^{32}P -Postlabelling Methode mit vorgeschalteter Immunaффinitätschromatographie (IPPA) [119,120] liegt das Detektionslimit der beschriebenen Methode um ungefähr den Faktor 600 höher. Allerdings wurde das Potential der neuen Methode noch nicht voll ausgeschöpft. Durch Erhöhung der eingesetzten DNA-Mengen und durch den Einsatz einer vorgeschalteten Immunaффinitätschromatographie ließe sich das Detektionslimit sicherlich noch um den Faktor 10 - 100 verbessern. Einige Studien beobachteten etheno-Desoxyadenosin-Adduktspiegel in humanen Geweben ($1,3 - 901 \text{ } \epsilon\text{dA} / 10^8 \text{ dA}$), die innerhalb des Meßbereichs dieser Methode liegen [121,122]. Allerdings erscheint der Adduktspiegel in unbehandelten Raji-Kontrollen mit $0,38 \pm 0,29 \times 10^{-5} \text{ } \epsilon\text{dA/dA}$ gegenüber den Spiegeln in Geweben aus Menschen und Tieren mit $\sim 0,02 - 10 \times 10^{-8}$ [100] relativ hoch; dies weist darauf hin, daß Raji Zellen in Zellkultur oder PBS-Puffer einem Streß unterliegen, der vermehrt ϵ dA-Addukte erzeugt. Damit könnte diese Methode als nicht-radioaktive Alternative zur der IPPA-Methode dienen, besonders wenn eine immunaффinitäts-chromatographische Anreicherung von etheno-Desoxyadenosin-DNA-Addukten vorgeschaltet würde. Eine weitere Einsatzmöglichkeit dieser Methode wäre die Analyse von etheno-Desoxyadenosin-Addukten in Lymphozyten von Patienten, die mit dem Krebstherapeutikum Ifosfamid behandelt werden. Im Blut bzw. Plasma dieser Patienten wurden CAA-Konzentrationen von $10 - 210 \text{ } \mu\text{M}$ nach Gabe von 5 mg/m^2 Ifosfamid gefunden [211,212], was die Bildung von etheno-DNA-Addukten und die damit verbundenen Folgen wahrscheinlich macht. Diese Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit für zwei Applikationen genutzt :

- Bestimmung von etheno-Desoxyadenosin-DNA-Addukten aus DNA von CAA-behandelten Raji Zellen.
- Detektion von etheno-Desoxyadenosin-DNA-Addukten aus DNA von Zigarettenrauchlösung-behandelten Raji Zellen.

Wie in Abschnitt 5.2.3 beschrieben, konnte keine Reduktion der etheno-Desoxyadenosin-DNA-Addukte nach CAA-Behandlung über einen Zeitraum von 24 Stunden festgestellt werden. Dieser Effekt könnte darauf beruhen, daß während dieses Zeitraumes die Vorläuferverbindung, das nichtfluoreszierende Hydroxyethano-desoxyadenosin-Addukt, zu dem etheno-Desoxyadenosin-Addukt konvertiert wird, was zu einer Erhöhung der ϵ dA-Spiegel führt, andererseits könnte er Folge der zumindest teilweisen Hemmung von DNA-Reparaturenzymen durch CAA sein. Diese Vermutung wird auch durch die in Abschnitt 5.1.2 beschriebenen Ergebnisse gestützt, denn es wurde gezeigt, daß CAA die DNA-Replikation über einen Zeitraum von 48 Stunden stark hemmt. Da DNA-Replikationsenzyme wie DNA-Polymerase γ , δ , ϵ auch an der Reparatur beteiligt sind [145], ist auch eine Hemmung der DNA-Reparatur anzunehmen. Zum ersten Mal wurde hier eine Tendenz zu erhöhten etheno-Desoxyadenosin-Spiegeln in Abhängigkeit von Zigarettenrauch beschrieben. In einer anderen Studie aus unserer Abteilung (*Yang et al.* 1999) wurde gezeigt, daß Zigarettenrauchlösung in Verdünnungen 1 : 3 und 1 : 10 für Raji Zellen letal wirkt und in einer Verdünnung von 1 : 30 das Wachstum hemmt [215]. Dies läßt vermuten, daß Zigarettenrauchlösung in einer Verdünnung von 1 : 100 schon im Sättigungsbereich maximaler Lipidperoxidation liegt, was sich dann unter anderem in der Bildung von etheno-DNA-Addukten auswirkt. Da die Mengen von Reparaturenzymen, die in der Lage sind, etheno-Desoxyadenosin-Addukte zu reparieren (z.B. MPG-Protein) [133], in Raji Zellen nicht bekannt sind, kann nicht entschieden werden, ob das geringe Ausmaß an Reparatur von etheno-Desoxyadenosin-Addukten auf geringe Mengen von Reparaturenzymen zurückzuführen ist oder diese durch Zigarettenrauchlösung bzw. durch deren Inhaltsstoff Acrolein gehemmt werden. Dieses Phänomen wurde in der gleichen Zelllinie nach Inkubation mit Zigarettenrauchlösung beobachtet [215]. Daraus folgt, daß die Bildung von etheno-Desoxyadenosin-Addukten eine weitere schädigende Folge von Zigarettenrauch sein könnte. Zigarettenrauch-induzierte Lipidperoxidation wurde in Lymphozyten [216] und Lunge [217] des Menschen beobachtet. Daher wäre es wichtig, die Zigarettenrauch-abhängige Bildung von etheno-DNA-Addukten und ihre Rolle in der Krebsentstehung des Menschen zu

untersuchen. Etheno-DNA-Addukte könnten daher als Biomarker für die Expositionskontrolle, zum Beispiel bei der Chemotherapie mit Ifosfamid, dienen, bzw. nützlich bei der Abschätzung von chemopräventiven Maßnahmen bei Menschen mit erhöhtem Lungenkrebsrisiko sein.

6.3 Diskussion der genspezifischen Induktion von etheno-DNA-Addukten in mitochondrialen Genen

In unserer Abteilung haben Yang und Hergenroth 1997 eine Methode zur genspezifischen Lokalisierung von Zigarettenrauch-induzierten DNA Schäden beschrieben [189]. Diese Methode diente als Basis für den in Abschnitt 5.3.1 beschriebenen Ansatz zur Lokalisierung von etheno-DNA-Addukten in einer 'Hot-Spot'-Region [194] des mitochondrialen Genoms. Die in dieser Arbeit verwendete Modifikation dieser Methode beruht auf der spezifischen Konversion von etheno-DNA-Addukten zu DNA-Strangbrüchen und dem Nachweis der betroffenen Region mittels PCR. Diese Induktion von DNA-Strangbrüchen wurde mittels einer Kombination der 3-Methyladenin-Glycosylase (MPG-Protein) und NaOH bzw. humaner AP-Endonuklease I erreicht. Abbildung 47 beschreibt die einzelnen Schritte dieses Ansatzes.

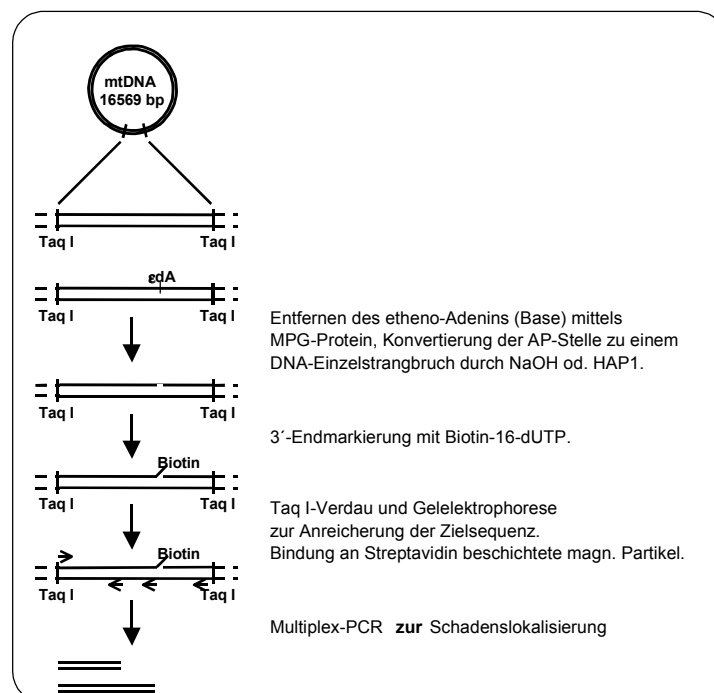


Abb. 47 : Prinzipielle Vorgehensweise des ϵ -Addukt-spezifischen SELBIODD-Tests. Die Pfeile beschreiben die Lage der Primer innerhalb der Zielsequenz.

