

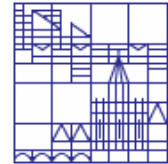


**Automatisierte Quantifizierung von DNA-Schädigung und
DNA-Reparatur und deren Anwendung in der genetischen
Toxikologie und Altersforschung**

DISSERTATION

María Moreno-Villanueva

Universität Konstanz
Fachbereich Biologie



Automatisierte Quantifizierung von DNA-Schädigung und DNA-Reparatur und deren Anwendung in der genetischen Toxikologie und Altersforschung

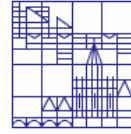
**Dissertationsschrift zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. rer. nat.**

Vorgelegt von
María Moreno-Villanueva

Universität Konstanz
Fachbereich Biologie

17. Dezember 2007

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Februar 2008
Referenten:
Prof. Dr. med Alexander Bürkle (Gutachter und Prüfer)
Prof. Dr. med Werner Hofer (Gutachter und Prüfer)
Prof. Dr. Dr. med Thomas Hartung (Prüfer)



Widmung



*Die Wahrheit steckt in der Welt des Lichtes,
das Licht schläft in unserer Phantasie,
sein Aufwachen benötigt die Kraft des Sinnes,
Ideen fließen ins Meer des Wissens
und komponieren die schönste Melodie.*

*Die Noten des Unbekannten darfst du laut singen,
die anderen pfeifen stolz die scheinbare Realität,
sie lassen sich die einfache Zukunft bringen,
und während sie glauben, mit ihrer Musik zu siegen,
ist Deine Melodie die wertvolle Rarität.*

Bild: Faro del Estacio, La Manga der Mar Menor (Spanien). Rekonstruiert von Dipl.-Ing. J. R. Moreno Farinós im Jahr 1974 (Foto: Rachel MacKay, 2007). **Gedicht:** „*Die Worte meines Vaters ... über Forschung*“. Gedichtet von M. Moreno-Villanueva im Mai 2003.

Diese Arbeit ist meinen Eltern José Ramón und Elda und meinen Schwestern Elda und Lydia von ganzem Herzen gewidmet

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	1
2. Zusammenfassung	5
3. Einleitung	6
3.1 DNA: Molekül des Lebens	6
3.1.1 Von Nukleotinsäuren zum menschlichen Genom	6
3.1.2 DNA als Informationsträger	7
3.1.3 DNA: Struktur und Eigenschaften	7
3.2 DNA-Schäden	9
3.2.1 Endogene DNA-Schäden	10
3.2.1.1 Desaminierung und Depurinierung	10
3.2.1.2 Oxidation von Basen	11
3.2.1.3 Methylierung	11
3.2.2 Exogene DNA-Schäden	12
3.2.2.1 Strahlen	12
3.2.2.2 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	13
3.2.2.3 Alkylierende Agenzien	13
3.2.2.4 Endotoxine: Lipopolysaccharide (LPS)	14
3.2.2.5 Krebs-Chemotherapeutika	14
3.2.2.5.1 DNA-Interkalatoren	14
3.2.2.5.2 „Crosslinker“	15
3.2.2.5.3 Topoisomerase-Inhibitoren	15
3.2.2.5.3.1 Camptothecin	15
3.2.2.5.3.2 Etoposid	16
3.2.2.6 Labor-Chemikalien	16
3.3 DNA-Reparatur-Mechanismen	17
3.4 Methoden zur Messung von DNA-Strangbrüchen und DNA-Reparatur	19
3.4.1 γ -H2AX-Immunfluoreszenz-Assay	19
3.4.2 Alkalische Filterelution	20
3.4.3 Alkalische Sucrosegradienten-Sedimentation	20
3.4.4 Alkalische Mikroelektrophorese (Comet-Assay).....	20
3.4.5 FADU-Assay	22

3.5 Zink (Zn²⁺)	23
3.5.1 Verteilung im Körper	24
3.5.2 Biologische Bedeutung von Zink	25
3.5.3 Zinkmangel	25
3.5.4 Zinkvergiftung	25
3.5.5 Zink im Alter	26
4. Material und Methoden	27
4.1 Material	27
4.1.1 Zellen	27
4.1.2 Fertig-Medien und Medienzusätze	27
4.1.3 Medienzusammensetzung	27
4.1.4 Chemikalien	28
4.1.5 Puffer und Lösungen	29
4.1.6 Labor-Geräte	30
4.1.7 Auswertungsprogramme	32
4.1.8 Verbrauchsmaterialien	32
4.1.9 Laborzubehör	33
4.2 Methoden	34
4.2.1 Zellkultur	34
4.2.1.1 Suspensionszellen	34
4.2.1.2 Adhärente Zellen	34
4.2.1.3 Humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC)	35
4.2.1.4 Auftauen von Zellen	35
4.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl	36
4.2.1.6 Einfrieren von Zellen	36
4.2.2 FADU (<i>Fluorimetric analysis of DNA unwinding</i>)	36
4.2.2.1 Schädigung	36
4.2.2.2 Reparatur	37
4.2.2.3 Messung der DNA-Strangbrüche	37
4.2.2.4 Detektion des Fluoreszenzsignals	41
4.2.2.5 Waschprotokoll für die Platten	41
4.2.2.6 Waschprotokoll der Roboter-Behälter	41
4.2.3 Immunfluoreszenz	41
4.2.3.1 Vorbereitung	41

4.2.3.2 Schädigung und Reparatur	42
4.2.3.3 Immunfluoreszenz	42
4.2.4 <i>Cell survival assay</i>	42
4.2.5 Mikrogelelektrophorese (<i>Comet Assay</i>)	43
5. Ergebnisse	43
5.1. Kapitel 1 Weiterentwicklung des automatisierten <i>fluorimetric analysis of DNA unwinding</i> (FADU)-Assays	44
5.1.1 Einbau von neuen Modulen	45
5.1.1.1 Eisbox für Eppendorfs-Reaktionsgefäße	45
5.1.1.2 Temperiermodul	46
5.1.2 Erhöhung der Empfindlichkeit	47
5.1.3 Optimierung von Protokollen	53
5.1.4 Messung von kryopräservierten humanen mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut	59
5.2 Kapitel 2 Validierung des neuen automatisierten FADU-Assays zur Dekektion von DNA-Strangbrüche und ihrer Reparatur in verschiedenen Zellsytemen	60
5.2.1 Einleitung zum Versuchsaufbau	61
5.2.2 Induktion von DNA-Strangbrüche	61
5.2.3 Reparatur der DNA-Strangbrüche	66
5.3 Kapitel 3 Anwendung der neuen FADU-Methode zur Untersuchung der Rolle von Zink in der DNA-Reparatur	76
5.3.1 Einleitung	77
5.3.2 Genotoxizität von Zink	77
5.3.3 Einfluss von Zink auf die DNA-Reparatur in Jurkat-Zellen	78
5.3.4 Auswirkung von FCS auf die Inhibition der DNA-Reparatur durch Zink	80
5.3.5 Einfluss von Zink auf die Reparatur in humanen PBMC	82
5.3.6 Einfluss von Medium auf die DNA-Reparatur in humanen PBMC	83
5.3.7 DNA-Strangbrüche und ihre Reparatur in Spendereigenem Plasma	84
5.3.8 Zink und DNA-Reparatur in spendereigenem Plasma	85
5.3.9 Zusammenfassung	86
5.4 Kapitel 4 Anwendung der neuen FADU-Methode zur spezifischen Charakterisierung von DSB-Reparatur defizienter Zelllinien	88
5.4.1 Einleitung	89

5.4.2 <i>Cell survival assay</i>	90
5.4.3 Automatisierter FADU-Assay	90
5.4.4 γ -H2AX-Immunfluoreszenz-Assay	91
5.5 Kapitel 5 Der automatisierte FADU-Assay im Vergleich mit dem Comet-Assay _____	95
6. Diskussion _____	101
6.1 Weiterentwicklung des automatisierten <i>fluorimetric analysis of DNA unwinding</i> (FADU)-Assays _____	101
6.1.1 Verbesserung der Empfindlichkeit	101
6.1.2 Entwicklung von neuen Modulen	101
6.1.3 Bedeutung von P0-Werten	102
6.1.4 Optimierung von Protokollen	103
6.2 Validierung des neuen automatisierten FADU-Assays zur Dekektion von DNA-Strangbrüche und ihrer Reparatur in verschiedenen Zellsytemen _____	104
6.2.1 Messung von DNA-Strangbrüchen	104
6.2.2 Messung von DNA-Reparatur	106
6.3 Anwendung der neuen FADU-Methode zur Untersuchung der Rolle von Zink in der DNA-Reparatur _____	107
6.4 Anwendung der neuen FADU-Methode zur spezifischen Charakterisierung von DSB-Reparatur defizienter Zelllinien _____	109
6.5 Der automatisierte FADU-Assay im Vergleich mit dem Comet-Assay __	110
7. Literaturverzeichnis _____	113
8. Abkürzungen _____	122
9. Danksagung _____	124

2. Zusammenfassung

In Vorarbeit war es gelungen, den *Fluorometric analysis of DNA unwinding* (FADU)-Assay zu automatisieren und mit Hilfe dieses Messverfahrens DNA-Strangbrüche mit einer hohen Reproduzierbarkeit und Empfindlichkeit (0,4 Gy Röntgenstrahlung) zu detektieren (Diplomarbeit Moreno-Villanueva, 2004).

In der vorliegenden Arbeit werden nun folgende Sachverhalte beschrieben: (1) eine Verbesserung der Empfindlichkeit auf bis zu 0,16 Gy Röntgenstrahlung; (2) eine Erhöhung des Probendurchsatzes auf das Dreifache; (3) die Validierung des Assays anhand eines breiten Spektrums von chemischen genotoxischen Agenzien mit unterschiedlichen Angriffspunkten; (4) die Optimierung von Protokollen zur Messung von DNA-Schädigung in mitochondrialer DNA bzw. in Vogel-Erythrozyten, (5) die Etablierung experimenteller Bedingungen zur Erfassung der DNA-Reparatur sowie (6) der Vergleich der neuen Methode mit dem bisherigen „Goldstandard“, dem Comet-Assay.

Insbesondere konnte gezeigt werden, dass mit dem verbesserten FADU-Assay DNA-Schäden, die durch sehr niedrige, nicht-zytotoxische Dosen verursacht werden, in mehreren Zellsystemen bereits erfasst werden können. Es wurde außerdem gezeigt, dass sich dieser Assay zur Messung der frühen Phase der DNA-Reparatur besonders gut eignet und dass die DNA-Reparatur durch das Fehlen von fötalem Kälberserum (FCS) bzw. von Zink gehemmt wird. Des Weiteren wurden Reparatorexperimente an humanen peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) von gesunden Spendern durchgeführt und es wurde dabei nachgewiesen, dass die Reparatur vom Nährmedium abhängt. Es wurde außerdem anhand von Messungen des Reparaturverlaufs in 5-Minuten-Abständen gezeigt, dass der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-Inhibitor 3-Aminobenzamid (3-AB) die DNA-Strangbruch-Reparatur signifikant verzögert. Zuletzt konnte gezeigt werden, dass der FADU-Assay geeignet ist, die zeitliche Überlagerung von DNA-Schädigung und DNA-Reparaturprozessen aufzulösen.

Mit den hier erzielten Ergebnisse wird also ein neues, robustes und anwenderfreundliches Werkzeug bereitgestellt, welches breite Einsatzmöglichkeiten für die biologische Grundlagenforschung, die Toxikologie, die Arzneimittelforschung, die Lebensmittelforschung sowie für die Altersforschung und Präventivmedizin bietet.

3. Einleitung

3.1 DNA: Molekül des Lebens

3.1.1 Von Nukleinsäuren zum menschlichen Genom

Friedrich Miescher entdeckte die Nukleinsäure 1869, aber die DNA (engl.: *deoxyribonucleic acid*, Desoxyribonukleinsäure) wurde das erste Mal im Jahr 1919 von Phoveus Levene in der wissenschaftlichen Literatur beschrieben. Demnach ist dieses Molekül ein Teil der Chromosomen und besteht aus vier Basen, Zuckermolekülen und Phosphaten. In seiner Publikation (Levene, 1919) im *Journal of Biological Chemistry*, „The Structure of Yeast Nucleic Acid“, beschreibt er die Isolierung und Charakterisierung der DNA von Hefen. 1928 legte der englische Arzt Frederick Griffith die Grundlage für den Chemiker Oswald Avery, der 1943 unmissverständlich zeigte, dass in bestimmten Bakterien die DNA für die Vererbung von Information verantwortlich ist (Oswald *et al.*, 1943). Die Wissenschaftler glaubten aber bis Anfang der fünfziger Jahre, die Proteine seien die Erbinformationsträger; erst 1952 bewies der Mikrobiologe Alfred Hershey, dass die Proteine bestimmter Viren für deren Vermehrung keine Rolle spielen, sondern die DNA (Hershey *et al.*, 1952). Acht Jahre später erhielten James Watson, Francis Crick und Rosalind Franklin den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für die Aufklärung der Struktur der DNA: die berühmte Doppelhelix (Watson und Crick, 1953). Linus C. Pauling hatte 1948 („Molecular Architecture and the Processes of Life“) die Idee der Replikation der DNA ans Licht gebracht (Meselson, 2004); Mathew Meselson und Frank W. Stahl griffen darauf zurück, bestätigten 1958 die Aussage von Watson und Crick und klärten die semikonservative Replikation der DNA auf (Meselson und Stahl, 1958). Im Jahr 1965 enthielten François Jacob, Jacques Monod und André Lwoff den Medizin-Nobelpreis für die Aufklärung der Genregulation (Cohen, 1995), und während der Jahre 1961 bis 1966 entzifferten Marshall Nirenberg und Heinrich Matthaei den genetischen Code (Nirenberg, 1968). Sydney Brenner, François Jacob und Matthew Meselson entdeckten 1961 die mRNA (Brenner *et al.*, 1961). Dank der Arbeit von Werner Arber, Daniel Nathans und Hamilton O. Smith (Nobelpreis für Medizin 1978) mit Restriktionsenzymen (Smith *et al.*, 1970) gelang es dem Amerikaner Paul Berg als Erstem, das Zusammensetzen von Genen verschiedener Organismen, das Erstellen von heute so genannter rekombinanter DNA (Goff *et al.*, 1976). 1976 klonierten Tom Maniatis und seine Mitarbeiter die erste cDNA (Efstratiadis *et al.*, 1976). Ein Jahr später entdeckten Richard J. Roberts und Phillip A. Sharp das RNA-Splicing (Berget

et al, 1977), und Frederick Sanger (Sanger *et al*, 1977), Walter Gilbert und Paul Berg entwickelten Sequenzierungsmethoden, wofür sie 1980 den Nobelpreis für Chemie erhielten. 1993 erhielt Kary B. Mullis ebenso den Nobelpreis für Chemie für die Entwicklung der PCR (engl. *polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion) im Jahr 1983 (Saiki *et al*, 1988). Die erste Gentherapie begann 1990 mit der 4-jährigen Patientin Ashanti da Silva. 1991 erfand Craig Venter eine automatische Methode zur Durchführung der Gensequenzierung, die „Expressed Sequence Tags“ (EST), und publizierte 1995 das Genom von *Mycoplasma genitalium* (Fraser *et al*, 1995). Im selben Jahr erschien die Publikation von Patrick Brown über die DNA-Microarrays, eine Methode zur Untersuchung der Genexpression vieler Gene gleichzeitig (Schena, *et al* 1995). Das menschliche Genom wurde 2001 publiziert (Venter *et al*, 2001), allerdings nicht lückenfrei, das Projekt wurde offiziell erst 2003 abgeschlossen; 2006 veröffentlichte *Nature* in einer speziellen „Human Genome Collection“ eine Sammlung von Publikationen zur Sequenzierung jedes Chromosoms.

3.1.2 DNA als Informationsträger

Die sichtbaren Eigenschaften eines Organismus bezeichnet man als Phänotyp, und die genetischen Faktoren, die dafür verantwortlich sind, nennt man Genotyp. Der Satz von Genen eines Individuums repräsentiert seinen Genotyp, jedes Gen besteht aus einer Sequenz von Basen, die im Allgemeinen für eine Abfolge von Aminosäuren und damit für ein bestimmtes Protein codieren. Die Eigenschaften der Gene wurden von Gregor Mendel vor mehr als 100 Jahren beschrieben; er bezeichnet die Gene als „Elemente“ die unverändert an die Tochtergeneration weitergegeben werden. 1941 entwickelten George Beadle und Edward Tatum die „Ein-Gen-ein-Enzym-Hypothese“ (Beadle *et al*, 1941), die besagt, dass jeweils 1 Gen für die Bildung 1 Enzyms verantwortlich ist. Sie erhielten dafür 1958 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin. Den Beweis, dass tatsächlich ein Gen ein bestimmtes Protein codiert, erbrachte Vernon M. Ingram 1957 (Ingram, 1957), allerdings wurde die „Ein-Gen-ein-Enzym-Hypothese“ zur „Ein-Gen-ein-Protein-Hypothese“ modifiziert. Heute wissen wir, dass durch das alternative Spleißen ein Gen unterschiedliche Proteine codieren kann, die regulatorischen Mechanismen hierfür sind aber noch nicht vollständig geklärt.

3.1.3 DNA: Struktur und Eigenschaften

Die DNA ist ein fadenförmiges Molekül (Polymer) aus vielen Nukleotiden. Jedes Nukleotid besteht aus einer von vier Basen (Thymin, Adenin, Cytosin oder Guanin), einer

Phosphatgruppe und einem Zuckermolekül (Desoxyribose). Ein DNA-Molekül besteht aus zwei Einzelnukleotidketten (Doppelhelix). Phosphodiestergruppen verbinden die Mononukleotide eines Einzelstranges, und die Basen verbinden die zwei Einzelstränge durch Wasserstoffbrücken (Abb. 1).

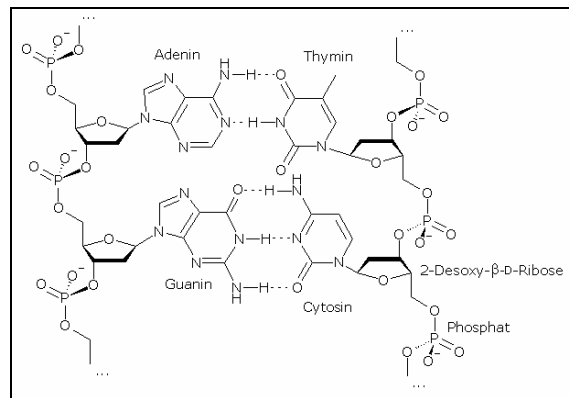


Abb. 1 Schematische Darstellung eines DNA-Abschnittes (<http://de.wikipedia.org>)

Die Sekundärstruktur der DNA, die Doppelhelix, wird durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen benachbarten Basenpaaren stabilisiert, und die Phosphatgruppen geben der DNA die negative Ladung. Die DNA ist unter neutralen pH-Bedingungen negativ geladen, manche molekularbiologische Methoden machen sich dieser Eigenschaft zu Nutze, wie zum Beispiel die Agarose-Gelelektrophorese, bei der die DNA in Stücken nach ihrer Größe getrennt wird (Adkins *et al.*, 1996).

Eine andere sehr wichtige Eigenschaft der DNA ist die Möglichkeit zu „Denaturieren“, d.h. zur Separation der Einzelstränge, die zuvor eine Doppelhelix ausgebildet hatten. Dies kann unter anderem durch eine Temperaturerhöhung erfolgen. Die Basen Adenin und Thymin sind durch zwei und Cytosin und Guanin durch drei Wasserstoffbrücken verbunden; deshalb haben DNA-Abschnitte mit reichem Guanin-Cytosin-Gehalt einen höheren Schmelzpunkt. Die Temperatur, bei der die Hälfte der DNA einzelsträngig vorliegt, nennt man T_m , fällt die Temperatur unter die T_m , lagern sich die Einzelstränge wieder aneinander. Das Schmelzen der Einzelstränge nennt man Hybridisierung oder Denaturierung und das Wiederaneinanderlagern Rehybridisierung oder Renaturierung. Die Zugabe von Alkali ist andere Möglichkeit, die DNA zu denaturieren, dabei werden der DNA die Protonen für die Bildung der Wasserstoffbrücken entzogen, so reichen die Kräfte nicht mehr aus, um die negative Abstoßung des Zucker-Phosphat-Rückgrates zu kompensieren, und die Stränge gehen auseinander. Diese Eigenschaft ist die Grundlage mehrerer analytisch-präparativer Methoden wie Plasmid-Isolation (Liou *et al.*,

1999), Southern Blot (Southern, 1975), *in-situ*-Hybridisierung (Gall *et al.*, 1969), alkalische Sucrose-Gradienten-Sedimentation (McGrath *et al.*, 1996), alkalische Entwindung (Ahnström *et al.*, 1974), alkalische Filterelution (Kohn, 1996) und alkalische Mikroelektrophorese (Singh, 2000). Die DNA besitzt auch die Eigenschaft, UV-Licht zu absorbieren. Die heterozyklischen Ringe der Nukleotide absorbieren mit einem Maximum bei etwa 260 nm, wobei die Absorption einzelsträngiger DNA ist etwa 2x höher als die von doppelsträngiger DNA ist. Die Denaturierung der DNA lässt sich dank dieser Eigenschaft in einem Photometer verfolgen.

3.2 DNA-Schäden

Die eukaryontische Zelle wird mit mehr als 50.000 DNA-Schäden pro Tag konfrontiert. Diese können sehr vielgestaltig sein. Sie können in der Zelle spontan auftreten („endogene DNA-Schäden“, z.B. Desaminierung und Depurinierung, Oxidation der Basen, Methylierung) oder durch physikalische Einwirkungen wie Bestrahlung mit UV- oder ionisierenden Strahlen, durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), chemische Substanzen inklusive Nahrungsbestandteile oder Medikamente (Chemotherapie), bzw. durch Mikroorganismen induziert werden („exogene DNA-Schäden“). Prinzipiell können DNA-Schäden repariert werden. Unreparierte bzw. unzureichend reparierte Schäden führen zu Mutationen, Transkriptions- und Replikationsblock, Apoptose, Nekrose, chromosomale Aberrationen, DNA-Amplifikationen, Mutationen, Verlust der Zellteilungskontrolle (Krebs) und Missbildungen beim Embryo/Feten (Teratogenese). Außerdem können DNA-Schäden in den Keimzellen zu erblichen Syndromen führen (Abb.2).

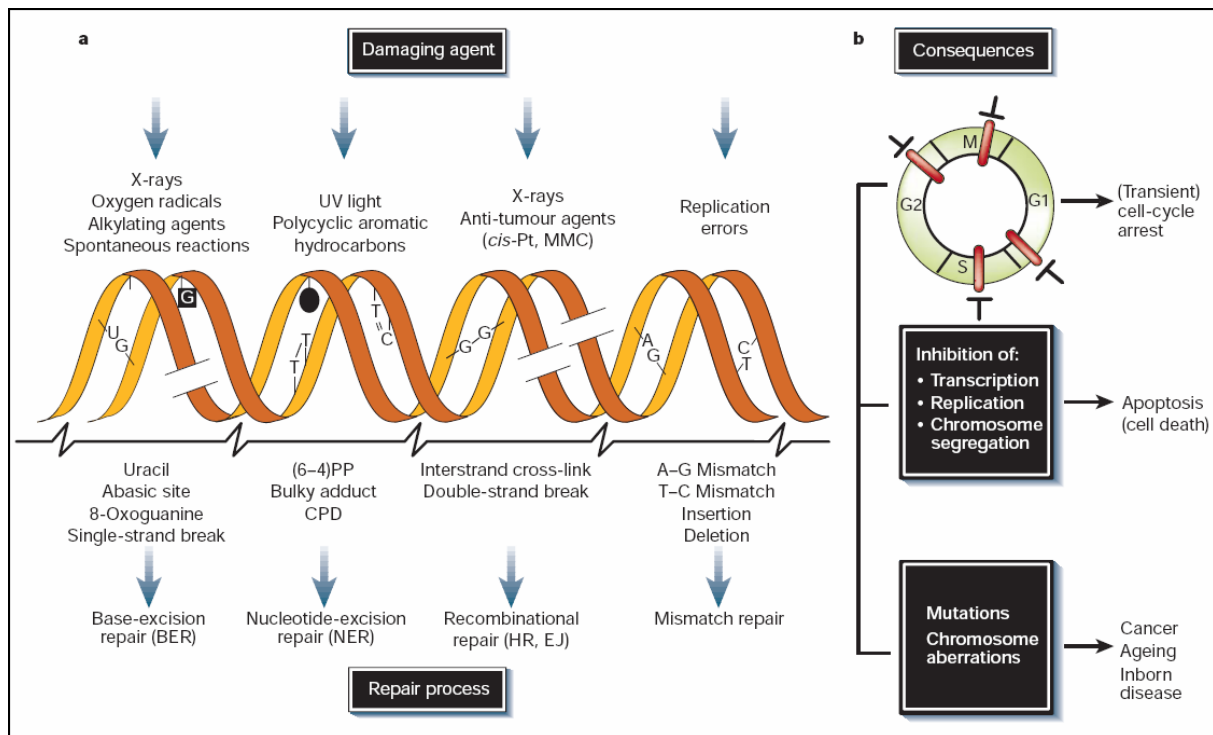


Abb. 2 DNA-Schäden: Mechanismen und Folgen. **a**, Beispiele für genotoxische Agenzien (oben), die von ihnen induzierten DNA-Schäden (Mitte) und die Reparaturmechanismen, um sie zu beseitigen (unten). **b**, Folgen der DNA-Schäden: Zellzyklusarrest (oben), Apoptose (Mitte) und Altern oder Krebs (unten). (Hoeijmakers, 2001)

3.2.1 Endogene DNA-Schäden

3.2.1.1 Desaminierung und Depurinierung

Die Deaminierung von DNA-Basen und die Depurinierung von DNA sind zwei chemische Reaktionen, die in der Zelle spontan, d.h. nicht-enzymatisch ablaufen können. Bei der Desaminierung handelt es sich um die Abspaltung einer Aminogruppe (-NH₂); so wird Cytosin in Uracil umgewandelt bzw. 5-Methylcytosin in Thymin. Uracil ist keine DNA-Base, sondern ist Bestandteil von RNA. Thymin ist hingegen eine DNA-Bases, paart sich jedoch nicht mit Guanin (wie Cytosin), sondern mit Adenin. Bei der Depurinierung wird die glykosidische Bindung zwischen Purin-Base und Desoxyribose hydrolytisch getrennt und es entsteht eine apurinische/apyrimidinische Stelle (AP-Läsion). Es wird geschätzt, dass durch spontane Basenhydrolyse täglich bis zu 10.000 AP-Stellen in der DNA einer Zelle entstehen (Aktories *et al*, 2005)

3.2.1.2 Oxidation von Basen

Hydroxyl-Radikale werden als die wichtigsten chemischen Agenzien angesehen, welche eine DNA-Schädigung durch Oxidation vermitteln. Diese entstehen in der Zelle unter anderem aus Superoxid, einem Nebenprodukt der Atmungskette, welches zu Wasserstoffperoxid weitermetabolisiert wird. Die wichtigste und am häufigsten auftretende Basenveränderung ist die Oxidation von Guanin. Durch den Angriff von OH^\bullet auf das C8 des Guanins entsteht 8-Oxo-Guanin (Abb.3); dieses paart sich während der Replikation bevorzugt mit Adenin (über Hoogsteen-Basenpaarung) – und nicht nur mit Cytosin – und kann Transversionen verursachen (G:C \rightarrow T:A).

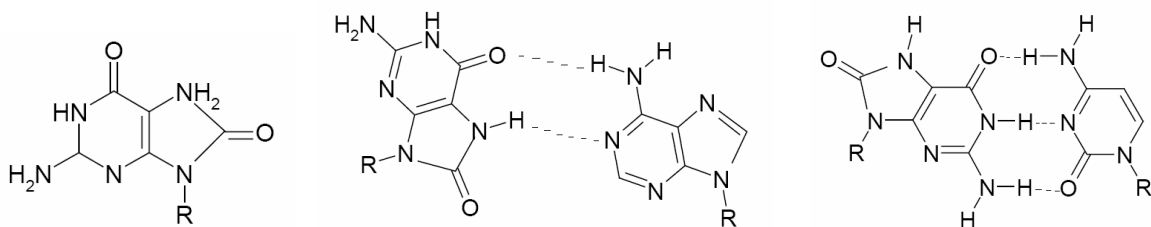


Abb. 3 8-Oxo-Guanin (links) paart sich mit Adenin (Mitte) oder mit Cytosin (rechts). (<http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/05/06H008/t2.pdf>)

3.2.1.3 Methylierung

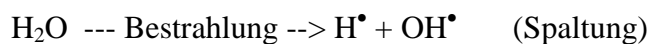
Die Methylierung ist ein natürlicher Prozess der Zelle mit einer regulatorischen Funktion. In humanen Zellen überträgt das Enzym DNA-Methyltransferase eine Methylgruppe an Cytosinreste in CG-Dinukleotiden, es entsteht 5-Methyl-Cytosin. Die Methylierung der DNA dient in eukaryontischen Zellen dem Ausschalten von Genen und damit der Regulation der Genexpression.

Eine pathologische Wirkung hat die Methylierung, wenn Genabschnitte hyper- oder hypomethyliert werden, dadurch werden Genen aktiviert, die inaktiv bleiben sollten und umgekehrt. Die Mechanismen der DNA-Methylierung sind in Tumoren häufig verändert. Die lokale Hypermethylierung führt zu einer Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, während eine globale Hypomethylierung eine Aktivierung von schädlichen DNA-Elementen bewirkt, die eine Destabilisierung des Genoms zur Folge haben kann (Johnen *et al*, 2007).

3.2.2 Exogene DNA-Schäden

3.2.2.1 Strahlen

Man unterteilt energiereiche und ionisierende Strahlen in elektromagnetische (UV-, Röntgen-, Gamma-) und korpuskulare (α -, β -, Höhen-) Strahlen. Die Energiedosis ionisierender Strahlen mit der Einheit Gray ($\text{Gy} = \text{J/kg}$) gemessen. Die Strahlenwirkung manifestiert sich auf zweierlei Weise: direkte und indirekte Wirkung. Unter direkter Strahlenwirkung versteht man physikalische Ereignisse der Strahlungsabsorption, die über intramolekulare Reaktionen zu Änderungen von Struktur und Funktion eines Moleküls führen. Die indirekte Wirkung ist auf chemische Wechselwirkung mit freien Radikalen zurückzuführen, die im Zuge der sogenannten Radiolyse des Wassers in wässriger Umgebung entstehen:



Diese Radikale verursachen schwere Schäden an der DNA. Pro 100 eV absorbiertes Energie werden etwa 4 Wassermoleküle zerstört (Adam, Läger, Stark, 1995).

Wird DNA in wässrigem Milieu bestrahlt, wird zumeist nur ein Nukleotidstrang der DNA durch ein Radikal angegriffen; es entstehen primär Einzelstrangbrüche. Nur wenn zufällig Einzelstrangbrüche auf den beiden Strängen gegenüber (oder wenige Nukleotide voneinander entfernt) liegen, kommt es zu einem Doppelstrangbruch (Mitzel-Landbeck und Hagen, 1976).

Aus Versuchen an Ratten ergibt sich als Abschätzung, dass durch Bestrahlung mit 3 Gy im Genom einer diploiden Zelle etwa 1.000 Einzelstrangbrüche und etwa 60 Doppelstrangbrüche erzeugt werden (Mitzel-Landbeck und Hagen, 1976).

Bei der UV-Schädigung von DNA handelt es sich um eine photoinduzierte Cycloaddition, das heißt durch die Aufnahme eines Lichtquants wird die Doppelbindung zwischen dem C5- und dem C6-Atom von zwei benachbarten Thymin-Basen aufgehoben und es bilden sich zwischen den C5- und den C6-Atomen der beiden Moleküle Einzelbindungen aus. Die entstehenden Thymin-Dimere verursachen eine gravierende Strukturänderung in der DNA und blockieren somit die Replikation und Transkription an diesen Stellen.

3.2.2.2 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Oxidativer Stress wird durch ROS (*reactive oxygen species*) ausgelöst. Zu den ROS gehören radikalische (wie das Hydroxyl-Radikal OH^\bullet) sowie nicht radikalische Sauerstoffspezies (z.B. H_2O_2). Endogen entstehen ROS aus normalen oxidativen Stoffwechselreaktionen. Abgesehen von Protein- und Lipidoxidation finden in der Zelle Reaktionen der ROS mit der DNA statt. Bis heute sind über 100 verschiedene DNA-Modifikationen identifiziert worden (Hoeijmakers, 2001). Außerdem tragen exogene Faktoren zu erhöhten Konzentrationen an reaktiven Sauerstoffspezies bei, z.B. elektromagnetische Strahlung, UV-Strahlung, Umwelttoxinen, einige Stoffe in der Nahrung sowie chemische Substanzen wie z. B. Morpholinosydnomine (SIN-1) (Abb.4). SIN-1 geht in wässriger Lösung unter Ringöffnung in N-Morpholino-N-nitrosoaminoacetonitril (SIN-1A) über, das Stickstoffmonoxid (NO) unter Sauerstoffbeteiligung spontan freisetzt (Feelisch, 1998). NO reagiert mit Superoxid, und es entsteht Peroxynitrit (ONOO^-), welches oxidative DNA-Schäden (Burney *et al*, 1999) und DNA-Strangbrüche (Szabó *et al*, 1996) induziert.

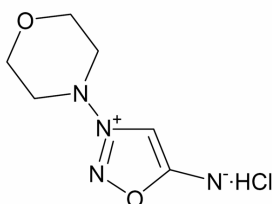


Abb. 4: Strukturformel von Morpholinosydnimine (SIN-1) (<http://www.biomoleurope.com/SiteData/docs/productdata/CN245.pdf>)

3.2.2.3 Alkylierende Agenzien

Alkylierende Agenzien sind allgemein organische Verbindungen, die Alkylgruppen auf andere Verbindungen übertragen können. Zu dieser Gruppe chemischer Substanzen gehören Senfgas (Stickstoff- und Schwefelost), Epoxide, α -Chlorether, Dialkylsulfate und N-Nitrosamine und -Nitrosamide (MNNG, MMS) (Abb.5). Nitrosamine zerfallen in Wasser spontan zu Diazohydroxiden und Carbokationen und können mit N- oder O-Atomen in der DNA reagieren, wobei das Ausmaß der Bildung von Sauerstoffalkylierungen, wie z.B. O^6 -Alkylguanin, nicht mehr als 8 % der gesamt-Alkylierung der DNA beträgt (Aktories, 2005).

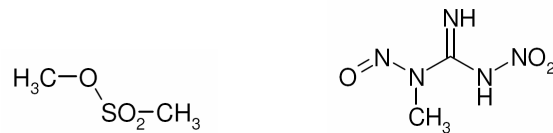


Abb. 5 Strukturformeln von MMS, Methylmethansulfonat (links) und MNNG, N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitroso-Guanidin (rechts) (http://deposit.ddb.de/cgi-bin/dokserv?idn=983173699&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=983173699.pdf)

Ein Sonderfall der Alkylierung ist die Methylierung. Durch das Anfügen einer zusätzlichen Methylgruppe an Guanin entsteht eine geradezu „klassisch“ zu nennende DNA-Schädigung, nämlich O⁶-Methylguanin. Diese macht zwar nur 8 % der Gesamtalkylierung aus, stellt aber aufgrund der ausgeprägten Fehlpaarungseigenschaften mit Thymin eine wichtige prämutagene Läsion dar (Aktories *et al.*, 2005).

3.2.2.4 Endotoxine: Lipopolysaccharide (LPS)

Lipopolysaccharide (LPS) sind relativ thermostabile Verbindungen aus lipophilen fettähnlichen (Lipo) und hydrophilen Zucker-Bestandteilen (Polysacchariden) der Zellmembran Gram-negativer Bakterien. Beim Zerfall der Bakterien werden Teile davon freigesetzt und aktivieren das Immunsystem; diese Teile bezeichnet man als Endotoxine. Sie gehören zu den pyrogenen (Fieber erzeugenden) Substanzen und stimulieren Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Thrombozyten und Endothelzellen. Die Aktivierung der Immunzellen induziert DNA-Strangbrüche (Hoyt *et al.*, 1996) und Apoptose (Bannerman *et al.*, 2003).

3.2.2.5 Krebs-Chemotherapeutika

3.2.2.5.1 DNA-Interkalatoren

DNA-Interkalatoren sind flache aromatische Ringsysteme, die sich zwischen Basenpaaren „einschieben“ können. Durch ihre positive Ladung erfolgt zunächst die schnelle Bindung an das DNA-Rückgrat, und in einem zweiten Schritt erfolgt die Interkalation. Der Komplex Interkalator–DNA wird durch nicht-ionische Wechselwirkungen stabilisiert. Eine ganze Reihe von Interkalatoren wird in der Chemotherapie zur Krebsbehandlung eingesetzt (Wheate *et al.*, 2007). Manche Interkalatoren besitzen außerdem funktionale Gruppen, die DNA-Strandbrüche

induzieren und die DNA zusätzlich schädigen, wie z.B. das Antibiotikum Bleomycin (Aktories *et al.*, 2005).

3.2.2.5.2 „Crosslinker“

Manche Substanzen reagieren mit zwei verschiedenen Positionen der DNA und führen zu einer Quervernetzung (Crosslink). Dies kann innerhalb desselben Stranges (Intrastrang-Crosslinks) oder zwischen beiden Strängen (Interstrang-Crosslinks) passieren. Crosslinks blockieren die Replikationsgabeln und können somit zum Zelltod führen. Zwei gut untersuchte Crosslinker sind Cisplatin und Mitomycin C. Cisplatin ist seit mehr als 30 Jahren bekannt, und man hat es erfolgreich in der Therapie bei Lungenkrebs und Tumoren des Urogenitaltraktes eingesetzt (Cohen *et al.*, 2001). Mitomycin C wurde 1958 aus *Streptomyces caespitosus* isoliert. Abgesehen von seiner Wirkung bei Krebs als Chemotherapeutikum kann es auch eingesetzt werden, um (überschießende) Narbenbildung zu vermeiden. Aktuelle Forschungsprojekte beschäftigen sich mit der möglichen Rolle von Mitomycin C in der Wundheilung (Scheithauer *et al.*, 2007).

3.2.2.5.3 Topoisomerase-Inhibitoren

Topoisomerasen sind Enzyme, welche die Topologie der DNA verändern können. Die Topoisomerasen vom Typ I (Topo I und III) verursachen ATP-unabhängig die Entstehung und das Wiederverschließen von DNA-Einzelstrangbrüchen, während die Topoisomerasen Typ II (Topo II bei Eukaryonten bzw. Topo IV und Gyrase bei Bakterien) ATP-abhängig transiente DNA-Doppelstrangbrüche einführen. Mehrere Substanzen sind bekannt, welche die Topoisomerasen in einem kovalenten Komplex an der DNA festhalten und somit ihre Funktion inhibieren (Champoux, 2001). Diese Substanzen werden als Chemotherapeutika gegen Krebs eingesetzt (Abb. 6).

3.2.2.5.3.1 *Camptothecin*

Camptothecin ist ein Extrakt von dem chinesischen Baum *Camptotheca acuminata*. Die Entwicklung von Camptothecin als Chemotherapeutikum verlief anfangs wegen seiner niedrigen Löslichkeit nur zögerlich. Heute sind mehrere wasserlösliche Camptothecin-Analoga bekannt, die eine signifikante klinische Aktivität bewiesen haben (Rothenberg, 1997). Camptothecin bindet an diese Topoisomerase I, sodass diese zwar die DNA schneiden, aber nicht wieder zusammenfügen kann. Somit entstehen DNA-Einzelstrangbrüche.

3.2.2.5.3.2 Etoposid

Etoposid wird aus der Wurzel des amerikanischen Maiapfels, *Podophyllum peltatum*, gewonnen. Es hemmt das Enzym Topoisomerase II und verursacht dabei DNA-Doppelstrangbrüche. Die Hemmung der Topoisomerase II aktiviert die Zellzyklus-Check-Point-Signalkaskade und wirkt sich auf die Genexpression aus (Montecucco *et al.*, 2006).

