

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

**Untersuchungen zur genotoxischen Wirkung
von oxidativem Streß**

von

Günter Speit und Claudia Dennog

Förderkennzeichen: PUG U 97 002

Die Arbeiten des Projektes Umwelt und Gesundheit wurden mit Mitteln des
Landes Baden-Württemberg gefördert

Februar 2000

Dieser Bericht basiert auf der Dissertation von Claudia Dennog mit dem Titel:
"Untersuchungen zur biologischen Bedeutung von oxidativem Streß für den
Menschen am Modell der hyperbaren Sauerstoffbehandlung".
Medizinische Fakultät der Universität Ulm, 1999.

Aus dem Projekt sind folgende Veröffentlichungen hervorgegangen:

1. Publikationen (peer-reviewed):

Dennog, C., Hartmann, A., Frey, G., Speit, G.:
Detection of DNA damage after hyperbaric oxygen (HBO) therapy
Mutagenesis **11**: 605-609 (1996)

Hartmann, A., Pfuhler, S., Dennog, C., Germadnik, D., Pilger, A., Speit, G.:
**Exercise-induced DNA effects in human leukocytes are not accompanied
by increased formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine or induction of
micronuclei**
Free Radicals Biol. Med. **24**: 245-251 (1998)

Speit, G., Dennog, C., Lampl, L.:
Biological significance of DNA damage induced by hyperbaric oxygen
Mutagenesis **13**: 85-87 (1998)

Rothfuß, A., Dennog, C., Speit, G.:
**Adaptive protection against the induction of DNA damage after hyperbaric
oxygen treatment**
Carcinogenesis **19**: 1913-1917 (1998)

Dennog, C., Radermacher, P., Barnett, Y.A., Speit, G.:
Antioxidant status in humans after exposure to hyperbaric oxygen
Mutat. Res. **428**: 83-89 (1999)

Dennog, C., Gedik, C., Wood, S., Speit, G.:
**Analysis of oxidative DNA damage and HPRT mutations in humans after
hyperbaric oxygen treatment**
Mutat. Res. (im Druck)

2. Tagungsbeiträge:

Dennog, C., Speit, G.:

Induction of DNA damage by hyperbaric oxygen therapy

Vortrag auf der 16. GUM-Tagung in Basel, 22.-24.4. 1997

Dennog, C., Hartmann, A., Frey, G., Speit, G.:

Induktion von DNA-Schäden durch HBO

7. Tagung der Ges. für Tauch- und Überdruckmedizin, Hofheim, 27.-29.9. 1996

Speit, G., Dennog, C., Hartmann, A.:

Exercise and hyperbaric oxygen induce DNA damage due to oxidative stress

9th International congress of human genetics, Rio de Janeiro 1996

Brazilian Journal of Genetics 19 (2) Supplement, S. 120 (1997)

Speit, G., Dennog, C.:

Biological significance of oxidative DNA damage detected with the comet assay

Comet assay workshop, London, Mai 1997

Hartmann, A., Pfuhler, S., Dennog, C., Germadnik, D., Pilger, A., Speit, G.:

Exercise induced-DNA damage in humans is not accompanied by increased formation of 8-OHdG or induction of micronuclei

28th annual EMS meeting, Minneapolis, 1997

Environmental and Molecular Mutagenesis 29, Supplement 28, S. 20 (1997)

Speit, G., Dennog, C.:

Genotoxische Effekte durch oxidativen stress in vitro und in vivo

6. Statuskolloquium des PUG, Karlsruhe, März, 1997

Pfuhler, S., Hartmann, A., Dennog, C., Speit, G., Wolf, H.U.:

DNA-Schäden in Leukozyten nach einem Triathlonwettkampf über die Olympische Distanz

35. Deutscher Sportärztekongreß, Tübingen, 25.-27. 9.1997

Speit, G., Dennog, C., Rothfuss, A.:

Genotoxische Effekte durch oxidativen stress in vitro und in vivo

7. Statuskolloquium des PUG, Karlsruhe, März, 1998

Rothfuss, A., Dennog, C., Speit, G.:

HBO induces adaptive protection against oxidative DNA-damage

5. Workshop des DNA-Repair Network, Mainz, 3.-6.3.1998

Dennog, C., Rothfuss, A., Speit, G.:

Protective mechanisms against oxidative stress in humans

10. Jahrestagung der Gesellschaft für Humangenetik, Jena, 25.-28.3.1998

Med. Genetik 10:1, S. 141

Dennog, C., Rothfuss, A., Gedik, C., Wood, S., Speit, G.:
Adaptive protection against oxidative stress
Free Radical Meeting, Kopenhagen, 28.-30.5.1998

Dennog, C., Gedik, C., Speit, G.:
Analysis of oxidative DNA damage and HPRT mutations after hyperbaric oxygen treatment
28. Jahrestagung der EEMS, Salzburg, 7.-11.9.1998

Speit, G., Rothfuss, A., Dennog, C.:
Adaptive protection against oxidative stress
28. Jahrestagung der EEMS, Salzburg, 7.-11.9.1998

Rothfuss, A., Dennog, C., Speit, G.:
Comparative investigations of the genotoxicity of hyperbaric oxygen in vivo and in vitro
28. Jahrestagung der EEMS, Salzburg, 7.-11.9.1998

Speit, G., Dennog, C., Rothfuss, A.:
Induktion, Reparatur und biologische Konsequenzen von oxidativen DNA-Schäden
Jahrestagung der Ges. für Biol. Strahlenforschung, Frankfurt, 23.-25.9.1998

Speit, G., Dennog, C., Rothfuss, A.:
Biological effects of oxidative stress
5. Jahrestagung der Lateinamerikanischen Gesellschaft für Mutagenese, Kanzerogenese und Teratogenese, Curitiba, November 1998.
Genetics and Molecular Biology, 21(3),Suppl, S.42, 1998

Speit, G., Dennog, C., Rothfuss, A.:
Oxidative stress response of the human body
ICEMHP, Bangkok, 29.11.-4.12.1998

Speit, G., Dennog, C.:
Genetische Konsequenzen von oxidativem Streß beim Menschen
Statuskolloquium des PUG, Karlsruhe, März 1999

Speit, G., Dennog, C., Rothfuß, A.:
Genetic effects of oxidative stress
UKEMS-meeting, Coleraine, 23.-25.6.1999

Dennog, C., Radermacher, P., Speit, G.:
Human antioxidant status after HBO exposure
25th EUBS, Haifa, 28.8-2.9.1999

Zusammenfassung

Das verstärkte Auftreten von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) kann zu oxidativem Streß im Organismus führen. Oxidativer Streß wird als ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung von Krebs und anderen Krankheiten diskutiert. ROS entstehen durch physiologische Prozesse aber auch durch Xenobiotika und Umweltschadstoffe. Auch im Verlauf einer Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff (HBO) entstehen ROS. Eine HBO beinhaltet das Atmen von reinem Sauerstoff bei 1,5 bar Überdruck für 60 Minuten und findet in der Klinik breite Anwendung. Für diese Arbeit hat sich die HBO als sehr geeignetes Modell erwiesen, um biologische Konsequenzen von oxidativem Streß am Menschen zu untersuchen.

Direkt nach einer HBO wurden auf Einzelzellebene Strangbrüche, alkalilabile Stellen und oxidativ modifizierte Basen in den Leukozyten von gesunden Probanden mit dem Comet Assay nachgewiesen. Unter Verwendung spezifischer Reparaturenzyme im Comet Assay erfolgte der Nachweis von oxidativ veränderte Basen nach HBO. Diese Enzyme erkennen neben anderen Basenmodifikationen 8-Oxo-Guanin, eine Läsion, die zu GC → TA Transversionen führt. Die direkte Bestimmung von 8-Oxo-Guanin mittels HPLC-Analyse zeigte jedoch keinen erhöhten Gehalt dieser oxidierten Base in Lymphozyten nach HBO, was für eine höhere Sensitivität des Comet Assays spricht. Eine HBO-Behandlung führte nicht zur Induktion von Chromosomenmutationen im Mikronukleustest und auch nicht zu einer Erhöhung der HPRT-Genmutationen im T-Zellenklonierungstest. Für die durch HBO induzierten DNA-Schäden wurde eine schnelle Reparatur nachgewiesen und es kann daher vermutet werden, daß die genotoxischen Effekte nach einer HBO unter therapeutischen Bedingungen repariert werden, bevor sie sich als Mutationen manifestieren.

Folgte für die Probanden einen Tag nach der ersten eine weitere HBO, so wurde kein genotoxischer Effekt nach der zweiten HBO gemessen, was auf eine effektive Adaptation antioxidativer Schutzmechanismen hinweist. Durch in vitro Experimente mit dem Blut von Probanden vor und nach HBO konnte gezeigt werden, daß der induzierte adaptive Schutz im Blut die genotoxische Wirkung von Wasserstoffperoxid verhindert, nicht aber vor genotoxischen Effekten durch γ -Bestrahlung schützt. Der adaptive antioxidative Schutz gegenüber H_2O_2 hielt mindestens sieben Tage an und war in isolierten Lymphozyten nachweisbar. Die Messungen der Vitamine A,C,E im Plasma sowie der antioxidativen Enzyme Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase in der Blutzellfraktion zeigten keine Veränderungen nach einer

HBO. Auch der Glutathionspiegel im Plasma und in den Lymphozyten blieb unverändert. Die Supplementationen von Probanden mit Vitamin E und N-Acetylcystein vor HBO hatte keinen protektiven Effekt gegenüber HBO-induzierten DNA-Schäden. Einen Tag nach HBO wurde eine deutliche Induktion des Hitzeschockproteins HSP70 nachgewiesen. Auch der Bilirubingehalt in den Blutzellen der Probanden war einen Tag nach HBO leicht erhöht. Bilirubin entsteht als Produkt bei dem Abbau des Häms durch die Hämoxygenase und besitzt antioxidative Eigenschaften. In dieser Arbeit konnte als Antwort auf oxidativen Streß durch HBO erstmals in den Lymphozyten des Menschen ein erhöhter Gehalt an Hämoxygenase 1 (HO1) einen Tag nach HBO nachgewiesen werden. Auch auf RNA-Ebene wurden Hinweise auf eine erhöhte HO-1-Expression bereits wenige Stunden nach HBO gefunden. Weiterhin wurden Hinweise auf eine erhöhte Expression des Gens für die leichte Kette vom Ferritin nach HBO erhalten. Eine erhöhte Ferritinsynthese erfolgt durch Bindung des beim Abbau vom Häm freigesetzten Eisens an ein Repressorprotein und ermöglicht so die Translation der Ferritin-mRNA. Das Ferritin als eisenbindendes Protein kann vor oxidativem Streß schützen, indem es das für die Fentonreaktion notwendige Eisen redoxinaktiv bindet. Durch das Abfangen von Eisen ließen sich auch die unterschiedlichen Befunde für H_2O_2 und γ -Bestrahlung erklären. Weiterführende Arbeiten werden zeigen, ob der hier vorgeschlagene Mechanismus die physiologische Grundlage für die in dieser Arbeit erstmalig im Menschen gefundene Adaptation gegenüber oxidativem Streß ist.

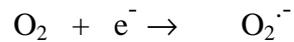
Die Daten haben darüber hinaus praktische Bedeutung für die Beurteilung des mutagenen und kanzerogenen Potentials von oxidativem Stress. Standardprüfungen nach einmaliger hoher Exposition, die die Reparatur- und Adaptationsprozesse nicht adäquat berücksichtigen, führen möglicherweise zu einer Überbewertung des Gefährdungspotentials.

1. Einleitung

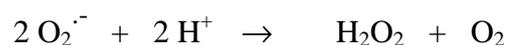
1.1 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Streß

Sauerstoff (O₂) ist zu 21 % in unserer Atemluft enthalten und für ein Überleben der Mehrheit der Organismen auf der Erde unerlässlich. In der mitochondrialen Atmungskette aerober Organismen findet eine Übertragung von Elektronen und Wasserstoffprotonen statt. Hierbei dient molekularer Sauerstoff als terminaler Akzeptor und wird zu Wasser reduziert. Durch diese Redoxreaktionen wird das energiereiche ATP generiert. Gleichzeitig kann es allerdings bei der durch Flavoproteine katalysierten Übertragung von Elektronen zu einem „Leck“ in der Atmungskette kommen. Diese Elektronenübertragungen werden unter anderem für das intrazelluläre Entstehen von reduzierten Sauerstoffformen verantwortlich gemacht (JOENJE et al., 1989), die als reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) bezeichnet werden (JAMIESON et al., 1986). Endogen entstehen ROS außerdem durch phagozytierende Zellen bei der Immunantwort (BABIOR UND WOODMAN, 1990). Exogene Faktoren tragen desweiteren zu erhöhten Konzentrationen von reaktivem Sauerstoff bei. Durch elektromagnetische Strahlung wird Wasser gespalten, ein als Radiolyse bezeichneter Prozeß, bei dem ROS generiert werden (DAVIES, 1987). Ebenso führt UV-Strahlung zu erhöhter Entstehung von ROS (EPE, 1991). Gleichzeitig sind wir in unserer Umwelt einer Vielzahl von Substanzen ausgesetzt wie zum Beispiel Zigarettenrauch und verschmutzter Luft, die ebenso wie einige Nahrungsmittel ROS enthalten oder im Metabolismus zur Generation von ROS führen (FREI et al., 1991; NAGASHIMA, 1995). Für eine Vielzahl kanzerogener Substanzen wie Benzol und Aflatoxin wird vermutet, daß ihre schädigende Wirkung zum Teil auf die metabolische Entstehung von ROS zurückzuführen ist (KOLACHANA et al., 1993; LI und TRUSH, 1993; SHEN et al., 1995). Die Fähigkeit, intrazellulär Redoxreaktionen auszulösen, wurde auch für eine Reihe von Chinonen nachgewiesen, und in der Krebstherapie kommen mehrfach substituierte Anthrachinone, *p*-Benzochinone und synthetische Chinone zum Einsatz, deren Wirkungsweise auch darauf beruht, daß sie durch ROS die Tumorzellen schädigen (O'BRIEN, 1991). Zu den ROS gehören verschiedene Sauerstoffspezies, radikalische sowie nicht radikalische Formen. Sauerstoffhaltige Radikale (O₂^{•-}, OH[•], RO[•] und RO₂[•]) enthalten ein oder mehrere ungepaarte Elektronen und reagieren mit ihresgleichen oder mit nicht radikalischen Molekülen. Nicht radikalische ROS (H₂O₂, O₃, Singulett-Sauerstoff und HOCl) können leicht in Radikale überführt werden.

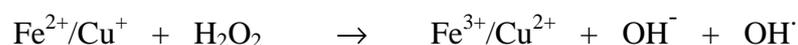
Durch Übertragung von einem Elektron auf molekularen Sauerstoff entsteht das **Superoxidradikal** ($\text{O}_2^{\cdot-}$):



Endogen wird es hauptsächlich durch das bereits beschriebene Leck in der Atmungskette gebildet. Außerdem trägt die Xanthinoxidase zur Bildung von Superoxidradikalen bei. Das Enzym ist für die Umsetzung von Hypoxanthin verantwortlich. Dabei entsteht Kaliumsuperoxid (ein Superoxidbildner) als Nebenprodukt (JOENJE et al., 1989). Laut Schätzungen werden 2 % des vom Menschen eingeatmeten Sauerstoffes in Superoxidradikale umgewandelt, was jährlich zu ca. 2 kg Superoxid im menschlichen Körper führt (HALLIWELL, 1994). Desweiteren existiert in der Membran von neutrophilen Blutzellen das Enzym NADPH Oxidase, welches ausschließlich Superoxidradikale außerhalb der Zelle generiert. Dieses Enzym wird als Teil der Immunantwort aktiviert (ROSSI et al., 1985). Auch andere phagozytierende Zellen setzen $\text{O}_2^{\cdot-}$ im Zuge ihrer Abwehrfunktion frei. Superoxidradikale sind milde Oxidantien (IMLAY und LINN, 1988; WISEMAN und HALLIWELL, 1996) und unter physiologischen Bedingungen nicht in der Lage, direkte DNA-Schäden zu induzieren (BRAUN und FRIDOVICH, 1981; HALLIWELL und GUTTERIDGE, 1989). Mit Wasserstoffprotonen können sie spontan zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff dismutieren. Diese Reaktion läuft sehr langsam ab (FRIDOVICH, 1986), kann aber durch die katalytische Wirkung der Superoxid Dismutase (SOD) beschleunigt werden.



Das bei der Dismutationsreaktion anfallende **Wasserstoffperoxid** (H_2O_2) stellt einen Vertreter der nichtradikalischen ROS dar. Es entsteht außerdem durch einige enzymatische Reaktionen oder durch Übertragung von zwei Elektronen auf molekularen Sauerstoff (GUTTERIDGE, 1994). Die Reduktion von H_2O_2 durch Superoxidradikale wird als Haber-Weiss-Reaktion bezeichnet, läuft aber in biologischen Systemen aufgrund der geringeren Reaktionsgeschwindigkeit als die der Dismutationsreaktion nicht ab. Eine Reduktion von Wasserstoffperoxid kann allerdings durch reduzierte Übergangsmetalle erfolgen. Dabei entsteht das Hydroxylion und das Hydroxylradikal (HALLIWELL und GUTTERIDGE, 1984; MENEGHINI und MARTINS, 1993).



Die Reduktion von Wasserstoffperoxid durch Fe^{2+} wurde bereits 1899 von Fenton beschrieben und wird in der Literatur als Fenton-Reaktion bezeichnet. Wasserstoffperoxid in Abwesenheit von Übergangsmetallen ist relativ stabil und kann so längere Strecken in der Zelle durch Diffusion zurücklegen. Es ist außerdem in der Lage, Zellmembranen zu passieren.

Hydroxylradikale (OH^\cdot) können durch die Fenton-Reaktion entstehen. Diese Reaktion wird durch Sauerstoff begünstigt (Übersicht bei MILLER et al., 1990). Zur Bildung von Hydroxylradikalen kommt es aber auch endogen über die Spaltung von Wasser durch energiearme Strahlung (DIZDAROGLU, 1992; RILEY, 1994). Dieser Prozeß wird als Radiolyse bezeichnet. Mit dem Hydroxylradikal ist eine hochreaktive Spezies entstanden, die aufgrund ihrer Halbwertszeit von 10^{-9} Sekunden mit fast allen organischen Verbindungen in fast diffusionskontrollierten Reaktionsraten reagiert (PRYOR, 1986, GUTTERIDGE, 1994). Daher wird das Hydroxylradikal häufig als das ultimativ schädigende Agens angesehen. Die typischen DNA-Schäden, die durch Hydroxylradikale entstehen, sind Einzel- und Doppelstrangbrüche, Verlust und Modifikationen der DNA-Basen, DNA-Protein-Quervernetzungen sowie Fragmentierung des Zucker-Phosphat-Gerüsts (HALLIWELL und ARUOMA, 1991).

Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) ist kein Radikal, die Restriktionen der Elektronenspins vom molekularen Sauerstoff sind allerdings aufgehoben, und damit besitzt Singulett-Sauerstoff ein starkes oxidierendes Potential (GUTTERIDGE, 1994). Die Halbwertszeit von Singulett-Sauerstoff liegt bei 10^{-6} Sekunden, und es besitzt eine Reichweite von 1-2 μm (PRYOR, 1986). Aufgrund seiner geringeren Aktivität im Vergleich zum Hydroxylradikal verursacht Singulett-Sauerstoff weniger oxidative Schäden (EPE, 1995). Die Entstehung von Singulett-Sauerstoff durch photochemische Reaktionen wurden von EPE (1991) und PIETTE (1991) beschrieben.

Es besteht ein Gleichgewicht zwischen Sauerstoffradikalen und deren Beseitigung. Bei Störung dieses Gleichgewichtes durch vermehrt auftretende Radikale oder nicht funktionierende Beseitigung der ROS wird der Begriff oxidativer Streß verwendet (HALLIWELL, 1994; ARUOMA und HALLIWELL, 1998). Sies definiert den Begriff als „Störung des Proxidantien-Antioxidantien Verhältnisses, zugunsten des Ersteren, welches zu einem potentiellen Schaden führt“ (SIES, 1991). Als Folge von oxidativem Streß können Proteine, Membranen und die DNA geschädigt werden. In Abbildung 1 sind die Zusammenhänge zwischen ROS, DNA-Schäden und Schutz vor oxidativem Streß dargestellt; sie werden im Folgenden näher erläutert.

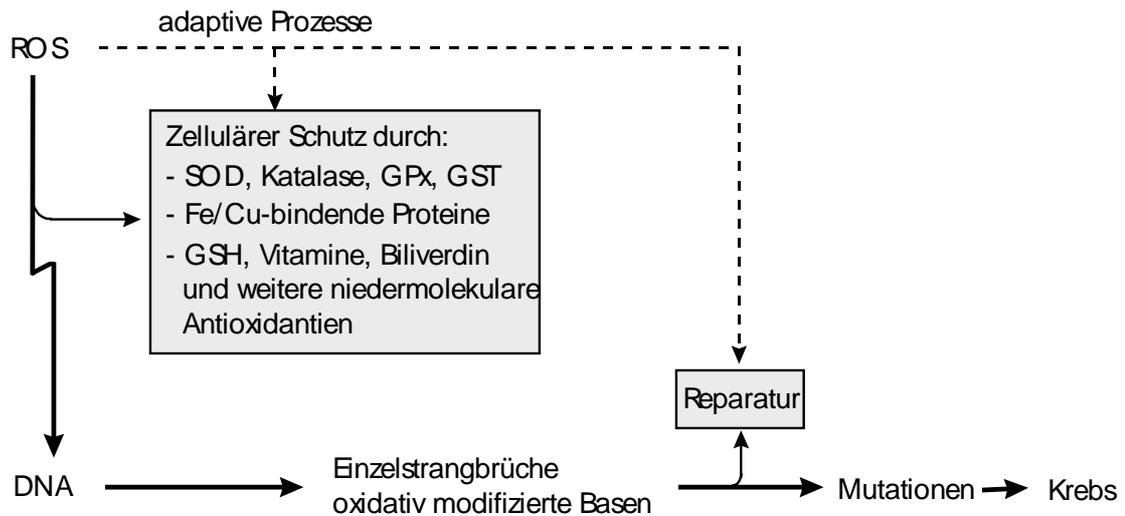


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Zusammenhänge zwischen ROS, DNA-Schäden und Schutzmechanismen vor ROS-induzierten Schäden.

1.1.1 Schäden durch ROS

Reaktive Sauerstoffspezies können in der Zelle mit Proteinen, Lipiden und der DNA reagieren. Proteine werden durch Radikaleinwirkung oxidiert, die entstehenden Produkte enthalten eine Bandbreite von modifizierten und degradierten Aminosäuren. Diese haben durch die Radikalreaktion neue funktionelle Gruppen wie Hydroxyl- und Carbonylgruppen erhalten. Als Folgereaktionen können Proteinfragmentierung, Crosslinks und Zerstörung der Tertiärstruktur und damit der Verlust der Funktionalität auftreten (Übersicht bei DEAN et al., 1997 und FU et al., 1998).

Ebenso wie Proteine können durch ROS auch Lipide oxidiert werden, ein Prozeß, der Lipidperoxidation genannt wird. Als Folge der Oxidation von ungesättigten Fettsäuren in der Membran läuft eine radikalische Kettenreaktion ab, deren Hauptprodukt das Hydroperoxyradikal ist (SIES, 1991). Lipidperoxidation führt zu strukturellen und funktionalen Veränderungen in den Membranen (ESTERBAUER et al., 1992; CADET et al., 1997), spielt eine Rolle bei verschiedenen degenerativen Krankheiten (DIX und AITKENS, 1993) und wird für Alterungsprozesse verantwortlich gemacht (AMES und SHIGENAGA, 1993; AMES et al., 1993; HALLIWELL, 1994). Hydroperoxyradikale, sowie bei der Lipidperoxidation anfallende Alkoxyradikale und weitere Abbauprodukte, können außerdem DNA-Schäden induzieren (JOENJE, 1989). Die Endprodukte der

Lipidperoxidation stehen daher als Promotoren der Kanzerogenese in der Diskussion (CHEESEMAN, 1993; CERRUTI, 1985).

Unabhängig von der Lipidperoxidation wird eine direkte Rolle oxidativer DNA-Schäden bei der Krebsentstehung diskutiert (TRUSH und KENSLER, 1991; WISEMAN und HALLIWELL, 1996). Eine Beteiligung an Prozessen der Initiation und Promotion der Kanzerogenese wird für ROS vermutet (GOLDSTEIN et al., 1981; GUERRERO et al., 1984; JANSSEN 1993; Abbildung 2).

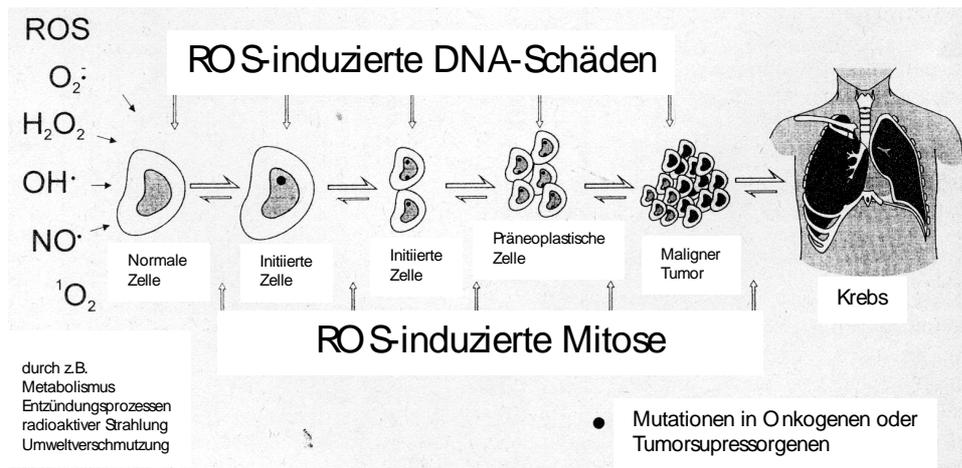


Abbildung 2: Mögliche Rolle von ROS bei einem mehrstufigen Prozeß der Kanzerogenese. (Aus LOFT und POULSEN, 1996)

Aus der Abbildung 2 wird deutlich, daß DNA-Schäden bei der Krebsentstehung beteiligt sind, und daher die durch ROS induzierten DNA-Schäden im Hinblick auf die Rolle von oxidativem Streß bei der Kanzerogenese von Interesse sind. Wie bereits beschrieben, kann Wasserstoffperoxid in der Zelle und durch Zellmembranen diffundieren. Die für die Fenton-Reaktion notwendigen Metallionen liegen an der DNA komplexiert vor oder können bei oxidativem Streß aus Transportproteinen freigesetzt werden (HALLIWELL und ARUOMA, 1991). Für Cu^{2+} zum Beispiel konnte eine Bindung an das N-7 des Guanins nachgewiesen werden (KAGAWA et al., 1991). Die bei der Reduktion von Wasserstoffperoxid entstehenden Hydroxylradikale können somit direkt an der DNA entstehen. Ungefähr 20 % aller OH^{\cdot} -Radikal-Attacken an der DNA führen zu Schäden am Zucker-Phosphat-Gerüst (ARUOMA und HALLIWELL, 1998). Daraus können DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie alkalilabile Stellen, die zum Verlust der Base führen (AP-Stellen), resultieren. Derartige DNA-Schäden sind sowohl für ionisierende Strahlung (von SONNTAG, 1987) als auch nach Einwirkung von Wasserstoffperoxid (DEMPLE et al., 1986) beschrieben.

Der Großteil oxidativer DNA-Schäden sind allerdings modifizierte DNA-Basen (SIES, 1991). Über 100 verschiedene oxidative DNA-Modifikationen sind bekannt (EPE, 1995). Dabei sind die Purine ebenso betroffen wie Pyrimidine (DIZDAROGLU, 1993). In Abbildung 3 sind die wichtigsten modifizierten DNA-Basen dargestellt.

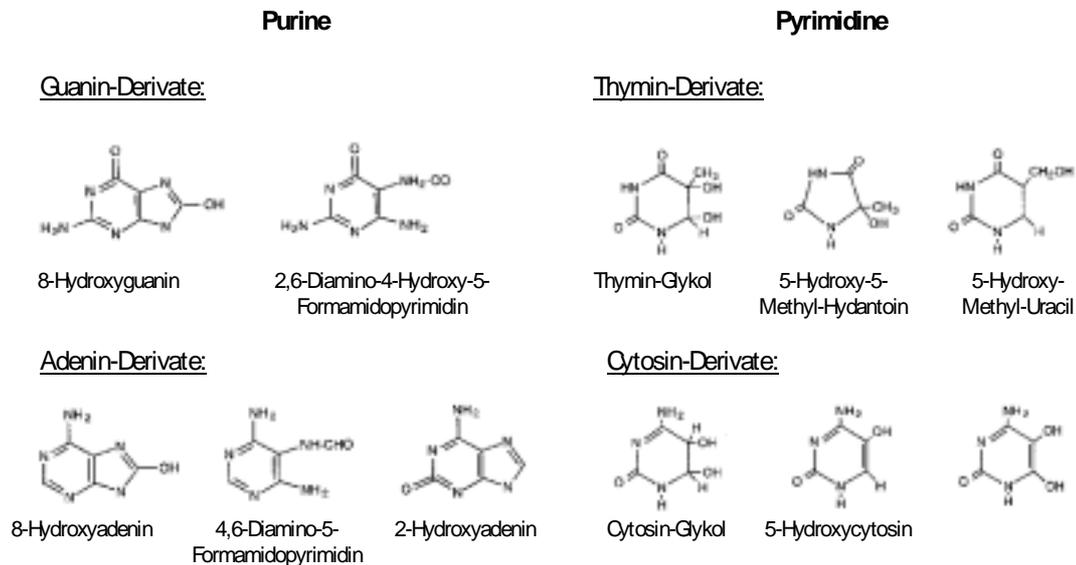


Abbildung 3: Struktur der am häufigsten vorkommenden oxidativ modifizierten DNA-Basen (nach NEWCOMB und LOEB, 1998).

Eine Veränderung des Guanins durch ROS tritt am häufigsten auf. NACKERDIEN et al. (1992) wies nach, daß bei Bestrahlung 45 % aller detektierten modifizierten Basen Derivate des Guanins sind. Die größte Bedeutung wird dem 7,8-dihydro-8-oxo-Guanin (8-Oxo-Guanin oder 8-Oxo-Gua, oft auch als 8-Hydroxyguanin bezeichnet) beigemessen, da es die am häufigsten auftretende Basenveränderung ist (EPE, 1995; LOFT und POULSEN, 1996). 8-Oxo-Gua entsteht durch Addition von OH[•] an das C8 des Guanins und kann sowohl nach Reaktion mit OH[•]-Radikalen als auch durch Singulett-Sauerstoff gebildet werden (HALLIWELL und ARUOMA, 1991). Bei der Replikation paart 8-Oxo-Gua mit Adenin und führt so zu G:C → T:A Transversionen. Die Mutagenität dieser Basenveränderung konnte in Mutagenitätstests gezeigt werden (TSCHOU und GROLLMANN, 1993). Außerdem kann nach Oxidation von dGTP im Nukleotidpool der Zelle 8-Oxo-dG Triphosphat als Substrat für eine Reihe von Polymerasen dienen und in die DNA gegenüber von Adenin eingebaut werden, was zu G:C → A:T Transitionen führt. Desweiteren kann die Oxidation von Purinen zur Ringöffnung und damit zu Formamidopyrimidinen (Fapy-Gua und Fapy-Ade) führen. Derartige Läsionen im Template-Strang führen zu einer Blockade der Polymerase I (LAVAL, 1996).

1.2 Hyperbare Sauerstoffbehandlung als Modell für oxidativen Streß beim Menschen

Sauerstoff wird in der hyperbaren Medizin für die Behandlung einer Vielzahl von Krankheiten eingesetzt. Hyperbare Sauerstoff-Behandlung oder hyperbare Oxygenation (HBO) bedeutet das Inhalieren von reinem Sauerstoff unter einem Druck von 2 - 3 bar absolut. Da ein normaler Umgebungsdruck von 1 bar vorherrscht, findet die Behandlung bei 1 - 2 bar Überdruck statt (ALMELING, 1996; CAMPORESI, 1996). In der Klinik wird die Behandlung in einer Stahldruckkammer durchgeführt, wobei die Sauerstoffzufuhr über Atemmasken erfolgt.

Im Körper findet der Transport des in der Lunge aufgenommenen Sauerstoffs über das Blut statt. In den einzelnen Organen und Geweben wird der Sauerstoff abgegeben und im gleichen Zuge das dort gebildete Kohlendioxid abtransportiert. Diese Aufgabe wird hauptsächlich von dem in Erythrozyten enthaltenen Hämoglobin übernommen. Ein Gramm Hämoglobin kann 1,34 ml Sauerstoff binden (WELSAU, 1996). Eine weitere Menge Sauerstoff löst sich physikalisch im Plasma. Unter den normalen atmosphärischen Bedingungen (1 bar) ist dieser Anteil mit 3 ml/l Blut gering. Während die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins mit 96 - 98 % kaum weiter gesteigert werden kann, steigt die Menge des gelösten O₂ jedoch linear zur Erhöhung des Umgebungsdrucks an. Eine direkte Proportionalität zwischen der in Lösung gehenden Gasmenge und dem über der Lösung herrschenden Partialdruck des Gases wird durch das Henry-Daltonsche Gesetz definiert (KUCHLING, 1994). Sind bei 1 bar in 1 l Blut 3 ml Sauerstoff gelöst, so erhöht sich dieser Gehalt bei 3 bar auf 65 ml pro Liter Blut. Diese Menge reicht theoretisch für eine erythrozytenfreie Sauerstoffversorgung aus (WELSLAU, 1996). In der Medizin kann daher die Behandlung mit Sauerstoff unter erhöhtem Druck sinnvoll sein, wenn Fälle von Ischämie (Einschränkung der Gewebedurchblutung), sowie eine Erniedrigung des O₂-Partialdruckes im arteriellen Blut (arterielle Hypoxie) oder eine Herabsetzung der O₂-Kapazität des Blutes (Anämie) vorliegen (WELSLAU, 1996; KINDWALL et al., 1991). Desweiteren wird die HBO angewendet bei Tinnitus und Osteomyelitis. Besondere Bedeutung aber erlangt die HBO bei der Behandlung akuter Notfälle wie der Dekompressionskrankheit, Gasbrand und Kohlenmonoxidvergiftung (TIBBLES und EDELSBERG, 1996). Fibroblastenproliferation und Kollagensynthese werden während einer HBO angeregt. Ebenso werden Leukozyten und Makrophagen aktiviert. Eine bakterizide Wirkung auf anaerobe Erreger

sowie Toxininaktivierung sind außerdem Wirkungen der HBO (WELSLAU, 1996; CAMPORESI et al., 1996). Die Dauer einer Druckkammerbehandlung richtet sich nach dem zu behandelnden Krankheitsbild und variiert zwischen 45 Minuten bei Kohlenmonoxidvergiftung und bis zu fünf Stunden bei schwerer Dekompressionskrankheit (TIBBLES und EDELSBERG, 1996). Die Atmung von reinem Sauerstoff wird durch kurze Zeitintervalle, in denen Normalluft geatmet wird, unterbrochen. Eine toxische Wirkung des Sauerstoffs, besonders in O₂-sensiblen Organen wie dem Gehirn und Nervengewebe, soll so verhindert werden.

Während einer Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff kommt es zu einer deutlichen Zunahme des im Plasma frei gelösten Sauerstoffes und so zur intrazellulären Bildung von ROS durch respiratorische Prozesse (ORIANI et al., 1996). Einen Nachweis für das Auftreten radikalischer Sauerstoffspezies erbrachten NARKOWICZ et al. (1993). Im Blut von Personen konnten sie nach einer HBO eine Zunahme an freien Radikalen beobachten. Das mit der Elektronenspinresonanzspektrometrie gemessene Ascorbat-Radikal entsteht durch Reaktion von ROS mit Ascorbinsäure. Eine lineare Abhängigkeit der H₂O₂-Produktion vom Sauerstoffdruck konnte in Ratten, die einer HBO unterzogen wurden, festgestellt werden (DE MARTINO et al., 1996). Damit eignet sich die HBO als Modell für die Untersuchung von Auswirkungen, die durch verstärktes Auftreten von ROS im menschlichen Körper entstehen.

1.3 Nachweis von oxidativen DNA-Schäden

Reaktive Sauerstoffspezies können in der DNA Einzelstrangbrüche und alkalilabile Stellen induzieren. Es gibt verschiedene Testsysteme, um DNA-Strangbrüche in isolierter DNA oder in Zellen zu detektieren. Ein Genotoxizitätstest, der in den letzten Jahren aufgrund seiner Sensitivität und einfachen Handhabung an Bedeutung gewonnen hat, ist die Einzelzellgelelektrophorese (SCGE oder Comet Assay). Dieser Test ermöglicht den Nachweis von DNA-Schäden und Reparatur in einzelnen Zellen (SINGH et al., 1988; TICE et al., 1990). Zur Durchführung wird eine Einzelzellsuspension verwendet. Die Zellen werden in Agarose aufgenommen und auf Objektträger aufgetragen. Darauf erfolgt die Lyse der Zellen, in deren Verlauf die Zellmembranen und Proteine zerstört werden. Für die Detektion von Einzelstrangbrüchen und alkalilablen Stellen wird eine Alkalidenaturierung der DNA mit anschließender Elektrophorese unter alkalischen Bedingungen durchgeführt. Die Präparate werden dann mit einem DNA-bindenden Farbstoff angefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Zellen mit runden Zellkernen werden als Zellen ohne nachweisbare DNA-Schäden angesehen. In Zellen mit DNA-Schäden wandert chromosomale DNA aus dem Kernbereich in

Richtung der Anode. Das mikroskopische Bild erinnert an einen Kometen (Übersicht bei MCKELVEY-MARTIN, 1993) und ist in Abbildung 4 dargestellt.

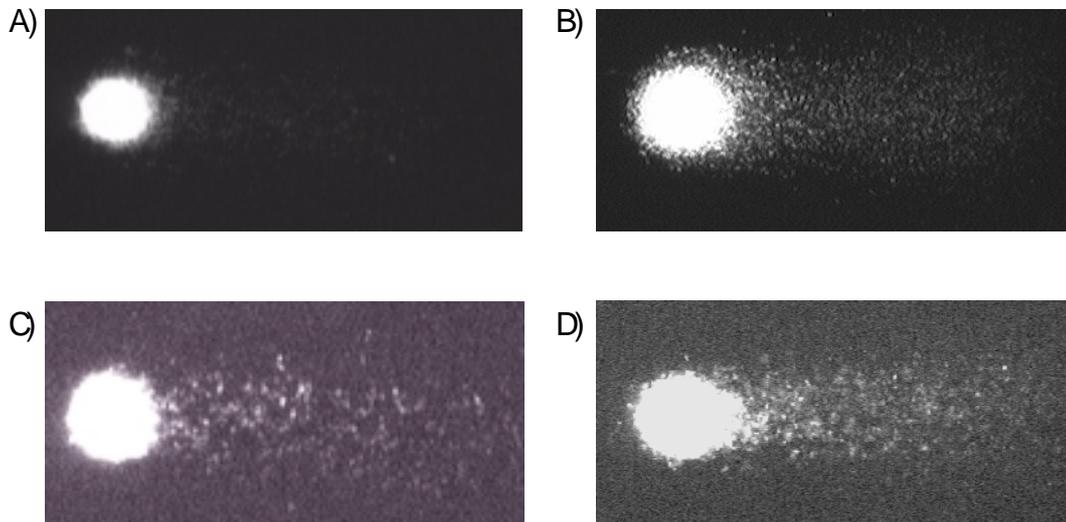


Abbildung 4: Mit Ethidiumbromid angefärbte Zellkerne nach Durchführung des Comet Assays. A) Zelle ohne erkennbare DNA-Schäden, B) geringe DNA-Migration, C) und D) zunehmende DNA-Migration.

Mit dem Comet Assay wurden eine Reihe von DNA-schädigenden Substanzen untersucht und durch oxidativen Streß induzierte Schäden nachgewiesen (Übersichten bei FAIRBAIRN et al., 1995; TICE, 1995). Auch Reparaturprozesse können mit dem Comet Assay untersucht werden (SPEIT et al., 1995). Neben in vitro-Studien eignet der Test sich ebenfalls für den Nachweis von DNA-Schäden nach in vivo-Exposition. In einem Kollektiv von Styrol-exponierten Arbeitern wiesen VODIKÁ (1995) erhöhte DNA-Migration gegenüber einer Kontrollgruppe nach. Vergleichende Untersuchungen von Mülldeponiearbeitern und einem Kontrollkollektiv zeigten einen signifikant erhöhten Mittelwert der DNA-Migration in dem Arbeiterkollektiv (HARTMANN et al., 1998). Effekte im Comet Assay wurden auf individueller Ebene nach körperlicher Belastung nachgewiesen (HARTMANN et al., 1994).

Da es durch ROS-Einwirkung neben DNA-Strangbrüchen zu oxidativ modifizierten Basen kommt, werden häufig Basenveränderungen als Parameter für ROS-induzierte DNA-Schäden bestimmt. Der direkte Nachweis von modifizierten Basen erfolgt über Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS) oder HPLC (high performance liquid chromatography)-Messungen (Übersichten bei HALLIWELL und GUTTERIDGE, 1989; HALLIWELL 1993a; RAVANAT et al., 1995). Durch GC-MS-Messungen werden

mehrere modifizierte Basen gleichzeitig nachgewiesen, und es kann so ein Schadensspektrum erstellt werden (TEIXEIRA et al., 1993; HALLIWELL, 1993b). Bei der HPLC-Analyse mit elektrochemischer Detektion wird eine spezifische oxidativ veränderte Base nach ihrer Freisetzung aus der DNA, zumeist durch enzymatische Hydrolyse, gemessen. Diese Methode gilt als sehr sensitiv (FLOYD et al., 1986; COLLINS et al., 1996). Als Marker für oxidativen Streß wird mit der HPLC-Analyse zumeist der Gehalt an 8-Oxo-Gua untersucht (LOFT et al., 1992, COLLINS et al., 1996)

Durch Modifikation des Comet Assays können auch mit diesem Test oxidativ veränderte Basen detektiert werden (COLLINS et al., 1993; COLLINS et al., 1997). Hierbei werden Reparaturenzyme eingesetzt, die spezifisch oxidative Schäden erkennen, und die während des Reparaturprozesses zusätzlich entstehenden Strangbrüche nachweisen. Dieser indirekte Nachweis durch ROS modifizierter Basen kann mit dem Comet Assay, aber auch durch den Einsatz der Reparaturenzyme in der alkalischen Elution erfolgen (EPE et al., 1993) und stellt einen wichtigen Beitrag bei der Diskussion über den Gehalt oxidativ veränderter Basen in unserer DNA dar (COLLINS et al., 1996; EPE et al., 1990).

1.4 Nachweis von Mutationen nach oxidativem Streß

DNA-Schäden wie Strangbrüche und Basenmodifikationen sind genotoxische Ereignisse. Sie können einer Mutation vorausgehen. Allgemein lassen sich Mutationen einteilen in Genmutationen (Veränderungen im einzelnen Gen), Chromosomenmutationen (Veränderungen in der Struktur eines oder mehrerer Chromosomen) und Genommutationen (Veränderungen am gesamten Chromosomensatz). DNA-Strangbrüche können zu Chromosomenbrüchen und daraus resultierenden Chromosomenmutationen führen, während Basenmodifikationen überwiegend zu Genmutationen führen. Besondere Bedeutung wird somatischen Mutationen bei der Krebsentstehung zugeschrieben (BISHOP, 1987). Genmutationen, ebenso wie Chromosomenmutationen können an der Induktion, Promotion und Progression von Krebserkrankungen beteiligt sein (Übersicht bei WÜRGLER, 1993). Für die Detektion von Mutationen im Menschen können verschiedene Mutationstests angewendet werden.