Das MPG-Protein zeigt eine Spezifität gegenüber folgenden DNA-Addukten : 3-Methyladenin-, 3-Methylguanin-, 7-Methylguanin-, Ethenoadenin-, Ethenoguanin-, Hypoxanthin- und Chlorethylnitrosoharnstoff-DNA-Addukten [132-134]. Die in diesem Test verwendete Multiplex-PCR sollte dazu dienen, nicht nur die Schäden in der ausgewählten Zielregion nachzuweisen, sondern die Schäden zusätzlich in dieser Region zu lokalisieren. Wie aus Abbildung 46 zu entnehmen ist, sollten verschiedene PCR-Produkte bei der verwendeten Multiplex-PCR in Abhängigkeit von der Lage der Schadensstelle gebildet werden. Liegen die Schäden innerhalb des von einem Primerpaar flankierten Bereichs, so fallen diese Sequenzen innerhalb der Zielsequenz als Matrizen für die PCR aufgrund des induzierten DNA-Strangbruchs aus, so daß nur die kleineren PCR-Produkte gebildet werden können (siehe Abb. 46 unten). Allerdings muß man auch in Betracht ziehen, daß die in der Multiplex-PCR gebildeten großen PCR-Produkte, als Matrizen für die kleineren Produkte dienen und damit eine Verschiebung der gemessenen Signale zu kleineren Produkten bewirken. Wie aus Abbildung 29 in Abschnitt 5.3.1 zu entnehmen ist, konnte kein Adduktierungs-`Hot-Spot` innerhalb der Zielsequenz beschrieben werden. Die quantitativen Daten zeigen jedoch eine signifikante, konzentrationsabhängige Tendenz der Zunahme von CAA-induzierten, MPG-sensitiven Schäden. Da jedoch die Bildung von methylierten Basen in Abhängigkeit der CAA-Konzentration unwahrscheinlich ist, muß man bei den in diesem Test detektierten DNA-Schäden von etheno-DNA-Addukten (etheno-Desoxyadenosin- und etheno-Desoxyguanosin-Addukten) ausgehen. Einen weiteren Hinweis auf das Vorhandensein von etheno-DNA-Addukten in mitochondrialer DNA gibt der qualitative Nachweis von etheno-Desoxyadenosin mittels HPLC (Abschnitt 5.2.4). Arbeiten zur Genexpression in Raji-Zellen, die mit DNA-Chip-Technik vorgenommen wurden (Dr.M.Hergenhausen), haben gezeigt, daß mRNAs einiger bekannter DNA-Reparaturenzyme nachzuweisen sind, während andere offenbar nicht exprimiert werden. Für eine weitere Gruppe kann keine Aussage gemacht werden, da deren komplementäre Sequenzen nicht auf dem Chip vorhanden waren; dies gilt z.B. für das MPG-Protein, das im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde. Die Boten-RNA der Apurin-Endonuclease (APE) ist jedoch in zahlreichen Kopien vorhanden, während die Boten-RNA von ERCC4, eines Excisions-Reparaturgens, das insbesondere DNA-Vernetzungen reparieren soll, und die der O⁶-Methylguanin Transferase (O⁶-MeGT) nur in sehr wenigen Kopien vorlag. Da mRNA-Kopien und Proteinspiegel häufig in einer direkten Beziehung stehen,

kann also mit beträchtlicher APE-Aktivität in Mitochondrien von Raji-Zellen gerechnet werden (Abschnitt 2.2.7). Dieser Befund erklärt den relativ hohen Hintergrund an DNA-Strangbrüchen in den unbehandelten Kontrollen in dem in dieser Arbeit verwendeten Ansatz. Da bisher keine mitochondrialen etheno-DNA-Addukt-spezifischen Reparaturenzyme beschrieben wurden, muß man davon ausgehen, daß etheno-DNA-Addukte einen Beitrag zu Mutationen im mitochondrialen Genom leisten und damit eine Rolle im Prozeß des Alterns bzw. in der Entwicklung von degenerativen Erkrankungen spielen könnten.

6.4 Diskussion der Mutationsanalytik

In Abschnitt 5.4 wurde die Mutationsanalyse in einer 'Hot-Spot'-Region des mitochondrialen Genoms mittels verschiedener Tests wie der RSM-Test und der DPD-Test beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit lieferten der RSM- und der DPD-Test [190-193] in nahezu allen Fällen qualitative Hinweise auf CAA-induzierte Mutationen in der mitochondrialen Zielsequenz. Unvollständiger Verdau der Restriktionsenzyme und Reamplifikation von wt-Sequenzen durch die geschnittenen wt-Fragmente, die als Megaprimer in der PCR fungierten, hatten laborintensive geoelektrophoretische Trennungen mit hohem Risiko an Kreuzkontaminationen zur Folge. Des weiteren waren die beiden Methoden im Hinblick auf vorhandene Hintergrundmutationen nicht empfindlich genug und verhinderten eine quantitative Analyse der Mutationen. Diese Probleme wurden durch die Entwicklung des Festphasen-DPD-Tests umgangen. Die Einführung des Festphasenschrittes hatte die folgenden Vorteile :

- Abtrennung der Zielsequenz von dem Hintergrund der gesamt DNA mit einem Überschuß der gewählten Restriktionsschnittstelle.
- Bindung der Zielsequenz an die magnetischen Partikeln reduzierte das Risiko von Kreuzkontaminationen.
- Verbesserter Restriktionsenzymverdau durch einfachen Austausch der Verdaulösungen.
- Basierend auf Rekonstruktionsexperimenten zeigte sich eine Detektionsempfindlichkeit von 400 mutierten Kopien unter $1,4 \times 10^8$ eingesetzten Kopien, was einer Mutationsfrequenz von $2,8 \times 10^{-6}$ entspricht.

Überraschenderweise wurden in diesem Test ausschließlich A → G und T → C Basensubstitutionen der beiden innenliegenden Basenpaaren (Kontrollen und CAA-behandelte Proben) gefunden. Diese gefundenen Mutationen stehen im Einklang mit den durch etheno-Addukte ausgelösten Mutationen [100]. Kürzlich veröffentlichten *Levine et al. (2000)* eine Studie, bei der die Mutagenese eines einzelnen etheno-Adenosin-Addukts in einem doppelsträngigen Plasmid der Größe von 8443 bp in humanen Zellen (HeLa) untersucht wurde. Es konnte eine Mutationsfrequenz von 7 bis 14 % gefunden werden, wobei die A → G Basensubstitution nach der A → T Basensubstitution die Zweithäufigste in diesen Zellen war [218]. Diese Daten sind durchaus mit den in dieser Arbeit erzielten quantitativen Ergebnissen vergleichbar (CAA-induzierte Mutationsraten von 10.5 bis 14.5 % gegenüber den Kontrollen), denn man kann das zirkuläre mitochondriale Genom durchaus als großes Plasmid ansehen. Es ist zu vermuten, daß die hohe Frequenz an A → G-Mutationen in Kontrollen auf hohe εdA-Adduktspiegel in Raji-Kontrollzellen zurückzuführen ist. *Khrapko et al. (1997)* fanden die A → G Transition in 11 von 17 Fällen in einer 100 bp Hot-Spot-Region des mitochondrialen Genoms, die in unmittelbarer Nähe der hier verwendeten Rsa I - Schnittstelle liegt, unter Verwendung einer komplett anderen Methode [194]. Diese Beobachtungen deuten eine Bevorzugung dieser Mutation an, aufgrund des Sequenzkontextes dieser Region bzw. einer biologischen Selektion, gegenüber anderen Mutationen. Die hier diskutierten Daten suggerieren, daß CAA geringe zusätzliche εdA-Adduktraten in der gewählten Zielregion auslöst, die zu A → G Mutationen konvertiert werden. Die geringe Mutationsfrequenz liegt in dem Bereich der Mutationsraten durch Mutagene, die von *Morley et al. (1999)* beschrieben wurden [219]. Desweiteren stimmen die Daten auch mit von *Ballering et al. (1996)* erarbeiteten Daten über CAA-induzierte Mutationen in *Drosophila melanogaster* überein [93]. Zusammenfassend ebnet die in dieser Arbeit entwickelte Festphasen-DPD-Methode den Weg, unselektierte durch εdA-ausgelöste Mutationen zu bestimmen, die aufgrund von erhöhter Lipidperoxidation unter pathologischen, präkarzinogenen Bedingungen wie Wilsons Syndrom oder Hämachromatose gebildet werden [122].

7 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Beitrag zu der Frage geleistet werden, welche Bedeutung etheno-(ϵ)-DNA-Addukte in der Karzinogenese und bei chronisch degenerativen Erkrankungen haben könnten. Zu diesem Zweck wurden etheno-DNA-Addukte mittels 2-Chloracetaldehyd (CAA), einem von zwei Metaboliten von Vinylchlorid und dem Krebstherapeutikum Ifosfamid, in einem humanen B-lymphoiden Zellsystem (Raji Zellen) induziert. Der subtoxische Konzentrationsbereich von CAA wurde mittels Wachstumskurven auf unter 100 μ M eingegrenzt. Weiterhin wurde gezeigt, daß CAA in den in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen einen relativ großen Einfluß auf das Wachstumsverhalten von Raji Zellen hatte. Dieser Einfluß beruhte unter anderem auf der Hemmung der DNA-Replikation und damit indirekt auch auf die DNA-Reparatur, der CAA-abhängigen Kondensation der zellulären DNA aufgrund von DNA-DNA-Quervernetzungen und einem geringen Einfluß auf die Atmungskette in Mitochondrien aufgrund einer Hemmung des NADH-Dehydrogenase-Komplexes. Die weitere Arbeit verteilte sich daraufhin auf drei Teilprojekte :

- Die Detektion und Quantifizierung von etheno-Desoxyadenosin-Addukten (ϵ dA) wurde unter Anwendung einer einfachen, nicht-radioaktiven Alternative zu der IPPA-Postlabeling-Methode auf HPLC-Basis mit Fluoreszenzdetektion durchgeführt, die im Rahmen dieser Arbeit etabliert wurde. Dabei konnte gezeigt werden, daß CAA bei Konzentrationen zwischen 30 und 100 μ M eine Erhöhung von ϵ dA um den Faktor 3-4 in Raji Zell-DNA zur Folge hatte. Ferner konnte mit Hilfe dieser HPLC-Methode zum ersten Mal die Induktion von ϵ dA als Folge von Zigarettenrauch in diesem Zellsystem gezeigt werden, wobei es offen bleibt, ob diese DNA-Addukte direkt oder durch Induktion von Lipidperoxidation gebildet wurden.
- Der Nachweis der genspezifischen Induktion von etheno-DNA-Addukten in einer 'Hot-Spot'-Region der mitochondrialen DNA wurde auf Basis einer in unserer Abteilung von Yang und Hergenahn entwickelten Methode zum genspezifischen Nachweis von DNA-Schäden durchgeführt. Dazu wurde diese Methode auf die in dieser Arbeit gestellten Anforderungen hin weiterentwickelt. Es konnte unter Zuhilfenahme dieser Methode eine signifikante Zunahme von

ϵ dA in der mitochondrialen Zielregion, bei CAA-behandelten Proben gegenüber den Kontrollen, nachgewiesen werden.