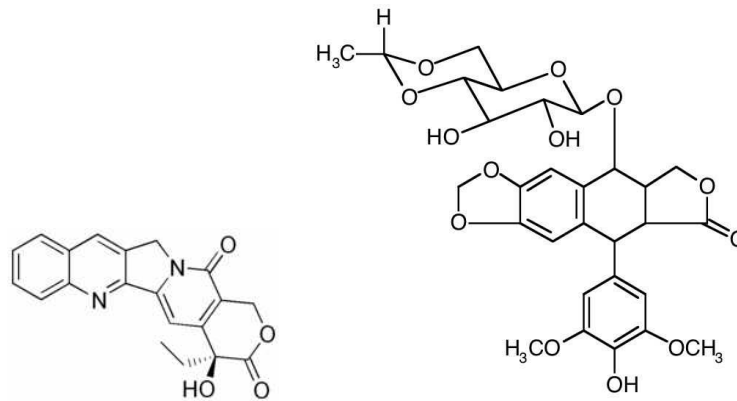


Abb. 6 Strukturformeln von Camptothecin (links) und Etoposid (rechts) (<http://de.wikipedia.org>)

3.2.2.6 Labor-Chemikalien

Es gibt eine ganze Reihe von Chemikalien, die in einem molekularbiologischen Labor zum Alltag gehören und aufgrund ihrer Wirkung auf die DNA gesundheitsschädlich bis giftig sind. Ethidiumbromid, SYBRgreen, DAPI und weitere Substanzen können DNA-Schäden hervorrufen und wirken oft mutagen, karzinogen und/oder teratogen. Andere können direkt oder indirekt die DNA angreifen und chemisch verändern. Die molekularen Mechanismen sind in vielen Fällen nicht vollständig verstanden.

Dimethylsulfoxid (DMSO) ist ein organisches Lösungsmittel, welches in der Biologie unter anderem für die Kryopräservierung von Zellen oder das Lösen verschiedener Substanzen benutzt wird. Es ist bekannt, dass es ab einer bestimmten Konzentration Apoptose (Chateau *et al.*, 1996) und DNA-Strandbrüche (Solvaig *et al.*, 1984) induziert.

3.3 DNA-Reparatur-Mechanismen

Alle Zellen besitzen eine große Zahl verschiedener DNA-Reparatur-Mechanismen, welche häufig sehr spezifisch für eine bestimmte Art von Schäden sind. Fehler bei der DNA-Reparatur der Zelle können zu Mutationen, genomischer Instabilität oder Zelltod führen (Ataian *et al.*, 2006).

Durch direkten „Reversion“ von DNA-Schäden werden methylierte Basen (wie O⁶-Methylguanin) durch eine spezifische Methyltransferase unter Wiederherstellung der ursprünglichen Base (Guanin) demethyliert. Das Enzym dient gleichzeitig als Methylgruppenakzeptor und wird im Zuge der Reaktion inaktiviert.

In der Nucleotid-Exzisions-Reparatur (NER) werden unterschiedliche veränderte Basen, die die DNA-Doppelhelix verzerren, durch einen „Schadens-Ortungs-Mechanismus“ identifiziert. Ein Oligonukleotid von 27 bis 29 Nukleotiden wird durch die konzertierte Aktion von zwei spezifischen Endonukleasen aus der DNA herausgeschnitten. Die DNA-Polymerasen δ/ϵ synthetisiert das fehlende DNA-Stück und die DNA-Ligase I „versiegelt“ den verbleibenden Einzelstrangbruch. Der genotoxische Effekt von UV-Strahlung wird in humanen Zellen hauptsächlich durch Nucleotid-Exzisions-Reparatur verhindert (Dawn *et al.*, 1999). *Xeroderma pigmentosum* (XP), das Cockayne-Syndrom (CS) und Trichothiodystrophie (TTD) sind genetische Störungen in der NER-Regulation mit unterschiedlichen Phänotypen (Lehmann, 2003). Eine Fehlfunktion in den XP-Genen A-G sowie in den CS-Genen A und B ist für diese drei Krankheiten verantwortlich (Auerbach, 1997).

Xeroderma pigmentosum (XP) ist eine seltene, rezessiv vererbte Krankheit, die weltweit mit einer Frequenz von 1:250.000 auftritt. Sie manifestiert sich in einem 2000-fach erhöhten Hautkrebsrisiko und andere starken Hautläsionen in lichtexponierten Hautpartien (Lichon *et al.*, 2007).

Das Cockayne-Syndrom (CS) ist eine seltene, rezessiv vererbte Krankheit, die mit einer Frequenz von 1:100.000 vorkommt. Diese Patienten sind kleinwüchsig, altern schneller und reagieren überempfindlich auf UV-Strahlen, haben jedoch kein erhöhtes Krebsrisiko (Arenas-Sordo *et al.*, 2006).

Trichothiodystrophie (TTD) ist eine seltene, rezessiv vererbte Krankheit mit Trichorrhexis nodosa (durch vermindertem Schwefelgehalt der Haare), Hautveränderungen und Photosensitivität (Botta *et al.*, 1998).

Basen-Exzisions-Reparatur-Mechanismen (BER) sind in der Evolution hochkonserviert (Krokan *et al.*, 2000). Eine veränderte Base wird durch DNA-Basenglykosylasen von der Desoxyribose hydrolytisch abgespalten, und an der somit entstehende basenlose Stelle wird durch eine Endonuklease eingeschnitten. Für die Wiederherstellung der ursprünglichen DNA-Konfiguration sind die DNA-Polymerasen β bzw. δ/ϵ und DNA-Ligasen III bzw. I zuständig. Bei Lungenkrebs kann das ebenfalls am BER beteiligte „X-ray cross-complementing group 1 protein“ (XRCC1) defekt sein (Divine *et al.*, 2001). Das Ausschalten wichtiger BER-Reparatur-Proteine induziert embryonale Letalität (Hoeijmakers, 2001), was die grundlegende Bedeutung dieses Reparaturpfads belegt. Ein weiteres interessantes Protein ist die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1), die an verschiedenen physiologischen Vorgängen, aber insbesondere der Basen-Exzisions-Reparatur (BER) und der Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität beteiligt ist (Bürkle, 2005). Unter Poly(ADP-Ribosyl)ierung versteht man die Bildung von protein-konjugierter Poly(ADP-Ribose) im Sinne einer posttranslationalen Modifikation von nukleären Akzeptor-Proteinen. Als Substrat dient NAD^+ . Bei der Reaktion wird Nicotinamid freigesetzt. Die Poly(ADP-Ribosyl)ierung ist eine sofortige zelluläre Antwort auf DNA-Strangbrüche (Beneke und Bürkle, 2007).

Die Fehlpaarungen zwischen den DNA-Strängen, die durch Replikationsfehler verursacht werden, werden durch Mismatch-Reparatur korrigiert. Die Proteine hMSH2/6 und hMSH2/3 binden an die Fehlpaarung und „rekrutieren“ die Proteine hMLH1 und hPMS2. Der Komplex aktiviert eine ganze Reihe weiterer Proteine, darunter pol δ/ϵ , RPA, PCNA, RFC, Exonuclease 1 und FEN1 (Hoeijmakers, 2001).

Für die Reparatur von Doppelstrangbrüchen (DSB) an der DNA gibt es zwei Mechanismen: Homologe Rekombination (HR) und „non-homologous end joining“ (NHEJ). Durch homologe Rekombination werden DNA-Brüche fehlerfrei unter Zuhilfenahme eines weiteren DNA-Stranges mit identischer (homologer) Sequenz repariert, während beim non-homologous end joining nicht-homologe DNA-Enden verbunden werden. Im Gegensatz zu HR treten bei NHEJ relativ häufig Fehler auf. So werden zum Beispiel nicht zusammengehörende Enden verbunden, was zu Translokationen (Chromosomenumlagerungen) führt, oder es kommt zu Mutationen an den Verknüpfungsstellen.

Des Weiteren sind diverse DNA-Reparatur-relevante Proteine über Erbkrankheiten mit hochcharakteristischem Phänotyp identifiziert worden.

Das Werner-Syndrom (WS) ist eine autosomal, rezessiv vererbte Krankheit, verursacht durch Mutationen im *WRN* Gen, das für eine DNA-Helikase kodiert (Chen *et al.*, 2003). Diese Krankheit ist gekennzeichnet durch das vorzeitige Auftreten von typischen Alterserscheinungen und -Krankheiten und manifestiert sich nach der Pubertät.

Ataxia telangiectasia (AT) ist eine seltene, rezessiv vererbte Krankheit, verursacht durch Mutationen im *ATM* Gen. Diese Krankheit ist gekennzeichnet durch Kleinhirndegeneration, Immundefizienz, erhöhte Strahlenempfindlichkeit, Zellzyklusstörungen, genetische Instabilität in somatischen Zellen und erhöhtes Krebsrisiko (Sabitsky *et al.*, 1995).

Fanconi-Anämie (FA) ist eine seltene, rezessiv vererbte Krankheit, verursacht durch Mutationen in einem von mehreren Fanconi-Anämie-Genen (FA-Gene). Diese Krankheit ist gekennzeichnet durch eine Knochenmarksaplasie, ein hohes Myelodysplasie- und Leukämie-Risiko und eine zelluläre Hypersensitivität gegenüber Crosslinker (Bagby *et al.*, 2006)

BRCA1 und BRCA2 spielen eine wichtige Rolle bei der HR. Der Funktionsverlust dieser Proteine erhöht das Risiko für Ovarial- und Brustkrebs (Levy-Lahad *et al.*, 2007). Aber andererseits kann die Tatsache, dass diese Krebszellen keine HR durchführen können, bei der Krebs-Chemotherapie genutzt werden: Das zusätzliche Blockieren der BER mit PARP-1-Inhibitoren macht die Krebszellen empfindlicher gegenüber (endogene) DNA-Schädigung als das gesunde Gewebe, das die DNA-Doppelstrangbrüche immer noch mittels HR reparieren kann (Bryant *et al.*, 2005).

3.4 Methoden zur Messung von DNA-Strangbrüchen und DNA-Reparatur

3.4.1 γ -H2AX-Immunfluoreszenz-Assay (Rothkamm *et al.*, 2003):

Einer der frühesten Schritte in der zellulären Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) ist die Phosphorylierung des Histons H2AX am Serinrest 139. Mit einem spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen die phosphorylierte Form dieses Histons können Foci an den Stellen von DSB detektiert werden. Es wird davon ausgegangen, dass mit dieser Methode sich selektiv DNA-Doppelstrangbrüche detektieren lassen (Abb. 7).

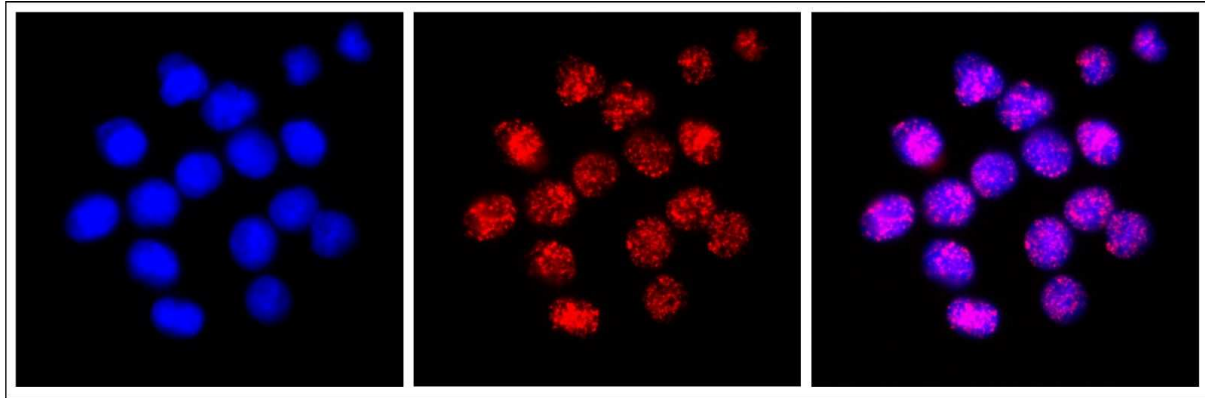


Abb. 7 Darstellung von DNA-DSB mit γ -H2AX-Immunfluoreszenz-Assay. Links: DAPI-DNA-Färbung; Mitte: Foci-Färbung; rechts: Überlappung. (M. Moreno-Villanueva, nicht veröffentlicht)

3.4.2 Alkalische Filterelution (Kohn, 1996):

Bei der alkalischen DNA-Filterelution werden die DNA-Stränge durch Aufbrechen der Wasserstoffbrücken zwischen den Basenpaaren voneinander getrennt. Da beide DNA-Einzelstränge negativ geladen sind und gleiche Ladungen sich abstoßen, können die Einzelstränge auseinanderdriften und durch die Poren eines Membranfilters hindurchgleiten. Die Kinetik der Elution ist dabei unabhängig von Zellzahl und Länge der DNA-Stücke. Es hat sich gezeigt, dass die DNA-Stränge nicht komplett entwunden sein müssen, um durch die Poren zu gelangen, allerdings wurde festgestellt, dass eine Elution doppelsträngiger DNA nicht möglich ist, da die Poren verstopfen. Der Anteil an einzelsträngiger DNA, die bei diesem Vorgang entsteht, hängt von der Anzahl der ursprünglich vorhandenen DNA-Einzelstrangbrüche ab.

3.4.3 Alkalische Sucrosegradienten-Sedimentation (McGrath und Williams, 1996):

Die einzelsträngigen DNA-Fragmente werden hier mittels eines Zuckergradienten nach Molekulargewicht getrennt.

3.4.4 Alkalische Mikrogelelektrophorese („Comet Assay“, Singh *et al.*, 1988):

Das Prinzip des „Comet Assay“ beruht auf der unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit verschieden großer DNA-Fragmente im Agarosegel unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes (Gelelektrophorese). Die Zellen werden genotoxisch behandelt und dann ein „low-

melting“ Agarosegel eingebettet und direkt oder nach einer Reparatur-Inkubationszeit lysiert. Die DNA wird unter alkalischen Bedingungen entwunden. Anschließend wird eine Mikrogelelektrophorese durchgeführt wobei die kleineren DNA-Fragmente schneller durch das Gel wandern als große. Die DNA-Fragmente werden mit Ethidiumbromid (Fluoreszenzfarbstoff) angefärbt und unter dem Mikroskop analysiert. Diese Zellen haben zu diesem Zeitpunkt das Aussehen eines Kometen, daher der Name „Comet Assay“ (Abb. 8).

Die Detektion von DNA-Brüchen ist abhängig von verschiedenen Parametern, einerseits von der Agarosekonzentration, dem pH-Wert, der Temperatur und der Dauer der alkalischen Entwindung, andererseits von der angelegten elektrischen Spannung und der Dauer der Gelelektrophorese (Hartmann *et al.*, 2003).

Bei einer Variante dieser Methode, der neutralen Mikrogelelektrophorese (bei pH 8,5), geht man davon aus, dass sie spezifisch DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) detektieren kann.

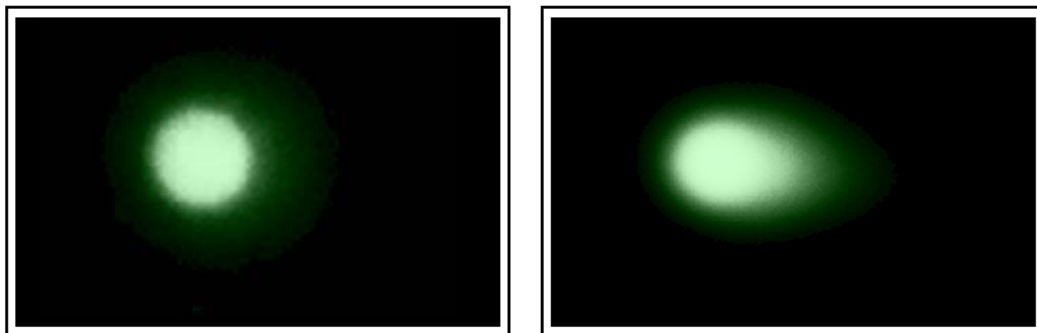


Abb. 8 Darstellung des Zellkerns nach dem „Comet Assay“. Links: Kern einer Zelle bei einer Energiedosis von 0 Gy. Rechts: Komet-Struktur bei einer Energiedosis von 1 Gy. (M. Moreno-Villanueva. nicht veröffentlicht)

Methode	Empfindlichkeit in Brüche/Daltons DNA	Röntgenstrahlen-Dosis in Gy*
Alkalische Sucrosegradienten-Sedimentation	1 Bruch/ $(2-5) \times 10^8$	5,00
Nukleotidsedimentation	1 Bruch/ 2×10^9	0,33
Alkalische Elution	1 Bruch/ $(2-3) \times 10^9$	0,30
Alkalische Gelelektrophorese	1 Bruch/ 3×10^9	0,30
Alkalische Entwindung	1 Bruch/ $(6-9) \times 10^9$	0,10
Alkalische Mikrogelelektrophorese	1 Bruch/ 2×10^{10}	0,032

Tab. 1 DNA-Bruch-Messmethoden und ihre Empfindlichkeit bei der Detektion von Strangbrüchen. Die alkalische Mikrogelelektrophorese ist hier die empfindlichste Methode (nach Singh, 2000).

* Niedrigste notwendige Röntgenstrahlen-Dosis, bei welcher DNA-Strangbrüche detektieren werden können.

3.4.5 FADU-Assay (Birnboim und Jevcak, 1981):

FADU steht für *Fluorometric analysis of DNA unwinding* (fluorimetrische Analyse der DNA-Entwindung). Eine Vor-Form dieses Assays war bereits von Ahnström und Edvardsson (1974) beschrieben worden. Diese Methode macht sich die Entwindung von DNA-Doppelsträngen unter kontrollierten alkalischen Bedingungen zunutze. Die DNA wird in alkalischer Lösung partiell entwunden. Die Entwindung ist von der Zeit, dem pH-Wert, der Temperatur und der Anzahl an Strangbrüchen abhängig. Da die Entspiralisierung nur an offenen Stellen der DNA stattfinden kann, ist der Umfang von insgesamt entwundener DNA eine Funktion der Anzahl an „offenen Stellen“ in der DNA gibt. Diese sind: Chromosomenenden, DNA-Replikationsgabeln und DNA-Brüche (Einzel- und Doppelstrangbrüche), die direkt als Ausdruck von DNA-Schädigung bzw. indirekt im Rahmen von DNA-Reparaturaktivität entstanden sind.

Um die DNA aus dem Komplex mit Histonen freizusetzen und für die Alkalibehandlung zugänglich zu machen, werden die zu untersuchenden Zellen zunächst in Anwesenheit von hochkonzentriertem Harnstoff lysiert. Es folgt die Zugabe von Alkali (NaOH) in limitierender Konzentration und unter kontrollierten Temperatur-, pH- und Zeitbedingungen. Hierbei ist absolut kritisch, dass die DNA im Lysat keinerlei Scherkräften ausgesetzt ist, da dies zur artifiziellen Erzeugung zusätzlicher DNA-Brüche führen würde. Die scherungsfreie Zugabe der alkalischen Lösung wird durch sorgfältiges, vermischungsfreies Übersichten des Lysats erreicht. Aus der so entstandenen Oberphase diffundiert NaOH dann in die Lysat-Phase. Die Entwindung wird nach einer optimierten Wirkungszeit durch Zugabe eines Neutralisationspuffer angehalten. Daraufhin wird dem Zelllysate ein Fluoreszenzfarbstoff zugegeben, welcher Wechselwirkungen mit der doppelsträngigen DNA eingeht und so ein Fluoreszenzsignal abgibt (Abb. 9).

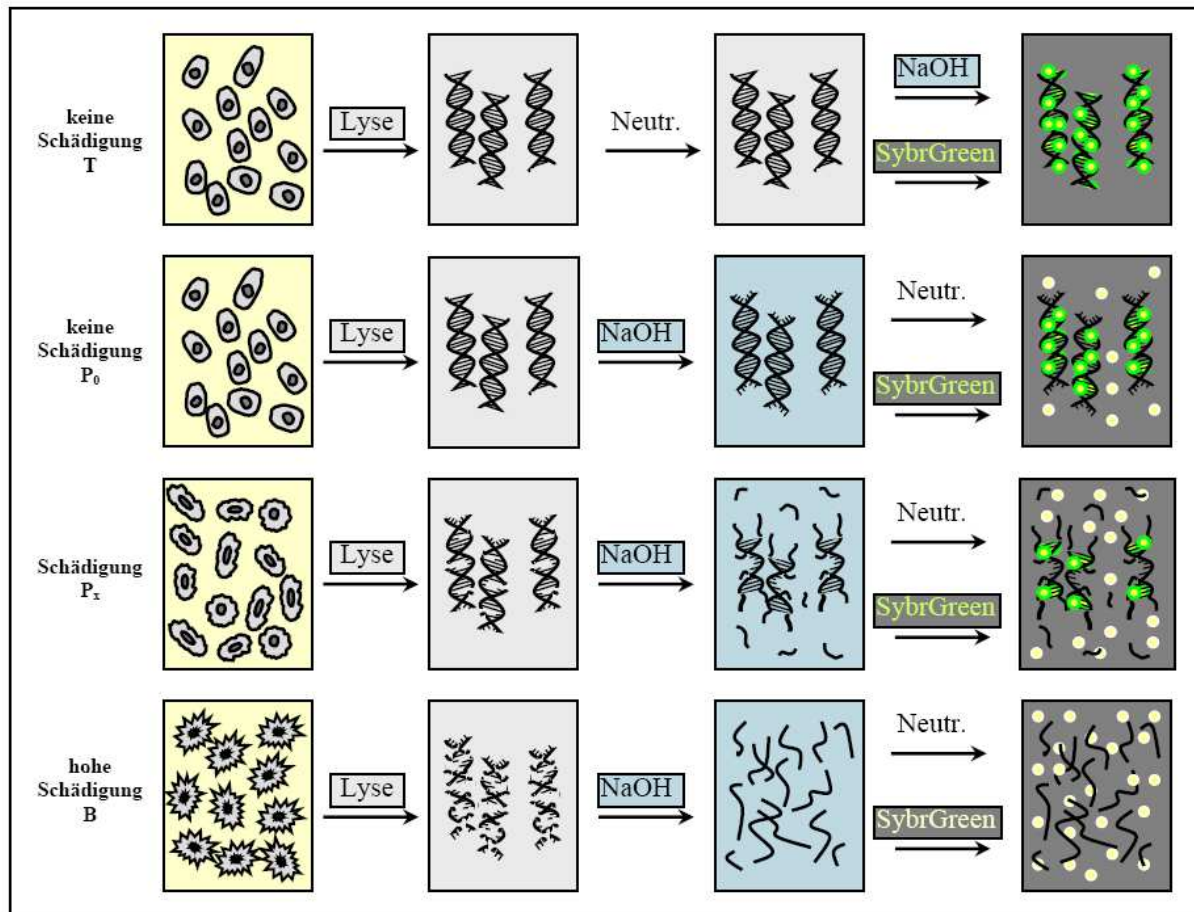


Abb. 9 Ablaufschema des FADU-Assays mit Darstellung der physikalisch/chemisch/biochemischen Vorgänge. Links (gelber Kasten) sind die Zellen dargestellt. In der Mitte sind DNA-Doppelstränge mit zunehmender Schädigung (hellgrauer Kasten) bzw. zunehmenden Entwindungsgrad (blauer Kasten) dargestellt. Die kleinen Kreise (dunkelgrauer Kasten) repräsentieren Farbstoffmoleküle (gelb = kein Fluoreszenzsignal und grün = Fluoreszenzsignal). T, P₀ und B sind Kontrollen. T ist der einzige Ansatz, bei dem direkt nach dem Lyse-Schritt die Neutralisation folgt, so dass eine Entwindung durch NaOH nicht stattfindet. Dieser Ansatz entspricht *per definitionem* 100 % Fluoreszenzsignal. Bei dem Kontrollansatz P₀ wird die Entwindung zugelassen. Dieser Ansatz entspricht den physiologischen „Strangbruch-Bedingungen“, d.h. er erfasst Chromosomenenden und Replikationsgabeln. Ansatz B ist eine dritte Kontrolle. Die DNA-Schädigung ist hier so groß, dass der gesamte DNA-Doppelstrang entwunden wird und somit kein Fluoreszenzsignal ergibt. Die P_x-Ansätze (P₁,P₂,P₃,P₄...P_x) sind die nach DNA-Schädigung zu messenden Proben (© M. Moreno-Villanueva, nach Pfeiffer, 2001)

3.5 Zink (Zn²⁺)

Zink ist ein Übergangsmetall mit der Wertigkeitstufe 2+ und gehört zu den essenziellen Spurenelementen. Seine 3d-Schale ist voll besetzt, es kann deshalb kein Elektron abgeben oder aufnehmen und ist daher nicht an Redoxaktivität (im Gegensatz zu Kupfer und Eisen) beteiligt.

3.5.1 Verteilung im Körper

Der Körper eines erwachsenen Menschen enthält 2–4 g Zink (Ibs *et al.*, 2003). Zink ist in allen Körpergeweben zu finden: 85 % in Knochen und Muskeln, 11 % in der Haut und Leber (Tapiero *et al.*, 2003) und weniger als 0,2 % im Plasma (Brown, 1998). In der Zelle ist die Zinkkonzentration in pM- bis nM-Bereich (Haase *et al.*, 2006); davon sind 30 – 40 % im Kern, 50 % in Zytoplasma, Organellen und Vesikeln und der Rest in der Zellmembran zu finden (Tapiero *et al.*, 2003). Der tägliche Zinkbedarf des Menschen liegt bei 12 bis 15 mg.

Die intra- und extrazellulären Zinkkonzentrationen sind im Körper streng reguliert. Extrazellulär ist das Plasma das Zink-Austausch-Medium für die verschiedenen Körpergewebe und hält selber einen relativ konstanten Zinkgehalt; der wichtigste Regulator des Zinkhaushaltes ist aber der Gastrointestinaltrakt. Für die zelluläre Zink-Homöostase (Abb. 10) sind Zinktransporter von großer Bedeutung. Dabei regulieren ZnT-Transporter die Abnahme der intrazellulären Zinkkonzentration, indem sie Zink aus dem Zytoplasma in Vesikel oder ins extrazelluläre Milieu transportieren, und Zip-Transporter die Zunahme des intrazellulären Zinkgehalts durch Transport von Zink aus dem extrazellulären Raum und möglicherweise auch aus Vesikeln in das Zytoplasma (Liuzzi *et al.*, 2004).

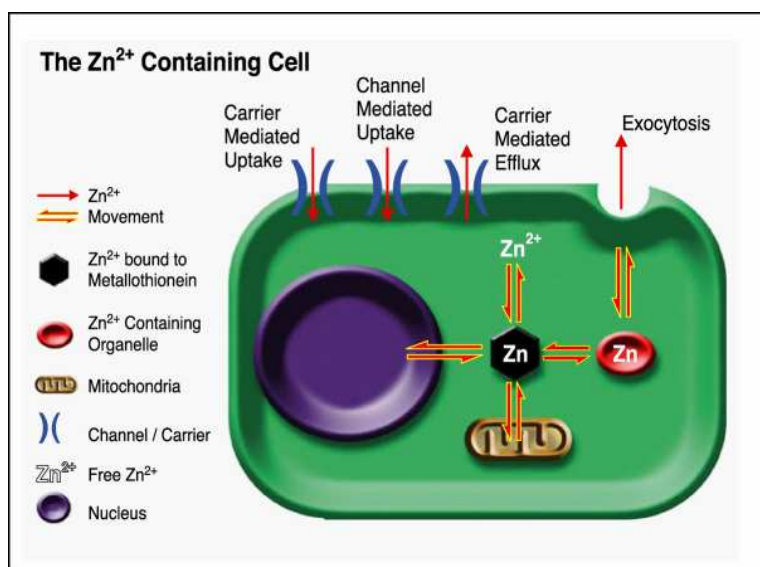


Abb. 10 Schematische Darstellung der Zink-Homöostase in der Zelle. Zink wird in Organellen und in Mitochondrien gespeichert und bindet an Zink-bindende Proteine (Metallothionein). Für den Zinktransport zwischen Zytoplasma, Organellen und extrazellulärem Milieu sind spezifische Transporter zuständig (Colvin *et al.*, 2003)

3.5.2 *Biologische Bedeutung von Zink*

Aufgrund seines kleinen Ionenradius (134 pm) und seiner positiven Ladung hat Zink (Zn^{2+}) eine hohe Affinität für Elektronendonatoren und bildet Komplexe mit Thiol-, Imidazol-, Carboxylat-, Sulfhydryl- und Aminogruppen vieler Proteine. Diese Komplexe sind sehr stabil, und deshalb ist die Konzentration an freiem Zink in menschlichen Körper sehr gering.

Zink ist für die Funktionalität von mehr als 300 Enzymen, die Stabilisierung der DNA, die Genexpression und die DNA-Reparatur notwendig (Frassinetti *et al.*, 2006). Ein Beispiel dafür ist die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1, ein wichtiges Protein in der BER. Zink ist wichtig für das Immunsystem, es stimuliert Lymphozyten zur Zytokinproduktion und Monozyten zur Produktion von Interleukin-1, Interleukin-6 und Tumornekrosefaktor- α (Rink *et al.*, 2000). Zink reguliert Apoptose (Truong-Tra, 2000), Zellwachstum und Zellproliferation (McDonal, 2000), und befindet sich außerdem in synaptischen Vesikeln (Colvin *et al.*, 2003).

3.5.3 *Zinkmangel*

Aufgrund der vielseitigen Wirkung von Zink auf den menschlichen Organismus ist es nicht überraschend, dass ein Zinkmangel schwere Konsequenzen haben kann. Folgen eines Zinkmangels können sein: Wundheilungsstörungen, Hauterkrankungen, Haarausfall, Wachstumsstörungen, Geruchs- und Geschmacksstörungen.

Die autosomal-rezessiv vererbte *Acrodermatitis enteropathica* (AE) ist klinisch charakterisiert durch eine schwere Dermatitis (v. a. Hände, Füße, Mund, Genitalbereich), chronische Diarrhö, Alopezie, Wachstums- und Entwicklungsretardierung sowie eine erhöhte Infektanfälligkeit. Ursache ist eine verminderte Zinkresorption im Darm. Im Jahr 2002 wurde das für AE verantwortliche Gen identifiziert. Es kodiert für ein Zink-Transporterprotein SLC39A4 (Lehnert *et al.*, 2006)

3.5.4 *Zinkvergiftung*

The American Journal of Forensic Medicine and Pathology publizierte 1997 den ersten Bericht von akuter Zinktoxizität mit tödlichen Folgen beim Menschen (Bennett *et al.*, 1997). Nach der Einnahme von 461 Münzen starb ein Patient an Multiorganversagen. Die Biopsien von Leber, Nieren und Pankreas zeigten leichte Fibrose und akute massive Nekrose sowie eine hohe

Zinkkonzentration. Auf zellulärer Ebene induziert Zink in hohen Konzentrationen ($> 100 \mu\text{M}$) Apoptose in humanen peripheren mononukleären Blutzellen (Chang *et al.*, 2006).

3.5.5 Zink im Alter

Biologisch gesehen ist das Altern ein Wandlungsprozess, der sich über das ganze Leben erstreckt. Störungen in der DNA-Reparatur-Maschinerie sind für eine ganze Reihe von Krankheiten und für manche Krebsarten verantwortlich. Heute wissen wir, dass DNA-Schädigungen und nicht reparierte DNA-Doppelstrangbrüche mit dem Alter akkumulieren, und dass Defekte in DNA-Reparatur-Genen Krankheiten hervorrufen, die zu frühzeitigem Altern führen (Werner-Syndrom, Bloom-Syndrom, Rothmund-Syndrom, Cockayne-Syndrom, *Xeroderma pigmentosum* und Trichothiodystropie). Die Beziehung zwischen Altern und dem Nachlassen der Reparaturmechanismen von DSB wird noch untersucht, diese Mechanismen können sich mit dem Altern dramatisch verändern (Engels *et al.*, 2007). In dem Verbundprojekt „Zincage“, welches von der Europäischen Union im sechsten Rahmenprogramm gefördert wurde, wurde der Effekt eines Zink-Defizits im Alter erforscht. Verschiedene Parameter (genetischer Hintergrund, Lebenserwartung, Neurodegeneration, oxidativer Stress, genomische Instabilität, Immunsystatus, Ernährung, zelluläre Signaltransduktion) wurden in Zusammenhang mit dem Alter untersucht. Es wurden viele Faktoren gefunden, welche die individuelle Zinkantwort beeinflussen, wie z.B. Ernährungsgewohnheiten, Genotyp, Geschlecht, Einnahme von Medikamenten und körperliche Schwäche. Zudem wurden eine Beziehung zwischen dem Enzym Superoxiddismutase, Zink und Alter (Mariani *et al.*, 2006), zwischen der zellulären Poly(ADP-Ribosyl)ierungskapazität, Zink und Alter (Kunzmann *et al.*, 2007), zwischen Zinkstatus und Immunsystem im Alter (Haase *et al.*, 2006) sowie zwischen Zinkstatus, Alter, psychologischen/psychischen Aspekten (kognitive Funktionen, Stimmung, Stresswahrnehmung) und der Ernährung (Marcellini *et al.*, 2006) gefunden.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zellen

Jurkat Klon E6-1	ATTC®, Wesel
HeLa S3	E. May, Universität Konstanz
Humane Blutzellen	22- bis 65-jährige gesunde Spender (m/w)
AA8 Chinese Hamster Ovary Cells	L. Thompson, Livermore, USA
V3 DNA-PK _{cs} -defiziente Zellen	L. Thompson, Livermore, USA
irs1SF XRCC3-defiziente Zellen	T. Helleday, Sheffield, Großbritannien

4.1.2 Fertig-Medien und Medienzusätze

Penicillin-Streptomycin-Lösung (10.000 U/ml und 10.000 µg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
FCS (fötale Kälberserum)	Biochrom AG, Berlin
RPMI	Invitrogen, Karlsruhe

4.1.3 Medienzusammensetzung

Zellkulturmedium für PBMC, Jurkat, AA8, V3 und irs1SF	RPMI + L-Glutamin. Zusatz: 10 % (v/v) FCS; 100 U/ml Penicillin; 100 mg/ml Streptomycin
Zellkulturmedium für HeLa	DMEM 41966-039 (mit 4500 mg/l Glucose + L-Glutamin + Pyruvat) Zusatz: 10 % (v/v) FCS; 100 U/ml Penicillin; 100 mg/ml Streptomycin
Reparatur-Medium für AA8, V3 und irs1SF	RPMI (mit L-Glutamin) Zusatz: 10 % (v/v) FCS; 100 U/ml Penicillin; 100 mg/ml Streptomycin

„Reparatur-Medium“ für HeLa	DMEM (mit 4500 mg/l Glucose + L-Glutamin –Pyruvat) Zusatz: Ø
„Reparatur-Medium“ für Jurkat und PBMC	RPMI (mit 4500 mg/l Glucose + L-Glutamin –Pyruvat) Zusatz: Ø
„Einfriermedium“	60% Medium; 30% FCS; 10% DMSO

4.1.4 Chemikalien

3-Aminobenzamid	Sigma-Aldrich, München
Antikörper Maus-anti- γ H2AX IgG ₁ Klon JBW301	Upstate, Billerica, USA
Antikörper Ziege-anti-Maus IgG (H+L) Alexa Fluor® 546	Invitrogen, Paisley, Großbritannien
Biocoll	Biochrom AG, Berlin
Borsäure	Sigma-Aldrich, Gillingham, Großbritannien
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Gillingham, Großbritannien
Camptothecin	Sigma-Aldrich, München
CometAssay™ HT Reagent Kit Catalog # 4252-40-K	Trevigen, Geithersburg, USA
Kristallviolett	Sigma Aldrich, Gillinham, Großbritannien
Cyclohexyl-diamintetraacetat	Sigma-Aldrich, München
D(+)-Glucose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
DAPI (Vectashield mounting medium)	Vector USA, Odessa, USA
DMSO	Merck, Darmstadt
Dulbecco's A phosphate buffered saline	Invitrogen-Gibco, Paisley, Großbritannien
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Essigsäure (konzentrierte)	Fisher Scientific International Ltd, Loughborough, Großbritannien
Ethanol (vergällt)	Roth GmbH, Karlsruhe

Ethanol (absolut)	Riedel de Haen, Seelze
Etoposid	Sigma-Aldrich, München
Harnstoff	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Isopropanol (100 %)	Fisher scientific, Loughborough, Großbritannien
Isotonische Lösung FACSFlow	BD Biosciences, Oxford, Großbritannien
Kaliumchlorid	BDH Limited, Poole, Großbritannien
LPS (Lipopolysaccharid)	Sigma-Aldrich, München
Magnesiumchlorid	Riedel de Haen, Seelze
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Meso-Inositol	Sigma-Aldrich, München
Methanol	BDH Ltd, Dorset, Großbritannien
Milchpulver	Tesco, Newcastle, Großbritannien
Natriumchlorid	Fisher Chemicals, Loughborough, Großbritannien
Natriumhydroxid	Riedel de Haen, Seelze
Salzsäure	BDH Limited, Poole, Großbritannien
SDS (10 % schwermetallfrei)	Bio-Rad
SIN-1	Calbiochem, San Diego, USA
Natriumphosphat	Riedel de Haen, Seelze
Sybr®Green (10000x konzentriert)	Mo Bi Tec, Göttingen
TPEN	Sigma-Aldrich, München
Tris	Sigma-Aldrich, Gillingham, Großbritannien
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Gillingham, Großbritannien
0,25 % Trypsin/EDTA	Sigma-Aldrich, München
Zinksulfat (cell culture tested)	Sigma-Aldrich, München

4.1.5 Puffer und Lösungen

Blockierungspuffer	KCM-Puffer + 1 % Triton X-100, 2 % BSA, 10 % Milchpulver
Kristallviolett-Lösung	Kristallviolett 0,4 % (w/v) in Wasser

Entwindungspuffer	0,425 Teile Lyse-Puffer in 0,2 M NaOH
Fixierungslösung (Zellzählung)	75 % Methanol, 25 % Essigsäure
KCM-Puffer	120 mM KCl, 20 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA
Lyse-Puffer	9 M Harnstoff; 2,5 mM Cyclohexyl-diamintetraacetat; 0,1 % SDS
Neutralisationspuffer	1 M Glucose; 14 mM β -Mercaptoethanol
PBS	0,3 mM Kaliumdihydrogenphosphat; 1 mM Dinatriumhydrogenphosphat; 13,7 mM Natriumchlorid, pH 7,4
Resuspensionspuffer	0,25 M Meso-Inositol; 10 mM Natriumphosphat pH=7,4; 1 mM Magnesiumchlorid
Sybr®Green-Lösung	Sybr®Green (3 : 25.000) in dH ₂ O
1x TBE-Puffer	108 g Tris, 55 g Borsäure, 9,3 g EDTA auf 1 l dH ₂ O (pH=8,3)
1x TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA
Waschpuffer (Immunfluoreszenz)	KCM-Puffer + 0.1 % Triton X-100

4.1.6 Labor-Geräte

Digitalthermometer Voltcraft® 300K	Conrad Electronic, Hirschau
Fluorometer FL 600 microplate	Bio-Tek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Zentrifuge Centaur 2 5415D	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Gelelektrophorese-System Sub-Cell® Model 192	BioRad, Hertfordshire, Großbritannien
Zentrifuge „Megafuge“ 1.0 R	Heraeus Instruments, Fellbach

Kältethermostat RE 204	Lauda Dr. R. Wobser GmbH, Lauda-Königshofen
Kolonienzähler	Oxford Optronix, Oxford, Großbritannien
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Leitz Labovert, Type 090-122.012	Ernst Leitz Wetzlar GmbH, Wetzlar
Mikroskop Olympus BH2-RFCA	Olympus, Hamburg
Mikrowelle 800 W	Panasonic, Newcastle, Großbritannien
Röntgenanlage RS320 Kv	Gulmay Medical Ltd., Camberley, Großbritannien
Röntgenanlage RT 100	C.H.F. Müller GmbH, Hamburg-Fu.
Röntgenröhre TÖ 100/8 Oberflächenröhre	C.H.F. Müller GmbH, Hamburg-Fu.
Schüttler (Plattform) IKA® Vivrax	Jencons-pls, East Grinstead, Großbritannien
Sterilbank HB 2448	Heraeus Instrument, Fellbach
Strahlendosimeter PTW unidos E	PTW-Freiburg, Freiburg
TECAN-Roboter Genesis RSP 100	TECAN AG, Hombrechtikon, Schweiz
Thermomixer comfort	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Vakuumsaugsystem Vacusafe confort	IBS Integra Biosciences, Chur, Schweiz
Vortex Genie2	VWR International, Darmstadt
Wasserbad	Wiss. Werkstätten der Universität Konstanz
Wasserbad	Gallenkamp EEC, London, Großbritannien
Wasserbad Grant W14	Grant Instruments Ltd., Cambridge, USA
Zellzähler	Beckman-Coulter UK Ltd., Buckinghamshire,

Modell Z1	Großbritannien
CO ₂ -Zellkultur-Inkubator Modell BB6220	Heraeus Instruments, Fellbach
CO ₂ -Zellkultur-Inkubator MCO-20AIC	Sanyo, Electric-Biomedical, Japan

4.1.7 Auswertungsprogramme

Komet 5.5 Kinetic imaging	Andor Technology, Connecticut, USA
Microsoft ® Excel 2000	Microsoft Corporation, USA
Gemini V4.0	TECAN Software GmbH, Berlin
Bio-Tek® KC4 software	Bio-Tek Instruments GmbH, Bad Friedrichschall
Image-Pro Plus 6.0	MediaCybernetics, Bethesda, USA

4.1.8 Verbrauchsmaterialien

6-Well-Platte	Corning Corporation, New York, USA
(96-Well-)FADU-Platte Masterblock, 2 ml, V-Boden	Greiner-Bio One GmbH, Frickenhausen Modifiziert von wiss. Werkstätten der Universität Konstanz
96-Well-Platte	Corning, Schipol-Rijk, Niederlande
sterile 99-mm-Petrischale	Nunc, Roskilde, Dänemark
Deckgläser 22 × 22 mm	Menzel-Glaser, Braunschweig, Deutschland
Handschuhe Safe Skin Satin Plus	Kimberly-Clark, Roswell, USA
Kanülen 0,45 × 25 mm	Braun, Melsungen
Objektträger SuperFrost® Plus	VWR International, Darmstadt
Parafilm	Pechiney plastic packaging, Los Angeles, USA
Plastikwaren	Brand, Petersaurach
Spritzen 5 und 10 ml	Becton Dickenson, Heidelberg
Spritze	Sarstedt, Nümbrecht

EDTA KE/9 ml	
Steriles Blutentnahme-Set mit Flügelkanüle und Anschlusschlauch 21Gx3/4"TW 0,8 × 19 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Sterile Glaspasteurpipetten Volac	Poulten and Graf Ltd., London, Großbritannien
Sterile Pipettenspitzen	Corning, Schipol-Rijk, Niederlande
Sterile Pipettenspitzen	Alltech, Carnforth, Großbritannien
Sterile Plastikpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen nonpyrogenic, 250 ml, 75 cm ² , steril, DNase, RNase free	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Gewebekulturflaschen Canted Neck, 75 cm ² , nonpyrogenic, Polystyrene, sterile	Corning, Schipol-Rijk, Niederlande

4.1.9 Laborzubehör

Allgemeine Glaswaren	Schott, Mainz
100 µl Multipipette	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Neubauer-Zählkammer	Supe Rior, Manenfeld
Pipetten	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipetten P200, P1000	Gilson, Anachem, Luton, Großbritannien

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Suspensionszellen

Verwendete Zellen: Jurkat

Kulturbedingungen: 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relative Luftfeuchtigkeit.