1.4.1 Der Mikronukleus-Test zum Nachweis von Chromosomenmutationen

Durch ROS werden Strangbrüche in der DNA induziert. Werden diese in Doppelstrangbrüche überführt - und das kann im Verlauf der Reparatur erfolgen - so kann es zu

Chromosomenbrüchen kommen. Im weiteren Verlauf des Zellzyklus können die Brüche sich als Mutation manifestieren. Für die zytogenetische Detektion von Chromosomenmutationen werden der Chromosomenaberrationstest und der Mikronukleus-Test eingesetzt. Als Mikronuklei werden vom Zellkern abgetrennte Kleinkerne bezeichnet, die aus Chromosomenbruchstücken oder ganzen Chromosomen entstanden sind (FENECH und MORLEY, 1985). Damit können mit dem Mikronukleus-Test neben chromosomalen Schäden auch Aneuploidien erfaßt werden. Im Mikronukleus-Test werden Lymphozyten mit dem Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert und zum Wachstum gebracht. Zur Exprimierung der Mutation müssen die Zellen mindestens eine Zellteilung durchlaufen haben. Bei Lymphozyten gibt man, um sicher zu sein, daß sich die Zellen geteilt haben, Cytochalasin B (Cyt B) zu den Kulturen. Cyt B verhindert die Zellteilung, nicht aber die Kernteilung (FENECH, 1996). Es werden dann die zweikernigen Zellen ausgewertet. Abbildung 5 zeigt zweikernige Zellen mit Mikronuklei. Der Mikronukleus-Test eignet sich für in vitro sowie für in vivo Untersuchungen (FENECH und MORLEY, 1985).

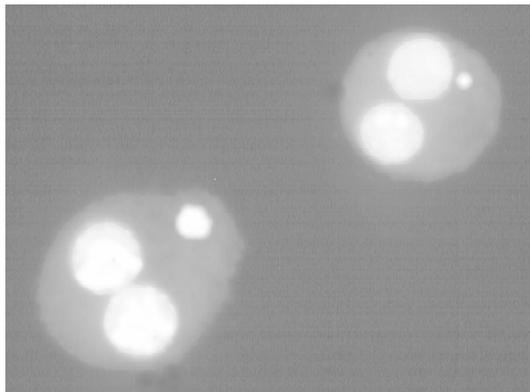


Abbildung 5: Zweikernige Lymphozyten mit Acridinorange angefärbt. Neben den Hauptkernen ist jeweils ein Mikronukleus erkennbar.

1.4.2 Der HPRT-Test zum Nachweis von Genmutationen

Oxidativ veränderte Basen können bei der Replikation zu Fehlpaarungen führen. Werden derartige Basenschäden nicht repariert, so kommt es zu Genmutationen. Besonders für das 8-Oxo-Gua sind Fehlpaarungseigenschaften nachgewiesen worden. Das mutagene Potential vom 8-Oxo-Gua wird auf die bevorzugte Paarung mit Adenin statt Cytosin zurückgeführt (TSCHOU und GROLLMANN, 1993). Genmutationen in somatischen Zellen des Menschen können am HPRT-, Glycophorin A-, oder HLA-A-Gen bestimmt werden (ALBERTINI et al., 1993; COLE und SKOPEK, 1994). Das HPRT-

NYHAN, 1964; SEEGMILLER et al., 1967). Das HPRT-Enzym ist nicht essentiell notwendig, um Purinnukleotide zur Verfügung zu stellen, da diese durch energieaufwendigere Neusynthese von der Zelle hergestellt werden können. Es ist daher möglich, einen der beiden Wege zu blockieren, ohne die Lebensfähigkeit der Zelle einzuschränken. Vom HPRT-Enzym werden neben den Purinen Hypoxanthin und Guanin auch die Purinanaloga 6-Thioguanin und 8-Azaguanin als Substrat erkannt und in für die Zelle letale Nucleosidmonophosphate umgewandelt (KRENITSKY et al., 1969). Zellen, die eine funktionsstörende Mutation in ihrem HPRT-Gen besitzen (HPRT-Zellen), sind aufgrund der fehlenden HPRT-Aktivität resistent gegenüber den toxischen Purinanaloga und überleben in einem Medium, das z. B. 6-Thioguanin enthält. Der HPRT-Mutagenitätstest nutzt diese Resistenz zur Selektion von Mutanten. Dabei werden alle Mutationen erfaßt, die eine Funktionsstörung des HPRT-Enzyms verursachen. Eine weitere wichtige Voraussetzung für eine Selektion auf HPRT-Mutanten ist die funktionelle Hemizygotie, so daß eine rezessive Mutation zur Manifestation eines HPRT-defizienten Phänotyps ausreicht. Bei allen bisher untersuchten Säugetieren ist das HPRT-Gen auf dem X-Chromosom lokalisiert (FENWICK, 1980; FRANCKE und TAGGART, 1980). Das humane HPRT-Gen befindet sich distal auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Xq26) (PAI et al., 1980), und somit unterliegt ein Allel bei Frauen der X-Inaktivierung. Männer mit nur einem X-Chromosom sind hemizygot für das HPRT-Gen. Die Lokalisation und Struktur des humanen HPRT-Gens ist in Abbildung 7 gezeigt.

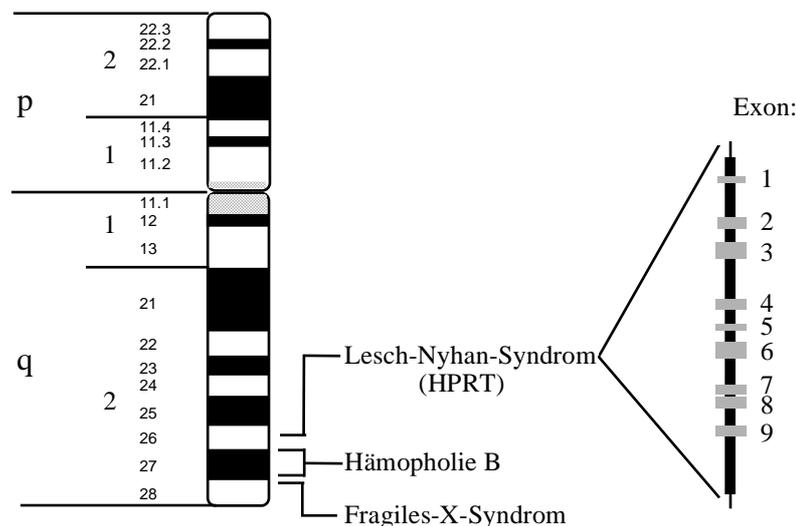


Abbildung 7: Lokalisation und Struktur des menschlichen HPRT-Gens auf dem X-Chromosom.

Das HPRT-Gen setzt sich aus neun Exons und acht Introns zusammen und erstreckt sich über insgesamt 44 kb (PATEL et al., 1986). Inzwischen ist das humane HPRT-Gen vollständig sequenziert (EDWARDS et al., 1990) und die Genstruktur läßt sich mit einer Multiplex-PCR untersuchen (GIBBS et al., 1990). Mit Hilfe der PCR-Technik kann die HPRT-mRNA über die entsprechende cDNA amplifiziert und sequenziert werden. So können Punktmutationen in der kodierenden HPRT-Sequenz nachgewiesen (VRIELING et al., 1988) und Mutationsspektren erstellt werden.

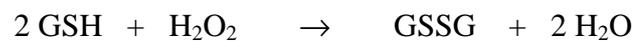
Für die Untersuchung von in vivo auftretenden HPRT-Mutationen im Menschen wurde in den 80er Jahren der HPRT-T-Zellen Klonierungstest entwickelt (ALBERTINI et al., 1982; MORLEY et al., 1983). Als zu untersuchende Zellpopulation werden Lymphozyten verwendet, die aus dem Blut der zu untersuchenden Person gewonnen werden. Die Zellen werden nach Mitogenstimulierung und unter Einfluß von Wachstumsfaktoren zum klonalen Wachstum angeregt. Die Wachstumsphase findet für einen Teil der Zellen unter nicht selektiven Bedingungen und für den Rest der Zellen mit Zusatz von 6-Thioguanin als selektives Agens statt. Die meisten Untersuchungen des HPRT-Gens erfolgten an gesunden Erwachsenen (TATES et al., 1994; HENDERSON et al., 1986; DAVIES et al., 1992; BRANDA et al., 1993). Der T-Zellen-Klonierungstest findet aber auch Anwendung bei Biomonitoring-Studien am Menschen, sowie in Studien nach einer definierten genotoxischen Belastung (MESSING und BRADLEY, 1985; HAKODA et al., 1988; COLE et al., 1995; ÖSTERHOLM et al., 1995). Einige Arbeitsgruppen haben sich auf die molekulare Analyse der HPRT-defizienten T-Lymphozyten konzentriert (VRIELING et al., 1992; BURCKHART-SCHULTZ et al., 1993; HOU et al., 1993), und es besteht eine Datenbasis der Mutationsanalysen (CARIELLO et al., 1992). Mutationsspektren werden erstellt, um Hinweise darauf zu erhalten, ob spezifische Genmutationen als Folge eines bestimmten Schadens entstehen.

1.5 Antioxidative Schutzmechanismen der Zelle

Das Entstehen von ROS ist unvermeidlich, aber die Zelle hat Mechanismen entwickelt, um einen Schaden durch oxidativen Streß zu verhindern. Zum einen werden ROS durch Antioxidantien abgefangen, zum anderen verfügt die Zelle über eine Reihe von Reparaturmechanismen, um Schäden zu minimieren. Antioxidativ wirkende Mechanismen lassen sich unterteilen in enzymatische und nicht enzymatische Antioxidantien. Eine Definition von biologischen Antioxidantien besagt, daß „jede Substanz, die in geringerer Konzentration als ihr oxidierbares Substrat vorliegt und die Oxidation dieses Substrates deutlich verlangsamt oder verhindert“, antioxidativ wirkt (BENZIE und STRAIN, 1996).

Enzymatische Antioxidantien:

Die am Schutz vor ROS beteiligten Enzyme wurden hauptsächlich intrazellulär nachgewiesen. Im Blutplasma des Menschen sind sie entweder gar nicht oder in geringen Mengen vorhanden (SIES, 1991). Das Enzym Superoxid Dismutase (SOD) entfernt Superoxidradikale, indem es die Dismutationsreaktion beschleunigt (FRIDOVICH, 1989). Säugerzellen besitzen eine Mn-haltige SOD in ihren Mitochondrien, sowie große Mengen Cu-,Sn-haltiger SOD im Zytosol (FRIDOVICH, 1989). Die dominant erbliche Form der amyotrophen lateralen Sklerose (ALS), einer degenerativen Krankheit der Motorneuronen im Gehirn und Rückenmark, wird beispielsweise mit Mutationen in Zusammenhang gebracht, die die CuZnSOD betreffen (ROBBENRECHT et al., 1994). Die SOD muß mit H₂O₂-entfernenden Enzymen eng zusammenarbeiten, um die Zelle nicht durch das bei der Dismutationsreaktion entstehende Wasserstoffperoxid zu gefährden. Katalase überführt H₂O₂ in Wasser und O₂, ist in den Peroxisomen lokalisiert (ANDERSON, 1996) und dient dort der Entfernung von H₂O₂, das durch peroxisomale Oxidasen gebildet wird (HALLIWELL, 1996). Der Großteil des durch SOD generierten H₂O₂ scheint aber durch die Glutathion Peroxidasen (GSHPX) entfernt zu werden (HALLIWELL, 1994):



Wasserstoffperoxid wird zu Wasser reduziert, reduziertes Glutathion (GSH) dient als H-Akzeptor und wird in seine oxidierte Form (GSSG) überführt (HALLIWELL, 1994, ANDERSON, 1996). Für die Regeneration des GSSG ist die Glutathion-Reduktase zuständig. Die Glutathion Peroxidase enthält Selenium in ihrem katalytischen Zentrum, ebenso wie die Phospholipid Hydroperoxid Glutathion Peroxidase, die für den Abbau der Lipid Hydroperoxide aus oxidativ geschädigten Membranen verantwortlich ist (MAIORINO et al., 1991). Es sind aber noch weitere, glutathionabhängige Enzyme von Bedeutung. Die Familie der Glutathion-S-Transferasen (GST) spielen eine zentrale Rolle bei zellulären Entgiftungsreaktionen (HAYES und PULFORD, 1995; SMITH et al., 1995). Mindestens fünf Genfamilien kodieren für diese Enzyme, die GSTA (alpha), GSTM (mu), GSTP (pi), GSTS (sigma) und GSTT (theta). Die GST-Enzyme katalysieren die Reaktion von reduziertem Glutathion mit elektrophilen Substanzen. Diese können einerseits als Intermediate im oxidativen Stoffwechsel von Xenobiotika aber auch durch oxidativen Streß entstehen (KETTERER und COLES, 1991; HAYES und PULFORD, 1995). Eine Beteiligung der GST-Enzyme beim zellulären Schutz vor ROS und beim Schutz vor ROS induzierten Abbauprodukten wird daher diskutiert (KETTERER und COLES, 1991; HAYES und PULFORD, 1995).

Nicht-enzymatische Antioxidantien:

Glutathion spielt nicht nur eine Rolle in den beschriebenen enzymatischen Entgiftungsreaktionen, sondern dient in seiner reduzierten Form als effektiver Radikalfänger. Allgemein weisen alle Thiole eine hohe Reaktionsrate mit OH \cdot -Radikalen auf. In der Zelle ist Glutathion in millimolaren Konzentrationen vorhanden, im Plasma dagegen nur in Spuren nachweisbar (HALLIWELL, 1994). Eine Gruppe anderer antioxidativ wirkender Substanzen sind die Vitamine. Dabei hat besonders das fettlösliche Vitamin E (α -Tocopherol) eine besondere Bedeutung. Vitamin E ist in Lipoproteinen und Membranen lokalisiert. Es unterbricht die radikalische Kettenreaktion bei der Lipidperoxidation, indem es mit Peroxylradikalen reagiert. Das dabei entstehende Tocopherol Radikal ist sehr viel weniger reaktiv und kann mit Vitamin C zu α -Tocopherol zurückreagieren (NIKI, 1987; ARUOMA, 1994; ANDERSON, 1996). Vitamin C besitzt ein stark reduzierendes Potential, und aufgrund dessen fungiert es als guter Radikalfänger für Hydroxylradikale, Superoxidradikale und Singulett Sauerstoff (STOCKER und FREI, 1991; GUTTERIDGE und HALLIWELL, 1996). Auch für Bilirubin gibt es Hinweise auf ein antioxidatives Potential (STOCKER und AMES, 1987; FREI et al., 1988). Effektiver Schutz vor Singulett Sauerstoff wurde für freies sowie für konjugiertes Bilirubin beschrieben (STEVENS und SMALL, 1976; DI MASCIO et al., 1989). Weitere nicht enzymatische Antioxidantien und ihre Konzentration im menschlichen Plasma sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1: Nicht-enzymatische niedermolekulare Antioxidantien im menschlichen Blutplasma (aus STOCKER und FREI, 1991)

Antioxidant	Konzentration im Plasma [μ M]
wasserlöslich:	
Glukose	4500
Pyruvat	30-70
Harnsäure	160-450
Ascorbinsäure	30-150
Bilirubin	5-20
GSH	< 2
fettlöslich:	
α -Tocopherol	15-40
Ubiquinol-10	0.4-1.0
Lycopene	0.5-1.0
β -Carotin	0.3-0.6
Lutein	0.1-0.3

Wie bereits beschrieben, haben Übergangsmetalle bei der Entstehung von ROS eine katalytische Funktion. Aus diesem Grund sind sie im Körper in Transportproteinen gebunden. Transferrin und Lactoferrin binden Eisen im Plasma, so daß es nicht für Redoxreaktionen zur Verfügung steht (HALLIWELL und GUTTERIDGE, 1986). Ceruloplasmin bindet Kupfer und oxidiert mit seiner Ferroxidase-Aktivität Fe^{2+} zu Fe^{3+} (STOCKER und FREI, 1991; ANDERSON, 1996). Intrazellulär wird Eisen von Ferritin gebunden. Das Ferritinprotein besteht aus 24 Untereinheiten, die in unterschiedlicher Zusammensetzung aus der leichten und der schweren Kette bestehen. Es können so bis zu 4500 Eisenatome von einem Protein gebunden werden (Übersichten bei HALLIDAY und POWELL, 1988 sowie MUNRO et al., 1988).

Trotz der beschriebenen Schutzmechanismen vor den Auswirkungen freier Radikale sind Zellen zeitweise Einflüssen ausgesetzt, die prooxidativ wirken. Das verstärkte Auftreten von ROS kann zur Expression einer Vielzahl von Genen führen, deren Produkte die Zelle vor oxidativem Stress schützen. Bereits beschrieben ist eine Aktivierung für die MnSOD-, GST-, NAD(P)H:Chinon Reduktase- kodierenden Gene, sowie für Zytokine, Transkriptionsfaktoren, Hämoxygenase und Wachstumsfaktoren (Übersicht bei ARRIGO und KRETZ-REMY, 1998). Die molekularen Mechanismen dieser Genaktivierungen sind Ziel vielfältiger Untersuchungen, aber bis heute nicht vollständig verstanden. Derartige Untersuchungen werden hauptsächlich an Zellkulturen durchgeführt. Eine Übertragung auf die in vivo Situation ist nicht ohne weiteres möglich.

DNA-Reparatur:

Entgehen ROS den antioxidativ wirkenden Mechanismen, so können sie die DNA schädigen. DNA-Reparatur-Prozesse sorgen dafür, daß derartige Schäden wieder aus der DNA entfernt werden und sich nicht als Mutation manifestieren. DNA-Schäden werden durch verschiedene Mechanismen repariert.

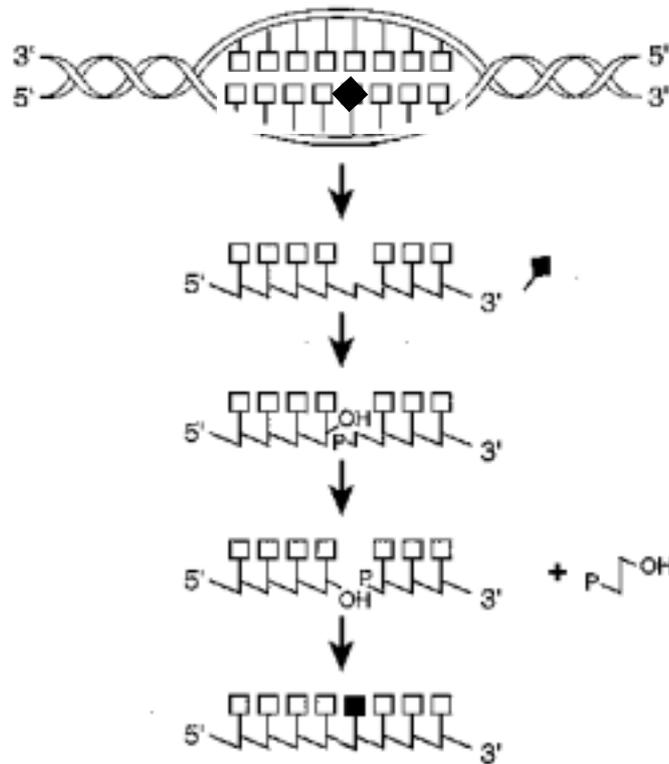


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Basen-Exzisions-Reparatur (nach FRIEDBERG, 1985).

Bei der Nukleotidexzisionsreparatur wird die geschädigte Base als Teil eines Oligonukleotids aus der DNA entfernt. Die entstehende Lücke wird anschließend durch Neusynthese aufgefüllt. Dieser Reparaturmechanismus trägt zu einem geringen Teil zu der Reparatur oxidativ geschädigter DNA, insbesondere bei der Reparatur von Einzelstrangbrüchen und AP-Stellen bei (RAMOTAR und DEMPLE, 1993). Demgegenüber wird bei der Basenexzisionsreparatur die geschädigte, falsch gepaarte oder DNA-unübliche Base durch spezifische DNA-Glykosylasen erkannt und als freie Base aus der DNA entfernt (LINDAHL, 1979). Die entstehenden AP-Stellen werden durch Insertion einer Base gefüllt, oder durch Endonukleaseaktivität der Glykosylase in einen Strangbruch überführt. Dieser kann durch Neusynthese geschlossen werden. Ein Schema der Basenexzisionsreparatur ist in Abbildung 8 gezeigt.

Für oxidative DNA-Schäden und besonders für die Reparatur des 8-Oxo-Guanins ist die Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG-Protein) von Bedeutung. Das FPG-Protein ist eine bakterielle Glykosylase aus *E.coli* und entfernt spezifisch 8-Oxo-Gua, Fapy-Gua und Fapy-Ade, sowie geringe Mengen 8-Oxo-Ade aus der DNA (BOITEUX et

al., 1992; KARAKAYA et al., 1997). Das humane, homologe Reparaturenzym ist kürzlich nachgewiesen und kloniert worden. Es wird vom ogg1-Gen kodiert (ROSENQUIST, 1997). Oxidative Basenschäden werden außerdem von der Endonuklease III erkannt und repariert (EPE, 1995, COLLINS et al., 1995). Die verschiedenen Endonukleasen und ihre Substrate sind in Tabelle 2 zusammengestellt.

Tabelle 2: Reparaturenzyme und ihre Substrate *

Reparatur- Endonuklease	Gen	Spektrum			
		AP-Stelle			Basen-Modifikation
		a)	b)	c)	
FPG-Protein	fpg	+	-	+	8-OxoGuanin, Formamidopyrimidine
Endonuklease III	nth	+	-	+	5,6-Dihydrpyrimidine; 5-Hydroxy-5-Methylhydantoin
T4 Endonuklease V	denV	+	-	+	Cyclobutan-Pyrimidin-Photodimere
Endonuklease IV	nfo	+	+	+	-
Exonuklease III	xth	+	-	+	-

Desoxyribose ^{a)} unverändert, ^{b)} in 1'-Position oxidiert, ^{c)} in 4'-Position oxidiert

* nach Epe, 1995

1.6 Fragestellung der Arbeit

Durch die Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff kommt es zu einer erhöhten Bildung intrazellulärer Sauerstoffradikale (ORIANI et al., 1996). Daher wurde für diese Arbeit HBO als ein Modell verwendet, um die Auswirkungen von ROS im Menschen zu untersuchen. Verschiedene Formen der ROS können neben Proteinen und Lipiden die DNA schädigen. Neben Strangbrüchen und AP-Stellen werden durch oxidativen Streß hauptsächlich oxidativ veränderte Basen induziert. Die am häufigsten nachgewiesene Modifikation, das 8-Oxo-Gua, gilt als prämutagene Läsion.

Mit dem Comet Assay sollten DNA-Strangbrüche und alkalilabile Stellen in Blutzellen nach HBO untersucht werden. Der Nachweis von oxidativ veränderter Basen nach HBO sollte durch Modifikation des Comet Assays mit Reparaturenendonukleasen erfolgen. Mit HPLC-Analyse sollte die Induktion von 8-Oxo-Guanin, direkt untersucht werden. Zur

Klärung der Frage, inwieweit oxidativer Streß bei HBO-Behandlung zu Mutationen führt, sollte die Entstehung von Chromosomen- und Genmutationen in Lymphozyten nach HBO in vivo untersucht werden. Ob sich Hinweise auf ROS als Auslöser von Genmutationen ergeben, sollte durch molekulare Analyse der Mutanten überprüft werden. Polymorphismen in den Genen der Glutathion-S-Transferasen sollten im Zusammenhang mit der Induzierbarkeit von oxidativen DNA-Schäden untersucht werden, um Hinweise auf eine mögliche genetische Suszeptibilität zu erhalten.

Da in ersten Experimenten ein Hinweis auf adaptiven Schutz bei wiederholter HBO erhalten worden war, sollten die der Adaptation zugrundeliegenden Mechanismen weiter untersucht werden. Ein Aspekt war die Frage, ob der durch HBO erworbene Schutz auch in vitro protektiv vor der Induktion von DNA-Schäden durch ROS-generierende Substanzen wirkt. Diese Frage sollte durch in vitro Experimente mit dem Blut vor und nach HBO untersucht werden. Um direkten Aufschluß über adaptive Veränderungen im Blut zu erhalten, sollte der antioxidative Status der Probanden vor und nach einer HBO bestimmt werden. Insbesondere sollte die Messung der antioxidativen Enzyme SOD und Katalase, vom Glutathion und den Vitaminen A, C, E sowie durch Streß induzierbarer Proteine und dem eisenbindenden Protein Ferritin Hinweise auf die physiologischen Prozesse, die der Adaptation zugrundeliegen könnten, geben.

2. Material und Methoden

2.1 Probanden

Das Programm der in vivo-Studien wurde der Ethikkommission der Universität Ulm vorgelegt und durch diese genehmigt. Alle Probanden wurden über die Fragestellung und Durchführung des jeweiligen Versuches informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis. An den Studien haben gesunde Nichtraucher im Alter von 20 - 39 Jahren teilgenommen. Über Lebensgewohnheiten (zum Beispiel Alkohol- und Medikamentenkonsum) gab jeder Proband anhand eines Fragebogens Auskunft. Desweiteren wurden die Probanden angehalten, zwei Tage vor ihrer Teilnahme an einem Versuch keine stark belastenden sportlichen Aktivitäten auszuführen.

2.2 Material

2.2.1 Chemikalien

Acrylamid/Bis-Acrylamid (19:1)	Sigma, München
Acridinorange	Merck, Darmstadt
Agarose NEE0	Roth, Karlsruhe
Agarose, NuSieve GTG, (low melting agarose)	Biozym, Hameln
Ampicillin	Sigma, München
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck, Darmstadt
Bindesilan plus one	Pharmacia, Freiburg
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Cytochalasin B	Sigma, München
Chromosomenmedium 1 A	Gibco BRL, Eggenstein
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, München
Dithiothreitol (DTT)	Böhringer, Mannheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Serva, Heidelberg
DNA-Polymerisations-Mix (dNTPs)	Pharmacia, Freiburg
DNA-Standard X-174 (Hae III verdaut)	Pharmacia, Freiburg
DNA 100 Längenstandard	Pharmacia, Freiburg
DNA Längenstandard Lambda /HindIII	Pharmacia, Freiburg
Dynabeads M-280 (Streptavidin-gekoppelt)	Dynal, Hamburg
Ethidiumbromid	Sigma, München
Ficoll 400	Pharm. Biotech., Uppsala
Fluoresceindiacetat (FDA)	Sigma, München
Formaldehyd	Merck, Darmstadt

Formamid	Fluka, Neu-Ulm
Fötale Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Gentamycin	Seromed, Berlin
Glycerin	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Heparin-Natrium	Braun, Melsungen
Histopaque-1077	Sigma, München
Interleukin-2, human (rec.II-2)	Boehringer, Mannheim
L-Glutamin	Seromed, Berlin
Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg
Metaphosphorsäure (MPA)	Sigma, München
Methylenblau	Sigma, München
Morpholino-propan-sulfonsäure (MOPS)	Sigma, München
NP-40 (Igepal CA-630)	Sigma, München
NF-Harnstoff	Roth, Karlsruhe
^{32}P α -dCTP	Amersham, Braunschweig
PCR-10x Puffer	Pharmacia, Freiburg
PBS (phosphat buffered saline)	Biochrom, Berlin
Phenylmethylsulfonsäure (PMSF)	Böhringer, Mannheim
Phytohaemagglutinin-M Form (PHA-M)	Gibco BRL, Eggenstein
Repelsilan	Pharmacia, Freiburg
Reverse Transkriptase (M-MLV)	Promega, Madison USA
RNA-ladder	Gibco BRL, Eggenstein
RNAsin	Promega, Madison USA
RPMI 1640 Dutch Modification	Gibco BRL, Eggenstein
^{35}S dATP	Amersham, Braunschweig
SDS (sodium-dodecyl-sulfate)	Sigma, München
Sephadex G50	Pharmacia, Freiburg
Taq-Polymerase	Pharmacia, Freiburg
TEMED plus one	Pharmacia, Freiburg
6-Thioguanin (2-Amino-6-Mercaptopurin)	Sigma, München
Tris	Boehringer, Mannheim
Triton X-100	Sigma, München
Trypanblau	Sigma, München
Tween 20	Sigma, München
Wasserstoffperoxid (37 %)	Merck, Darmstadt

2.2.2 Besondere Geräte und Materialien

ALFexpress	Pharmacia, Freiburg
Software: ALFwin™ Version 1.00	Pharmacia, Freiburg
Bestrahlungsgerät (Gammacell 2000)	Nuclear Data Inc., Frankfurt
Blotpapier	Schleicher & Schüll, Dassel
CCD-Kamera IMAC-CCD S30	Compulog, Böblingen
DNA-Thermalcycler PTC 100	MJ Research Inc., Waterhouse
Elektrophoresekammer DNA Sub Cell™	Biorad, München
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Membran Hybond N ⁺	Amersham, Braunschweig
96er Multiwells (round bottom)	Nunc, Wiesbaden
Multi Crystal Gamma Counter LB2101	Berthold
PhosphoImager, Phospho Screens	Molecular Dynamics
Software: Scanner Control™	Molecular Dynamics
Image QuaNT™	Molecular Dynamics
Software „Colourmorph Comet Assay“ zur Bildanalyse	Perceptive Instruments, Haverhill, UK

2.2.3 Lösungen, Medien und Puffer

Acridinorange-Färbelösung	125 µg/ml Acridinorange in Sörensenpuffer
Acrylamid-Lösung (0,4 mm Gel, 100 ml)	42 g Harnstoff 15 ml Acrylamid-Stammlösung (40 %) 30 ml Aqua bidest. 20 ml 5 x TBE-Puffer 800 µl 10 % APS 40 µl TEMED
Acrylamid Hydrolink-Long Ranger (0,5 mm Gel, 60 ml)	21,7 g NF-Harnstoff 6,6 ml Acrylamid Long Ranger (50 %) 9,0 ml 10 x TBE auf 60 ml mit H ₂ O auffüllen 300 µl APS (10 %) 30 µl TEMED
Alkali-Elektrophoresepuffer pH>13	300 mM NaOH 1 mM EDTA
Ampicillin-Stammlösung	25 mg/ml in H ₂ O

Basismedium	RPMI 1640 2 mM L-Glutamin 2,5 ml/500 ml Gentamycin
Binde- & Waschpuffer (B/W-Puffer)	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 1 mM EDTA 2 M NaCl 0,1 % Tween-20
Blutkulturmedium	Chromosomenmedium 1 A mit 1% PHA
cDNA-Cocktail	1 fach Lysispuffer (2 x) 10 mM DTT 500 μ M dNTP Mix 1,6 μ M Primer 20 U RNAsin 50 U M-MLV
DEPC-Wasser	0,1 % Diethylpyrocarbonat (DEPC)
Enzypuffer	50 mM NaPO ₄ (pH 7,0) 10 mM EDTA (pH 10) 100 mM NaCl mit NaOH auf pH 7,5 einstellen,
Denaturierungslösung (5 x)	0,5 M NaOH 2 mM EDTA pH 8,0
Fixativ	Methanol : Eisessig (5:1), das erste Fix wurde außerdem 1 : 1 mit NaCl gemischt
Hybridisierungslösung	500 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,2 1 mM EDTA 7 % SDS in DEPC-Wasser
Lymphozytenpuffer für Antioxidantien	10 mM HEPES-Puffer 1,5 mM MgCl ₂ 10 mM KCl 0,5 μ M PMSF 0,5 μ M DTT

Lymphozytenpuffer für 8-OxodG	10 mM Tris 400 mM NaCl 2 mM Na ₂ EDTA (pH 8,0)
Lysispuffer (2 x) für cDNA-Synthese	100 mM Tris/HCl pH8,5 150 mM KCl 6 mM MgCl ₂ 5 % NP-40
Lyselösung (pH 10)	2,5 M NaCl 100 mM EDTA 10 mM Tris 10 % SDS, 1 % Triton X-100 und 10 % DMSO frisch dazu geben
Mops-Puffer (10fach)	200 mM MOPS 50 mM Na-Acetat 10 mM EDTA, mit NaOH auf pH 7,1 einstellen
Multiplex-PCR-Puffer (2 fach)	134 mM Tris-HCl pH 8,8 13,4 mM MgCl ₂ 33,2 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ 10 mM β-Mercaptoethanol 13,6 mM EDTA
Na-Phosphatpuffer	1 M Na ₂ HPO ₄ und 1 M NaH ₂ PO ₄ für pH 7,2 im Verhältnis 3 : 1 für pH 6,5 im Verhältnis 1 : 1
Neutralisationspuffer	0,4 M Tris, pH 7,5
10 x PCR-Puffer für GST-PCR	500 mM KCl 100 mM Tris (pH 8,4) 15 mM MgCl ₂
10 x PCR-Puffer für HPRT-PCR	600 mM KCl

	150 mM Tris (pH 8,5) 275 μ M MgCl ₂
RNA-Färbelösung	0,5 M Na-Acetat , pH 5,2 0,04 % Methylenblau
Sörensen-Puffer pH 6,8	0,3 M Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 0,3 M KH ₂ PO ₄
SOB-Agar	SOC-Medium 1,5 % Bacto-Agar 2,5 mM KCl
SOC-Medium	1 mM NaCl 2 % Bacto-Trypton 0,5 % Hefe Extrakt 10 mM MgSO ₄ 10 mM MgCl ₂ 20 mM Glucose
SSPE-Puffer (20 x) pH 7,0	3,6 M NaCl 0,3 M Natrium-Citrat-Dihydrat
1 x TBE pH 8,0	0,4 M Tris 0,4 M Borsäure 0,5 M EDTA
10 x TBE für ALF-Gele	121,14 g/l Tris 51,3 g/l Borsäure 3,72 g/l EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris pH 7,6 1 mM EDTA ph 7,6
Transferpuffer	50 mM Na-Phosphatpuffer pH 6,5
Triton-Waschlösung (TWS)	0,17 % [v/v] Triton X-100 100 mM NaCl 10 mM Tris pH 7,6

	1 mM EDTA pH 8,0
Waschpuffer	250 mM, 100 mM und 50 mM Na-Phosphatpuffer pH 7,2 mit 1 % SDS
X-Gal-Stammlösung	2 % (w/v) in Dimethylformamid

2.2.4 Reagenziensysteme (Kits) und Antikörper

AK anti Heme-Oxygenase-1	ABR
AK anti rabbit (horseradish peroxidase)	Amersham
AK anti ERK2	Santa Cruz
GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Pharmacia Biotech
Qiagen Plasmid Mini Kit	QIAGEN
T7-QuickPrime-Kit	Pharmacia
Rneasy Mini Kit	QIAGEN
RT-Superscript Preamplification	Gibco
T7-Sequencing-Kit	Pharmacia
T7-ALF- <i>express</i> -Sequencing-Kit	Pharmacia
TOPO TA Cloning-Kit	Invitrogen

2.2.5 Primer

Primer für die GSTM1/GSTT-PCR: (5' → 3')

GSTM1 (177 bp)	M1a	CTG CAA TGT GTG GGG GGA AG
	M1b	CTG GAT TGT AGC AGA TCA TG
GSTT1 (489 bp)	T1a	TCC CTT ACT GGT CCT CAC ATC TC
	T1b	TCA CCG GAT CAT GGC CAG CA

Primer für Multiplex-PCR: (5' → 3')

Exon 1 (636 bp)	V25	TGG GAC GTC TGG TCC AAG GAT TCA
	AS11/A	TGA CGT AAA GCC GAA CCC GGG AAA
Exon 2 (572 bp)	V27	TGG GAT TCA ACG TGT GAA CCA ACC
	V28	GAC TCT GGC TAG AGT TCC TTC TTC
Exon 3 (1059 bp)	V29A	CCT TAT GAA ACA TGA GGG CAA AGG
	V30A	TGT GAC ACA GGC AGA CTG TGG ATC
Exon 4 (334 bp)	V31	TAG CTA GCT AAC TTC TCA AAT CTT CTA
	V32/2	ATT AAC CTA GAC TGC TTC CAA GGG

Exon 5 (766 bp)	S53	GCG AGG TGA GGG TTT ATG GTG AGA
	AS53/A	GAG AGG TAG GAA GTA TAC CAT TCC
Exon 6 (411 bp)	V35/1	GAC AGT ATT GCA GTT ATA CAT GGG G
	V36/1	CCA AAA TCC TCT GCC ATG CTA TTC
Exon 7/8 (1533 bp)	V37A	GAT CGC TAG AGC CCA AGA AGT CAA G
	V38A	TAT GAG GTG CTG GAA GGA GAA AAC
Exon 9 (1278 bp)	V39/A	GAG GCA GAA GTC CCA TGG ATG TGT
	V40/A	CCG CCC AAA GGG AAC TGA TAG TC

Primer für die Herstellung von cDNA-Sonden: (5' → 3')

Hämoxxygenase (670 bp)	HEME1	CAG CAT GCC CCA GGA TTT GTC A
	HEME2	GGG GCT CTG GTC CTT GGT GTC A
Ferritin leichte Kette (601 bp)	FERL1	AGA ATT ATT CCA CCG ACG TGG A
	FERL2	GAA AGC TGC CTA TTG GCT GGA
Ferritin schwere Kette (561 bp)	FERH1	ATC AAC CGC CAG ATC AAC CTG
	FERH2	CCA ACA TGC ATG CAC TGG CTT

Primer für cDNA-Amplifikation und Sequenzierung: (5' → 3')

C3	AGG ACT CCA GAT GTT TCC AA
C5N	CGC GCC GGC CGG CTC CGT T
C5SH	ACC GGC TTC CTC CTC CTG AG
cD3	GCT CTA CTA AGC AGA TGG CC
Exon 3-1	TGA GAG ATC ATC TCC ACC
H3N	GCA GAT GGC CAC AGA ACT AG
H5N	TCC TCC TGA GCA GTC AGC C
HPRTALF1	ATA GGA CTC CAG ATG TTT CC
vr125	AAC TCT CAT CTT CGG CTT TG
vr123	CAA ATC CAA CAA AGT CTG GC
vr121	ACA CAG AGG GCC ACA ATG TG
Y3SH	GAT AAT TTT ACT GGC GAT GT

Als biotynlierter Primer wurde C5N verwendet.

Alle Primer wurden von der Firma Interactiva, Ulm, hergestellt.

2.3 Methoden

2.3.1 Comet Assay

Mit der alkalischen Version des Comet Assays können DNA-Schäden wie Strangbrüche und AP-Stellen auf Einzelzellniveau untersucht werden (Abbildung 9).

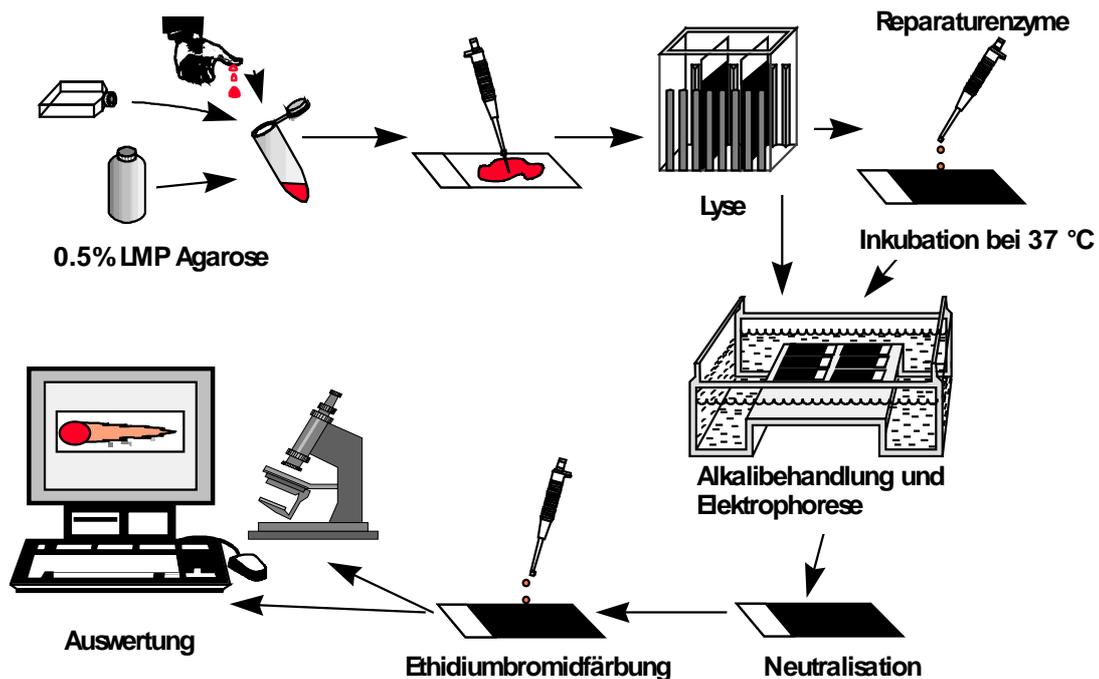


Abbildung 9: Ablaufschema des Comet Assays

Im Verlauf dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet. Die ursprüngliche Version wurde nach SINGH ET AL. (1988) durchgeführt, das neue Protokoll entstand in Anlehnung an KLAUDE ET AL. (1996). In der folgenden Beschreibung der Methoden wird jeweils auf Singh et al. oder Klaude et al. hingewiesen. Die Experimente für die in Abbildung 18 - 20, sowie 22 und 28 dargestellten Ergebnisse wurden mit der Methode nach Singh et al. durchgeführt.

2.3.1.1 Herstellen der Präparate

Nach *Singh et al.*: Es wurden aufgerauhte Objektträger verwendet, auf die eine Grundschrift aus 300 µl Agarose (MEEEO, 0,75 % in PBS) aufgetragen und mit einem Deckglas eingedeckt wurde. Zur Erhärtung der Agarose erfolgte die Lagerung für

mindestens 10 min im Kühlschrank. Eine Lagerung bis zu einer Stunde war möglich, dies mußte aber in einer feuchten Kammer geschehen, damit die Agarose nicht austrocknete. Das Deckglas wurde zum Auftragen der Zellsuspension vorsichtig abgezogen. Als Zellsuspension wurden 5 µl Vollblut bzw. 10 µl Lymphozyten in 90 µl Low Melting Agarose (NuSieve GTG, 0,5 % in PBS) aufgenommen, auf die Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas eingedeckt. Zum Erhärten der Agarose wurden die Objektträger dann ca. 5 min bei 4° C aufbewahrt. Danach wurde das Deckglas wieder entfernt, eine Deckschicht aus 90 µl Low Melting Agarose aufgetragen und eingedeckt. Nach abermaligem Erhärten dieser Deckschicht wurde das Deckglas entfernt und die Präparate zur Lyse für mindestens eine Stunde in eine Küvette mit 4° C kalter Lyselösung gestellt. Das Aufbewahren der Präparate in der Lyselösung ist für mehrere Tage möglich.

Nach KLAUDE ET AL.: Diese Modifikation des Protokolls von 1996 ermöglicht es, vorbeschichtete Objektträger über Monate hinweg aufzubewahren. Hierfür wurden glatte Objektträger mit Mattrand an der Unterkante mit einem Glasstift eingeritzt und mit 70 % Ethanol gereinigt. Die Objektträger wurden dann bis zur unteren Hälfte des Mattrandes in Agarose getaucht (MEE0, 1,5 % in PBS). Durch das Einritzen sowie das Eintauchen des Mattrandes war eine bessere Haftung der Agarose gewährleistet. Die Unterseite der Objektträger wurde abgewischt und die Objektträger dann bei Raumtemperatur waagrecht zum Trocknen der Agarose gelagert. War die Agarose durchgetrocknet, konnten die Objektträger gestapelt und über Monate bis zu ihrer Verwendung gelagert werden. Als Zellsuspension wurden 5 µl Vollblut bzw. 10 µl Lymphozyten in 120 µl Low Melting Agarose (NuSieve GTG, 0,5% in PBS, 37° C) aufgenommen, auf die Objektträger pipettiert und mit einem Deckglas eingedeckt. Nach 5 minütigem Erhärten der Agarose bei 4° C konnte das Deckglas abgezogen werden. Die Objektträger wurden für mindestens eine Stunde in eine Küvette mit 4 ° C kalter Lyselösung gestellt.

2.3.1.2 Alkalidenaturierung und Elektrophorese

Nach der Lyse wurden die Objektträger in eine horizontale Gelelektrophoresekammer gelegt. Die Präparate wurden dann für die Alkalidenaturierung mit dem Alkali-Elektrophoresepuffer überschichtet. Die Dauer der Alkali-Denaturierung betrug 40 Minuten nach *Singh et al.* und 25 Minuten nach *Klaude et al.* Die Elektrophorese erfolgte mit dem gleichen Puffer für 20 bzw. 25 min respektive bei einer Spannung von 25 V (0,86 V/cm) und einer Stromstärke von 300 mA. Die richtige Stromstärke wurde durch Hinzufügen oder Abpipettieren des Puffers eingestellt. Während der Alkalidenaturierung und Elektrophorese wurde direkter Lichteinfall vermieden.