- Der Einfluß von CAA auf die Mutationsraten in mitochondrialer DNA aus Raji Zellen wurde mit Hilfe des RSM- und DPD-Tests untersucht. Der DPD-Test wurde im Laufe dieser Arbeit zu einem Festphasen-DPD-Test weiterentwickelt um den Hintergrund an nicht mutierten Sequenzen und die Gefahr von Kreuzkontaminationen zu minimieren. Im Rahmen dieser Experimente konnte eine Zunahme von Mutationen zwischen 10,5 und 14,5 % der CAA-behandelten Proben gegenüber den unbehandelten Kontrollen gezeigt werden. Die Art der Mutationen wurde durch Sequenzierung ermittelt und waren in allen CAA-behandelten Proben A \rightarrow G und T \rightarrow C Transitionen. Weiterhin wurde überprüft, ob CAA, als bifunktionelles Agens, neben Punktmutationen auch Deletionen auslösen könnte. Dabei wurde eine nahezu signifikante Zunahme an Deletionen in den CAA-behandelten Proben gegenüber den unbehandelten Kontrollen festgestellt.

Die in dieser Arbeit angewendeten und weiterentwickelten Methoden könnten durchaus weitere praktische Anwendungen finden. So könnte die Bestimmung von ϵ dA mittels HPLC aus Blut von Krebspatienten, bei Behandlung mit dem Krebstherapeutikum Ifosfamid, ein nützliches Hilfsmittel für die Expositionskontrolle werden. Hierbei könnte ϵ dA als Marker für die interne Belastung des Patienten mit, dem Metabolit von Ifosfamid, CAA dienen. Die in dieser Arbeit entwickelte Festphasen-DPD-Methode ebnet den Weg, unselektierte durch ϵ dA-ausgelöste Mutationen in nukleären Genen wie z.B. p53 zu bestimmen, die aufgrund von erhöhter Lipidperoxidation unter pathologischen, präkarzinogenen Bedingungen wie Wilsons Syndrom oder Hämochromatose gebildet werden könnten. Da bisher keine mitochondrialen etheno-DNA-Addukt-spezifischen Reparaturenzyme beschrieben wurden, muß man davon ausgehen, daß etheno-DNA-Addukte auch einen Beitrag zu Mutationen im mitochondrialen Genom leisten und damit eine Rolle im Prozeß des Alterns bzw. in der Entwicklung von degenerativen Erkrankungen spielen könnten.

8 Literaturverzeichnis

- [1] N.Becker und J.Wahrendorf, Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland, *Springer-Verlag (1998), Heidelberg.*
- [2] F.P.Perera, Molecular epidemiology : insights into cancer susceptibility, risk assessment and prevention.
J.Natl.Cancer Inst., (1996) 88, 496 - 509.
- [3] H.Marquardt in H.Marquardt und S.G.Schäfer (Herausgeber) „ Lehrbuch der Toxikologie “
BI Wissenschaftsverlag Mannheim (1994) 124 - 147.
- [4] K.Hemminki, DNA adducts, mutations and cancer.
Carcinogenesis 14 (1993), 2007 - 2012.
- [5] F.P.Perera, I.B.Weinstein, Molecular epidemiology : recent advantages and future directions.
Carcinogenesis 21 (2000), 517 - 524.
- [5a] P.Vineis, DNA adducts as markers of exposure to carcinogens and risk of cancer.
Int.J.Cancer 88 (2000), 517 - 524.
- [6] D.C.Wallace, Mitochondrial DNA in ageing and disease.
Scientific American (1997), August, 325 - 28.
- [7] M.V.Reddy, K.Randerath, Nuclease P1-mediated enhancement of sensitivity of ³²P-postlabeling test for structurally diverse DNA adducts.
Carcinogenesis 7 (1986), 1543 - 1551.
- [8] F.P.Guengerich, Metabolic activation of carcinogens
Pharmac.Ther. 54 (1992), 17 - 61.
- [9] P.Pott, Chirurgische observations relative to the cancer of the scrotum.
L.Hawes, W.Clark und R.Collins, London (1775).
- [10] K.Yamagiwa, K.Ichikawa, Experimental study of the pathogenesis of carcinoma.
J.Cancer Res., 3 (1918), 1 - 18.
- [11] C.Auerbach, J.M.Robson, J.G.Carr, The chemical production of mutations.
Science, 105 (1947), 243 - 247.
- [12] J.A.Miller, Carcinogenesis by chemicals: an overview.
Cancer Res., 30 (1970), 559 - 576.
- [13] F.P.Guengerich, Metabolism of chemical carcinogens.
Carcinogenesis, 21 (2000), 345 - 351.
- [14] E.Kriek, M.Rojas, K.Alexandrov, H.Bartsch, Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in humans : relevance as biomarkers for exposure and cancer risk.
Mutat.Res., 400 (1998), 215 - 231.
- [15] D.H.Phillips, Fifty years of benzo[a]pyrene.
Nature, 303 (1983), 472 - 486.

- [16] G.Talaska, A.Z.S.S.Al-Juburi, F.F.Kadlubar, Smoking related carcinogen-DNA-adducts in biopsy samples of human urinary bladder : Identification of N-(deoxyguanosin-8-yl-4—aminobiphenyl) as a major adduct.
PNAS, 88 (1991), 5350 - 5354.
- [17] D.Lin, O.Lay, M.S.Bryant, C.Malaveille, M.Friesen, H.Bartsch, N.P.Lang, F.F.Kadlubar, Analysis of 4-Aminobiphenyl-DNA adducts in human urinary bladder and lung by alkaline hydrolysis and negative –ion gas-chromatography mass spectrometry.
Environ.Health Perspect., 102 (1994), 11 - 16.
- [18] K.R.Kaderlik, G.Talaska, D.G.DeBord, A.M.Osorio, F.F.Kadlubar, 4,4'-Methylene-bis(2-chloroaniline)-DNA adduct analysis in human exfoliated urothelial cells by ³²P-postlabeling.
Cancer Epidemiol.Biom.Prev., 2 (1993), 63 - 69.
- [19] P.N.Magee, J.M.Barnes, The production of malignant primary hepatic tumors in the rat by feeding dimethylnitrosamine.
Br.J.Cancer., 10 (1956), 114 - 122
- [20] J.D.Groopman, P.R.Donahue, J.Zhu, J.Chen, G.N.Wogan, Aflatoxin metabolism in humans : detection of aflatoxin metabolites and nucleic acid adducts in urine by affinity chromatography
PNAS, 82 (1985), 6492 - 6497.
- [21] J.M.Bishop, Molecular themes in oncogenesis.
Cell, 64 (1991) 235 - 248.
- [22] H.Bartsch in J.Higginson, C.S.Muir, N.Munoz (Herausgeber), Human cancer: epidemiology and environmental causes.
Cambridge Univ.Press, New York (1992), 189 - 208.
- [23] K.Frenkel, Carcinogen-mediated oxidant formation and oxidative DNA damage.
Pharmacol.Ther., 53 (1992), 127 - 166.
- [24] F.P.Perera, Perspectives on risk assessment for nongenotoxic carcinogens and tumor promoters.
Environ.Health Perspect., 94 (1991), 231 - 235.
- [25] D.L.Davis, H.L.Bradlaw, M.Wolff, T.Woodruff, D.G.Hoel, H.Anton-Culver, Medical hypothesis : xenoestrogens as preventable causes of breast cancer.
Environ.Health Perspect., 101 (1993), 373 - 377.
- [26] I.Berenblum, P.Shubik, An experimental study of the initiating state of carcinogenesis and a reexamination of the somatic cell theory of cancer.
Br,J.Cancer, 3 (1949) 109 - 118.
- [27] C.C.Harris, Chemical and physical carcinogenesis : Advances and perspectives for the 1990s.
Cancer Res. (Suppl.), 18 (1991), 5023s – 5044s.
- [28] I.B.Weinstein, R.M.Santella, F.P.Perera in P.Greenwald, B.S.Kramer, D.L.Weed (Herausgeber): „Cancer prevention and control“.
New York, Marcel-Dekker, (1995) 83 - 110.
- [29] S.Venitt, Mechanisms of carcinogenesis and individual susceptibility to cancer.
Clin.Chem., 40 (1994), 1421 - 1425.