Kulturflasche: Tissue Culture Flask, nicht-pyrogen, 250 ml, 75 cm², steril, DNase-, RNase-frei.

Passagieren: Das gesamte Zellsuspensionsvolumen wurde aus der Kulturflasche entnommen und in ein 50-ml-Zentrifugationsröhrchen überführt. Nach 4 Minuten Zentrifugation bei 200× g bei Raumtemperatur wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml Nährmedium resuspendiert. Daraus wurden X µl (X = entsprechende Verdünnung) in eine Kulturflasche mit 30 ml frischem Medium überführt. Dieselbe Kulturflasche wurde höchstens fünfmal wiederverwendet. Die Zellen wurden bei den oben genannten Kulturbedingungen, mit leicht geöffnetem Flaschen-Deckel inkubiert und je nach Notwendigkeit passagiert.

4.2.1.2 Adhärente Zellen

Verwendete Zellen: HeLa S3, CHO AA8, V3 and irs1SF

Kulturbedingungen: 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % relative Luftfeuchtigkeit

Kulturflasche: Tissue Culture Treated Flask, gebogener Hals, 75 cm², nichtpyrogen, Polystyren, steril.

Passagieren: Zuerst wurde das Medium aus der Kulturflasche abgesaugt und die Flasche mit 5 ml PBS gespült, um das Medium vollständig zu entfernen. Um am Boden haftende Zellen von der Flasche abzulösen, wurde 1 ml Trypsin zugegeben und 5 Minuten auf 37°C inkubiert. Danach wurden 5 ml frisches Medium in die Flasche zugegeben und nach drei- bis viermaligem Auf- und Abpipettieren in ein 15-ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 200× g für 4 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 1 ml frischem Medium resuspendiert. Daraus wurden X µl (X = entsprechende Verdünnung) in die Kulturflasche mit 10 ml frischem Medium überführt. Die gleiche Kulturflasche wurde nur zweimal wiederverwendet. Die Zellen wurden wie bei den oben genannten Kulturbedingungen mit leicht geöffnetem Flaschen-Deckel inkubiert und je nach Notwendigkeit passagiert.

4.2.1.3 Humane periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC)

10 ml Blut von einem Spender wurden mit Hilfe einer Heparin enthaltenden Spritze abgenommen. Die Isolierung von Blutzellen wurde grundsätzlich nach dem Ficoll-Gradienten-Prinzip durchgeführt. Das Blut wurde in 10 ml PBS verdünnt, und in drei sterile 15-ml-Zentrifugationsröhrchen wurden jeweils 5 ml Ficoll vorgelegt. Das Ficoll (Biocoll) wurde vorsichtig mit dem verdünnten Blut überschichtet. Die Proben wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur und $400\times g$ (ohne Bremse und im Schwingrotor) zentrifugiert, dabei bildete sich eine Zellsuspensionsschicht zwischen den Phasen. Diese enthält die PBMC (periphere mononukleäre Blutzellen). Nach dem Absaugen mit einer Kanüle wurden die Zellen in ein neues 15-ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und dieses mit PBS aufgefüllt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 Minuten bei $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $200\times g$) wurde der Überstand abgenommen und verworfen und das Pellet in eiskaltem Medium resuspendiert (Abb. 11)

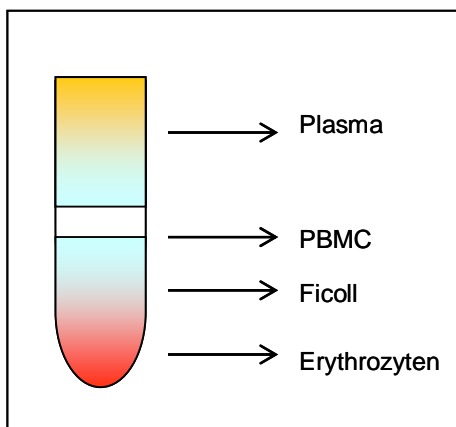


Abb. 11 Schematische Darstellung des Ficoll-Gradienten-Prinzips.

Die Erythrozyten wandern nach unten, das Plasma mischt sich nicht mit dem Ficoll und bildet die obere Phase. Dazwischen befinden sich die PBMC.

4.2.1.4 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Zellen wurden durch das Mischen mit vorgewärmtem Medium aufgetaut. Um das für das Einfrieren notwendige (für die Zellen aber toxische) DMSO vom Medium zu entfernen, wurde die Zellsuspension 5 Minuten bei $200\times g$ bei Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem Medium resuspendiert und in die Zellkulturflasche gegeben.

4.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde manuell mit Hilfe einer Zellkammer unter dem Mikroskop dreimal gezählt, es wurde der Durchschnittswert ermittelt und die Suspension auf die gewünschte Zellzahl verdünnt.

4.2.1.6 Einfrieren von Zellen

Die Zellen wurden aus der Kulturflasche gewonnen, in 250 µl vorgekühltem Medium resuspendiert und zu 750 µl Einfriermedium gegeben. Das Einfriermedium enthält DMSO, welches die Eiskristallbildung verhindert. Das gesamte Zellsuspensionsvolumen wurde in Kryogefäße aliquotiert und bei –80 °C über Nacht gelagert. Die Kryogefäße wurden danach in flüssigen Stickstoff überführt und bei –196 °C gelagert.

4.2.2 FADU (*Fluorometric analysis of DNA unwinding*)

4.2.2.1 Schädigung

Bestrahlung

Bei den Experimenten, bei denen Reparatur untersucht wurde, wurden für jeden Ansatz 100 µl Zellsuspension (1000–2000 Zellen/µl) in RPMI- oder DMEM-Medium (je nach Zelltyp) in einem 1,5-ml-Eppendorf bestrahlt, während bei Bestrahlungsexperimenten, die ausschließlich der Quantifizierung von primär induzierten DNA-Brüchen dienen, die Proben in einer 96-Well-Platte (100 µl/Well, 100–200 Zellen/µl) bestrahlt wurden. Die Dosis wurde mit einem Dosimeter gemessen.

Etoposid, Camptothecin, LPS, SIN-1, 3-Aminobenzamid, Zink, DMSO

Bei den Experimenten, bei denen Reparatur untersucht wurde, wurde 3 ml Zellsuspension (1000–2000 Zellen/µl) in RPMI- oder DMEM-Medium (je nach Zelltyp) in 15-ml-Zentrifugationsröhrchen mit der entsprechenden Substanz-Konzentration geschädigt und für einen definierten Zeitraum bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Um die toxische Substanz vom Medium zu entfernen (nur in manchen Versuchen) wurden die 3 ml Zellsuspension zentrifugiert (5 Minuten bei 200× g), und das Pellet wurde in 3 ml neues Medium resuspendiert. Danach wurden die 3 ml auf 1,5-ml-Reaktionsgefäße verteilt (jeweils 100 µl). Bei den Experimenten, die ausschließlich der Quantifizierung von primär induzierten DNA-

Brüchen dienten, wurden 100 µl Zellsuspension (1000–2000 Zellen/µl) in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen vorgelegt und mit der entsprechenden Substanz-Konzentration geschädigt. Als Negativ-Kontrolle wurde Medium ohne weitere Zusätze benutzt.

4.2.2.2 Reparatur

Die Zellen wurden nach der Schädigung in einem Wasserbad oder Inkubator, während bestimmter Zeiten bei 37 °C inkubiert. Die Kontrollproben wurden zwischenzeitlich auf Eis gelegt. Danach wurden alle Proben, inklusive der Kontrolle, mit 900 µl Suspensionspuffer verdünnt. Anschließend wurden 70 µl/Well in die (96-Well-)FADU-Platte pipettiert.

Hinweis: Die Zellkulturmedien (RPMI und DMEM) enthielten während der Schädigung und Reparatur grundsätzlich kein FCS. Die Auswirkung von FCS auf die DNA-Strangbrüche und ihre Reparatur wurde dennoch untersucht, in den Fällen wird dies in den Ergebnissen der betroffenen Experimente erwähnt.

4.2.2.3 Messung der Strangbrüche

Die Messung der DNA-Strangbrüche erfolgte mittels eines Pipettier-Roboters (Abb. 12). Um die aus dem Chromatin freigesetzte DNA vor Licht zu schützen, ist der Roboter in einem Gehäuse mit Rollläden eingebaut. Die Pipettier-Spitzen bewegen sich dreidimensional mit einer Präzision von 0,1 mm in jede Richtung. Die Aufnahme- und Abgabegeschwindigkeit sowie das aufgenommene und abgegebene Volumen und die Abgabehöhe von Puffer und Lösungen wurden programmiert. Die ganze Prozedur lief unter kontrollierten Temperatur- und pH-Bedingungen ab. Alle notwendigen Programmeinstellungen sind in Tabelle 2 zusammengefasst. Die automatisierten Schritte sind folgende:

Resuspension: Nach der Reparatur wurde auf die als Pellet vorgelegten Zellen Suspensionspuffer pipettiert.

„Homogenisierung“: Um dem Problem der Sedimentation entgegenzuwirken, wurden die Zellen vor der Übertragung auf die (96-Well-)FADU-Platte durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert.

Zelltransfer: 70 µl Zellsuspension wurden von der 96-Well-Platte in der Eisbox in die (96-Well-)FADU-Platte im Temperiermodul übertragen.

Lyse: Durch Zugabe von hochkonzentriertem Harnstoff werden die Zellproteine denaturiert. Cyclohexyl-diamintetraacetat ist ein Chelatbildner, welcher divalente Kationen bindet. SDS ist ein Detergens, welches die Zellmembran auflöst.

Entwindung: Die DNA wird unter alkalischen Bedingungen entwunden. Die alkalische Lösung (0,2 M NaOH) wird bei 0 °C sehr langsam direkt über dem Flüssigkeitsspiegel der Zellsuspension abgegeben, sodass sich eine zweite Phase bildet. Nach 5 Minuten Diffusion vom Alkali in die untere Phase (Lysat) wurden die Temperatur auf 30 °C erhöht und 60 Minuten Zeit für die Entwindung gelassen. Die Abgabehöhe ist bei den T-Werten größer, da zu diesem Zeitpunkt das Volumen der Zellsuspension durch die vorherige Zugabe des Neutralisationspuffers größer ist.

Neutralisation: Glucose neutralisiert die Entwindung durch die Absenkung des pH-Wertes. β -Mercaptoethanol ist ein Reduktionsmittel; es bricht Disulfidbrücken auf bzw. verhindert SH-Gruppen-Oxidation.

Fluoreszenzfarbstoff: Es wurde Sybr®Green verwendet. Dieser Farbstoff gibt in Anwesenheit von doppelsträngiger DNA ein Fluoreszenzsignal bei 520 nm ab (Emission), wenn er mit einer Wellenlänge von 492 nm angeregt wird (Excitation).

Spitzen waschen: Diejenigen vier Spitzen, die in Kontakt mit Sybr®Green waren, wurden mit DMSO gewaschen. Die anderen vier wurden bei Pufferwechsel und nach Kontakt mit Zellen jedesmal mit destilliertem Wasser innen und außen gespült.

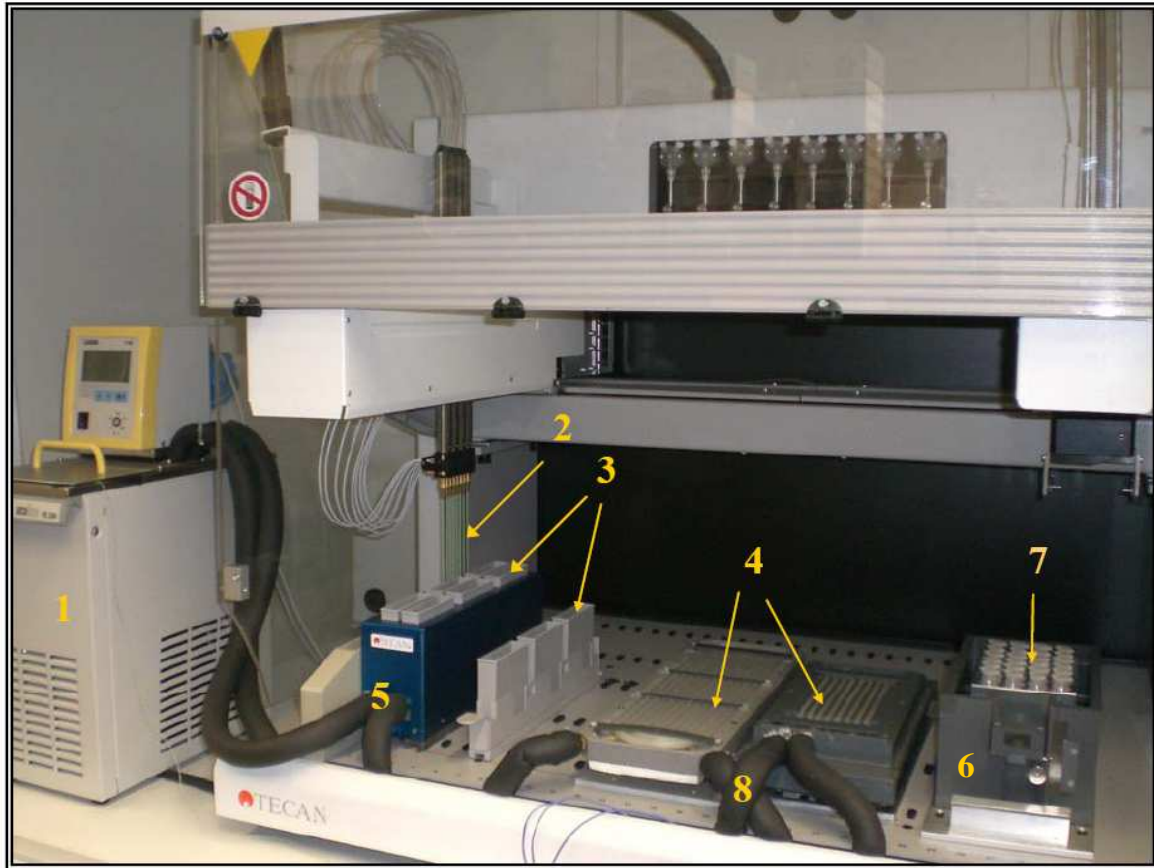


Abb. 12 TECAN-Pipettierroboter mit Versuchsaufbau für den FADU-Assay. 1) Kältethermostat. Hier werden die Temperaturstufen eingestellt/ 2) 8 Stahldüsen/ 3) Pufferbehälter temperiert (links) und bei Raumtemperatur (rechts)/ 4) Temperiermodul für drei Platten (links) und für eine Platte (rechts) / 5) Kühlwanne, hierin werden Puffer vortemperiert/ 6) Eisbox, dieser Behälter ist im Versuch mit Eis gefüllt/ 7) Aluminiumaufnahme für 2-ml-Reaktionsgefäße hier werden die Proben auf 1–2 °C temperiert/ 8) Isolierter Temperierschlauch. Er verbindet Kältethermostat mit Kühlwanne und Temperiermodul, so werden die drei benötigten Temperaturen von 0 °C, 30 °C und 22 °C hergestellt.

AUFNAHME

	Ort	Aufnahme- position in mm	v=μl/s	Vol=μl	Wiederholung	T=°C	t=min
*Resuspension	Resuspensionspuffer- Behälter	Flüssigkeit- detektion	150	100	1x	0	-
*Homogenisierung	96-Well-Platte	Flüssigkeit- detektion	150	75	2x Mischen	0	-
*Zelltransfer	96-Well-Platte	Z-Max	150	75	1x	0	-
Lyse	Lyse-Puffer- Behälter	Flüssigkeit- detektion	150	75	1x	0	-
Entwindung	Alkali-Puffer-Behälter	Flüssigkeit- detektion	150	75	1x	0 30	- -
Neutralisation	Neutralisations- Puffer-Behälter	Flüssigkeit- detektion	150	145	1x	RT	-
Fluoreszenz- farbstoff	Sybr®Green-Lösung- Behälter	Flüssigkeit- detektion	150	160	1x	RT	-
Spitzen waschen	DMSO-Behälter	Flüssigkeit- detektion	150	220	1x	22	-

ABGABE

	Ort	Abgabeposition in mm	v=μl/s	Vol=μl	Wiederholung	T=°C	t=min
Resuspension	96-Well-Platte	Z + 1	600	70	1x	0	-
Homogenisierung	96-Well-Platte	Z + 1	300	70	3x Mischen	0	-
Zelltransfer	(96-Well-)FADU-Platte	Z + 12	300	70	1x	0	-
Lyse	(96-Well-)FADU-Platte	Z + 6	100	70	1x	0	12
Entwindung	(96-Well-)FADU-Platte	T → Z + 10,3 P → Z + 13	10	70	1x	0 30	5 60
Neutralisation	(96-Well-)FADU-Platte	Z + 0	200	140	1x	22	-
Fluoreszenz- farbstoff	(96-Well-)FADU-Platte	Z + 0	100	156	1x Mischen	22	5
Spitzen waschen	Abfall-Behälter	Z + 0	600	220	1x	22	-

Tab. 2 Notwendige Einstellungen im Pipettier-Programm und am Kältethermostat. Aufnahmehöhe: Z-Max ist die tiefste von den Pipettenspitzen erreichbare (Aufnahme-) Höhe, bei der der Plattenboden nicht berührt wird. Der Programm-Befehl „Flüssigkeits-Detektion“ wurde für die Aufnahme von Puffer und Lösungen verwendet. Die Detektion geschieht vollautomatisch nach dem elektrostatischen Prinzip zwischen den Pipettier-Spitzen und der zu detektierenden Flüssigkeit. Abgabehöhe: Z ist die Höhe, wo die Oberkante der (96-Well-)FADU-Platte erreicht wird. Z+1 ist 1 mm tiefer als die Z-Höhe, etc. „Mischen“ heißt das Auf- und Abpipettieren, um die Zellen zu resuspendieren und die Zellsuspension zu homogenisieren; dafür fahren die Spitzen bis auf Z-Max.

4.2.2.4 Detektion des Fluoreszenzsignals

Nach der Zugabe von Sybr®Green wurde die (96-Well-)FADU-Platte mit den Proben aus dem Roboter herausgenommen und bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Die Messung des Fluoreszenzsignals wurde mit einem Fluorimeter bei einer Anregungswellenlänge von 492 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm durchgeführt. Die Werte wurden mit dem Programm Kc4 ermittelt und in Excel ausgewertet.

4.2.2.5 Waschprotokoll für die Platten

Die (96-Well-)FADU-Platte wurde in 1 M NaOH-Lösung eingetaucht, nach 60 Minuten herausgenommen, gründlich unter laufendem Wasser gespült, für 5 Minuten in DMSO eingetaucht, nochmals gründlich unter laufendem Wasser gespült, erneut für 5 Minuten in DMSO eingetaucht und ebenso mit Wasser gespült. Zum Schluss wurde die Platte zweimal für jeweils 5 Minuten in 70 % EtOH gelegt und abgetropft.

4.2.2.6 Waschprotokoll der Roboter-Behälter

Die Roboter-Behälter für die Puffer und Lösungen wurden mit laufendem destillierten Wasser gründlich gespült. Die Behälter für Sybr®Green-Lösung und DMSO wurden markiert und ausschließlich für diesen Zweck verwendet.

4.2.3 Immunfluoreszenz

4.2.3.1 Vorbereitung

Die Zellen wurden in einer 6-Well-Platte (2 ml Medium/Well) mit einem Deckglas/Well ausplattiert und bei 37 °C bis zum Erreichen einer Konfluenz von 50–70 % inkubiert.

4.2.3.2 Schädigung und Reparatur

Die Zellen wurden in der 6-Well-Platte bestrahlt oder mit Etoposid für 5–60 Minuten (je nach Versuch) bei 37 °C inkubiert, danach wurden das Medium abgesaugt und 2 ml frisches Medium zu jedem Well pipettiert. Für die Reparatur wurde die 6-Well-Platten bei 37 °C während bestimmter Zeiten im Brutschrank inkubiert.

4.2.3.3 Immunfluoreszenz

Nach der Schädigung und Reparatur wurden das Medium abgesaugt und die Deckgläser in den Wells mit 2 ml/Well kaltem PBS (4 °C), zweimal für jeweils 10 Minuten gewaschen, danach wurden die Zellen mit 2 ml/Well Methanol für 5 Minuten bei –20°C fixiert. Danach wurde das Methanol abgesaugt, und die Objektträger wurden dreimal für jeweils 10 Minuten mit PBS (2 ml/Well) rehydriert. Mit einer feinen Pinzette wurden die Deckgläser auf einem Stück Parafilm in einer 15-cm-Petrischale mit einem Stück nassem Papier übertragen. Auf jedes Deckglas wurden 200 µl Blockpuffer pipettiert und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 60 Minuten wurden der Blockpuffer mit einer Pipette entfernt, der erste Antikörper anti- γ H2AX, 1:800 in Blockpuffer verdünnt (200 µl/Deckglas), zugegeben und für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Deckgläser wurden in eine 6-Well-Platte transferiert und viermal für jeweils 10 Minuten mit 2 ml/Well Waschlösung unter leichtem Schwanken (Schüttler) gewaschen. Mit einer feinen Pinzette wurden die Deckgläser auf ein Stück Parafilm in einer 15-cm-Petrischale mit einem Stück nassem Papier übertragen mit dem zweiten Antikörper Alexa Fluor[®] 546, 1:200 in Blockpuffer verdünnt (200 µl/Deckglas), für 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Deckgläser wurden danach wieder in eine 6-Well-Platte übertragen und mit Waschlösung (200 µl/Well) 4x10 Minuten gewaschen, dabei wurde die 6-Well-Platte mit Aluminiumfolie umwickelt, um eine Lichtexposition zu vermeiden. Danach wurden die Deckgläser mit Vectorshield-Mounting-Medium mit DAPI auf Objektträger gebracht und nach frühestens zehn Minuten mit dem Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet.

4.2.4 Cell survival assay

Die Zellen wurden in Petrischalen (Ø 10 cm) plattiert, pro Petrischale, Zelltyp (AA8, V3, irs1SF) und Bestrahlungsdosis jeweils 2000, 1000 und 500 Zellen in 10 ml Medium (Fig. 10).

Nach 7 bis 10 Tagen im Inkubator wurden Kolonien sichtbar, das Medium wurde abgesaugt, die Kolonien mit 0,4% Kristallviolett (10 ml/Petrischale) für 10 Minuten gefärbt, danach wurden das Kristallviolett unter laufendem Wasser ausgespült und die Kolonien mit einer ColCountTM-Maschine gezählt.

4.2.5 Mikrogelelektrophorese (Comet Assay)

Jurkat-Zellen (2 ml) wurden in einer 6-Well-Platte bestrahlt, bzw. für eine Stunde mit Etoposid bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Der Comet-Assay wurde nach dem Protokoll von Trevigen, *CometAssayTMHT*, Katalog # 4252-040-K, durchgeführt, die alkalische Version nach Bestrahlung und die neutrale Version nach Etoposid-Behandlung.

5. Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in fünf Kapitel gegliedert.

Kapitel 1

Weiterentwicklung des automatisierten *Fluorimetric analysis of DNA unwinding* (FADU)-Assays

Vor Beginn der Doktorarbeit war eine Messstation zur Durchführung des automatisierten FADU-Assays als Prototyp sowie ein darauf abgestimmtes Messprotokoll entwickelt worden. Als erster Schritt im Rahmen der Doktorarbeit stand die Weiterentwicklung der Messstation und die Optimierung der Abläufe an. Dies wird in den folgenden Abschnitten beschrieben.

5.1.1 Einbau von neuen Modulen

5.1.1.1 Eisbox für Eppendorf-Reaktionsgefäße

Für die Quantifizierung der DNA-Reparatur wurde ein neues Modul entwickelt. Um den Zellen die DNA-Reparatur zu erlauben, wurden diese in 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße auf 37 °C inkubiert. Um die Reparatur anzuhalten, wurde die Zellsuspension mit eiskaltem Suspensionspuffer verdünnt, und die Reaktionsgefäße sofort auf 0 °C gestellt. Die Gewährleistung einer Kühlung auf 0 °C wurde dank dieses neuen Moduls erreicht, welches auch einen integrierten Magneten für das Anbringen des Strahlen-Dosimetersensor enthält. Da die Temperatur die Messung beeinflussen kann, ist dieser Sensorhalter außerhalb der Eisbox angebaut (Abb. 13).



Abb. 13 Eisbox für 2-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäße. 1) Träger für die Eisbox/ 2) Eisbox/ 3) Metallträger für die Reaktionsgefäße/ 4) Reaktionsgefäße/ 5) Halter für den Dosimetersensor; 5a) Lineal, um den Sensor zu positionieren (Konstruktionsentwurf von Dipl. Biol. Thilo Sindlinger)

Ergebnis

Mit diesem neuen Modul wurden die Resuspension von sedimentierten Zellen und ihre Übertragung auf die (96-Well-)FADU-Platte automatisiert. Außerdem kann es auch für die Bestrahlung der Proben benutzt werden und ermöglicht eine genaue Messung der Strahlendosis, indem der Dosimetersensor millimetergenau auf die gleiche Höhe wie die zu bestrahlenden Zellen positioniert werden kann.

5.1.1.2 Temperiermodul

Damit die Proben die nötige Temperatur erreichen, ist die (96-Well-)FADU-Platte auf einem Temperiermodul aufgestellt. Dieses ist mit einem Wasserbad verbunden, welches die Änderung der Temperatur steuert. Auf diesem Temperiermodul war bis jetzt die Aufstellung von nur einer einzigen (96-Well-)FADU-Platte möglich. Das neue Modul hat hingegen eine Kapazität für drei Platten (Abb. 14).

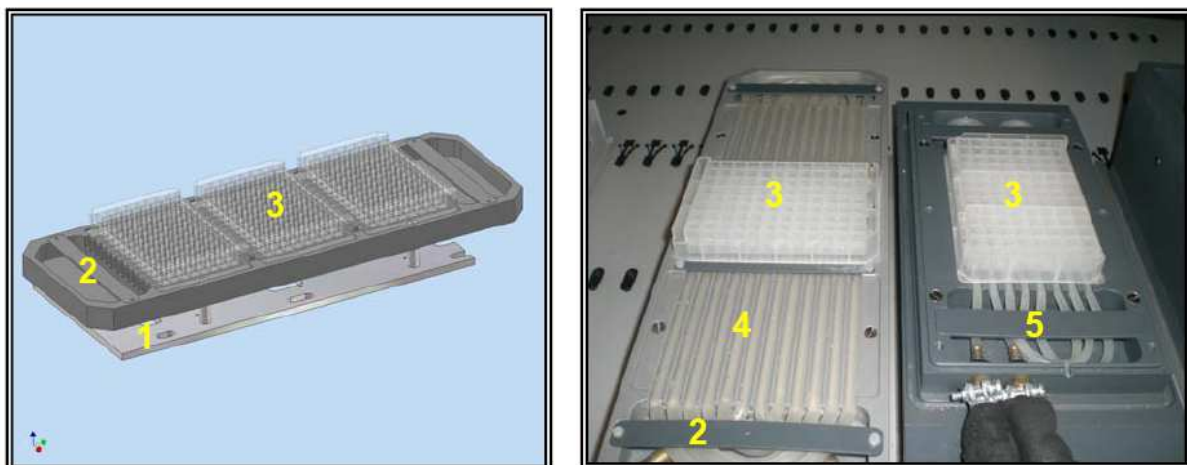


Abb. 14 Temperiermodul. Links: Zeichnung der wiss. Werkstatt der Universität Konstanz. Rechts: Eingebaute Temperiermodule in der Arbeitsfläche des Roboters. 1) Träger für das Temperiermodul; 2) Temperiermodul für drei (96-Well-)FADU-Platten; 3) (96-Well-)FADU-Platte; 4) Silikonschlauch, der mäanderartig das Temperiermodul durchzieht, um die Platte schnell und homogen zu temperieren; 5) Temperiermodul für eine Platte.

Ergebnis

Mit dem neuen Temperiermodul ist es möglich, bis zu drei Platten gleichzeitig zu messen und damit den Probendurchsatz massiv zu erhöhen.

5.1.2 Erhöhung der Empfindlichkeit

Um die Empfindlichkeit der automatisierten FADU-Methode zu erhöhen, wurden folgende Parameter optimiert:

Mischen nach Zugabe von SybrGreen-Lösung

Nach der Zugabe der Lysepuffer zur Zellsuspension wird diese, wegen der DNA-Freisetzung, hochviskös. Es wurde angenommen, dass die SybrGreen-Moleküle nur ineffizient diffundieren würden. Das Auf- und Abpipettieren von SybrGreen sollte die Diffusion erleichtern und eine homogene Verteilung ermöglichen, so dass die Genauigkeit der Messungen erhöht würde, was sich in kleineren Standardabweichungen manifestieren sollte. Durch Mischen könnten aber auch unerwünschte DNA-Strangbrüche entstehen.

Es wurde durch Austesten verschiedener Pipettierbedingungen festgestellt, dass eine Mischung von 1x 400 µl mit einer Geschwindigkeit des Auf- und Abpipettierens von 100 µl/s keine zusätzlichen DNA-Strangbrüche verursacht. Der Effekt von „Mischen“ auf die Entwindung wurde mit Hilfe der T-Werte (absolute DNA-Menge) in Jurkat-Zellen (250 Zellen/µl) untersucht (Abb. 15).

Ergebnis

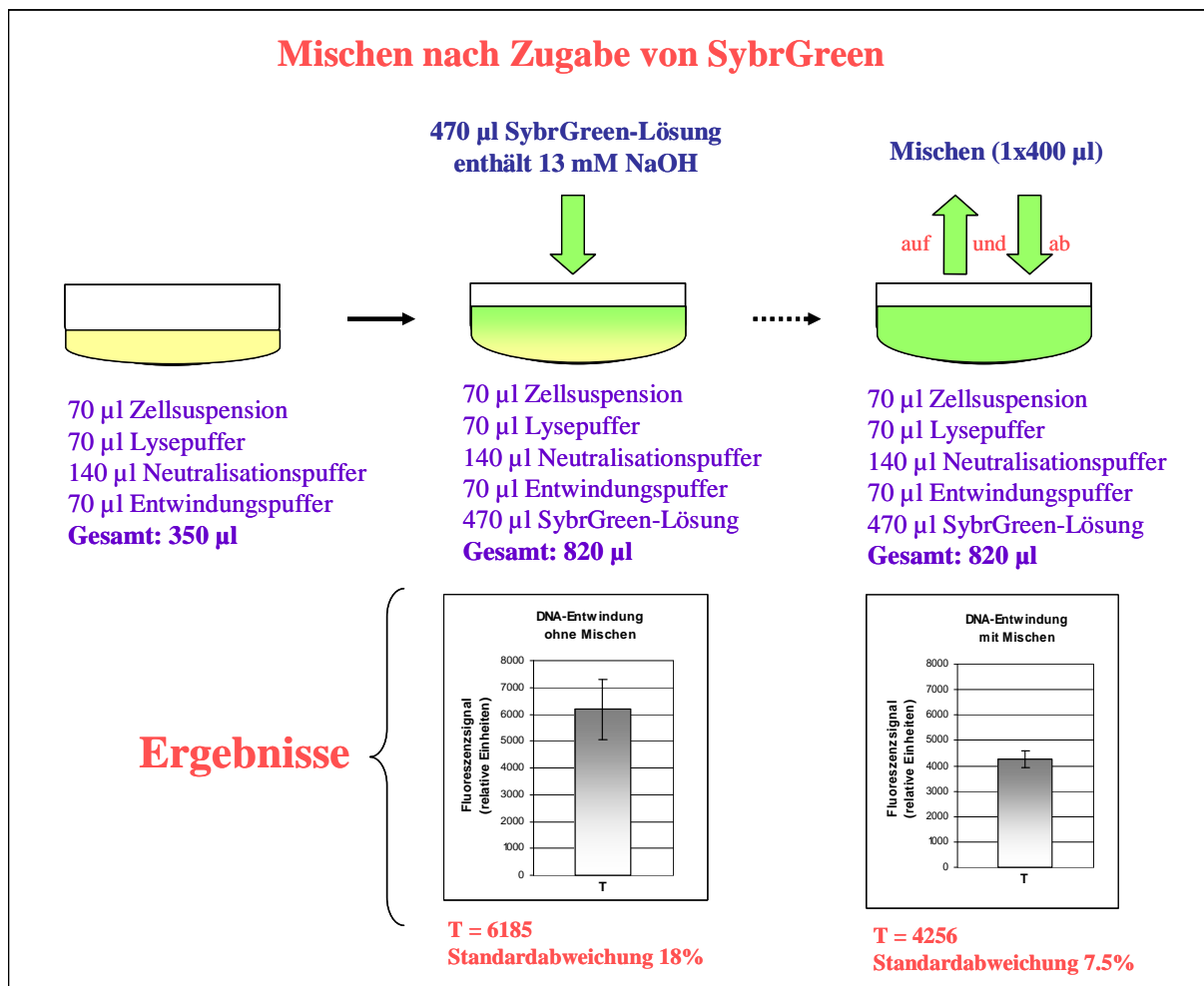


Abb. 15 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit Ergebnissen. Links: Zellysats nach der Zugabe aller Puffer (gelb). Mitte: Zugabe von SybrGreen-Lösung (1:25.000 SybrGreen®; 13,3 mM NaOH) ohne Mischen (gelb/grün). Rechts: Mischen nach Zugabe von SybrGreen-Lösung (grün). Unten grafische Darstellung der dazugehörigen Ergebnisse (Fluoreszenzsignal und Standardabweichung in Achtfachbestimmung).

Interpretation

Wie erwartet wurden die Standardabweichungen durch das Mischen und Homogenisieren des Zellysats geringer, aber es wurde auch der absolute T-Wert (entspricht dem Anteil an doppelsträngiger DNA) auch geringer. Das heißt, dass das Mischen eine weitere und unerwünschte Entwindung der DNA verursacht. Das könnte man durch die Anwesenheit von NaOH in der SybrGreen-Lösung erklären.

Auswirkung von NaOH in der SybrGreen-Lösung auf die DNA-Entwindung

Um eine Renaturierung der DNA nach der Zugabe der SybrGreen-Lösung zu vermeiden, enthält diese 13,3 mM NaOH. Die Auswirkung der NaOH wurde mit Hilfe des T-Wertes in Jurkat-Zellen (250 Zellen/ μ l) unter folgenden Bedingungen untersucht:

1. SybrGreen-Lösung enthält 13,3 mM NaOH und wird mit dem Zelllysate durch Auf- und Abpipettieren gemischt.
2. SybrGreen-Lösung enthält keine NaOH und wird auch nicht mit dem Zelllysate gemischt.
3. SybrGreen-Lösung enthält keine NaOH, wird aber mit dem Zelllysate gemischt.

Ergebnis

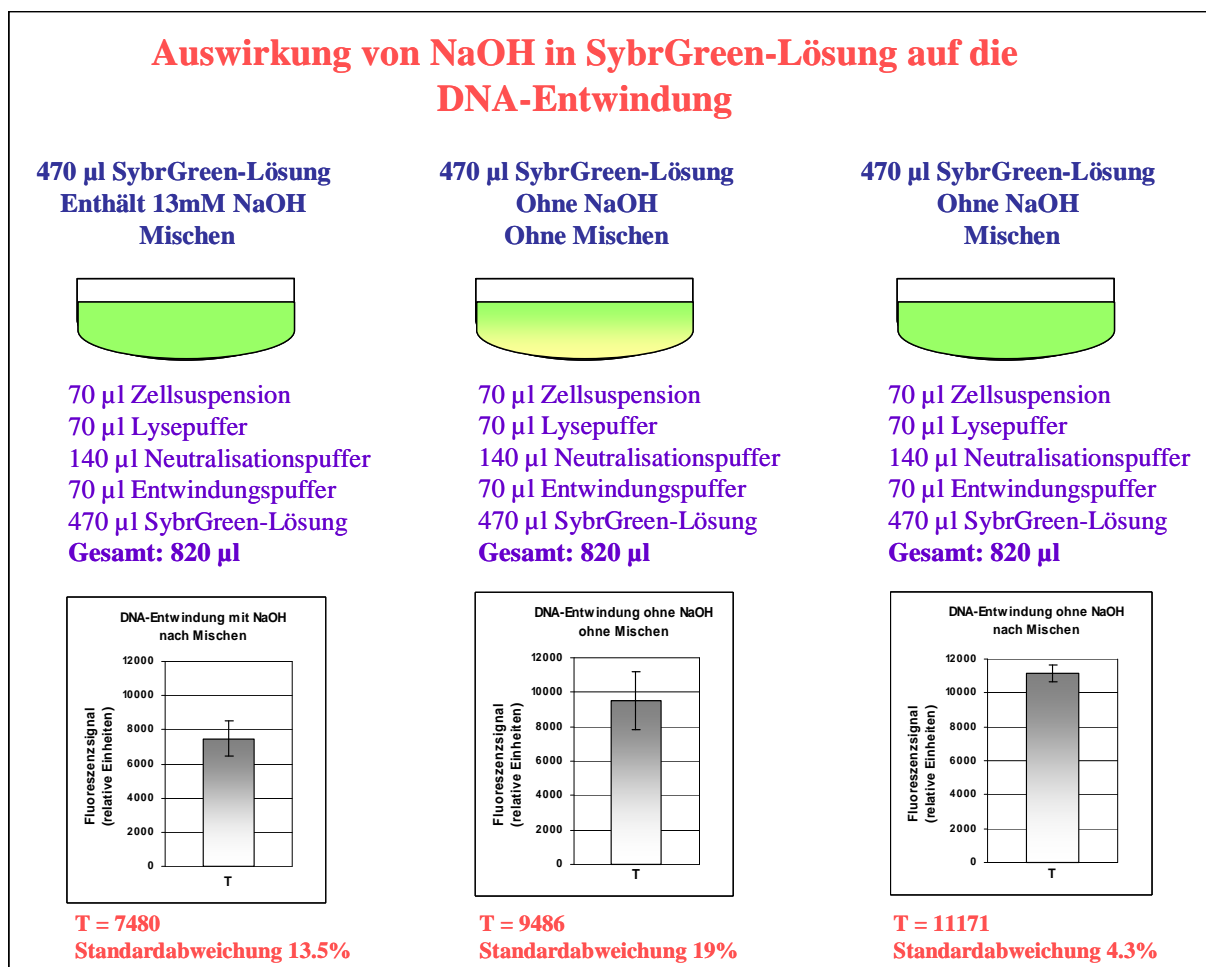


Abb. 16 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit Ergebnissen. Links: SybrGreen enthält NaOH und wird mit dem Zelllysate gemischt. Mitte: SybrGreen ohne NaOH, keine Mischung mit dem Zelllysate. Rechts: SybrGreen ohne NaOH, Mischung mit dem Zelllysate. Unten grafische Darstellung der dazugehörigen Ergebnisse (Fluoreszenzsignal und Standardabweichung in Achtfachbestimmung).