2.3.1.3 Neutralisierung und Anfärbung der DNA

Nach der Elektrophorese wurden die Präparate aus der Kammer genommen, horizontal auf Abtropfständer gelegt und dreimal für jeweils 5 Minuten mit Neutralisierungspuffer (0,4 M Tris, pH 7,5) überschichtet. Nach *Singh et al.* mußten die Präparate sofort bzw. innerhalb weniger Stunden ausgewertet werden. Hierfür wurden zur Anfärbung der DNA 50 µl Ethidiumbromid (20 µg/ml) auf die Objektträger pipettiert, diese mit einem Deckglas eingedeckt und in einer feuchten Kammer aufbewahrt. Bei den getrockneten Objektträgern, die nach *Klaude et al.* verwendet wurden, erfolgte nach der Neutralisation eine Dehydrierung für 5 Minuten in 100 % Ethanol, dann wurden die Objektträger zum Trocknen bei Raumtemperatur schräg gestellt. Diese Trocknung ermöglichte es, die Präparate über einen längeren Zeitraum aufzubewahren. Direkt vor der Auswertung wurden 40 µl Ethidiumbromid (20 µg/ml) auf die Objektträger pipettiert, diese mit einem Deckglas eingedeckt und in einer feuchten Kammer aufbewahrt.

2.3.1.4 Mikroskopie und Auswertung

Die Auswertung erfolgte bei 200-facher Vergrößerung unter einem Fluoreszenzmikroskop (Anregungsfilter: 515-560 nm; Sperrfilter: 590 nm). Pro Objektträger wurden 50 Zellen zufällig ausgewertet. Zellen an den Randbereichen der Objektträger wurden nicht in die Auswertung einbezogen, da sie häufig Schäden aufwiesen, die wahrscheinlich auf mechanische Einflüsse zurückzuführen sind. Es wurden nur Zellen berücksichtigt, deren Zellkern eine runde Form aufwiesen. Mit Hilfe eines Bildanalysesystems, das über eine CCD-Kamera an das Mikroskop angeschlossen ist, können verschiedene Parameter bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde das Tailmoment als Auswerteparameter verwendet. Das Tailmoment wird berechnet als Produkt aus Fluoreszenzintensität der aus dem Kern gewanderten DNA und der Wanderungslänge.

2.3.1.5 Modifikation des Comet Assays für die Nachbehandlung mit Reparaturenzymen

Für die Nachbehandlung der lysierten Zellen mit den Reparaturenzymen Formamido-Pyrimidin-Glycosylase (FPG) und der Endonuklease III (EndoIII) wurden die Objektträger aus dem Lysepuffer genommen und mit 4°C kaltem Enzympuffer dreimal für je 5 Minuten gespült. Währenddessen wurden Deckgläser präpariert, indem auf jede Ecke 6 µl Agarose (0,75 %) pipettiert wurde. Von dem im Enzympuffer gelösten Enzym wurden 200 µl auf die Objektträger pipettiert und dann vorsichtig mit dem vorbereiteten Deckglas eingedeckt. Zwischen Objektträger und Deckglas entstand so eine Kammer, wodurch verhindert wurde, daß das Enzym an den Rändern des Deckglases heraustropfte. Die Enzymkonzentration betrug jeweils 1 µg/ml und die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei 37°C im Dunkeln. Nach der Enzyminkubation konnte die Elektrophorese wie unter 2.2.1.2. beschrieben durchgeführt werden. Bei Anwendung des Protokolls nach *Singh et al.* betrug die Zeit für Alkali-Denaturierung nach Enzyminkubation 20 Minuten, für das Protokoll nach *Klaude et al.* hingegen 25 Minuten. Die Elektrophoresezeiten wurden nicht verändert.

2.3.1.6 Protokoll zum Nachweis der DNA-Exzisionsreparatur

Um den Einfluß der DNA-Exzisionsreparatur zu untersuchen, wurde Aphidicolin (APC) als Inhibitor der DNA-Polymerase eingesetzt. Findet in der Zelle DNA-Exzisionsreparatur in Gegenwart von Aphidicolin statt, erfolgt eine Akkumulation von offenen DNA-Reparaturstellen, die im Comet Assay als erhöhte DNA-Migration nachzuweisen ist. Die Inkubation mit oder ohne APC ($1,5 \times 10^{-6}$ M) erfolgte für 2 Stunden ex vivo mit 1 ml Vollblut, das vor und direkt nach einer HBO entnommen worden war. Danach wurde das Blut im Comet Assay verwendet.

2.3.2 Mikronukleus-Test

Ein Test für den Nachweis von Chromosomenmutationen ist der Mikronukleus-Test. Mit diesem Test können chromosomenbrechende (klastogene) Ereignisse und die Induktion von Fehlverteilungen (Aneuploidie) nachgewiesen werden. Mikronuklei (MN) entstehen, wenn bei der Zellteilung Chromosomenfragmente oder ganze Chromosomen nicht auf die Tochterkerne verteilt werden, sondern sich mit einer Kernmembran umgeben. Sie bleiben als eigener, kleinerer Kern im Zytoplasma. Die Entstehung eines Mikronukleus erfordert zumindest eine Zellteilung. Um sicherzustellen, daß bei der Verwendung von Vollblut alle Zellen, die bei der Auswertung berücksichtigt werden, eine Zellteilung durchlaufen haben, wurde der

modifizierte Test mit Cytochalasin B-Zugabe durchgeführt. Hierbei wurde Cytochalasin B den Kulturen 24 Stunden vor Abbruch zugegeben, so daß nur noch Kernteilungen, nicht aber Zellteilungen erfolgten. Für die Auswertung wurden nur zweikernige Zellen berücksichtigt.

2.3.2.1 Ansetzen der Blutkulturen

In Blutkulturröhrchen wurden 300 µl heparinisertes Blut zu 3 ml Chromosomenmedium 1A (2 % PHA) gegeben. Wurde mit einer Testsubstanz behandelt, erfolgte die Zugabe direkt in die angesetzte Blutkultur. Die gesamte Kultivierungsdauer betrug 68 Stunden bei 37° C in verschlossenen Röhrchen. Nach 44 Stunden wurden 6 µg/ml Cytochalasin B zu den Kulturen gegeben. Für den Mikronukleus-Test mit isolierten Lymphozyten mußten Lymphozyten aus 3 ml Blut über einen Ficoll-Gradienten isoliert und dann zu 3 ml Medium gegeben werden.

2.3.2.2 Präparation

Die Präparation wurde im wesentlichen in Anlehnung an FENECH und MORLEY (1985) durchgeführt. Die Zellen wurden bei 800 U/min abzentrifugiert und der Überstand zur Hälfte abgenommen. Darauf folgte die Hypotoniebehandlung zum Aufquellen der Zellen durch tropfenweise Zugabe von 1,5 ml eiskalter 0,56 %iger KCl. Die Zellen wurden dann sofort abzentrifugiert (800 U/min, 10 min) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in eine Plastik-Transferpipette aufgenommen, die Röhrchen mit 5 ml der eiskalten 1. Fixierungslösung (Methanol : Eisessig = 5 : 1 + gleicher Anteil 0,9 % NaCl) gefüllt und das Zellpellet dann zugegeben. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Fixierungsschritt wiederholt, die 1. Fixierungslösung wurde allerdings durch die eiskalte 2. Fixierungslösung (Methanol : Eisessig = 5 : 1) ersetzt. Insgesamt wurde dreimal mit der 2. Fixierungslösung fixiert, dabei wurde das letzte Fixativ nach dem Abzentrifugieren so weit wie möglich abgesaugt. Die verbliebene Zellsuspension wurde vorsichtig auf trockene Objektträger aufgebracht, so daß das Zytoplasma erhalten blieb, und diese wurden zum Trocknen bei Raumtemperatur in der Waagerechten belassen. Es wurden pro Ansatz mindestens zwei Objektträger hergestellt.

2.3.2.3 Färbung und Auswertung der Präparate

Zur Anfärbung wurden die Präparate 10 - 15 Sekunden in einer Acridinorangelösung (125 µg/ml) gefärbt und anschließend in PBS gründlich gespült, bevor sie mit einem Deckglas eingeckt wurden. Die Auswertung erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung (Anregungsfilter: BP 450 - 490 nm, Sperrfilter: LP520 nm). Pro Ansatz wurden 1000 zweikernige Zellen ausgezählt. Mikronukleushaltige Zellen waren nur diejenigen, die neben einem Mikronukleus zwei ähnlich große Zellkerne besaßen und keine Plasmabrücke zwischen Zellkern und Mikronukleus aufwiesen. Der Mikronukleus sollte nicht größer als ein Drittel des Zellkerns sein. Es ist jeweils die Anzahl der mikronukleihaltigen Zellen pro 1000 ausgewerteter Zellen angegeben.

2.3.2.4 Bestimmung des Proliferationsindex

Der Poliferationsindex (nuclear division index, NDI) wurde durch Auswertung von 500 Zellen bestimmt. Er setzt sich aus dem Anteil ein-, zwei-, drei- und vierkerniger Zellen zusammen. Der NDI wird wie folgt berechnet:

$$\text{NDI} = \frac{1x (\text{Zellen mit einem Kern}) + 2x (\text{Zellen mit 2 Kernen}) + 3x (\text{Zellen mit 3 Kernen}) + 4x (\text{Zellen mit 4 Kernen})}{\text{Anzahl ausgewerteter Zellen}}$$

2.3.3 HPRT-Mutagenitätstest an T-Lymphozyten (T-Zellen-Klonierung)

Der HPRT-Mutagenitätstest dient dem Nachweis von Genmutationen in Säugerzellen. Durch die Verwendung von T-Lymphozyten können in vivo entstandene, somatische Mutationen am Menschen untersucht werden. Der T-Zellen-Klonierungs-Test läßt sich auf ALBERTINI et al. (1982) und MORLEY et al. (1983) zurückführen. Allgemein läßt sich der HPRT-Mutagenitätstest in drei Phasen unterteilen. In der ersten Phase wird ein Schaden induziert. Dieses kann durch Inkubation mit einem Schadstoff in vitro erfolgen, oder durch eine Schadensinduktion in vivo. In der anschließenden Expressionsphase können Mutagen-induzierte DNA-Läsionen repariert werden, oder sich als Mutation manifestieren. Desweiteren wird noch vorhandenes HPRT-Enzym sowie HPRT-mRNA in diesem Zeitraum abgebaut. Als dritte Phase schließt sich die Selektionsphase an. Als selektives Agens dient 6-Thioguanin. 6-TG, eine zytotoxische Substanz, wird vom HPRT-Enzym im Purin-Salvage-Pathway verwertet. HPRT profiziente Zellen sterben unter diesen selektiven Bedingungen ab, während Zellen, die HPRT defizient sind, zu

Klonen heranzuwachsen. Die Phase der Schadensinduktion ebenso wie die Expressionsphase findet bei dem hier beschriebenen T-Zellen-Klonierungstest in vivo statt. Erst die dritte Phase, der Selektionsschritt, erfolgt in vitro. Für die Selektionsphase wird venöses Vollblut entnommen und die Lymphozyten werden isoliert. Diese können mit PHA stimuliert und in Mikrotiterplatten unter Verwendung weiterer Wachstumsfaktoren zum klonalen Wachstum angeregt werden. Die Selektionszeit kann zwischen 10 - 25 Tagen betragen. Sie sollte so gewählt werden, daß gut sichtbare Klone heranwachsen können. Diese können dann für die molekulare Analyse der Mutation verwendet werden. In Abbildung 10 ist ein schematischer Ablauf des T-Zellen-Klonierungstests zu sehen.

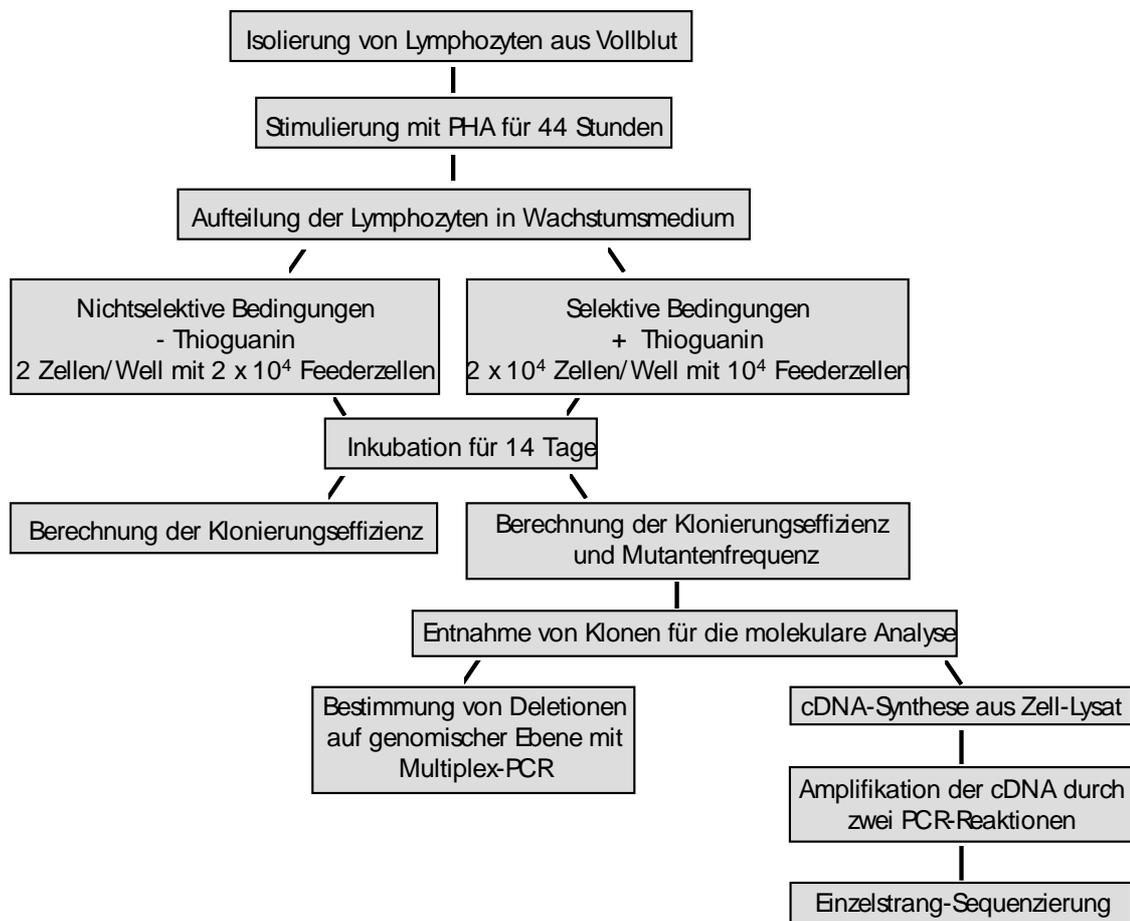


Abbildung 10: Schematische Darstellung des T-Zellen-Klonierungstests und anschließender molekularer Charakterisierung der HPRT-defizienten Lymphozyten.

2.3.3.1 Präparation der Wachstumsfaktoren (TCGF = T-cell-growth-factor)

Für das klonale Wachstum der Lymphozyten wurden im Rahmen dieser Arbeit Wachstumsfaktoren nach der Methode von HOU et al. (1995a) hergestellt. Es wurden 3×10^6 TK6-Zellen abzentrifugiert und im Basismedium auf 3×10^6 Zellen/ml eingestellt. Die Wachstumsinaktivierung erfolgte durch Bestrahlung mit 40 Gy. Gleichzeitig wurden die Lymphozyten eines Buffy coats (aus 500 ml Vollblut) über einen Ficoll-Gradienten isoliert, mit PBS gewaschen und im Basismedium auf 3×10^6 Zellen/ml eingestellt. Diese Zellen wurden zur Mitogenstimulierung mit 10 Gy bestrahlt. Die bestrahlten TK6-Zellen und Lymphozyten wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und die Zellzahl mit Basismedium und FKS (2 % Endkonzentration) auf 5×10^5 je Zelltyp eingestellt. Nach der Zugabe von 1 % PHA erfolgte die Inkubation bei 37 °C für 72 Stunden, wobei die Flaschen täglich bewegt wurden. Nach 72 Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert (1500 U/min, 30 Minuten). Von dem Überstand wurden 10 ml sterilfiltriert und getestet, der Rest bei -20 °C bis zum Testergebnis tiefgefroren. Bei guter Qualität des TCGF konnte der gesamte Überstand sterilfiltriert, aliquotiert und bei -70 °C tiefgefroren werden.

2.3.3.2 TCGF-Test

Um die TCGF-Konzentration zu ermitteln, die im T-Zellen-Klonierungstest zu einem optimalen Wachstum führt, wurden verschiedene TCGF-Konzentrationen in einem Vorversuch ausgetestet. In isolierten Lymphozyten, die mit PHA für drei Tage stimuliert worden waren, konnte eine Abhängigkeit von TCGF induziert werden, indem sie fünf Tage auf TCGF-haltigem Medium kultiviert wurden. Danach wurden sie aliquotiert und tiefgefroren.

Diese Zellen wurden für den TCGF-Test aufgetaut, mit PBS gewaschen und in Normalmedium auf eine Zellzahl von 10^5 Zellen/ml eingestellt. Die Zellen wurden dann auf 96er Mikrotiterplatten ausgesät. Die Zellzahl betrug 10^4 Zellen je Well (200 µl) und enthielt unterschiedliche TCGF-Konzentrationen. Nach 4 - 7 Tagen erfolgte die mikroskopische Auswertung und Zellzählung. Die TCGF-Konzentration, die zu gutem Wachstum der Zellen führte, wurde in dem T-Zellen-Klonierungstest eingesetzt. Für die Versuche in dieser Arbeit konnte durch Zusatz von 15 % TCGF ein optimales Wachstum erreicht werden.

2.3.3.3 Lymphozytenisolierung für den T-Zellen-Klonierungstest

Jedem Probanden wurden 40 ml heparinisiertes Vollblut durch Venenpunktur abgenommen. Nach einer 1:1 Verdünnung des Blutes mit PBS erfolgte die Auftrennung der Lymphozyten über einen Ficoll-Dichtegradienten. Danach wurden die

Zellen zweimal mit PBS gewaschen, gezählt und mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml in Basismedium für 44 Stunden in einer Kulturflasche inkubiert. Zur Stimulierung der Lymphozyten wurde dem Medium 0,3 % PHA zugesetzt. Während dieser Zeit hefteten sich Monozyten und Granulozyten an den Flaschenwänden an. Nach 44 Stunden wurden die Zellen abzentrifugiert, in Basismedium aufgenommen, die Lebensfähigkeit mit Trypanblau bestimmt und die stimulierten Zellen gezählt. Die Zellen wurden dann auf eine Zellzahl von 2×10^5 Zellen/ml eingestellt. Diese Verdünnung erfolgte mit U/MINI 1640-Medium und den Wachstumsfaktoren. Die Endkonzentration der Wachstumsfaktoren betrug 5 % FKS, 5 % Humanserum, 15 % TCGF, 0,3 % PHA und 2 U/ml Interleukin-2 (Wachstums- oder Klonierungs-medium).

2.3.3.4 Feederzellen

In den Mikrotiterplatten zur Ermittlung der Klonierungseffizienz wurden jeweils nur zwei Zellen/Well eingesetzt. In diesen Platten wurden nicht teilungsfähige Zellen als Feederzellen verwendet, um ein Wachstum bei der geringen Zelldichte zu ermöglichen. Die lymphoblastoide Zelllinie RJK 853 wurde in Basismedium kultiviert. Direkt vor Beginn der Selektionsphase wurden die Zellen gezählt, auf 10^6 Zellen/ml mit Basismedium eingestellt und mit 40 Gy bestrahlt. Die Feederzellen wurden dann entweder in einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml tiefgefroren oder direkt verwendet. Wurden tiefgefrorene Feederzellen eingesetzt, mußten die Zellen nach dem Auftauen zweimal in PBS gewaschen und dann auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt werden.

2.3.3.5 Zellkonzentrationen für das Wachstum unter nicht selektiven Bedingungen (-TG)

Es wurden zwei 96er Multiwell-Platten für die Bestimmung der Klonierungsfrequenz verwendet. Für jede der Platten wurden 2 ml der Feederzellsuspension mit 18 ml Wachstumsmedium verdünnt. Die Lymphozytensuspension (2×10^5 Zellen/ml) wurde in zwei Schritten auf 1×10^3 Zellen/ml in Basismedium verdünnt. Aus dieser Suspension wurden 200 μ l zu den 20 ml Wachstumsmedium mit Feederzellen gegeben. Die Konzentration der Lymphozyten betrug dann 10 Zellen/ml und 10^5 Feederzellen/ml. In Vorversuchen wurden 1 Zelle/Well und 2 Zellen/Well ausgesät. Für 1 Zelle/Well erfolgte die letzte Verdünnung mit 100 μ l Zellsuspension in 20 ml Wachstumsmedium.

2.3.3.6 Zellkonzentrationen für Wachstum unter selektiven Bedingungen (+TG)

Die Feederzellen wurden auf 10^5 Zellen/ml mit Wachstumsmedium verdünnt. Die restlichen Lymphozyten wurden 1 : 2 mit der Feederzellsuspension verdünnt. Die Zellkonzentrationen waren für Lymphozyten 10^5 Zellen/ml und für Feederzellen 5×10^4 Zellen/ml.

2.3.3.7 Bestimmung der Klonierungsfrequenz unter selektiven und nicht selektiven Bedingungen

Für die Selektionsphase wurden jeweils 200 μ l pro Well in 96er Multiwell-Platten ausgesät. Es wurden zwei Platten ohne Thioguanin ausplattiert und die restlichen Zellen wurden unter Zugabe von Thioguanin verteilt. Die Platten eines jeden Probanden wurden zum Schutz gegen Verdunstung in Frischhaltefolie locker eingewickelt und für 12 Tage bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte mit einem Umkehrmikroskop. Es wurden die Wells, in denen Klone erkennbar waren, als positive Wells gezählt. Die Klonierungseffizienz (CE) wurde in Anlehnung an ALBERTINI et al. (1982) nach folgender Formel berechnet:

$$CE = \frac{-\ln(\text{negative Wells/gesamte Wells})}{\text{Zellzahl pro Well}}$$

Ebenso wurden die Klone in den Platten mit Thioguaninzugabe ausgewertet.

2.3.3.8 Bestimmung der Mutantenfrequenz

Der Quotient aus der Klonierungseffizienz unter selektiven Bedingungen (+TG) und unter nicht selektiven Bedingungen (-TG) ergibt die Mutantenfrequenz.

$$MF = \frac{\text{CE in selektiven Platten (+TG)}}{\text{CE in nicht selektiven Platten (-TG)}}$$

2.3.3.9 Gewinnung der 6-Thioguanin resistenten Mutantenklone

Es wurden 10 - 15 Mutantenklone je Versuch für die molekulare Analyse entnommen, wobei die Auswahl zufällig erfolgte. Die Zellen wurden in Eppendorf Gefäßen abzentrifugiert, einmal mit PBS gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -70°C eingefroren.

2.3.4. Direkte Sequenzierung der amplifizierten HPRT-cDNA

Durch Modifikation etablierter Methoden ist es möglich, aus wenigen Zellen genügend cDNA für die Sequenzierung herzustellen. Hierbei entfällt das zeit- und materialaufwendige Expandieren HPRT-defizienter Mutantenklone zur RNA-Isolierung. Die Amplifikation der cDNA verläuft in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird ausgehend von der in den Zellpellets enthaltenden mRNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase (RT) die komplementäre cDNA hergestellt. Die neusynthetisierte cDNA wird in einem zweiten Schritt, der eigentlichen PCR-Reaktion, amplifiziert. Dieses amplifizierte PCR-Produkt des HPRT-Gens dient als Template für die Sequenzierung. Die Synthese der cDNA erfolgte direkt aus dem Zellpellet. Durch den für die Synthese verwendeten cDNA-Cocktail wurden die Zellen lysiert, zur RNase-Inhibition wurde RNasin zugegeben. Die HPRT-cDNA wurde mit dem Primer Y3SH oder cD3 synthetisiert. Beide Primer binden in der nicht-translatierten Region auf der 3'-Seite des Stoppcodons. Der Primer cD3 liegt weiter von der translatierten Region entfernt und ermöglicht somit, daß nach den folgenden PCR-Reaktionen die gesamte Sequenz des translatierten Bereichs gelesen werden kann. Die Sequenz des menschlichen HPRT-Gens sowie die Lage der wichtigsten verwendeten Primer sind in Abbildung 11 dargestellt. Die Amplifikation der cDNA fand in zwei aufeinanderfolgenden PCR-Reaktionen mit internen (nested) Primerpaaren statt. Dadurch wurde eine spezifische Anreicherung der HPRT-cDNA erreicht. Die erste PCR-Amplifikation erfolgte entsprechend dem Primer der cDNA-Synthese mit den Primerpaaren C5SH/Y3SH oder H5N/H3N. In der zweiten PCR-Reaktion wurden die Primerpaare C5N/C3 oder C5N/C3N eingesetzt. Der Primer C5N lag biotinyliert vor. Zwischen Biotin und Streptavidin besteht eine hohe Affinität. Mit Hilfe kleiner, an Streptavidin gekoppelter Magnetkügelchen (Dynabeads) werden biotinylierte PCR-Produkte magnetisch in einem Magnetständer fixiert. Die so fixierten PCR-Produkte werden gereinigt, denaturiert und stehen dadurch als einzelsträngige Templates in der sogenannten „Festphasen-Sequenzierung“ zur Verfügung.

Die Sequenzierung erfolgte enzymatisch in Anlehnung an das von SANGER und Mitarbeitern (1977) entwickelte Verfahren. Durch Zugabe von Didesoxy-Nukleotiden werden in Primer-Extensionsreaktionen basenspezifisch Kettenabbrüche herbeigeführt. So entsteht in jedem Reaktionsansatz eine Mischung aus doppelsträngigen DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge mit einem terminalen Didesoxynukleotid, das jeweils das korrespondierende Desoxynukleotid der Originalsequenz repräsentiert. Die Detektion kann entweder über radioaktive Markierung oder durch die Verwendung fluoreszierender Sequenzprimer erfolgen. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Reaktionsprodukte in vier, nach den jeweiligen ddNTPs getrennten Spuren, kann die

Abfolge, nach der die Didesoxynukleotide an die Primersequenz geheftet wurden, anhand der sukzessiv größer werdenden Fragmente in den vier Spuren abgelesen werden.

2.3.4.1 Direkte cDNA-Synthese aus Zellpellets

Die direkte cDNA-Synthese erfolgte in Anlehnung an ÖSTERHOLM et al. (1995) mit Modifikationen. Es wurden Zellpellets (6000 Zellen) eingesetzt, zweimal in eiskaltem PBS-Puffer gewaschen (13000 U/min, 5 min) und dann in 20 µl cDNA-Cocktail resuspendiert. In abgewandelter Form wurden die Zellen vor dem Tieffrieren nicht gezählt. In diesem Fall wurde das gesamte Zellpellet in 200 µl eiskaltem PBS-Puffer resuspendiert und 50 µl für die cDNA-Synthese abgenommen und wie oben beschrieben behandelt. Die restlichen 150 µl wurden abzentrifugiert und als Zellpellet wieder tiefgefroren. Der cDNA-Cocktail enthielt 1,6 µM des Primers Y3SH für radioaktive Sequenzierung und cD3 für die automatische Sequenzierung auf dem *Alfexpress*. Nach Resuspension des gewaschenen Zellpellets in dem cDNA-Cocktail wurde der Ansatz für eine Stunde bei 37°C inkubiert und dann bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.4.2 Erste PCR-Amplifikation

Das Gesamtvolumen des PCR-Ansatzes betrug 50 µl und bestand aus:

5 µl	cDNA-Cocktail als Template
10 %	10 x Puffer für 1. und 2. PCR
je 0,2 mM	dNTPs
je 0,4 µM	Primer (C5SH/Y3SH oder H5N/H3N)
1 U	Taq-Polymerase und x µl H ₂ O

Die PCR-Reaktion wurde in einem DNA-Thermocycler PTC 100 durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde für 5 Minuten auf 94 °C erhitzt. Insgesamt wurden 30 Zyklen (94 °C, 45 Sekunden; 50 °C, 45 Sekunden; 72 °C, 2 Minuten) durchlaufen. Nach dem letzten Zyklus schloß sich eine Inkubation von 7 Minuten bei 72 °C an. Nach der ersten PCR-Amplifikation konnte aufgrund der geringen Menge noch keine Bande in einem Agarosegel nachgewiesen werden.

2.3.4.3 Zweite (nested) PCR-Amplifikation

Die zweite PCR-Reaktion lief unter den gleichen Bedingungen wie die erste Amplifikation ab. Als Template wurden 5 µl des 1. PCR-Produktes eingesetzt. Abweichend von der ersten PCR wurden die Primerpaare C5N/C3 sowie C5N/C3N auf eine Endkonzentration von 0,2 µM eingestellt. Der Primer C5N lag biotinyliert vor.

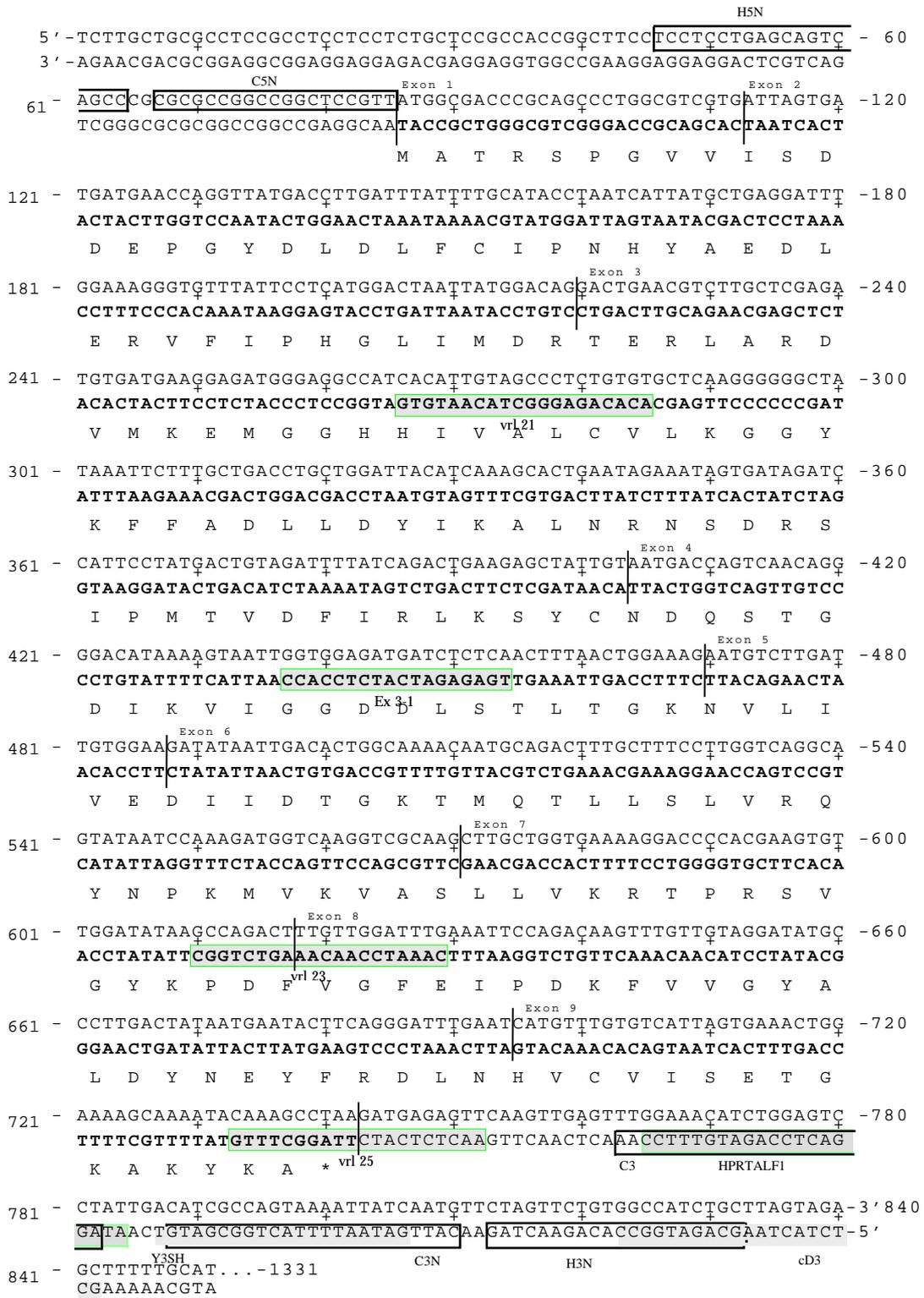


Abbildung 11: Darstellung der cDNA-Sequenz des HPRT-Gens und der zugehörigen Aminosäure-Sequenz des HPRT-Proteins (JOLLY et al., 1983). Eingezeichnet sind außerdem die Grenzen der Exons (vertikale Striche) und Bindungsstellen der Primer (Boxen).

2.3.4.4 Gelelektrophoretische Auftrennung des zweiten PCR-Produktes

Es wurden 10 µl des PCR-Produktes mit 5 µl Bromphenolblau gemischt und auf ein einprozentiges Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 50 Minuten bei 80 Volt. Das Gel wurde dann unter UV-Licht ausgewertet und photographiert (Abbildung 12).

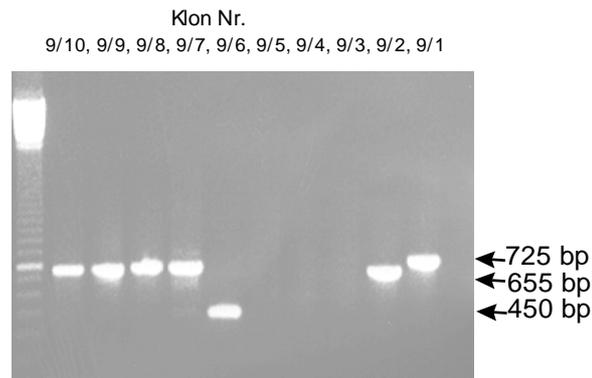


Abbildung 12: Gelelektrophoretische Darstellung der in zwei PCR-Reaktionen amplifizierten HPRT-cDNA von 10 Klonen. In den Spuren 9/6 und 9/2 sind verkürzte Produkte sichtbar.

2.3.4.5 Aufreinigung der PCR-Produkte für die radioaktive Sequenzierung

Die PCR-Produkte, die eine deutliche cDNA-Bande im Gel zeigten, wurden mit Dynabeads isoliert. Hierfür wurden pro PCR-Produkt 12 µl Dynabeads mit 100 µl Triton-Wasch-Lösung (TWS) gewaschen. Der Überstand konnte nach Fixieren der Magnetpartikel im Magnetständer abgenommen werden. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt, danach wurden die Dynabeads in 12 µl TE resuspendiert. Die Bindung des PCR-Produktes an die Dynabeads erfolgte unter definierter Salzkonzentration, indem 45 µl des PCR-Produktes mit 12 µl gereinigten Dynabeads und 5 x SSPE-Endkonzentration für eine Stunde bei Raumtemperatur gemischt wurden. Der biotinylierte Strang bindet in dieser Reaktion an die Dynabeads. Zum Auswaschen der nicht-biotinylierten DNA wurde nach der Inkubation dreimal mit je 200 µl TWS-Lösung im Magnetständer gewaschen und der Überstand verworfen. Zur Denaturierung der an Dynabeads gekoppelten doppelsträngigen DNA wurde das Pellet mit 20 µl Denaturierungslösung resuspendiert und für fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Danach

konnte der Überstand erneut abgenommen und das im Magnetständer verbleibende Pellet zweimal mit TWS-Lösung gewaschen werden. Die so gereinigte, einzelsträngige, an Streptavidin gekoppelte DNA wurde in 10 µl TE aufgenommen und bis zur Sequenzierung für maximal eine Woche bei 4°C aufbewahrt.

2.3.4.6 Radioaktive Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mit T7-Polymerase, Puffern und dNTP-Mix („short Mix) der Firma Pharmacia nach Angaben des Herstellers. Die Reaktion kann in zwei Abschnitte unterteilt werden, in die Markierungsreaktion, in der $\alpha^{35}\text{S}$ -ATP für die Markierung eingesetzt wurde, und die Terminationsreaktion. Es wurden für die Sequenzierung die vier Primer vrl25, vrl23, Exon3-1 und vrl21 verwendet. Für die Markierungsreaktion wurden zum Primerannealing 10 µl der PCR-Aufreinigung mit 2 µl Primer und 2 µl Annealing-Puffer gemischt und für zehn Minuten auf 60°C erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden zu diesem Ansatz T7-Polymerase (3 Units), Labelling-Mix dATP, $\alpha^{35}\text{S}$ -ATP (10 µCi) und Aqua dest. ad 20 µl pipettiert. Die Ansätze wurden gemischt und zur Markierung fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden je 4,5 µl der Synthesereaktion auf vier Ansätze verteilt, die jeweils 2,5 µl dNTP/ddNTP-short-Mix enthielten. Jeder der Ansätze enthielt ein anderes modifiziertes Nukleotid (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Wird in den DNA-Strang ein Didesoxynukleotid eingebaut, kommt die Synthesereaktion zum Stillstand, es werden so statistisch verteilt Kettenabbrüche herbeigeführt. Diese Terminationsreaktion erfolgte für fünf Minuten bei 37 °C und wurde durch Zugabe des Stoppuffers (5 µl) beendet.

2.3.4.7 Sequenz-Gelelektrophorese und Autoradiographie

Die Auftrennung der Sequenzprodukte erfolgte in einem denaturierenden Acrylamidgel (6%, 8 M Harnstoff, 1 x TBE-Puffer, 0,4 mm stark). Die Vorlaufzeit des Gels zum Erreichen der gewünschten Geltemperatur von 55°C betrug 15 - 45 Minuten bei 1500 - 1900 Volt. Die Sequenzprodukte wurden bei 90°C für drei Minuten denaturiert. Nach Abscheiden der biotinylierten Primer im Magnetständer erfolgte der Auftrag auf das Gel für jeden Primer vierspurig, wobei die Nukleotide in der Reihenfolge A-C-G-T aufgetragen wurden. Die Elektrophorese lief über 4 - 5 Stunden bei 1500 - 1900 Volt. Nach der Elektrophorese wurden die Glasplatten getrennt, das Gel auf Whatman 3 MM Papier übertragen und im Gelrockner getrocknet. Zur Autoradiographie wurde ein

Röntgenfilm aufgelegt. Die Expositionszeit betrug 3 Tage. In Abbildung 13 ist der Ausschnitt eines derartigen Röntgenfilms zu sehen.

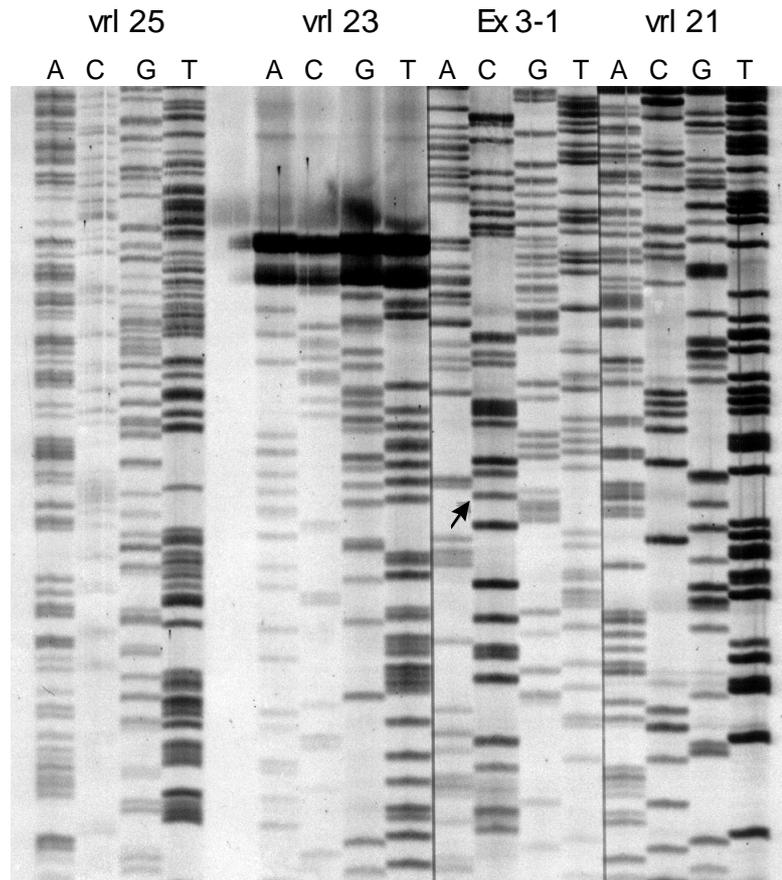


Abbildung 13: Ausschnitt aus einem HPRT-Sequenzfilm. Es sind die vier Nucleotidspuren für jeden Primer zu sehen. Der Pfeil zeigt auf eine GC < CG Transversion in Position 293.

2.3.4.8 Aufreinigung der PCR-Produkte und Sequenzreaktion für die automatische Sequenzierung

Für jede Probe wurden 20 µl Dynabeads mit 20 µl B/W-Puffer gewaschen. Nach dem Abscheiden im Magnetständer erfolgte die Resuspendierung der Dynabeads in 40 µl B/W-Puffer und daran schloß sich eine 15-minütige Inkubation der Dynabeads mit 40 µl des PCR-Produktes an. Danach wurde wiederum mit 40 µl B/W-Puffer gewaschen, worauf eine Inkubation von 5 Minuten mit 8 µl 0,1 M NaOH folgte. Nach der Denaturierung wurde in drei aufeinanderfolgenden Waschschritten mit 50 µl 0,1 M NaOH, 50 µl B/W-Puffer und 50 µl TE gewaschen. Die so gereinigte, einzelsträngige und an Dynabeads gebundene DNA wurde in 13 µl H₂O gelöst.

Die Sequenzierung erfolgte mit dem *ALFexpress* AutoRead Sequencing Kit der Firma Pharmacia entsprechend den Angaben des Herstellers. Die Reaktion wurde analog der radioaktiven Methode durchgeführt, abweichend wurden 13 µl Template eingesetzt, der Sequenzierprimer war Cy5'-markiert und die Konzentration der Taq-Polymerase während der Synthesereaktion betrug 6 Units.

2.3.4.9 ALFexpress Acrylamid-Gel und Elektrophorese

Es wurde ein 0,5 mm Hydrolink-Long Ranger Gel verwendet. Zur Herstellung von 60 ml Gelmatrix wurden 21,7 g Harnstoff mit 6,6 ml Long Ranger (50 %) und 9 ml 10 x TBE gemischt. Nach dem Auffüllen auf 60 ml mit Aqua bidest. wurde die Lösung filtriert, entgast und die Polymerisation durch Zugabe von 300 µl 10 % Ammoniumpersulfat und 30 µl TEMED gestartet.

Die Elektrophorese erfolgte in 1,5 x TBE. Nach Aufheizen des Gels auf 55 °C erfolgte der Auftrag der für 3 Minuten bei 80 °C denaturierten Proben in der Reihenfolge A-C-G-T. Das Gel lief 15 Stunden bei 1500 V und 58 mA. Die Auswertung wurde mit AlfinTM Version 1.00 durchgeführt.

2.3.5 Multiplex PCR aus Zell-Lysat

Die vollständige Sequenzierung des menschlichen HPRT-Gens (EDWARDS et al., 1990) hat es ermöglicht, daß mit Primern, die beidseits der Exons im Intronbereich binden, alle 9 Exons mit der PCR amplifiziert werden können. Aufgrund ihrer Nähe zueinander können Exon 7 und 8 nur als ein Amplifikationsprodukt erfaßt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden nach den Angaben von GIBBS et al. (1990) und EDWARDS et al. (1990) synthetisiert. Fehlende Amplifikationsprodukte oder Amplifikationsprodukte mit veränderter Größe deuten auf Deletionen oder Rearrangements im HPRT-Gen hin. Die Struktur des HPRT-Gens mit den Amplifikationsprodukten der Multiplex sind in Abbildung 14 dargestellt.