-
- [30] J.C.Barnett in H.Vainio, P.N.Magee, D.B.McGregor, A.J.McMichael (Herausgeber), Mechanisms of carcinogenesis in risk identification. *IARC, Lyon, (1992), 115 - 134.*
- [31] I.B.Weinstein, The origins of human cancer – Molecular mechanisms of carcinogenesis and their implications for cancer prevention and treatment – 27th Clowes, G.H.A. Memorial Award Lecture. *Cancer Res., 48 (1988), 4135 - 4143.*
- [32] R.A.Weinberg in „Spektrum der Wissenschaft Spezial 5 : Krebsmedizin. *Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg (1999), 7 - 17.*
- [33] F.Oesch in H.Marquard und S.G.Schäfer (Herausgeber) „Lehrbuch der Toxikologie“. *BI Wissenschaftsverlag Mannheim (1994), 68 - 93.*
- [34] P.Brookes, P.D.Lawley, Evidence for the binding of polynuclear aromatic hydrocarbons to the nucleic acids of the mouse skin: relation between carcinogenic power of hydrocarbons and their binding to deoxynucleic acid. *Nature, 202 (1964), 781 - 784.*
- [35] B.Singer, J.M.Essigmann, Site specific mutagenesis – retrospective and prospective. *Carcinogenesis, 12 (1991), 949 - 955.*
- [36] E.L.Loehler, The role of adduct specific mutagenesis in understanding how carcinogen-DNA adducts cause mutations – perspective, prospects and problems. *Carcinogenesis, 17 (1996), 895 - 902.*
- [37] M.S.Greenblatt, W.P.Bennett, M.Hollstein, C.C.Harris, Mutations in the p53 tumor-suppressor gene – clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Mutat.Res., 54 (1994), 4855 – 4878.*
- [38] B.Ruggeri, M.DiRado, S.Y.Zhang, B.Bauer, T.Goodrow, A.J.P.Klein-Szanto, Benzo[a]pyrene-induced murine skin tumors exhibit frequent and characteristic G-to-T mutations in the p53-gene. *PNAS, 90 (1991), 1013 - 1017.*
- [39] A.K.Basu, J.M.Essigmann, Site-specifically modified oligonucleotides as probes for the structural and biological effects of DNA-damaging agents. *Chem.Res.Toxicol., 1 (1988), 1 - 18.*
- [40] J.A.Ross, S.Nesnow, Polycyclic aromatic hydrocarbons – correlations between DNA-adducts and ras oncogene mutations. *Mutat.Res., 424 (1999), 155 - 166.*
- [41] P.C.Burcham, Internal hazards – base-line DNA-damage by endogenous products of normal metabolism. *Mutat.Res., 443 (1999), 11 - 36.*
- [42] „IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, Suppl.7 : Overall Evaluations of Carcinogenicity : An Updating of IARC Monographs Vols. 1-42“. *International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France (1987).*

- [43] H.A.J.Schut, E.G.Snyderwine, DNA-adducts of heterocyclic amine food mutagens – implications for mutagenesis and carcinogenesis.
Carcinogenesis, 20 (1999), 353 - 368.
- [44] T.Sugimura, M.Nagao, T.Gawachi, in H.H.Hiatt, J.D.Watson and J.A.Winsten (Herausgeber), „Origins of human cancer“.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1977), 1561 - 1577.
- [45] B.Commoner, A.J.Vithayathil, P.Dolara, S.Nair, P.Madyastha, G.C.Guca, Formation of mutagens in beef and beef extract during cooking.
Science, 201 (1978), 913 - 916.
- [46] T.Enya, H.Suzuki, T.Watanabe, T.Hirayama, Y.Hisamatsu, 3-Nitrobenzanthrone, a powerful bacterial mutagen and suspected human carcinogen found in Diesel exhaust and airborne-particulates.
Environ.Sci.Technol., 31 (1997), 2772 - 2776.
- [47] C.A.Bieler, M.Wießler, L.Erdinger, H.Suzuki, T.Enya, H.H.Schmeiser, DNA adduct formation from the mutagenic air pollutant 3-Nitrobenzanthrone.
Mutat.Res., 439 (1999), 307 - 311.
- [48] A.M.J.Fichtinger-Schepman, A.T.Van Oosterrom, P.H.M.Lohman, F.Behrends, cis-Diaminedichloroplatinium(II)-induced DNA-adducts in peripheral leukocytes from seven cancer patients: quantitative immunochemical detection of the adduct induction and removal after a single dose of cis-Diaminedichloroplatinium(II).
Cancer Res., 47 (1987), 3000 - 3004.
- [49] A.Eastman, Glutathion-mediated activation of anticancer platinum(IV) complexes.
Biochem.Pharm., 36 (1987) 4177 - 4178.
- [50] J.M.Malinge, M.J.Giraudpanis, M.Leng, Interstrand cross-links of Cisplatin induce striking distortions in DNA.
J.Inorg.Biochem., 77 (1999), 23 - 29
- [51] J.Reedijk, The relevance of hydrogen- bonding in the mechanism of action of platinum antitumor compounds.
Inorg.Chem.Acta, 200 (1992), 873 - 881.
- [52] J.M.Essigman, R.G.Croy, A.M.Nadzan, W.F.Busby, V.N.Reinhold, G.Buchi, G.N.Wogan, Structural identification of the major adduct formed by Aflatoxin B₁ in vitro.
PNAS, 74 (1977), 1870 - 1874.
- [53] J.K.Lin, J.A.Miller, E.C.Miller, 2,3-Dihydro-2-(guan-7yl)-3-hydroxy-aflatoxin B₁, a major acid hydrolysis product of aflatoxin B₁-DNA or ribosomal RNA adducts formed in hepatic microsomal-mediated reactions and in rat liver in vivo.
Cancer Res., 41 (1977), 4430 - 4438.
- [54] H.H.Schmeiser, K.-B.Schoepe, M.Wießler, DNA-adduct formation of aristolochic acid-I and acid-II in vitro and in vivo.
Carcinogenesis, 9 (1988), 297 - 303.

- [55] W.Pfau, H.H.Schmeiser, M.Wießler, Aristolochic acid binds covalently to the exocyclic amino group of purine nucleotides in DNA.
Carcinogenesis, 11 (1990), 313 - 319.
- [56] H.H.Schmeiser, J.W.G.Janssen, J.Lyons, H.Scherf, W.Pfau, A.Buchmann, C.R.Bartram, M.Wießler, Aristolochic acid activates ras genes in rat tumors at deoxyadenosine residues.
Cancer Res., 50 (1990), 5464 - 5469.
- [57] J.L.Nortier, M.-C.Muniz, H.H.Schmeiser, V.M.Arlt, C.A.Bieler, M.Petein, M.F.Depierreux, L.dePauw, D.Abramovicz, P.Vereerstraeten, J.-L.Vanherweghem, Urothelial carcinoma associated with the use of Chinese herbs (*Aristolochia* species).
N.Engl.J.Med., 342 (2000), 1686 - 1692.
- [58] H.Bartsch, A.Barbin, M.J.Marion, J.Nair, Y.Guichard, Formation, detection, and role in carcinogenesis of ethenobases in DNA.
Drug Metab.Rev., 26 (1994), 349 - 371.
- [59] K.B.Beckman, B.N.Ames, The free- radical theory of ageing matures.
Physiol.Rev., 78 (1998), 547 - 581.
- [60] H.J.Helbock, K.B.Beckman, M.K.Shigenaga, P.B.Walter, A.A.Woodall, H.C.Yeo, B.N.Ames, DNA oxidation matters – The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine.
PNAS, 95 (1998), 288 - 293.
- [61] L.J.Marnett, Oxyradicals and DNA damage.
Carcinogenesis, 21 (2000), 361 - 370.
- [62] S.Duffy, A.So, T.H.Murphy, Activation of endogenous antioxidant defenses in neuronal cells prevents free radical-mediated damage.
J.Neurochem., 71 (1988), 69 - 77.
- [63] S.B.Farr, R.D'Ari, D.Touati, Oxygen-dependent mutagenesis in *Escherichia coli* lacking superoxide dismutase.
PNAS, 83 (1994), 8268 - 8272.
- [64] N.Abril, C.Pueyo, Mutagenesis in *Escherichia coli* lacking catalase.
Environ.Mol.Mutagen., 15 (1990), 184 - 189.
- [65] P.Chary, D.Dillon, A.L.Schroeder, D.O.Nadvig, Superoxide-dismutase (SOD-1) null mutants of *Neurospora crassa* -oxidative stress sensitivity, spontaneous mutation rate and response to mutagens.
Genetics, 137 (1994), 723 - 730.
- [66] A.Jenner, T.G.England, O.I.Aruoma, B.Halliwell, Measurement of oxidative DNA-damage by gas-chromatography mass-spectrometry – ethanethiol prevents artifactual generation of oxidized DNA bases.
Biochem.J., 331 (1998), 365 - 369.
- [67] J.R.Wagner, C.C.Hu, B.N.Ames, Endogenous oxidative damage of deoxycytidine in DNA.
PNAS, 89 (1992), 3380 - 3384.