Interpretation

Hier bestätigt sich die Verbesserung der Standardabweichung durch das Mischen (Abb. 16 Graphen links und rechts). Das Fehlen von NaOH in der SybrGreen-Lösung hat ein hohes Fluoreszenzsignal (absoluter T-Wert) zur Folge. Hiermit ist gezeigt, dass das Mischen in Kombination mit NaOH in der SybrGreen-Lösung eine weitere DNA-Entwindung bewirkt.

Zeitverlauf der Intensität des SybrGreen-Fluoreszenzsignals

Idealerweise wird durch die Zugabe von Neutralisationspuffer die Entwindung der DNA angehalten und dies sollte sich auch durch Zugabe der SybrGreen-Lösung nicht verändern. Um dies zu prüfen, wurde das Fluoreszenzsignal nach Zugabe von SybrGreen sofort und nach 10, 20 und 30 Minuten im Fluorimeter gemessen. Hier wurden die T- (absolute DNA-Menge), P0- (Entwindung ohne Schädigung), P1- (Entwindung nach Bestrahlung mit einer Dosis von 0,29 Gy) und P2-Werte (Entwindung nach 2,1 Gy) in humanen PBMC (600 Zellen/ μ l) verglichen.

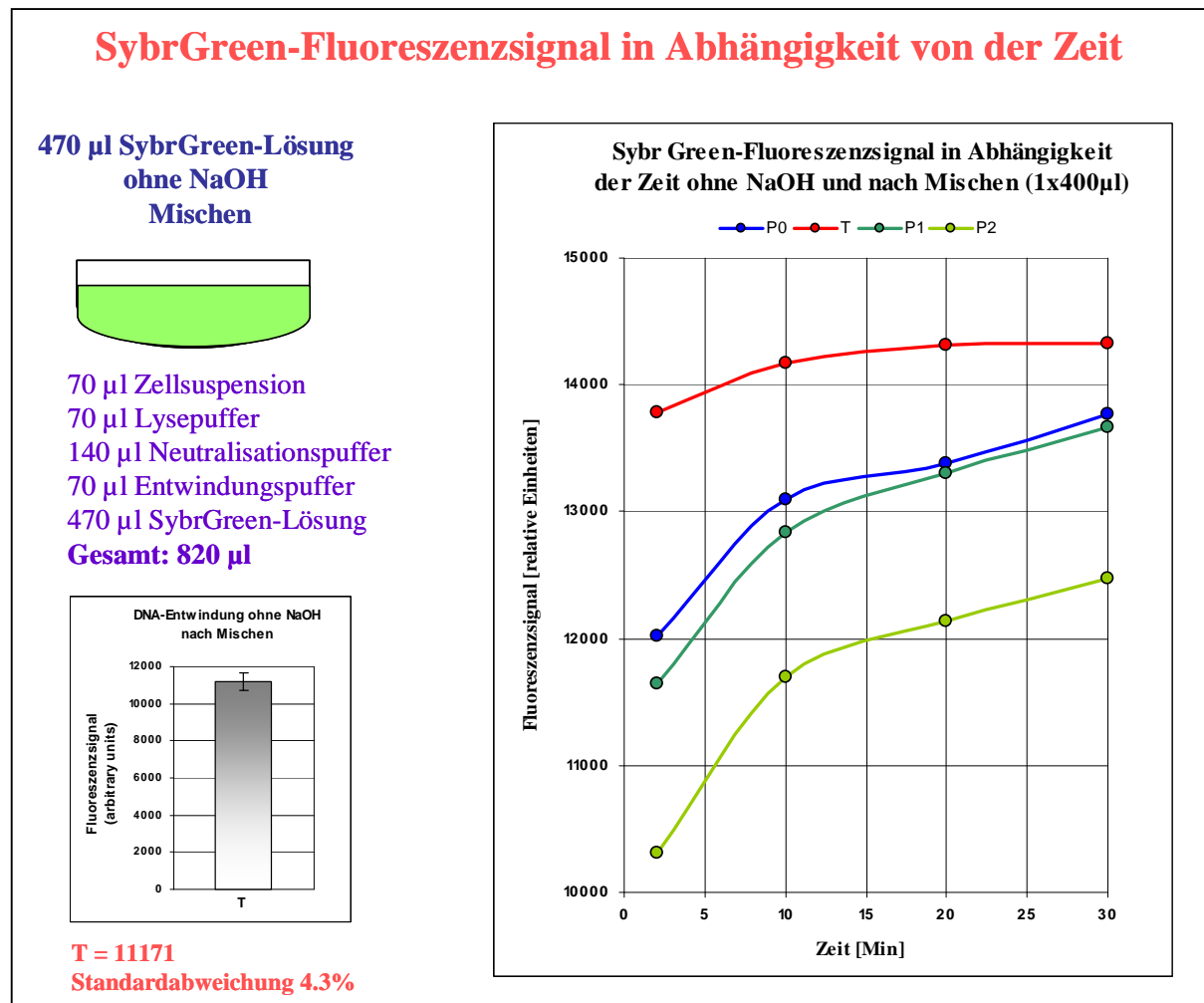
Ergebnis

Abb. 17 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit Ergebnissen. Links: Versuchsbedingungen, SybrGreen enthält keine NaOH und wird mit dem Zelllysate gemischt, links unten: Grafische Darstellung des T-Wertes und der dazugehörigen Standardabweichung in Achtfachbestimmung. Rechts graphische Darstellung des Fluoreszenzsignals in Abhängigkeit von der Zeit.

Interpretation

Das Fluoreszenzsignal nimmt mit der Zeit zu, was bedeutet, dass eine Renaturierung der DNA stattfindet. Abgesehen davon verlaufen die vier Kurven (T, P0, P1 und P2) nicht parallel, das bedeutet unterschiedliche Verhältnisse einzelnen Punkte (T, P0, P1 und P2) zueinander, je nach Zeitpunkt der Messung. Daher waren weitere Optimierungen vonnöten (Abb. 17).

Reduktion des Volumens der SybrGreen-Lösung

Wie schon erwähnt wurde im ursprünglichen FADU-Protokoll NaOH der SybrGreen-Lösung zugegeben, um das Problem der Renaturierung der DNA nach Zugabe von SybrGreen zu umgehen. Es wurde aber festgestellt, dass das Mischen eine Reduktion der Standardabweichung auf die Hälfte mit sich bringt (Abb. 15) und dadurch eine Erhöhung der Empfindlichkeit bewirkt. Eine Verbesserung der Empfindlichkeit wird nach wie vor angestrebt, deshalb wurde weiterhin auf NaOH in der SybrGreen-Lösung verzichtet. Nun wurde, um das Problem der Renaturierung zu umgehen, das Volumen an SybrGreen-Lösung reduziert, wodurch der davor zugegebene Entwindungspuffer weniger verdünnt wird, sodass das Endvolumen eine höhere Konzentration an NaOH enthält. Die SybrGreen-Menge wurde aber nicht geändert. Für diese Experimente wurden die T-, P0-, P1- und P2-Werte in humanen PBMC (341 Zellen/ μl) untersucht (P1 = 0,29 Gy; P2 = 2,1 Gy).

Ergebnis

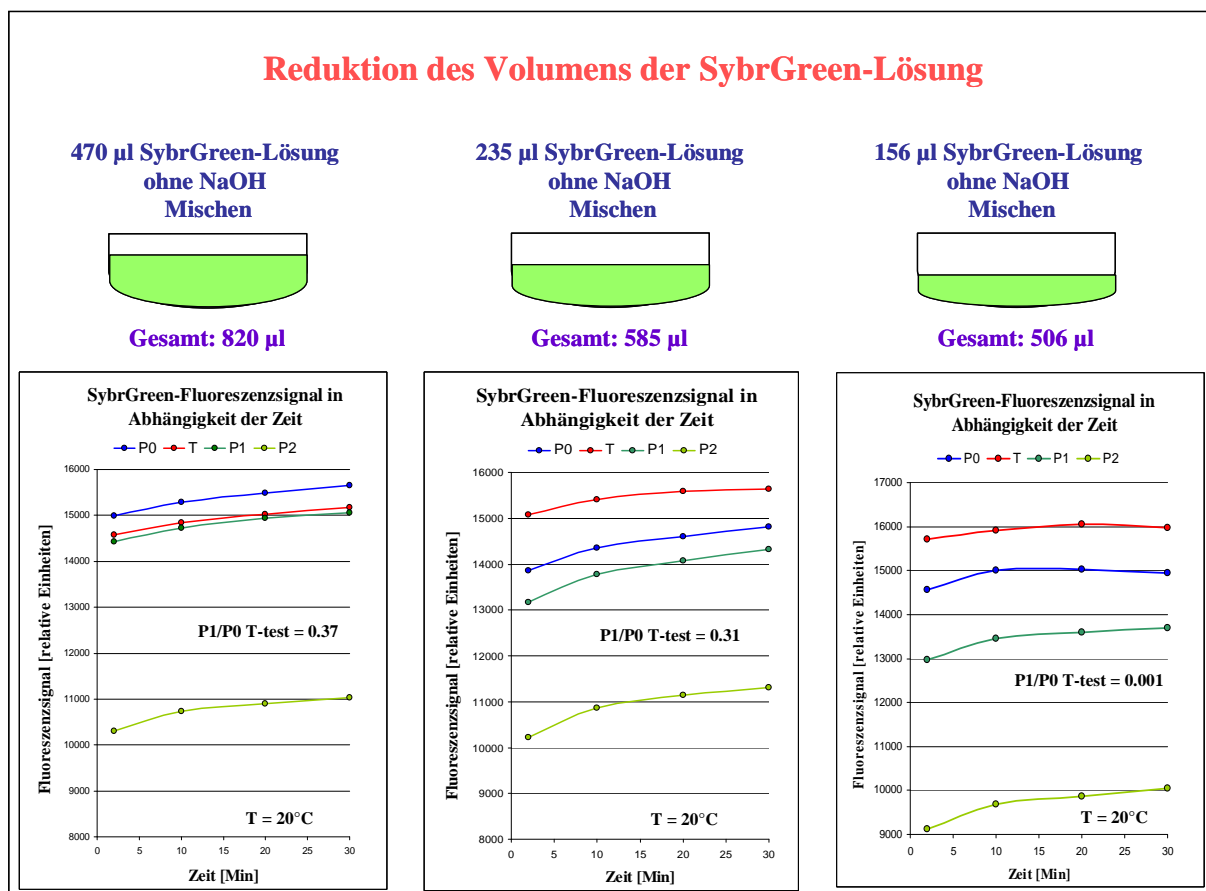


Abb. 18 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit Ergebnissen. Links: Zugabe von 470 μl SybrGreen-Lösung. Mitte: Zugabe von 235 μl SybrGreen-Lösung. Rechts: Zugabe von 156 μl SybrGreen-Lösung.

Durch das Reduzieren des Endvolumens wurde nicht nur die DNA-Renaturierung verhindert, sondern auch eine höhere Auflösung zwischen den vier Werten erreicht (Abb. 18). Dieses zusammen mit dem Mischen und dem Verzicht auf NaOH in der SybrGreen-Lösung ermöglichen die Detektion von DNA-Strangbrüchen nach einer Bestrahlungsdosis von 0,14 Gy gegenüber der unbestrahlten Kontrolle (P0) mit einer statistischen Signifikanz ($p < 0,05$ nach dem t-Test, Abb. 19). Außerdem erlaubt die Erhöhung des Fluoreszenzsignals durch das Mischen eine Reduktion der benötigten Zellzahl auf bis zu 100 Zellen/ μl .

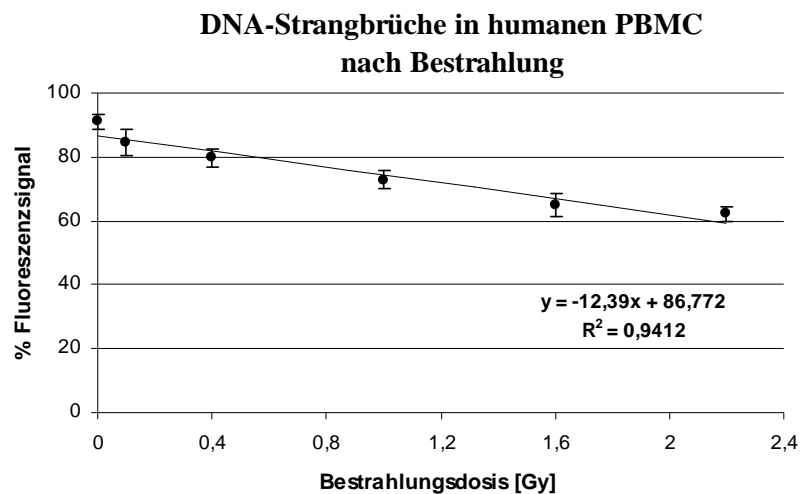


Abb. 19 DNA-Entwindung in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis. Humane PBMC wurden mit verschiedenen Dosen zwischen 0,14 und 2,2 Gy bestrahlt. Mit zunehmender Dosis nimmt das Fluoreszenzsignal, das heißt der Anteil an doppelsträngiger DNA nach Ablauf des FADU-Protokolls, ab. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Vierfachbestimmung. t-Test für den Vergleich 0,14 Gy vs. 0 Gy: $p=0,02$

5.1.3 Optimierung von Protokollen

Die Detektion von DNA-Strangbrüchen mittels FADU basiert auf der Denaturierung der DNA unter alkalischen Bedingungen. Das bis jetzt vorgestellte Protokoll wurde in humanen PBMC und Jurkat-Zellen für eine hohe Empfindlichkeit optimiert, weswegen stark alkalische Bedingungen vorherrschen.

Der P0-Wert ist ein Maß für die DNA-Strangbrüche unter „physiologischen Bedingungen“ (Enden der Chromosomen und Replikationsgabeln). Idealerweise liegt dieser Wert in der Nähe des T-Wertes (Abb. 21), was für die humanen PBMC der Fall ist. Andere Zelllinien weisen niedrigere P0-Werte auf, lassen sich aber trotzdem mit dem hier optimierten Protokoll gut

untersuchen. Dagegen werden mitochondriale DNA (mtDNA) und Plasmid-DNA (4,7 kb) unter diesen Bedingungen mit nur einem einzigen DNA-Strangbruch zu 80 bis 100 % entwunden (Abb. 20).

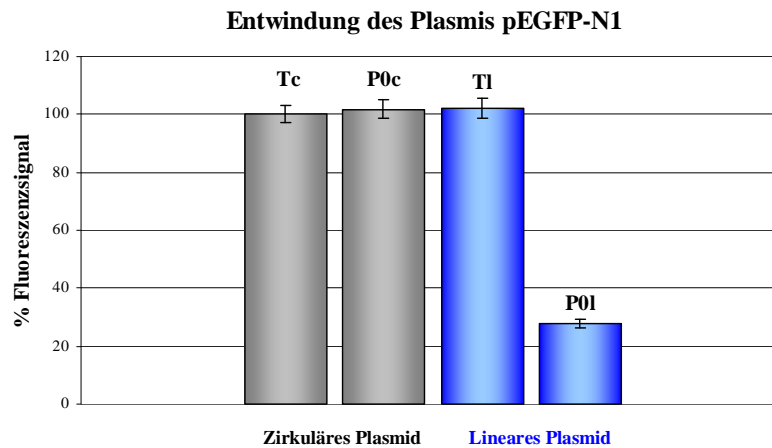


Abb. 20 Entwindung des Plasmids pEGFP-N1. Die zirkuläre Form des Plasmids (Tc und P0c) enthält keine DNA-Strangbrüche und wurde deshalb nicht entwunden. Zur Generierung der linearen Form (Tl und P0l) wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* linearisiert. In Tl fand aus chemischen Gründen keine Entwindung statt, denn hier war der Neutralisationspuffer vor dem Entwindungspuffer dazugegeben worden; P0l hingegen wurde entwunden. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Vierfachbestimmung (Diplomarbeit María Moreno, 2004).

Auch manche Zellen, die von Natur aus eine hohe Anzahl an DNA-Strangbrüchen aufweisen, lassen sich hier unter diesen starken Entwindungsbedingungen nicht gut untersuchen. Beispiele hierfür sind CHO-Zellen und Vogel-Erythrozyten (Abb. 21), die, im Gegensatz zu den Erythrozyten von Säugetieren, noch über einen Zellkern verfügen. Hier ist eine Anpassung von den Entwindungsbedingungen notwendig.

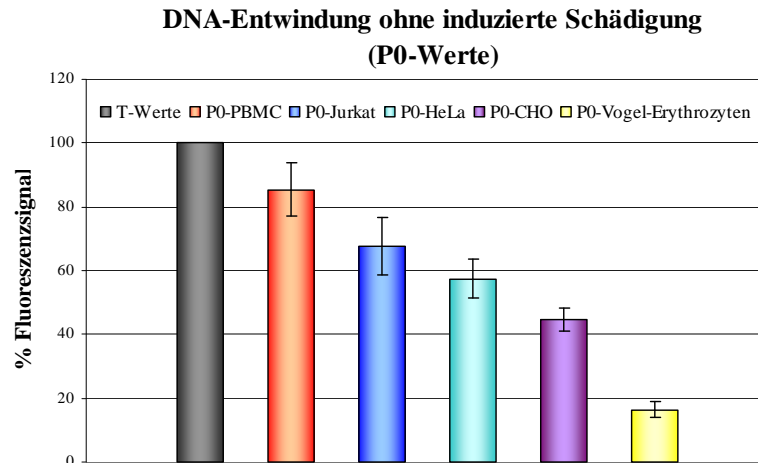


Abb. 21 DNA-Strangbrüche unter physiologischen Bedingungen in verschiedenen Zellsystemen. T stellt den Referenzwert ohne Entwindung dar (grau). Die DNA von humanen PBMC (rot), Jurkat-Zellen (blau) und HeLa Zellen (grün) bleibt nach Entwindung über 50 % doppelsträngig. Bei CHO-Zellen (violett) und Vogel-Erythrozyten (gelb) wird die DNA zu mehr als 50 % entwunden. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von 50 Experimenten (P0-CHO von drei Experimenten).

Protokoll für Vogel-Erythrozyten-DNA

Im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Anne Peters (MPI für Ornithologie/Vogelwarte Radolfzell) kamen Blutproben von Vögeln zur Messung im FADU-Assay. Es wurden im Rahmen eines an der Vogelwarte laufenden Projekts Alter, Geschlecht, Mauser und Fettablagerung für 48 Individuen (Blaumeisen und Mönchsgrasmücken) dokumentiert. Die Vögel wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, wobei eine Gruppe mit Anthozyanen, die eine antioxidative Wirkung besitzen, gefüttert wurde, während die Kontrollgruppe eine Standard-Diät erhielt. Die Zufütterung mit Anthozyanen sollte die DNA vor oxidativem Stress schützen; für diesen Fall wurde eine geringere DNA-Entwindung bei den P0-Proben erwartet. Um dies zu testen, wurde 1 µl Vogelblut in 10 ml Suspensionspuffer verdünnt, was zu einer Zellzahl von 250–300 Erythrozyten/µl führte. Davon wurden 70 µl/well für die Untersuchung der T- und P0-Werte verwendet. Die Entwindungsbedingungen wurden wie folgt geändert: 0,1 M NaOH im Entwindungspuffer (statt 0,2 M), Entwindung bei 0 °C (statt bei 30 °C), und es wurde 0 min Entwindungszeit zugelassen (statt 60 Minuten). Mit diesem dafür optimierten Protokoll liegen die P0-Werte zwischen 96,9 und 76,16 %.

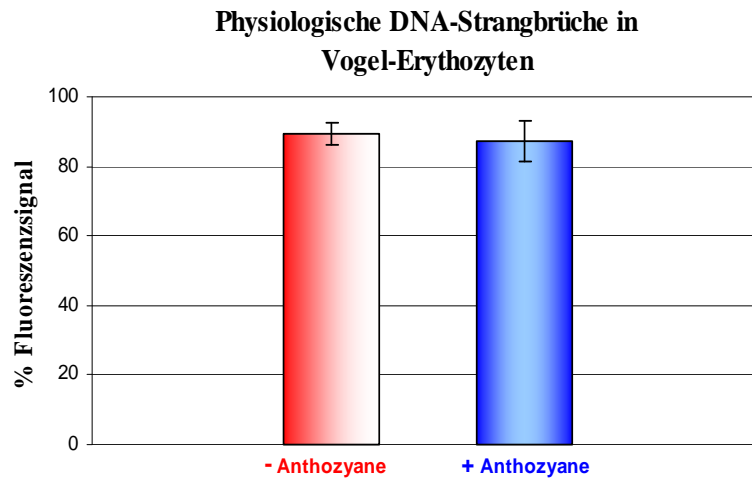
Ergebnis

Abb. 22 DNA-Strangbrüche von Vogel-Erythrozyten unter physiologischen Bedingungen. 48 Vögel wurden mit einer Standard-Diät (rot) oder zusätzlich mit Anthozyanen (blau) gefüttert. Die Fluoreszenzintensität ist in % der T-Werte angegeben. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von 25 (rot) und 23 (blau) Vögeln.

Interpretation

Was die Anthozyan-Zufütterung betrifft, wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den DNA-Strangbrüchen (P0-Werte) der Vögel der zwei Gruppen gefunden (Abb. 22).

Protokoll für Plasmide und mitochondriale DNA (mtDNA)

8-oxoG-Schäden wurden in Plasmid-DNA durch Inkubation mit SIN-1 induziert. Danach wurde das Plasmid mit dem Enzym Formamidopyrimidin-Glykosylase (Fpg) inkubiert. Fpg erkennt spezifisch 8-oxoG und erzeugt an dieser Stelle in der DNA einen Einzelstrangbruch, der mithilfe des FADU-Assays erfasst werden kann. Um diese oxidativen Schäden in Plasmiden zu messen, musste jedoch das FADU-Protokoll für die Entwindung geändert werden. Nach mehreren Versuchen wurde die Entwindungs-Bedingung auf 0 °C bei 45 Sekunden Entwindungszeit optimiert (Abb. 23).

Ergebnis

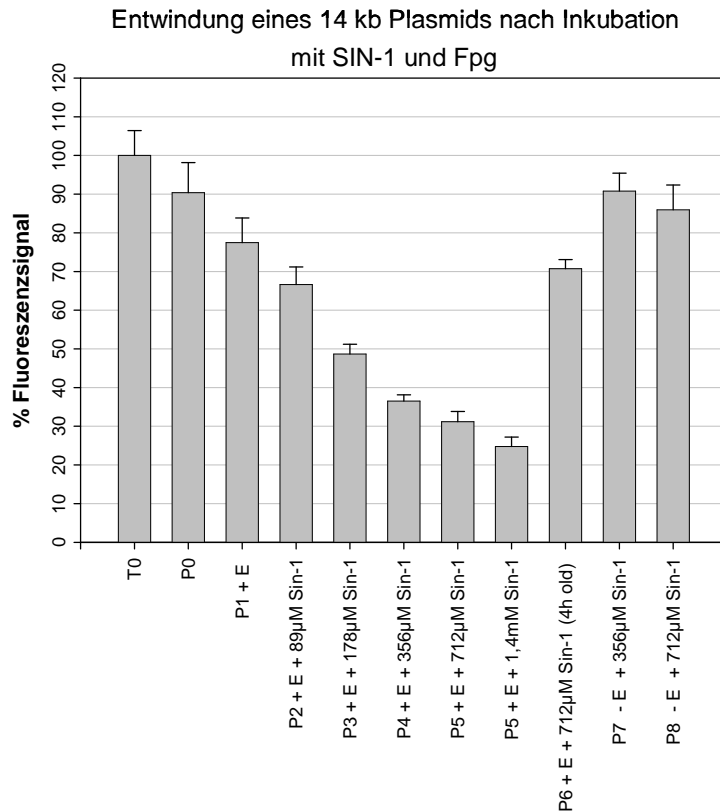


Abb. 23 Nachweis von 8-oxoG in Plasmid-DNA mit der automatisierten FADU-Methode.

T0 repräsentiert die absolute DNA-Menge und ist als 100% definiert. P0 ist die DNA-Entwindung ohne SIN-1 induziertes 8-oxoG. P1 ist die Entwindung nach Inkubation mit dem Enzym Fpg (E) und ohne induzierte 8-oxoG. P2 – P5 stellt die Zunahme der Entwindung mit zunehmenden SIN-1 Konzentrationen (indirekter Nachweis durch die Wirkung von Fpg). Mit Induktion von 8-oxoG durch SIN-1 ohne Fpg (erster und zweiter Balken von rechts) wurden keine DNA-Strangbrüche nachgewiesen. Mit Inaktivierung von SIN-1 mit der Zeit (4 Std) verringert sich die Entwindung (dritter Balken von rechts). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Achtfachbestimmung. (N.B. Diese Experimente wurden in enger Zusammenarbeit mit Dipl. Biol. Joachim Kienhöfer durchgeführt).

Für das Protokoll für die Untersuchung von Strangbrüchen in mtDNA wurde zusätzlich der Entwindungspuffer 1:2,8 in Suspensionspuffer verdünnt und die Entwindungszeit auf 15 Sekunden verkürzt (Abb. 24).

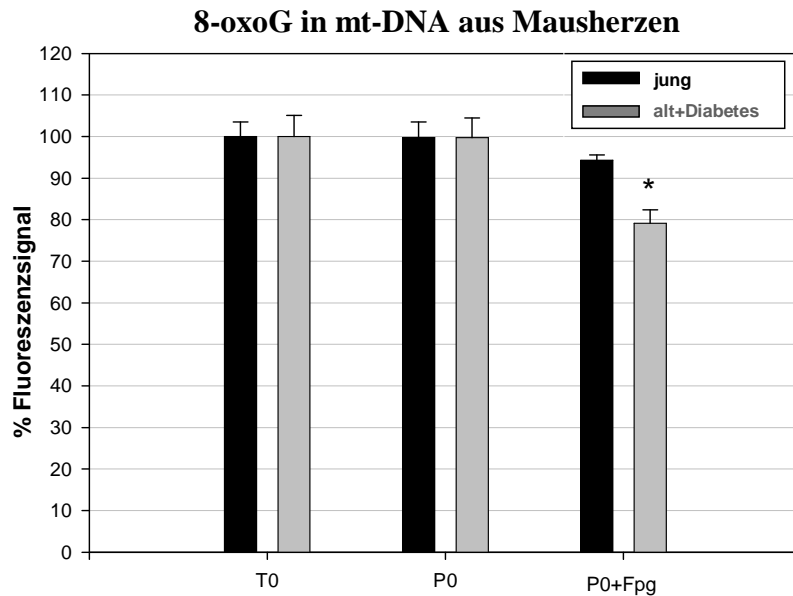
Ergebnis

Abb. 24 Indirekter Nachweis von 8-oxoG in mtDNA von Mäusen mit der automatisierten FADU-Methode.

T0 repräsentiert die absolute DNA-Menge und ist auf 100 % normiert. P0 ist die DNA-Entwindung ohne Fpg. Das Fluoreszenzsignal nimmt nach der Inkubation mit dem Enzym Fpg ab (P0+Fpg). Die schwarzen Balken repräsentieren 3 Monate alte Mäuse und die grauen Balken 10 Monate alte Mäuse mit Diabetes. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Vierfachbestimmung, $*=p<0,001$. (N.B. Diese Experimente wurden in enger Zusammenarbeit mit Dipl. Biol. Joachim Kienhöfer durchgeführt.)

Interpretation

Die hier optimierten Protokolle ermöglichen die Anwendung der neuen automatisierten FADU-Version für den Nachweis von 8-oxoG in Plasmid- und mitochondrialer DNA.

5.1.4 Messung von kryopräservierten humanen mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC)

PBMC wurden aus drei verschiedenen Spendern isoliert. Von jedem Spender wurde ein Teil der PBMC kryopräserviert, der andere Teil wurde mit 3,4 Gy bestrahlt und mit der automatisierten FADU-Methode hinsichtlich der DNA-Strangbrüche vermessen. Die kryopräservierten PBMC wurden 2 Tage später aufgetaut und ebenso bestrahlt und gemessen. P0 (physiologische DNA-Strangbrüche) und P1 (Schädigung) von kryopräservierten und frischen PBMC wurden verglichen.

Ergebnis

Spender	Frische PBMC		Eingefrorene PBMC	
	P0	P1	P0	P1
1	81%	46%	83,1%	42,2%
2	85%	48,2%	82,3%	42%
3	77,8%	37,8%	81,4%	39,5%

Tab. 3 Vergleich von DNA-Strangbrüchen in PBMC von drei Spendern (1-3) vor und nach dem Einfrieren/Auftauen. P0 repräsentiert die DNA-Strangbrüche ohne induzierte Schädigung und P1 nach einer Bestrahlung mit einer Dosis von 3,4 Gy.

Interpretation

In beiden Fällen, vor dem Einfrieren und nach dem Einfrieren/Auftauen der PMBC, wurden in allen Spendern die gleichen Werte gemessen mit einer sehr niedrigen Abweichung zwischen 1,7 und 6,2 % (Tab. 3). Da kein statistischer signifikanter Unterschied messbar ist, kann der automatisierte FADU-Assay ohne Auswirkung auf das Ergebnis auch für nach der Isolierung eingefrorene und vor der Messung wieder aufgetaute PBMC eingesetzt werden.

Kapitel 2

Validierung des neuen automatisierten FADU-Assays zur Detektion von DNA-Strangbrüchen und ihrer Reparatur in verschiedenen Zellsystemen

5.2.1 Einleitung zum Versuchsaufbau

Um die FADU-Methode zu validieren, wurden Jurkat-Zellen, HeLa-Zellen und humane PBMC benutzt. DNA-Strangbrüche wurden durch Bestrahlung oder bekannte genotoxische Substanzen induziert. Um die DNA-Reparatur zu ermöglichen, wurden die Zellen bei 37 °C inkubiert.

5.2.2 Induktion von DNA-Strangbrüchen

Die Energiedosis (in Gy) bzw. die Substanzkonzentrationen, die Inkubationszeiten und die jeweils erreichte maximale Empfindlichkeit (statistische Signifikanz nach dem t-Test) sind in der Tabelle 4 zusammengefasst. Für den Versuchsaufbau siehe Abschnitt 4.2.2.1. Als Negativ-Kontrolle (Substanz, die keine DNA-Strangbrüche induziert) wurde Medium ohne weitere Zusätze benutzt.

Abb. Nummer	DNA-Strangbrüche durch	Dosis/Konzentration	Inkubationszeiten	Zelltyp	Empfindlichkeit*
25	Zellkulturmedium	10–50 µl	60 Minuten	Jurkat	Keine mesbare Unterschiede
26	DMSO	0,5–15 %	30 Minuten	Jurkat	10 %
27	Etoposid	50 nM–40 µM	5 Minuten (links) 60 Minuten (rechts)	Jurkat	1 µM
28	Etoposid	1–20 µM	5–20 Minuten	Jurkat	1 µM
29	SIN-1	100 µM–3 mM	30 Minuten	Jurkat	500 µM
30	SIN-1	200 µM–10 mM	30 Minuten (oben) 90 Minuten (unten)	Jurkat	200 µM (90 Min., Ø FCS)
31	Röntgen-Bestrahlung	0,14–2,17 Gy	Dauer der Bestrahlung von 30 bis 130 Sekunden	PBMC	14 cGy
32	LPS	0,1 ng/ml	0–50 Minuten	PBMC	0,1 ng/ml nach 5 Minuten
33	Camptothecin	5 nM–1 µM	5 Minuten	PBMC Jurkat	5 nM

Tab. 4 Zusammenfassung Abbildungen 25–33. Messung der DNA-Strangbrüche nach Bestrahlung und Inkubation mit genotoxischen Substanzen und Zellkulturmedium in Jurkat-Zellen und humanen PBMC. *Niedrigste gemessene Dosis mit statistisch signifikanter Zunahme der DNA-Strangbrüche verglichen mit dem Kontrollwert P0 (t-Test, P < 0,05).

Ergebnisse

Es wurde gezeigt, dass mit der neuen automatisierte FADU-Methode Folgendes leisten kann:

1. DNA-Strangbrüche, die von DMSO, Etoposid, SIN-1, γ -Bestrahlung, LPS oder Camptothecin induziert wurden, dosisabhängig detektieren;
2. Die von genotoxischen Substanzen induzierten DNA-Strangbrüche in Abhängigkeit von der Dosis und von der Wirkungszeit parallel erfassen. Im Fall von Etoposid ist der genotoxische Effekt in Abhängigkeit von der Dosis stärker als in Abhängigkeit von der Zeitdauer der Etoposid-Inkubation (Abb. 28);
3. Unterschiedliche DNA-Entwindung als Funktion der Inkubationsbedingungen, messen. So wurde eine höhere Anzahl an DNA-Strangbrüchen nach Inkubation mit SIN-1 in Medium ohne FCS als in Medium mit FCS gemessen (Abb. 30);
4. Unterschiedliche DNA-Entwindung als Funktion des Zelltyps erfassen. Jurkat-Zellen sind replikative Zellen und deshalb sensitiver gegenüber Zytostatika (CPT) als PBMC, diese Eigenschaft wurde hier auch gemessen (Abb. 33).

Negativ-Kontrolle

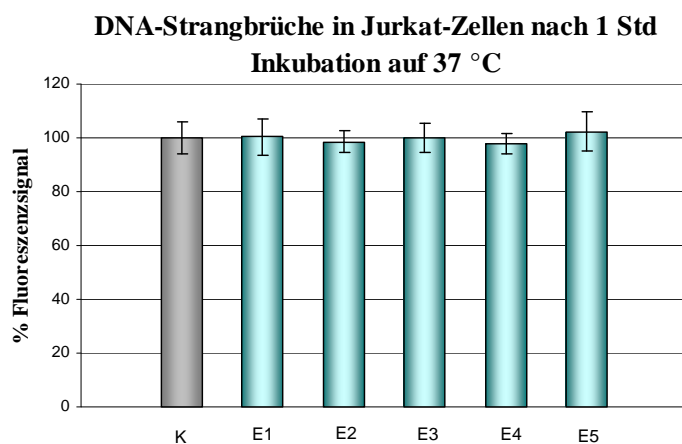


Abb. 25 DNA-Strangbrüche in Jurkat-Zellen nach Inkubation in RPMI-Medium. K stellt den Referenzwert ohne Entwindung dar. Die grünen Balken (E1–E5) repräsentieren, von links nach rechts, die Zugabe von jeweils 10-50 μ l Medium, so wurde ein Dosiswirkungsexperiment simuliert. Das Fluoreszenzsignal bleibt unverändert, das bedeutet keine Zunahme der endogen vorhandenen DNA-Strangbrüche. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

DMSO-Kontrolle

Viele genotoxische Substanzen sind in DMSO gelöst. Die von DMSO induzierten DNA-Strangbrüche wurden für verschiedene Konzentrationen in Jurkat-Zellen gemessen. Die Anwesenheit von DMSO während 30 Minuten in Konzentrationen unter 2 % verursachen keine DNA-Strangbrüche (Abb. 26). Da die Endkonzentration an DMSO in keinem Experiment einen Wert von 0,5 % übersteigt, kann davon ausgegangen werden, dass keine Lösungsmittel-induzierten Strangbrüche entstehen.

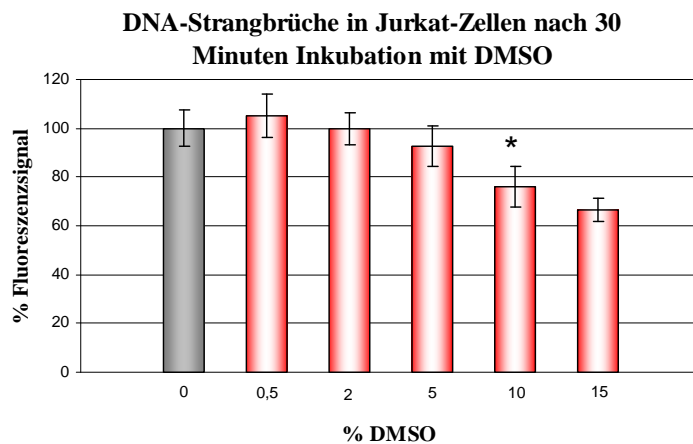


Abb. 26 DNA-Strangbrüche in Jurkat-Zellen nach Inkubation mit DMSO. Ab einer Konzentration von 2 % nehmen die DNA-Strangbrüche mit zunehmender DMSO-Konzentration zu. Der graue Balken stellt den Referenzwert P0 dar. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von Dreifachbestimmungen. *P<0,05 ab 10 % in Vergleich zu Kontrollwert.

Etoposid

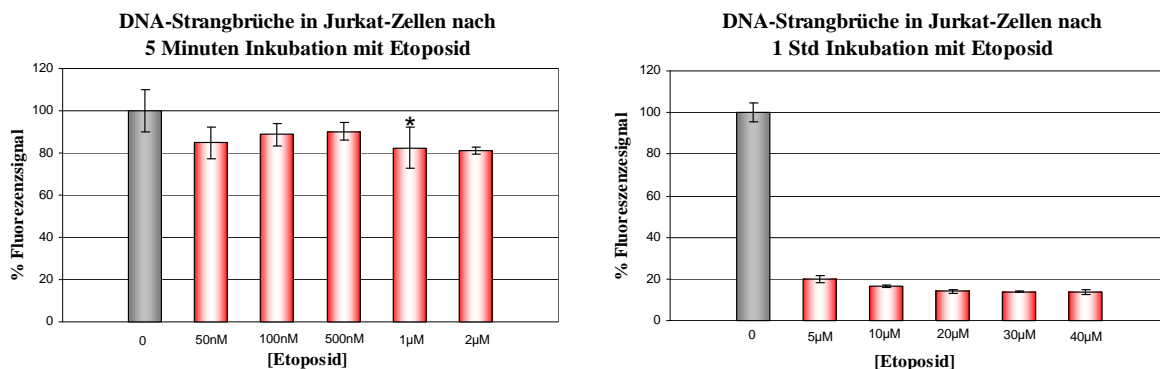


Abb. 27 DNA-Strangbrüche in Jurkat-Zellen nach Inkubation mit Etoposid. Links: Die DNA-Strangbrüche nehmen mit zunehmender Etoposid-Konzentrationen von 50 nM bis 2 µM nicht zu; rechts: Nach 1 Stunde Inkubation mit Etoposid-Konzentrationen von 5 µM oder höher ist die DNA 80–90% entwunden. Der graue Balken stellt den Referenzwert P0 dar. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von Dreifachbestimmungen. *P<0,05 ab 1 µM in Vergleich zu Kontrollwert.

DNA-Strangbrüche nach Inkubation mit Etoposid

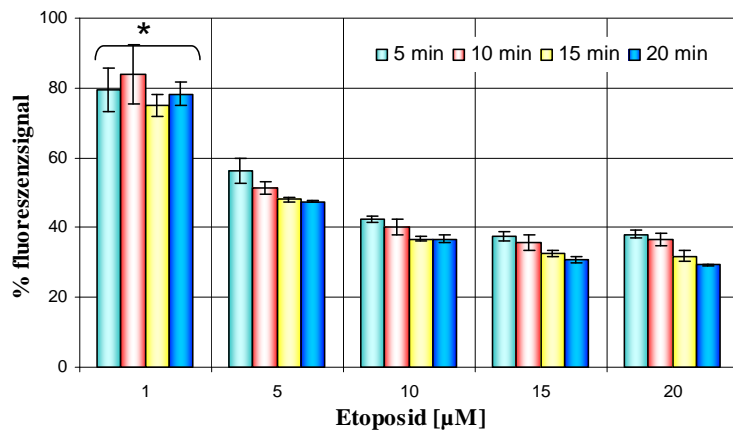
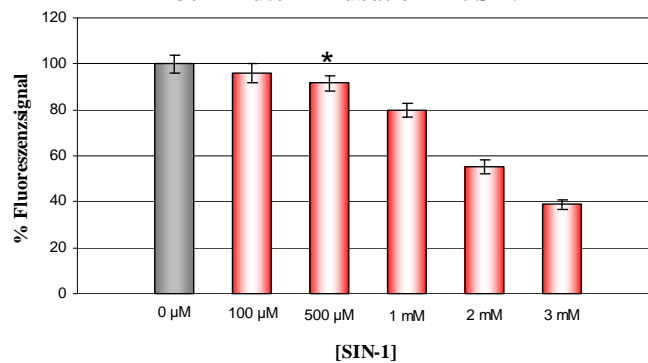


Abb. 28 DNA-Strangbrüche in Jurkat-Zellen nach Inkubation mit Etoposid. Die DNA-Strangbrüche nehmen mit zunehmenden Etoposid-Konzentrationen und mit der Inkubationszeit zu. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von Dreifachbestimmungen. *P<0,05 ab 1 µM in Vergleich zu Kontrollwert P0 (=100%).