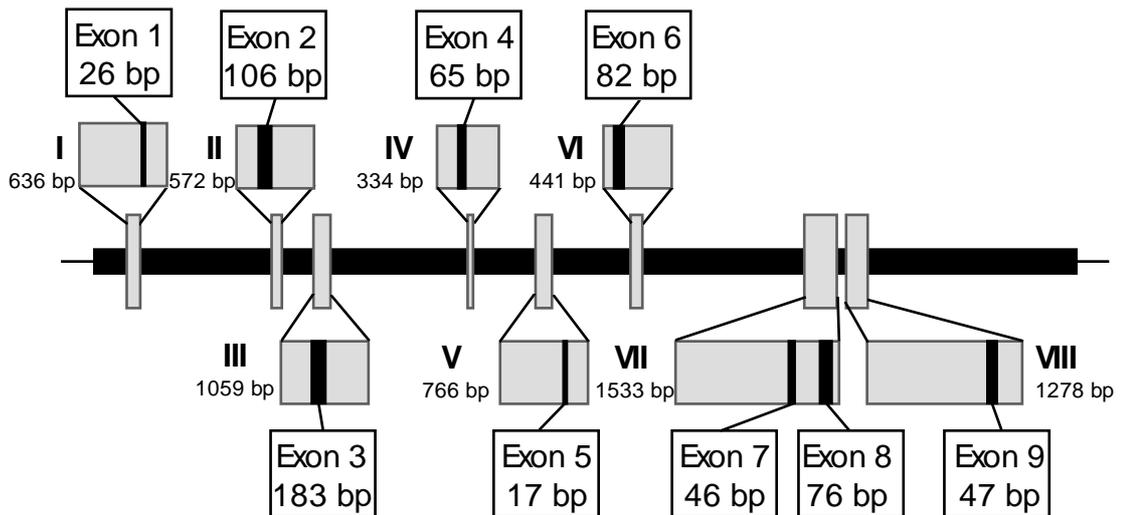


Abbildung 14: Struktur des humanen HPRT-Gens. Dargestellt sind die Amplifikationsprodukte I bis VIII (helle Banden) mit ihren Größen sowie die Lage und Größe der zugehörigen Exons 1 bis 9 (dunkle Banden).

Bei der Verwendung von isolierter DNA können alle 8 Exons in einer Reaktion amplifiziert werden. Multiplex-PCR aus Zell-Lysat hingegen kann bei wenig Zellen als Ausgangsmaterial angewendet werden und macht die Expansion der Mutantenklone überflüssig. Hierbei wurden die kurzen und die langen Fragmente in separaten Reaktionsansätzen amplifiziert (ÖSTERHOLM et al., 1995).

2.3.5.1 Herstellung des Zell-Lysats

Es wurden tiefgefrorene Zellpellets verwendet. Die Zellen wurden in 100 µl eiskaltem PBS resuspendiert, 50 µl für die Multiplex-PCR abgenommen und beide Fraktionen dann sofort abzentrifugiert (13000 U/min, 5 min). Die Zellpellets der verbliebenen 50 µl wurden wieder tiefgefroren, für die anderen Zellen wurde der Waschschritt mit PBS wiederholt, bevor die Zellen in 200 µl 2 x Lysispuffer mit Proteinase K bei 56°C für eine Stunde inkubiert wurden. Die Inaktivierung der Proteinase K erfolgte danach bei 96°C für 10 Minuten. Das so erhaltene Zell-Lysat konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt werden.

2.3.5.2 Multiplex-PCR-Amplifikation

Die Amplifikation erfolgte mit je 8 µl Zell-Lysat in getrennten Reaktionsgefäßen für die kurzen und die langen Fragmente. Der PCR-Ansatz bestand aus

50 %	2 x Puffer für Multiplex PCR
10 %	DMSO
je 1,5 mM	dNTPs

Außerdem wurden 4 Units Taq-Polymerase und folgende Konzentrationen der jeweils 8 Primer für die kurzen oder langen Fragmente benutzt:

<u>kurze Fragmente</u>		<u>lange Fragmente</u>	
Exon 1	25 pmol	Exon 3	8 pmol
Exon 2	5 pmol	Exon 5	12 pmol
Exon 4	5 pmol	Exon 7/8	12 pmol
Exon 6	8 pmol	Exon 9	10 pmol

Die Multiplex-PCR-Amplifikation wurde mit einem hot start (94°C) für 5 Minuten gestartet und umfaßte 33 Zyklen (1 Minute 94°C; 1,5 Minuten 60°C und 2 Minuten 70°C). Nach dem letzten Zyklus wurden die Ansätze 7 Minuten bei 72°C inkubiert und anschließend auf 4°C heruntergekühlt.

2.3.5.3 Gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikationsprodukte

Es wurde eine Elektrophorese in einem 1 %igen Agarose-Gel durchgeführt. Es wurden entweder zu 10 µl des amplifizierten Produktes wurden 5 µl BPB-Lösung pipettiert und in die Geltaschen gegeben, oder je 10 µl der Amplifikationsprodukte der kurzen und langen Fragmente eines Klons gemischt, mit BPB-Lösung versetzt und gemeinsam auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese lief 1 Stunde bei 80 Volt. Danach wurde das Gel unter UV-Licht photographiert (Abbildung 15).

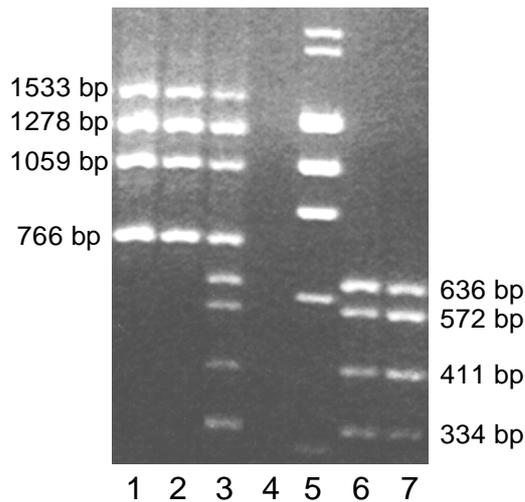


Abbildung 15: Gelelektrophoretische Darstellung der Multiplex-PCR-Produkte des menschlichen HPRT-Gens. In Spur 1 und 2 sind die Amplifikationsprodukte der langen Fragmente aufgetragen, in Spur 3 erfolgte ein gemeinsamer Auftrag aller Amplifikationsprodukte. Spur 4 enthält die Negativkontrolle und in den Spuren 6 und 7 sind die kurzen Fragmente dargestellt. Der Längenstandard ist in Spur 5 aufgetragen.

2.3.6 GST-Genotypisierung

Die für diese Arbeit untersuchten Polymorphismen in den Genen GSTM1 und GSTT1 sind auf eine Deletion des Gens zurückzuführen. Es ist daher möglich durch PCR-Amplifikation den Polymorphismus zu detektieren, wenn die Deletion homozygot vorliegt. Heterozygote können durch diese Methode nicht von Probanden, die homozygot für das Normalallel sind, unterschieden werden. Die verwendeten Primer binden für das GSTM-Gen im Intron 4 sowie im Exon 5 und für das GSTT-Gen in dem 3' Bereich der kodierenden Sequenz.

2.3.6.1 Isolierung der DNA aus Blut

Für die DNA-Isolierung mit Chelex 100 reichten 5 - 10 µl Blut, das aus der Fingerbeere entnommen wurde. Das Blut wurde unter Mischen 15 - 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 1,5 ml sterilem H₂O inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren (13000 U/min, 3 Minuten) wurde der Überstand bis auf 30 µl verworfen. Das Pellet wurde mit 270 µl Chelex 100 (5 %, frisch angesetzt) resuspendiert und für bei 56°C inkubiert (15 - 30 Minuten). Nachdem die Proben dann gut gemixt wurden (5 - 10 Sekunden), erfolgte eine Inkubation bei 98°C für 8 Minuten. Nach erneutem Mixen wurde die Probe wieder abzentrifugiert. Der erhaltene Überstand konnte dann als Template in die PCR

eingesetzt werden. Die restliche Probe konnte im Kühlschrank aufbewahrt werden, mußte vor weiterer Verwendung allerdings erneut gemixt und abzentrifugiert werden.

2.3.6.2 GSTM1/GSTT1-PCR

Die Amplifikation für GSTM1 und GSTT1 erfolgte in einer Reaktion. Als Template wurden 20 µl der im Chelex 100-Überstand gelösten DNA eingesetzt und das Endvolumen des Ansatzes betrug 50 µl. In dem Ansatz waren desweiteren enthalten:

10 %	10 x Puffer für GST-PCR
je 0,2 mM	dNTPs
je 0,4 µM	Primer
2,5 U	Taq-Polymerase

Die PCR-Reaktion wurde in einer PTC 100-Maschine für 5 Minuten auf 94°C gestartet, insgesamt erfolgte die Amplifikation in 33 Zyklen (94°C, 20 Sekunden; 58 °C, 30 Sekunden; 72°C, 30 Sekunden). An den letzten Zyklus schloß sich eine Inkubation bei 72°C für 7 Minuten an, bevor auf 4°C heruntergekühlt wurde.

2.3.6.3 Gelelektrophoretische Auftrennung

Die Auftrennung erfolgte in einem 1 % Agarose-Gel. Es wurden 20 µl Amplifikationsprodukt mit 5 µl Blaumarker versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte für 40 Minuten bei 80 Volt. Das Gel wurde anschließend unter UV-Licht photographiert (Abbildung 16). Die PCR wurde bei dem Genotyp GSTM1-negativ/GSTT1-negativ wiederholt.

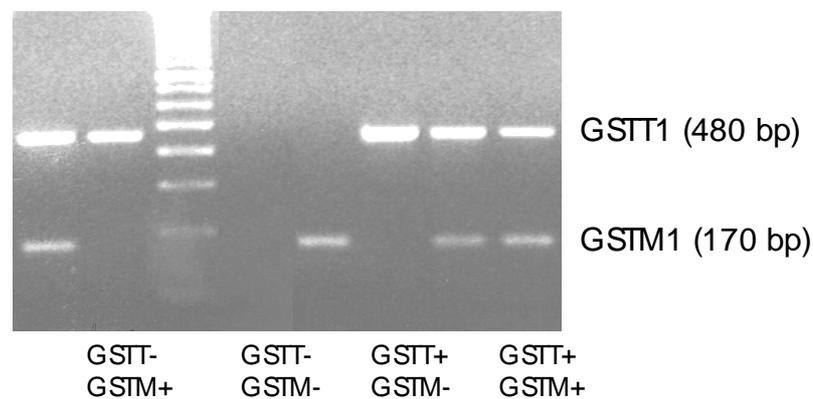


Abbildung 16: Gelelektrophoretische Darstellung der PCR-Produkte von verschiedenen GST-Genotypen.

2.3.7 Northern-Blot

Mit dem Northern Blotting wird der Gehalt einer spezifischen RNA untersucht. Die gesamte RNA wird der Größe nach auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Danach werden die RNA-Moleküle auf eine Nitrocellulose oder Nylon Membran übertragen, so daß ein genauer Abklatsch des Gels entsteht. Dieses Filter wird dann mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert. Nach dem Abwaschen der nicht gebundenen Sondenmoleküle wird das Filter auf einen Röntgenfilm gelegt und nach Entwicklung des Röntgenfilms erscheint die Lage eines RNA-Fragments, das komplementär zur Sonde ist, als Bande auf dem Film. Durch quantitative Auswertung kann so die Expression eines Gens untersucht werden.

2.3.7.1 RNA-Isolierung aus Blut

Die Isolierung der RNA erfolgte mit einem Kit der Firma QIAGEN entsprechend den Angaben des Herstellers. 1,5 ml Vollblut wurden zur Lyse der Erythrozyten mit 7,5 ml EL-Puffer 15 Minuten auf Eis inkubiert und währenddessen zweimal gemixt. Nach dem Abzentrifugieren (10 Minuten bei 1000 U/min) wurde das Pellet in 3 ml EL-Puffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde danach in 600 µl RTL-Puffer aufgenommen und auf die QIASchredder-Säulen gegeben. Nach dem Zentrifugieren (2 Minuten bei 14.000 U/min) wurde das Lysat mit 600 µl Ethanol (70%) gemischt, auf Rneasy mini Säulen gegeben und 15 Sekunden bei 14.000 U/min abzentrifugiert. Danach wurde die in den Säulen befindliche RNA mit 700 µl RW1-Puffer gewaschen und zweimal mit RPE-Puffer getrocknet, bevor die RNA in RNase freiem Wasser eluiert wurde. Das Eluat konnte bei -70°C aufbewahrt werden. Vor dem Einsatz im Northern-Blot wurde der RNA-Gehalt durch elektrophoretische Auftrennung in einem 0,8 %igen Agarosegel überprüft.

Die Isolierung von RNA aus isolierten Lymphozyten ermöglichte eine höhere Ausbeute. Abweichend von dem Protokoll für Vollblut wurden die Lymphozyten aus 10 ml Vollblut über einen Ficoll-Gradienten isoliert. Das Zellpellet konnte nach einmaligem Waschen in PBS in 350 µl RTL-Puffer aufgenommen und auf die QIASchredder-Säulen gegeben werden. Danach erfolgte die Aufarbeitung wie oben beschrieben.

2.3.7.2 Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA

Für die Elektrophorese wurde ein 2 %iges Agarosegel in DEPC-Wasser mit 1 % MOPS-Puffer und 2,2 M Formaldehyd hergestellt. Die RNA-Proben wurden in einer SpeedVac eingengt und dann mit 0,5 % SDS auf 4,5 µl aufgefüllt. Zu den Proben wurden

2 µl	10 x MOPS-Puffer,
3,5 µl	Formaldehyd,
10 µl	Formamid und
2 µl	Ladepuffer

gegeben. Als Marker diente eine RNA-Leiter, die außerdem mit 2,5 µl Ethidiumbromid-Lösung versetzt wurde. Alle Proben wurden vor dem Auftrag auf das Gel 15 Minuten bei 60°C denaturiert. Der Gellauf erfolgte in 1 x MOPS-Puffer in DEPC-Wasser bei 18 V über Nacht. Nach dem Gellauf wurde das Gel so photographiert, daß nur die Markerspuren dem UV-Licht ausgesetzt war.

2.3.7.3 Transfer der RNA auf das Filter (Northern Blot)

Vor dem Blotten erfolgte die alkalische Hydrolyse der RNA durch Inkubation des Gels in 50 mM NaOH/10 mM NaCl in DEPC-Wasser für 45 Minuten. Danach wurde das Gel kurz in DEPC-Wasser gespült und dann ebenso wie die Membran (Hybond N⁺) 15 Minuten in Transferpuffer äquilibriert. Der Northern Blot wurde aufgebaut wie folgt: Als Docht diente dickes Blotpapier, welches auf einer Glasplatte lag, so daß der Docht auf beiden Seiten in einer Schale mit dem Transferpuffer Kontakt hatte. Auf dem Docht lag je ein dickes und ein dünnes Blotpapier, welches mit Transferpuffer angefeuchtet wurde. Auf dieses Trägerfilterpapier wurde das Gel und darauf die Membran gelegt. Die Bereiche um Gel und Filter wurden mit Parafilm abgedeckt. Direkt auf die Membran wurden zwei Lagen dünnes Blotpapier für den Transfer und 10 Lagen saugfähiges Filterpapier gelegt und mit ca. 10 cm gestapelten Papierhandtüchern überdeckt. Der Northern-Blot-Aufbau wurde mit 3 kg beschwert und der RNA-Transfer erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Filter in 50 mM Naphosphatpuffer (pH 7,2) gewaschen und luftgetrocknet. Danach erfolgte UV-Crosslinking der RNA bei 254 nm für 5 Minuten je Filterseite. Das Filter konnte dann in Alufolie bei 4°C aufbewahrt werden.

2.3.7.4. Herstellung des PCR-Produktes für cDNA-Sonden

Es wurde RNA aus Vollblut wie unter 2.2.8.2. beschrieben isoliert. Mit dem Super Script II RT-Kit wurde cDNA durch „random priming“ hergestellt. Auf dieser cDNA wurde die PCR mit den Primern der jeweiligen Sonde durchgeführt. Es wurden 1 µl cDNA für den 50 µl PCR-Ansatz verwendet, der wie folgt zusammengesetzt war:

10 mM	Tris-HCl
50 mM	KCL
0,001 %	Gelatine
je 200 µM	dNTP
je 1 µM	der Primer für die jeweilige Sonde
x µl	H ₂ O.

Die PCR-Bedingungen waren: 5 Minuten, 94°C (1 Minute 94°C, 45 Sekunden 58 °C, 45 Sekunden 72°C) für 30 Zyklen, darauf folgten 10 Minuten bei 72°C und die PCR wurde bis zum Einsatz im TOPO-TA-Klonierungskit auf 4°C aufbewahrt.

2.3.7.5 Klonierung des PCR-Produktes

Um eine ausreichende Menge des PCR-Produktes zur Verwendung als Sonde zu erhalten, wurde das PCR-Produkt in ein Plasmid einkloniert und mit diesem Bakterien transformiert. Nach Vermehrung der Bakterien kann das Plasmid dann isoliert werden.

Allgemein liegt nach einer Transformation ein Gemisch aus transformierten Zellen ohne Plasmid, Zellen mit Vektor und Zellen mit rekombinantem Plasmid vor. Zur Unterscheidung dieser drei Formen bedient man sich folgender Hilfsmittel: Durch die Transformation wird eine auf dem Plasmid lokalisierte Ampicillin-Resistenz vermittelt. Nicht transformierte Zellen können auf Agar-Platten mit Ampicillin nicht wachsen. Ob es sich bei dem aufgenommenen Plasmid um ein rekombinantes Plasmid oder den Vektor einligierter Fremd-DNA handelt, unterscheidet man anhand von X-Gal, das den Agarplatten zugesetzt war. X-Gal wird durch β-Galaktosidase gespalten, wodurch die farblose Verbindung in das blaue 3-Brom-4-Chlor-Indigo übergeht. Der verwendete Vektor besitzt ein Stück des E.coli lac-Z-Gens, das in der Lage ist, das lac-Z-Gen der Wirtszelle zu komplementieren, so daß eine funktionelle β-Galaktosidase synthetisiert werden kann. Bakterien mit Vektor spalten X-Gal, es tritt eine Blaufärbung auf. Wird das lac-Z-Genfragment durch Einklonierung eines DNA-Stückes in den Vektor zerstört, kann keine β-Galaktosidase mehr hergestellt werden. Wird X-Gal nicht gespalten, bilden die Zellen weiße Kolonien.

Die Einklonierung des PCR-Produktes erfolgte mit dem TOPO-TA-Klonierungskit gemäß den Angaben des Herstellers. Die in der PCR verwendete Taq Polymerase hat eine terminale Transferaseaktivität, durch die ein Deoxyadenosin an das 3'-Ende angehängt wird. Der gelieferte, linearisierte Vektor hat ein überlappendes 3'-Deoxythymidin. Das PCR-Produkt kann so mit dem durch Topoisomerase, welche eine Ligasefunktion besitzt, aktivierten Vektor ligiert werden. Die Ligation läuft in fünf Minuten spontan ab, hierfür wurden 2 µl des PCR-Produktes mit 1 µl pCR-TOPO-Vector gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In dem Kit sind desweiteren chemisch kompetente Zellen enthalten, in die der Vektor eingebracht wird. Für die Transformation wurden 2 µl 0,5 M β-Mercaptoethanol zu den kompetenten Zellen gegeben und gemischt, bevor 2 µl der Ligationsreaktion mit den kompetenten Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert wurden. Es erfolgte dann ein Hitzeschock der Zellen für 30 Sekunden bei 42°C und eine weitere Inkubation auf Eis für 2 Minuten. Durch Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurde die Transformationsreaktion beendet und daran eine 30 minütige Selektionsphase bei 37°C angeschlossen. Danach wurden die Zellen sofort weiterverwendet, oder bei 4 °C aufbewahrt.

Jeweils 100 µl transformierte Bakterien in SOC-Medium wurden in 100- und 10-facher Verdünnung sowie unverdünnt auf Ampicillin-Platten mit 50 µl X-Gal-Lösung ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Für jede Sonde wurden 10 weiße Kolonien gepickt und in einer Übernachtskultur (3 ml) in Medium mit Ampicillin eingesetzt.

Die Isolierung des Plasmids erfolgte mit dem QIAGEN Plasmid-Mini-Kit entsprechend dem Protokoll des Herstellers. Dabei wurden die Übernachtskulturen, in denen Bakterien gewachsen waren, abzentrifugiert, das Pellet in 250 µl Puffer P1 aufgenommen, kurz in Puffer P2 inkubiert und dann mit Puffer N3 gemischt. Die so lysierten Zellen wurden abzentrifugiert und der das Plasmid enthaltende Überstand abgenommen und auf die mitgelieferten Säulen gegeben. Die Säulen wurden einmal mit Puffer PB und zweimal mit Puffer PE gewaschen. Danach erfolgte die Elution des Plasmids in 100 µl Tris/HCl (10 mM, pH 8,5).

Das einklonierte PCR-Fragment wurde durch einen Restriktionsverdau mit *EcoR* I ausgeschnitten und auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Unter UV-Licht konnte die Bande, die von der Größe dem PCR-Produkt entsprach, aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem GFXTM-PCR-DNA and Gel-Band-Purification-Kit aus dem Gel isoliert werden. Die Isolierung aus dem Gel erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Das Gelstück wurde hierfür in ein Eppendorf Gefäß überführt und mit 300 µl Capture Buffer

bei 60°C verflüssigt. Danach wurde mit dem flüssigen Gel eine GFX-Säule beladen und nach einer Minute bei 14000 U/min 30 Sekunden zentrifugiert. Nachdem die Säule mit 500 µl des Waschpuffers bei 14000 U/min gewaschen worden war, wurde die DNA mit 50 µl Elutionspuffer für 1 Minute inkubiert und anschließend eluiert. Von jeder Sonde wurden 2,5 µl zur Überprüfung auf ein Gel aufgetragen. Die gelelektrophoretische Überprüfung ist in Abbildung 17 dargestellt.

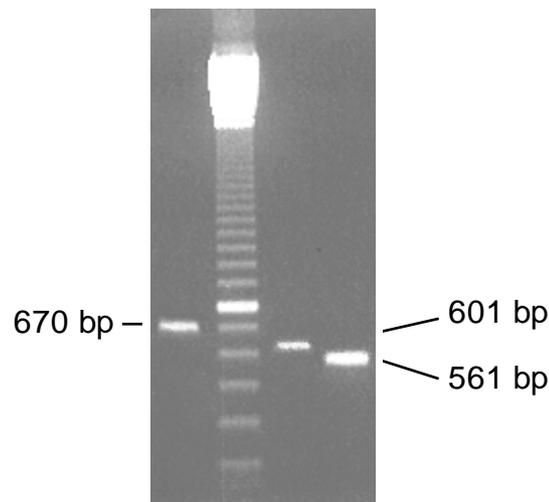


Abbildung 17: Gelelektrophoretische Darstellung der cDNA-Sonden, die im Northern Blot eingesetzt wurden. Die PCR-Produkte haben folgende Größen: Hämoxygenase 670 bp, Ferritin (leichte Kette) 601 bp und Ferritin (schwere Kette) 561 bp.

2.3.7.6 Markierung der cDNA-Sonden

Die Markierung der cDNA-Sonden erfolgte nach dem Prinzip der „random prime labelling“-Methode (FEINBERG und VOGELSTEIN, 1983 und 1984) mit dem T7-Kit der Firma Pharmacia entsprechend den Angaben des Herstellers. Dabei lagern sich Hexanukleotide zufälliger Sequenz an die denaturierten DNA-Stränge und dienen als Primer für die T7-Polymerase, welche α - ^{32}P -dCTP in die neu synthetisierten Stränge einbaut. Diese Markierung hat den Vorteil, sehr geringe Mengen an DNA und kurze Sequenzen effektiv markieren zu können. Für die Markierung wurden 150 ng der Sonden-DNA mit TE zur Denaturierung bei 94°C für 10 Minuten gekocht, auf Eis abgekühlt und mit 1 µl T7-Polymerase, 10 µl Mix und ^{32}P - α -dCTP (10 µCi/µl) versetzt. Markierte Stränge wurden über eine äquilibrierte Sephadex-G50-Säule von nicht eingebauten Nukleotiden getrennt. Die markierten DNA-Fragmente wurden durch 10-

minütiges Kochen denaturiert, auf Eis gekühlt und als Sonde in der Hybridisierung eingesetzt.

2.3.7.7 Hybridisierung und Waschen

Die Hybridisierung erfolgte in Schalen im Wasserbad. Nach einer zweistündigen Vorhybridisierung mit 20 ml Hybridisierungspuffer bei 60°C wurde die Hybridisierungslösung ausgetauscht, die Sonde zugegeben und bei 60°C über Nacht hybridisiert.

Am nächsten Tag wurde die Membran jeweils für 30 Minuten mit 250 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,2)/1 % SDS und 100 mM Na-Phosphatpuffer (pH 7,2)/1 % SDS bei 60°C gewaschen. Nach diesem Waschschrift wurde überprüft, ob die Radioaktivität spezifisch auf dem Filter verteilt war. Der Filter wurde dann in Folie eingeschweißt. Die Autoradiographie auf einem Röntgenfilm erfolgte über Nacht bei -70°C oder für 6 - 10 Stunden im Phosphor Imager.

2.3.8 Bestimmung des 8-Oxo-Guanin-Gehaltes in Lymphozyten

Die Messung des 8-Oxo-Guanins wurde in den Laboren von Dr. U. Andrae, GSF, München und Dr. A. Collins, Rowett Research Institute, Aberdeen, UK durchgeführt. Aus 40 ml Vollblut wurden Lymphozyten über einen Ficoll-Gradienten isoliert und mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in 1 ml 8-Oxo-Puffer aufgenommen, mit Stickstoff überschichtet und im Stickstoff eingefroren, bevor sie auf Trockeneis verschickt wurden. Zur Aufarbeitung der DNA wurden die Zellen lysiert und mit Proteinase K inkubiert. Durch eine Hochsalzlösung wurden die verbleibenden Proteine gefällt und abzentrifugiert. Die DNA konnte dann durch Ethanol-Präzipitation gefällt und durch Abpipettieren des Ethanols die RNA durch Rnase-Verdau entfernt werden. Nach weiterer Ethanol-Präzipitation und Aufreinigung wurde die DNA-Konzentration und Reinheit (OD 260/280) bestimmt, die DNA mit Stickstoff überschichtet und bei -80°C tiefgefroren. Für die HPLC-Messungen erfolgte die Hydrolyse der DNA mit Dnase, Alkalischer Phosphatase, Phosphodiesterase II und Phosphodiesterase I. Die HPLC-Bedingungen sind im folgenden exemplarisch für eine Messung angegeben: Pumpe: Gilson 306 mit 10 WSC-Kopf; Fließ-Rate: 0,65 ml/Minute; manometrisches Modul: Gilson 805; Injektor: manuelle Injektion mit einer 7125 Rheodyne valve; Loop size: 100 µl; Guard Säule: 2 x 0,4 cm ID mit pellicular C185 µ packing; analytische Säule: Capital analytical 150 x 4,6 Apex C 183 µ column; UV-Detektor: Gilson Holochrom (254 nM), ECD-Detektor: ESA Coulchem 2 mit einer 5021 conditioning Zelle (+150

mV), 5011 analytische Zelle (+ 400 mV) Bereich 2nA; Daten-Auswertung: Gilson 715-Software; mobile phase: 50 mM PO₄/8 % MeOH pH 5,5; Gradient: Isocratic.

2.3.9 Messung der Lipidperoxidation

Für die Bestimmung der Lipidperoxidation wurde Plasma von Probanden vor, direkt nach und einen Tag nach einer HBO bei -20 °C tiefgefroren. Die Bestimmung erfolgte über fluorometrische Bestimmung der Malondialdehydkonzentration in der Arbeitsgruppe von Dr. Irene Witte, ICBM, Oldenburg.

2.3.10 Messung des antioxidativen Status

Die Messungen erfolgten in Kooperation mit Dr. Y. Barnett, University of Ulster, N. Ireland. Es wurden Plasma und Zellfraktionen hergestellt, die auf Trockeneis zur Analyse verschickt werden konnten. Für die Bestimmung der Vitamine und des Glutathions im Plasma, sowie der Aktivität von SOD, Katalase und Glutathionperoxidase in der Erythrozyten-Zellfraktion, wurden 10 ml Blut bei 2500 U/min für 10 Minuten abzentrifugiert. Das Plasma wurde aliquotiert und bei -20°C tiefgefroren. Für die Bestimmung des Vitamin C-Gehaltes, wurde je ein Aliquot (250 µl) mit 500 µl 10 % Metaphosphorsäure versetzt und bei -70°C aufbewahrt. Das Erythrozyten-Zellpellet wurde dreimal mit PBS gewaschen und dann ebenfalls bei -70°C aufbewahrt. Die Messungen erfolgten gemäß den von THURNHAM et al. (1988) und HEILIGER (1980) beschriebenen Methoden. Für die intrazelluläre GSH-Bestimmung wurden die Lymphozyten aus 40 ml Vollblut über einen Ficoll-Gradienten isoliert, gewaschen und in 70 % RPMI, 20 % FKS und 10 % DMSO auf -70°C tiefgefroren. Für die Messung des „antioxidativen Potentials“ wurde der FRAP-Assay (ferric reducing ability of plasma) angewendet. Die Messung beruht auf der Fähigkeit des Plasmas, einen Fe³⁺-TPTZ (Tripyridyltriazin)-Komplex zu reduzieren. Dabei entsteht Fe²⁺-TPTZ, mit einem Absorptionsmaximum bei 593 nm. Die Entstehung dieses Komplexes kann photometrisch verfolgt werden und gibt Aufschluß über das Reduktionspotential im Plasma. Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte über einen Ficoll-Gradienten, das Plasma wurde abgenommen und bei -70°C eingefroren. Die Lymphozyten wurden einmal in PBS gewaschen, in 1 ml Lymphozytenpuffer aufgenommen und ebenfalls bei -70°C tiefgefroren.

2.3.11 Bestimmung des Bilirubin-Gehaltes

Gesamt-Bilirubin wurde im Serum von Probanden vor und am Tag nach einer HBO bestimmt. Es wurde Vollblut in neutralen Monovetten abgenommen und die Messung erfolgte photometrisch in der Abteilung Klinische Chemie der Universität Ulm nach JENDRASSIK und GROF (1938) mit Modifikation nach DOUMAS et al. (1985).

2.3.12 Western Blot-Analyse der Hämoxygenase

Für die Bestimmung des Proteingehaltes der Hämoxygenase in Lymphozyten von Probanden vor und nach einer HBO wurden Western Blots in der Abteilung Toxikologie von Prof. Kaina, Universität Mainz, durchgeführt. Hierfür wurden 20 ml Vollblut vor, 4 Stunden und 24 Stunden nach einer HBO entnommen und die Lymphozyten über einen Ficoll-Gradienten isoliert. Nach einmaligem Waschen in PBS wurde das Zellpellet in flüssigem Stickstoff bis zum Versenden auf Trockeneis tiefgefroren. Nach dem Zellaufschluß wurden für den Western Blot jeweils 40 µg Protein aufgetragen. Als Antikörper gegen Hämoxygenase diente anti Hämoxygenase-1 (1:1000 verdünnt), die Hybridisierung erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurde mit anti rabbit (horseradish peroxidase) für eine Stunde bei Raumtemperatur hybridisiert. Als Ladekontrolle diente polß, hierfür wurde der Antikörper anti ERK2 verwendet.

2.3.13 Statistik

Die statistische Signifikanz der Ergebnisse wurde mit dem gepaarten Student's t-Test überprüft und 1 % Fehlerwahrscheinlichkeit wurde als Signifikanzgrenze gewertet.

3. Ergebnisse

Es wurde nach einem in der Klinik angewendeten Schema eine Behandlung von 4 Probanden mit hyperbarem Sauerstoff (HBO) durchgeführt. In diesem Versuch atmeten die Probanden an fünf aufeinanderfolgenden Tagen jeweils für 60 Minuten (3 x 20 Minuten) 100 % Sauerstoff bei 1,5 bar Überdruck (d.h. 2,5 bar absolut). Die Auswirkung dieser Behandlung auf die DNA Migration (Tailmoment) im Comet Assay mit Vollblut der Probanden vor und direkt nach der Behandlung ist in Abbildung 18 dargestellt. Am ersten Tag wurde nach der HBO in den Leukozyten der 4 Probanden ein signifikant erhöhtes Tailmoment gemessen ($p < 0,01$). Demgegenüber wiesen Leukozyten, die nach der dritten HBO beziehungsweise nach der fünften HBO das heißt am Tag 3 und am Tag 5 entnommen wurden, keine erhöhte DNA Migration auf. Das Tailmoment an den Tagen 3 und 5 lag bei allen Probanden unter dem Kontrollwert vor der HBO am Tag 1.

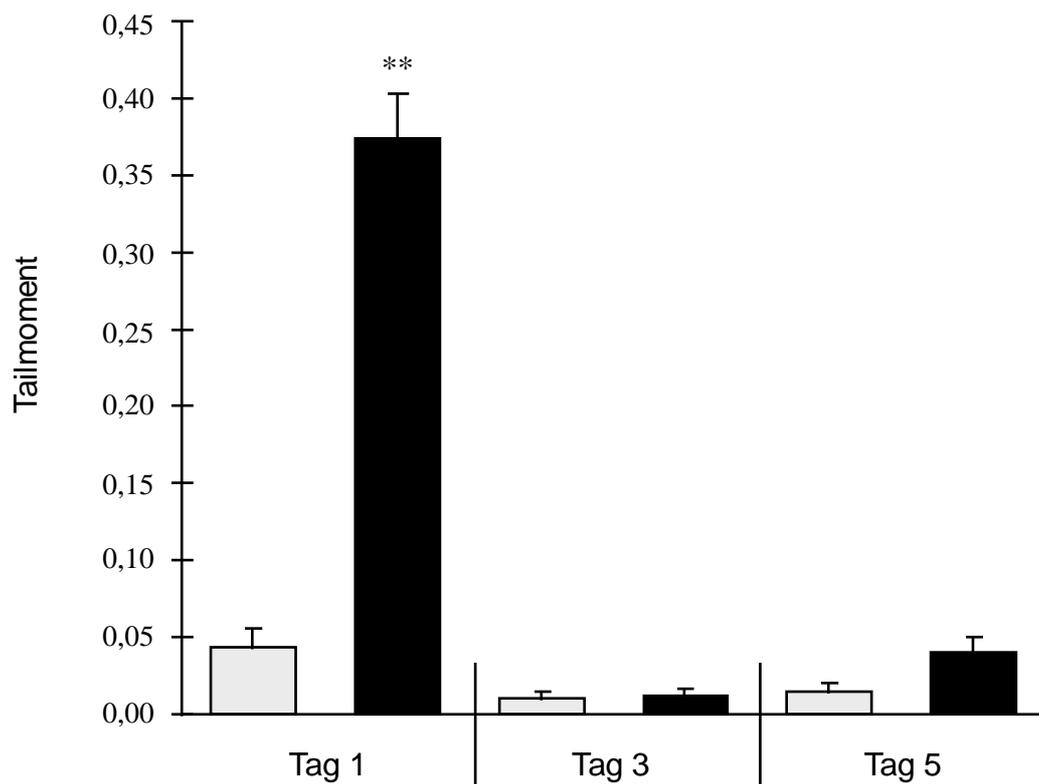


Abbildung 18: Der Effekt von HBO an 5 aufeinanderfolgenden Tagen auf DNA-Migration (Tailmoment) im Comet Assay. Mittelwerte und SEM von 4 Probanden. □ vor HBO, ■ nach HBO.

Aus diesem Befund ergaben sich zwei Fragestellungen, die mit den folgenden Experimenten abgeklärt werden sollten. Im ersten Teil der Arbeit wurde der biologischen Bedeutung des gezeigten DNA-Effektes nachgegangen, während im zweiten Teil das

Nichtauftreten der DNA-Migration bei aufeinanderfolgenden HBO Behandlungen, das heißt, eine mögliche Adaptation, weiter untersucht wurde.

3.1 Biologische Bedeutung des genotoxischen Effektes

3.1.1 Untersuchungen des HBO-induzierten, genotoxischen Schadens und zur zytotoxischen Wirkung einer HBO

Eine einmalige HBO führte in den Leukozyten von Probanden zu verstärkter DNA Migration. In Abbildung 19 ist dies für 10 Probanden dargestellt. Der Mittelwert des Tailmoments dieser Personen ist in den Zellen direkt nach einer HBO signifikant erhöht ($p < 0,01$) gegenüber der Kontrolle vor der HBO.

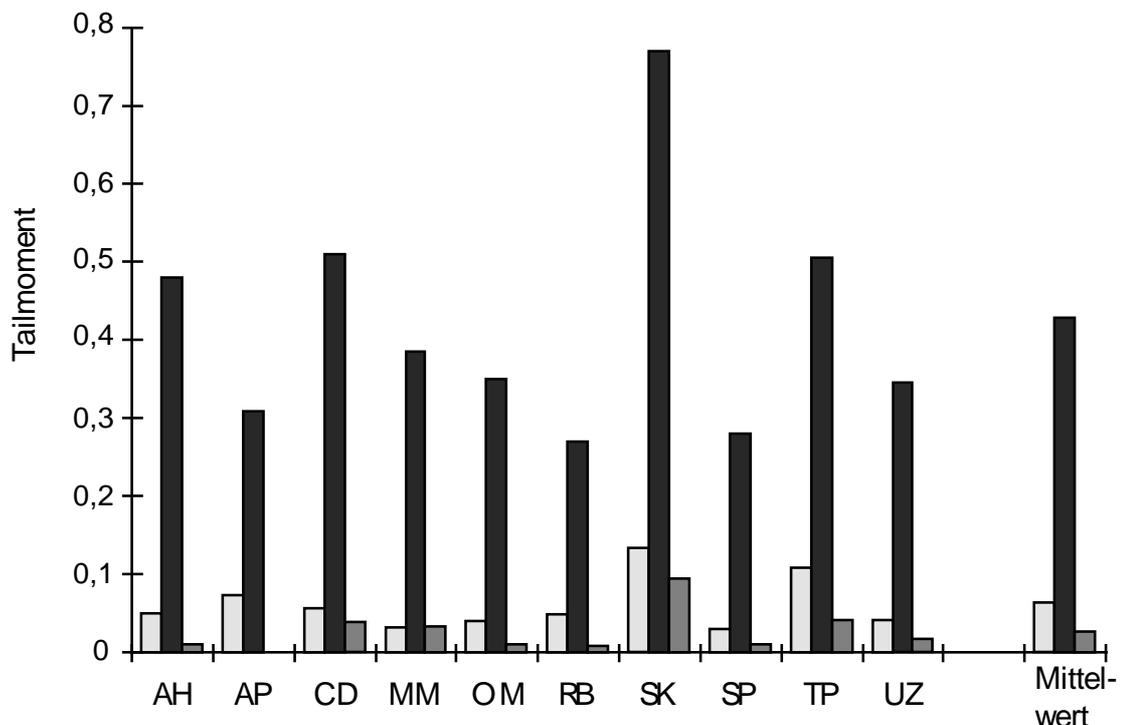


Abbildung 19: DNA Migration (Tailmoment) in Leukozyten von 10 Probanden vor, nach und 24 h nach HBO (Mittelwert aus 50 Zellen). □ vor HBO, ■ nach HBO und ▒ 24 h nach HBO.

In Abbildung 19 ist außerdem das Tailmoment in Leukozyten aus Blut dargestellt, das 24 Stunden nach der Behandlung entnommen wurde. Mit Ausnahme von MM lag der Wert für das Tailmoment unter dem Niveau der Kontrolle vor der HBO. Aus der Abbildung 19 geht deutlich hervor, daß es zwischen den einzelnen Probanden Unterschiede hinsichtlich ihrer DNA-Migration im Kontrollblut wie auch bei den induzierten Werten gibt. Diese Variabilität zeigte sich auch auf intraindividuellerebene. Für

Probanden, die während dieser Arbeit wiederholt bei einer Druckkammerfahrt teilnahmen, wurden Unterschiede in den Absolutwerten zwischen den Versuchen festgestellt. Diese Unterschiede konnten nur teilweise auf das während der Arbeit veränderte Protokoll des Comet Assays zurückgeführt werden.

Zur Verdeutlichung des durch HBO induzierten Effektes zeigt Abbildung 20 die Verteilung der DNA-Migration in den einzelnen Leukozyten des jeweiligen Probanden vor und nach einer HBO. Das Atmen von 100 % Sauerstoff bei 2,5 bar absolut induzierte ein erhöhtes Tailmoment in der Mehrzahl der Zellen aller Probanden.

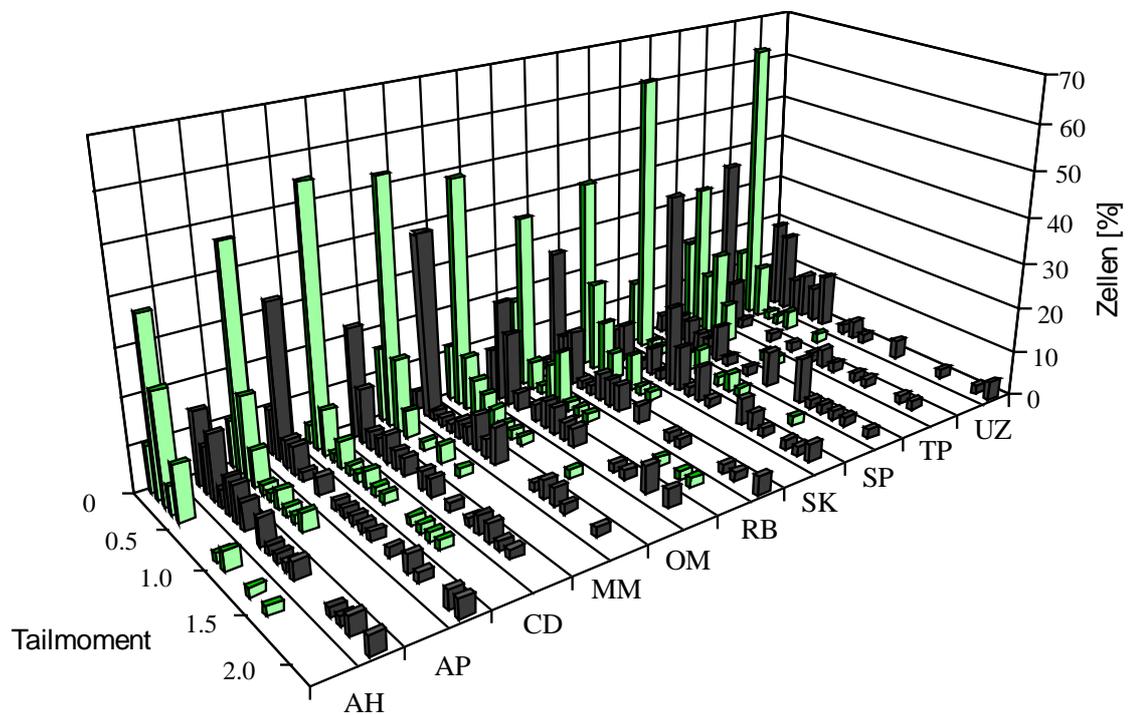


Abbildung 20: Verteilung der DNA-Migration in Leukozyten. Es wurden 50 Zellen je Proband ausgewertet. ■ vor HBO, ■ nach HBO.

Die Auswirkung einer HBO auf die Vitalität von Leukozyten wurde durch Trypanblaufärbung bestimmt, um auszuschließen, daß die gemessenen Effekte im Comet Assay im toxischen Bereich auftraten. Die in Tabelle 3 dargestellten Daten zeigen deutlich, daß der Anteil toter Zellen in einem Bereich von 0,2 - 7,3 % variierte, aber nach einer HBO nicht erhöht war.

Tabelle 3: Nachweis toter Zellen im Blut von Probanden vor und nach einer HBO durch Trypanblau-Färbung

Proband	vor HBO	nach HBO
	[% tote Zellen]	[% tote Zellen]
JB	2,3	7,3
CD	4,5	0,5
OM	4,1	0,2
SP	5,1	1,9
Mittelwert	4	2,5

Ein weiteres Maß für toxische Effekte im Blut ist die Zusammensetzung der Zellpopulation, die sich als Antwort auf äußere Einflüsse verändern kann. Die Auswirkung einer HBO auf die Zellpopulationen im Blut wurde daher untersucht (Tabelle 4).

Tabelle 4: Prozentualer Anteil der segmentkernigen Zellen, Lymphozyten und Monozyten im Blut von Probanden vor und nach einer HBO.