- [68] H.Esterbauer in D.C.H.McBrien und T.F.Slater (Herausgeber), „Free radicals, lipid peroxidation and cancer“.
Academic Press, London (1982), 101 - 128.
- [69] F.L.Chung, H.J.Chen, R.G.Nath, Lipid-peroxydation as a potential endogenous source for the formation of exocyclic DNA adducts.
Carcinogenesis, 17 (1996) 2105 - 2111.
- [70] P.C.Burcham, Genotoxic lipid-peroxidation products – their DNA-damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts.
Mutagenesis, 13 (1988), 287 - 305.
- [71] K.D.Robertson, P.A.Jones, DNA methylation : past, present and future directions.
Carcinogenesis, 21 (2000), 461 - 467.
- [72] J.M.Zingg, P.A.Jones, Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis.
Carcinogenesis, 18 (1997), 869 - 882.
- [73] T.Rein, M.L.DePamphilis, H.Zorbas, Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes.
Nucl.Acids.Res., 26 (1998), 2255 - 2264.
- [74] L.S.Chuang, H.H.Ng, J.N.Chia, B.F.Li, Characterization of independent DNA and multiple Zn-binding domains at the N-terminus of human DNA-(cytosine-5)methyltransferase – modulating the property of a DNA-binding domain by contiguous Zn-binding motifs.
J.Mol.Biol., 257 (1996), 935 - 948.
- [75] H.Leonhardt, A.W.Page, H.U.Weier, T.H.Bestor, A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA-replication in mammalian nuclei.
Cell, 71 (1992), 865 - 873.
- [76] M.A.Gama Sosa, R.M.Midgett, V.A.Slagel, S.Githens, K.C.Kuo, C.W.Gehrke, M.Ehrlich, Tissue specific differences in DNA methylation in various mammals.
Biochim.Biophys.Acta, 740 (1990), 212 - 219.
- [77] S.Kochanek, M.Toth, A.Demel, D.Renz, W.Doerfler, Interindividual concordance of methylation profiles in human genes for tumor necrosis factor-alpha and factor-beta.
PNAS, 87 (1990), 8830 - 8834.
- [78] J.M.Zingg, G.Pedraza Alva, J.P.Jost, MyoD-1 promoter autoregulation is mediated by 2 proximal E-boxes.
Nucl. Acids Res., 22 (1994), 2234 - 2241.
- [79] P.W.Laird, R.Jaenisch, DNA methylation and cancer.
Hum.Mol.Genet., 3 (1994), 1487 - 1495.
- [80] P.A.Jones, W.M.Rideout, J.C.Shen, C.H.Spruk, Y.C.Tsai, Methylation, mutations and cancer.
Bioessays, 14 (1992), 33 - 36.
- [81] P.A.Jones, DNA methylation errors and cancer.
Cancer Res., 56 (1996), 2463 - 2467.

- [82] T.L.Kautiainen, P.A.Jones, DNA methyltransferase levels in tumorigenic and nontumorigenic cells in culture.
J.Biol.Chem., 261 (1986), 1594 - 1598.
- [83] J.L.Counts, J.I.Goodman, Hypomethylation of DNA – a nongenotoxic mechanism involved in tumor promotion.
Toxicol.Lett., 82/83 (1995), 663 - 672.
- [84] P.M.Pollock, J.V.Pearson, N.K.Hayward, Compilation of somatic mutations of the Cdkn2 gene in human cancers – nonrandom distribution of base substitutions.
Genes, Chrom.Cancer, 15 (1996), 77 - 88.
- [85] N.K.Kochetkov, V.N.Shibaev, A.A.Kost, New reaction of adenine and cytosine derivatives, potentially useful for nucleic acid modifications.
Tetrahedron Lett., 22 (1971), 1993 - 1996.
- [86] J.L.Creech Jr., M.N.Johnson, Angiosarcoma of the liver in the manufacture of polyvinylchloride.
J.Occup.Med., 16 (1974), 150 - 151.
- [87] C.Maltoni, G.Lefemine, P.Chieco, D.Caretti, Vinyl chloride carcinogenesis : current results and perspectives.
Med.Lav., 65 (1974), 421 - 444.
- [88] H.Bartsch, C.Malaveille, A.Barbin, H.Brésil, L.Tomatis, R.Montesano, Mutagenicity and metabolism of vinyl chloride and related compounds.
Environ.Health Perspect., 17 (1976) 193 - 198.
- [89] A.K.Giri, Genetic toxicology of vinyl chloride – a review.
Mutat.Res., 339 (1995), 1 - 14.
- [90] C.Malaveille, H.Bartsch, A.Barbin, A.-M. Camus, R.Montesano, A.Croisy, P.Jacquignon, Mutagenicity of vinyl chloride, chloroethylene oxide, chloroacetaldehyde and chloroethanol.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 63 (1975), 363 - 370.
- [91] A.Barbin, L.Tenenbaum, Z.Toman, M.Radman, H.Bartsch, recA-independent mutagenicity induced by chloroethylene oxide in E.coli.
Mutat.Res., 152 (1985), 157 - 159.
- [92] A.Barbin, F.Besson, M.-H.Perrard, J.-C.Béréziat, J.Kaldor, G.Michel, H.Bartsch, Induction of specific base pair substitutions in E.coli trpA mutants by chloroethylene oxide, a carcinogenic vinyl chloride metabolite.
Mutat.Res., 152 (1985), 147 - 156.
- [93] L.A.P.Ballering, M.J.M.Nivard, E.W.Vogel, Characterization by two endpoint comparisons of the genetic toxicity profiles of vinyl chloride and related etheno adduct-forming carcinogens in Drosophila.
Carcinogenesis, 17 (1996), 1083 - 1092.
- [94] L.A.P.Ballering, M.J.M.Nivard, E.W.Vogel, Preferential formation of deletions following in vivo exposure of post-meiotic germ cells to the DNA adduct-forming carcinogen vinyl carbamate.
Environ.Mol.Mutagen., 30 (1997), 321 - 329.

- [95] S.-Y.Chiang, J.A.Swenberg, W.H.Weisman, T.R.Skopek, Mutagenicity of vinyl chloride and its reactive metabolites chloroethylene oxide and chloroacetaldehyde in a metabolically competent B-lymphoblastoid cell line.
Carcinogenesis, 18 (1997), 31 - 36.
- [96] H.L.Liber, W.Kaufmann, M.Marion, J.A.Swenberg, Exposure to vinyl chloride is associated with a persistent increase in hprt mutants in peripheral blood lymphocytes.
Proc.Am.Assoc.Cancer Res., 40 (1999), 508.
- [97] A.Barbin, H.Bartsch, P.Leconte, M.Radman, Studies on miscoding properties of 1,N⁶-etheno-adenine and 3,N⁴-ethenocytosine, DNA reaction products of vinyl chloride metabolites, during in vitro DNA synthesis.
Nucleic Acids Res., 9 (1981), 375 - 387.
- [98] J.A.Hall, R.Saffhill, T.Green, D.E.Hathway, The induction of errors during in vitro DNA synthesis following chloroacetaldehyde treatment of poly(dA-dT) and poly(dC-dG) templates.
Carcinogenesis 2 (1981), 141 - 146.
- [99] S.Spengler, B.Singer, Transcriptional errors and ambiguity resulting from the presence of 1,N⁶-ethenoadenosine or 3,N⁴-ethenocytidine in polyribonucleotides.
Nucleic Acids Res., 9 (1981), 365 - 373.
- [100] A.Barbin, Etheno-adduct-forming chemicals: from mutagenicity testing to tumor mutation spectra.
Mutat.Res., 462 (2000), 55 - 69.
- [101] A.K.Basu, M.L.Wood, L.J.Niedernhofer, L.A.Ramos, J.M.Essigmann, Mutagenic and genotoxic effects of three vinyl chloride induced lesions : 1,N⁶-ethenoadenine and 3,N⁴-ethenocytosine, and 4-amino-5-(imidazol-2-yl)imidazole.
Biochemistry, 32 (1993), 12793 - 12801.
- [102] S.Shibutani, N.Suzuki, Y.Matsumoto, A.P.Grollman, Miscoding properties of 3,N⁴-etheno-2'-deoxycytidine in reactions catalyzed by mammalian polymerases.
Biochemistry, 35 (1996), 14992 - 14998.
- [103] V.A.Plejewala, R.W.Rzepka, D.Simha, M.Z.Humayun, Quantitative multiplex sequence analysis of mutational hot spots. Frequency and specificity of mutations induced by a site specific ethenocytosine in M13 viral DNA.
Biochemistry, 32 (1993), 4105 - 4111.
- [104] V.A.Plejewala, R.W.Rzepka, M.Z.Humayun, UV-irradiation of E.coli modulates mutagenesis at a site specific ethenocytosine residue in M13 DNA. Evidence for an inducible recA-independent effect.
Biochemistry, 32 (1993), 4112 - 4120.
- [105] B.Singer, S.J.Spengler, F.Chavez, J.T.Kusmieriek, The vinyl chloride-derived nucleoside, N²,3'-ethenoguanosine, is a highly efficient mutagen in transcription.
Carcinogenesis, 8 (1987), 745 - 747.
- [106] K.C.Cheng, B.D.Preston, D.S.Cahill, M.K.Dorsanjh, B.Singer, L.A.Loeb, The vinyl chloride DNA derivative N²,3'-ethenoguanosine produces G→A transitions in E.coli.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 88 (1991), 9974 - 9978.