SIN-1

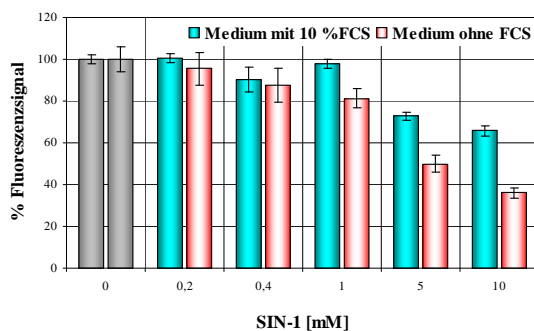
Abb. 29 DNA-Strangbrüche in Jurkat-Zellen nach Inkubation mit SIN-1. Die DNA-Strangbrüche nehmen mit zunehmender SIN-1-Konzentration zu. Der graue Balken stellt den Referenzwert P0 dar. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von Dreifachbestimmungen. *P<0,05 ab 500 µM in Vergleich zu Kontrollwert.

DNA-Strandbrüche in Jurkat-Zellen nach 30 Minuten Inkubation mit SIN-1



Auswirkung der Anwesenheit von FCS auf SIN-1-induzierte DNA-Strangbrüche

DNA-Strangbrüche in Jurkat-Zellen nach 30 Minuten Inkubation mit SIN-1



DNA-Strangbrüche in Jurkat-Zellen nach 90 Minuten Inkubation mit SIN-1

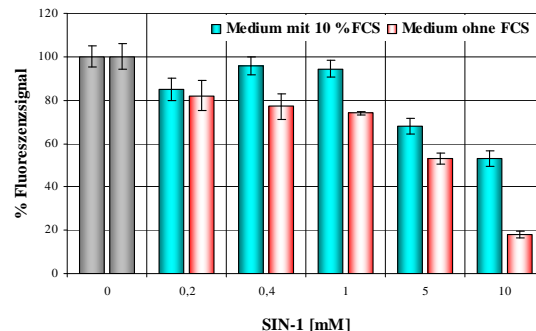


Abb. 30 DNA-Strangbrüche in Jurkat-Zellen nach 30 Minuten (links) und 90 Minuten (rechts) Inkubation mit SIN-1 in Medium ohne und mit 10 % FCS. Die DNA-Strangbrüche nehmen mit zunehmender SIN-1-Konzentration zu. In Anwesenheit von FCS wurden weniger DNA-Strangbrüche gemessen als in Abwesenheit von FCS. Der graue Balken stellt den Referenzwert P0 dar. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

Röntgen-Bestrahlung

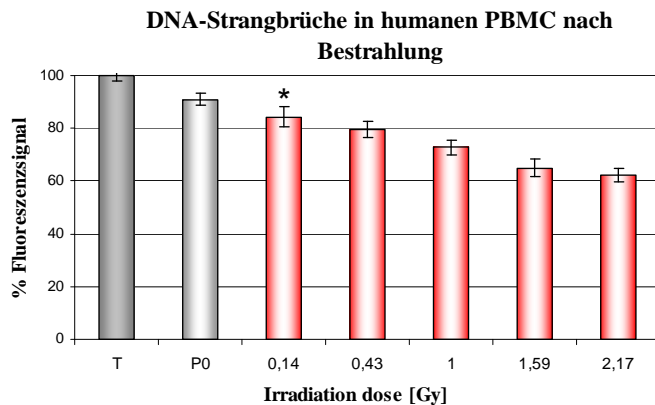
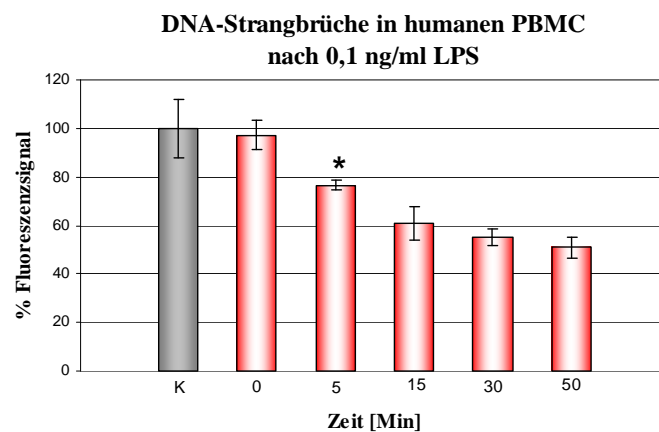


Abb. 31 DNA-Strangbrüche in humanen PBMC nach Bestrahlung. Die DNA-Strangbrüche nehmen mit der Zunahme der Bestrahlungsdosis zu. Die grauen Balken sind die Kontrollwerte (T= absolute DNA-Menge, P0 = physiologische DNA-Strangbrüche). Die roten Balken repräsentieren, von links nach rechts, die Zunahme der DNA-Entwindung in Abhängigkeit von der Energiedosis. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von Dreifachbestimmungen. * $P < 0,05$ ab 0,14 Gy in Vergleich zu P0.

LPS

Abb. 32 DNA-Strangbrüche in humanen PBMC nach Inkubation mit LPS. Die DNA-Strangbrüche nehmen mit zunehmender Inkubationszeit mit LPS zu. Der graue Balken stellt den Referenzwert P0 dar. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von Dreifachbestimmungen. * $P < 0,05$ ab 5 Minuten Inkubation in Vergleich zu Kontrollwert.



Camptothecin

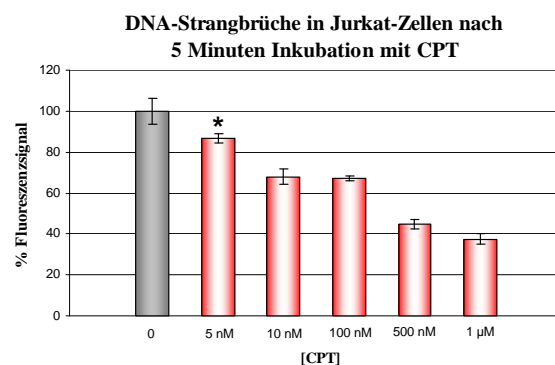
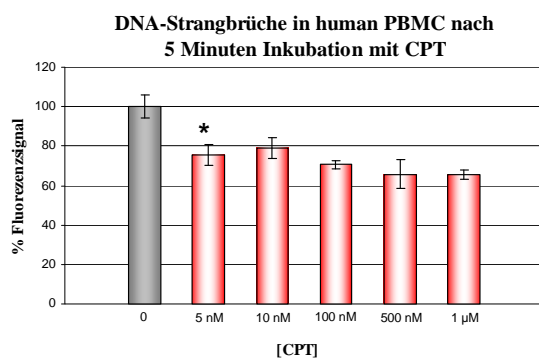


Abb. 33 DNA-Strangbrüche in humanen PBMC (links) und Jurkat-Zellen (rechts) nach Inkubation mit Camptothecin (CPT). Die DNA-Strangbrüche nehmen insbesondere bei Jurkat-Zellen mit zunehmender CPT-Konzentration zu. Der graue Balken stellt den Referenzwert P0 dar. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung. * $P < 0,05$ ab 5 nM in Vergleich zu Kontrollwert.

5.2.3 Reparatur der DNA-Strangbrüche

Die Energiedosis (in Gy) bzw. die Substanzkonzentrationen, ihre Inkubationszeiten und die Reparatur-Zeiten sind in der Tabelle 5 zusammengefasst. Für den Versuchsaufbau siehe Abschnitt Material und Methoden 4.2.2.2. Als Negativ-Kontrolle wurde Medium ohne weitere Zusätze benutzt.

Abb. Nummer	DNA-Strangbrüche durch	Dosis bzw. Konzentration	Inkubationszeiten	Zelltyp
34	Zellkulturmedium	50 μ l	5–20 Minuten	Jurkat
35	Bestrahlung	3,8–13,8 Gy	5–20 Minuten	Jurkat
36	Bestrahlung	3,8 Gy	10–40 Minuten	PBMC
37	Etoposid	15 μ M	10–40 Minuten	HeLa
38	Camptothecin	100 nM 500 nM	5–20 Minuten	Jurkat
39	Camptothecin	100 mM	10–40 Minuten	HeLa
40	Etoposid	15 μ M	10–40 Minuten	HeLa
41	Bestrahlung	6,8 Gy	5–20 Minuten	Jurkat
42	Bestrahlung	6,8 Gy	5–20 Minuten	PBMC

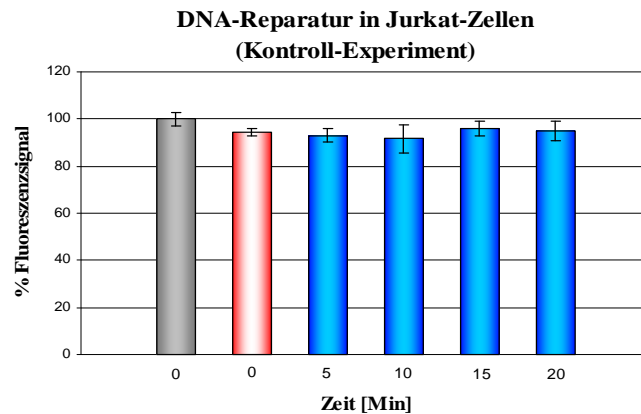
Tab. 5 Zusammenfassung Abbildungen 34–42. Bestrahlung und genotoxische Substanzen, Dosis, Inkubationszeiten für die Reparatur und Zelltyp von jeder Abbildung sind hier aufgelistet.

Ergebnisse

1. DNA-Reparatur konnte in verschiedenen Zellen (humanen PBMC, HeLa- und Jurkat-Zellen) erfolgreich gemessen werden;
2. Die Reparatur wurde in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt (Reparaturkinetik), und Unterschiede zwischen den verschiedenen Zellsystemen konnten erfasst werden;
3. Eine Stimulierung der DNA-Reparatur durch FCS wurde detektiert. Diese Stimulierung war zu beobachten sowohl in den Zellen, die nur für 5 bis 20 Minuten während der Reparatur in Medium mit FCS aufgenommen wurden, als auch in PBMC, die vor der Bestrahlung für 24 Stunden in Medium mit FCS inkubiert worden waren. Eine stärkere Stimulierung der Reparatur durch FCS wurde beobachtet im Vergleich mit Zellen, die in Medium ohne FCS unterdurchschnittlich reparieren.
4. FCS hat keinen Einfluss auf das Fluoreszenzsignal.

Negativ-Kontrolle

Abb. 34 DNA-Strangbrüche in Jurkat-Zellen nach Inkubation im RPMI-Medium. Der graue Balken stellt den Referenzwert P0 dar. Der rote Balken repräsentiert die „Schädigung“ (in diesem Fall keine) nach 20-minütiger Inkubation auf Eis. Die blauen Balken stellen die DNA-Reparatur nach jeweils 5–20 Minuten Inkubation bei 37 °C dar. Das Fluoreszenzsignal bleibt unverändert, dies bedeutet keine Zunahme/-Abnahme der DNA-Strangbrüche. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.



Bestrahlung

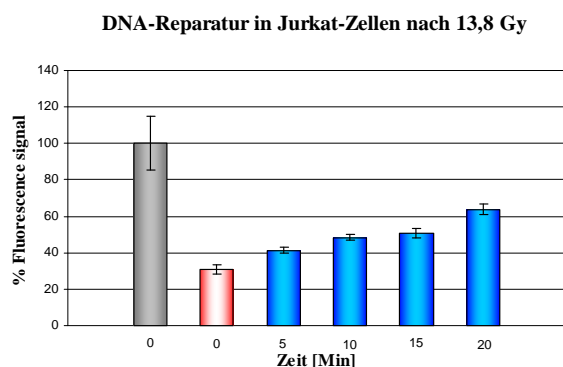
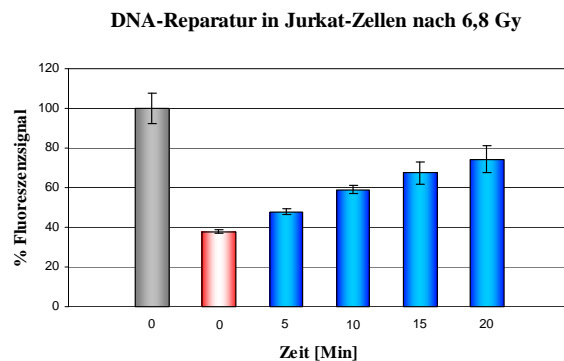
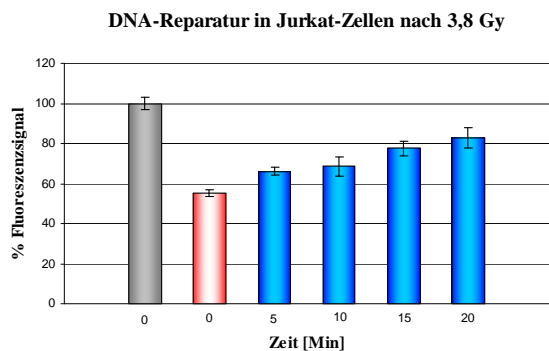
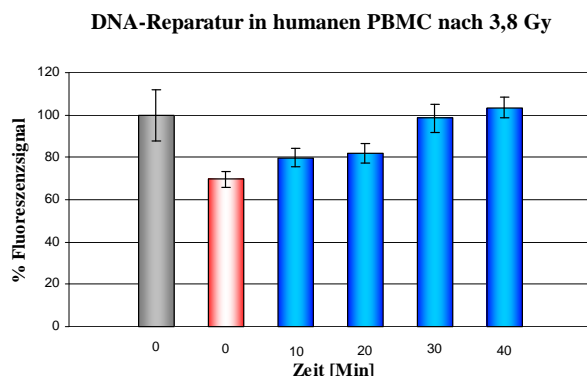


Abb. 35 DNA-Reparatur in Jurkat-Zellen nach Bestrahlung. Die DNA-Strangbrüche (rote Balken) wurden durch Bestrahlung induziert. Die DNA-Reparatur (blaue Balken) wurde nach 5, 10, 15 und 20 Minuten gemessen; hier nimmt das Fluoreszenzsignal mit der Zeit zu. Der graue Balken stellt den Referenzwert P0 dar. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von Dreifachbestimmungen.

Abb. 36 DNA-Reparatur in humanen PBMC nach Bestrahlung. Die DNA-Strangbrüche (rote Balken) wurden durch Bestrahlung induziert. Die DNA-Reparatur (blaue Balken) wurde nach 5, 10, 15 und 20 Minuten gemessen, hier nimmt das Fluoreszenzsignal mit der Zeit zu. Der graue Balken stellt den Referenzwert P0 dar. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.



Etoposid

DNA-Reparatur in HeLa-Zellen nach 5 Minuten Inkubation mit 15 μ M Etoposid

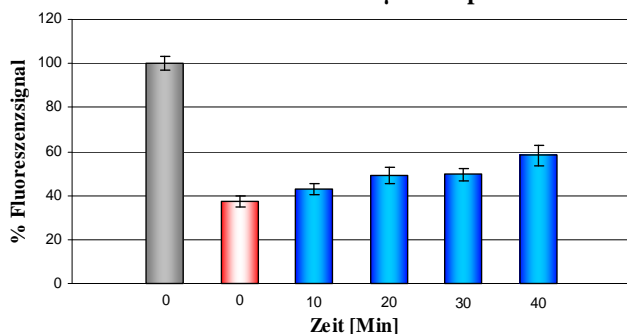
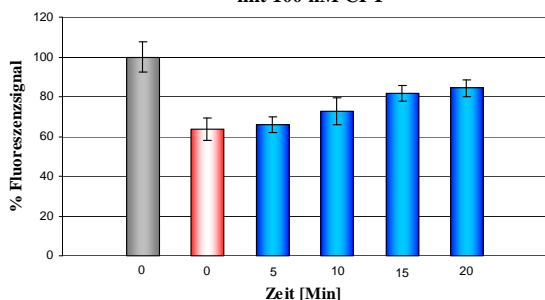


Abb. 37 DNA-Reparatur in HeLa-Zellen nach Inkubation mit Etoposid. Die Zellen wurden mit 15 μ M Etoposid bei 37 °C inkubiert (rote Balken). Nach 5 Minuten wurde das Etoposid-haltige Medium durch Etoposid-freies ersetzt, und die DNA-Reparatur (blaue Balken) wurde nach weiteren 5, 10, 15 und 20 Minuten gemessen, hier nimmt das Fluoreszenzsignal mit der Zeit zu. Der graue Balken stellt den Referenzwert P0 dar. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

Camptothecin

DNA-Reparatur in Jurkat-Zellen nach Inkubation mit 100 nM CPT



DNA-Reparatur in Jurkat-Zellen nach Inkubation mit 500 nM CPT

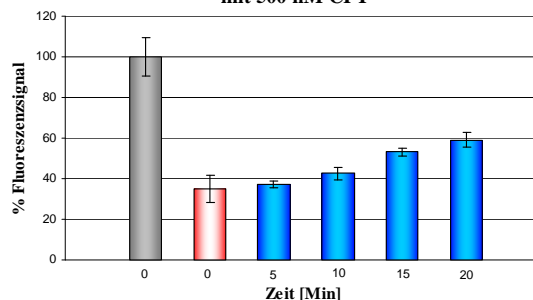


Abb. 38 DNA-Reparatur in Jurkat-Zellen nach Inkubation mit CPT. Die Zellen wurden mit 100 nM (links) und 500 nM (rechts) CPT 5 Minuten bei 37 °C inkubiert (rote Balken). Ohne CPT aus dem Medium zu entfernen, wurde die DNA-Reparatur (blaue Balken) nach 5, 10, 15 und 20 Minuten gemessen, hier nimmt das Fluoreszenzsignal mit der Zeit zu. Die grauen Balken stellen die jeweiligen Referenzwerte (P0) dar. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

Effekt von FCS auf die Reparatur

Camptothecin

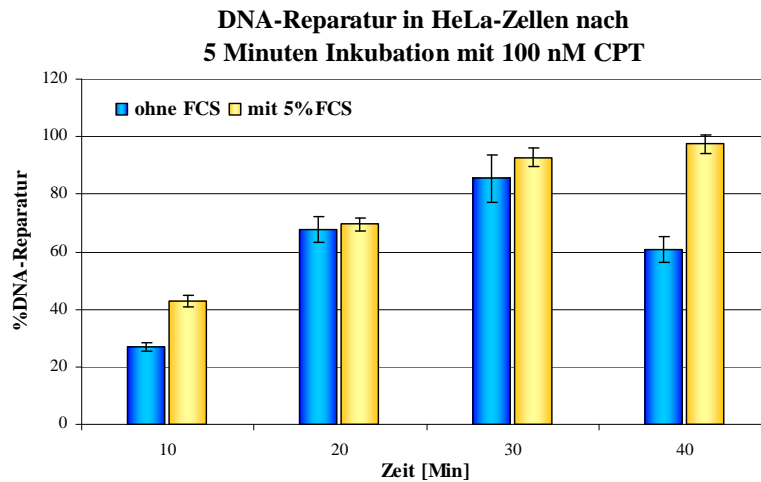


Abb. 39 DNA-Reparatur in HeLa-Zellen nach Inkubation mit CPT. Nach 5 min wurde das CPT-haltige Medium durch CPT-freies ersetzt. Die DNA-Reparatur wurde in Medium ohne FCS (blaue Balken) und mit 5 % FCS (gelbe Balken) zugelassen und nach 10, 20, 30 und 40 Minuten gemessen. Die DNA-Reparatur wurde für jeden Zeitpunkt R_x ($X=10, 20, 30$ und 40 Minuten) auf die Fluoreszenzabnahme von P_0 , die nach CPT-Inkubation auftritt (P_1 = Schädigung ohne anschließende Reparatur), bezogen ($\% \text{ Reparatur} = (R_x - P_1)/(P_0 - P_1) \times 100$). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

Etoposid

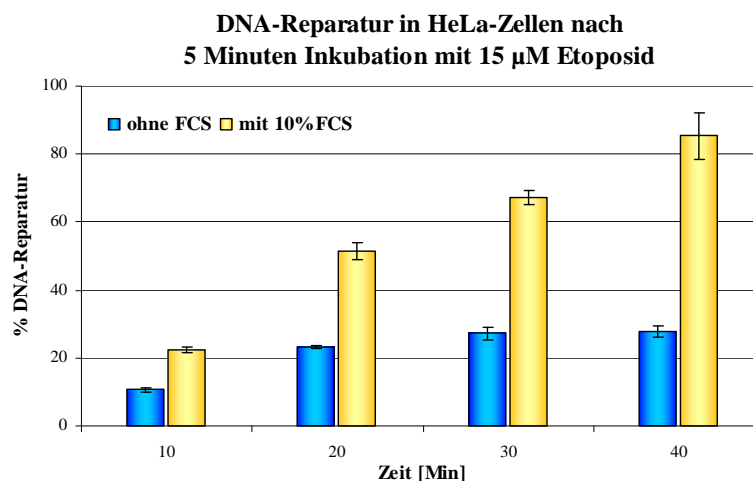


Abb. 40 DNA-Reparatur in HeLa-Zellen nach Inkubation mit Etoposid. Nach 5 min wurde das Etoposid-haltige Medium durch Etoposid-freies ersetzt. Die DNA-Reparatur wurde in Medium ohne FCS (blaue Balken) und mit 10 % FCS (gelbe Balken) zugelassen und nach 10, 20, 30 und 40 Minuten gemessen. Die DNA-Reparatur wurde für jeden Zeitpunkt R_x ($X = 10, 20, 30$ und 40 Minuten) auf die Fluoreszenzabnahme von P_0 , die nach Etoposid-Inkubation auftritt (P_1 = Schädigung ohne anschließende Reparatur), bezogen ($\% \text{ Reparatur} = (R_x - P_1)/(P_0 - P_1) \times 100$). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

Bestrahlung

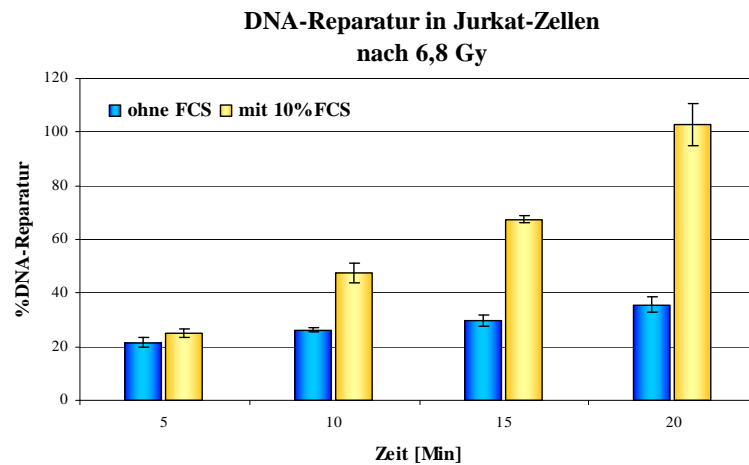


Abb. 41 DNA-Reparatur in Jurkat-Zellen nach Bestrahlung. Die DNA-Reparatur wurde in Medium ohne FCS (blaue Balken) und mit 10 % FCS (gelbe Balken) zugelassen und nach 5, 10, 15 und 20 Minuten gemessen. Die DNA-Reparatur wurde für jeden Zeitpunkt R_x ($X = 5, 10, 15$ oder 20 Minuten) auf die Fluoreszenzabnahme von P_0 , die nach der Bestrahlung auftritt ($P_1 =$ Schädigung ohne anschließende Reparatur), bezogen ($\% \text{ Reparatur} = (R_x - P_1) / (P_0 - P_1) \times 100$). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

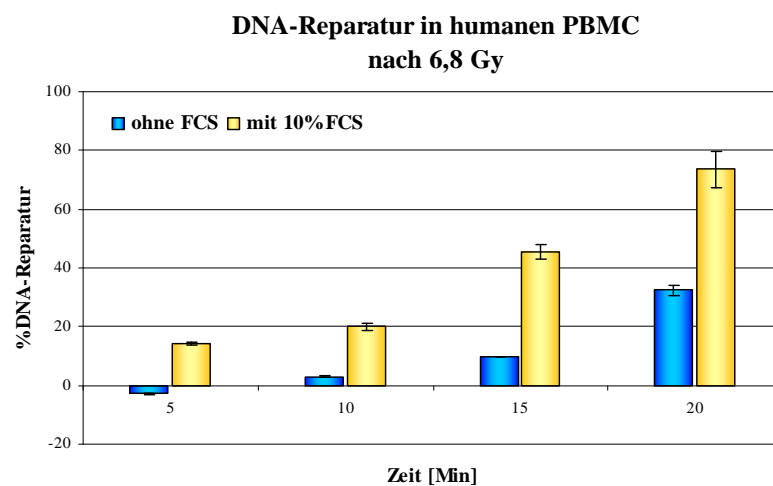


Abb. 42 DNA-Reparatur in humanen PBMC nach Bestrahlung. Die DNA-Reparatur wurde in Medium ohne FCS (blaue Balken) und mit 10 % FCS (gelbe Balken) zugelassen und nach 5, 10, 15 und 20 Minuten gemessen. Die DNA-Reparatur wurde für jeden Zeitpunkt R_x ($X = 5, 10, 15$ oder 20 Minuten) auf die Fluoreszenzabnahme von P_0 , die nach Bestrahlung auftritt ($P_1 =$ Schädigung ohne anschließende Reparatur), bezogen ($\% \text{ Reparatur} = (R_x - P_1) / (P_0 - P_1) \times 100$). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

Der Anteil an FCS im Reparatur-Medium mit FCS betrug 10 %. Nach den Verdünnungen mit den verschiedenen Puffern und vor der Zugabe des Farbstoffes SybrGreen beträgt dieser Anteil weniger als 3,5 %. Es wurde geprüft, ob dieser Anteil einen Einfluss auf das Fluoreszenzsignal hat, indem die Fluoreszenz von Medium mit und ohne FCS sowie von Puffer ohne Medium gemessen wurde. Ein Einfluss von FCS auf das Fluoreszenzsignal wurde ausgeschlossen (Abb. 43).

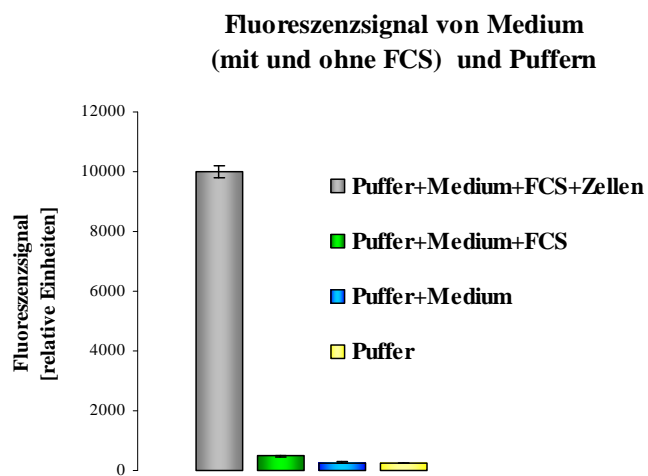


Abb. 43 SybrGreen-Fluoreszenzsignal.

Der graue Balken (T-Wert) zeigt das Fluoreszenzsignal von 30.000 humanen PBMC in Medium mit FCS und nachdem alle Puffer (Suspensions-, Lyse-, Entwindungs- und Neutralisationspuffer) zugegeben wurden. Der grüne Balken zeigt das Fluoreszenzsignal ohne Zellen, der blaue Balken ist die Fluoreszenzsignal der Puffer mit Medium und der gelbe Balken das Signal der Puffer alleine. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

DNA-Reparatur in humanen PBMC nach 24 Stunden Inkubation in Medium mit FCS

PBMC von drei jungen und gesunden Spendern wurden aus dem Blut isoliert. Die Hälfte der gewonnenen PBMC wurden in Medium mit 10 % FCS aufgenommen und für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert, danach wurden sie bestrahlt. Die Reparatur wurde 20 Minuten in Medium ohne FCS zugelassen. Die andere Hälfte der PBMC wurden sofort bestrahlt, und nach 20 Minuten Inkubation in Medium ohne FCS wurde die Reparatur gemessen.

Ergebnis

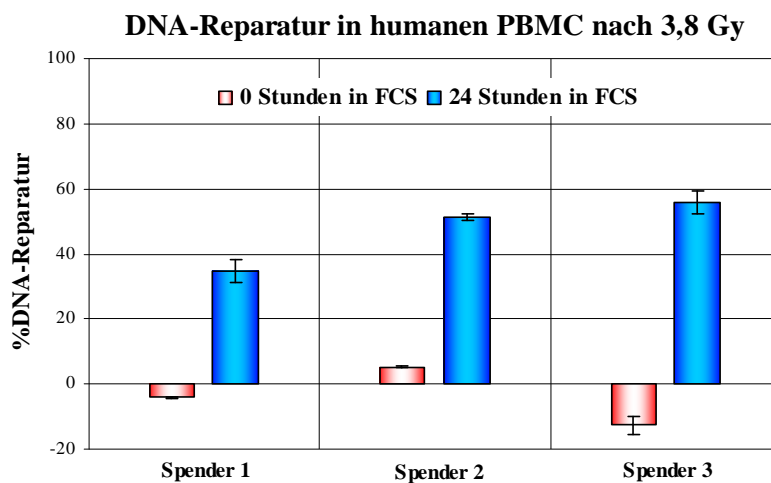


Abb. 44 DNA-Reparatur in humanen PBMC von 3 jungen Spendern nach Bestrahlung. Nach der Isolierung wurden 50 % der PBMC in Medium mit 10 % FCS aufgenommen und nach 24 Stunden Inkubation bei 37 °C sie bestrahlt (blaue Balken). Die anderen 50 % wurden nach der Isolierung sofort bestrahlt (rote Balken). Die DNA-Reparatur wurde in beiden Fällen in Medium ohne FCS zugelassen und nach 20 Minuten gemessen. Die DNA-Reparatur wurde für den Zeitpunkt $R_x = 20$ Minuten auf die Fluoreszenzabnahme von P_0 , die nach Bestrahlung auftritt ($P_1 =$ Schädigung ohne anschließende Reparatur), bezogen ($\% \text{ Reparatur} = (R_x - P_1) / (P_0 - P_1) \times 100$) Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

„Versteckte“ Reparatur

Bei Inkubationszeiten mit Camptothecin von 5 bis 30 Minuten wurde eine Zunahme des Fluoreszenzsignals gemessen, was eine Abnahme der DNA-Strangbrüche bedeutet. Der gleiche Effekt wurde bei den Konzentrationen 10, 100, 500 und 1000 nM gemessen (Abb. 45)

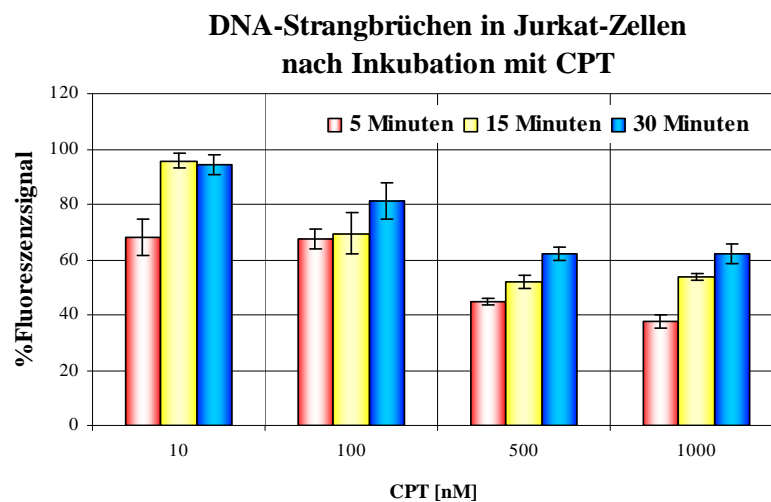
Ergebnis

Abb. 45 DNA-Strangbrüche in Jurkat-Zellen nach Inkubation mit Camptothecin. Die DNA-Strangbrüche nehmen mit zunehmenden Camptothecin-Konzentrationen zu und mit der Inkubationszeit ab. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

Interpretation

In Reparatur-Experimenten wurde gezeigt, dass die induzierten DNA-Strangbrüche durch 100 und 500 nM Camptothecin selbst bei Dauerinkubation mit dieser Substanz nach 20 Minuten zu 80 bzw. 60 % repariert wurden (Abb. 38). In diesem Fall ist die Abnahme der DNA-Strangbrüche mit der Zeit als „versteckte“ Reparatur zu interpretieren, die Schädigung durch Camptothecin ist dann schwächer als die Reparatur.

Antagonismus zwischen Schädigung und Reparatur

Es wurden unterschiedliche Reparaturwerte gemessen, je nach Ab- oder Anwesenheit von Camptothecin im Medium während der Reparaturzeit (Abb. 46).

Ergebnis

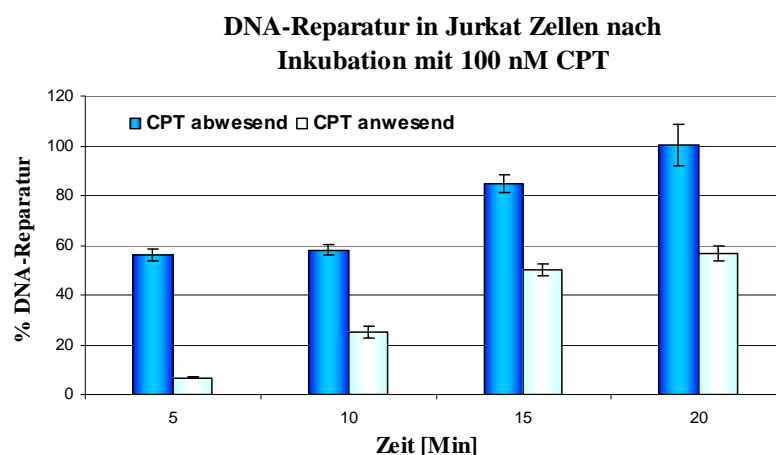


Abb. 46 DNA-Reparatur in Jurkat-Zellen nach Inkubation mit Camptothecin. Die DNA-Reparatur wurde in Anwesenheit (hellblaue Balken) und Abwesenheit (dunkelblaue Balken) von 100 nM CPT zugelassen und nach 5, 10, 15 und 20 Minuten gemessen. Die DNA-Reparatur wurde für jeden Zeitpunkt R_x ($X = 5, 10, 15$ oder 20 Minuten) auf die Fluoreszenzabnahme von P_0 , die nach CPT-Inkubation auftritt ($P_1 =$ Schädigung ohne anschließende Reparatur), bezogen ($\% \text{ Reparatur} = (R_x - P_1) / (P_0 - P_1) \times 100$). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

Interpretation

In Abwesenheit von Camptothecin wurden 100 % der induzierten DNA-Strangbrüche repariert, während in Anwesenheit von CPT ein negativer Effekt auf die Reparatur gemessen wurde. Das deutet darauf hin, dass während der Reparaturzeit CPT weiterhin DNA-Strangbrüche induziert. Der Antagonismus zwischen Schädigung und Reparatur lässt sich mit der automatisierten FADU-Methode untersuchen und quantifizieren.

Hemmung der Reparatur

Jurkat-Zellen wurden 105 Minuten mit dem PARP-1- Inhibitor 3-Aminobenzamid (3-AB) auf 37 °C vorinkubiert. Nach Bestrahlung wurde die Reparatur gemessen.

Ergebnis

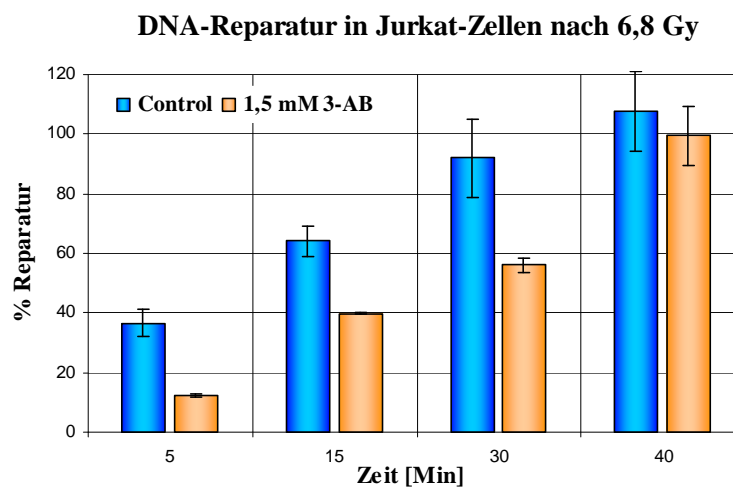


Abb. 47 DNA-Reparatur in Jurkat-Zellen nach Bestrahlung. Jurkat-Zellen wurden 105 Min mit (orange Balken) und ohne 1,5 mM 3-AB (blaue Balken) im Medium ohne FCS inkubiert und anschließend mit 6,8 Gy bestrahlt. Die DNA-Reparatur wurde nach 5, 10, 15 und 20 Minuten gemessen. Die DNA-Reparatur wurde für jeden Zeitpunkt R_x ($X = 5, 10, 15$ oder 20 Minuten) auf die Fluoreszenzabnahme von P_0 , die nach der Bestrahlung auftritt ($P_1 =$ Schädigung ohne anschließende Reparatur), bezogen ($\% \text{ Reparatur} = (R_x - P_1)/(P_0 - P_1) \times 100$). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

Interpretation

Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (Parp-1) spielt eine wichtige Rolle in dem Basen-Excisions-Reparatur-Mechanismus (Bürkle, 2005). Hier wurde gezeigt dass, die Inkubation der Jurkat-Zellen mit dem PARP-1-Inhibitor 3-AB eine signifikante Verzögerung der Reparatur zufolge hat. Dieses ist nochmals ein Beleg dafür, dass mit dieser neuen FADU-Methode die Reparatur erfolgreich untersucht werden kann.

Kapitel 3

Anwendung der neuen FADU-Methode zur Untersuchung der Rolle von Zink in der DNA-Reparatur

5.3.1 Einleitung

In diesem Kapitel wird geprüft, inwiefern die in dieser Arbeit optimierte FADU-Methode in der Grundlagenforschung Anwendung finden kann. Dafür wurde die Rolle von Zink auf die DNA-Reparatur sowie die Abhängigkeit der Reparatur vom Lebensalter untersucht.

Die Zellen wurden zunächst in An- oder Abwesenheit von Zink bei 37 °C während bestimmter Zeiten inkubiert. Danach wurden sie bestrahlt, und die Reparatur wurde nach einer Zeit von bis zu 40 Minuten in 5- bis 15-Minuten-Intervallen gemessen. Die Inkubationsbedingungen (Medium, Zeit), der Zelltyp (Jurkat-Zellen, humane PBMC) und die Reparaturzeiten wurden variiert und werden deshalb unten für jedes einzelne Experiment gesondert aufgeführt. Die DNA-Reparatur wurde für jeden Zeitpunkt R_x ($X = 5, 10, 15, 20, 30$ und 40 Minuten) auf die Fluoreszenzabnahme von P_0 , die nach der Bestrahlung auftritt ($P_1 =$ Schädigung ohne anschließende Reparatur), bezogen. So bedeutet ein Wert „40%“, dass 40% der induzierten DNA-Strangbrüche verschwinden, was als DNA-Reparatur interpretiert wird.

$$\% \text{ Reparatur} = \frac{R_x - P_1}{P_0 - P_1} \times 100$$

Die Reparatur-Unterschiede zwischen den verschiedenen Bedingungen (z.B. mit oder ohne Zink) lassen sich besser vergleichen, wenn der Wert P_1 (Schädigung) konstant gesetzt wird, so wird die DNA-Reparatur einer gleichen Anzahl an DNA-Strangbrüchen gemessen und verglichen. Ein Effekt der Behandlung auf die Bestrahlung müsste in diesem Fall ausgeschlossen sein. Das trifft auf alle hier vorgestellten Experimente zu, die hier miteinander verglichen werden, mit einer Ausnahme: Die Zellen, die im spendereigenen Plasma bestrahlt wurden, zeigen eine um 17% niedrigere Schädigung als die Zellen in Medium (Abb. 55).