Proband	Segmentkernige [%]		Lymphozyten [%]		Monozyten [%]	
	vor HBO	nach HBO	vor HBO	nach HBO	vor HBO	nach HBO
IJ	60	51	31	41	5	6
SN	73	43	21	43	3	1
SS	66	65	21	25	10	7
TR	54	39	38	52	5	5
IJ	59	53	29	45	8	1
KK	62	42	34	55	2	2
OM	50	70	46	28	3	1
RM	51	55	45	35	4	8
Mittelwert	59,4	52,3	33,1	40,5	5,0	3,9

Auf der individuellen Ebene lassen sich für Segmentkernige, Lymphozyten und Monozyten leichte Unterschiede feststellen. Allerdings ist kein eindeutiger Trend erkennbar. Die Segmentkernigen lagen bei vier Probanden nach HBO in verminderter Anzahl vor, für drei Probanden konnte kein deutlicher Unterschied beobachtet werden

und bei einem Probanden erhöhte sich die Anzahl der Zellen. Für Lymphozyten konnten bei fünf Probanden erhöhte Zellzahlen nach HBO nachgewiesen werden, bei zwei Probanden waren es weniger Lymphozyten nach HBO und bei einem Probanden veränderte sich die Anzahl nicht. Die Monozyten verringerten sich bei einem Probanden deutlich, bei einem Probanden waren sie nach HBO verdoppelt und bei den restlichen sechs Probanden war keine deutliche Veränderung nachweisbar. Die Unterschiede der Mittelwerte nach HBO sind nicht signifikant. Für Stabkernige, Eosinophile und Basophile konnte ebenfalls keine Veränderung durch eine HBO beobachtet werden (Daten nicht aufgeführt).

Die HBO diente in dieser Arbeit als Modell für oxidativen Streß. Um die Bedingungen der Schadensentstehung weiter einzugrenzen, wurde im folgenden Versuch die Frage geklärt, inwieweit 1,5 bar Überdruck bei normaler Sauerstoffzufuhr oder 100% Sauerstoff bei Normaldruck (1 bar) DNA-Schäden induzierte, die im Comet Assay erfaßt werden können. Aus Abbildung 21 wird deutlich, daß es bei der Verwendung des in der Klinik angewendeten Protokolls (1,5 bar Überdruck, 100 % Sauerstoff) zur bereits beschriebenen Induktion von DNA-Effekten kommt.

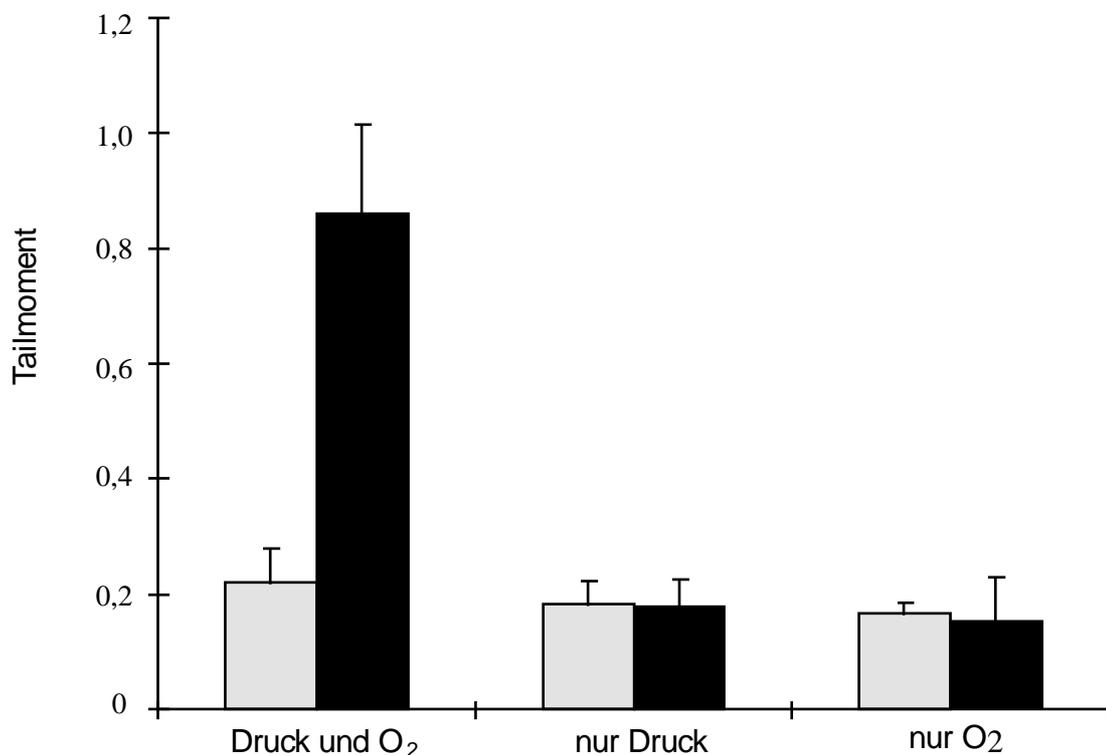


Abbildung 21: DNA Migration (Tailmoment) vor und nach HBO Behandlung, vor und nach Inhalation von Raumluft unter hyperbarem Druck und vor und nach Inhalation von 100% Sauerstoff unter normobarem Druck. Mittelwerte und Standardabweichungen von 3 Probanden. vor HBO, nach HBO.

Demgegenüber wurde weder durch Überdruck (1,5 bar) bei normaler Sauerstoffzufuhr, noch durch Inhalation von 100 % Sauerstoff bei Normaldruck ein Anstieg der DNA Migration gemessen. Diese Experimente wurden mit drei Probanden durchgeführt, wobei zwischen den Versuchen ein Zeitraum von 4 Monaten lag, um den beschriebenen adaptiven Effekt auszuschließen. Die Kontrollwerte lagen ebenso wie das absolute Tailmoment nach HBO über den sonst für Blut ermittelten Werten. Dies wurde auf Schwankungen in den Testbedingungen während der Umstellung auf ein modifiziertes Protokoll zurückgeführt.

3.1.2 Nachweis oxidativ veränderter DNA-Basen nach einer HBO

Es ist bekannt, daß eine Wirkung von Sauerstoffradikalen die Induktion oxidativ veränderter Basen in der DNA ist. Durch Modifikation des Comet Assays ist der Nachweis dieser veränderten Basen möglich. Eine Inkubation der Präparate nach der Lyse mit Reparaturenzymen führt zu Einzelstrangbrüchen und so zu einer Erhöhung des Tailmoments. Es wurde Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG), das unter anderem spezifisch 8-Oxo-Guanin erkennt, sowie Endonuklease III (EndoIII), das oxidierte Pyrimidine erkennt, eingesetzt. Die HBO induzierte einen signifikanten ($p < 0,01$) Anstieg des Tailmoments (Abbildung 22). Die Nachbehandlung der Zellkerne mit dem jeweiligen Reparaturenzym verstärkte diesen Effekt. Das FPG-Protein zeigte hierbei eine mehr als dreifache Verstärkung, während durch EndoIII eine Verstärkung um mehr als das Doppelte erreicht wurde. Auch die DNA Migration in den Kontrollzellen wurde durch Nachinkubation mit FPG beziehungsweise EndoIII signifikant ($p < 0,01$) verstärkt. Dies kann zum Teil durch Induktion von DNA-Effekten während der Inkubation mit dem Enzym begründet werden. Der Enzympuffer kann zu einem erhöhten Tailmoment in der Kontrolle führen, außerdem ist ein Basislevel an oxidierten Basen *in vivo* beschrieben, der in Kontrollzellen detektiert werden kann.

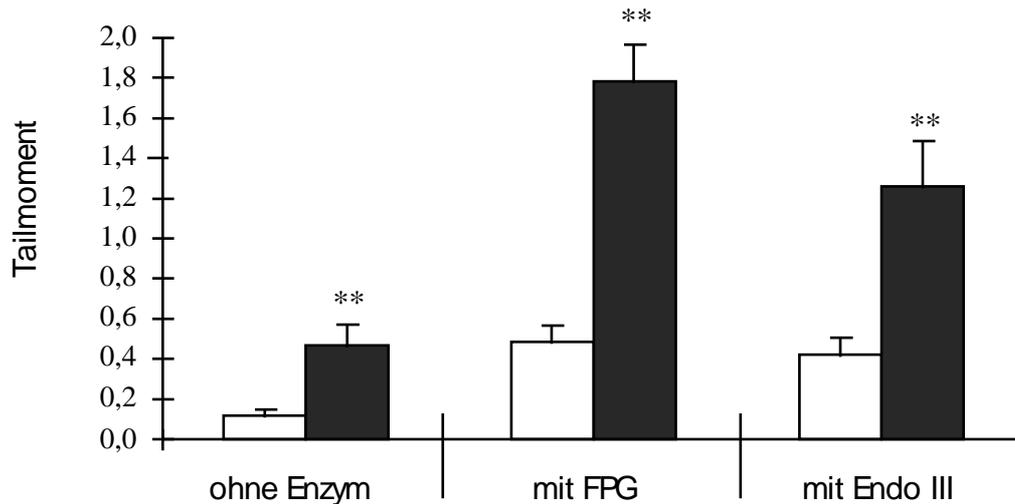


Abbildung 22: DNA-Migration im Comet Assay mit Vollblut vor und direkt nach einer HBO-Behandlung, sowie der Effekt der schadensspezifischen Enzyme FPG und EndoIII. Mittelwerte und SEM von 14 Probanden. □ vor HBO, ■ nach HBO

Ein direkter Nachweis oxidativ geschädigter Basen kann durch eine HPLC-Analyse erfolgen. Für die Frage nach der biologischen Relevanz scheint besonders das 8-Oxoguanin eine Rolle zu spielen, das über die HPLC-Analyse als Marker für oxidativen Streß untersucht werden kann. Lymphozyten aus dem Vollblut von Probanden vor und nach einer HBO wurden zur Messung des 8-Oxoguanin-Gehalts mittels HPLC mit elektrochemischer Detektion isoliert. Zellen von 6 Probanden wurden von Dr. P. Kreis im Labor von Dr. U. Andrae bei der GSF in München analysiert, von 7 Probanden späterer HBO-Behandlungen wurde der 8-Oxoguanin-Gehalt von Dr. C. Gedik und Dr. S. Wood im Labor von Dr. A. Collins im Rowett Research Institutes in Aberdeen, Schottland, bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 aufgeführt. Ein erhöhter 8-Oxoguanin-Gehalt ist nach einer HBO nicht zu erkennen, wenn man die Mittelwerte betrachtet. Sämtliche Werte liegen in einem Bereich von 0,1 - 3,4 8-OxodG/10⁵dG. Dies trifft sowohl für die Analysen aus München, als auch für die Analysen aus Aberdeen zu. Auf dem individuellen Level ist zwar bei einigen Probanden ein Anstieg feststellbar, betrachtet man aber die individuelle Schwankung bei wiederholten Messungen, so wird am Beispiel von OM deutlich, daß die Werte im Bereich der individuellen Variationsbreite liegen (Tabelle 5).

Tabelle 5: HPLC-Analyse des 8-Oxo-Guanin Gehaltes in Lymphozyten von Probanden vor und direkt nach einer HBO.

Proband	vor HBO [8-OxodG/10 ⁵ dG]	nach HBO [8-OxodG/10 ⁵ dG]
a) AH	3,2	0,91
KD	1,97	3,39
OM	2,03	1,23
SP	1,37	2,38
OM	0,62	1,94
SK	1,03	0,16
Mittelwert	1,70	1,67
b) CD	1,2	1,82
OM	1,53	0,56
SP	2,09	0,93
GA	0,44	0,84
JB	0,59	0,33
DK	0,51	1,27
RK	0,37	1
Mittelwert	0,96	0,96

Durchführung der Messungen bei:

a) Dr. U. Andrae in München und

b) Dr. A. Collins in Aberdeen.

Für 8 der in Tabelle 5 angegebenen Messungen des 8-Oxo-Guanins mittels HPLC, wurde parallel der Comet Assay mit FPG-Nachinkubation durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abbildung 23 zusammengestellt.

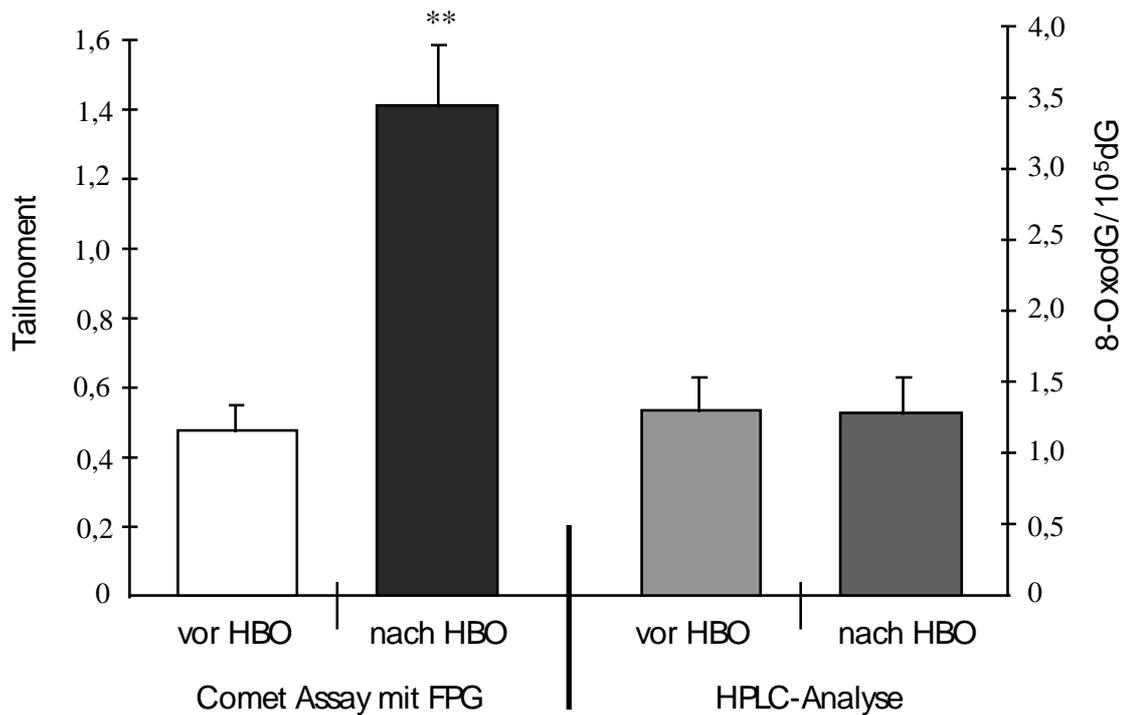


Abbildung 23: Der Effekt einer einmaligen HBO auf die Induktion von FPG-sensitiven Läsionen im Comet Assay und 8-Oxo-Guanin-Gehalt in der HPLC-Analyse in Leukozyten. Mittelwerte und SEM von 8 Probanden.

Die HBO führte im Comet Assay mit FPG zu einem signifikanten Anstieg des Tailmoments ($p < 0,01$). Im Gegensatz dazu wurde keine Erhöhung des 8-Oxo-Guanin-Gehaltes in den Leukozyten nach HBO mittels HPLC nachgewiesen.

3.1.3 Messung der Lipidperoxidation nach HBO

Neben direkten Schäden an der DNA durch Sauerstoffradikale, können in der Zelle Proteine und Lipide durch ROS geschädigt werden. Lipidperoxidation ist ein derartiger Prozess, bei dem die Membranen betroffen sind. Die Abbauprodukte der Lipidperoxidation können die DNA schädigen und könnten so zu Effekten im Comet Assay führen. Es sollte daher im folgenden geklärt werden, ob durch HBO Lipidperoxidation im Blut induziert wird. Die Messung der Malondialdehyd (MDA)-Konzentration im Plasma von Probanden als Marker der Lipidperoxidation vor, direkt nach einer HBO und einen Tag nach einer HBO, ergaben keinen erhöhten MDA-Spiegel nach der HBO (Tabelle 6).

Tabelle 6: Bestimmung der Malondialdehyd-Konzentration (MDA) im Plasma von Probanden vor, direkt nach und am Tag 1 nach einer HBO.

Proband	vor HBO [nM MDA]	nach HBO [nM MDA]	Tag 1 nach HBO [nM MDA]
CD	437,3	207,9	414,2
RG	303,6	277,2	394,4
SH	412,5	247,8	372,9
KK ^(a)	339,9	404,3	348,3
KK ^(b)	310,0	277,2	n.d.
IJ	328,4	315,7	n.d.
OM	293,3	280,5	n.d.
RM	310,2	330,0	n.d.
Mittelwert	341,9	292,6	382,4

^(a) und ^(b) der gleiche Proband bei verschiedenen HBO-Behandlungen, Mittelwerte aus zwei Messungen.

3.1.4 Reparatur oxidativer DNA-Schäden nach HBO

DNA-Läsionen können durch Reparaturenzyme erkannt und eliminiert werden. Um die Persistenz der durch HBO induzierten DNA-Schäden und deren Reparatur zu untersuchen, wurde direkt nach einer HBO, sowie 6 Stunden und 24 Stunden später Blut entnommen und im Comet Assay eingesetzt. In Abbildung 24 ist für alle drei Probanden eine deutliche Induktion der DNA-Migration durch HBO zu erkennen. Bereits 6 Stunden nach der HBO lag das Tailmoment jedoch unter dem Wert der Kontrolle. Einen Tag nach HBO war das Tailmoment ebenfalls auf Kontrollniveau. Die Kontrollwerte und Tailmoments nach HBO lagen in diesem Versuch ebenso wie die aus Abbildung 21 höher, da auch dieser Versuch während der Umstellung auf ein neues Protokoll erfolgte.

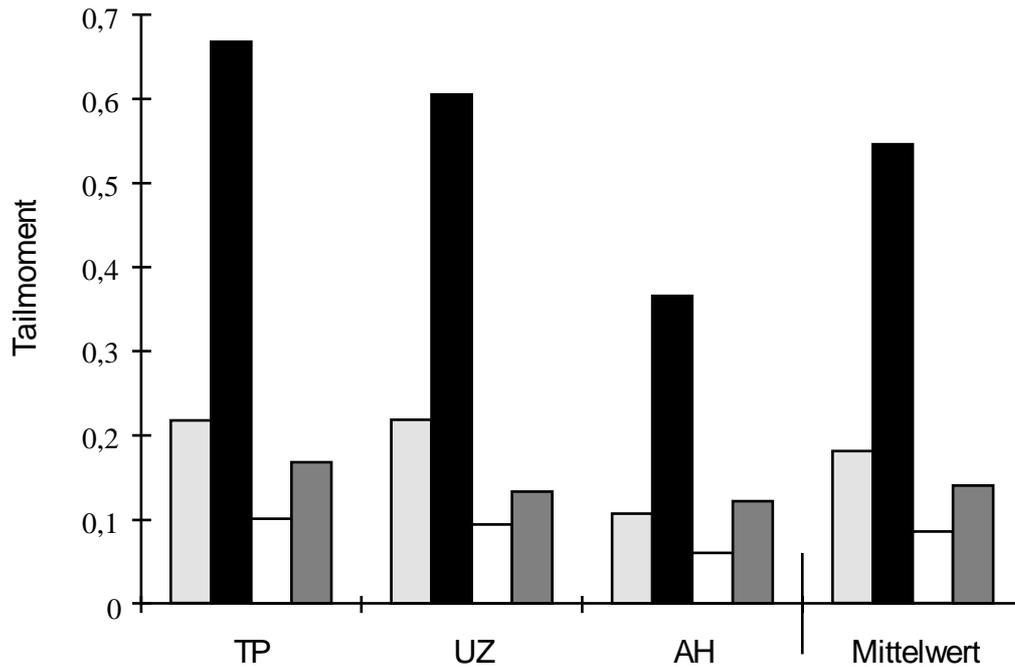


Abbildung 24: DNA Migration (Tailmoment) in Leukozyten von 3 Probanden vor, direkt nach, 6 h nach und 24 h nach HBO Behandlung. Mittelwerte von 50 Zellen, Alkali-/Elektrophoresezeit 40/20 Minuten. □ vor HBO, ■ nach HBO, □ 6 h nach HBO, ■ 24 h nach HBO.

Die Reparaturkinetik wurde im weiteren untersucht, indem die Zeitabstände der Blutentnahme auf eine halbe, eine und zwei Stunden nach einer HBO verkürzt wurden.

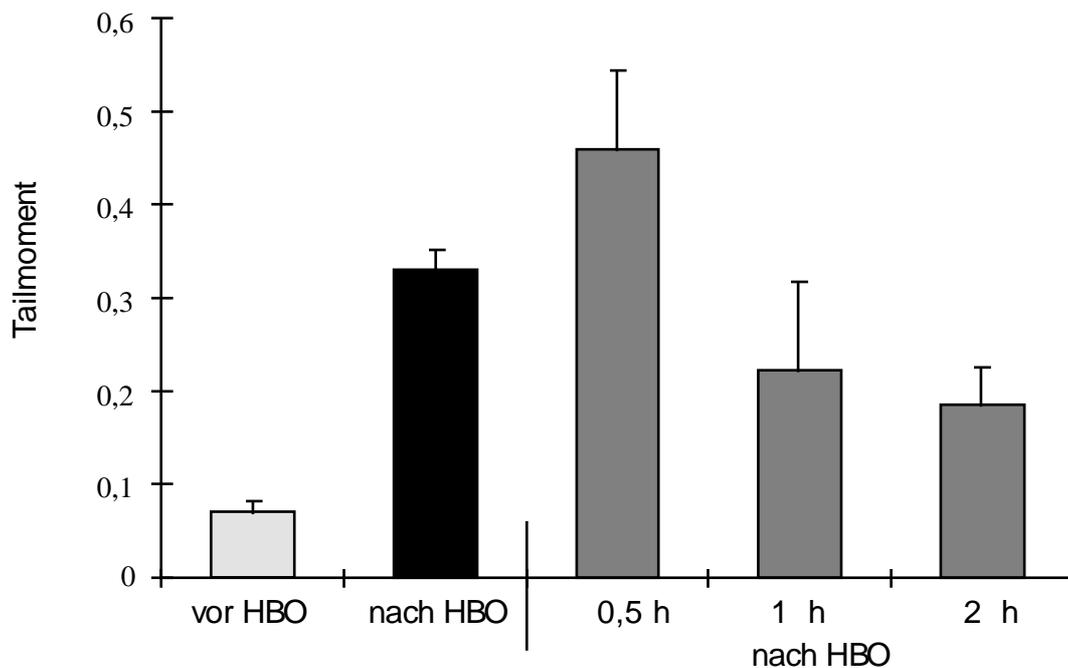


Abbildung 25: DNA Migration (Tailmoment) in Leukozyten vor, nach und 2 h nach HBO. Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 Probanden.

In Abbildung 25 ist eine signifikante Induktion von DNA-Schäden zu erkennen, eine halbe Stunde nach der HBO ist das Tailmoment sogar noch weiter erhöht. Demgegenüber wiesen Leukozyten, die eine Stunde nach der HBO entnommen wurden, eine deutliche Reduktion der DNA-Effekte auf. Nach zwei Stunden war das Tailmoment zwar immer noch gegenüber der Kontrolle erhöht, aber bereits um ca. 50 % reduziert gegenüber dem Effekt nach HBO.

Um auszuschließen, daß zu den untersuchten Zeitpunkten DNA-Schäden in verschiedenen Zellpopulationen analysiert wurden, erfolgte eine parallele Inkubation für zwei Stunden bei 37°C (ex vivo).

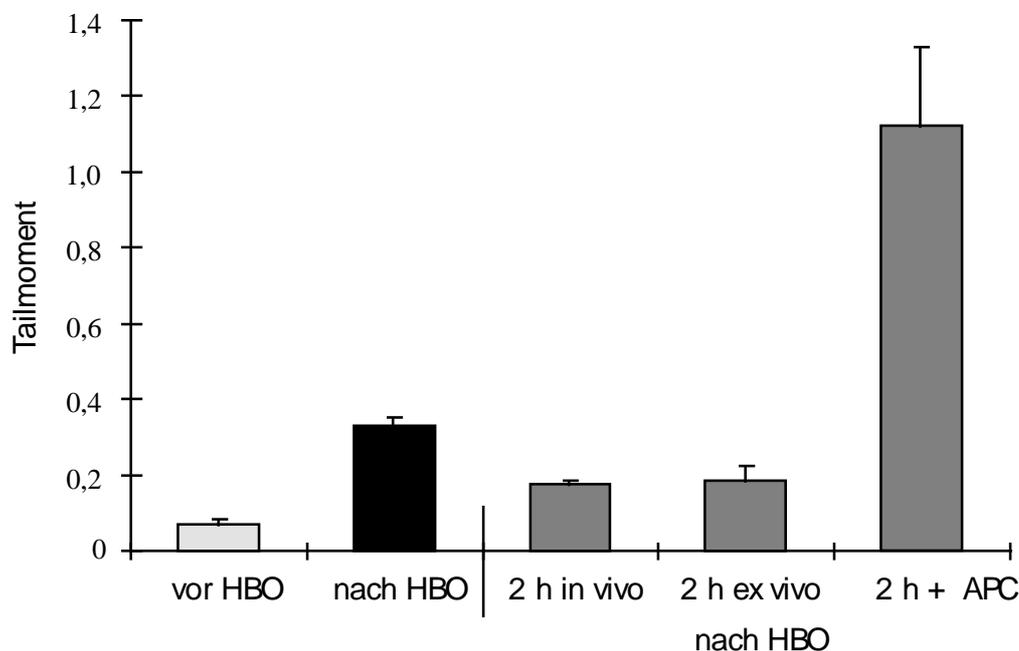


Abbildung 26: DNA Migration (Tailmoment) vor, nach und 2 h nach HBO, sowie mit Nachinkubation bei 37°C (ex vivo) mit und ohne Aphidicolin (APC). Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 Probanden.

Abbildung 26 zeigt, daß nach einer Induktion von DNA-Effekten durch HBO ein Rückgang der Effekte um 50 % zwei Stunden nach HBO zu sehen ist. Diese Abnahme des Tailmoments ist unabhängig davon, ob das Blut zwei Stunden nach HBO entnommen wurde, oder für zwei Stunden bei 37° C inkubiert wurde. Bei ex vivo-Inkubation in Anwesenheit von APC erhöhte sich das Tailmoment auf mehr als das Fünffache. Da APC die DNA-Polymerase hemmt, ist die Zunahme des Tailmoments ein Hinweis auf Exsisionsreparatur.

Der Einfluß der Reparatur auf oxidative Basenschäden konnte untersucht werden, indem Blut vor, direkt nach und zwei Stunden nach HBO entnommen und im Comet Assay mit

FPG-Behandlung eingesetzt wurde. In Abbildung 27 ist gezeigt, daß FPG-Nachinkubation zu einer Erhöhung der DNA Migration in Leukozyten führte. Mit und ohne FPG-Behandlung ist ein signifikanter Anstieg des Tailmoments nach HBO zu sehen. Bei Blutentnahme zwei Stunden nach HBO ist ohne FPG ein signifikanter ($p < 0,01$) Rückgang der Effekte um 50 % messbar. Auch die oxidativen Basenschäden, die durch FPG erkannt werden, sind zwei Stunden nach HBO signifikant ($p < 0,01$) reduziert gegenüber dem Wert direkt nach HBO.

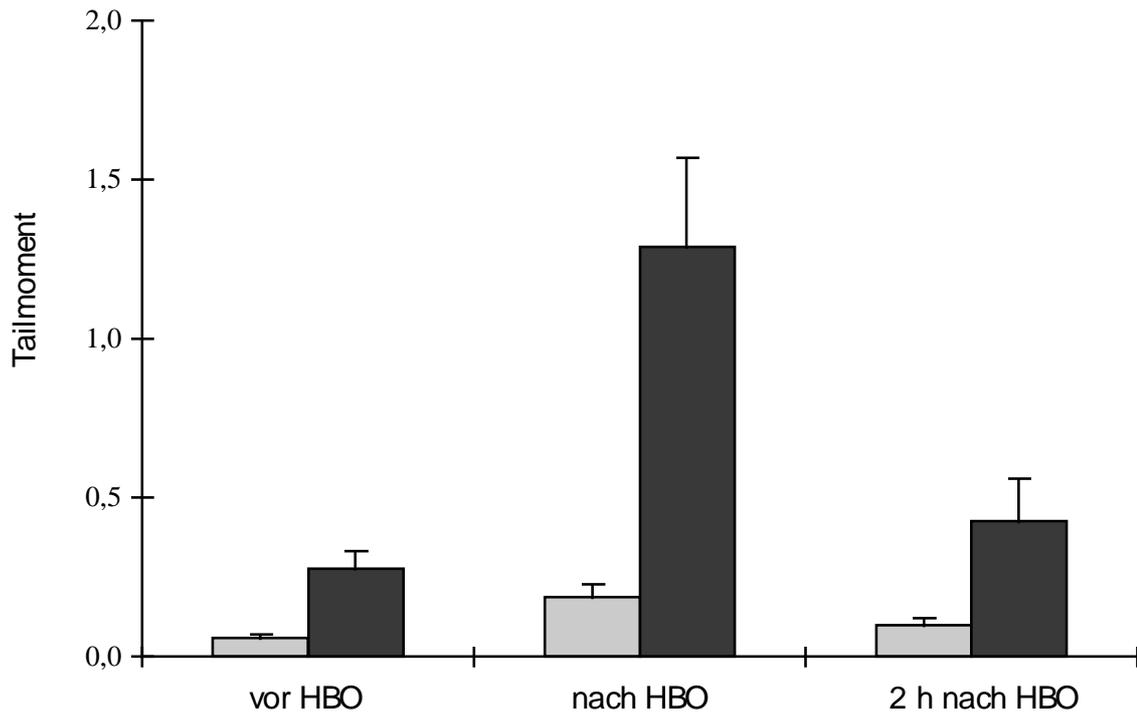


Abbildung 27: DNA Migration (Tailmoment) vor, direkt nach und 2 h nach HBO mit und ohne FPG-Nachinkubation. Mittelwerte und SEM von 12 Probanden. □ Standardprotokoll, ■ FPG-Nachinkubation.

3.1.5 Untersuchung chromosomaler Schäden nach einmaliger HBO

Zur Untersuchung der Frage, ob der im Comet Assay gefundene genotoxische Effekt zu Chromosomenschäden führt, wurde Blut von Probanden vor und nach einer HBO im Mikronukleus Test eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Tabelle 7: Die Anzahl von Mikronuklei in Leukozyten von Probanden vor und nach einer HBO-Behandlung.

Proband ^{a)}	vor HBO [MNC] ^{b)}	nach HBO [MNC] ^{b)}
JB	6	7
KD	3	3
SF	5	7
AH	5	6
SK	6	8
OM	3	10
OM	9	10
SP	0	4
SP	11	9
DT	7	4
PW	3	5
Mittelwert	5.27	6.64
SEM	0.93	0.74

a) Von den Probanden OM und SP wurden Werte aus zwei unabhängigen Versuchen gewertet.

b) Mikronukleihaltige Zellen (MNC) pro 1000 ausgewerteter, binukleärer Zellen.

Der Mittelwert von 11 Probanden zeigte keinen deutlichen Anstieg der mikronukleihaltigen Zellen nach HBO. Bei den individuellen Werten wurde lediglich bei OM eine deutliche Erhöhung gefunden. Bei einem zweiten Versuch wurde jedoch auch für OM keine erhöhte Rate an Mikronuklei festgestellt. Alle Werte liegen im Bereich der historischen Kontrolle (0 - 13 MN).

Die HBO hatte nur einen geringen Einfluß auf die Zellproliferation. Wie in Tabelle 8 zu sehen ist, lag der Proliferationsindex (NDI) nach HBO bei zwei Probanden geringfügig unter dem vor der HBO. Bei allen drei Probanden stieg nach HBO der Anteil einkerniger Zellen leicht an.

Tabelle 8: NDI (nuclear division index) für die Probanden JB, SK und OM vor und nach einer HBO.

Anzahl der Zellen mit:	JB		SK		OM	
	vor HBO	nach HBO	vor HBO	nach HBO	vor HBO	nach HBO
1 N	72	112	90	169	109	114
2 N	244	186	273	218	208	239
3 N	14	17	14	15	24	12
> 4 N	170	185	123	98	159	129
NDI	2,56	2,55	2,34	2,08	2,47	2,29

N: Zellkern pro Zelle

3.1.6 T-Zellen-Klonierungstest und molekulare Analyse von Mutationen im HPRT-Gen

Da oxidativen Basenschäden, und hierbei insbesondere 8-Oxo-Gua, prämutagene Eigenschaften zugeschrieben werden, erfolgte mit dem T-Zellen-Klonierungstest die Untersuchung von Genmutationen am HPRT-Gen in Lymphozyten der Probanden.

3.1.6.1 Validierung des T-Zellen-Klonierungstests

Zur Etablierung der Methode wurden aus dem Blut von zwei Blutspendern je drei Ansätze parallel aufgearbeitet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 dargestellt. Die Klonierungsfrequenzen lagen in beiden Experimenten ungewöhnlich hoch, bei Spender 4 sogar über 100 %. In diesen Versuchen waren je eine oder zwei Zellen pro Well in den Kontrollplatten eingesetzt worden. Bei der verwendeten Berechnung für die Klonierungseffizienz kann es zu einem rechnerischen Fehler kommen, wenn nur eine Zelle eingesetzt wird. In weiteren Versuchen wurden daher 2 Zellen/Well eingesetzt. Aufgrund der hohen Klonierungsfrequenz errechnete sich eine niedrige Mutantenfrequenz. Diese war aber besonders bei Spender 4 in den drei unabhängigen Ansätzen gut reproduzierbar.

Tabelle 9: Klonierungseffizienz und HPRT-Mutantenfrequenz im T-Zellen-Klonierungstest für Lymphozyten aus Buffy-coats.

Buffy coat ^a	CE P ₀ ^b		CE [%] ^c		Mutantenfrequenz	
	1N/Well	2 N/Well	1N/Well	2 N/Well	MF P ₀ ^d	MF/10 ⁶ Zellen
3-a	44/96	30/96	78	58	354/384	6,0
3-b	43/95	30/95	91	58	352/384	5,8
3-c	30/95	27/95	110	53	262/288	3,8
4-a	12/96	8/96	208	124	346/384	3,3
4-b	12/96	4/96	208	159	334/384	3,8
4-c	25/96	5/96	130	147	346/384	3,8

^a Lymphozyten aus zwei Buffy-coats (3 und 4) in drei parallelen Ansätzen (a - c)

^b CE P₀: Anzahl negativer Wells/gesamte Wells

^c CE: Klonierungseffizienz

^d MF P₀: Anzahl negativer Wells unter selektiven Bedingungen/gesamte Wells unter selektiven Bedingungen

3.1.6.2. HPRT-Genmutationen in T-Lymphozyten vor und nach einer HBO

Mit dem Blut von Probanden vor, 10 Tage nach HBO und 80 Tage nach HBO wurde der T-Zellen-Klonierungstest durchgeführt. In die Platten zur Berechnung der Klonierungseffizienz wurden 2 Zellen/Well eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

Aus der Tabelle wird deutlich, daß zwischen den individuellen Ergebnissen eine hohe Variabilität auftrat. Dies traf sowohl für die Klonierungseffizienz mit Werten zwischen 10 % - 103 % wie auch für die Mutantenfrequenz mit Werten zwischen $3,1 \times 10^{-6}$ - $36,6 \times 10^{-6}$ zu. Für den Mittelwert war mit $14,4 \times 10^{-6}$ und $13,2 \times 10^{-6}$ gegenüber der Kontrolle von $18,6 \times 10^{-6}$ keine Erhöhung der Mutantenfrequenzen 10 Tage oder 80 Tage nach HBO zu erkennen. Auch auf der individuellen Ebene konnten keine erhöhten Mutationsraten nach HBO gefunden werden. Alle Werte liegen im Bereich publizierter Kontrollen. Es ist allerdings auffällig, daß einige Probanden (SN, SS) wiederholt deutlich höhere Mutantenfrequenzen aufwiesen, als die anderen Probanden.

Tabelle 10: Klonierungseffizienz und HPRT-Mutationsfrequenz im T-Zellen-Klonierungs-Test vor und nach einer HBO.

Proband	vor HBO				10 Tage nach HBO				80 Tage nach HBO			
	CE P0 ^a	CE (%) ^b	MF P0 ^c	MF/10 ⁶	CE P0 ^a	CE (%) ^b	MF P0 ^c	MF/10 ⁶	CE P0 ^a	CE (%) ^b	MF P0 ^c	MF/10 ⁶
SF	48/192	69	412/480	11	24/192	103	320/384	8,9	n.d.	-	n.d.	-
PW	40/192	78	262/275	3,1	37/192	83	452/480	3,6	n.d.	-	n.d.	-
IJ	77/192	46	176/224	26,2	86/192	40	202/237	20	n.d.	-	n.d.	-
TR	113/192	26	282/316	21,9	110/192	27	251/271	14,2	n.d.	-	n.d.	-
SN	102/192	32	142/173	30,9	111/192	27	207/241	28,2	n.d.	-	n.d.	-
SS	157/192	10	158/170	36,6	133/192	18	257/288	31,6	n.d.	-	n.d.	-
JB	69/192	51	160/186	14,8	91/192	38	371/384	4,5	100/192	33	199/212	9,6
CD	100/192	33	135/139	4,4	29/192	95	341/383	6,1	114/192	26	268/286	12,5
OM	n.d.	-	n.d.	-	52/192	65	353/384	6,5	109/192	28	273/284	7,1
SP	n.d.	-	n.d.	-	78/192	45	320/384	20,3	143/192	15	231/248	23,7
Mittelwert		43,1		18,6		54,1		14,4		25,5		13,2
SEM		8,0		4,3		9,6		3,2		3,8		3,7

^a CE P0: Anzahl negativer Wells/ gesamte Wells

^b CE: Klonierungseffizienz

^c MF P0: Anzahl negativer Wells unter selektiven Bedingungen/ Anzahl gesamter Wells unter selektiven Bedingungen

3.1.6.3 Molekulare Analyse von HPRT-defizienten Klonen

Es wurden vierzig 6-TG-resistente Klone isoliert und zur molekularen Analyse aufbewahrt. Das HPRT-Gen von insgesamt 27 Klonen wurde sequenziert. Für die restlichen Klone konnte kein für die Sequenzierung geeignetes PCR-Produkt amplifiziert werden. Wenn auf cDNA-Basis die Deletion von mindestens einem Exon festgestellt wurde, erfolgte eine Multiplex PCR mit genomischer DNA, um zu überprüfen, ob eine Deletion auf genomischer Ebene vorliegt, oder ob es sich um eine Splice-Mutation handelt. Für die Klone, die nicht sequenziert werden konnten, wurde ebenfalls eine Multiplex-PCR durchgeführt. Die Ergebnisse der Sequenzierung sind in Tabelle 11 dargestellt. Der am häufigsten auftretende Mutationstyp waren Basenaustausche. Neben einer Frameshift Mutation durch Deletion einer Base wurden 5 Splice Mutationen, die den Verlust eines beziehungsweise zwei oder vier Exons nach sich zogen, detektiert. Für 3 Klone konnte keine Mutation nachgewiesen werden. Die Mutation am Basenpaar 181 trat bei dem Probanden PW sowohl vor wie auch nach der HBO auf.

Die Multiplex-PCR ergab für keinen der analysierten Klone eine Deletion auf genomischer Ebene. Alle Klone wiesen das in Abbildung 15 dargestellte Bild mit Wildtypmuster auf.

Tabelle 11: Mutationen in T-Lymphozyten von Probanden vor und nach einer HBO.

	Klon Nr. ¹⁾	Mutation	Position	Exon	Änderung der cDNA/des Proteins
Proband SF	6/1	GC> AT	684	8	Arg> Lys
	6/7	GC> CG	237	3	Arg> Pro
	6/3	CG> GC	453	4	Ser> Stop
	6/5	-T	506	6	frameshift, stop bp 651
	6/2	Splice Mutation			Verlust Exon 7
	6/6	Splice Mutation			Verlust Exon 8
	6/8	Splice Mutation			Verlust Exon 2-3
	8/3	CG> TA	548	6	Pro> Ser
	8/5	GC> TA	220	3	Arg> Ser
	8/8	GC> AT	554	6	Gly> Glu
8/10	TA> CG	359	3	Ser> Pro	
Proband FW	7/1	GC> CG	293	3	Gly> Arg
	7/3	GC> TA	181	2	Leu> Phe
	7/11	GC> TA	181	2	Leu> Phe
	7/12	GC> TA	181	2	Leu> Phe
	7/15	GC> TA	181	2	Leu> Phe
	7/18	GC> TA	181	2	Leu> Phe
	7/16	TA> AT	330	3	Ile> Asn
	7/19	Splice Mutation			Verlust Exon 2-5
	7/4	-			keine Veränderung
	7/17	-			keine Veränderung
	7/20	-			keine Veränderung
	9/1	AT> TA	195	2	Ile> Phe
9/7	GC> AT	293	3	Gly> Arg	
9/8	GC> AT	486	5	Gln> Lys	
9/9	GC> TA	181	2	Leu> Phe	
9/2	Splice Mutation			Verlust Exon 4	

¹⁾Die Klone 6/1-6/8 und 7/1-7/20 sind aus den Versuchen vor HBO, 8/3-8/10 und 9/1-9/9 nach HBO.

3.1.7 Einfluß der GST-Genotypen auf genotoxische Effekte und HPRT-Mutationen

Der Einfluß von Glutathion-S-Transferase Genen auf die Sensitivität gegenüber Xenobiotika und auch oxidativem Streß wird diskutiert. Daher wurden die Genotypen für GSTM1 und GSTT1 bei den Probanden bestimmt.

Probanden, die für diese Arbeit an einer HBO teilgenommen haben, wurden hinsichtlich ihres GSTM1/GSTT1-Genotyps untersucht. Das Ergebnis ist in Tabelle 12 dargestellt. Sieben Probanden (33,3 %) wiesen mindestens je ein Normal-Allel für GSTM1 und GSTT1 auf. Zwischen homozygot oder heterozygot konnte hier nicht unterschieden werden. Zwei Probanden (DT und SH) waren für den Locus GSTT1 homozygot deletiert (11,1 %). Weitere sieben Probanden waren homozygot für die Deletion des GSTM1-Gens (33,3 %) und lediglich drei Probanden (16,7 %) wiesen homozygot Null-Allele für GSTM1 und GSTT1 auf.

Tabelle 12: Übersicht über GSTM1- und GSTT1-Genotypen der Probanden.

GSTM1/GSTT1			
+ / +	+ / -	- / +	- / -
SF	SH	JB	SN
RG	DT	CC	SS
AH		CD	PW
IJ		SK	
KK		OM	
SP		RM	
DK		TR	

Es wurde im weiteren untersucht, ob in dem kleinen Kollektiv der Probanden Hinweise auf eine Korrelationen zwischen der Sensitivität gegenüber oxidativem Streß und den entsprechenden Genotypen besteht.

Für die Probanden mit den Genotypen GSTM+/GSTT+ und GSTM-/GSTT+ ist das Tailmoment vor und nach HBO mit FPG-Nachinkubation in Tabelle 13 zusammengestellt. Eine Korrelation des genotoxischen Effektes mit dem Genotyp konnte nicht abgeleitet werden, da besonders bei den Probanden OM und SP deutlich wurde, daß

andere individuelle Schwankungen für die Kontrolle vor HBO ebenso wie für die Höhe des Effektes nach HBO von Bedeutung sind. Der leicht über dem Wert der GSTM+/GSTT+ liegende Mittelwert der GSTM-/GSTT+-Gruppe, war nicht signifikant höher.

Tabelle 13: Effekte im Comet Assay mit FPG-Nachbehandlung in Leukozyten von Probanden vor und nach HBO und deren GSTM/GSTT-Genotypen.

Proband	Genotype	Tailmoment		
	GSTM1/GSTT1	vor HBO	nach HBO	Differenz*
AH	+ / +	0,25	0,93	0,68
KD	+ / +	0,07	1,27	1,20
SP	+ / +	0,18	0,92	0,74
SP	+ / +	0,84	1,58	0,74
Mittelwert	+ / +	0,34	1,18	0,84
JB	- / +	0,37	1,06	0,69
CD	- / +	0,71	2,11	1,40
OM	- / +	1,20	1,42	0,22
OM	- / +	0,14	1,57	1,43
Mittelwert	- / +	0,61	1,54	0,94

* durch HBO induziert

Desweiteren wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen den Genotypen und der Mutantenfrequenz im T-Zellen-Klonierungstest besteht. In der untersuchten Gruppe wurde kein Zusammenhang zwischen Mutantenfrequenz und Genotyp beobachtet (Tabelle 14). Für den Probanden IJ (GSTM+/GSTT+) wurde ebenso eine relativ hohe Mutantenfrequenz ermittelt, wie für SN (GSTM-/GSTT-). Die hohe Mutantenfrequenz von SS beruht dagegen auf einer niedrigen Klonierungsfrequenz (Tabelle 10).