- [107] S.Langouet, M.Müller, F.P.Guengerich, Misincorporation of dNTPs opposite 1,N²-ethenoguanine and 5,6,7,9-tetrahydro-7-hydroxy-9-oxoimidazol[1,2- α]purine in oligonucleotides by E.coli polymerases I exo⁻ and II exo⁻, T7 polymerase exo⁻, human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase, and rat polymerase β .
Biochemistry, 36 (1997), 6069 - 6079.
- [108] S.Akasaka, F.P.Guengerich, Mutagenicity of site-specifically located 1,N²-ethenoguanine in Chinese ovary hamster cell chromosomal DNA.
Chem.Res.Toxicol., 12 (1999), 501 - 507.
- [109] M.Moriya, W.Zhang, F.Johnson, A.P.Grollman, Mutagenic potency of exocyclic DNA adducts: marked differences between E.coli and simian kidney cells.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 91 (1994), 11899 - 11903.
- [110] V.Litinski, A.Chenna, J.Sagi, B.Singer, Sequence context is an important determinant in the mutagenic potential of 1,N⁶-ethenoadenosine (ϵ A): formation of ϵ A base pairs and elongation in defined templates.
Carcinogenesis, 18 (1997), 1609 - 1615.
- [111] F.El Ghissassi, A.Barbin, H.Bartsch, Metabolic activation of vinyl chloride by rat liver microsomes: low-dose kinetics and involvement of cytochrome P450 2E1.
Biochem.Pharmacol., 55 (1998), 1445 - 1452.
- [112] A.Barbin, formation of DNA etheno adducts in rodents and humans and their role in carcinogenesis.
Acta Biochim.Pol., 45 (1998), 145 - 161.
- [113] Some anti-thyroid and related substances, nitrofurans and industrial chemicals.
IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, Vol.7, IARC Lyon 1974, 1 - 326.
- [114] B.Zimmerli, J.Schlattner, Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment.
Mutat.Res., 259 (1991), 325 - 350.
- [115] F.P.Guengerich, D.H.K.Kim, Enzymatic oxidation of ethyl carbamate to vinyl carbamate and its role as an intermediate in the formation of 1,N⁶-ethenoadenosine.
Chem.Res.Toxicol., 4 (1991), 413 - 421.
- [116] M.L.Ribovich, J.A.Miller, E.C.Miller, L.G.Timmins, Labeled 1,N⁶-ethenoadenosine and 3,N⁴-ethenocytidine in hepatic RNA of mice given [ethyl-1,2-³H or ethyl-1-¹⁴C] ethyl carbamate (urethane) and vinyl carbamate.
Carcinogenesis, 3 (1982), 539 - 546.
- [117] G.Eberle, A.Barbin, R.J.Laib, F.Ciroussel, J.Thomale, H.Bartsch, M.F.Rajewsky, 1,N⁶-etheno-2'-deoxyadenosine and 3,N⁴-etheno-2'-deoxycytidine detected by monoclonal antibodies in lung and liver DNA of rats exposed to vinyl chloride.
Carcinogenesis, 10 (1989), 209 - 212.

- [118] N.Fedtke, J.A.Boucheron, V.E.Walker, J.A.Swenberg, Vinyl chloride-induced DNA adducts. II: Formation and persistence of 7-(2'-oxoethyl)guanine and N²,3-ethenoguanine in rat tissue DNA. *Carcinogenesis*, 11 (1990), 1287 - 1292.
- [119] Y.Guichard, J.Nair, A.Barbin, H.Bartsch, Immunoaffinity clean-up combined with ³²P-postlabelling analysis of 1,N⁶-ethenoadenine and 3,N⁴-ethenocytosine in DNA. *In D.H.Phillips, M.Castegnaro, H.Bartsch (Eds.), Postlabelling methods for detection of DNA adducts, Vol. 124. IARC Sci.Publ.IARC Lyon, (1993), 263 - 269.*
- [120] J.Nair, A.Barbin, Y.Guichard, H.Bartsch, 1,N⁶-ethenodeoxyadenosine and 3,N⁴-ethenodeoxycytidine in liver DNA of humans and untreated rodents detected by immunoaffinity / ³²P-postlabelling. *Carcinogenesis* 16 (1995), 613 - 617.
- [121] J.Nair, C.E.Vaca, I.Velic, M.Mutanen, L.M.Valsta, H.Bartsch, High dietary ω -6 polyunsaturated fatty acids drastically increase the formation of etheno-DNA base adducts in white blood cells of female subjects. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 6 (1997), 597 - 601.
- [122] J.Nair, P.L.Carmichael, R.C.Fernando, D.H.Phillips, H.Bartsch, Lipid peroxidation-induced etheno-DNA adducts in liver of patients with the genetic storage disorder Wilson's disease and primary hemochromatosis. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 7 (1998), 435 - 440.
- [123] J.Nair, A.Gal, S.Tannenbaum, G.Wogan, H.Bartsch, Etheno adducts in spleen DNA of SJL mice stimulated to overproduce nitric oxide. *Carcinogenesis* 19 (1998), 2081 - 2084.
- [124] H.Ohshima, H.Bartsch, Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. *Mutat.Res.*, 305 (1994), 253 - 264.
- [125] J.Nair, A.Barbin, I.Velic, H.Bartsch, Etheno-DNA base adducts from endogenous reactive species. *Mutat.Res.*, 424 (2000), 59 - 69.
- [126] R.S.Sodum, F.L.Chung, 1,N²-ethenodeoxyguanosine as a potential marker for DNA adduct formation by trans-4-hydroxy-2-nonenal. *Cancer Res.*, 48 (1998), 320 - 323.
- [127] H.J.Chen, F.L.Chung, Formation of etheno adducts in reactions of enals via autoxidation. *Chem.Res.Toxicol.*, 7 (1994), 857 - 860.
- [128] J.Nair, H.Sone, M.Nagao, A.Barbin, H.Bartsch, Copper-dependent formation of miscoding etheno-DNA adducts in the liver of Long Evans Cinnamon (LEC) rats developing hereditary hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.*, 56 (1996), 1267 - 1271.
- [129] F.Oesch, S.Adler, R.Rettelbach, G.Doerjer, Repair of etheno DNA adducts by N-glycosylases. *in B.Singer, H.Bartsch (Eds.), The role of cyclic nucleic acid adducts in carcinogenesis and mutagenesis, Vol.70, IARC Sci.Publ., IARC Lyon 1986, 373 - 379.*

- [130] B.Rydberg, M.K.Dorsanjh, B.Singer, Human cells contain protein specifically binding to a single 1,N⁶-ethenoadenine in a DNA fragment.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 88 (1991), 6839 - 6842.
- [131] F.Oesch, C.M.Weiss, S.Klein, Use of oligonucleotides containing ethenoadenine to study the repair of this DNA lesion. Determination of individual and collective repair activities.
Arch.Toxicol., 68 (1994), 358 - 363.
- [132] M.K.Dorsanjh, A.Chenna, E.Kim, H.Fraenkel-Conrat, L.Samson, B.Singer, All four known cyclic adducts formed in DNA by the vinyl chloride metabolite chloroacetaldehyde are released by a human DNA glycosylase.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 91 (1994), 1024 - 1028.
- [133] B.Singer, A.Antoccia, A.K.Basu, M.K.Dorsanjh, H.Fraenkel-Conrat, P.E.Gallagher, J.T.Kusmieriek, Z.H.Qiu, B.Rydberg, Both purified human 1,N⁶-ethenoadenine binding protein and purified 3-methyladenin-DNA glycosylase act on 1,N⁶-ethenoadenine and 3-methyladenine.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 89 (1992), 9386 - 9390.
- [134] M.Saparbaev, K.Kleibl, J.Laval, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, rat and human 3-methyladenine DNA glycosylases repair 1,N⁶-ethenoadenine when present in DNA.
Nucleic Acids Res., 23 (1995), 3750 - 3755.
- [135] B.Hang, A.Chenna, S.Rao, B.Singer, 1,N⁶-ethenoadenine and 3,N⁴-ethenocytosine are excised by separate human DNA glycosylases.
Carcinogenesis, 17 (1996), 155 - 157.
- [136] M.Saparbaev, J.Laval, 3,N⁴-ethenocytosine, a highly mutagenic adduct, is a primary substrate for *Escherichia coli* double-stranded uracil-DNA glycosylase and human mismatch-specific thymine-DNA glycosylase.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 95 (1998), 8508 - 8513.
- [137] B.Hang, M.Medina, H.Fraenkel-Conrat, B.Singer, A 55 kDa protein isolated from human cells shows DNA glycosylase activity toward 3,N⁴-ethenocytosine and the G/T mismatch.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 95 (1998), 13561 - 13566.
- [138] P.Fortini, E.Parlanti, O.M.Sidorkina, J.Laval, E.Dogliotti, The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells.
J.Biol.Chem., 274 (1999), 15230 - 15236.
- [139] Z.Matijasevic, M.Sekiguchi, D.B.Ludlum, Release of N²,3-ethenoguanine from chloroacetaldehyde-treated DNA by *Escherichia coli* 3-methyladenine glycosylase II.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 89 (1992), 9331 - 9334.
- [140] E.Buddeke, Grundriß der Biochemie.
Walter de Gruyter, 246 - 258, 393 - 394.
- [141] R.K.Naviaux, The spectrum of mitochondrial disease.
A primary care physicians guide, 1997, 3 - 10.
- [142] B.Alberts, D.Bray, J.Lewis, M.Raff, K.Roberts, J.D.Watson, Molekularbiologie der Zelle.
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- [143] L.Stryer, Biochemie.
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.(1991)