5.3.2 Genotoxizität von Zink

Es wurde überprüft, ob Zink (als $ZnSO_4$) DNA-Strangbrüche induziert. Dafür wurden Jurkat-Zellen und humane PBMC mit verschiedenen Zink-Konzentrationen inkubiert.

Ergebnis

Die Inkubation mit bis zu 500 μM Zink während 30 Minuten induziert keine DNA-Strangbrüche (Abb. 48A und B). Eine „versteckte DNA-Reparatur“ (Abb. 45) ist hier auch ausgeschlossen, da nach 5, 10, 15 und 20 Minuten Inkubation mit 50 μM Zink keine Abnahme des Fluoreszenzsignals zu messen ist, das bedeutet keine DNA-Strangbruchinduktion (Abb. 48C).

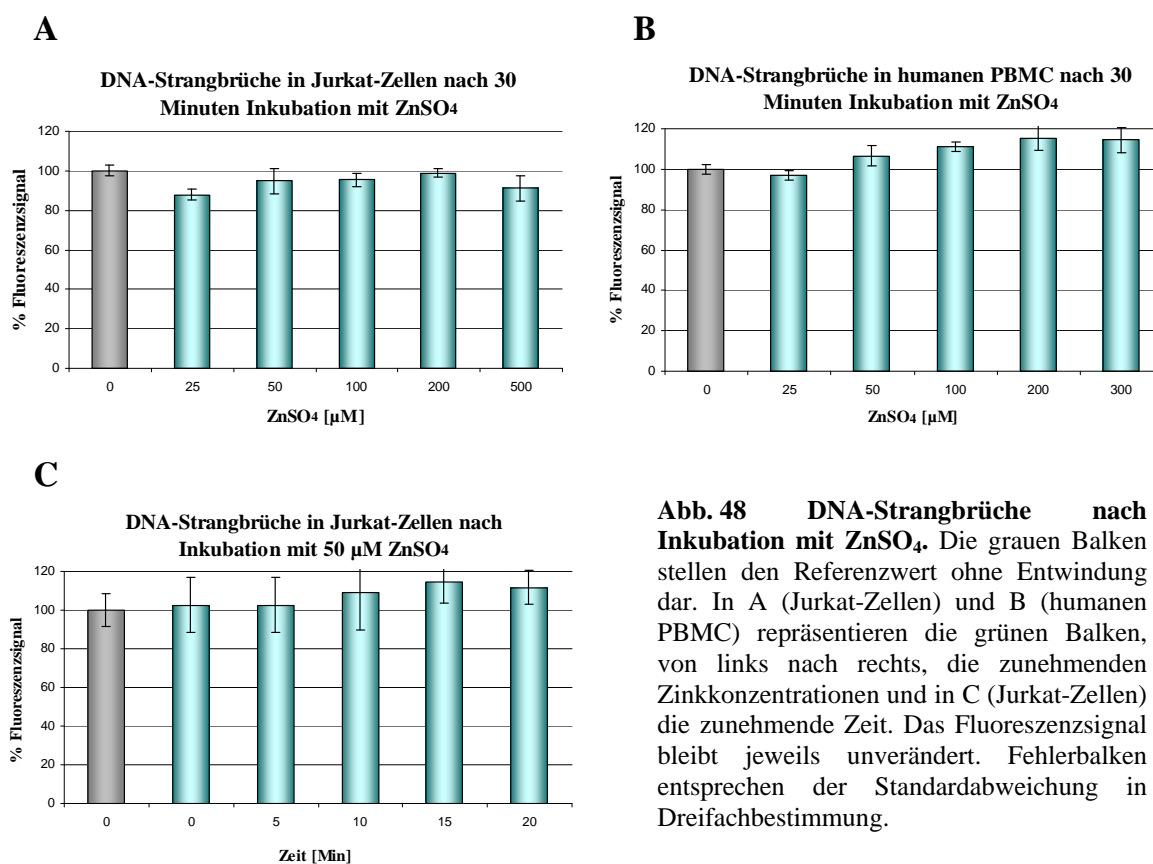


Abb. 48 DNA-Strangbrüche nach Inkubation mit ZnSO_4 . Die grauen Balken stellen den Referenzwert ohne Entwindung dar. In A (Jurkat-Zellen) und B (humanen PBMC) repräsentieren die grünen Balken, von links nach rechts, die zunehmenden Zinkkonzentrationen und in C (Jurkat-Zellen) die zunehmende Zeit. Das Fluoreszenzsignal bleibt jeweils unverändert. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

5.3.3 Einfluss von Zink auf die DNA-Reparatur in Jurkat-Zellen

Jurkat-Zellen wurden in RPMI-Medium mit zusätzlichem Zink (als ZnSO_4) inkubiert. Da Zinkkonzentrationen ab 50 μM Apoptose induzieren (siehe Abschnitt 3.5.4), wurden die Zellen mit 10 oder 25 μM Zink inkubiert. Danach wurden die Zellen bestrahlt, und nach bestimmten Zeiten wurde die Reparatur gemessen. Mehrere Experimente wurden an verschiedenen Tagen durchgeführt und sind deshalb unabhängig voneinander. Es wurden zwei verschiedene Effekte festgestellt:

1. Bei den Zellen, die nach der Bestrahlung die optimale Reparatur erreicht haben, hat Zink keinen oder einen hemmenden Einfluss (Abb. 49A).
2. In den Fällen in denen die Zellen die induzierte Schädigung nicht optimal reparieren, wurde mit Zink ein stimulierender Effekt auf die Reparatur gemessen (Abb. 49B).

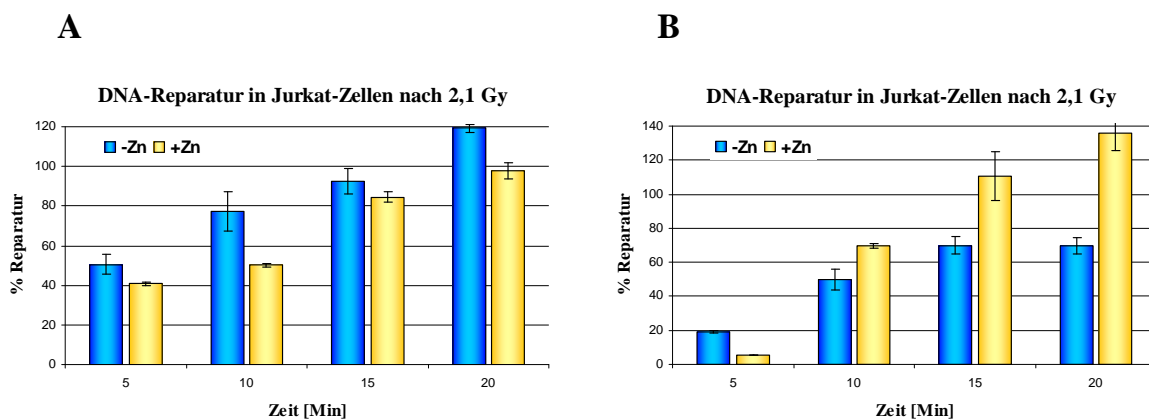


Abb. 49 DNA-Reparatur in Jurkat-Zellen nach Bestrahlung. Die Zellen wurden 15 Minuten mit 25 μM (A) oder mit 10 μM (B) ZnSO_4 inkubiert (gelbe Balken) und danach mit einer Dosis von 2,1 Gy bestrahlt. Die Kontrolle (blaue Balken) wurden 15 Minuten parallel, aber ohne ZnSO_4 inkubiert. Die DNA-Reparatur wurde in Medium ohne FCS zugelassen und nach 5, 10, 15 und 20 Minuten gemessen. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

Die Tatsache, dass die Reparatur in Jurkat-Zellen mit Zink verbessern werden konnte, führte zur Hypothese, dass eine verlangsamte Reparatur vielleicht eine Konsequenz eines vorliegenden Zinkmangels sein könnte. Um dies nachzuweisen, wurde den Jurkat-Zellen Zink entzogen. Dafür wurde der Zink-Chelator N',N',N',N' -Tetrakis-(2-Pyridyl-Methyl)-Ethyldiamin (TPEN) benutzt, 50% der mit TPEN behandelten Zellen wurden während 5 Minuten mit 50 μM ZnSO_4 inkubiert und die anderen 50% auf Eis gestellt (Kontrolle). Nach der Bestrahlung wurde die Reparatur nach 5, 10 und 20 Minuten gemessen und mit der Kontrolle verglichen (Abb. 50).

Ergebnis

Nach Behandlung mit TPEN wurde eine Hemmung der DNA-Reparatur gemessen. Dieser Effekt konnte durch Zugabe von Zink rückgängig gemacht werden. Damit wird hier gezeigt, dass unter optimalen DNA-Reparatur-Bedingungen eine *in-vitro*-Zink-Zugabe die Reparatur hemmt, während bei suboptimaler DNA-Reparatur aufgrund Zinkmangels eine Zugabe von Zink zu einer Stimulierung der Reparatur führt.

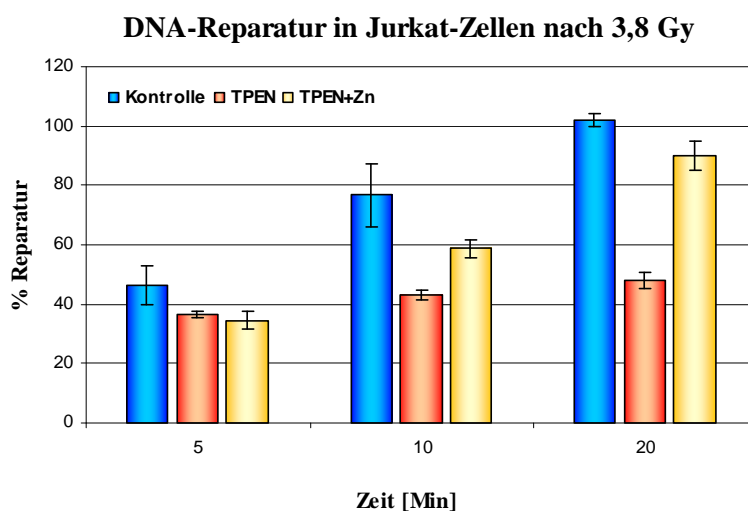


Abb. 50 DNA-Reparatur in Jurkat-Zellen nach Bestrahlung. Die Zellen wurden 30 Minuten mit 50 μM TPEN (rote Balken) oder 30 Minuten mit 50 μM TPEN und anschließend 5 Minuten mit 50 μM ZnSO_4 (gelbe Balken) inkubiert und danach bestrahlt. Die Kontrolle (blaue Balken) wurden parallel, aber ohne TPEN und ohne ZnSO_4 inkubiert. Die DNA-Reparatur wurde in Medium ohne FCS zugelassen und nach 5, 10 und 20 Minuten gemessen. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

5.3.4 Auswirkung von FCS auf die Inhibition der DNA-Reparatur durch Zink

Es wurde oben gezeigt, dass bei optimalen Reparatur-Bedingungen Zink selbst in niedrigen Konzentrationen (25 μM) einen hemmenden Effekt auf die DNA-Reparatur hat (Abb. 49A) und dass bei suboptimalen Reparatur-Bedingungen FCS diese stimuliert (Abb. 39–42 und 44). Da sowohl FCS als auch Zink einen Einfluss auf die DNA-Reparatur haben können, wurde hier die Interaktion zwischen Zink und FCS untersucht.

Ergebnis

Der inhibitorische Effekt von Zink auf die Reparatur war in Jurkat-Zellen nicht mehr messbar, wenn die Zellen während der Reparatur-Zeit im Medium mit 10% FCS inkubiert wurden (Abb. 51A), was vermutlich bedeutet, dass FCS eine große „Pufferkapazität“ für Zink hat; eine Hemmung der DNA-Reparatur in Anwesenheit von FCS wurde erst nach 15 Minuten Inkubation mit 100 μM ZnSO_4 detektiert (Abb. 52).

In humanen PBMC wurde eine „negative Reparatur“ gemessen, diese kann man als „weitere Schädigung“ nach einer solch hohen Strahlendosis von 6,8 Gy interpretieren. Die Reparatur im Medium ohne FCS beginnt in diesem Spender nach 20 Minuten. FCS hat auch hier einen positiven Effekt auf die Reparatur, der Effekt von Zink wird hier aber von FCS maskiert (Abb. 51B).

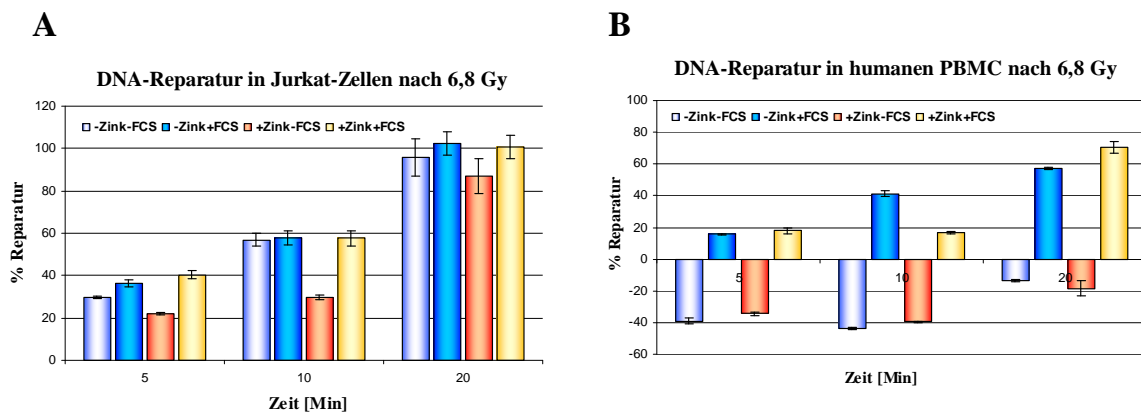


Abb. 51 DNA-Reparatur in Jurkat-Zellen (A) und humanen PBMC (B) nach Bestrahlung. Die Zellen wurden für 10 Minuten mit 25 μM ZnSO_4 in Medium ohne FCS (rote Balken) oder in Medium mit 10% FCS (gelbe Balken) inkubiert und danach bestrahlt. Die Kontrollzellen wurden parallel, aber ohne ZnSO_4 in Medium ohne FCS (hellblaue Balken) oder Medium mit 10% FCS (dunkelblaue Balken) inkubiert. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

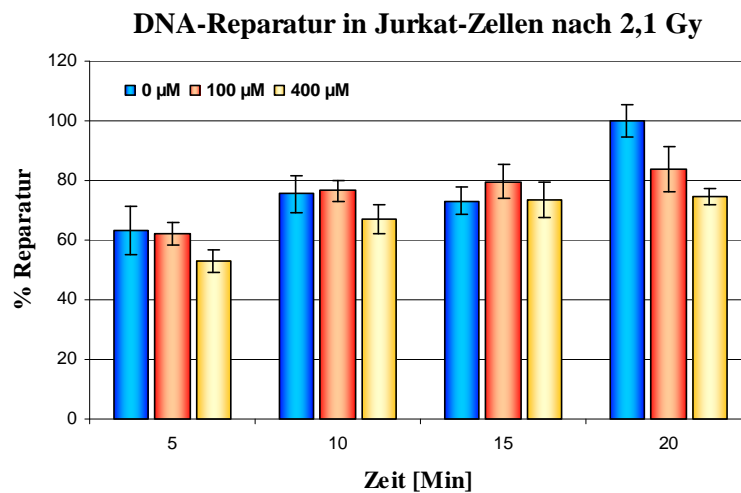


Abb. 52 DNA-Reparatur in Jurkat-Zellen nach Bestrahlung. Die Zellen wurden für 20 Minuten mit 100 (rote Balken) oder 400 μM (gelbe Balken) ZnSO_4 inkubiert und danach bestrahlt. Die Kontrolle (blaue Balken) wurden parallel, aber ohne ZnSO_4 inkubiert. Die DNA-Reparatur wurde in Medium mit 10% FCS zugelassen und nach 5, 10, 15 und 20 Minuten gemessen. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

5.3.5 Einfluss von Zink auf die Reparatur in humanen PBMC

Es wurde gezeigt, dass Zink in einer Konzentration von bis zu 300 μM in humanen PBMC keine DNA-Strangbrüche induziert (Abb. 48B). Hier wurde nun der Effekt noch höherer Zinkkonzentrationen auf die DNA-Reparatur untersucht. Da FCS einen großen Einfluss auf die Reparatur und auf die verfügbare Zinkkonzentration hat (vgl. Abb. 51), wurden die Experimente in Medium ohne FCS durchgeführt.

Ergebnis

In humanen PBMC hat Zink in hohen Konzentrationen (50 und 100 μM) nicht nur einen die DNA-Reparatur hemmenden, sondern auch einen toxischen Effekt, da die DNA-Strangbrüche mit der Zinkkonzentration zunehmen (Abb. 53A). Niedrigen Zinkkonzentrationen (10 und 25 μM) haben einen DNA-Reparatur hemmenden oder keinen Effekt (Abb. 53B).

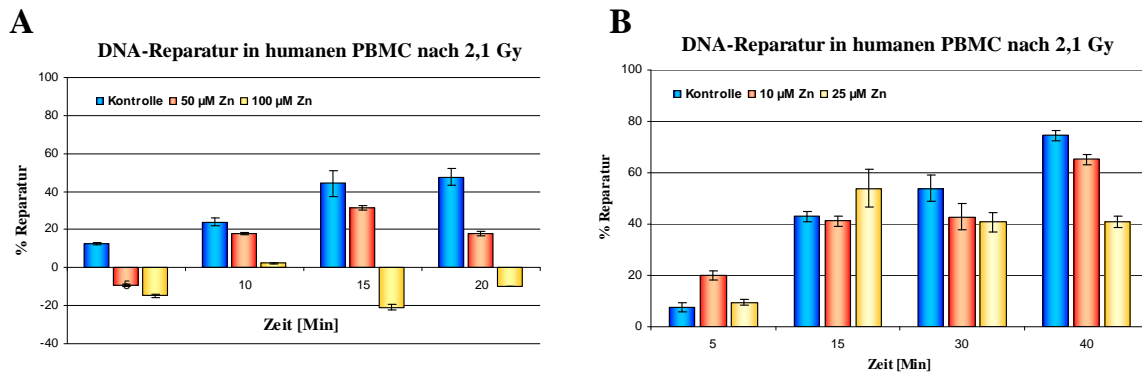


Abb. 53 DNA-Reparatur in humanen PBMC nach Bestrahlung. Die Zellen wurden 10 (A) oder 15 (B) Minuten mit hohen (A) oder niedrigen (B) ZnSO_4 -Konzentrationen inkubiert und danach bestrahlt. Die Kontrolle (blaue Balken) wurden parallel aber ohne ZnSO_4 inkubiert. Die DNA-Reparatur wurde in Medium ohne FCS zugelassen. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

5.3.6 Einfluss von Medium auf die DNA-Reparatur in humanen PBMC

Um die physiologischen Bedingungen des jeweiligen Spenders so gut wie möglich zu erhalten, wurde die Reparatur in spendereigenem Plasma durchgeführt und mit der Reparatur in Medium mit und ohne FCS verglichen.

Ergebnis

Es wurde ein Unterschied in der DNA-Reparatur in Abhängigkeit vom Medium, in dem die Zellen inkubiert wurden, gemessen. Medium (mit und ohne FCS) zeigt eine Stimulierung der Reparatur in Vergleich mit spendereigenem Plasma (Abb. 54).

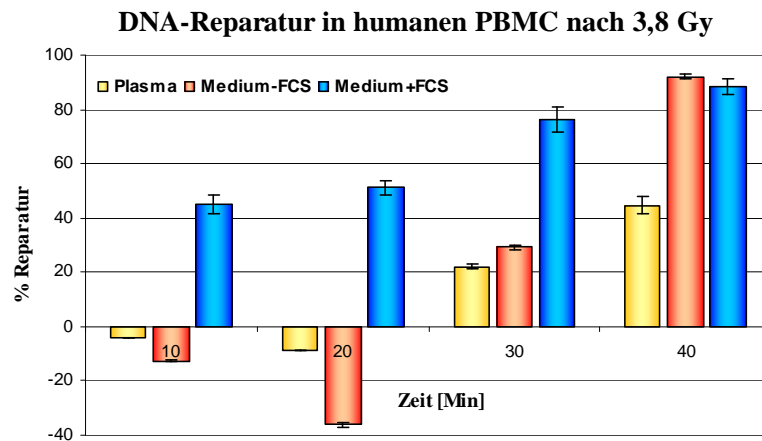


Abb. 54 DNA-Reparatur in humanen PBMC nach Bestrahlung. Die Zellen in Medium ohne FCS (rote Balken), Medium mit 10% FCS (blaue Balken) oder Plasma (gelbe Balken) inkubiert und jeweils bestrahlt. Die DNA-Reparatur wurde nach 10, 20, 30 und 40 Minuten gemessen. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

5.3.7 DNA-Strangbrüche und ihre Reparatur in spendereigenem Plasma

Es wurde festgestellt, dass die Anzahl an DNA-Strangbrüchen nach Bestrahlung in den Zellen, die im Medium bestrahlt wurden, höher ist als in den Zellen, die in spendereigenem Plasma bestrahlt wurden. Allerdings ist die Variabilität der Schädigung in Plasma und in Medium sehr gering. Der Unterschied im Fluoreszenzsignal zwischen in Medium und in Plasma inkubierten Zellen (Plasma minus Medium) beträgt 16,6% (Abb. 55).

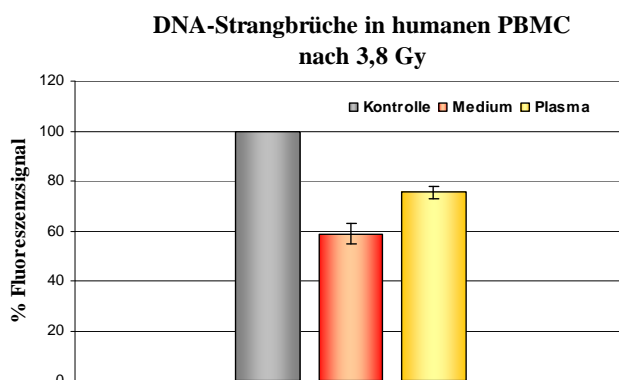


Abb. 55 DNA-Strangbrüche in humanen PBMC nach Bestrahlung. Der graue Balken ist der Kontrollwert P0 (physiologische DNA-Strangbrüche). Der rote Balken repräsentiert die Abnahme des Fluoreszenzsignals nach Bestrahlung in Medium ohne FCS und der gelbe Balken nach der Bestrahlung in spendereigenem Plasma. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von 4 Spendern.

PBMC von sechs Freiwilligen im Alter von 25 bis 59 Jahren wurden auf DNA-Reparatur untersucht. Die Zellen wurden in spendereigenem Plasma mit 3,8 Gy bestrahlt. Der Anzahl der DNA-Strangbrüche lag bei allen Spendern bei einem Wert für die Abnahme des Fluoreszenzsignals (P0–P1) von $22\% \pm 8,8\%$. Die Reparatur wurde nach 10, 20, 30 und 40 Minuten nach Inkubation bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ im Plasma gemessen. Bei den Spendern 2 und 4 wurde eine „langsamere“ DNA-Reparatur gemessen als bei den Spendern 1, 3, 5 und 6 (Abb. 56).

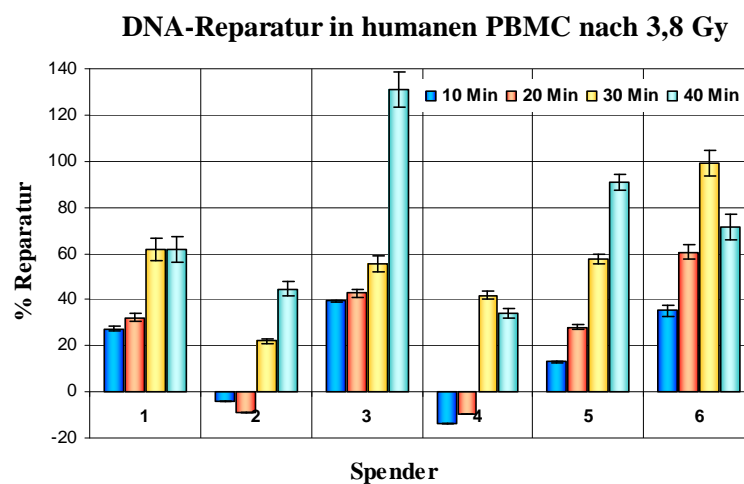


Abb. 56 DNA-Reparatur in humanen PBMC nach Bestrahlung. PBMC von 6 Spendern wurden gereinigt und in eigenem Plasma wieder aufgenommen und bestrahlt. Die DNA-Reparatur wurde nach 10, 20, 30 und 40 Minuten gemessen (blaue, rote, gelbe und grüne Balken). Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

5.3.8 Zink und DNA-Reparatur in spendereigenem Plasma

Ein Teil der PBMC von vier Spendern des vorigen Abschnittes wurden parallel während 5 Minuten mit $25\text{ }\mu\text{M}$ ZnSO_4 im Brutschank inkubiert. Nach der Bestrahlung wurde die DNA-Reparatur gemessen und mit der Reparatur der PBMC des jeweiligen Spenders ohne Zink-Behandlung verglichen.

Bei den Spendern 2 und 4 wurde eine Stimulierung der Reparatur nach Zink-Behandlung gemessen, im Gegensatz zu den Spendern 1, 3, 5 und 6, bei denen die Reparatur ohne Zink-Behandlung deutlich besser war als bei den Spendern 2 und 4 (Abb. 57).

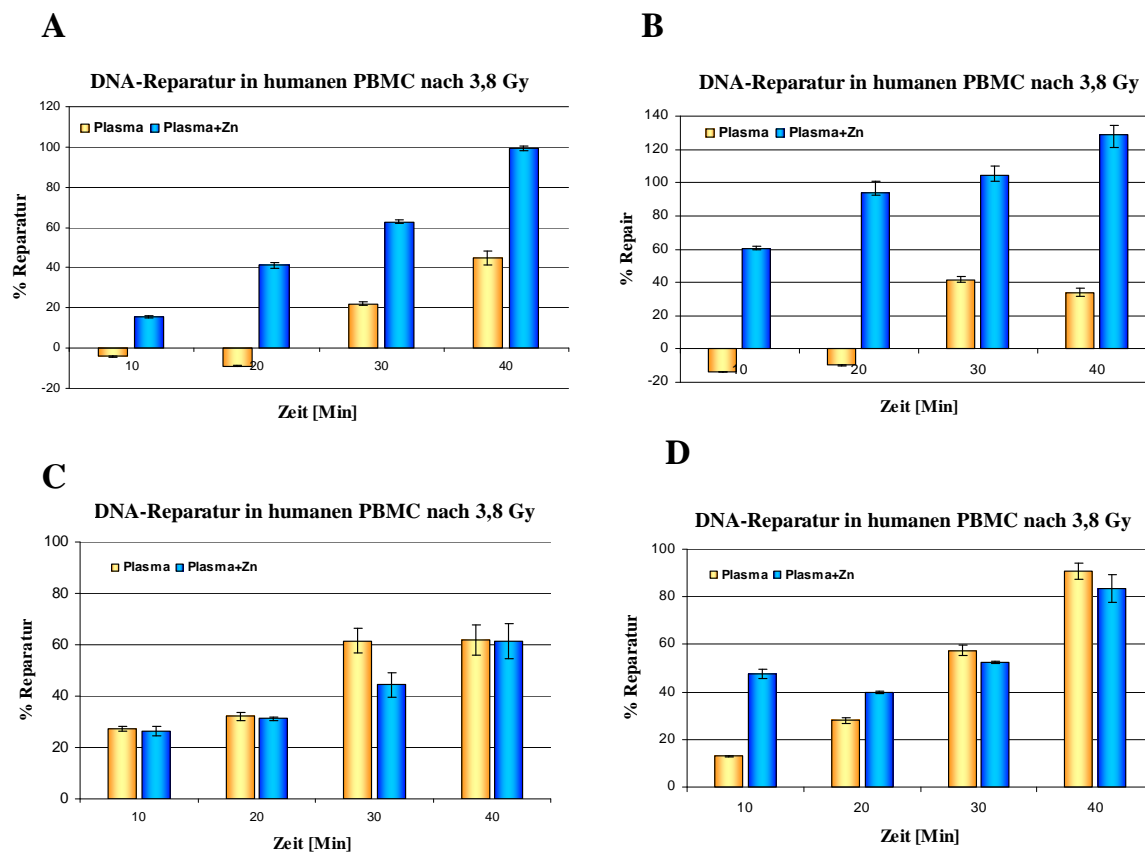


Abb. 57 DNA-Reparatur in humanen PBMC von vier Spendern (A, B, C und D) nach Bestrahlung. Die Zellen wurden 5 Minuten mit $25 \mu\text{M ZnSO}_4$ in Plasma auf 37°C inkubiert (blaue Balken) und danach bestrahlt. Die Kontrolle (gelbe Balken) wurden parallel aber ohne ZnSO_4 inkubiert und ebenso bestrahlt. Die DNA-Reparatur wurde in Plasma zugelassen. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

5.3.9 Zusammenfassung

Es gelang, die hier entwickelte neue Technologie mit Erfolg auf die biologische Fragestellung „Einfluss von Zink auf die DNA-Reparatur“ anzuwenden. Es wurden zahlreiche Optimierungsarbeiten durchgeführt und klare Unterschiede festgestellt, wie z. B. der Einfluss von FCS oder Medium auf die DNA-Reparatur in humanen PBMC. Es gelang darüber hinaus, neuartige Daten zu produzieren. Diese seien hier zusammengefasst:

1. Zink induziert bis zu einer Konzentration von 300 (humanen PBMC) bzw. 500 μM (Jurkat-Zellen) keine DNA-Strangbrüche (Abb. 48).
2. FCS hat einen positiven Effekt auf die DNA-Reparatur (Kapitel 2). Die Reparaturkapazität ist abhängig vom Medium (RPMI, RPMI + 10% FCS oder spendereigenes Plasma), in dem die Zellen inkubiert werden (Abb. 54).

3. Die DNA-Reparatur wird in Jurkat-Zellen nach Entzug von Zink gehemmt, diese Hemmung wird durch Wiedergabe von Zink rückgängig gemacht. Damit ist gezeigt, dass die DNA-Reparatur in Jurkat-Zellen von Zinkstatus abhängt (Abb. 50).
4. FCS hat eine „Pufferkapazität“ für Zink und eignet sich nicht für Untersuchungen zur Rolle von Zink auf die DNA-Reparatur- (Abb. 52).
5. Im Fall einer „langsameren“ Reparatur wird diese, in Jurkat-Zellen sowie in humanen PBMC, nach Inkubation mit Zink „beschleunigt“ (Abb. 49 und 57).
6. Eine hohe Zinkkonzentration (ab 50 μM) hemmt in humanen PBMC in Abwesenheit von FCS die Reparatur und führt zu einer Zunahme der DNA-Strangbrüche (Abb. 53).
7. In spendereigenem Plasma konnte die Zink-Abhängigkeit der DNA-Reparatur nachgewiesen (Abb. 56 und 57).
8. Die Anzahl an DNA-Strangbrüchen nach einer Bestrahlungsdosis von 3,8 Gy ist geringer in Zellen, die im Plasma inkubiert wurden (Abb. 55).

Kapitel 4

Anwendung der neuen FADU-Methode zur spezifischen Charakterisierung von DSB-Reparatur defizienter Zelllinien

5.4.1 Einleitung

Im Rahmen einer Kollaboration mit Professor Nicola Curtin von *Northern Institute for Cancer Research* an der Newcastle University in Newcastle Upon Tyne (England) ergab sich die Frage nach der näheren Charakterisierung von Zelllinien mit bekannter Defizienz in der DNA-Doppelstrangbruch (DSB)-Reparatur. Es handelt sich hier um drei Derivates der Hamterzelllinie CHO:

1. *V3-CHO-Zellen* sind defizient für die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK_{cs}), welche für den Reparaturweg des non-homologous end joining (NHEJ) notwendig ist;
2. *Irs1SF-CHO-Zellen* sind defizient für XRCC3, ein Protein, welches für die Reparatur durch homologe Rekombination (HR) essentiell ist;
3. *AA8-CHO-Wildtyp* Zellen dienen als Kontrolle.

Um die induzierten DNA-Strangbrüche zu quantifizieren, wurde die hier vorgestellte automatisierte FADU-Methode mit den oben beschriebenen Zelllinien durchgeführt. Um die Überlebensrate zu bestimmen wurde der *clonogenic survival assay* angewendet. Die DSB-Reparatur wurde mit dem γ -H2AX-Immunfluoreszenz-Assay untersucht.

Ergebnis

1. Mit dem *clonogenic survival assay* wurde bestätigt, dass die Überlebensrate der defizienten Zellen (V3 und irs1SF) erheblich unter der des Wildtyp (AA8) liegt (Abb. 58).
2. Mit dem automatisierten FADU-Assay wurden P0-Werte von 47,4% für AA8-, 46,4% für V3- und 39,5% für irs1SF-Zellen gemessen. Diese Werte sind überraschend niedrig. Das bedeutet, dass der „natürliche DNA-Zustand“ dieser Zellen, verglichen mit den humanen PBMC, einen deutlich höheren DNA-Strangbrüche aufweist. Unter diesen Umständen kann der FADU-Assay die Schädigung von „nur“ 2 Gy nicht mehr auflösen (Abb. 59).
3. Mit dem γ -H2AX-Immunfluoreszenz-Assay wurde gezeigt, dass die Zelllinien mit Defizienz im NHEJ nur etwa zwei Drittel der induzierte DSB innerhalb von 24 Stunden reparieren. Bei der Zelllinie mit Defizienz in der HR wurde das maximale Signal von

induzierten DSB erst nach 1 Stunde (statt 15 Minuten) detektiert. Diese induzierte DSB wurden zumindest innerhalb von 24 Stunden nicht repariert (Abb. 60-63).

5.4.2 Clonogenic survival assay

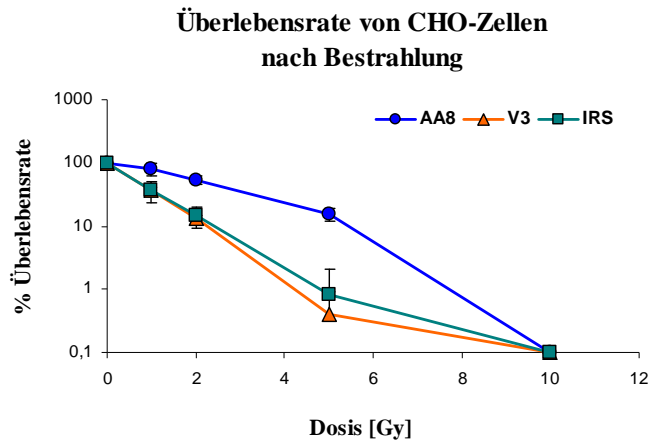
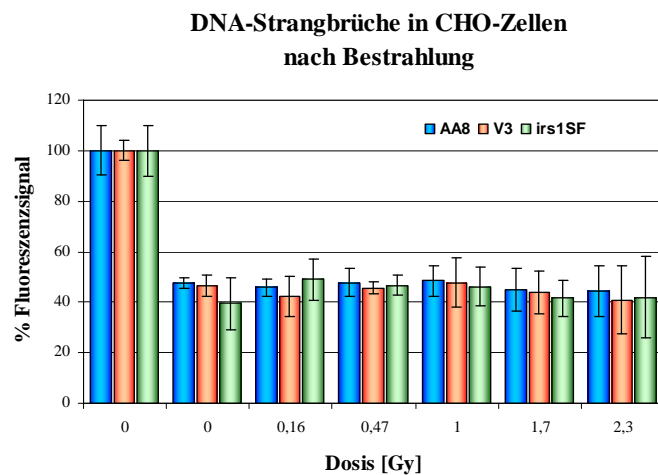


Abb. 58 Überlebensrate von CHO-Zellen nach Bestrahlung. AA8-Wildtyp (blau), V3- (rot) und irs1SF-Zellen (grün) wurden mit 0,15 bis 10 Gy bestrahlt und plattiert. Nach 7 (AA8 und V3) bzw. 10 Tagen (irs1SF) wurden die Kolonien gezählt. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

5.4.3 Automatisierter FADU-Assay

Abb. 59 DNA-Strangbrüche in CHO-Zellen nach Bestrahlung. AA8 Wildtyp Zellen (blaue Balken), V3- (rote Balken) und irs1SF-Zellen (grüne Balken) wurden mit 0,16 bis 2,3 Gy bestrahlt. Der Kontrollwert T wurde gleich 100% gesetzt (absolute DNA-Menge). Der PO-Wert (physiologische DNA-Strangbrüche) nimmt um 50-60% bei allen Zelltypen ab. Das Fluoreszenzsignal bleibt nach der Bestrahlung auf dem gleichen Niveau. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Vierfachbestimmungen.



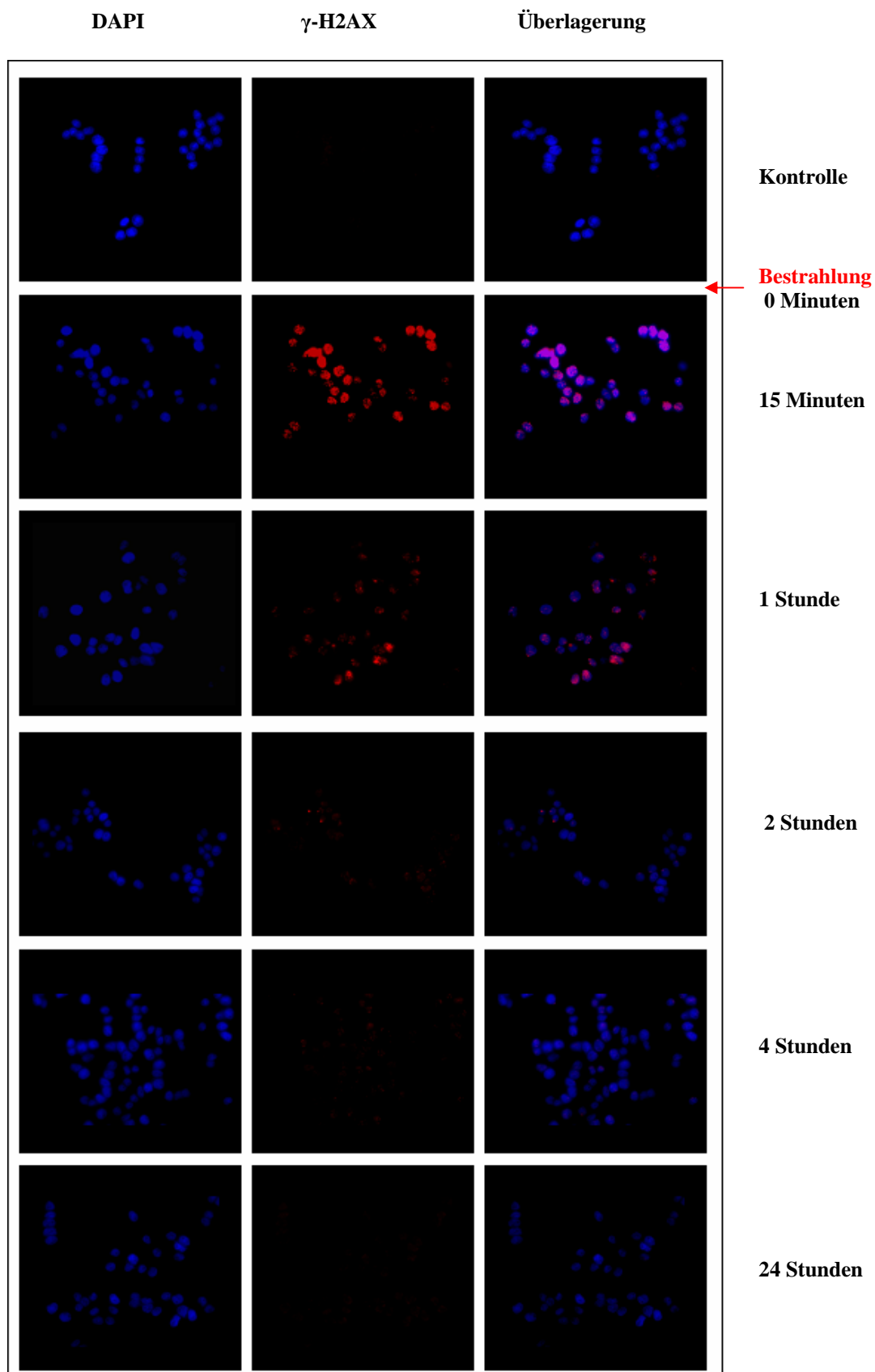
5.4.4 γ -H2AX-Immunfluoreszenz-Assay

Abb. 60 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der γ H2AX-Signale in AA8-CHO-Zellen. Die höchste Fluoreszenzintensität wurde 15 Minuten nach der Bestrahlung gemessen und nimmt in den folgenden 24 Stunden wieder ab. Die Bilder wurden mit dem 40x-Objektiv DplanApo 40UV Olympus aufgenommen.