Tabelle 14: GSTM/GSTT-Genotypen und Mutantenfrequenzen im T-Zellen-Klonierungstest vor und nach HBO.

Proband	Genotyp	MF/10 ⁶	
	GSTM1/GSTT1	vor HBO	10 Tage nach HBO
SF	+ / +	11	8,9
IJ	+ / +	26,2	20
SP	+ / +	n.d.	20,3
TR	+ / -	21,9	14,2
JB	- / +	14,8	4,5
CD	- / +	4,4	6,1
OM	- / +	n.d.	6,5
PW	- / -	3,1	3,6
SN	- / -	30,9	28,2
SS	- / -	36,6	31,6

MF: Mutantenfrequenz pro 10⁶ Zellen

3.2. Untersuchungen zur Adaptation nach einmaliger HBO

In Abbildung 18 ist dargestellt, daß bei HBO-Behandlungen an aufeinanderfolgenden Tagen lediglich nach der ersten Kammerfahrt ein genotoxischer Effekt im Comet Assay gemessen wurde. Dieser Hinweis auf eine Adaptation sollte durch die folgenden Experimente weiter untersucht werden. Außerdem sollte der Frage nachgegangen werden, ob eine HBO Auswirkungen auf die genotoxische Wirkung ROS-generierender Substanzen in vitro hat.

3.2.1. Modifikationen des Behandlungsprotokolls

Die Bedingungen, die zu einem genotoxischen Effekt nach HBO führten, sollten weiter untersucht werden. Besonders wichtig hierbei war die Frage, ob der Initialschaden notwendig ist, um vor Schäden durch die folgenden Behandlungen geschützt zu sein. Probanden bekamen an drei aufeinanderfolgenden Tagen hyperbaren Sauerstoff zu atmen. Die Zeiten, in denen 100 % Sauerstoff gegeben wurde, erhöhte sich von 1 x 20 Minuten über 2 x 20 Minuten auf 3 x 20 Minuten am dritten Tag mit jeweils 5 Minuten Pause zwischen den Intervallen. Zu keinem Zeitpunkt konnte ein genotoxischer Effekt im Comet Assay nachgewiesen werden (Abbildung 28). Das Tailmoment aller Probanden lag auf Kontrollniveau oder leicht darunter. Für den dritten Tag mit einer Behandlung von insgesamt 60 Minuten und damit dem in der Klinik angewendeten

Protokoll, wurde ein Tailmoment von 0,06 als Mittelwert der Probanden gemessen. Für die 60 minütige Exposition ohne langsame Erhöhung der Expositionszeit, konnte ein Tailmoment von 0,38 nachgewiesen werden (Abbildung 18).

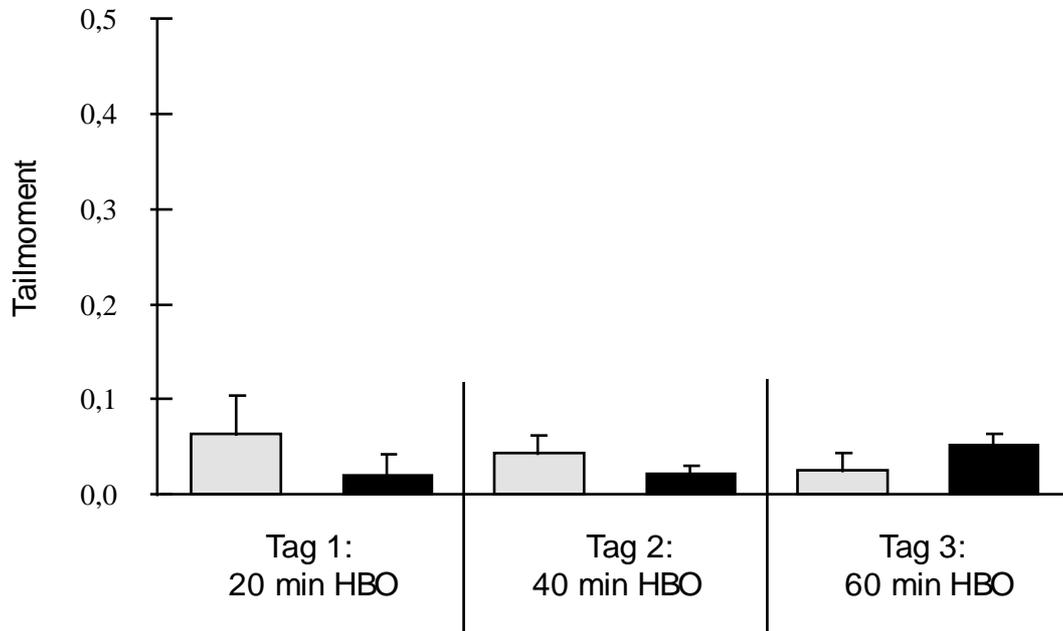


Abbildung 28: DNA Migration (Tailmoment) in Leukozyten nach schrittweiser Erhöhung der HBO Behandlungsdauer von 20 min am 1.Tag auf 40 min am 2.Tag und 60 am min 3.Tag. Mittelwerte und Standardabweichungen von 4 Probanden. ■ vor HBO, ■ nach HBO.

3.2.1.1. Verabreichung von Vitamin E oder N-Acetylcystein vor einer HBO

Bei Einsatz einer HBO-Behandlung in der Klinik stellt sich die Frage, ob der in dieser Arbeit gezeigte genotoxische Effekt nur durch Veränderung des Behandlungsprotokolls zu vermeiden ist, oder ob auch durch den Einsatz von antioxidativ wirkenden Substanzen ein DNA-schädigender Effekt vermeidbar ist.

Drei Probanden bekamen sieben Tage vor der HBO täglich 800 mg Vitamin E. Auf die DNA-Migration im Comet Assay nach einer HBO hatte diese Vitamingabe keine Auswirkungen (Abbildung 29). Auch bei Nachinkubation mit FPG oder EndoIII konnte kein Unterschied zum Tailmoment von Probanden ohne Vitamingabe festgestellt werden.

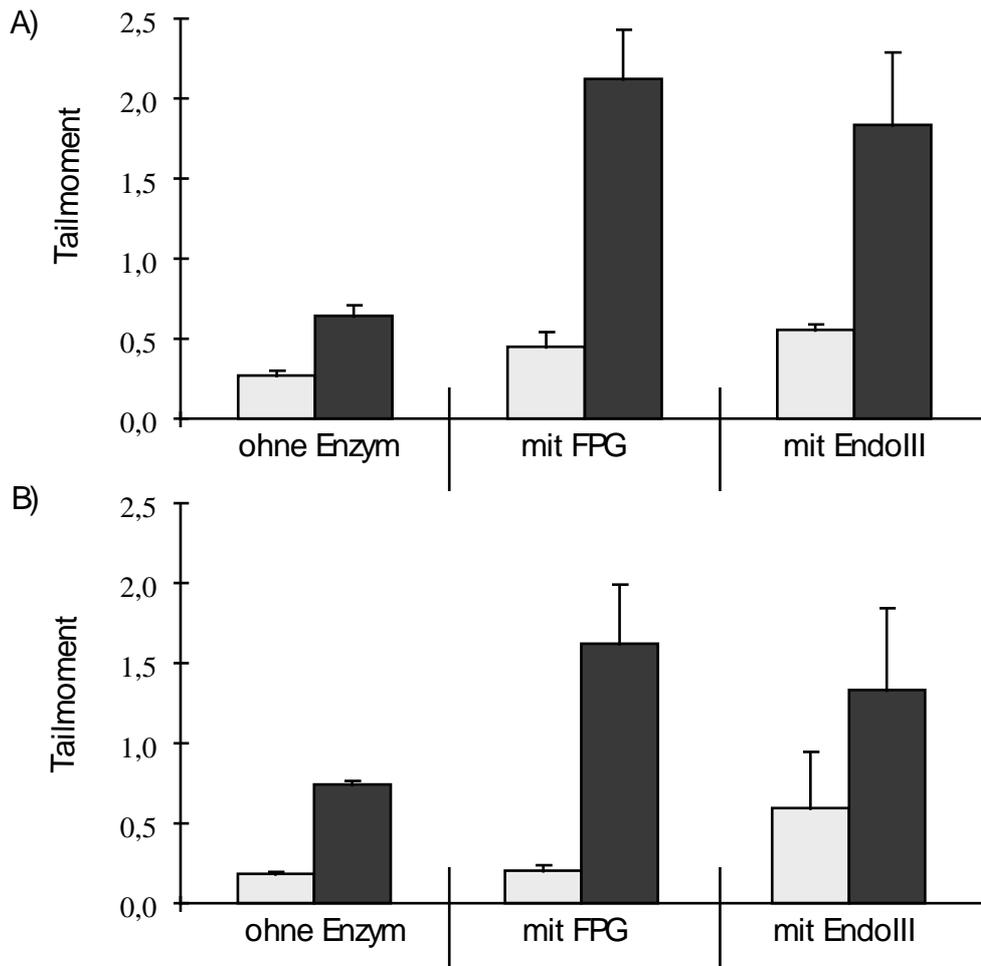


Abbildung 29: Induktion von DNA Migration in Leukozyten von Probanden, die A) für 7 Tage vor einer HBO 800 mg Vitamin E pro Tag eingenommen haben und B) eine HBO ohne vorherige Vitamingabe absolvierten. Es sind in beiden Versuchen die gleichen Probanden untersucht worden. Die Präparate wurden ohne Nachinkubation mit Enzym, sowie mit FPG- und EndoIII-Nachbehandlung ausgewertet. Mittelwerte und SEM von drei Probanden. □ Vor HBO, ■ nach HBO.

Vergleicht man den Mittelwert der Differenz zwischen dem Tailmoment vor und nach der HBO (also den induzierten Wert) von den Probanden, so errechnet sich ohne Vitamin E ein Tailmoment von 0,56 und mit Vitamin E ein Tailmoment von 0,37. Bei Nachinkubation mit FPG erhöhte sich der induzierte Wert auf 1,4 ohne Vitamin E, auf 1,6 mit Vitamin E. Für EndoIII zeigte sich ein ähnliches Bild, die Werte stiegen hier auf 0,8 beziehungsweise 1,3.

N-Acetylcystein (NAC) erhöht den Spiegel freier SH-Gruppen und kann so zum Schutz vor freien Radikalen beitragen. Vier Probanden erhielten eine Stunde vor einer HBO eine orale Dosis von 400 mg NAC. Eine Kontrollgruppe wurde parallel untersucht. Die

Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt. Bis auf den Probanden PR zeigten alle Probanden eine eindeutige Induktion von DNA-Effekten. Der Mittelwert der Zellen vor HBO lag nach Gabe von NAC leicht unter dem ohne NAC, dieser Unterschied war aber nicht signifikant.

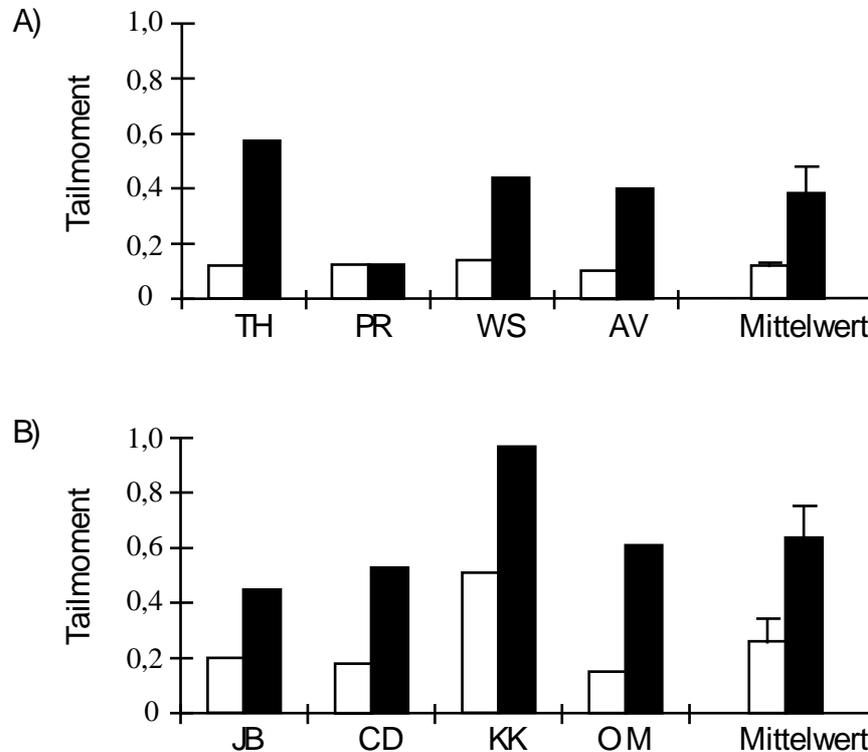


Abbildung 30: DNA-Migration (Tailmoment) in Leukozyten vor (□) und nach einer HBO (■). Die Probanden in A) erhielten eine orale Gabe von 400 mg NAC eine Stunde vor der HBO. Als Kontrolle sind in B) die Werte von 4 Probanden aus dem gleichen Experiment dargestellt. Mittelwerte aus 100 Zellen je Proband sowie Mittelwert und SEM der 4 Probanden sind dargestellt.

Aufgrund einer besseren Verfügbarkeit von NAC im Blut nach intravenöser Gabe, wurde eine HBO nach Verabreichung von 400 mg NAC i.v. für zwei Probanden durchgeführt. Vier Probanden dienten im gleichen Experiment als Kontrolle ohne NAC. Auch die Applikation von NAC i.v. führte nicht zu einem Schutz vor den genotoxischen Auswirkungen der HBO (Abbildung 31). Beide supplementierten Probanden zeigten deutliche DNA-Effekte in ihren Leukozyten nach HBO. Diese lagen im Bereich der in dem gleichen Versuch erhobenen Daten mit Kontrollpersonen. Lediglich TH wies einen stark erhöhten Wert in den Kontrollzellen auf. Durch ein anschließendes Gespräch konnte eine aufkommende Infektion als mögliche Ursache für den erhöhten Kontrollwert vermutet werden. Die absoluten Werte vor und nach HBO lagen über

denen des entsprechenden Versuchs mit oraler Gabe von NAC. Eine mögliche Ursache für diesen Unterschied kann in der testbedingten Variabilität liegen.

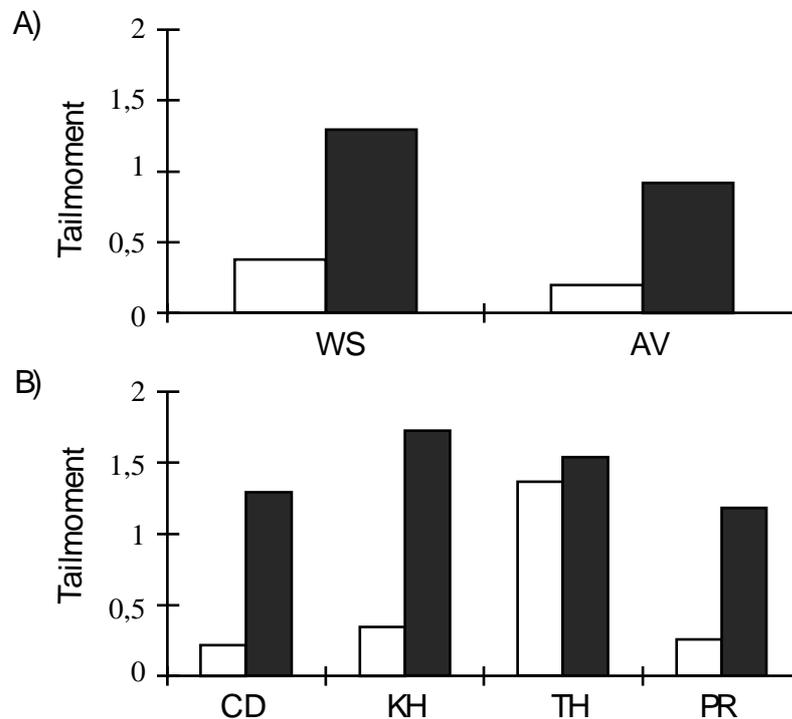


Abbildung 31: DNA Migration (Tailmoment) in Leukozyten vor (□) und nach einer HBO (■). WS und AV erhielten 400 mg NAC direkt vor der HBO intravenös (i.v.) appliziert (A), als Kontrolle sind 4 Probanden aus dem gleichen Experiment dargestellt (B). Mittelwerte von je 100 Zellen pro Proband.

3.2.2 In vitro Untersuchungen zur Adaptation

Eine Adaptation in vivo wurde im Vorangegangenen für HBO-induzierte Effekte beschrieben. Diese Adaptation sollte weiter untersucht werden. Im folgenden werden Ergebnisse von in vitro-Versuchen beschrieben. Für diese in vitro Versuche erfolgte eine Behandlung von Blut mit ROS-generierenden Agenzien. Das Blut wurde vor und einen Tag nach der HBO entnommen, um so die gleichen Bedingungen wie bei einer Adaptation in vivo zu erzielen. Als ROS-generierende Quellen wurden γ -Strahlung und H_2O_2 ausgewählt.

3.2.2.1 Der Effekt einer HBO auf die genotoxische Wirkung von γ -Strahlung

γ -Strahlung erzeugt durch Radiolyse von Wasser OH-Radikale. Die Behandlung von Vollblut mit 1 und 2 Gy führte zu einer dosisabhängigen Zunahme der DNA-Migration im Comet Assay bei allen Probanden (Abbildung 32). Nach HBO waren die durch 1 und 2 Gy induzierten Mittelwerte der DNA-Migration geringfügig niedriger als vor HBO, dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.

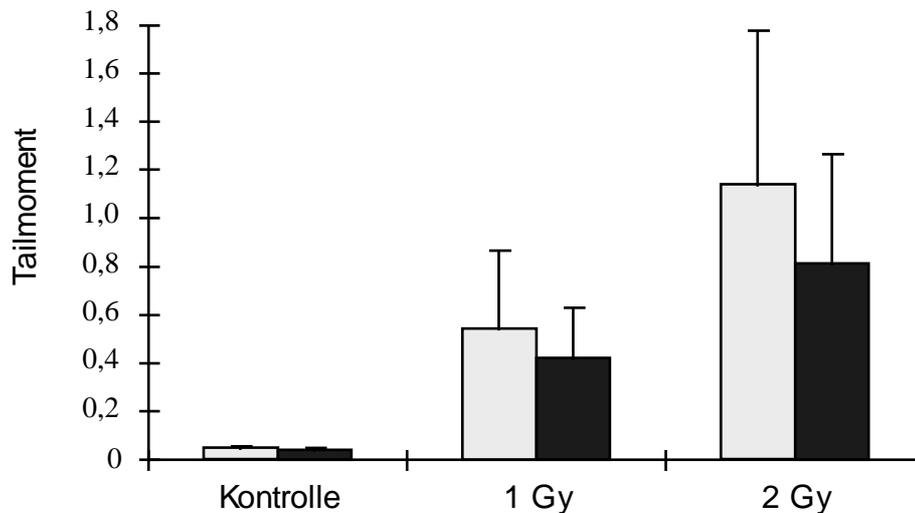


Abbildung 32: Die Induktion von DNA-Migration durch Bestrahlung von Vollblut mit 1 Gy und 2 Gy. Blut wurde \square vor und \blacksquare am Tag nach einer HBO entnommen. Mittelwerte und SEM von 8 Probanden.

Für die Behandlung von Vollblut mit γ -Strahlung vor und nach HBO wurde als zweiter Endpunkt der Mikronukleustest durchgeführt. Die Bestrahlung der Zellen erfolgte ebenfalls mit 1 und 2 Gy. In Abbildung 33 wird deutlich, daß durch γ -Strahlung dosisabhängig Mikronuklei im Blut induziert wurden. Insbesondere bei der Bestrahlung mit 2 Gy wurde verstärkt das Auftreten binuklearer Zellen mit zwei oder drei Mikronuklei beobachtet. Die HBO-Behandlung von Probanden hatte auf die Induktion von Mikronuklei in deren Lymphozyten keinen Effekt.

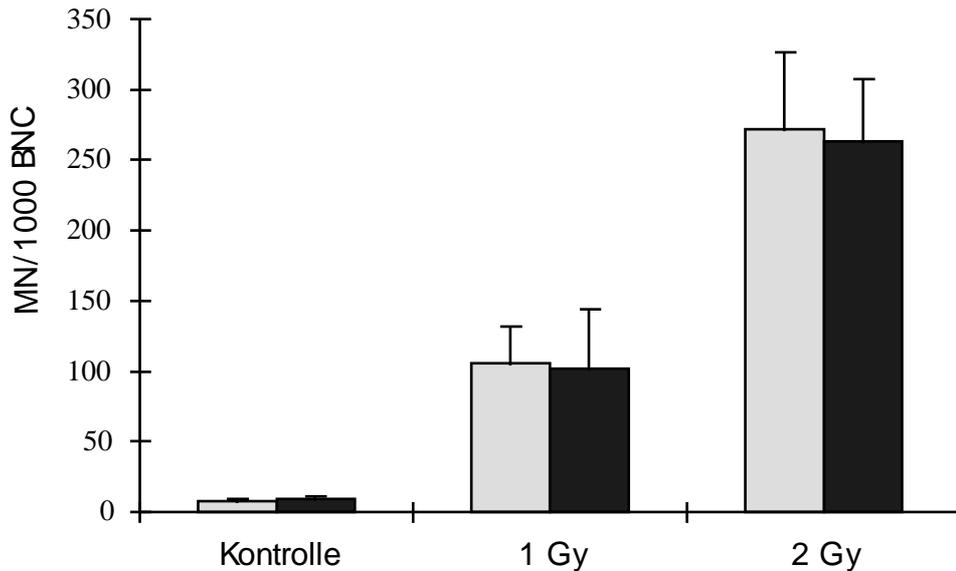


Abbildung 33: Die Induktion von Mikronuklei (MN) durch Bestrahlung von Vollblut mit 1 Gy und 2 Gy. Blut wurde □ vor einer HBO und ■ einen Tag nach einer HBO entnommen. Mittelwerte und SEM von 8 Probanden. BNC: binukleare Zellen.

Die Anzahl der Mikronuklei im Mittelwert von 8 Probanden liegt für 1 Gy bei 106 und 101 Mikronuklei vor beziehungsweise nach HBO und für 2 Gy bei 272 und 264 Mikronuklei vor und nach HBO. Dies ist kein signifikanter Unterschied. Auch für das Auftreten mikronukleihaltiger Zellen ergibt sich kein signifikanter Unterschied vor und nach HBO. Der Mittelwert von 8 Probanden liegt für 1 Gy bei 96 und 92 beziehungsweise für 2 Gy bei 231 und 226 mikronukleihaltiger Zellen pro 1000 binuklearer Zellen vor und nach HBO. Daraus folgt, daß nach HBO die Induktion von mehr als einem Mikronukleus pro Zelle durch γ -Strahlung sich nicht von der vor einer HBO unterscheidet.

3.2.2.2 Der Effekt einer HBO auf die genotoxische Wirkung von H_2O_2

Auch H_2O_2 erzeugt über die Fenton-Reaktion OH-Radikale und wurde als weitere ROS-generierende Quelle verwendet. In Abbildung 34 ist die Auswirkung einer fünfminütigen Behandlung von Vollblut auf Eis mit $200 \mu M H_2O_2$ zu sehen.

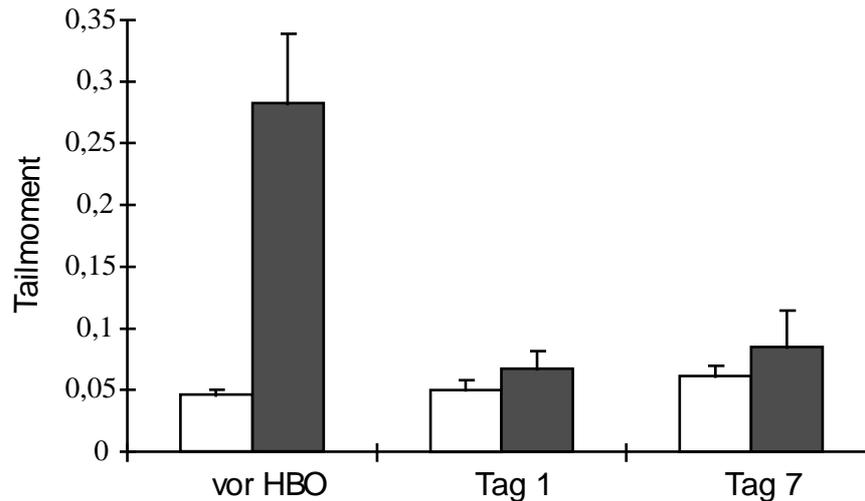


Abbildung 34: Die Induktion von DNA-Migration durch Behandlung von Vollblut mit 200 µM H₂O₂. Blut wurde vor einer HBO, sowie einen und sieben Tage nach HBO entnommen. Mittelwerte und SEM von 8 Probanden; □ ohne H₂O₂, ■ 200 µM H₂O₂.

Die Behandlung führte im Vollblut vor HBO zu einem signifikanten ($p < 0,01$) Anstieg des Tailmoments. Im Blut, das einen Tag oder sieben Tage nach der HBO entnommen wurde, konnte durch die gleiche Behandlung keine erhöhte DNA-Migration nachgewiesen werden. Das durch H₂O₂ induzierte Tailmoment betrug am Tag eins und sieben 0,02 und lag damit signifikant ($p < 0,01$) niedriger, als das vor HBO durch H₂O₂ induzierte Tailmoment von 0,24. Von einer Person, die keine HBO erhielt, wurde Blut als interne Kontrolle zu den jeweiligen Zeitpunkten entnommen und mit H₂O₂ behandelt. Bei der Kontrolle wurde ein Tailmoment im Bereich von 0,15 - 0,23 durch H₂O₂ induziert (ohne Abbildung).

Um die Frage zu klären, ob das Blut der Probanden auch gegen die Induktion von oxidativ geschädigten Basen durch H₂O₂ geschützt ist, wurde eine Nachinkubation mit FPG durchgeführt. Um einen direkten Vergleich der induzierten Effekte zu ermöglichen, wurden die jeweiligen Kontrollen ohne H₂O₂-Behandlung abgezogen, es ist also nur der durch H₂O₂ induzierte Effekt dargestellt. Wie bereits gezeigt (Abbildung 34), induzierte die H₂O₂-Behandlung von Vollblut einen Anstieg des Tailmoments. Dieser Effekt konnte durch Nachinkubation mit FPG deutlich verstärkt werden (Abbildung 35). Im Blut nach einer HBO war der durch H₂O₂ induzierte Effekt signifikant niedriger als vor der HBO. Auch die durch H₂O₂ induzierten, oxidativ geschädigten Basen wurden im Blut nach HBO in signifikant geringerer Menge gemessen ($p < 0,01$).

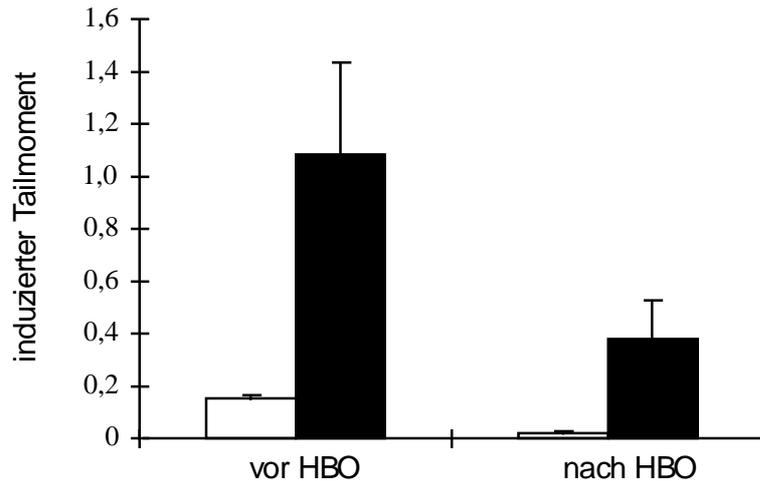


Abbildung 35: Der Effekt des FPG-Proteins auf die DNA-Migration in H₂O₂-behandeltem Vollblut (vor und einen Tag nach einer HBO). Mittelwerte und SEM von 4 Probanden. □ 200 µM H₂O₂, ■ 200 µM H₂O₂ + FPG.

Ein ähnliches Ergebnis lieferte der Mikronukleus Test nach in vitro Behandlung mit H₂O₂ (Abbildung 36). Es wurde ebenfalls Blut von Probanden vor, einen Tag und sieben Tage nach einer HBO mit H₂O₂ (1 mM) behandelt. Eine eindeutige Induktion von Mikronuklei im Blut vor einer HBO durch H₂O₂ ist erkennbar. Im Blut, das einen oder sieben Tage nach HBO entnommen wurde, konnten durch H₂O₂-Behandlung signifikant weniger ($p < 0,01$) Mikrokerne induziert werden. Die Anzahl der Mikronuklei betrug nach H₂O₂-Behandlung nur 6 MN und lag damit im Bereich der historischen Kontrolle von 0 - 13 Mikrokernen.

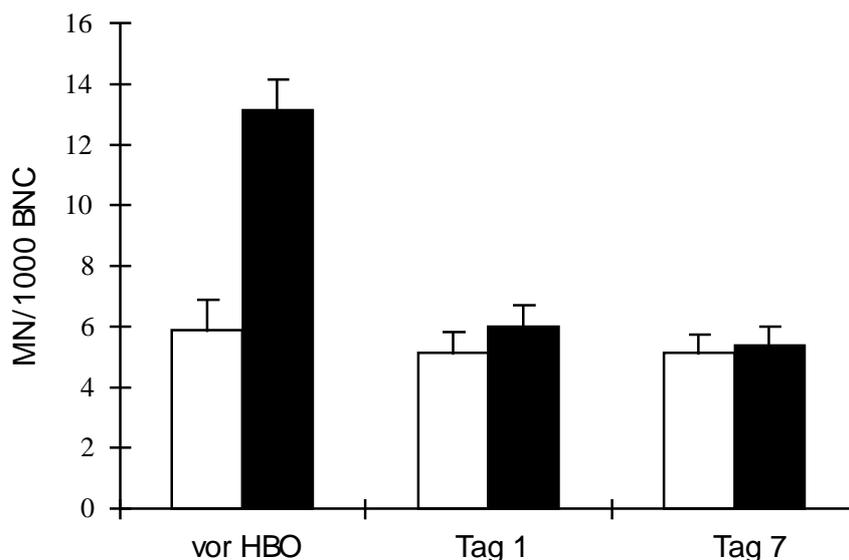


Abbildung 36: Die Induktion von Mikronuklei (MN) durch Behandlung von Vollblut mit 1 mM H₂O₂ (vor, einen und sieben Tage nach HBO). Mittelwerte und SEM von 8 Probanden. □ Kontrolle, ■ 1 mM H₂O₂.

Für die Klärung der Frage, ob der Schutz vor H_2O_2 -induzierten, genotoxischen Schäden im Vollblut generiert wird, oder ob es ein zellulärer Schutzmechanismus der analysierten Blutzellen ist, wurden *in vitro* Versuche mit H_2O_2 -Behandlung an isolierten Lymphozyten vor und nach einer HBO durchgeführt (Abbildung 37). Hierbei zeigte sich für $20 \mu\text{M}$ H_2O_2 eine deutliche Induktion der DNA-Migration im Comet Assay mit Lymphozyten vor einer HBO ($p < 0,01$).

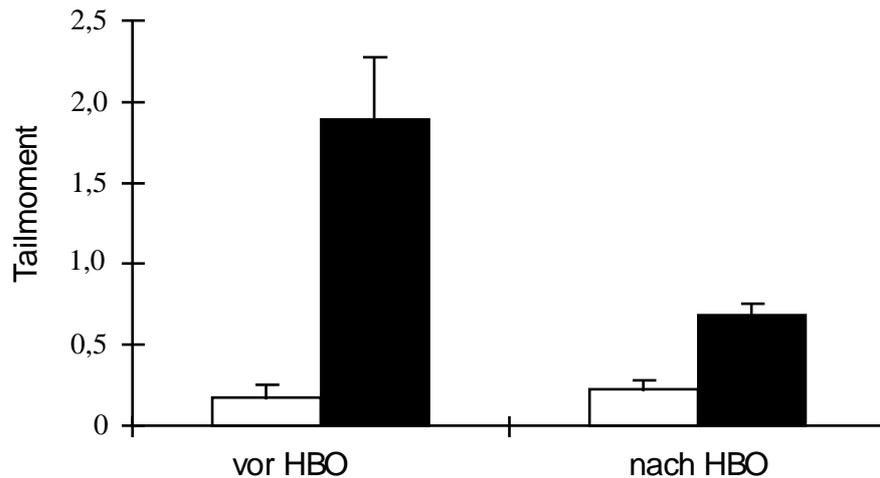


Abbildung 37: Induktion von DNA-Migration in Lymphozyten durch $20 \mu\text{M}$ H_2O_2 . Lymphozyten wurden vor und einen Tag nach einer HBO isoliert. Mittelwerte und SEM von 8 Probanden. □ Kontrolle, ■ $20 \mu\text{M}$ H_2O_2 .

Auch nach HBO induzierte H_2O_2 einen signifikanten Anstieg des Tailmoments in isolierten Lymphozyten ($p < 0,01$). Dieser Anstieg erwies sich allerdings als signifikant niedriger als die vor HBO durch H_2O_2 induzierte Zunahme des Tailmoments. Der adaptive Schutz ist demzufolge auch auf zellulärer Basis zu beobachten. Die Schutzwirkung vor H_2O_2 -induzierten Effekten im Comet Assay hielt auch in Lymphozyten mindestens sieben Tage an. Es konnte auch sieben Tage nach HBO in isolierten Lymphozyten von vier Probanden keine signifikant erhöhte DNA-Migration nachgewiesen werden.

Als zweiter Endpunkt zur Überprüfung des adaptiven Schutzes vor oxidativem Streß wurde wieder der Mikronukleustest durchgeführt. Vor und einen Tag nach einer HBO wurden isolierte Lymphozyten mit $40 \mu\text{M}$ H_2O_2 behandelt. Das Ergebnis von vier Probanden ist in Abbildung 38 dargestellt. Vor der HBO induzierte H_2O_2 einen signifikanten Anstieg mikronukleihaltiger Zellen ($p < 0,01$). Am Tag nach einer HBO konnte nur eine leichte Erhöhung gemessen werden, die nicht signifikant war. Der Unterschied

aber zwischen der Induktion von Mikronuklei vor HBO und einen Tag nach HBO war hoch signifikant ($p < 0,01$).

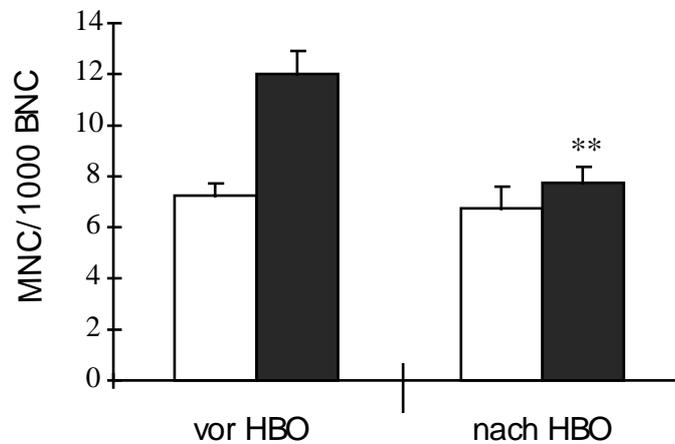


Abbildung 38: Induktion von Mikronuklei durch H₂O₂ in isolierten Lymphozyten. Blut wurde den Probanden vor und einen Tag nach HBO entnommen. Mittelwerte und SEM von 4 Probanden. □ ohne H₂O₂, ■ mit 40 µM H₂O₂.

Aus den hier dargestellten Ergebnissen geht eindeutig hervor, daß eine einmalige HBO vor der genotoxischen Wirkung von H₂O₂ schützen kann. Dieser Schutz dauerte mindestens sieben Tage an und war auch in isolierten Lymphozyten nachweisbar.

3.2.3 Nachweis von Vitaminen, Glutathion und antioxidativen Enzymen

Verschiedene Schutzmechanismen vor oxidativem Streß sind bereits bekannt. Dabei spielen unter anderem Vitamine und Glutathion eine Rolle, den Enzymen SOD, Katalase sowie Glutathion Peroxidase wird außerdem eine wichtige Bedeutung zugeschrieben. Die Bedeutung dieser Mechanismen für die beschriebene Adaptation sollte im folgenden untersucht werden.

3.2.3.1 Bestimmung des Vitamingehaltes und der antioxidativen Kapazität im Plasma

Der Gehalt der im Plasma enthaltenen Vitamine C, A und E wurde vor und nach einer HBO bestimmt. Keines der Vitamine zeigte nach HBO eine deutlich erhöhte Konzentration im Plasma (Tabelle 15). Der Vitamin C-Gehalt lag bei allen Probanden in einem Bereich von 30 - 37 $\mu\text{mol/l}$. Vitamin A wurde in einer Konzentration von 1,8 - 2,6 $\mu\text{mol/l}$ und Vitamin E in einer Konzentration von 16 - 25 $\mu\text{mol/l}$ gemessen. Die Mittelwerte lagen alle im Bereich der historischen Kontrollen des Labors.

Tabelle 15: Bestimmung der antioxidativen Vitamine im Blutplasma von Probanden vor und einen Tag nach einer HBO.

Probanden	Vitamin C [$\mu\text{mol/l}$]		Vitamin A [$\mu\text{mol/l}$]		Vitamin E [$\mu\text{mol/l}$]	
	vor HBO	Tag 1	vor HBO	Tag 1	vor HBO	Tag 1
AH	33,8	36,8	1,8	2,0	22,3	25,0
KD	32,2	37,6	2,6	2,4	23,4	23,3
OM	36,4	34,4	1,9	2,1	16,3	18,2
SP	31,4	30,7	2,3	2,2	25,7	22,7
Mittelwert	33,5	34,9	2,1	2,2	21,9	22,3

Der FRAP-Assay wird angewendet, um die antioxidative Kapazität zu bewerten. Dabei wird die Fähigkeit im Plasma, Fe^{3+} zu reduzieren, gemessen (ferric reducing ability of plasma). Hier wurde der antioxidative Status im Plasma vor und nach HBO mit dem FRAP-Assay bestimmt (Tabelle 16). Im Plasma ist der Wert für die vier Probanden nach HBO leicht erhöht, jedoch liegen alle Werte im angegebenen Normbereich. Die Erhöhung auf individueller Ebene spiegelt sich auch in der Steigerung um 23 % des Mittelwertes nach HBO gegenüber vor HBO wider. Dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant ($p > 0,5$).

Tabelle 16: Bestimmung der antioxidativen Kapazität mit dem FRAP-Assay im Plasma von Probanden vor und einen Tag nach einer HBO.

Proband	FRAP (Plasma)	
	[$\mu\text{mol/l}$]	
	vor HBO	Tag 1
PH	891,21	1233,02
IJ	735,74	863,29
KK	805,53	834,35
RK	895,82	1158,87
Mittelwerte	832,08	1022,38
Normbereich	638 - 1634 $\mu\text{mol/l}$	

3.2.3.2 Bestimmung des Glutathion-Gehaltes

Ebenfalls im Plasma und in der Lymphozytenfraktion wurde der Glutathiongehalt vor und nach einer HBO bestimmt. Die Messungen erfolgten an den Probanden, die an der in Abbildung 30 dargestellten Druckkammerfahrt mit oraler Gabe von NAC teilgenommen haben. Die Probanden JB - OM erhielten kein NAC. Für keinen Probanden ist ein Anstieg der der GSH-Plasmakonzentration zu erkennen (Tabelle 17). Für die intrazellulären GSH-Konzentrationen bietet sich ein eher uneinheitliches Bild, bei zwei Probanden konnte ein Anstieg nachgewiesen werden, bei den anderen Probanden war eine niedrigere intrazelluläre GSH-Konzentration meßbar. Nach oraler Gabe von 400 mg NAC war keine erhöhten GSH-Konzentrationen im Plasma nach HBO erkennbar. Die plasmatische GSH-Konzentration dieser Probanden lag deutlich, aber nicht signifikant unter der von den Probanden ohne NAC-Supplementation. Die zellulären GSH-Konzentrationen lagen im Bereich der nicht supplementierten Probanden, es konnte auch hier keine eindeutige Veränderung des GSH-Spiegels festgestellt werden.

Tabelle 17: Bestimmung des Glutathion-Gehaltes im Plasma und in der Lymphozytenfraktion von Probanden vor, einen und sieben Tage nach einer HBO.

	Proband	GSH - Plasma Konzentration [μ M]			Intrazelluläre GSH - Konzentration [μ M]		
		vor HBO	Tag 1	Tag7	vor HBO	Tag 1	Tag 7
a)	JB	8,8	22,6	13,7	37,7	64,8	47,9
	CD	41,9	23,2	21,5	37,1	47,9	47,3
	KK	51,0	73,2	8,9	60,5	54,5	16,7
	OM	149,5	48,5	27,5	36,5	16,7	27,5
	Mittelwert	62,8	41,9	17,9	43,0	46,0	34,8
b)	TH	7,1	10,1	11,9	25,1	39,5	53,9
	PR	16,7	21,5	41,3	33,5	36,5	37,7
	WS	17,3	26,3	13,1	61,1	21,5	46,1
	AV	35,9	14,9	23,3	55,1	46,7	52,7
	Mittelwert	19,2	18,2	22,4	43,7	36,0	47,6

a) ohne NAC-Supplementation,

b) Probanden nach oraler Gabe von 400 mg N-Acetylcystein (NAC).

3.2.3.3 Bestimmung der Superoxid Dismutase, Katalase und Glutathion Peroxidase

Adaptive Prozesse nach oxidativem Streß können es zu einer Erhöhung antioxidativer Enzyme führen. Derartige Prozesse sind bereits für SOD, Katalase und Glutathion Peroxidase beschrieben. In der Blutzellfraktion wurden daher diese antioxidativen Enzyme vor und nach HBO gemessen. In der Zellfraktion waren neben Leukozyten auch die Erythrozyten enthalten. Die Ergebnisse von acht Probanden sind in Tabelle 18 zusammengestellt. Für SOD wurden interindividuelle Unterschiede gezeigt, allerdings keine Erhöhungen auf individueller Ebene nach HBO. Alle Werte lagen in dem angegebenen Normbereich. Für Katalase war im Mittel kein Anstieg meßbar. Trotz Schwankungen auf individueller Ebene lagen alle Werte im Normbereich. Während die Probanden OM und SP eine Erhöhung des Katalase-Spiegels zeigten, waren für KK, RG und SH deutlich niedrigere Konzentrationen nach HBO nachweisbar. Bei AH und KD blieb der Spiegel unverändert. Lediglich ein Proband (SP) wies einen erhöhten Gehalt an Glutathion Peroxidase nach HBO auf. Die Werte aller anderen Probanden lagen im Bereich des Wertes vor HBO. Eine Erhöhung im Mittelwert wurde nicht gemessen, alle Werte lagen im Normbereich.

Tabelle 18: Messung antioxidativer Enzyme in der Zellfraktion aus Vollblut von Probanden vor und einen Tag nach einer HBO.

Proband	SOD [U/gHb]		Katalase [U/gHb]		Glutathion Peroxidase [U/gHb]		Hb [g/l]	
	vor HBO	Tag 1	vor HBO	Tag 1	vor HBO	Tag 1	vor HBO	Tag 1
AH	781,0	1053,5	68,4	63,4	8,6	14,7	341,5	299,0
KD	835,8	852,8	41,6	41,1	18,9	13,7	301,5	295,5
OM	1455,1	1459,5	28,6	66,8	32,2	30,4	267,0	259,0
SP	1704,4	1928,2	23,3	96,8	37,9	52,7	326,5	299,5
CD	1250,8	1235,3	25,8	24,2	52,8	52,8	319,0	332,0
KK	1494,5	1477,9	66,7	23,8	50,4	48,1	274,0	279,0
RG	1312,5	1100,0	135,0	17,5	42,5	38,2	304,0	315,0
SH	1333,3	1184,1	45,2	23,1	55,8	59,6	315,0	302,0
Mittelwert	1270,9	1286,4	54,3	44,6	37,4	38,8	306,1	297,6
Normbereich	553 - 1660		14 - 191		21 - 62		132 - 308	

Hb: Hämoglobin

Da sich die Konzentration der Enzyme auf den Hämoglobingehalt beziehen, ist dieser für alle Probanden aufgeführt. Auch hier ergaben sich keine deutliche Schwankungen, so daß eine eventuelle Erhöhung eines der Enzyme nicht durch gleichfalls erhöhten Hämoglobingehalt überdeckt wurde.