- [144] D.C.Wallace, Mitochondrial diseases in man and mouse.
Science, 283 (1999), 1482 - 1487.
- [145] J.-W.Taanman, The mitochondrial genome: structure, translation and replication.
Biochim.Biophys.Acta, 1410 (1999), 103 - 123.
- [146] S.Anderson, T.Bankier, B.G.Barrell, M.H.L.de Bruijn, A.R.Coulson, J.Drouin, I.C.Eperon, D.P.Nierlich, B.A.Roe, F.Sanger, P.H.Schreier, A.J.H.Smith, R.Staden, I.G.Young, Sequence organisation of the human mitochondrial genome.
Nature, 290 (1981), 457 - 465.
- [147] P.F.Chinnery, D.M.Turnbull, Mitochondrial DNA and disease.
Mol.Med., 354 (1999), 17 - 21.
- [148] H.Shitara, J.I.Hayashi, S.Takahama, H.Yonekawa, Maternal inheritance of mouse interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage.
Genetics, 148 (1998), 851 - 857.
- [149] P.F.Chinnery, N.Howell, R.N.Lightowlers, D.M.Turnbull, Genetic counselling and paternal diagnosis of mtDNA disease.
Am.J.Hum.Genet., 63 (1998), 1908 - 1911.
- [150] R.N.Lightowlers, P.F.Chinnery, D.M.Turnbull, N.Howell, Mammalian mitochondrial genetics : Heredity, heteroplasmy and disease.
Trends Genet., 13 (1997), 450 - 455.
- [151] S.L.White, V.R.Collins, R.Wolfe et al., Genetic counselling and paternal diagnosis for mitochondrial DNA mutations at nucleotide8993.
Am.J.Hum.Genet., 65 (1999), 474 - 482.
- [152] N.G.Larson, D.A.Clayton, Molecular genetic aspects of human mitochondrial disorders.
Annu.Rev.Genet., 29 (1995), 151 - 178.
- [153] D.C.Wallace, William Allan Award Adress. Mitochondrial DNA variation in human evolution, degenerative disease and aging.
Am.J.Hum.Genet., 57 (1995), 201 - 223.
- [154] M.Jaksch-Angerer, S.Hofmann, M.F.Bauer, K.Gempel, B.Obermaier-Kusser, I.Paetzke, K.D.Gerbitz, Mitochondriale Erkrankungen.
Deutsches Ärzteblatt, 96 (1999), 2972 - 2981.
- [155] J.A.Morgan-Hughes, M.G.Hanna, Mitochondrial encephalomyopathies : the enigma of genotype versus phenotype.
Biochim.Biophys.Acta, 1410 (1999), 125 - 145.
- [156] M.G.Hanna, I.P.Nelson, Genetics and molecular pathogenesis of mitochondrial respiratory chain diseases.
Cell.Mol.Life Sci, 55 (1999), 691 - 706.
- [157] O.Warburg, On the origin of cancer cells.
Science, 123 (1956), 309 - 314.
- [158] O.Warburg, F.Wind, E.Negelein, Über den Stoffwechsel von Tumoren im Körper.
Klin.Wochenschr., 5 (1926), 829 - 832.

- [159] K.Khrapko, N.Bodyak, W.G.Thilly, N.J. van Orsouw, X.Zhang, H.A.Coller, T.T.Perls, M.Upton, J.Vijk, J.Y.Wei, Cell-by-cell scanning of whole mitochondrial genomes in aged human hearts reveals a significant fraction of myocytes with clonally expanded deletions.
Nucl.Acids Res., 27 (1999), 2434 - 2441
- [160] D.A.Clayton, J.Vinograd, Circular dimers and catenates of mitochondrial DNA in human leukemia leucocytes.
Nature, 216 (1967), 652 - 653.
- [161] D.A.Clayton, J.Vinograd, Complex mitochondrial DNA in leukemic and normal human myeloid cells.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 62 (1969), 1077 - 1084.
- [162] A.M.Gianni, R.Dalla-Favera, E.Polli, Restriction enzyme analysis of human leucemic mitochondrial DNA.
Leuk.Res., 4 (1980), 155 - 160.
- [163] M.Taira, E.Yoshida, M.Kobayashi, K.Yaginuma, K.Koike, Tumor-associated mutations of rat mitochondrial transfer RNA genes.
Nucl.Acid Res., 11 (1983), 1635 - 1643.
- [164] L.R.Cavalli, B.C.Liang, Mutagenesis, tumorigenicity and apoptosis : are mitochondria involved.
Mutat.Res., 398 (1998), 19 - 26.
- [165] J.W.Shay, H.Werbin, New evidence for the insertion of mitochondrial DNA into the human genome: significance for cancer and ageing.
Mutat.Res., 275 (1992), 227 - 235.
- [166] D.R.Green, J.C.Reed, Mitochondria and apoptosis.
Science, 281 (1998), 1309 - 1312.
- [167] K.Polyak, Y.Li, H.Zhu, C.Lengauer, J.K.Willson, S.D.Markowitz, M.A.Trush, K.W.Kinzler, B.Vogelstein, Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumors.
Nat.Genet., 20 (1998), 291 - 293.
- [168] W.Habano, S.Nakamura, T.Sugai, Microsatellite instability in the mitochondrial DNA of colorectal carcinomas: evidence for mismatch repair systems in mitochondrial genome.
Oncogene, 17 (1998), 1931 - 1937.
- [169] A.Alonso, P.Martin, C.Albarran, B.Aquilera, O.Garcia, A.Guzman, H.Oliva, M.Sancho, Detection of somatic mutations in the mitochondrial DNA control region of colorectal and gastric tumors by heteroduplex and single-strand conformation analysis.
Electrophoresis, 18 (1997), 682 - 685.
- [170] K.Khrapko, H.Coller, P.Andre, X.-C.Li, F.Foret, A.Belenky, B.L.Karger, W.G.Thilly, Mutational spectrometry by genotypic selection : human mitochondrial DNA.
Nucleic Acid.Res., 25 (1997), 685 - 693.
- [171] D.A.Clayton, J.N.Doda, E.C.Friedberg, The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 71 (1974), 2777 - 2781.

- [172] W.J.Driggers, S.P.LeDoux, G.L.Wilson, Repair of oxidative damage within the mitochondrial DNA of RINr 38 cells.
J.Biol.Chem., 268 (1993), 22042 - 22045.
- [173] W.J.Driggers, V.I.Grishko, S.P.LeDoux, G.L.Wilson, Defective repair of oxidative damage in the mitochondrial DNA of a *Xenoderma Pigmentosum* group A cell line.
Cancer Res., 56 (1996), 1262 - 1266.
- [174] W.J.Driggers, G.P.Holmquist, S.P.LeDoux, G.L.Wilson, Mapping frequencies of endogenous oxidative damage and kinetic response to oxidative stress in a region of rat mtDNA.
Nucleic Acid Res., 25 (1997), 4362 - 4369.
- [175] F.M.Yakes, B.van Houten, Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 94 (1997), 514 - 519.
- [176] J.J.Salazar, B.van Houten, Preferential mitochondrial DNA injury caused by glucose oxidase as a steady generator of hydrogen peroxide in human fibroblasts.
Mutat.Res., 385 (1997), 139 - 149.
- [177] R.M.Anson, D.L.Croteau, R.H.Stierum, C.Filburn, R.Parsell, V.A.Bohr, Homogenous repair of singlet oxygen-induced DNA damage in differentially transcribed regions and strands of human mitochondrial DNA.
Nucleic Acid Res., 26 (1998), 662 - 668.
- [178] M.Jaiswal, L.J.Lipinski, V.A.Bohr, S.J.Mazur, Efficient in vitro repair of 7-hydro-8-oxodeoxyguanosine by human cell extracts : involvement of multiple pathways.
Nucleic Acid Res., 26 (1998), 2184 - 2191.
- [179] B.G.Taffe, F.Larminat, J.Laval, D.L.Croteau, R.M.Anson, V.A.Bohr, Gene-specific nuclear and mitochondrial repair of formamidopyrimidine DNA glycosylase-sensitive sites in Chinese hamster ovary cells.
Mutat.Res., 364 (1996), 183 - 192.
- [180] C.C.Petepher, S.P.LeDoux, V.A.Bohr, G.L.Wilson, Repair of alkali-labile sites within mitochondrial DNA of RINr 38 cells after exposure to the nitrosourea streptozotocin.
J.Biol.Chem., 266 (1991), 3113 - 3117.
- [181] M.Pirsel, V.A.Bohr, Methyl methanesulfonate adduct formation and repair in the DHFR gene and in mitochondrial DNA in hamster cells.
Carcinogenesis, 14 (1993), 2105 - 2108.
- [182] S.P.LeDoux, G.L.Wilson, E.J.Beecham, T.Stevensner, K.Wassermann, V.A.Bohr, Repair of mitochondrial DNA after various types of DNA damage in Chinese hamster ovary cells.
Carcinogenesis, 13 (1992), 1967 - 1973.
- [183] S.P.LeDoux, N.J.Patton, L.J.Avery, G.L.Wilson, Repair of N-methylpurines in the mitochondrial DNA of *Xenoderma Pigmentosum* group D cells.
Carcinogenesis, 14 (1993), 913 - 917.
- [184] B.Pascucci, A.Versteegh, A.van Hoffen, A.A.van Zeeland, L.H.Mullenders, E.Dogliotti, DNA repair of UV photoproducts and mutagenesis in human mitochondrial DNA.
J.Mol.Biol., 273 (1997), 417 - 427.

- [185] C.Cullinane, V.A.Bohr, DNA interstrand crosslinks induced by psoralen are not repaired in mammalian mitochondria.
Cancer Res., 58 (1998), 1400 - 1404.
- [186] A.E.Tomkinson, R.T.Bonk, J.Kim, N.Bartfeld, S.Linn, Mammalian mitochondrial endonuclease activities specific for ultraviolet-irradiated DNA.
Nucleic Acid Res., 18 (1990), 929 - 935.
- [187] E.G.Snyderwine, V.A.Bohr, Gene and strand-specific damage and repair in Chinese hamster ovary cells treated with 4-nitroquinoline 1-oxide.
Cancer Res., 52 (1992), 4183 - 4189.
- [188] D.L.Croteau, R.H.Stierum, V.A.Bohr, Mitochondrial repair pathways.
Mutat. Res., 434 (1999), 137 - 148.
- [189] Q.Yang, M.Hergenbahn, H.Bartsch, Epstein-Barr virus episomes as targets for cigarette smoke- and γ -irradiation-induced DNA damage : studies on the EBNA-1 region by a new gene-specific technique.
Carcinogenesis, 18 (1997), 1401 - 1405
- [190] J.M.Parry, M.Shamsher, D.O.F.Skibinski, Restriction site mutation analysis, a proposed methodology for the detection and study of DNA base changes following mutagen exposure.
Mutagenesis, 5 (1990), 209 - 212.
- [191] B.A.Bridges, A.M.Carr, A.R.Lehmann, Possible methodologies for detecting and study of DNA sequence changes following mutagen exposure : magnetic enrichment in mutant DNA.
Mutagenesis, 5 (1990), 523 - 524.
- [192] J.Zijlstra, E.Felley-Bosco, P.Amstad, P.Cerutti, A mammalian mutation system avoiding phenotypic selection: the RFLP / PCR approach.
in E.M.W.Pariza (Eds.), Mutagens and carcinogens in diet, Wiley-Liss (1990), 187 - 200.
- [193] F.Palotti, X.Chen, E.Bonilla, E.A.Schon, Evidence that specific mtDNA point mutations may not accumulate in skeletal muscle during normal aging.
Am.J.Hum.Genet., 59 (1996), 591 - 602.
- [194] K.Khrapko, H.A.Coller, P.C.André, X.-C.Li, J.S.Hanekamp, W.G.Thilly, Mitochondrial mutational spectra in human cells and tissues.
Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 94 (1997), 13798 - 13803.
- [195] C.Meissner, N.von Wurmb, Sensitive Detection of the 4977-bp deletion in human mitochondrial DNA of young individuals.
BioTechniques, 25 (1998), 652 - 654.
- [196] H.G.Gratzner, Monoclonal antibody to 5-bromo- and 5-iododeoxyuridine : a new reagent for detection of DNA replication.
Science, 218 (1982), 474 - 475.
- [197] O.Östling, K.J.Johanson, Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 123 (1984), 291 - 298.