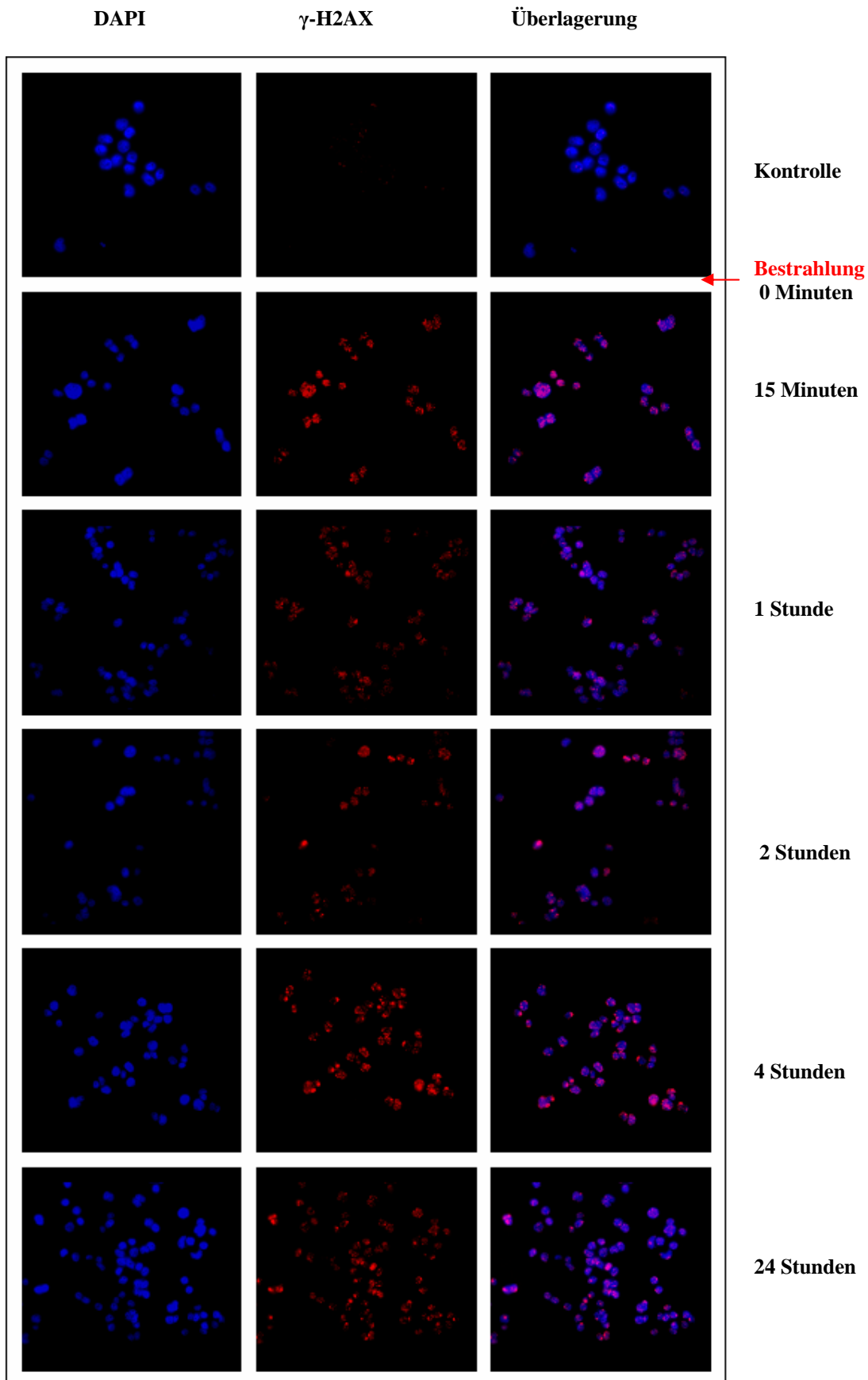


Abb. 61 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der γ H2AX-Signale in V3-CHO-Zellen. Die höchste Fluoreszenzintensität wurde 15 Minuten nach der Bestrahlung gemessen, nach 1 bis 2 Stunden nimmt sie ab und nach 4-24 Stunden wieder zu. Die Bilder wurden mit dem 40x-Objektiv DplanApo 40UV Olympus aufgenommen.

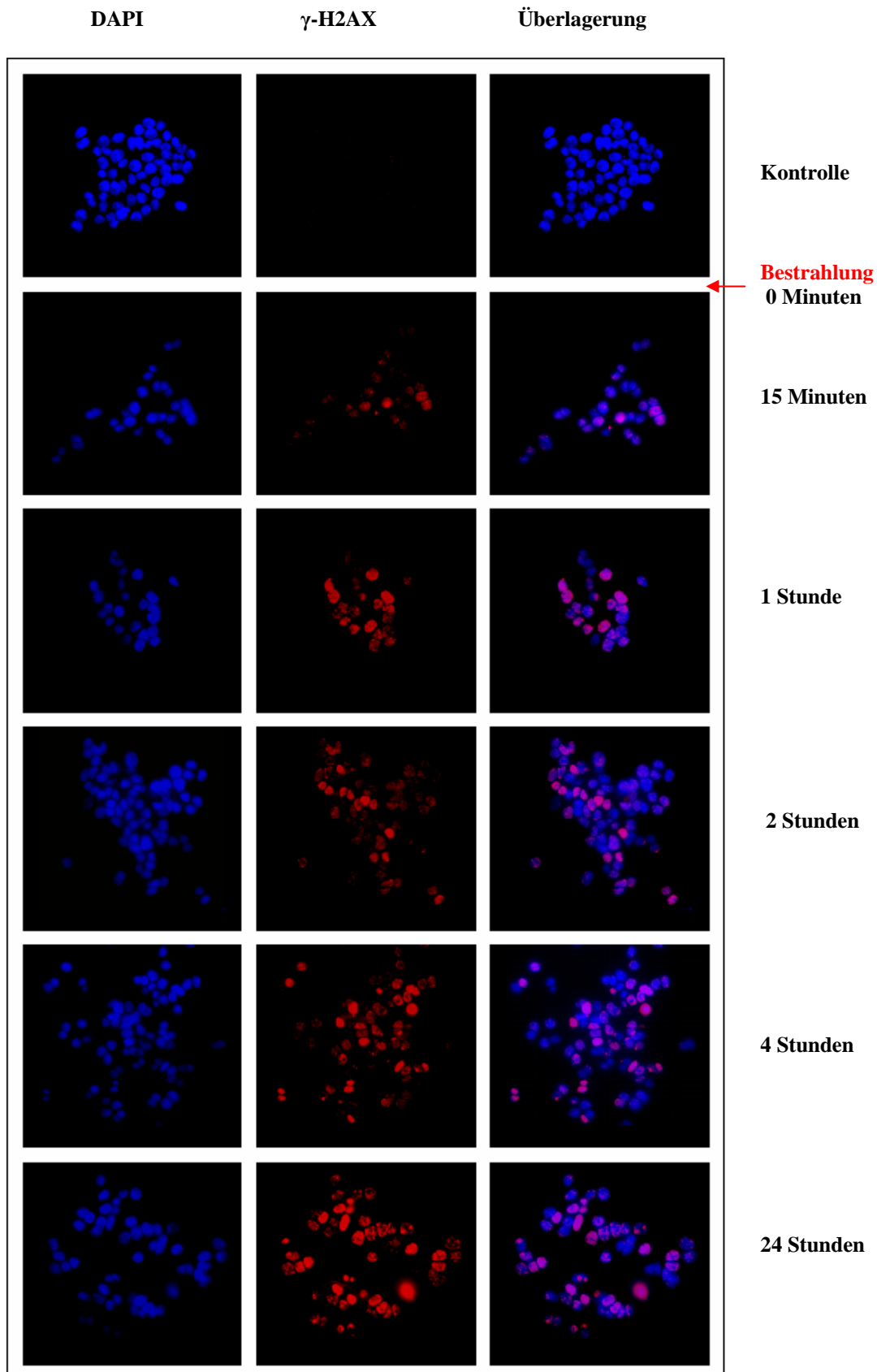


Abb. 62 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der γ H2AX-Signale in irs1SF-CHO-Zellen. Die höchste Fluoreszenzintensität wurde 1 Stunde nach der Bestrahlung gemessen und nimmt in den darauf folgenden 24 Stunden leicht zu. Die Bilder wurden mit dem 40x-Objektiv DplanApo 40UV Olympus aufgenommen.

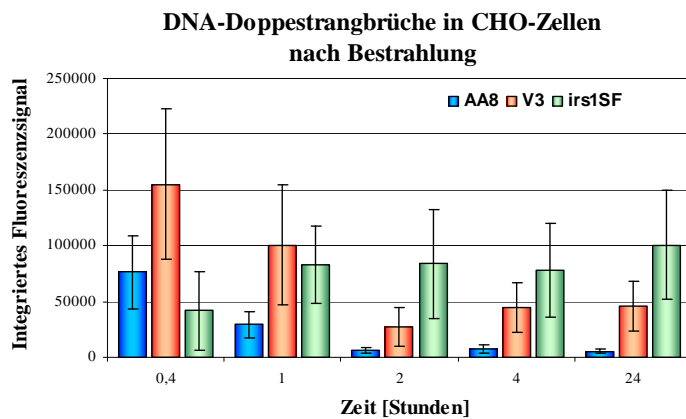


Abb. 63 DNA-Doppelstrangbrüche in CHO-Zellen nach Bestrahlung. AA8 Wildtyp Zellen (blaue Balken), V3- (rote Balken) und irs1SF-Zellen (grüne Balken) wurden mit 2 Gy bestrahlt. Um die Reparatur zuzulassen, wurden die Zellen 1, 2, 4 und 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die DSB-assoziierte Foci wurden mit γ -H2AX-immunfluoreszenz gemessen. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung bei Auswertung von 20-50 Zellkernen.

Mit den *clonogenic survival assay* traten wie erwartet deutliche Unterschiede in der Überlebensrate der drei Zelllinien zutage. Mit dem γ -H2AX-Immunfluoreszenz-Assay zur Detektion von DSB sind weitere Optimierungsarbeiten der Methode notwendig; alle Experimenten ergeben zwar die gleiche Tendenz, aber mit den bisherigen Daten ist eine Quantifizierung der DSB-Reparatur nicht möglich. Das „Standard-Protokoll“ des FADU-Assays ist aufgrund der starken alkalischen Entwindung der DNA auch ohne exogene Schäden für diese spezielle CHO-Zelllinie nicht geeignet.

Kapitel 5

Der automatisierte FADU-Assay im Vergleich mit dem Comet-Assay

5.5 Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen mit dem automatisierten FADU-Assay und dem Comet-Assay

Der Mikrogelelektrophorese-Assay (Comet-Assay) gilt als etablierte Standard-Methode zur Messung von DNA-Strangbrüchen und DNA-Reparatur. In diesem Kapitel wird der Comet-Assay mit der neuen automatisierten FADU-Methode verglichen. Es sei darauf hingewiesen, dass es um den Vergleich beider Methoden geht und nicht um eine biologische Fragestellung. Es wurde daher ein in der Literatur beschriebenes, Standard-Experiment ausgewählt, dessen hier relevante Ergebnisse durch eigene Experimente mit drei unterschiedlichen Etoposid-Konzentrationen und vier Bestrahlungsdosen annähernd bestätigt werden konnten (Olive *et al.*, 2006 und www.trevigen.com/pdfs).

Experimente

Jurkat-Zellen wurden 1 Stunde mit Etoposid inkubiert bzw. mit Röntgenstrahlen bestrahlt. Die induzierten DNA-Strangbrüche wurden mit dem Comet-Assay sowie mit dem automatisierten FADU-Assay gemessen. Die Bestrahlungsdosen und die Etoposid-Konzentrationen sind in folgender Tabelle für beide Methoden zusammengefasst:

Alkalischer Comet-Assay	Neutraler Comet-Assay	Automatisierter FADU-Assay	Automatisierter FADU-Assay
Bestrahlung [Gy]	Etoposid [μ M]	Bestrahlung [Gy]	Etoposid [μ M]
0	0	0	0
0,5	1	0,43	1
1	5	1,1	5
1,5	15	1,59	15
2,5		2,17	

Für den Comet-Assay wurden Jurkat-Zellen bestrahlt und mit der alkalischen Version (zu Detektion von SSB) des Comet-Assays gemessen. Die DNA-Strangbrüche nach Etoposid

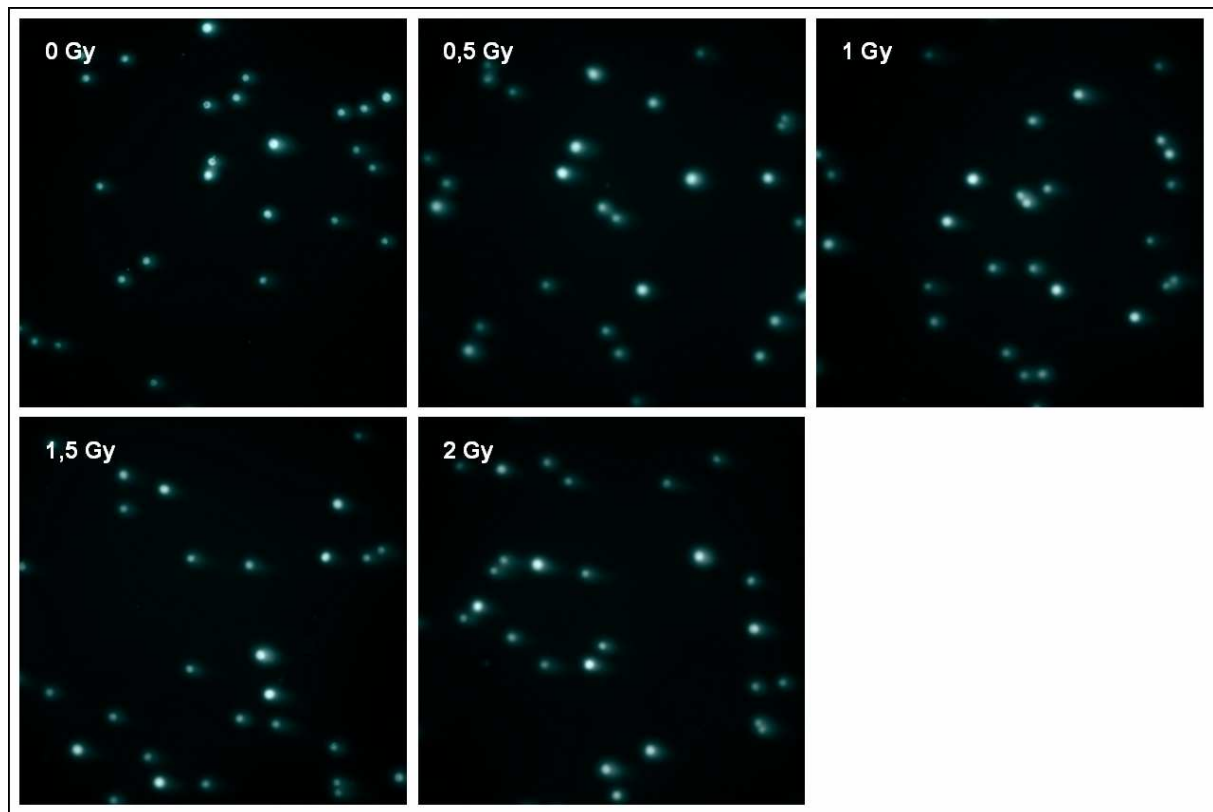
wurden mit der neutralen Version (zu Detektion von DSB) des Comet-Assays gemessen. Die DNA-Strangbrüche wurden als *tail moment* ausgedrückt.

$$\textit{tail moment} = \frac{\text{Schweiflänge} \times \text{DNA-Gehalt des Schweifes}}{100}$$

Ergebnisse

Die Abbildungen 64 und 65 zeigen Originaldaten der durchgeführten Comet-Assays sowie die Quantifizierung der Ergebnisse. In Abbildung 66 ist ein Vergleich der Ergebnisse aus den Comet-Assays mit dem FADU dargestellt.

A



B

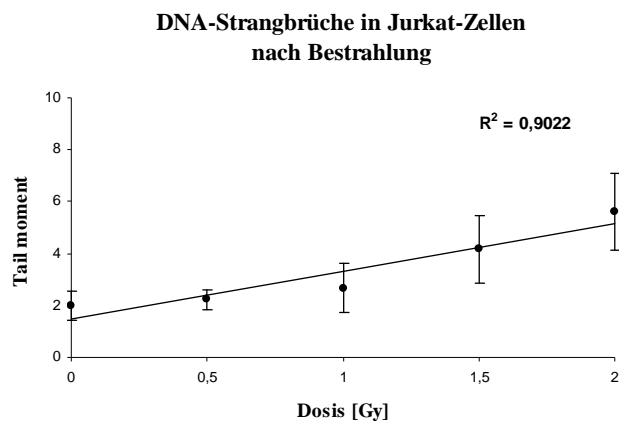
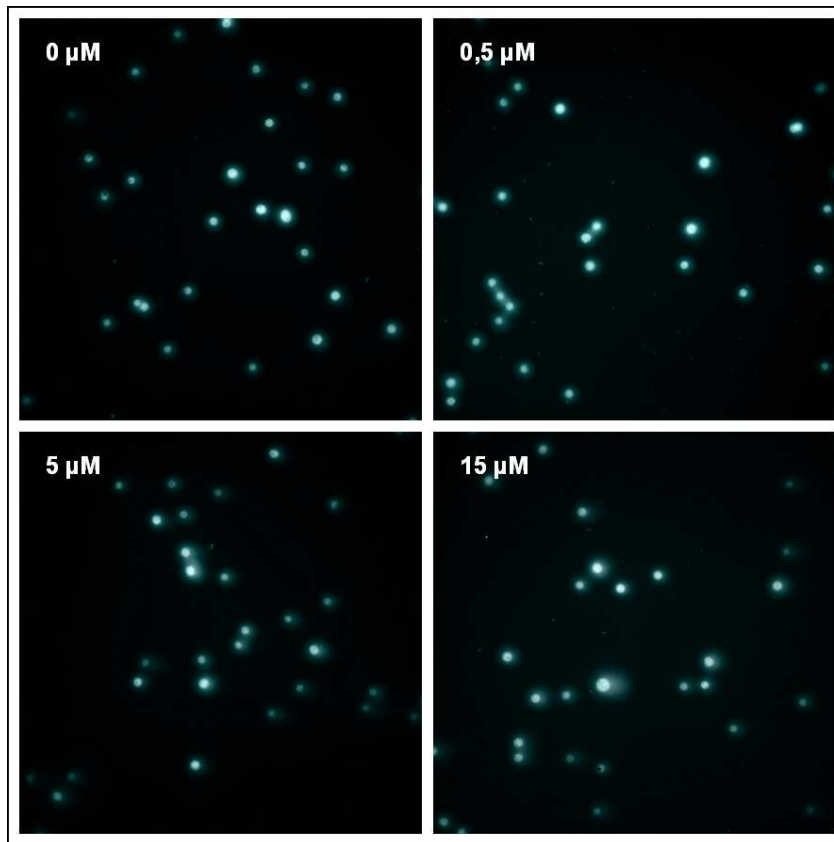


Abb. 64 DNA-Strangbrüche in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis beim Comet-Assay. Jurkat-Zellen wurden mit verschiedenen Dosen zwischen 0,5 und 2 Gy bestrahlt. Mit zunehmender Dosis nimmt das *tail moment* zu. **A)** DNA-Fluoreszenzbilder von Zellkernen, **B)** graphische Darstellung nach Auswertung von 40 Zellkernen pro Kontrolle, bzw. pro Bestrahlungsdosis. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung bei Auswertung von 40 Zellkernen. t-Test $p < 0,03$

A



B

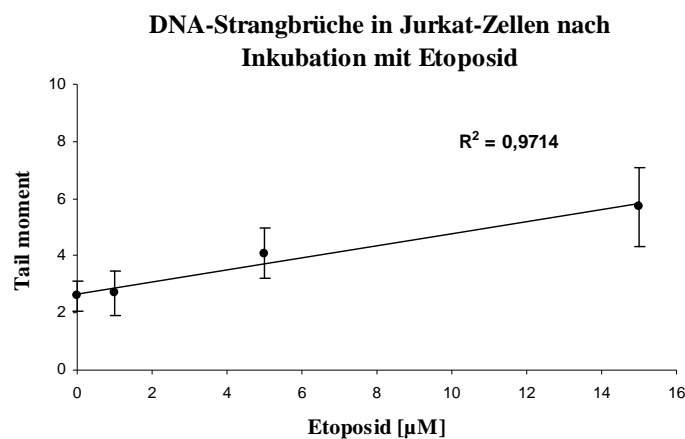


Abb. 65 DNA-Strangbrüche in Abhängigkeit von der Etoposid-konzentration beim Comet-Assay. Jurkat-Zellen wurden mit Konzentrationen zwischen 1 und 15 µM Etoposid während 1 Stunde inkubiert. Mit zunehmender Konzentration nimmt das Tail moment zu. **A)** DNA-Fluoreszenzbilder von den Zellkernen, **B)** graphische Darstellung nach Auswertung von 40 Zellkernen pro Kontrolle, bzw. pro Konzentration. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der Standardabweichung bei Auswertung von 40 Zellkernen. t-Test $P < 0.001$ ab 5 µM

Um die Ergebnisse der beiden Methoden vergleichen zu können und in einer übersichtlichen Abbildung zusammenzufassen, wurden die Tail Moment-Werte in Prozent-Werte transferiert: ein *tail moment* von 10 wurde als 100% definiert.

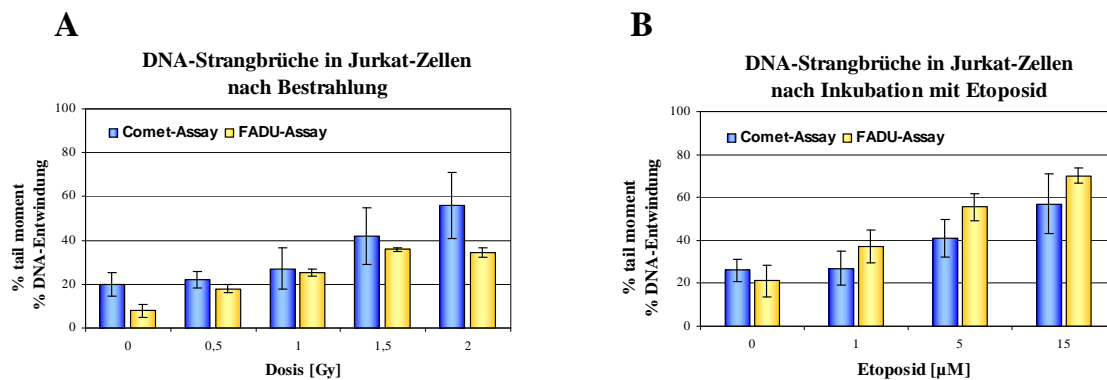


Abb. 66 Gegenüberstellung von Comet- und FADU-Assay. Jurkat-Zellen wurden bestrahlt (A) oder 1 Stunde mit Etoposid inkubiert (B). Für die Quantifizierung der DNA-Strangbrüche wurden der Comet-Assay (blaue Balken) und, als separates Experiment, der FADU-Assay durchgeführt (gelbe Balken). Mit dem Comet-Assay wurde eine Zunahme des *tail moment* mit steigenden Dosen (Bestrahlung) bzw. Konzentrationen (Etoposid) gemessen. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung bei Auswertung von 40 Zellkernen. Zum Vergleich wurde mit den FADU-Assay die Zunahme der Entwindung gemessen. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Dreifachbestimmung.

Aus der Abb. 66 ist ersichtlich, dass die mit dem FADU-Assay gemessene Fluoreszenzsignale mit aufsteigender DNA-Schädigung sich, wie erwartet, tendenziell im *tail moment* des Comet-Assay widerspiegeln. Allerdings sind die folgenden, sehr deutlichen Unterschiede zu vermerken:

1. Die mit dem FADU-Assay gemessenen Standardabweichungen liegen zwischen 1,2 und 2,6%, während die vom Comet-Assay zwischen 16,6 und 26,6% liegen.
2. Die Detektionsschwelle ist sowohl bei Röntgenbestrahlung als auch bei Etoposidbehandlung im FADU-Assay niedriger.
3. Der Zeitbedarf für die beiden Assays unterscheidet sich drastisch: Der FADU-Assay benötigt 2,5 Stunden, der Comet-Assay über 10 Stunden.

6. Diskussion

6.1 Weiterentwicklung des automatisierten *Fluorimetric analysis of DNA unwinding* (FADU)-Assays

6.1.1 Verbesserung der Empfindlichkeit

Verlässliche und anwenderfreundliche Methoden zur Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen und DNA-Reparatur werden seit vielen Jahren gesucht. Die heute bekannten Methoden sind allerdings immer noch aufwendig, wenig robust und teuer. Die Idee, eine automatisierte Methode zur Erfassung von DNA-Strangbrüchen und DNA-Reparatur zu entwickeln, die einfach, kostengünstig und zuverlässig ist, mit der erfasst werden können, wurde bereits in früheren Arbeiten vorgestellt (Pfeiffer, 2001 und Moreno-Villanueva, Diplomarbeit 2004). Das Original-Protokoll der FADU-Methode (Birnboim *et al.*, 1981) wurde dabei wesentlich modifiziert und automatisiert, und es gelang, DNA-Strangbrüche mit hoher Reproduzierbarkeit zu messen.

Eines der Ziele der vorliegenden Arbeit war die Weiterentwicklung der Methode, um eine höhere Empfindlichkeit zu erreichen und die Reparatur der DNA in sehr kurzen Zeitabständen zu erfassen. In Kapitel 1 werden die wesentlichen Optimierungsarbeiten gezeigt, und es wird anhand von repräsentativen Beispielen dargestellt, dass die von einer Strahlendosis von nur 0,14 Gy induzierten DNA-Strangbrüche mit hoher Zuverlässigkeit und statistischer Signifikanz detektiert werden können (Abb. 19). Eine Bestrahlung mit 3 Gy induziert in einer diploiden Zelle etwa 1000 Einzelstrangbrüche (SSB) und etwa 60 Doppelstrangbrüche (DSB) (Mitzel-Landbek und Hagen, 1976). Das heißt, die hier verbesserte Methode kann etwa 47 SSB und etwa 3 DSB mit statistischer Signifikanz detektieren.

6.1.2 Entwicklung von neuen Modulen

Es wurde ein Temperiermodul für drei 96-Well-Platten entwickelt, wodurch wurde die Kapazität der Messung um das Dreifache erhöht wurde (Abb. 14). Die Nutzung als „high throughput“-Methode ist damit durchaus denkbar, hängt aber von verschiedenen Faktoren ab, z.B. davon, welche Hardware zu Verfügung steht. Gegenüber dem hier eingesetzten TECAN-Roboter mit acht Pipettenspitzen würde ein 96-Spitzen-Roboter zwar den Durchsatz weiter erhöhen; allerdings würde das auch gesteigerten Ansprüche an die Personalkapazität für der

Probenvorbereitung bedingen. Deshalb wurden Strategien überlegt, die die Durchführung des Experiments einfacher und gleichzeitig die Messung präziser machen. Genau dies ist mit der Entwicklung einer speziellen Eisbox für Eppendorf-Reaktionsgefäße gelungen (Abb. 13). Sie ist an verschiedenen Stellen im Protokoll einzusetzen und dient als Verbindung zwischen kritischen Schritten, so dass diverse zeitraubende und sensitivitätsmindernde Transport- bzw. Pipettierschritte entfallen. Sie ermöglicht die Automatisierung weiterer Schritte und kann auch für die Bestrahlung der Zellen genutzt werden; ein Dosimetersensor kann millimetergenau auf gleicher Höhe wie die zu bestrahlenden Zellen positioniert werden. Damit wurde die Methode vereinfacht.

6.1.3 Bedeutung von P0-Werten

Eine humane diploide Zelle hat 46 Chromosomen und jedes Interphase-Chromosom hat zwei Telomere, die als „offene“ DNA-Stellen und damit als Angriffspunkte für die Entwindung gelten; das heißt, die genomische DNA wird mit der FADU-Methode an mindestens 92 Stellen entwunden. Diese Anzahl an „Telomer-DNA-Brüchen“ manifestiert sich im Falle von PBMC in einer basalen Entwindung von ca. 10% (Abb. 21), d.h. der P0-Wert liegt bei etwa 90% des T-Werts. In replizierenden Zellen wie Jurkat-Zellen ist der P0-Wert niedriger, was man sich dadurch erklären könnte, dass auch Replikationsgabeln als „offene“ Stellen in der DNA weitere Startpunkte für die alkalische Entwindung sind. In humanen PBMC, die 20 Stunden in RPMI-Medium + 10% FCS inkubiert worden waren, wurde ebenfalls ein niedrigerer P0-Wert gemessen, obwohl diese Zellen durch diese Maßnahme die G₀-Phase des Zellzyklus nicht verlassen haben. Dies lässt Spekulation zu, ob FCS die Zellen zu verstärkter Transkription stimuliert und auch diese Transkriptionsstellen als „offene“ DNA-Stellen ein neuer Angriffspunkt für die Entwindung sein könnten. Eine weitere mögliche Erklärung für eine Abnahme der P0-Wert könnte die durch den Ablauf des Experiments induzierten DNA-Strangbrüche sein, z.B. durch das Trypsinieren von adhärennten Zellen. In diesem Zusammenhang wurde hier gemessen, dass das Abschaben von Zellen mehr DNA-Strangbrüche (um 12% höheres Fluoreszenzsignal) induziert als Trypsin und somit Trypsin eine schonendere Methode ist, um die Zellen vom Boden der Kulturflasche abzulösen. Die Möglichkeit, „unerwünschte“ DNA-Strangbrüche im System zu detektieren, ist mit Sicherheit von großem Vorteil.

In diesem Kapitel wurde auch gezeigt, dass es möglich ist, eine „Klassifizierung“ der Zelltypen gemäß ihres „physiologischen DNA-Status“ zu machen. Mit dieser neuen Version des FADU-

Assays wurden in humanen PBMC, HeLa-, Jurkat-, bzw. in Hamster-Zellen und Vogel-Erythrozyten die physiologischen DNA-Strangbrüche anhand der P0-Werte gemessen und untereinander verglichen (Abb. 21). Die Unterschiede zwischen den Zelltypen ist nicht nur eine sehr wichtige Information wenn es darum geht einen bestimmten Zelltyp für die DNA-Forschung auszuwählen, sondern kann auch bei bestimmten biologischen Vorgängen (z.B. Karzinogenese) interessante biologischer Informationen liefern. So ist bereits seit längerem bekannt, daß sich maligne Tumorzellen durch eine erhöhte spontane genomische Instabilität auszeichnen und dass letztere geradezu eine treibende Kraft der Krebsentstehung und –entwicklung darstellt. Die bei der hier untersuchten Auswahl von transformierten Zellen überraschenderweise aufgefundenen und teilweise starken Absenkungen der P0-Werte weisen daraufhin, dass solche Zellen möglicherweise einen aktive, endogene Quelle für DNA-Strangbrüche besitzen, was letztlich die genetische Instabilität antreibt. Eine tiefere Untersuchung dieser Zusammenhänge wäre sicher lohnenswert.

6.1.4 Optimierung neuer Protokolle

Man kann die Entwindung der DNA durch Änderungen der Messbedingungen (pH, Temperatur, Entwindungszeit, Alkalikonzentration) beeinflussen. Das chemische Gleichgewicht zwischen Entwindung und Neutralisation (Stopp der Entwindung) ist sehr labil, das heißt, eine kleine Änderung im Protokoll kann große Konsequenzen haben und dies erschwert die rasche Modifikation des Assays für spezielle Zwecke. Um DNA-Strangbrüche in humanen PBMC und humanen Zelllinien mit hoher Empfindlichkeit detektieren zu können, wurde das Protokoll mit starken alkalischen Bedingungen optimiert. Mitochondrien- und Plasmid-DNA wurden aber unter diesen Bedingungen, aufgrund ihrer Größe (14 kb), komplett entwunden. Auch andere Zellen wie Vogel-Erythrozyten oder CHO-Zellen, die von Natur aus eine hohe Anzahl an DNA-Strangbrüchen aufweisen, lassen sich unter diesen starken alkalischen Bedingungen nur schwer untersuchen. Es ist aber gelungen, das labile chemische Gleichgewicht so zu modifizieren, dass es jetzt möglich ist, 8-Oxo-Guanin-Schäden in Plasmid-DNA indirekt durch das Enzym Formamidopyrimidin-Glykosylase (Fpg) zu detektieren (Abb. 23). Außerdem wurden erfolgreich 8-Oxo-Guanin-Schäden an muriner mt-DNA gemessen, und es konnte gezeigt werden, dass ältere Mäuse mehr 8-Oxo-Guanin-Stellen in ihren Herz-Mitochondrien haben als jüngere Mäuse (Abb. 24).

6.2 Validierung des neuen automatisierten FADU-Assays zur Detektion von DNA-Strangbrüchen und ihrer Reparatur in verschiedenen Zellsystemen

6.2.1 Messung von DNA-Strangbrüchen

„Dosis sola facit venenum“ (Paracelsus, *1493; †1541), auf Deutsch: „Allein die Dosis macht das Gift“. Die Wirkung hoher Mengen lassen sich meistens gut messen und untersuchen, aber der toxische Effekt kleinerer Mengen bleibt uns oft verborgen. Dieser Bereich des Nichtwissens ist zumeist durch einen Mangel an geeigneten Methoden begründet, welche dieses kleine Wirkungsfenster erfassen können; deshalb ist es wichtig, neue, sensitivere Methoden zu entwickeln, mit denen auch kleine Primäreffekte, die aber oft gravierende Folgen haben können (z.B. Karzinogenese), studiert werden können. Mit der hier etablierten Methode ist es gelungen, die genotoxische Wirkung sehr geringer Dosen bekannter Substanzen in einer sehr kurzen Inkubationszeit (5 Minuten) zu untersuchen. Es wurden Substanzen ausgewählt, von denen man weiß, dass sie DNA-Strangbrüche induzieren, nämlich Camptothecin, Etoposid, LPS, SIN-1 und DMSO. Über deren Wirkungsweise ist einiges bekannt (siehe Abschnitt 3.2), aber mit der neuen FADU-Methode konnten wichtige neue Informationen gewonnen werden, z.B., wie schnell eine Substanz DNA-Strangbrüche induziert und wie schnell diese wieder repariert werden. Die Ergebnisse variieren von Zelltyp zu Zelltyp, aber innerhalb eines Zellsystems sind die Daten hoch reproduzierbar. Die alkalische Entwindung von doppelsträngiger DNA ist der zentrale Mechanismus des FADU-Assays. Aufgrund der gewaltigen Verstärkung ist es möglich, wenige DNA-Strangbrüche zu detektieren. Unter den gewählten Entwindungsbedingungen werden schätzungsweise $3,5 \times 10^6$ bp rechts und links von jedem DNA-Strangbruch entwunden. So werden „mikroskopische“ Schäden sichtbar gemacht. Diese Entwindungsstrecke kann wie folgt abgeschätzt werden:

Man nehme an, man habe eine Zelle ohne chromosomeninterne Strangbrüche (eine ungeschädigte, nicht-replizierende, nicht-transkribierende Zelle). In dieser bilden nur die Chromosomenenden (Telomere) den Ausgangspunkt für die alkalische DNA-Entwindung. Diese Annahme trifft am ehesten auf Zelltypen zu, bei denen sich der gemessene P0-Wert möglichst wenig vom T-Wert unterscheidet. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit bei humanen PBMC gezeigt, bei denen der P0-Wert ca. $10\% \pm 5$ unter dem T-Wert liegt. In einer einfachen Abschätzung entsprechen 10%-Fluoreszenzsignalabnahme 10% Entwindung des $3,2 \times 10^9$ bp-großen Genoms, bestehend aus 46 Chromosomen. Jedes Chromosom hat 2

Telomere und jedes Telomer ist ein Startpunkt für die alkalische Entwindung. Die „einseitige Entwindungsstrecke“ ergibt sich zu:

$$\text{Einseitige Entwindungsstrecke} = \frac{0,1 \times 3,2 \cdot 10^9 \text{ bp}}{2 \times 46} = 3,5 \cdot 10^6 \text{ bp}$$

Um in diesem idealen Modell die minimale Anzahl an induzierten DNA-Strangbrüchen, die notwendig sind, um die restliche doppelsträngige DNA vollständig zu entwinden, ergibt sich:

$$\text{Maximale DNA-Strangbrüche} = \frac{0,9 \times 3,2 \cdot 10^9 \text{ bp}}{2 \times 3,5 \cdot 10^6 \text{ bp}} = 411$$

Bei dieser Betrachtung wurde angenommen, dass die DNA-Strangbrüche mit einem idealen Abstand von $2 \times 3,5 \times 10^6$ bp voneinander entfernt sind. In Wirklichkeit sind die DNA-Strangbrüche nicht gleich verteilt und das führt zu einer gegenseitigen Überlappung der Entwindungsstrecken. Überlappung bedeutet eine nicht-lineare Beziehung zw. DNA-Strangbrüchen und der Abnahme des Fluoreszenzsignals. Die Überlappung ist desto wahrscheinlicher je höher die Zahl der DNA-Strangbrüche ist. Experimentell wurde bis zu einer Dosis von 2,5 Gy eine näherungsweise lineare Beziehung gemessen.

Man könnte sich auch fragen, wie viele DNA-Strangbrüche unterschiedlicher Art genotoxische Expositionen verursachen. Nach der Abschätzung oben, 411 DNA-Strangbrüche würden idealerweise eine 100% DNA-Entwindung beduten. Mit Hilfe einer Eichgerade wurde festgestellt, dass 1Gy etwa 27% DNA-Entwindung entspricht (Abb. 67). Dann entspricht 27% DNA-Entwindung etwa 111 DNA-Strangbrüche.

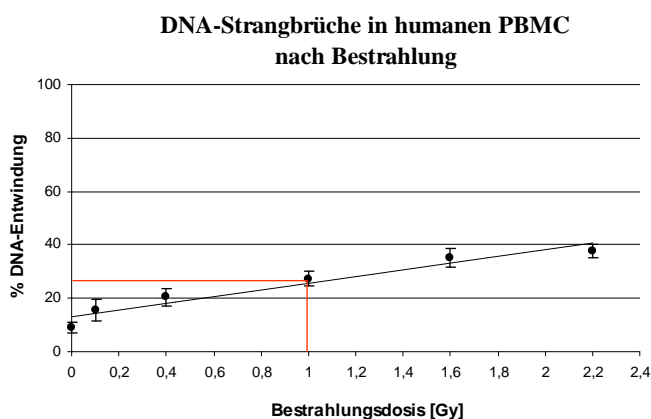


Abb. 67 DNA-Entwindung in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdosis. Humane PBMC wurden auf Eis bestrahlt und mit dem FADU-Assay gemessen. Die DNA-Entwindung nimmt mit der Zunahme der Bestrahlungsdosis zu. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung in Vierfachbestimmung.

Unter der Voraussetzung, dass das Fluoreszenzsignal und die Anzahl der DNA-Strangbrüche in einer linearen Beziehung zueinander stehen ist diese Bedingung im Bereich von 0 bis 2,2 Gy erfüllt. Damit ergibt sich die folgende Tabelle:

Art der Exposition	Zelltyp	Dosis/Konzentration	Expositionszeit	gemessene Fluoreszenzabnahme	abgeschätzte DNA-Strangbrüche
CPT	PBMC	500 nM	5 Minuten	35%	144
Etoposid	Jurkat	10 µM	10 Minuten	40%	164
SIN-1	Jurkat	1 mM	30 Minuten	20%	82
LPS	PBMC	0,1 ng/ml	15 Minuten	40%	164
DMSO	Jurkat	15%	30 Minuten	35%	144

Tab. 6 Abschätzung der Anzahl der induzierten DNA-Strangbrüche. Nach Bestrahlung oder Inkubation der Zellen mit verschiedenen genotoxischen Substanzen wurden mit Hilfe der Entwindung die DNA-Strangbrüche jeweils abgeschätzt.