3.2.4 Untersuchung der durch Streß induzierbaren Proteine HSP70, Hämoxygenase und Ferritin

Auf verschiedenen Formen von Streß reagieren Zellen mit der Induktion des Proteins HSP 70 (heat shock protein). Es sollte daher geklärt werden, ob in vivo induzierter oxidativer Streß zu einer Erhöhung des HSP 70 im Menschen führt. Der Proteingehalt wurde im Western Blot bestimmt, und einer dieser Blots ist in Abbildung 39 gezeigt.

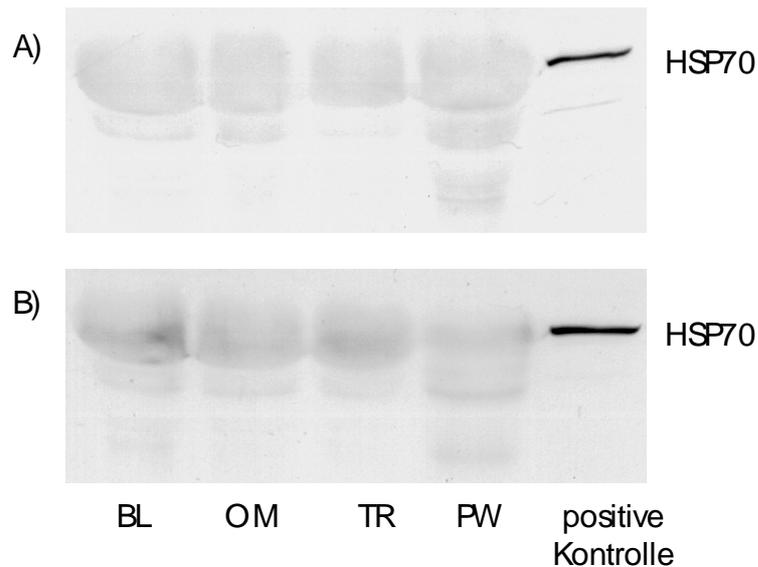


Abbildung 39: Darstellung des HSP70-Proteins im Western Blot. A) vor einer HBO, B) 24 Stunden nach einer HBO. Als positive Kontrolle wurden Zellen 30 Minuten auf 40°C erhitzt und dann 4 Stunden bei 37°C inkubiert.

In den Proben nach HBO war deutlich mehr HSP70-Anteil enthalten. Für eine quantitative Auswertung wurde eine weitere HBO durchgeführt und die Intensität der Banden bestimmt. Eine positive Kontrolle ist mit aufgetragen worden, und die ermittelten Werte wurden auf diese bezogen (Tabelle 19). Einen Tag nach HBO konnte für alle Probanden eine eindeutige Induktion des HSP70 nachgewiesen werden.

Tabelle 19: Nachweis des Hitze-Schock-Proteins HSP70 in Lymphozyten von Probanden vor und einen Tag nach einer HBO.

Proband	HSP 70 *	
	vor HBO	Tag 1
BL	26	128
OM	31	96
TR	41	149
PW	58	123

* prozentualer Anteil gegenüber der positiven Kontrolle

In Zellkulturen konnte von einigen Arbeitsgruppen durch oxidativen Streß eine Induktion der Hämoxygenase nachgewiesen werden. Ein Abbauprodukt der von der Hämoxygenase katalysierten Reaktion ist das Bilirubin. Dieses kann im Serum nachgewiesen werden. In Tabelle 20 sind die Bilirubinwerte von vier Probanden vor und einen Tag nach einer HBO dargestellt. Deutliche individuelle Schwankungen sind erkennbar, aber bei allen Probanden wurde nach der HBO ein leicht erhöhter Wert festgestellt. Diese Erhöhung des Mittelwertes ist nicht signifikant ($p > 0,5$).

Tabelle 20: Gesamtgehalt an Bilirubin im Serum von Probanden vor und am Tag 1 nach einer HBO.

Proband	vor HBO [$\mu\text{mol/l}$]	Tag 1 nach HBO [$\mu\text{mol/l}$]
IJ	15,58	17,7
PH	7,02	7,11
KK	14,69	15,68
RK	5,61	8,87
Mittelwert \pm SEM	10,73 \pm 2,57	12,34 \pm 2,57

Eine Induktion der Hämoxygenase wurde daher im folgenden weiter untersucht. Die Induktion aufgrund einer erhöhten Expression wurde im Northern Blot bestimmt, auf Proteinebene wurden Western Blots durchgeführt. In Tabelle 21 sind die Ergebnisse der Northern Blots gezeigt. In zwei verschiedenen Kammerfahrten wurde einmal nach 4 Stunden und bei der zweiten Kammerfahrt nach 24 Stunden Blut abgenommen und aus den Lymphozyten RNA isoliert. Die Quantifizierung erfolgte im Phospho-Imager und als Beladungskontrolle diente β -Actin. Die RNA-Menge wurde auf β -Actin abgeglichen, und die Intensität nach der Hybridisierung mit der Hämoxygenasesonde auf β -Actin bezogen. Für zwei Probanden war 4 Stunden nach der HBO eine deutlich erhöhte Expression der Hämoxygenase zu erkennen. Dagegen wurde für die Probanden, denen 24 Stunden nach der HBO Blut entnommen wurde, nur bei einem eine erhöhte Expression nachgewiesen.

Tabelle 21: RNA-Gehalt für Hämoxygenase in Lymphozyten von Probanden vor und entweder 4 oder 24 Stunden nach HBO.

	Proband	RNA-Gehalt [%] * Häm-Oxygenase
4 Stunden nach HBO	AR	375
	SS	158
	CU	71
	UW	112
24 Stunden nach HBO	CD	94
	OM	94
	PR	159
	PW	43

*Der RNA-Gehalt jedes Probanden wurde in den Lymphozyten vor HBO auf 100 % gesetzt.

Im Western Blot konnte 24 Stunden nach der HBO eine eindeutige Erhöhung des Hämoxygenase-Proteingehaltes nachgewiesen werden (Abbildung 40). Dieses Ergebnis wurde für 4 weitere Probanden bestätigt (ohne Abbildung). Während vor der HBO nur Spuren des Enzyms sichtbar waren, zeigten sich am Tag nach einer HBO deutliche Banden, während es zu keiner Veränderung der pol- β als Kontrollprotein kam.

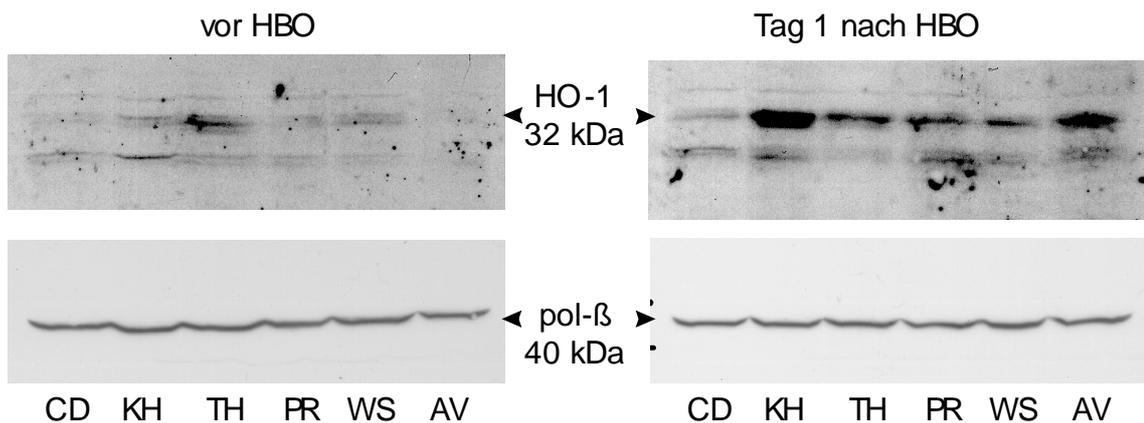


Abbildung 40: Western Blot mit Lymphozyten von Probanden vor und einen Tag nach einer HBO. Es wurde mit einem Antikörper gegen Hämoxygenase und als Kontrolle mit einem Antikörper gegen pol- β hybridisiert.

Ein Abbauprodukt der Hämoxxygenase, das Häm, kann die Induktion des IRE (Iron Responsive Element) bewirken und so die intrazellulären Erhöhung des Ferritins induzieren. Daher sollte eine erhöhte Expression von Ferritin nach einer HBO überprüft werden. Vier Stunden nach einer HBO wurden in drei Probanden ein deutlich erhöhter Level der Ferritin L-Kette-RNA gefunden (Tabelle 22), dagegen waren die Werte 24 Stunden nach der HBO nur noch für einen Probanden höher als vor einer HBO.

Tabelle 22: RNA-Gehalt für Ferritin L-Kette in Lymphozyten von Probanden vor und entweder 4 oder 24 Stunden nach HBO.

		RNA-Gehalt [%] *	
		Proband	Ferritin L-Kette
4 Stunden nach HBO		AR	106
		SS	311
		CU	173
		UW	154
24 Stunden nach HBO		CD	126
		OM	111
		PR	195
		PW	13

*Der RNA-Gehalt jedes Probanden wurde in den Lymphozyten vor HBO auf 100 % gesetzt.

Für die H-Kette des Ferritins konnten 12 Probanden untersucht werden, da die RNA auch bei geringem RNA-Gesamtgehalt im Northern Blot nachweisbar war. 24 Stunden nach einer HBO wurde für fünf Probanden eine leicht erhöhte Expression des Ferritins nachgewiesen (Tabelle 23). Der hohe Wert von PW am Tag nach einer HBO beruhte auf extrem geringen β -Actin-Mengen, was zu einer Verfälschung des Ergebnisses führen kann. Der Mittelwert zeigte einen Tag nach HBO keinen erhöhten RNA-Gehalt für die Ferritin H-Kette.

Tabelle 23: RNA-Gehalt für die Ferritin H-Kette in Lymphozyten von Probanden vor und 24 Stunden nach HBO.

Proband	RNA-Gehalt [%]* 24 Stunden nach HBO
AV	83
WS	122
PR	96
TH	47
JB	122
CD	111
KK	140
OM	136
PW	162
TR	77
OM	91
BL	85
Mittelwert	106
SEM	9.27

*Der RNA-Gehalt jedes Probanden wurde in den Lymphozyten vor HBO auf 100 % gesetzt.

Zusätzlich wurde für 4 Probanden der RNA-Gehalt der Ferritin H-Kette sechs Stunden nach HBO bestimmt und in allen vier Proben wurden niedrigere RNA-Level als vor der HBO gemessen (ohne Abbildung).

4. Diskussion

Oxidativer Streß, das heißt das verstärkte Auftreten von freien Radikalen im Organismus kann aufgrund von physiologischen Prozessen sowie durch Umweltschadstoffe entstehen. Das Auftreten von ROS wird im Verlauf einer Vielzahl von Krankheiten beobachtet (HALLIWELL, 1996). Nicht zuletzt wegen ihrer DNA-schädigenden Wirkung wird den radikalischen Sauerstoffspezies eine wachsende Bedeutung bei der Induktion, Promotion und Progression von Krebserkrankungen beigemessen (TRUSH und KENSLER, 1991). Geeignete Systeme, um unter kontrollierten Bedingungen die Auswirkungen von oxidativem Streß im Menschen zu studieren, sind jedoch selten. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die HBO ein geeignetes Modell ist, um oxidativen Streß im Menschen zu untersuchen. Die HBO ist eine bei verschiedenen Krankheitsbildern in der Klinik angewendete Behandlung mit 100 % Sauerstoff bei 1,5 bar Überdruck. Während der HBO kommt es zu einer Erhöhung des im Plasma gelösten Sauerstoffanteils (Übersicht bei WELSLAU, 1996) und zur Bildung von Sauerstoffradikalen durch respiratorische Prozesse (ORIANI et al., 1996). Die Entstehung von ROS wurde von NARKOWICZ et al. (1993) nachgewiesen, die die Bildung von Ascorbat-Radikalen nach einer HBO im Blut von Personen gemessen haben.

In den Leukozyten von gesunden Probanden, die sich einer Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff unterzogen haben, wurden direkt nach der HBO DNA-Schäden im Comet Assay nachgewiesen. Eine aus diesem Ergebnis resultierende Frage ist die nach der biologischen Bedeutung des genotoxischen Effekts und wird im ersten Teil der Diskussion behandelt. Bei wiederholter Exposition in der Druckkammer an aufeinanderfolgenden Tagen wurde kein genotoxischer Effekt im Comet Assay gemessen. Dies weist auf adaptive Schutzmechanismen nach HBO hin. Der zweite Abschnitt der Diskussion beschäftigt sich mit den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zur Adaptation gegenüber oxidativem Streß im Menschen.

4.1. Genotoxischer Effekt nach einer HBO

Der Comet Assay ist ein Genotoxizitätstest, mit dem in seiner alkalischen Version DNA-Strangbrüche und alkalilabile Stellen auf Einzelzellniveau nachgewiesen werden können (SINGH et al., 1988). Der Test weist eine hohe Sensitivität für den Nachweis von Schäden, die durch ionisierende Strahlung, radiomimetische Substanzen und oxidativen Streß induziert werden, auf (Übersichten bei MCKELVEY-MARTIN et al., 1993; FAIRBAIRN et al., 1995).

DNA-Effekte im Comet-Assay wurden nach einer einmaligen HBO von wenigen Ausnahmen abgesehen, in den Leukozyten aller Probanden nachgewiesen. Die Kontrollwerte vor der HBO waren bis auf wenige Ausnahmen homogen. Daß die basalen, im Comet-Assay gemessenen Effekte nur geringe Schwankungen aufweisen, wurde schon von SINGH et al. (1991) beschrieben. In der Studie konnte außerdem, bis auf 3 Personen, die deutlich erhöhte Werte zeigten, keine Korrelation mit dem Alter der Personen gefunden werden. Auch in Studien von BETTI et al. (1994; 1995) und PLAPPERT et al. (1995) wurden Kontrollpersonen hinsichtlich der nachweisbaren DNA-Effekte im Comet Assay untersucht, und es wurden nur geringe Schwankungen festgestellt. Diese Homogenität der Werte ist für den Einsatz des Comet Assays in Biomonitoringstudien wichtig. In derartigen Studien wird der Comet Assay angewendet, um ein möglicherweise exponiertes Personenkollektiv zu untersuchen. Eine Personengruppe, die altersmäßig und von den Lebensgewohnheiten, der zu untersuchenden Population ähnelt, wird in solchen Studien als Kontrollgruppe herangezogen. In dieser Arbeit konnte allerdings die DNA-Migration für dieselben Probanden vor und nach HBO untersucht werden. Ein Vorteil dieser Studiendesigns, in denen jeder Proband seine eigene Kontrolle ist, besteht darin, daß interindividuelle Variabilität keine Bedeutung hat und somit auch geringe Anzahlen an untersuchten Probanden ausreichen, um eine eindeutige Aussage zu erhalten .

Erhöhte Kontrollwerte können auf verschiedene Störfaktoren zurückgeführt werden. In Leukozyten von Kindern, die an einer Infektion erkrankt waren, fanden BETANCOURT et al. (1995) erhöhte Werte der DNA-Migration. Bei zwei Probanden, für die erhöhte Kontrollwerte gemessen wurden, konnte eine beginnende Erkältung als mögliche Ursache in Betracht gezogen werden. Desweiteren zeigten BETANCOURT et al. (1995) in ihrer Studie, daß der Ernährungszustand einen Einfluß auf die DNA-Schäden hatte. Kranke, unterernährte Kinder wiesen höhere DNA-Migration auf, als ausreichend ernährte Kinder. Auch in einer Studie von GREEN et al. (1994) wurde bei einer kleinen Anzahl von Probanden ein Einfluß der Ernährung auf die Kontrollwerte im Comet Assay beschrieben. Die DNA-Migration im Blut von Probanden, die eine vitaminreiche Mahlzeit zu sich genommen hatten, lag in ihrer Studie unter der von Probanden, die nicht gegessen hatten. Die Probanden, die für die vorliegende Arbeit an einer HBO teilnahmen, waren alle ausgewogen ernährt, so daß dieser Faktor keinen Einfluß auf die Kontrollwerte haben sollte. Rauchen als Ursache für erhöhte Mittelwerte im Comet Assay wurde von BETTI et al. (1994; 1995) festgestellt. Demgegenüber wiesen die Studien von PLAPPERT et al. (1995) und ANDERSON et al. (1994) keine gegenüber Nichtrauchern erhöhte Werte für Raucher auf. Allerdings basieren diese Studien auf kleinen untersuchten Kollektiven (18 Raucher/80 Nichtraucher und 6 Raucher/6

Nichtraucher), so daß sie nicht mit den Studien von Betti et al. gleichzustellen sind. In der vorliegenden Arbeit wurden nur Nichtraucher eingesetzt, um den Störfaktor Rauchen auszuschließen. Erst kürzlich wurde ein weiterer Faktor entdeckt, der zu einer erhöhten DNA-Migration führen kann und bei in vivo Studien beachtet werden sollte. Hierbei handelt es sich um körperliche Belastung, die einen Tag (HARTMANN et al., 1994) aber auch bis zu vier Tage (HARTMANN et al., 1998) nach einer sportlichen Betätigung zu erhöhten DNA-Effekten im Comet Assay führen kann. Probanden, die an Druckkammerfahrten teilnahmen, haben in den Tagen vor dem Versuch keinen Sport betrieben. Hohe Kontrollwerte der Probanden sind demnach nicht zurückführbar auf bekannte Störfaktoren. Als mögliche Ursachen könnten eventuelle Infektionen denkbar sein. Außerdem wurde während der Durchführung dieser Arbeit das Protokoll für den Comet Assay verändert, erhöhte Kontrollwerte können auch auf vorübergehende methodische Variabilität während der Umstellung zurückgeführt werden.

Die Verteilung geschädigter Zellen nach einer HBO zeigt, daß nicht alle Zellen im Blut gleichmäßig geschädigt wurden. Eine derartige Heterogenität wurde schon von ÖSTLING und JOHANSON (1987) nach Bleomycin-Behandlung in Zellkulturen beschrieben. Bleomycin als radiomimetische Substanz produziert oxidativen Streß. Die Versuche waren an V79 Zellkulturen (Chinesische Hamsterzellen) durchgeführt worden, so daß die Heterogenität ein charakteristisches Merkmal ROS-generierender Substanzen sein könnte und nicht auf Unterschiede in der Zellpopulation zurückführbar wäre. Die unterschiedliche Aufnahme der Substanz in die Zelle könnte gerade bei ROS-generierenden Substanzen, die schnell abreagieren, eine Erklärung für eine derartige Heterogenität sein. Eine ähnliche Verteilung geschädigter Zellen wurde ebenfalls bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten in vitro-Experimenten mit H₂O₂ festgestellt (mikroskopische Beobachtung). Auch SINGH et al. (1988) und VISVARDIS et al. (1997) haben eine heterogene Schadensverteilung nach H₂O₂-Behandlung beschrieben und die Aufnahme in die Zelle als mögliche Erklärung angeführt. Desweiteren besitzen aber gerade Blutzellen einen unterschiedlichen Antioxidantienspiegel, so daß die Abwehr von Radikalen in einigen Zellpopulationen des Blutes effektiver sein kann als in anderen (SINGH et al., 1988; VISVARDIS et al., 1997). Das Niveau an zellulären Eisen- und Kupferionen, ebenso wie Reduktionsäquivalente (NAD(P)H), spielt bei Reaktionen von ROS eine wesentliche Rolle und kann eine Ursache von unterschiedlich induzierbaren DNA-Effekten in verschiedenen Zellpopulationen sein (COLLINS et al., 1995; VISVARDIS, 1997).

Neben der unterschiedlichen Verteilung der Schäden auf dem zellulären Niveau kann ein unterschiedlicher Antioxidantienspiegel sich auch auf die in dieser Arbeit gemessene deutliche interindividuelle Variabilität der durch HBO induzierten Effekte auswirken.

Der unterschiedliche Antioxidantienstatus der Probanden wurde bei den Messungen der antioxidativ wirkenden Enzyme und Vitamine deutlich. Die mit der Nahrung aufgenommenen Vitamine können zum Beispiel einen Einfluß haben. Auch bei Probanden, die an mehreren Kammerfahrten im Laufe dieser Arbeit teilnahmen, wurden individuelle Schwankungen beobachtet. GREEN et al. (1994) zeigten, daß mit der Nahrung aufgenommenes Vitamin C bei Probanden einen Effekt sowohl auf Kontrollwerte im Comet Assay, als auch auf durch Bestrahlung induzierte DNA-Schäden in Lymphozyten hat. Sie stellen in der Arbeit die Hypothese auf, daß Nahrungszusammensetzung nicht nur Einfluß auf den basalen DNA-Schaden, sondern auch auf die Induzierbarkeit eines DNA-Schadens durch Bestrahlung hat. Durch Supplementierung mit Vitamin C, E und β -Carotin konnten basale oxidative DNA-Schäden sowie DNA-Schäden, die durch Behandlung der Lymphozyten mit H_2O_2 induziert wurden, herabgesetzt werden (DUTHIE et al., 1996). Der Ernährungszustand der an dieser Arbeit beteiligten Probanden wurde zwar durch Befragung als ausgewogen eingestuft, aber nicht vor einer HBO kontrolliert, so daß Schwankungen zumindest teilweise auf diese Faktoren zurückführbar sein könnten.

Neben DNA-Strangbrüchen und alkalilabilen Stellen werden durch oxidative Angriffe auf die DNA hauptsächlich Basenveränderungen induziert. Die am häufigsten gemessene, modifizierte Base ist das 8-Oxo-Guanin (8-Oxo-Gua). Weiterhin sind aus dem Spektrum der Basenveränderungen häufig die durch Ringöffnung von Purinen entstehenden Formamidopyrimidine, das Fapy-Guanin und Fapy-Adenin, nachgewiesen worden. Auch erhöhte Level an 8-Oxo-Adenin und Thyminglykol werden nach oxidativem Streß gemessen (Übersichten bei EPE, 1995; DIZDAROGLU, 1992). Das 8-Oxo-Gua wird aufgrund der Tatsache, daß es die am häufigsten nachweisbare oxidativ modifizierte Base ist und direkt mit GC/MS oder HPLC-Analyse gemessen werden kann, als Marker für oxidativen Streß verwendet (HALLIWELL und DIZDAROGLU, 1992). Eine Korrelation zwischen dem Sauerstoffverbrauch im Menschen und dem Gehalt des Nukleosids 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-Deoxyguanosin (8OxodG) im Urin konnten LOFT et al. (1992) nachweisen. Allerdings ist der Nachweis von oxidativ veränderten Basen im Urin als Marker für oxidativen Streß umstritten. Das Auftreten von 8-OxodG im Urin wird durch Reparaturprozesse begründet, wodurch die ausgeschnittene Base mit dem Urin ausgeschieden wird. Ein Reparaturweg, durch den das Nukleosid entfernt wird, wurde von BESSHO et al. (1993) beschrieben. Modifizierte DNA-Basen im Urin können allerdings auch Produkte der DNA-Degradierung toter Zellen sein (LINDAHL, 1993). Oxidativ veränderte Basen werden nicht allein im Urin bestimmt, sondern auch im Blut nachgewiesen. Im peripheren Blut von Patienten wurde nach der therapeutischen Behandlung mit ionisierender Strahlung ein Anstieg von 8-Oxo-Gua gemessen (WILSON et al., 1993). Ebenso wurde in Patienten mit Autoimmunkrankheiten ein erhöhter Level

oxidativer Basenschäden nachgewiesen (BASHIR et al., 1993). Eine Korrelation zwischen 8-Oxo-Gua und dem Rauchen von Zigaretten wurde von ASAMI et al. (1996) gefunden. Für die Probanden der vorliegenden Arbeit wurde der 8-Oxo-Gua-Gehalt vor und nach einer HBO im Blut bestimmt, da dies die gleichen Zielzellen waren, in denen der HBO-induzierte genotoxische Effekt im Comet Assay gemessen wurde. Die Höhe des Basislevels an 8-Oxo-Gua, der sich aus einer permanenten oxidativen Schädigung der DNA und der Reparatur dieser Schäden ergibt, ist ein andauernder Diskussionspunkt. Die in dieser Arbeit durch HPLC-Analyse mit elektrochemischer Detektion ermittelten Werte für den 8-Oxo-Gua-Gehalt in den Leukozyten von Probanden lagen mit 0,16 - 3,39 8-Oxo-Gua/10⁵ dG im Bereich der veröffentlichten Werte für Kontrollpersonen (PFLAUM et al., 1997).

Eine weitere Möglichkeit für den Nachweis oxidativ modifizierter DNA-Basen ist der Einsatz spezifischer Reparaturenzyme. In der Literatur wird dieser Ansatz beschrieben, um mit der alkalischen Elution, sowie mit dem Comet Assay, oxidativ veränderte Basen in Zellen nachzuweisen. Die Reparaturenzyme erkennen die modifizierte Base und entfernen diese aus der DNA. Die hierbei entstehenden Einschnitte in die DNA führen im Comet Assay zu verstärkter DNA-Migration. Durch den Einsatz verschiedener Reparaturenzyme können substanzspezifische Schadensprofile erstellt werden (EPE et al., 1993; EPE, 1995). Die Endonuklease III (Endo III) erkennt oxidativ veränderte Pyrimidine, während die Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (FPG) neben Formamidopyrimidinen hauptsächlich das 8-Oxo-Gua aus der DNA entfernt (BOITEUX et al., 1992). Das Spektrum der induzierten FPG-sensitiven Läsionen nach OH⁻-Radikal-Reaktionen mit der DNA deckt sich mit dem durch GC/MS-Analyse ermittelten Spektrum (EPE, 1995). Sowohl durch Nachinkubation mit Endo III als auch mit FPG kam es zu einer Erhöhung des Kontrollwertes vor HBO, was auf den Basislevel oxidativer DNA-Schäden zurückgeführt werden kann. Dies hat auch COLLINS et al. (1993) vermutet und gezeigt, daß der Comet Assay für den Nachweis von oxidativen Schäden gut geeignet ist und einen wichtigen Beitrag zur Bestimmung des tatsächlichen Basislevels an 8-Oxo-Gua liefert. Durch Kalibrierung des Comet Assays und der alkalischen Elution ist eine quantitative Bestimmung der Basenveränderungen möglich und kann mit dem 8-Oxo-Gua Level, der durch direkte Methoden bestimmt worden ist, verglichen werden. Die veröffentlichten Werte für die verschiedenen Methoden, wie auch für HPLC-Analysen aus unterschiedlichen Arbeiten, weichen um mehr als das Zehnfache voneinander ab (Zusammenstellung bei PFLAUM et al., 1997). Dabei ist auffällig, daß die auf Reparaturenzymen basierenden Tests die niedrigsten Werte für den 8-Oxo-Gua-Gehalt lieferten. Bedenkt man, daß das FPG außer 8-Oxo-Gua auch Formamidopyrimidine erkennt, so müßten eigentlich höhere Werte als der mit HPLC-Analyse ermittelte Gehalt gemessen werden. Der 8-Oxo-Gua-Gehalt kann allerdings

durch Verwendung von enzyspezifischen Assays unterschätzt werden, da Läsionen, die in Clustern auftreten und zu nur einem Einzelstrangbruch führen, nicht gesondert erkannt werden könnten. Desweiteren kann die Chromatinstruktur die Effektivität der Reparaturenzyme *in vitro* beeinflussen. Auch die Spezifität und Reinheit der Enzyme können ein Problem darstellen. Demgegenüber kann es bei der Aufarbeitung der DNA für die HPLC-Analyse zu Oxidationsprozessen kommen, die zu einem erhöhten 8-Oxo-Gua-Gehalt führen können (PFLAUM et al., 1997). Durch vorsichtige Aufarbeitung der DNA konnten die Werte auf weniger als ein Zehntel gesenkt werden (COLLINS et al., 1996), liegen aber auch damit immer noch über den mit Reparaturenzymen gemessenen Werten.

Nach der Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff wurde durch HPLC-Analyse kein erhöhter Gehalt an 8-Oxo-Gua detektiert. Demgegenüber wurde mit dem Comet Assay und den Reparaturenzymen Endo III und FPG nach HBO in den Leukozyten jedes Probanden ein erhöhter Wert verglichen mit dem vor HBO gemessen. Dies könnte möglicherweise bedeuten, daß der Comet Assay sensitiver für den Nachweis von induzierbaren, oxidativen Schäden *in vivo* ist, da bei der HPLC-Analyse ein zu hoher Level 8-Oxo-Gua gemessen wird, so daß eine weitere Erhöhung überdeckt wird. Auch könnte die Isolierung der Zellen vor der Aufarbeitung für die HPLC-Analyse ein Problem darstellen. Mit einem Ficoll-Gradienten dauert die Lymphozytenisolierung ungefähr fünfundvierzig Minuten und wird bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reparatur oxidativ modifizierter Basen und hierbei insbesondere der Einschnitt erfolgt sehr schnell. Das Ausschneiden von DNA-Schäden durch Reparaturenzyme führt zu verstärkter DNA-Migration im Comet Assay. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, daß HBO-induzierte oxidative DNA-Effekte bereits zwei Stunden nach einer HBO zu 50 % repariert waren. Bereits eine halbe Stunde nach HBO wurde eine Erhöhung des Tailmoments nachgewiesen, was auf Einschnitte der Reparaturenzyme zurückgeführt werden kann. Für die HPLC-Analyse würde dies bedeuten, daß die nachzuweisende Base bereits während der Probenaufarbeitung aus der DNA entfernt wurde. Im Gegensatz dazu werden die Zellen für den Comet Assay sofort verwendet was eine höhere Sensitivität begründen würde.

ROS-generierende Substanzen können neben der DNA-Schädigung auch zytotoxisch wirken. Der Einfluß von zytotoxischen Effekten auf DNA-Migration im Comet Assay ist immer wieder ein Diskussionspunkt. OLIVE et al. (1993) haben wolkenähnliche Strukturen nach der Behandlung mit hohen Konzentrationen der zu testenden Substanz beschrieben. Sie korrelierten diese Beobachtung mit apoptotischen Zellen. Die Apoptose bezeichnet den programmierten Zelltod, in dessen Verlauf eine schnelle Degradierung der DNA eingeleitet wird (MARKS und FOX, 1991). Da sich der Prozeß

der Apoptose über mehrere Stunden ziehen kann (Übersicht bei WYLLIE, 1992), ist es fraglich, ob nach einer HBO und sofortiger Durchführung des Comet Assays apoptotische Zellen detektiert werden können. SINGH et al. (1995) führte das Auftreten wolkenähnlicher Strukturen auf nekrotische Zellen zurück und FAIRBURN et al. (1996) wendeten den Comet Assay an, um zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen zu unterscheiden. Als Nekrose wird der unmittelbare Zelltod bezeichnet. HARTMANN und SPEIT untersuchten (1997) den Einfluß von zytotoxischen aber nicht genotoxischen Substanzen mit dem Ergebnis, daß zytotoxische Einflüsse kein praktisches Problem darstellen, da nekrotische oder apoptotische Zellen erkannt und bei der Auswertung berücksichtigt werden können. Wolkenähnliche Strukturen im Blut wurden nach einer HBO nur vereinzelt beobachtet. Auch in den Versuchen, in denen 6 Stunden nach der HBO Blut entnommen wurde, konnten keine Anzeichen apoptotischer Wirkungen festgestellt werden. Eine toxische Wirkung der HBO wurde darüber hinaus durch Bestimmung der toten Zellen im Blut nach einer HBO ausgeschlossen. Die Bestimmung der Toxizität empfahlen auch HENDERSON et al. (1998), die zytotoxische Einflüsse auf DNA-Migration im Comet Assay bei Überlebensraten von weniger als 75 % beschrieben haben.

Auch wenn eine zytotoxische Wirkung der HBO in dieser Arbeit ausgeschlossen wurde, hatte die Behandlung einen Einfluß auf die Zellproliferation. Der NDI (nuclear division index, Index der Zellkernteilung), der für den Mikronukleus-Test bestimmt wurde, lag nach HBO unter dem vor einer Druckkammerfahrt. Diese Beobachtung wurde bei in vitro-Versuchen nach HBO bestätigt (Rothfuß, persönliche Mitteilung). Daß oxidativer Streß einen hemmenden Einfluß auf die Zellproliferation hat, wurde mehrfach beobachtet (Übersicht bei POOT und JOENJE, 1993). Als Ursache wird die Hemmung des Zellzyklus in der G1- oder G2-Phase diskutiert. Denkbar wäre eine Verzögerung der Proliferation, um Reparaturprozessen die Möglichkeit zu geben, DNA-Schäden zu reparieren, bevor die Zelle ihre DNA repliziert. Die präferentielle Reparatur des transkribierten DNA-Stranges verdeutlicht die Wichtigkeit einer schadensfreien DNA-Matrize (DOWNES et al., 1993). Die Übergänge der G1- zur S-Phase sowie der G2- zur M-Phase unterstehen einer genetischen Kontrolle. Mutationen in Genen, die bei der Regulation des Zellzyklus und hierbei insbesondere für einen Stopp des Zellzyklus nach Schadensinduktion verantwortlich sind, werden in engen Zusammenhang mit der Krebsentstehung und -entwicklung gebracht (Übersicht bei WEINERT, 1998). Lymphozyten in vivo befinden sich zum Großteil in der G₀-Phase. Durch Mitogenstimulierung beginnen sie mit der Proliferation. Bei der Verwendung von Lymphozyten im Mikronukleus-Test wird die Proliferation durch PHA als Mitogen induziert. Es wäre daher denkbar, daß bei DNA-Schäden, die - wie für diese Arbeit -

durch HBO induziert wurden, die Reparatur der Schäden vor dem Beginn der Replikation abläuft.

Einen Tag nach einer HBO wurden bei keinem Probanden DNA-Effekte im Comet Assay mit Leukozyten gemessen. Auch bei Blutentnahme sechs Stunden nach einer Druckkammerfahrt lagen die Werte bereits auf Kontrollniveau. Wird dieses Ergebnis in Zusammenhang mit der beschriebenen Verzögerung der Zellproliferation gestellt, liegt die Frage nach der Reparatur der durch HBO induzierten DNA-Schäden nahe. Die DNA-Reparatur läßt sich indirekt mit dem Comet-Assay nachweisen. Für in vitro-Studien konnten SPEIT et al. (1995) und HELBIG et al. (1997) zeigen, daß Strangbrüche, die im Verlauf der Exzisionsreparatur entstehen, zu der im Comet Assay meßbaren DNA-Migration beitragen. In beiden Arbeiten erfolgte nach Schadstoffinkubation eine Gegenüberstellung der DNA-Effekte in Zellen mit Reparaturdefekten und Zellen, die eine normale Reparaturkapazität besitzen. Für Zellen, die durch eine defekte Exzisionsreparatur charakterisiert sind, wurden geringere Werte der DNA-Migration nachgewiesen. Die Beteiligung der Exzisionsreparatur an HBO-induzierten DNA-Läsionen und deren Verschwinden 6 Stunden nach der Kammerfahrt wurde im Comet Assay untersucht. Hierfür wurde Blut, das direkt nach einer HBO entnommen worden war, bei 37 °C bis zu zwei Stunden inkubiert. Die Ergebnisse zeigten bei allen Probanden einen Anstieg der DNA-Migration eine halbe Stunde nach Beendigung der HBO. Dieser Anstieg kann auf die Einschnitte der Reparaturenzyme während des Reparaturprozesses zurückgeführt werden. DNA-Effekte durch DNA-Exzisionsreparatur wurden auch von GEDIK et al. (1992) beschrieben. Die Einschnitte werden danach durch DNA-Polymerasen wieder aufgefüllt und durch Ligation geschlossen. Bereits eine Stunde nach HBO war bei allen Probanden ein deutlicher Rückgang der DNA-Migration zu messen. Nach zwei Stunden wiesen die Leukozyten nur noch leicht erhöhte Werte auf. Dieser Rückgang war bei in vitro-Nachinkubation ebenso feststellbar, wie bei Blutentnahme 2 Stunden nach HBO. Die DNA-Schäden wurden demzufolge eliminiert, und die in vivo nach zwei und sechs Stunden beobachtete Abnahme der Schäden beruht nicht auf dem Verschwinden geschädigter Zellen. Reparaturkinetiken mit Blut verschiedener Personen wurden auch von BUSCHFORT et al. (1997) durchgeführt. Nach in vitro-Exposition mit genotoxischen Substanzen konnten die Autoren interindividuelle Unterschiede der Reparaturkapazität nachweisen. Ein weiterer indirekter Beweis für Exzisions-Reparaturprozesse in Leukozyten nach einer HBO erfolgte durch Nachinkubation des Blutes mit Aphidicolin (APC). Als Hemmer der DNA-Polymerase inhibiert APC die Reparatur, offene Reparaturstellen akkumulieren und können im Comet Assay als erhöhte DNA-Migration nachgewiesen werden. Für alle Probanden wurden erhöhte Werte 2 Stunden nach HBO bei Nachinkubation mit APC gemessen, während die DNA-Effekte in den

Zellen ohne APC-Nachinkubation abnahmen. In einem ähnlichen Ansatz konnten GEDIK et al. (1992) für UV-bestrahlte HeLa-Zellen nach APC-Inkubation erhöhte Werte im Comet Assay zeigen. Ebenso wiesen SPEIT und HARTMANN (1995) für schadstoffinduzierte Effekte eine verstärkte DNA-Migration bei APC-Nachinkubation für MRC5-Zellen, nicht aber für XP-Zellen nach. Das Charakteristische von XP-Zellen, die von Patienten mit Xeroderma Pigmentosum stammen, ist ein Defekt in der Exzisionsreparatur. Verstärkte DNA-Migration nach APC-Inkubation kann demzufolge als Hinweis auf Exzisionsreparatur gewertet werden.

Die Reparatur oxidativer Basenschäden in der DNA nach einer HBO wurde durch Verwendung des bereits beschriebenen Reparaturenzyms FPG gemessen. Die direkt nach HBO detektierten oxidativen Basenschäden waren zwei Stunden nach der HBO signifikant reduziert. Die Reparatur von oxidativen Basenschäden wurde auch von COLLINS et al. (1995) nach einer in vitro-Behandlung von unstimulierten Lymphozyten mit H₂O₂ untersucht. Die in der Studie dargestellten Ergebnisse weisen auf eine langsamere Reparatur hin, da die Schäden erst nach vier Stunden um die Hälfte reduziert waren. Die Autoren diskutieren einen Unterschied der Reparaturkapazität von stimulierten und unstimulierten Zellen. Lymphozyten aus den HBO-Experimenten wurden unstimuliert verwendet, während COLLINS et al. (1995) schnelle Reparatur nur in stimulierten Lymphozyten beobachtete. Eine Erklärung für diese Diskrepanz könnte darin bestehen, daß mit dem Comet Assay nicht direkt Reparatur, sondern DNA-Schäden beziehungsweise deren Abnahme mit der Zeit gemessen werden. Bei in vitro kultivierten Lymphozyten würde man einen viel höheren Basislevel an oxidativen DNA-Schäden erwarten als in Lymphozyten, die sich im Vollblut umgeben von einer großen Menge an Substanzen, die Radikale abfangen, befinden. Dieser höhere Basislevel könnte Reparatureffekte überdecken. Desweiteren zeigte eine Studie über die Kinetik des Einschnitts in die DNA durch FPG, daß das 8-Oxo-Gua sehr schnell ausgeschnitten wird, die Geschwindigkeit aber abhängig von dem Substrat- das heißt- von der Beschaffenheit des Schadens ist (KARAKAYA et al., 1997). Zwar wird durch HBO die Schadensinduktion über ROS und H₂O₂ vermutet, aber ob der ultimative DNA-Schaden der gleiche ist, wie nach in vitro-Behandlung mit H₂O₂, bleibt offen.

Die Untersuchungen zur genotoxischen Wirkung einer HBO mit dem Comet Assay zeigen eine genotoxische Wirkung der HBO auf, diese Schäden werden aber schnell repariert. Es stellt sich daher die Frage nach der biologischen Bedeutung der im Comet Assay gemessenen Effekte. Strangbrüche können zu Chromosomenmutationen und Basenmodifikationen zu Genmutationen führen. Der Mikronukleus-Test dient dem Nachweis irreversibler DNA-Schäden, die zu Chromosomenmutationen führen. Mikronuklei können sowohl durch Strangbrüche, die sich als Chromosomenbrüche

manifestieren, als auch durch Chromosomenfehlverteilungen entstehen. Dabei müssen die Zellen mindestens eine Zellteilung durchlaufen, bei der die Chromosomen oder Chromosomenfragmente nicht auf die Tochterkerne verteilt werden, sondern mit Kernhülle umgeben, im Zytoplasma verbleiben. Nach einer einmaligen Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff wurden keine erhöhten Mikronukleusfrequenzen detektiert. Eine schnelle und effiziente Reparatur könnte der Grund dafür sein, daß durch einmalige HBO keine Mikronuklei induziert wurden. Die nach einer HBO untersuchten Lymphozyten aus peripherem Blut sind überwiegend in der G₀-Phase und müssen durch Mitogenzugabe zur Zellteilung angeregt werden. Bei einer schnellen Reparatur, wie sie nach HBO gemessen wurde, kann davon ausgegangen werden, daß die DNA-Schäden vor einer Replikation der Zelle repariert wurden und nicht zur Induktion von Mikronuklei führten. Erst wenn eine große Menge an DNA-Schäden induziert werden, und diese nicht alle oder nicht fehlerfrei vor der Replikation repariert werden, kommt es zur Entstehung von Mikronuklei. So wurde auch bei den für in vitro Experimente im Comet Assay verwendeten H₂O₂-Konzentrationen keine Erhöhung der Mikronukleusfrequenz nachgewiesen. Lediglich höhere H₂O₂-Konzentrationen induzierten bei den in vitro Experimenten Mikronuklei im Vollblut und in den Lymphozyten. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit, daß HBO zwar genotoxische Effekte im Comet Assay induziert, diese aber nicht zu Chromosomenmutationen führen, wiesen GUSKOV et al. (1990) die Induktion von Chromosomenaberrationen durch HBO nach. Die Untersuchungen erfolgten mit dem Blut von Patienten nach zehn aufeinanderfolgenden HBO-Behandlungen unter den gleichen Bedingungen wie das in dieser Arbeit angewendete HBO-Behandlungsprotokoll. Im Unterschied zu den in dieser Studie untersuchten Probanden führten Guskov et al. ihre Studie an kranken Personen, die zudem Medikamente einnahmen, durch. Synergistische Effekte der Medikamente mit Sauerstoffradikalen können nicht ausgeschlossen werden. Jedoch scheint eine Akkumulation von DNA-Schäden bei aufeinanderfolgenden HBO-Behandlungen unwahrscheinlich. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß in den Leukozyten von Probanden nach mehrmaliger HBO nur nach der ersten HBO, nicht aber nach weiteren HBO-Behandlungen genotoxische Effekte im Comet Assay nachweisbar waren.