- [198] Olive P.L., Banath J.P., Durand R.E., Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the Comet assay.
Radiat.Res., 122 (1990), 86-94.
- [199] Kuchenmeister F., Schmetzer P., Engelhardt G., Genotoxic bifunctional aldehydes produce specific images in the comet assay.
Mutat.Res., 419 (1998), 69-78.
- [200] T.Mosman, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays.
J.Immunol.Meth., 65 (1983), 55 - 63.
- [201] M.B.Hansen, S.E.Nielsen, K.Berg, Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth / cell kill.
J.Immunol.Meth., 119 (1989), 203 - 210.
- [202] M.P.Goren, R.K.Wright, C.B.Pratt, F.E.Pell, Dechloroethylation of ifosfamide and neurotoxicity.
Lancet, 2 (1986), 1219 - 1220.
- [203] L.D.Lewis, C.A.Meanwell, Ifosfamide pharmacokinetics and neurotoxicity..
Lancet, 335 (1990), 175 - 176.
- [204] R.Skinner, I.M.Sharkey, A.D.Pearson, A.W.Craft, Ifosfamide, mesna, and nephrotoxicity in children.
J.Clin.Oncol., 11 (1993), 173 - 190.
- [205] J.C.Kandala, J.E.K.Mrema, A.DeAngelo, F.B.Daniel, R.V.Guntaka, 2-chloroacetaldehyde and 2-chloroacetal are potent inhibitors of DNA synthesis in animal cells.
Biochem.Biophys.Res.Comm., 167 (1990), 457 - 463.
- [206] F.P.Guengerich, P.S.Mason, M.T.Stott, T.R.Fox, P.G.Watanabe, Roles of 2-Haloethylene oxides and 2-Haloacetaldehydes derived from Vinyl Bromide and Vinyl Chloride in irreversible binding to protein and DNA.
Cancer Res., 41 (1981), 4391 - 4398.
- [207] M.J.Lind, A.T.McGowan, J.A.Hadfield, N.Thatcher, D.Crowther, B.W.Fox, The effects of ifosfamide and its metabolites on intracellular GSH levels.
Biochem.Pharmacol., 38 (1989), 1835 - 1840.
- [208] C.Sood, P.J.O'Brien, Molecular mechanisms of chloroacetaldehyde-induced cytotoxicity in isolated rat hepatocytes.
Biochem.Pharmacol., 46 (1993), 1621 - 1626.
- [209] C.Sood, P.J.O'Brien, Chloroacetaldehyde-induced hepatocyte cytotoxicity.
Biochem.Pharmacol., 48 (1994), 1025 - 1032.
- [210] S.J.Spengler, B.Singer, Formation of intrastrand crosslinks in chloroacetaldehyde-treated DNA demonstrated by ethidium bromide fluorescence.
Cancer Res., 48 (1988), 4804 - 4806.
- [211] G.P.Kaijser, J.H.Beijnen, E.L.Jeunink, A.Bult, H.J.Keizer, J.deKraker, W.J.Underberg, Determination of chloroacetaldehyde, a metabolite of oxaphosphorine cytostatic drugs, in plasma.
J.Chromatogr., 614 (1993), 253 - 259.

- [212] T.Cerny, A.Küpfer, Stabilization and quantitative determination of the neurotoxic metabolite chloroacetaldehyde in the plasma of ifosfamide treated patients.
In : Proceedings of the fifth European Conference on clinical Oncology, London (1989), 147.
- [213] M.A.Bedell, M.C.Dyroff, G.Doerjer, J.A.Swenberg, Quantification of etheno adducts by fluorescence detection.
IARC Sci. Publ., 70 (1986), 425 - 436.
- [214] R.E. Sotomayor, M.C.Washington, Formation of etheno and oxoethyl adducts in liver DNA from rats exposed subchronically to urethane in drinking water and ethanol.
Cancer Letters 100 (1996), 155-161.
- [215] Q.Yang, M.Hergenbahn, A.Weninger, H.Bartsch, Cigarette smoke induces direct DNA damage in the human B-lymphoid cell line Raji.
Carcinogenesis, 20 (1999), 1769-1775.
- [216] O.Miro, J.R.Alonso, D.Jarreta, J.Casademont, A.Urbano-Marquez, F.Cardellach, Smoking disturbs mitochondrial respiratory chain functions and enhances lipid peroxidation on human circulating lymphocytes.
Carcinogenesis, 20 (1999), 1331-1336.
- [217] H.C.Lee, M.L.Lim, C.Y.Lu, V.W.Liu, H.J.Fahn, C.Zhang, P.Nageley, Y.H.Wei, Concurrent increase of oxidative DNA damage and lipid peroxidation together with mitochondrial DNA mutation in human lung tissues during aging – smoking enhances oxidative stress on the aged tissues.
Arch. Biochem. Biophys., 362 (1999), 309-316.
- [218] R.L.Levine, I-Y.Yang, M.Hossain, G.A.Pandya, A.P.Grollman, M.Moriya, Mutagenesis induced by a single 1,N⁶-Ethenoadenosine adduct in human cells.
Cancer Res., 60 (2000), 4098 - 4104.
- [219] A.A.Morley, D.R.Turner, The contribution of exogenous and endogenous mutagens to in vivo mutations.
Mutat. Res., 428 (1999), 11 - 15.

Veröffentlichungen

Publikationen

B.Zielinski, M.Hergenhahn; 2-chloroacetaldehyde induces ϵ dA DNA adducts in DNA of Raji cells as demonstrated by an improved HPLC/fluorimetry method.
Zur Publikation akzeptiert von Fresenius Journal of Analytical Chemistry

B.Zielinski, H.Bartsch, M.Hergenhahn; Spontaneous and 2-chloroacetaldehyde-induced A→G mutations in a mitochondrial hot spot region as studied by a new solid-phase version of the Restriction Site Mutation (RSM) Assay.
Manuskript in Vorbereitung

Vorträge

" Aspects of DNA-Adducts " ; 3. Graduiertenforum des DKFZ
Schmittchen-Oberreifenberg / Taunus ; 25. - 27. April 1999

" Role of etheno-DNA-Adducts in Carcinogenesis " ; 10th Swiss Workshop on Genetic Recombination and DNA Repair
Les Diablerets / Schweiz ; 19. - 20. Oktober 2000

Poster

10th AEK-Symposium, Heidelberg, 24.-26. März 1999
B.Zielinski, J.Nair, P.Goelzer, M.Hergenhahn, H.Bartsch; An improved HPLC/fluorimetry method for determination of chloroacetaldehyde - induced ϵ dA adducts in Raji cells.
J.Cancer Res. Clin. Oncol., 125 (1999) K41 (suppl.)

Curriculum Vitae

Zur Person

Boris Alejandro Zielinski,
geboren am 29.08.1967
in Guayaquil / Ecuador
Diplom Chemiker, ledig

Schul Ausbildung

1974 - 1977	Grundschule Bad Vilbel
1977 - 1979	Carstenn Grundschule Berlin - Lichterfelde
1979 - 1985	Kurpfalz Gymnasium Schriesheim
1985 - 1988	Albertus Magnus Schule Viernheim
20.06.1988	Abitur an der Albertus Magnus Schule Viernheim

Studium

10/1988 - 04/1989	Studium der Betriebswirtschaft an der Universität Mannheim
10/1989 - 07/1997	Studium der Chemie an der Ruprecht-Karls-Universität in Heidelberg
02/1993	Diplom Vorprüfung
06/1996 - 05/1997	Diplomarbeit an der Bundesforschungsanstalt für Ernährung in Karlsruhe mit dem Thema : " Einfluß von hydrostatischem Hochdruck auf die Autoxidation von Öl- und Linolsäure "
07/1997	Diplom Hauptprüfung
08/1997 - 09/1997	Molekularbiologisches Praktikum am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg
seit 11/1997	Doktorarbeit am Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg mit dem Thema : " Zur Bedeutung von etheno-DNA-Addukten in der Karzinogenese : ihre genspezifische Induktion und Reparatur "

Erklärung :

Ich erkläre hiermit an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit eigenhändig durchgeführt habe und keine anderen als die in der Arbeit angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Schriesheim, den 24.11.2000

Boris Zielinski