6.2.2 Messung von DNA-Reparatur

Mit zahlreichen Experimenten wurde gezeigt, dass die neue automatisierte FADU-Methode DNA-Reparatur in Intervallen von nur 5 Minuten in verschiedenen Zellsystemen detektieren kann. Es wurde auch eine „DNA-Reparatur-Kinetik“ aufgenommen nach Induktion der DNA-Strangbrüche mit verschiedenen Substanzen. Das Erreichen eines Fluoreszenzsignals von 100% bedeutet dabei, dass alle induzierten DNA-Strangbrüche repariert worden sind. Eine über den P0-Wert (physiologische DNA-Strangbrüche) „hinausschießende“ DNA-Reparatur ist durchaus möglich und wurde in sehr wenigen Fällen gemessen (Abb. 49). Diese „übermäßige“ DNA-Reparatur wurde immer in Verbindung mit niedrigeren P0-Werten beobachtet. In diesen einzelnen Fällen könnte es daran liegen, dass während des Experimentes „unerwünschte“ DNA-Strangbrüche vor der induzierten Schädigung entstanden sind und diese auch „mitrepariert“ wurden.

Es wurde auch ein positiver Effekt von FCS auf die Reparatur beobachtet. Hieraus stellt sich die Frage, ob man die DNA-Reparatur generell in Medium mit oder ohne FCS untersuchen soll. Im Fall von Zelllinien, die ohnehin in Medium mit FCS kultiviert werden, würde dies keine Zugabe von „fremden“ Substanzen bedeuten, was man aber im Fall von frisch gewonnenen humanen PBMC mit Sicherheit nicht sagen kann. Eine wertvolle Information für die genetische Toxikologie ist, zu welchem Zeitpunkt die Schädigung von der Reparatur

„überholt“ wird. Jurkat-Zellen wurden für 5 Minuten mit 100 nM CPT inkubiert, 20 Minuten danach war etwa die Hälfte der induzierten DNA-Strangbrüche repariert. Wenn man aber Jurkat-Zellen mit der gleichen Dosis (100 nM) für 30 Min inkubiert, wurde eine niedrigere Anzahl an DNA-Strangbrüchen gemessen, und zwar genau um das Fluoreszenzsignal, welches einer DNA-Reparatur von 20 Minuten entspricht. Hier wurde der Begriff „versteckte Reparatur“ eingeführt, da es sich um eine DNA-Reparatur handelt, die durch die lange Inkubationszeit für den Experimentator „versteckt“ bleibt (Abb. 45).

Da es in diesem Kapitel nicht darum ging, DNA-Reparatur-Mechanismen zu untersuchen, wurde die Zunahme des Fluoreszenzsignals, um die Ergebnisse deutlicher und einheitlich darzustellen, als DNA-Reparatur interpretiert. Hierbei muss aber erwähnt werden, dass eine solche Interpretation die Kenntnis der Art der Schädigung voraussetzt. Es ist bekannt, dass Etoposid nach 40 Minuten vom DNA-Topoisomerase-II-Komplex dissoziiert (Errington *et al.*, 2004), in diesem Fall ist nicht auszuschließen, dass die Zunahme des Fluoreszenzsignals durch die reversible Wirkung der Inhibition der Topoisomerase II zustande kommt. Andererseits wurde auch gezeigt, dass der NHEJ-Reparaturweg eine wichtige Rolle bei der Reparatur der Etoposid-induzierten DSB spielt (Malik *et al.*, 2006), so dass die Fluoreszenzsignal-Zunahme auch die Reparatur von DSB bedeuten kann. Für eine eindeutige Interpretation sind weitere Experimente erforderlich, z.B. mit Hilfe von DNA-Reparatur-Inhibitoren. Im Fall des PARP-1-Inhibitors 3-AB wurde gezeigt, dass nach Röntgenbestrahlung der Zellen das Fluoreszenzsignal in Anwesenheit des Inhibitors in den ersten 30 Minuten um etwa 25% weniger zunimmt. Daraus lässt sich schließen, dass dieses um 25% erhöhte Fluoreszenzsignal in den Zellen ohne 3-AB DNA-Reparatur bedeuten (Abb. 47).

6.3 Anwendung der neuen FADU-Methode zur Untersuchung der Rolle von Zink in der DNA-Reparatur in Abhängigkeit des Alters

Die Rolle von Zink in biologischen Systemen stellt ein breit gefächertes Forschungsgebiet dar und ist von großer Relevanz für die Toxikologie, die Ernährungsforschung und für die klinische Medizin. Ein direkter Einfluss von Zink auf eine DNA-Reparatur ist (meines Wissens) nicht bekannt. Mit der hier entwickelten FADU-Methode wurde in dieser Arbeit der Einfluss von Zink auf die DNA-Reparatur *in vitro* bearbeitet und eine Abhängigkeit der DNA-Reparatur in Jurkat-Zellen vom Zinkstatus ermittelt (Abb. 50).

Angewandt an PBMC gesunder Spender konnte die entwickelte Methode eine starke Variabilität in der DNA-Reparatur der einzelnen Spender aufzeigen (Abb. 68).

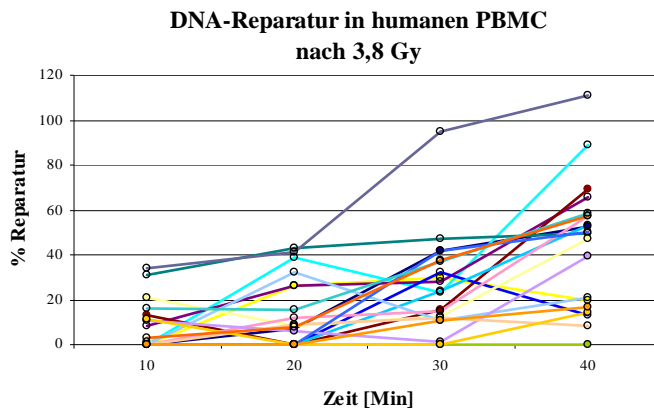


Abb. 68 DNA-Reparatur in humanen PBMC nach Bestrahlung. PBMC von 20 Spendern wurden gereinigt und in Medium ohne FCS wieder aufgenommen und bestrahlt. Die DNA-Reparatur wurde nach 10, 20, 30 und 40 Minuten gemessen. Jede Farbe repräsentiert einen Spender.

So zeigt die Gruppe der jungen Raucher eine schwächere DNA-Reparatur als gleichaltrige Nichtraucher (Abb. 69). Weiter konnte eine altersabhängige DNA-Reparatur ermittelt werden. Spender zwischen 31 und 62 Jahre besitzen eine schwächere Reparatur als Spendern zwischen 22 und 30 Jahre (Abb. 70) Geschlechtsspezifische Unterschiede in der DNA-Reparatur konnten hingegen nicht gemessen werden.

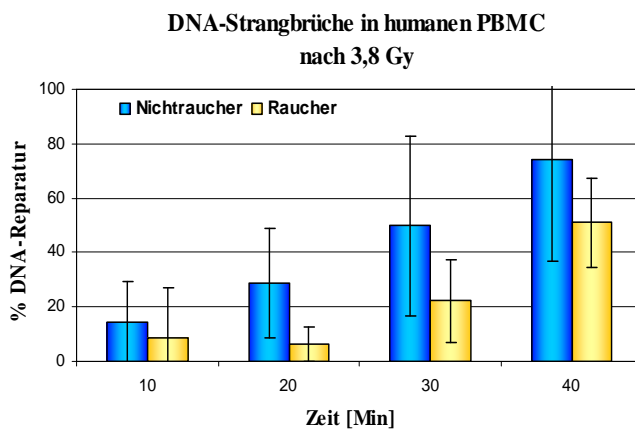
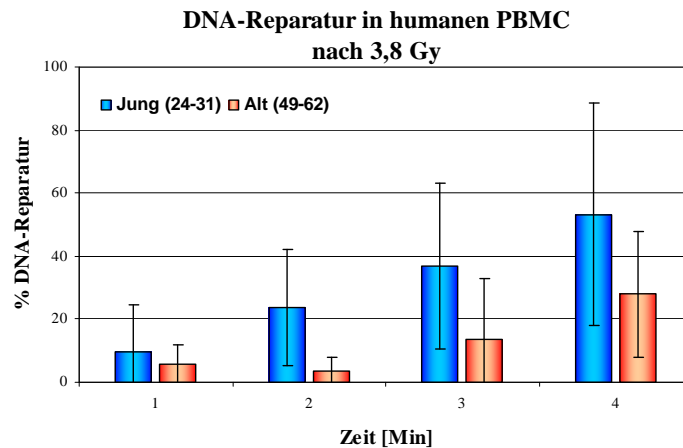


Abb. 69 DNA-Reparatur in PBMC von Rauchern (gelbe Balken) und Nichtrauchern (blaue Balken). PBMC von 14 Spendern (7 Raucher und 7 Nichtraucher) wurden gereinigt und in Medium ohne FCS aufgenommen und bestrahlt. Die DNA-Reparatur wurde nach 10, 20, 30 und 40 Minuten gemessen. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von 7 Spendern.

Abb. 70 DNA-Reparatur in PBMC von jungen (blaue Balken) und älteren (rote Balken) Nichtraucher-Spendern. PBMC von 4 Spendern zw. 24 und 31 und 4 Spendern zw. 49 und 62 Jahre alt wurden gereinigt und in Medium ohne FCS aufgenommen und bestrahlt. Die DNA-Reparatur wurde nach 10, 20, 30 und 40 Minuten gemessen. Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung von 4 Spendern.



Die geringe Zahl an untersuchten Spendern schränkt allerdings die statistische Aussage ein. Eine deutliche Tendenz zeichnet sich dennoch ab. DNA-Reparatur könnte demnach von Faktoren wie Lebensstil oder Lebensalter abhängen. Korreliert nun eine Verminderung der „DNA-Reparatur-Kapazität“ im Alter mit einer verminderten Zink-Präsenz im Alter? Um diese Frage zu beantworten müssten Experimente gemacht werden, in denen DNA-Reparatur und intrazelluläre Zinkkonzentration parallel gemessen werden. Die entwickelte FADU-Methode ermöglichte hier bereits präliminäre Experimente die Reparaturmessung in spendereigenem Plasma unter physiologischen Bedingungen. Diese Experimente gaben erste Hinweise auf eine Stimulierung der DNA-Reparatur durch Zink in Spendern mit „schwächerer“ DNA-Reparatur. Entsprechend dem Jurkat-Modell hängt also möglicherweise die DNA-Reparatur in humanen PBMC vom Zink-Status ab. Weiter kann hier die Abnahme der Reparatur-Kapazität mit dem Alter und Genuss von Zigaretten in Verbindung gebracht werden. Für die Durchführung ausreichend großer Probandenstudien stellt die automatisierte FADU-Methode eine probate Möglichkeit dar.

6.4 Anwendung der neuen FADU-Methode zur spezifischer Charakterisierung von DSB-Reparatur defiziente Zelllinien

Hier wurde der FADU-Assay für die Charakterisierung von Zelllinien eingesetzt. Es galt herauszufinden werden, ob Unterschiede in der Radiosensitivität und DSB-Reparatur von AA8- (Wildtyp), V3- (DNA-PK_{cs}-defekt) und irs1SF-Zellen (XRCC3-defekt) bestehen. Mit dem *clonogenic survival assay* wurde wie erwartet festgestellt, dass die V3- und irs1SF-Zellen eine niedrigere Überlebensrate haben als der Wildtyp AA8. Das bestätigt nochmals die Notwendigkeit der Reparatur-Proteine DNA-PK_{cs} und XRCC3 für das Überleben der Zelle

nach Exposition gegen ionisierende Strahlen. Mit dem γ -H2AX-Immunfluoreszenz-Assay wurde die Reparatur von DSB untersucht und es konnte gezeigt werden, dass die DSB in V3- und irs1SF-Zellen auch nach 24 Stunden persistieren, während sie in AA8-Wildtyp-Zellen repariert werden. Die meisten Experimente zeigten die gleiche Tendenz, aber eine echte Quantifizierung der DSB, bzw. der DNA-Reparatur ist mit γ -H2AX-Immunfluoreszenz-Assay nicht gelungen. Davon abgesehen waren mehrere Experimente wegen einer zu hohen Anzahl an DNA-Strangbrüchen in den Kontrollen nicht auswertbar. Der FADU-Assay wurde für die Detektion der DNA-Strangbrüche nach einer Bestrahlung der Zellen von 2 Gy eingesetzt. Es wurde allerdings ein sehr hoher Anteil an vor der Bestrahlung vorhandenen DNA-Strangbrüchen gemessen. Eine zusätzliche Schädigung nach 2 Gy konnte nicht detektiert werden. Eine Möglichkeit die Detektion von induzierten Strangbrüchen zu erreichen, kann in der Bestrahlung der Zellen mit einer höheren Strahlendosis bestehen. Sterben aber nach einer Strahlendosis von 2 Gy 50% der V3- und irs1SF-Zellen, so ist eine Erhöhung der Dosis für die Untersuchung der Reparatur nicht optimal geeignet. In diesem Fall ist das hier etablierte FADU-Protokoll für die CHO-Zellen, die von Natur aus eine sehr hohe Anzahl an DNA-Strangbrüchen haben (Abb. 21) nicht geeignet. Für diesen Fall müssen andere Zelllinien als Modell ausgewählt werden. Alternativ könnte durch ein weniger hohes pH im Entwindungspuffer die alkalische Entwindung vermindert werden, wodurch die etablierte Methode aber an Empfindlichkeit verliert.

6.5 Vergleich: Automatisierte FADU-Assay - Mikrogelelektrophorese-Assay (Comet-Assay)

Der Comet-Assay stellt in der Literatur die wohl bekannteste Technik zur Ermittlung von DNA-Schädigung und DNA-Reparatur dar. Die Wörter „Comet-Assay“ in PubMed ergeben zu momentan 3465 Papers und 103 Reviews, „FADU-Assay“ hingegen nur 12 Papers. Ein kritischer Punkt in dem FADU-Assay ist die Zugabe des Entwindungspuffers; dieser muss auf gleicher Temperatur, aber vor allem und sehr wichtig(!) mit der gleichen Geschwindigkeit und sehr langsam(!) aus gleicher Höhe auf die Zellsuspension pipettiert werden. Desweiteren muss die Prozedur im Dunkeln stattfinden und möglichst in allen Proben gleichzeitig vorgenommen werden. Dies ist vermutlich der Hauptgrund, warum der manuell durchgeführte FADU-Assay sich nicht durchgesetzt hat. Um dieses Problem zu umgehen, wurde die Methode in früheren Arbeiten in ihren wesentlichen Schritten automatisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde das für Jurkat-Zellen und humanen PBMC optimierte Protokoll mit dem Comet-Assay verglichen.

Die experimentellen Ergebnisse sind annähernd vergleichbar (Abb. 66) Die Stärke des FADU-Assays liegt nicht etwa in einer massiv höheren Empfindlichkeit gegenüber dem Comet-Assay, sondern im vereinfachten Protokoll. Dieses enthält weniger kritische Schritte und ist somit einfacher zu erlernen und durchzuführen. Abgesehen davon ist der FADU-Assay in 1/4 der Zeit des Comet-Assays durchzuführen (Tab. 7).

Vergleich des Zeitaufwandes beider Methoden

COMET-ASSAY		FADU-ASSAY	
Einzelschritte	Zeit [Min]	Einzelschritte	Zeit [Min]
Vorbereitung von Puffern: Alle vorhanden in Vorräten	5	Vorbereitung von Puffer: Alle vorhanden in Vorräten	5
Vorbereitung Agarose: Verteilung auf 24 Eppendorfs	20	Geräte: Einschalten des Roboters	2
Geräte: Aufbau der Gelelektrophorese-Apparatur	15		
Eppendorfs mit Agarose auf 37°C stellen	15		
Schädigung	30	Schädigung	30
Einbetten der Zellen im Agarose auf Objektträgern	60	Zugabe von Suspensionspuffer	5
Agarose abkühlen lassen	10		
Lyse	30	Automatisierte Schritte: Verteilung der Proben auf die 96-Well-Platte, Lyse, Entwindung, Neutralization, SybrGreen	120
Alkalischer Puffer	60		
Elektrophorese	30		
70% Ethanol	5		
Objektträger trocknen lassen	60		
SybGreen-Anfärbung	15		
SybGreen trocknen lassen	> 240		
Mikroskopaufnahme	> 60	Fluorimeter	2
Auswertung	> 60	Auswertung	10
Gesamte Zeit	>715	Gesamte Zeit	174

Tab. 7 Schrittweises Vorgehen und Zeitplan beiden Methoden; dunkelgrau hinterlegt der alkalische Comet-Assays und hellgrau der automatisierte FADU-Assay. Für die FADU-Methode werden etwa 9 Stunden weniger Zeit benötigt.

Ein anderer wichtiger Vorteil dieses neuen FADU-Assays gegenüber dem Comet-Assay ist, dass vom Zeitpunkt der Lyse bis zur Messung des Fluoreszenzsignals die Methode völlig automatisiert ist. Beim Comet-Assay hingegen sind alle Schritte manuell durchzuführen, und es ist deshalb mit einer höheren Fehlerquote zu rechnen.

Ein weiterer Vorteil des hier etablierten FADU-Assays ist seine Anwendung in der Untersuchung von Mitochondrien-DNA-Schäden und die Möglichkeit in einem Plasmid-Modell DNA-Strangbrüche zu detektieren. Diese Anwendung kann der Comet-Assay nicht leisten.

Zusammenfassend betrachtet ist es gelungen, mit dem hier weiter modifizierten und optimierten automatisierten FADU-Assay ein neuartiges analytisches Werkzeug bereitzustellen, welches in vielen Bereichen der biologisch-medizinischen Forschung Anwendung finden kann. Für die molekulare Grundlagenforschung zu DNA-Schädigung und –Reparatur stellt dieser Assay einen wertvollen und vielseitigen funktionellen Test dar. Im Bereich der genetischen Toxikologie kann die Methode prinzipiell zum Screening von potentiell gentoxischen Substanzen (Umweltchemikalien, Arzneimittelforschung) und potentiellen Gentoxizitäts-präventiven Substanzen (Arzneimittelforschung, Lebensmittelforschung) verwendet werden. Sie kann ferner zum Screening von Populationen auf gentoxische Exposition bzw. auf DNA-Reparaturkapazität verwendet werden. Letztere Endpunkte könnten im Bereich Altersforschung/Präventivmedizin zukünftig eine große Bedeutung erlangen.

7. Literaturverzeichnis

Adkins S. and Burmeister M. (1996): *Visualization of DNA in agarose gels as migration colored bands: Applications for preparative gels and educational.* Anal Biochem. 240(1): 17-23

Ahnström G. and Edvarsson K.A. (1974): *Radiation-induced single-strand breaks in DNA determined by rate of alkaline strand separation and hydroxylapatite chromatography: an alternative to velocity sedimentation.* Int. J. Radiat. Biol. 5:493-497

Aremas Sordo M.L., Hernández Zamora E, Montoya Pérez L.A. and Aldape Barrios B.C. (2006): *Cockayne's syndrome: A case report. Literature review.* Oral Medicine and Pathology 11:E236-8

Ataian Y. and Krebs J.E. (2006): *Five repair pathways in one context: chromatin modification during the repair.* Biochem. Cell Biol. 84:490-504

Auerbach A.D. (1997): *Disorders of DNA replication and repair.* Curr Opin Pediatr. 9(6):600-16

Bagby G.C. and Alter B.P. (1006): *Fanconi anemia.* Semin Hematol. 43(3):147-56

Bannermann D.D. and Goldblum S.E. (2003): *Mechanims of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 284:L899-L914

Beadle G.W. and Tatum E.L. (1941): *Genetic Control of biochemical reactions in neurospora.* Genetics 27: 499-506

Beneke S. and Bürkle A. (2007): *Poly(ADP-ribosyl)ation in mammalian ageing.* Nucleic Acids Res. 1-10

Bennet D., Baird C., Chan K.M., Crookes P., Bremmer C., Gottlieb M. and Naritoku Y. (1997): *Zinc toxicity following massive coin ingestion.* American Journal of Forensic Medicine & Pathology. 18(2):148-153

Berget S.M., Moore C. and Sharp P.A. (1977): *Spliced segments at 5' terminus of Adenovirus 2 late mRNA*. Proc. N.A.S. 74(8): 3171-3175

Birnboim H.C. and Jevcak J.J. (1981): *Fluorometric method for a rapid detection of DNA strand breaks in human white blood cells produced by low doses of radiation*. Cancer Research 41:1889-1892.

Botta E., Nardo T., Broughton B.C., Marinoni S., Lehmann A.R. and Miria S. (1998): *Analysis of mutations in the XPD gene in Italian patients with trichothiodystrophy: Site of mutations correlates with repair deficiency but gene dosage appears to determine clinical severity*. Am. J. Hum. Gene. 63:1036-1048

Brenner S. Jacob F., Meselson M (1961): *An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis*. Nature 190: 576-581

Brown K.H. (1998): *Effect of infections on plasma zinc concentration and implications for zinc status assessment in low-income countries*. Am J Clin Nutr. 68(suppl):425S-9S

Bryant H.E., Schultz N., Thomas H.D., Parker K.M., Flower D., Lopez E., Kylöe S., Meuth M., Curtin N. and Helleday T. (2005): *Specific killing of BRCA2-Deficient tumors with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase*. Nature 434:913-917

Bürkle A. (2005): *Poly(ADP-ribose) the most elaborate metabolite of NAD⁺*. The FEBS Journal 272:4576-4589

Burney S., Caulfield J.L., Niles J.C., Wishnok J.S. and Tennenbaum S.R. (1999) *The chemistry of DNA and peroxynitrite*. Mitat Res. 424(1-2):37-49

Campoux J.J. (2001): *DNA Topoisomerases: Structure, function and mechanism*. Annu. Rev. Biochem. 79:369-413

Chang K.L., Hung T.C., Hsieh B.S., Chen Y.H., Chen T.F. and Cheng H.L. (2006): *Zinc at pharmacologic concentrations affects human peripheral blood mononuclear cell*. Nutrition 22(5):465-74

Chateau M.T., Ginestier-Verne C, Chiese J, Caravano R. and Bureau J.P. (1996): *Dimethyl sulfoxide-induced apoptosis in human leukemic U937 cells*. Anal Cell Pathol. 10(2):75-84

Chen L., Huang S., Lee L., Davalos A. Schiestl R.H., Campisi J. and Oshima J. (2003): *WRN, the protein deficient in Werner syndrome, plays a critical structural role in optimizing DNA repair*. Aging Cell 2:191-199

Cohen G.N. (1995): *Thirty years since the award of the Nobel Prize to Lwoff, Monod, and Jacob*. The FASEB Journal 9: 981-982

Cohen S.M. and Lippard S.J. (2001): *Cisplatin: from DNA damage to cancer chemotherapy*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 67:93-130

Colvin R.A., Fontaine C.P., Laskowski M. and Thomas D. (2003): *Zn²⁺ transporter and Zn²⁺ homeostasis in neurons*. European Journal of Pharmacology 479:171-185

Dawn P. Batty and Richard D. Wood (2000): *Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA*. Gene 241:193-204

Divine K.K., Gilliland F.D., Crowel R.E., Stidley C.A., Bocklage T.J., Cook D.L. and Belinsky S.A. (2001): *The XRCC1 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung*. Mutat Res 461(4):273-8

Efstratiadis A., Kafatos F.C., Maxam A.M. and Maniatis T. (1976): *Enzymatic in vitro synthesis of globin genes*. Cell 7(2): 279-88

Engels W.R., Johnson-Schlitz D., Flores C., White L and Preston C.R. (2007): *A third link connecting aging with double strand break repair*. Cell Cycle 6(2):131-5

Errington F., Willmore E., Leontiou C., Tilby M.J. and Austin C.A. (2004). *Differences in the longevity of Topo II α and Topo II β drug-stabilized cleavable complexes and the relationship to drug sensitivity*. Cancer Chemother Pharmacol. 53(2):155-62

Feelisch M. (1998): *The use of nitric oxide donors in the pharmacological studies*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 358(1):113-22

Fraser C.M. et al. (1995): *The minimal gene complement of Mycoplasma genitalium*. Science 270(5235): 397-403

Frassinetti S., Bronzetti G., Caltavuturo L. Cini M. and Croce C.D. (2006): *The role of zinc in life: a review*. J Environ Pathol Toxicol Oncol. 25(3):597-610

Gall J.G. and Pardue M.L. (1969): *Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations*. Proc. N.A.S. 63(2): 378-383

Goff S.P and Berg P. (1976): *Construction of hybrid viruses containing SV40 and Lambda phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells*. Cell 9 (4PT2): 695-705

Haase H., Hebel S., Engelhardt G. and Rink L. (2006): Flow cytometric measurement of labile zinc in peripheral blood mononuclear cells. Analytical biochemistry 352:222-230

Haase H., Mocchegiani E., and Rink L. (2006): Correlation between zinc status and immune function in the elderly. Biogerontology 7(5-6):421-8

Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V. and Tice R.R. (2003): *Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay*. Mutagenesis 1:45-51

Hershey A.D. and Chase M. (1952): *Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage*. The Journal of General Physiology 36(2):39

Hoeijmakers Jan H. J. (2001): *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer*. Nature 411: 366-374

Hoyt D.G., Mannix R.J., Gerritsen M.E., Watkins S.C., Lazo J.S. and Pitt B.R. (1996): *Integrins inhibit LPS-induced DNA strand breakage in cultured lung endothelial cells*. Am J Physiol. 270(4 pt 1):698-94

Ingram V.M. (1957): *Gene mutations in human haemoglobin: The chemical difference between normal and sickle cell haemoglobin*. Nature 180(4581): 326-8

Johnen G, Pozynek P und Brüning T (2007): *Untersuchung von DNA-Methylierungsmustern am BGFA*. BGFA-Info 02/2007 10-13

Kohn K.W. (1991): *Principles and practices of DNA filter elution*. Pharmac. Ther. 49: 55-77

Kohn K.W. (1996): *DNA filter elution: a window on DNA damage in mammalian cells*. Bioessays 18(6):505-13

Krokan H.E., Nilsen H., Skorpen F., Otterlei M. and Slupphaug G. (2000): *Base excision repair of DNA in mammalian cells*. FEBS Letters 476: 73-77

Kunzmann A., Dedoussis G., Jajte J., Malavolta M., Mocchegiani E. and Bürkle A. (2007): *Effect of zinc on cellular poly(ADP-ribosyl)ation capacity*. Exp. Gerontol. in press

Lehmann A.R. (2003): *DNA repair-deficient diseases, xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome and trichothiodystrophy*. Biochim 85(11):1101-11

Lehnert T., Küry S., Bürk G., Hoeffner W. and Schuster V. (2006): *Acrodermatitis enteropathica (AE) is caused by mutations in zinc transporter gene SLC39A4*. Klin. Padiatr. 218:221-223

Levene PA (1919): *The structure of yeast nucleic acid. IV. Ammonia Hydrolysis*. J. Biol. Chem. 40, 415-424

Levy-Lahad E. and Friedmann E. (2007): *Cancer risks among BRCA 1 and BRCA 2 mutation carriers*. British Journal of Cancer 96:11-15

Lichon V. and Khachemoune A. (2007): *Xeroderma pigmentosum: beyond cancer skin* J Drugs Dermatol 6(3):281-8

Liou J.T., Shien B.H., Chen S.W. and Li C. (1999): *An improved alkaline lysis method for minipreparation of plasmid DNA*. Prep. Biochem. Biotechnol. 29(1): 49-54

Liuzzi J.P. and Cousins R.J. (2004): Mammalian zinc transporters. Annu Nutr. 24:151-72

Malik M., Nitiss K.C., Enriquez-Rios V and Nitiss L. (2006): *Roles of nonhomologous end-joining pathways in survival topoisomerase II-mediated DNA damage*. Mol Cancer Ther. 5(6):1405-1414

Marcellini F., Giuli C., Papa R., Gagliarde C., Dedoussis G., Herbein G., Fulop T., Monti D., Rink I., Jaite J. and Mocchegiani E. (2006): *zinc status, physiological and nutritional assessment in old people recruited in five european countries: Zincage study*. Biogerontology 7(5-6):339-45

Mariani E., Cornacchiola V., Polidori M.C., Mangialasche F., Malavolta M., Cecchetti R., Bastiani P., Baglioni M., Mocchegiani E. and Mecocci P. (2006): *Antioxidant enzyme activities in healthy old subjects: influence of age, gender and zinc status: Results from Zincage project*. Biogerontology 7(5-6):391-8

McDonald R. (2000): *The role of zinc in growth and cell proliferation*. J. Nutr. 130:1500-1508

McGrath R.A. and Williams R.W. (1996): *Reconstruction in vivo of irradiated Escherichia coli deoxyribonucleic acid; the Rejoining of broken pieces*. Nature 5061:534-535

Meselson M (2004): *Explorations in the land of DNA and beyond*. Nature Medicine Volume 10, Number 10

Meselson M and Stahl F.W. (1958): *The Replication of DNA in Escherichia Coli*. Proc. N.A.S. 44, 671-682

Mitzel-Landbeck L, Schutz G and Hagen U (1976): *In vitro repair of radiation-induced strand breaks in DNA*. Biochimica et Biophysica Acta, 432:145-153

Mitzel-Landbeck and Hagen U (1976): *Strahlenwirkung auf biopolymere*. Chemie unserer Zeit 10:65-74

Montecucco A. and Biamonti G. (2006): *Cellular response to etoposide treatment*. Cancer Lett 252(1):9-18

Nirenberg M (1968): *The genetic code*. Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1963-1970: 372-395

Oswald T, Avery M.D., Colin M., MacLeod M.D. and Maclyn McCarty M.D. (1943): *Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III*. The Journal of Experimental Medicine 79: 137-157

Olive P.L. and Banáth J.P. (2006): *The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells*. Nature Protocols 1: 23-29

Rink L. and Kirchner H. (2000): *Zinc-altered immune function and cytokine production*. J. Nutr. 130:1407-1411

Rothenberg M.L. (1997): *Topoisomerase I inhibitors: Review and update*. Annals of Oncology 8:837-855

Rothkamm R. and Löbrich M. (2003): *Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses*. PNAS 100(9):5057-5062

Saiki R.K. et al. (1988): *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science 239(4839): 487-91

Sanger F., Niclen S. and A.R. Coulson (1977): *DNA Sequenzen with chain-terminating inhibitor*. Proc. N.A.S. 74(12):5463-5467

Savitsky K., Bar-Shira A., Gilad S., Rotman G., Ziv Y., Vanagaite L., Tagle D.A., Smith S., Uziel T., Stef S., Ashkenazi M., Pecker I., Frydman M., Harnik R., Patanjali S.R., Simmons A., Clines G.A., Sartiel A., Gatti R.A., Chessa L., Sanal O., Lavin M.F., Jaspers N.G., Taylor A.M., Arlett C.F., Miki T., Weissman S.M., Lovett M., Collins F.S., and Shiloh Y. (1995): A

single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. Science 23:268(5218):1749-53

Scheithauer M.O. and Riechelmann H (2007): *Mitomycin C in head and neck surgical procedures. Laryngorhinootologie* 86(5):384-90

Schena M., Shalon D., Davis R.W. and Brown P. (1995): *Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science* 270: 467-470

Singh N.P. (2000): *Microgels for estimation of DNA protein crosslinks and apoptosis. Mutation Research* 455:111-127

Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.P. and Schneider E-L. (1988): *A simple technique for the quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res.* 175(1):184-91

Smith H.O. and Wilcox K.W. (1970): *A Restriction enzyme from Hemophilus influenzae. I. Purification and general properties. J Mol Bio* 51(2): 379-91

Solveig Walles S.A. and Erixon K. (1984): *Single-strand Breaks in DNA of various organs of mice induced by methyl methanesulfonate and dimethylsulfoxide determined by the alkaline unwinding technique. Carcinogenesis* 5(3):319-23

Southern E.M. (1975): *Detection of specific sequences among DNA fragment separated by gel electrophoresis. J Mol Biol.* 98(3): 503-17

Szabó C., Zingarelli B., O'Connor M. And Salzman L. (1996): *DNA strand breakage, activation of Poly(ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity in macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:1753-1758

Tapiero H. and Tew K.D. (2003): *Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. Biomed Pharmacother.* 57(9):399-411

Truong-Tra A.Q., Ho L.H., Chai F and Zalewski P.D. (2000): *Cellular zinc fluxes and regulation of apoptosis/gene-directed cell death*. J. Nutr. 130: 1459-1466

Venter J.C. et al (2001): *The sequence of the human genom*. Science 291, 1304

Watson J.D. and Crick F.H.C. (1953): *Molecular structure of nucleic acids*. Nature 171:737-738

Wheate N.J., Brodie C.R., Collins J.G., Kemp S. and Aldrich-Wright J.R. (2007): *DNA Intercalators in Cancer Therapy: Organic and inorganic drugs and their spectroscopic tools of the analysis*. Mini Rev Med Chem 7(6):627-48

Lehrbücher

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke (2005) 9. Auflage. Elsevier Urban & Fischer

Ibs K.H. and Rink L. (2003): Zinc. Job:Dietary Enhancement-Hughes Chapter 13:241-259

Molekularbiologie der Gene. Benjamin Lewin (2002) Spektrum Akademischer Verlag

Physikalische Chemie und Biophysik. Adam, Läger und Stark. (1995) 3. Auflage. Springer

Diplomarbeiten

Entwicklung eines automatisierten Verfahrens zur Messung von DNA-Strangbrüchen. María Moreno-Villanueva, 30 November 2004

8. Abkürzungen

3-AB	3-Aminobenzamid
AP-Läsion	Apurinisch/apyrimidinische-Läsion
AT	Ataxia teleangiectasia
ATM	Ataxia teleangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
BRCA	Breast cancer
BER	Basen-Excisionsreparatur
CPT	Camptothecin
CS	Cockayne Syndrom
DAPI	4'-6-diamidino-2-Phenylindole
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSB	Doppelstranbruch
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	Expressed Sequence Tags
EtOH	Ethanol
FA	Fanconi-Anämie
FADU	<i>Fluorimetric analyses of DNA unwinding</i>
FCS	Fötale Kälberserum
<i>g</i>	Zentrifugalkraft
Gy	Gray (Einheit für gamma-Bestrahlung)
HE	Homologe Rekombination
kb	kilo Basen
LPS	Lipopolysaccharide
MMS	Methylmethansulfonat

MNNG	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitroso-Guanidin
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NER	Nucleotid-Excisionsreparatur
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i>
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polimerase
PBMC	Periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
ROS	Reactive oxygen Species
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIN-1	Morpholinosydnonimine
SSB	Einzelstrangbruch
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TPEN	N,N,N',N'-tetrakis-(2-pyridylmethyl)-Ethylendiamine
Topo	Topoisomerase
TRIS	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan
TTD	Trichothiodystropie
UV	Ultraviolett
(v/v)	Volumenverhältnis
XP	Xeroderma pigmentosum
XXCC1	x-ray cross-complementing group 1 protein
WS	Werner-Syndrom

9. Danksagung

Wie alle Kinder wurde auch ich gefragt: „¿Qué quieres ser de mayor?“ (= was willst du werden, wenn du groß bist?). Mir war es mit sieben schon klar: „Ich werde Forscher, und wenn es nicht klappt, werde ich Boss!“ Alles, was die Menschen sich nicht erklären können, und alles, was sie mit bloßen Augen nicht sehen können, hat mich immer fasziniert. Ich wollte alle diese Rätsel und viele mehr „einfach“ aufklären! Die Mittel, um überhaupt an diesen Rätseln arbeiten zu können und somit meinen großen Traum zu verwirklichen, habe ich Professor Alexander Bürkle zu verdanken. Er hat an mich geglaubt, mich in seiner Arbeitsgruppe aufgenommen, mir das Forschen beigebracht und die Chance gegeben, eine Wissenschaftlerin zu werden. Außerdem hat er mich in den drei Jahren meiner Promotion ausgezeichnet betreut und fachlich sowie menschlich unterstützt. Aus tiefstem Herzen vielen, vielen Dank, Alexander!

Meinen Frust und meine Freude habe ich mit Thilo Sindlinger geteilt, ob er es wollte oder nicht ... Aus unseren Gesprächen entstanden viele Ideen, die meine Doktorarbeit vorangebracht haben. Thilo war stets bereit, Überstunden für mich und meinetwegen zu machen, und er hat oft zu erfolgreichen Ergebnissen beigetragen. Auch ihm vielen Dank!

Ein „sprechendes PubMed“ wurde schon erfunden, es heißt Sascha Beneke, und ich habe es oft „benutzt“. Tja, es ist bequemer und schöner, Sascha zu fragen, als stundenlang vergeblich zu versuchen, die Antworten aus dem Computer zu bekommen, aber vor allem geht es auch schneller! Ich danke Sascha für seine fachliche Unterstützung.

Mein Ärger, meine schlechte Laune (die ich auch mal hatte) und meine Missgeschicke (ich glaube, es waren einige) haben vor allem zwei Menschen aufgefangen: Katharina Hüttner und Andrea Kunzmann. Die erste mit ihrem freundlichen Gemüt und die zweite mit ihrer Geduld und Fürsorge haben die „Bombe“ kurz vor der „Explosion“ deaktiviert. Danke! Ich vergesse die männliche „Besatzung“ der AG Bürkle nicht: „Die drei PARP-Musketiere“ Tobias Eltze, Jörg Fahrer und Aswin Mangerich. Sie machten aus jedem Kongress ein Abenteuer, die Gummibärchen mussten gerettet werden! „Einer für alle und alle für ... mich!“, oder wie war es? Vielen Dank für die gute Zeit! Für die nette Zusammenarbeit möchte ich mich besonders bei Prof. Volker Ulrich, Dr. Elisa Ferrando-May, Dr. Anne Peters, Dr. Corina Hermann, Dr. Anna Gora, Daniela Hermann und Joachim Kienhöfer, aber auch bei anderen Lehrstuhlmitgliedern (Patricia Grote, Nathalie Veith, Jens Lutz, Muriel Malaisé und Momo Arsic) bedanken. Und, sehr wichtig! „Verwaltungskram“ und „Paper-Bestellung“ können ganz

schön nerven, aber ich hatte die Hilfe von Claudia Hoffmann, dem „Speedy González“ der Bürokratie – ándale, ándale, arriba, arriba! Gracias Claudia!

Auch das Betreuen hat richtig Spaß gemacht, dafür ein Dankeschön an meine vier Studentinnen Carmen Fehr, Maike Schmitz, Kathrin Weidele und Rebecca Steinhaus.

Außerhalb des Lehrstuhls möchte ich mich bei Prof. Hofer und Prof. Hartung für die freundliche Erstellung des Zweitgutachtens meiner Doktorarbeit bedanken. Für einen sehr schönen Forschungsaufenthalt im Krebsforschungsinstitut von Newcastle-upon-Tyne bedanke ich mich ganz herzlich bei Professor Nicola Curtin und ihrer Arbeitsgruppe. Die vier Monate dort waren eine Bereicherung für meine Doktorarbeit und für mein Leben. Für die finanzielle Unterstützung bedanke ich mich beim DAAD und dem VEUK.

Eine sehr wichtige Person in der Endphase meiner Arbeit (für mich auch die schwerste) war Bastian Thaa. Er hat meine gesamte Doktorarbeit unter die Lupe genommen und sehr sorgfältig nach jedem Fehler gesucht, seine professionelle Hilfe hat mich sehr beruhigt. Ihm ein dickes Dankeschön für den großen Einsatz beim Korrekturlesen!

Ich danke auch dem guten Doktor Stocker, immer noch großzügig und verständnisvoll, und meinen Zytologie-Kolleginnen, vor allen Caro Köhler, Gisela Schindele und Melanie Greis, für ein Lächeln, wenn es hieß: „... ich kann diese Woche nicht arbeiten kommen ...“ – schön, dass es sie gibt, und schön, dass ich bei ihnen noch mikroskopieren darf.

Die Unterstützung von Freunden hatte ich auch, hier möchte ich mich besonders bei Sandra Czogalla, Karin Heine, Steffi Schädler und Steffi Iskra bedanken, was hätte ich ohne sie gemacht? Meine gute Schulfreundin Ana Correa glaubt immer noch, dass ich den Nobelpreis bekommen werde und will unbedingt einen Sitzplatz in der ersten Reihe, wenn das nicht Motivation ist!? ... Ich danke ihr von ganzem Herzen für die schönen Träume ...

Das Studium und die Promotion haben sehr wenig Zeit für meine Familie gelassen. Einmal im Jahr nach Hause zu fliegen und nie länger als eine Woche war für uns alle sehr wenig. Darunter haben meine Eltern heimlich sehr gelitten, aber sie haben sich nie in den Vordergrund gedrängt, im Gegenteil, ich und meine Promotion waren wichtiger als ihre Bedürfnisse und Wünsche. Während dieser Zeit haben meine beiden Schwestern nach meinen Eltern geschaut und mir das Gefühl gegeben, alles sei in Ordnung. Ich danke meiner Familie für alles!

... und auch wenn es sich merkwürdig anhört, bedanke ich mich bei unserem Roboter, dem Herz meiner Promotion, für einen fehlerfreien und pausenlosen dreijährigen Einsatz!