Auch die neben den Strangbrüchen detektierten oxidativen Basenschäden können zu Mutationen führen. Dem 8-Oxo-Gua wird nicht nur aufgrund der Tatsache, daß es das am häufigsten nachweisbare Basenaddukt ist, eine große Bedeutung beigemessen. Bei der DNA-Synthese während der Replikation wird sowohl dCMP und dAMP gegenüber von 8-Oxo-Gua eingebaut (SHIBUTANI et al., 1991). Bevorzugt paart 8-Oxo-Gua mit Adenin, was zu G:C → T:A Transversionen führt (KASAI und NISHIMURA, 1991; TSCHOU und GROLLMANN, 1993). Dabei hängt die Häufigkeit der Fehlpaarung von den

benachbarten Basensequenzen und der synthetisierenden Polymerase ab (KUCHINO et al., 1987, SHIBUTANI et al., 1991). Aufgrund dieses mutagenen Potentials wird dem 8-Oxo-Gua eine Rolle in der Kanzerogenese zugeschrieben (FLOYD, 1990). So wurde eine Aktivierung der Onkogene *HA-ras* oder *K-ras* durch 8-Oxo-Gua mehrfach beschrieben (SHIBUTANI et al., 1991; KAMIYA et al., 1992; HIGINBOTHAM et al., 1992). Desweiteren sind in menschlichen Tumoren G → T Transversionen die häufigsten „Hot Spot“-Mutationen im Tumor Suppressor Gen p53 (HUSSAIN et al., 1994). Erhöhte Level an 8-Oxo-Gua wurden in menschlichen Lungentumoren gefunden, und in Ratten wurde die Akkumulation von 8-Oxo-Gua mit dem Auftreten verschiedener Krebsformen korreliert (Übersicht bei LOFT und POULSEN, 1996). Neben dem mutagenen Potential von 8-Oxo-Gua sind auch für apurine Läsionen mutagene Eigenschaften beschrieben worden. Dabei wird in der DNA gegenüber von derartigen Schäden bevorzugt ein Adenin eingesetzt (SHAGER und STRAUSS, 1983). AP-Stellen und oxidativ veränderte Basen wurden in dieser Arbeit nach einmaliger HBO mit dem Comet Assay gemessen. Das zum Nachweis oxidativ modifizierter Basen verwendete FPG-Protein weist eine hohe Spezifität für 8-Oxo-Gua auf (BOITEUX, 1992). Die durch HBO induzierten DNA-Schäden könnten somit prämutagene Eigenschaften haben. Eine mögliche mutagene Wirkung der HBO sollte daher in den Lymphozyten der Probanden - das heißt, in der gleichen Zellpopulation, in denen der genotoxische Schäden nachgewiesen wurde - untersucht werden. Der T-Zellen-Klonierungstest ist ein Genmutationstest, der besonders geeignet ist, um Basensubstitutionen sowie kleine Deletionen zu detektieren. Durch Verwendung von T-Lymphozyten können Mutationen, die in vivo entstanden sind, nachgewiesen werden. Mutationen im HPRT-Gen führen zu einem Verlust der HPRT-Aktivität, wodurch die Zellen Purine neu herstellen müssen. Wird den Zellen das toxische Basenanalogue 6-Thioguanin (6-TG) angeboten, bauen Zellen mit funktionierendem HPRT-Enzym dieses bei der Wiederverwertung der Purinbasen ein und sterben ab, während bei fehlender HPRT-Aktivität kein Einbau von 6-TG erfolgt. HPRT-defiziente Zellen wachsen auf 6-TG-haltigem Medium zu Zellklonen heran. Nach einer HBO wurde in der vorliegenden Arbeit für keinen der Probanden eine Erhöhung der Mutantenhäufigkeit festgestellt. Die Werte der Mutantenfrequenzen lagen alle im Bereich publizierter Kontrollwerte (ROBINSON et al., 1994). Durch eine niedrige Klonierungsfrequenz könnte eine Erhöhung der Mutantenfrequenz überdeckt werden, da eine negative Korrelation zwischen Mutantenfrequenz und Klonierungsfrequenz besteht (ALBERTINI et al., 1985; HENDERSON et al., 1986). Die höchste Mutantenfrequenz vor und nach HBO wies der Proband SS auf, was auf die sehr niedrige Klonierungseffizienz zurückgeführt werden kann. Die intraindividuelle Variabilität der Mutantenfrequenz war gering, demgegenüber wurde eine hohe interindividuelle Variabilität mit Mutantenfrequenzen von 3,1 - 36,6 Mutanten pro 10⁶ Zellen festgestellt. In Parallelexperimenten zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit vom T-Zellen-

Klonierungstest mit dem Blut einer Person in 3 Ansätzen, wurden nur geringe Schwankungen zwischen den drei parallelen Versuchen festgestellt. Hieraus kann man schließen, daß die Variabilität der für die Probanden ermittelten Mutantenfrequenz nicht durch instabile Testbedingungen zustande gekommen ist. Auch für diesen Test wurde das Rauchen als Störfaktor beschrieben. Erhöhte Mutantenfrequenzen sind in Korrelation mit dem Rauchen, sowie mit steigendem Alter der Personen nachgewiesen worden (COLE et al., 1988; JONES et al., 1993). Sämtliche Probanden, die an den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen teilgenommen haben, waren nicht nur Nichtraucher, sondern auch zwischen 20 - 35 Jahre alt, so daß das Alter und das Rauchen als beeinflussende Faktoren ausgeschlossen werden kann. Einen Zusammenhang zwischen Ernährung und Variabilität in Bezug auf Mutantenfrequenzen haben BRANDA und ALBERTINI (1995) sowie DUTHIE et al. (1995) beschrieben. Daß allerdings Unterschiede in der Ernährung bei den in dieser Arbeit untersuchten Probanden eine derart hohe Variabilität verursachten, ist nicht wahrscheinlich. Der Grund für keine Erhöhung der Mutantenfrequenz kann in dem Test an sich begründet sein. SALA-TREPAT et al. (1990) wiesen bei Patienten, die sich einer Chemotherapie unterziehen mußten, keine erhöhte Mutantenfrequenz nach. Die Autoren führten dies darauf zurück, daß sich die zirkulierenden T-Lymphozyten in der G₀-Phase befinden, und Zytostatika nur auf sich teilende Zellen einwirken können. Übertragen auf oxidative DNA-Schäden, die durch eine HBO induziert wurden, kann das bedeuten, daß die Zellen ebenso wie bei ihrer Verwendung im Mikronukleus-Test Zeit für die Reparatur der Schäden haben. Die Proliferation der Zellen beginnt erst, wenn das Blut entnommen wird und zur Stimulierung der Zellen mit PHA versetzt wird. Für die DNA-Schäden nach HBO wurde in dieser Arbeit jedoch gezeigt, daß die Reparatur der oxidativen Schäden sehr schnell verläuft. An der Reparatur derartiger DNA-Schäden ist die Basenexzisionsreparatur sowie die Nukleotidexzisionsreparatur beteiligt. Von beiden wird vermutet, daß sie fehlerfrei arbeiten (MOLLER und WALLIN, 1998). Der HPRT-Mutationstest an T-Lymphozyten in vivo könnte daher nicht sensitiv genug sein, um Mutationen nach DNA-Schäden, für die fehlerfreie Reparaturmechanismen bestehen, zu detektieren. Trotzdem wurden für jeden Probanden HPRT-defiziente Zellen nachgewiesen. Es wird diskutiert, daß diese T-Lymphozyten aus sich teilenden Vorläufer- beziehungsweise Stammzellen resultieren. Der T-Zellen-Klonierungstest wird deshalb auch angewendet, um die Proliferation von T-Lymphozyten zu detektieren; zum einen als Index für in vivo T-Zellen-Amplifikation (LODGE et al., 1996), zum anderen als Indikator für Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen (ANSARI et al., 1995).

Ein weiteres Problem bei der Anwendung des T-Zellen-Klonierungstests für die Detektion von Mutationen nach einem einmaligen DNA-schädigenden Ereignis, ist die

Expressionszeit. In dieser Zeit wird das noch vorhandene Enzym in HPRT-defizienten Zellen aufgebraucht und der DNA-Schaden manifestiert sich als Mutation. Die optimale Expressionszeit *in vivo* ist nicht bekannt. Bei Chemotherapie-Patienten wurde eine Erhöhung der Mutantenfrequenz nach 2 Wochen detektiert und persistierte für Monate und Jahre (AMMENHEUSER et al., 1988; BRANDA et al., 1991; TATES et al., 1994). Allerdings sind auch diese Daten nicht eindeutig. Die T-Lymphozyten chemotherapierter Patienten wachsen schlechter als die von gesunden Personen. Daher sinkt für die Patienten zumeist die Klonierungsfrequenz und aufgrund der negativen Korrelation von Klonierungsfrequenz und Mutantenfrequenz kommt es zu einer Erhöhung der Mutantenfrequenz. Außerdem wurde in den Arbeiten ebenso wie bei den Probanden vor und nach HBO eine hohe Variabilität zwischen den Einzelwerten gemessen, so daß Erhöhungen der Mutantenfrequenz immer noch in der Bandbreite der detektierten Mutantenfrequenzen liegen. Die in dieser Arbeit angewendete Expressionszeit von 10 Tagen wurde aufgrund von *in vitro* Daten gewählt. In diesen Studien von O'NEILL et al. (1990) und BASTLOVA et al. (1995) wurden 10 Tage als optimale Expressionszeit beschrieben. Basierend auf den Daten einer neueren Arbeit mit Affen, die eine einmalige Dosis Ethylnitrosoharnstoff appliziert bekamen (ZIMMER und AARON, 1997), wurde von vier Probanden die Mutantenfrequenz nach 80 Tagen bestimmt. Für die Affen wurde ein Peak der Mutantenfrequenz 70 - 100 Tage nach der Mutagenbehandlung gemessen. Nach einer HBO wies aber auch zu diesem Zeitpunkt keiner der Probanden eine erhöhte Mutantenfrequenz auf. Daß eine etwaige Erhöhung der Mutantenfrequenz nach HBO aufgrund einer nicht optimalen Expressionszeit unentdeckt blieb, ist nicht auszuschließen. Für eine weitere Verwendung des T-Zellen-Klonierungstestes ist es daher sicherlich von Bedeutung, eine Positivkontrolle zu finden und mit dieser biologischen Grundlagen des Tests, wie zum Beispiel die Expressionszeit zu untersuchen. Werden sämtliche der diskutierten Argumente berücksichtigt, bleibt immer noch die Frage offen, ob man mit einer Schwankung der Hintergrundmutantenfrequenz, die bei den für diese Arbeit untersuchten Probanden zwischen 3,1 und 36,6 pro Million Zellen lag, einen signifikanten Anstieg detektieren kann, wenn der genotoxische Effekt im Comet Assay um das Dreifache erhöht war. Rein rechnerisch ist selbst bei der Annahme, daß es sich bei den DNA-Schäden, die mit dem Comet Assay gemessen wurden, um prämutagene Läsionen handelt, kein signifikanter Anstieg der Mutantenfrequenz zu erwarten.

Beispielhaft an den HPRT-defizienten Klonen, die von zwei Probanden jeweils vor und nach der HBO für die molekulare Analyse entnommen wurden, sollte untersucht werden, ob gehäuft Mutationen mit für ROS-Angriffe typischen Basenaustauschen auftraten. Die gefundenen Mutationen waren in Übereinstimmung mit der Literatur hauptsächlich Basenaustauschmutationen. Für gesunde Menschen wurde VON

BURKHART-SCHULTZ et al. (1996) das folgende Mutationsspektrum beschrieben: 59 % Basenaustausche, 39 % Deletionen/Insertionen, davon je ein Drittel Frameshiftmutationen, kleine Deletionen und große Deletionen (> 200 Basenpaare) und 2 % komplexere Mutationen. Die in dieser Arbeit detektierten Mutationen entsprechen dem Mutationsspektrum. Es konnte keine Häufung für Mutationstypen festgestellt werden, die auf oxidativen Streß als Ursache deuten. Für ein Mutationsspektrum hätten allerdings eine größere Anzahl Klone jedes Probanden untersucht werden müssen. Auffällig war die bei der Person PW vor, sowie nach der HBO gehäuft auftretende G:C → T:A Mutation an der Position 181. Vermutlich wurde in einer T-Vorläuferzelle die Mutation induziert. Nachdem sich diese in vivo geteilt hat, kam es zu einem klonalen Wachstum von T-Lymphozyten mit dieser Mutation. Wie bereits erwähnt wird der T-Zellen-Klonierungstest unter anderem eingesetzt, um das klonale Wachstum von T-Lymphozyten in vivo zu untersuchen (LODGE et al., 1996). Die Bestimmung von substanzspezifischen Mutationen wird durch derartige abhängige Klone bei Personen extrem erschwert, wenn nicht unmöglich. Auf genomischer Ebene wurde durch Multiplex-PCR keine weitere Mutation detektiert. Klone, für die in der cDNA keine Mutation oder der Verlust eines Exons nachgewiesen wurde, zeigten keine Deletion eines Exons auf genomischer Ebene. Für diese Klone sind wahrscheinlich fehlerhaftes Splicing die Ursache für den Verlust des HPRT-Enzyms. Deletionen auf genomischer Ebene sind auch in der Literatur für HPRT-defiziente Zellen in Kontrollpersonen selten beschrieben (BURKHART-SCHULTZ et al., 1996).

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Genotoxizitätstests und Mutationstests wurde deutlich, daß zwischen den einzelnen Probanden eine Variabilität hinsichtlich ihrer Kontrollwerte, sowie der durch oxidativen Streß induzierten Effekte bestand. Es sind genetische Unterschiede zwischen den Probanden denkbar, die für diese Unterschiede verantwortlich sein könnten. In der letzten Zeit haben Polymorphismen, die für bestimmte Bevölkerungsgruppen zu einer erhöhten Suszeptibilität gegenüber Xenobiotika führen könnten, verstärkt an Bedeutung gewonnen. Derartige Polymorphismen wurden für metabolisierende Enzyme der Phase I und II beschrieben (Übersicht bei GONZALES, 1995). Ihre Bedeutung im Hinblick auf eine Prädisposition für Krebsentstehung wird von vielen Arbeitsgruppen untersucht (Übersichten bei IDLE, 1991; D'ERRICO et al., 1996 und NEBERT, 1997). Eine Enzymfamilie, die in der Phase II des Fremdstoffmetabolismus im Menschen eine wichtige Rolle spielt, sind Glutathion-S-Transferasen. Isoenzyme dieser Familie katalysieren die Reaktion von Glutathion mit reaktiven Elektrophilen. Neben Produkten des Phase I-Metabolismus zählen daher auch Produkte, die durch oxidativen Streß generiert werden, zu ihren Substraten (KETTERER und COLES, 1991; HAYES und PULFORD, 1995). Adaptiv erhöhte GST-Expression nach Induktion von zellulärem Streß zeigt, daß die GST-Enzyme für den Schutz von Zellen

vor Schäden und auch vor oxidativem Streß wichtig sind (Übersicht bei HAYES und PULFORD, 1995). Für die Gene GSTM1 und GSTT1, die für die Isoenzyme GSTM1 und GSTT1 kodieren, sind Polymorphismen bekannt (PEMBLE et al., 1994). Für das GSTM1-Gen wurde bereits 1984 die homozygote Deletion des gesamten Gens bei 40 % der kaukasischen Bevölkerung beschrieben (SEIDEGARD et al., 1984). Neuere Studien wiesen sogar für 50 % der kaukasischen Bevölkerung die homozygote Deletion (GSTM-Null-Genotyp) nach (PEMBLE et al., 1994; FIGUERAS et al., 1997). Dagegen wurde für 10-15 % der Bevölkerung eine homozygote Deletion des GSTT1-Gens (GSTT-Null-Genotyp) beschrieben (PEMBLE et al., 1994; NELSON et al., 1995). Der Nachweis dieser beiden Polymorphismen erfolgt über eine PCR-Amplifikation, wobei zwischen homozygoter Deletion und dadurch komplett fehlender Enzymaktivität und Wildtyp-PCR-Muster (mindestens ein Allel vorhanden) unterschieden werden kann. Die kleine Gruppe Probanden, für die im Verlauf dieser Arbeit der GSTM/GSTT-Genotyp bestimmt wurde, wies eine den Literaturdaten ähnliche Häufigkeit der einzelnen Genotypen auf. Für Personen, denen die entsprechende GST-Enzymaktivität komplett fehlt, ist zu erwarten, daß sie einem höheren Risiko für Schäden durch elektrophile Substanzen ausgesetzt sind. Bei in vitro Versuchen mit verschiedenen zytogenetischen Endpunkten konnte für einige Substanzen eine erhöhte Sensitivität in Lymphozyten mit deletiertem GSTM1 beziehungsweise GSTT1 nachgewiesen werden (Übersicht bei NORPA, 1997). Eine Korrelation zwischen erhöhten Chromosomenaberrationsraten bei Rauchern mit GSTM-Null-Genotyp wurde kürzlich gezeigt (SCARPANTO et al., 1997). Für Personen mit GSTT-Null-Genotypen wurden erhöhte Schwesterchromatid-austausche gemessen (KELSEY et al., 1995). Ein Zusammenhang zwischen homozygot deletiertem GSTM-Gen und erhöhter Tumorzinzidenz für bestimmte Tumore, wie Brust-, Lungen-, Blasen- oder Nierenkrebs wird in der Literatur ebenfalls diskutiert (HELZLSOUER et al., 1998; BELL et al., 1993; RYBERG et al., 1997; FIGUERAS et al., 1997). Für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Probanden wurde keine Korrelation zwischen den GST-Genotypen und basalen, sowie durch HBO induzierten, genotoxischen Effekten im Comet Assay gemessen. Die interindividuelle Variabilität konnte nicht auf GST-Genotypen zurückgeführt werden. Allerdings läßt die geringe Anzahl der in dieser Arbeit untersuchten Probanden keine endgültige Aussage zu. Auch zwischen der Mutantenfrequenz im T-Zellen-Klonierungstest und den Genotypen der Probanden wurde kein Zusammenhang gesehen. Hierbei waren besonders die drei Probanden mit GSTM/GSTT-Null-Genotyp von Interesse. Sie zeigten aber weder eine erhöhte Mutantenfrequenz vor HBO noch eine Erhöhung dieser nach HBO. Für den T-Zellen-Klonierungstest wurde von HOU et al. (1995a, b) ebenfalls keine signifikante Korrelation zwischen Mutantenfrequenz und GSTM-Genotyp beschrieben. Eine eindeutige Aussage über den Einfluß von GST-Genotypen auf die Induktion von Mutationen kann jedoch nicht getroffen werden, da für die HBO keine mutagenen

Effekte detektiert wurden. Es wären Studien notwendig, in denen nach definierter Exposition eindeutige Effekte in Mutagenitätstests nachgewiesen werden. Die Untersuchung verschiedener GST-Genotypen in derartigen Studien, könnte in der Zukunft eindeutigeren Aufschluß über die Rolle der GST-Polymorphismen bei mutagenen Prozessen und der Krebsentstehung geben.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen deutlich, daß oxidativer Streß durch HBO im Blut von Probanden zu DNA-Schäden führte. Die mit dem Comet Assay detektierten Strangbrüche sowie modifizierte Basen hatten aber weder Chromosomen-, noch Genmutationen in den gleichen Zielzellen zur Folge. Zwei mögliche Gründe sind als Ursache hierfür diskutiert worden. Der T-Zellen-Klonierungstest kann durch hohe Variabilität und nicht bekannte Expressionszeiten *in vivo* zu insensitiv sein. Durch die in dieser Arbeit nachgewiesene, schnelle Reparatur der DNA-Effekte im Comet Assay ist es aber wahrscheinlicher, daß durch HBO zwar prämutagene Läsionen induziert wurden, diese aber sehr schnell und fehlerfrei repariert wurden und so nicht zu Mutationen führten. Bedenkt man die in der Literatur beschriebenen hohen Basiswerte für oxidative DNA-Modifikationen, so erscheint es plausibel, daß sich derartig gute Reparaturmechanismen etabliert haben.

4.2 Untersuchungen zum adaptiven Schutz vor oxidativem Streß

Auch wenn die Experimente zur biologischen Bedeutung der Comet Assay-Effekte darauf hindeuten, daß es unter therapeutischen Bedingungen nicht zur Induktion von Mutationen kommt, stellt sich die Frage, inwieweit sich die Zelle vor oxidativem Streß schützen kann. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß durch Modifikation des Behandlungsprotokolls DNA-Schäden verhindert werden können. Bei schrittweiser Erhöhung der Behandlungsdauer an drei Tagen von 20 auf 40 und auf die normale Dauer von 60 Minuten wurde zu keinem Zeitpunkt ein genotoxischer Effekt im Comet Assay nachgewiesen. Dieses Protokoll könnte demzufolge in der Klinik eine Möglichkeit sein, die genotoxische Wirkung einer HBO zu vermeiden. Gleichzeitig deutet das Ergebnis darauf hin, daß der Erwerb eines antioxidativen Schutzes *in vivo* möglich ist, auch ohne daß ein genotoxischer Effekt induziert wurde. Eine Möglichkeit, den antioxidativen Mechanismus zu untersuchen, ist die Supplementation mit antioxidativ wirkenden Substanzen. Derartige Supplementierungen wären außerdem ein leicht verabreichbarer Schutz vor der genotoxischen Wirkung einer HBO. In dieser Arbeit wurden daher Probanden vor einer HBO mit Vitamin E oder mit N-Acetylcystein

supplementiert. Vitamin E ist ein fettlösliches Vitamin und unterbricht radikalische Kettenreaktionen, auch ein Schutz vor substanziellem Verlust von reduziertem Glutathion (GSH) wird diskutiert. So wurde in Ratten, denen Vitamin E zur Nahrung zugegeben worden war, erhöhte Level an GSH in der Leber und den Lungen, im Gehirn und im Blut gefunden (BOADI et al., 1991b). Eine verstärkte Erhöhung der Glutathion-Peroxidase (GPx)-Aktivität nach HBO in Vitamin E-supplementierten Ratten wurde von denselben Autoren nachgewiesen (BOADI et al., 1991a). Allerdings fanden die Autoren (BOADI et al., 1991b) keinen Einfluß einer Vitamin E-Supplementation auf HBO-induzierte Toxizität in den Ratten. Demgegenüber berichteten STONE et al. (1989) von verminderten Schäden in Vitamin E-supplementierten Ratten nach einer HBO, wobei als Parameter die Toxizität und Augenschäden gemessen wurden. Mit dem Comet Assay wurde die Effektivität der Vitamin C-, β -Carotin- und Vitamin E-Supplementation bestimmt (DUTHIE et al., 1996). Nach zwanzigwöchiger Gabe wurden niedrigere Werte für oxidierte Basen in Lymphozyten gefunden, gleichzeitig waren die Lymphozyten besser gegen in vitro Behandlung mit H_2O_2 geschützt. In vivo konnte ein protektiver Effekt von Vitamin E auf DNA-Schäden, die im Comet Assay detektiert wurden, nach extremer sportlicher Belastung gezeigt werden (HARTMANN et al., 1994). In den Leukozyten der Probanden, die sich im Rahmen dieser Arbeit nach einwöchiger Vitamin E-Supplementation einer HBO unterzogen haben, wurde allerdings keine Reduktion der DNA-Effekte im Comet Assay gemessen. Entweder sind an den Schäden, die nach einer HBO im Comet Assay detektiert wurden, ROS beteiligt, vor denen Vitamin E nicht schützt - dies könnten zum Beispiel in der direkten Nähe der DNA entstehende Hydroxylradikale sein - oder aber die Dosierung reichte für einen effektiven Schutz nicht aus.

Eine weitere Möglichkeit, um die antioxidative Kapazität zu erhöhen, stellt die Supplementierung mit N-Acetylcystein (NAC) dar. NAC wirkt antioxidativ, indem es direkt mit elektrophilen Substanzen reagiert. Dies erfolgt in der Zelle ansonsten häufig an Thiolgruppen. Indirekt erleichtert NAC die GSH Biosynthese und stellt GSH für die von der GPx-katalysierten Reaktionen zur Verfügung. Nach oraler Gabe von NAC eine Stunde vor einer HBO wurde ein verminderter GSH-Gehalt im Plasma, verglichen mit den Werten von gleichzeitig untersuchten Probanden, gefunden. Ein ähnlicher Effekt wurde von VAN KLAVEREN et al. (1997) beschrieben. In Ratten wurden niedrigere intrazelluläre GSH-Level nach NAC-Supplementation gemessen. Da den Ratten über einen Zeitraum von 10 Tagen NAC verabreicht wurde, ist nicht auszuschließen, daß bei längerer Supplementierung der Probanden ein Einfluß auf den intrazellulären GSH-Spiegel nachweisbar wäre. Die Supplementierung der Ratten führte allerdings nicht zu einem Schutz vor 80 % Sauerstoff über sieben Tage, sondern zu erhöhten DNA-Schäden. Die Autoren führen dies auf eine erhöhte GSH-Spaltung durch die γ -

Glutamytransferase und daraus resultierende Lipidperoxidation zurück und bezweifeln, daß eine Supplementation über längere Zeit sinnvoll ist. Im Gegensatz dazu konnte ein protektiver Effekt von NAC auf die toxische Wirkung von 100 % Sauerstoff in der Lunge von Ratten nachgewiesen werden (LUCAS et al., 1995). Für die gesunden Probanden der vorliegenden Arbeit wurde durch orale Supplementation mit NAC kein Schutz vor DNA-Schäden in Leukozyten nach einer HBO erzielt. Die Einnahme der NAC-Tabletten erfolgte eine Stunde vor Beginn der HBO, da BORGSTRÖM et al. (1986) die maximale Plasmakonzentration ein bis zwei Stunden nach oraler Verabreichung von NAC gemessen haben. Da die Autoren außerdem eine Verfügbarkeit von nur 6 - 10 % nach Einnahme von NAC nachwiesen, wurde für zwei Probanden eine HBO nach intravenöser Verabreichung von NAC durchgeführt. Auch durch dieses Protokoll konnte kein protektiver Effekt vor DNA-Schäden im Comet Assay erreicht werden. Ob durch eine Erhöhung der Dosierung oder andere Protokollvariationen ein Schutz erzielt werden kann, bleibt offen. Inwieweit derartige Dosierungen in der Klinik vertretbar sind, wäre dann abzuwägen. Auch sind für diese Arbeit nur gesunde Probanden supplementiert worden. Es ist durchaus denkbar, daß diese Ergebnisse nicht direkt auf Patienten übertragbar sind.

Nach der ersten HBO wurden in den Leukozyten der Probanden DNA-Schäden induziert. Durch darauffolgende HBO-Behandlungen kam es bei keinem der Probanden zu erhöhten Tailmomentwerten und die jeweiligen Kontrollwerte vor weiteren Kammerfahrten lagen unter denen vor der ersten Kammerfahrt. Dies läßt auf einen adaptiven Schutz vor ROS schließen. Für die Behandlung von Zellen in vitro wurde eine adaptive Antwort auf oxidativen Streß bereits gezeigt. So waren Zellen, die mit H₂O₂ oder Xanthin/Xanthin-Oxidase vorbehandelt wurden, vor der Induktion von DNA-Schäden geschützt (LAVAL, 1988; DOMINGUEZ et al., 1993; WIESE et al., 1995). Auch Ratten tolerierten nach einer Vorbehandlung höhere Sauerstoffkonzentrationen als nicht vorbehandelte Tiere (SJÖSTROM und CRAPO, 1983). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher untersucht, ob der in vivo durch HBO erworbene Schutz vor oxidativem Streß, auch bei ex vivo Behandlung mit ROS-generierenden Substanzen zum Tragen kommt. Für diese Versuche wurde Blut vor und einen Tag nach einer Kammerfahrt entnommen und mit γ -Strahlung oder Wasserstoffperoxid so behandelt, daß vor einer HBO eindeutige Effekte im Comet Assay und Mikronukleustest induziert wurden. Intrazellulär kommt es durch γ -Strahlung und H₂O₂ zur Entstehung von Hydroxylradikalen (MENEHINI und MARTINS, 1993; RILEY, 1994). Für γ -Strahlung wurde im Vollblut kein protektiver Schutz durch eine HBO-Behandlung nachgewiesen. Weder die Induktion von DNA-Strangbrüchen noch von Mikrokernen war nach HBO signifikant niedriger als vor HBO. Durch Strahlung kommt es durch radiolytische Spaltung des zytoplasmatischen Wassers zur Bildung von Hydroxylradikalen. Radiolyse

ist der hauptsächlichste Reaktionsmechanismus von der in der Strahlung enthaltenen Energie (RILEY, 1994). Die als Produkt der Radiolyse entstehenden Hydroxylradikale reagieren direkt mit in der Nähe befindlichen Biomolekülen wie der DNA (GUTTERIDGE, 1994). Neben dieser indirekten Schädigung der DNA durch Strahlung, die über die Bildung reaktiver Intermediate erfolgt, sind direkte Strahlenschäden bekannt (RILEY, 1994; FRIEDBERG, 1995). Sie sind zu 35 % am Gesamtschaden beteiligt (FRIEDBERG, 1995) und entstehen durch Ionisierung des DNA-Zuckerphosphatrückgrats sowie der Basen in der DNA (DIZDAROGLU, 1992). Desweiteren entstehen durch γ -Strahlung aquatisierte Elektronen (e^-_{aq}) und H-Atome, die die DNA schädigen können (DIZDAROGLU, 1992). Wenn man davon ausgeht, daß bei einer HBO DNA-Schäden über indirekte Reaktionen induziert werden, und der Körper adaptive Schutzmechanismen gegen ROS wie O_2^- , H_2O_2 und daraus resultierenden OH-Radikale erwirbt, besteht die Möglichkeit, daß die antioxidativ wirkende Substanz nicht vor anderen ROS beziehungsweise direkt DNA-schädigenden Reaktionen schützt. Antioxidative Biomoleküle wie Bilirubin können im Zytoplasma und in der Membran, nicht aber direkt an der DNA antioxidativ wirken. Das von Ferritin gebundene Eisen würde bei indirekter Entstehung von Hydroxylradikalen über die Fenton Reaktion fehlen, nicht aber bei der direkten Radiolyse von Wasser.

HBO hatte keinen Effekt auf die Induktion von DNA-Schäden durch γ -Strahlung. Im Gegensatz dazu war das Blut der Probanden einen Tag nach einer HBO vor der genotoxischen Wirkung von H_2O_2 geschützt. Weder im Comet Assay, noch im Mikronukleus-Test wurden am Tag nach einer Kammerfahrt Effekte durch H_2O_2 -Behandlung induziert. Einen Tag nach HBO wurden im Blut auch signifikant weniger H_2O_2 -induzierte, oxidativ modifizierte Basen gemessen, als bei gleicher Behandlung des Blutes vor der HBO. Dieser adaptive Schutz hielt über sieben Tage an. Eine adaptive Antwort, die mit einer Erhöhung des Reparaturproteins APE-1 nach Behandlung von HeLa-Zellen und Fibroblasten mit sublethalen Konzentrationen an ROS-generierenden Substanzen einherging, wurde von RAMANA et al. (1998) beschrieben. Derartig adaptierte Zelle zeigten eine erhöhte Resistenz gegenüber H_2O_2 und Bleomycin, was auf ihre verstärkte Fähigkeit, die DNA-Schäden zu reparieren zurückgeführt wurde. Daß Reparaturmechanismen, die bei der Adaptation in vivo eine Rolle spielen könnten, für diese Adaptation verantwortlich sind, wurde durch die ex vivo-Versuche ausgeschlossen. Da die Aufarbeitung im Comet Assay sofort nach der fünfminütigen Behandlung mit H_2O_2 erfolgte, stand überhaupt keine Zeit für Reparatur zur Verfügung. Diese Ergebnisse der ex vivo-Versuche unterstreichen den in vivo gefundenen adaptiven Mechanismus. In weiterführenden Experimenten wurde nachgewiesen, daß die Adaptation hauptsächlich auf einen zellulären Mechanismus zurückzuführen ist. Die H_2O_2 -Behandlung von isolierten Lymphozyten, die vor und einen Tag nach einer HBO

entnommen worden waren, zeigte, daß auch in isolierten Lymphozyten einen Tag nach der HBO ein Schutz vor der genotoxischen Wirkung von H_2O_2 bestand. Die niedrigeren Konzentrationen, die bei der Behandlung von isolierten Lymphozyten verwendet wurden, begründen sich in der erhöhten Empfindlichkeit der Lymphozyten in Abwesenheit der mit hoher antioxidativ wirkender Kapazität ausgestatteten Erythrozyten.

Aerob lebende Organismen haben vielfältige Strategien, um sich vor den schädigenden Auswirkungen von ROS zu schützen. Besonders das Blut mit den in ihm enthaltenen Erythrozyten und phagozytierenden Zellen bedarf eines hohen antioxidativ wirkenden Potentials. Daß antioxidative Mechanismen sich entsprechend den Anforderungen entwickelt haben, wird deutlich, wenn man Zellen untersucht, die bei geringer Sauerstoffkonzentration existieren. Bei Säugetieren gehören die Nervenzellen im Gehirn zu dieser Gruppe. Diese Zellen sind gekennzeichnet durch geringe antioxidative Kapazität und hohe Sensibilität gegenüber oxidativem Streß. Demgegenüber haben Lungenzellen eine hohe antioxidative Kapazität. Es scheint daher auch nicht verwunderlich, daß antioxidative Schutzmechanismen bei Bedarf verstärkt werden können. Die Regulation der antioxidativen Enzyme erfolgt unterschiedlich, abhängig von dem Zelltypen und der Art des schädigenden Agens (SHULL et al., 1991). Ein wichtiges Enzym, das vor oxidativem Streß schützt, ist die Superoxiddismutase (SOD). Durch Katalyse der Dismutationsreaktion überführt es Superoxidradikale in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff (FRIDOVICH, 1989). In der Literatur gibt es mehrere Hinweise auf die Beteiligung der SOD an einer adaptiven Antwort. So wurde nach in vitro Behandlung von CHO-Zellen und H4-Rattenzellen mit H_2O_2 oder Xanthin/Xanthin Oxidase eine adaptive Antwort gefunden, die mit einer Verdopplung der SOD-Aktivität einherging (LAVAL, 1988). QUINLAN et al. (1994) beschrieben eine Erhöhung der SOD in Rattenlungen nach Hyperoxie. Auch nach HBO-Behandlung wiesen Ratten eine erhöhte SOD-Aktivität in der Lunge auf. Wurden Ratten vor der HBO mit SOD behandelt, wiesen sie eine gegenüber Kontrolltieren höhere Resistenz gegenüber toxischen Sauerstoffkonzentrationen auf (HARABIN et al., 1990). CARLSON et al. (1995) haben für Mäuse, die SOD-defizient waren, eine reduzierte Überlebensfähigkeit beschrieben. Bei Messung der SOD in der Zellfraktion von Probanden vor und nach einer HBO wurde zwar eine starke interindividuelle Variabilität der Werte nachgewiesen, aber es war kein Anstieg nach HBO erkennbar. Die SOD scheint damit nicht verantwortlich für die Adaptation in vivo zu sein. Dafür spricht auch, daß Mäuse, die SOD-defizient waren, trotzdem eine adaptive Antwort entwickeln konnten (WOLFF, 1996). Für den ex vivo beobachteten Schutz vor H_2O_2 -induzierten Schäden kann die SOD ausgeschlossen werden, da H_2O_2 kein Substrat für die SOD darstellt. Vor der toxischen Wirkung von H_2O_2 schützt sich die Zelle mit den Enzymen Katalase und

Glutathion Peroxidase. Während Katalase H_2O_2 in Wasser und O_2 überführt, katalysieren Glutathion Peroxidasen die Reaktion von H_2O_2 mit GSH (HALLIWELL, 1996). In den Blutzellfraktionen nach HBO wurde auch für diese Enzyme kein Anstieg detektiert. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von WIESE et al. (1995) überein, die während adaptiver Prozesse in Zellen zwar eine erhöhte Proteinsynthese, nicht aber einen Anstieg der beschriebenen Enzyme beobachteten. Auch für lymphoblastoide Zellen wurde bei der Adaptation nach H_2O_2 -Behandlung nur ein leicht signifikanter Anstieg der Glutathion Peroxidase, nicht aber der SOD und Katalase gemessen (O'FARRELL et al., 1996). In Gehirn und Lunge von Ratten und Meerschweinchen wurde dagegen ein Anstieg der antioxidativen Enzyme nach HBO beschrieben (HARABIN et al., 1990; BOADI et al., 1991a). Bei den adaptiven Prozessen der Probanden nach HBO könnte allerdings eine Induktion der beschriebenen Enzyme in Leukozyten durch die in der Zellfraktion enthaltenen genetisch nicht regulierbaren Erythrozyten mit hohem Enzymgehalt überdeckt werden.

Auch wenn bei den ex vivo-Studien die Adaptation als zellulärer Prozeß identifiziert worden ist, schließt dies für die komplexere in vivo-Situation extrazelluläre Mechanismen, die hochreguliert werden, nicht aus. Antioxidativ wirkenden Vitaminen wird ein hoher Stellenwert bei dem Schutz vor oxidativem Streß zugeschrieben. Das Vitamin E und seine Wirkung wurde bereits beschrieben. Vitamin C fungiert aufgrund seines stark reduzierenden Potentials als Radikalfänger (STOCKER und FREI, 1991). Der protektive Effekt der Supplementation mit antioxidativen Enzymen auf oxidative DNA-Schäden wurde von DUTHIE et al. (1996) beschrieben. HBO wirkte in Ratten weniger toxisch nach Vitamin E-Gabe (STONE et al., 1989). Für die Probanden konnte nach einer HBO kein Anstieg der Vitamine A,C und E festgestellt werden. Auch der FRAP-Assay zeigte keine gegenüber der Kontrolle erhöhten Werte. Dieser Test mißt die reduzierende Fähigkeit des Plasmas, und gibt Aufschluß über die antioxidative Kapazität des Plasmas. Der Glutathion-Spiegel zeigte im Plasma sowie intrazellulär keine signifikanten Veränderungen durch hyperbaren Sauerstoff. GSH ist das hauptsächliche, niedermolekulare Antioxidans, das mit H_2O_2 , Hydroxylradikalen und Produkten der Lipidperoxidation reagieren kann. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit wurde eine Freisetzung von GSH nach oxidativem Streß in einer anderen Arbeit beschrieben (CHOI et al., 1997). Lungenepithelzellen wiesen nach Behandlung mit sublethalen Konzentrationen von Tert-Butylhydrochinon erhöhte GSH-Spiegel auf und waren aufgrunddessen geschützt vor einer folgenden schädigenden Behandlung mit Tert-Butylhydrochinon.

Messungen der antioxidative Enzyme sowie die beschriebenen Vitamine und Glutathion werden in der Literatur unter dem Begriff „antioxidativer Status“ zusammengefaßt. Der

antioxidative Status spiegelt das Gleichgewicht zwischen antioxidativem System und Prooxidantien wieder. Es wurde vorgeschlagen, daß die Bestimmung des antioxidativen Status im Rahmen von Biomonitoring Studien sinnvoll ist, um individuelle Unterschiede in der Reaktion auf oxidativen Streß zu erfassen (PAPAS, 1996). Arbeiten, in denen der antioxidative Status und Mutationsfrequenzen im Zusammenhang mit dem Alter der Personen bestimmt wurde, zeigten bei 35 - 69 jährigen keine Korrelation zwischen den gemessenen Antioxidantien und Mutationsfrequenzen (BARNETT und KING, 1995). Lediglich bei einer Gruppe von 75 - 80 jährigen wurde erhöhter Gehalt der antioxidativen Enzyme gemessen (KING et al., 1997). Allerdings deuten die in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur Messung der Antioxidantien darauf hin, daß ein adaptiver Schutz ohne Änderung des antioxidativen Status erfolgen kann. Es wurde damit in dieser Arbeit gezeigt, daß der antioxidative Status offensichtlich kein sehr sensitiver Parameter ist.

Nach oxidativem Streß wurde desweiteren eine erhöhte Expression von Proteinen beschrieben, die als Hitzeschockproteine (HSPs, heat shock proteins) bekannt sind. Die Familie der HSP70 besteht neben konstitutiv exprimierten Proteinen aus einer durch Streß induzierbaren Form. Nachdem die Expression des HSP70 eigentlich als Antwort auf zellulären Streß durch Hitze beobachtet wurde (LINDQUIST, 1986), gibt es Hinweise auf eine protektive Rolle dieser Proteine vor oxidativem Streß (AUCOIN et al., 1995; SU et al., 1998). Überexpression des HSP70-Proteins in transgenen Mäusen resultierte in einem cardioprotektiven Effekt während der Reperfusion. Nach einer HBO war für sechs der acht Probanden eine eindeutig erhöhte Expression des HSP70 zu messen. Die genaue protektive Wirkungsweise vom HSP70 ist nicht bekannt, allerdings wurde für das bakterielle HSP70 eine Interaktion mit der RNA-Polymerase und Verhinderung von deren thermaler Inaktivierung beschrieben (SKOWYRA et al., 1990). Außerdem wurde eine hohe Affinität von HSP70 zu anderen zellulären Proteinen wie Clathrin und Actin beschrieben (Übersicht bei SU et al., 1998), so daß der protektive Mechanismus nicht der direkte Schutz vor ROS-induzierten DNA-Schäden, sondern Aufrechterhaltung diverser anderer zellulärer Funktionen sein könnte, die, wenn sie nicht intakt sind, eine erhöhte Sensitivität der Zellen gegenüber oxidativem Streß bedeuten könnten.

Eine weitere Klasse streßregulierter Proteine stellen die HSP32 dar. Diese Proteine werden durch UV-Strahlung und oxidativen Streß induziert. KEYSE und TYRELL (1989) identifizierten als hauptsächliches Protein die Hämoxygenase. Die Hämoxygenase ist eine Monooxygenase und bei dem Abbau der Erythrozyten in der Milz beteiligt. Sie katalysiert die Spaltung der α -Methinbrücke im Häm, wodurch Biliverdin, Kohlenmonoxid und Fe^{3+} frei werden. Biliverdin wird im weiteren Verlauf des Abbaus durch die Biliverdin-Reduktase reduziert und es entsteht Bilirubin. Neben Ascorbat und Urat

ist das Bilirubin das wichtigste Antioxidans im Plasma, desweiteren wirkt es in Membranen antioxidativ und kommt in dieser Beziehung dem Vitamin E nahe (Übersichten bei STRYER, 1994; STOCKER und FREI, 1991). In Ratten wurde die antioxidative Rolle des Bilirubins mehrfach beschrieben. So wurde nach Exposition der Ratten gegenüber Endotoxinen eine Oxidation des Bilirubins und eine synergistische Wirkungsweise von Bilirubin mit Ascorbinsäure beobachtet (YAMAGUCHI et al., 1995). Auch im Ischämie-Reperusionsmodell wird Bilirubin eine protektive Rolle zugeschrieben (YAMAGUCHI et al., 1996). Im Serum von vier Probanden nach HBO konnte eine leichte Erhöhung des Bilirubingehaltes gemessen werden. Der Bilirubingehalt in den Lymphozyten ist schwer nachzuweisen, so daß kein Aufschluß über einen eventuellen intrazellulären Anstieg in den Lymphozyten der Probanden nach einer HBO erhalten werden konnte. Die Bilirubinmessungen können daher lediglich als Hinweis darauf betrachtet werden, daß der Häm-Metabolismus bei Ausbildung der adaptiven Antwort nach oxidativem Streß eine Rolle spielen könnte. Daher wurde die Hämoxxygenase als durch Streß induzierbares Protein untersucht. Für die Hämoxxygenase in Ratten wiesen SHIBAHARA et al. (1985) die höchste Expression in der Milz nach. Die Induktion von Hämoxxygenase 1 durch sein Substrat, das Häm, wurde von MAINES und KAPPAS (1974) beschrieben. Zwei Isoenzyme der Hämoxxygenase sind bisher bekannt, die Hämoxxygenase 1 (HO-1, 32 kDa), die induzierbar ist und die Hämoxxygenase 2 (HO-2, 36 kDa), die konstitutiv und hauptsächlich im zentralen Nervensystem exprimiert wird. Beide Proteine werden von zwei unterschiedlichen Genen kodiert (MAINES, 1988). Für eine Induktion der HO-1 sind in der Literatur eine Vielzahl von Beispielen zu finden. In Ratten wurde bereits 6 Stunden nach UV-Bestrahlung eine erhöhte HO-1-Aktivität beschrieben, die 12 Stunden nach Bestrahlung ihr Maximum erreichte (OSSOLA und TOMARO, 1998). Hamsterzellen, die HO-1 überexprimierten, zeigten eine höhere Resistenz gegenüber Hyperoxie (DENNERY et al., 1996). In polymorphonuklearen Zellen konnte eine erhöhte HO-1-Aktivität nach Entzündungsprozessen beobachtet werden (WILLIS et al., 1996). Hämoxxygenase-Synthese wurde durch HBO oder Puromycin in Linsenepithelzellen induziert (PADGAONKAR et al., 1997). Einen Tag nach Behandlung mit hyperbarem Sauerstoff, an dem sowohl ein Schutz vor HBO-induzierten DNA-Effekten als auch vor Schäden durch H₂O₂ bestand, wurde bei allen Probanden eine deutlich erhöhte Proteinmenge der HO-1 gemessen. Bei Untersuchungen zur Expression der Hämoxxygenase in Lymphozyten von Probanden vor und einen Tag nach einer HBO wurde kein erhöhter HO-1-RNA-Gehalt detektiert. Eine Induktion der HO-1 Expression wurde in mehreren Studien bereits nach wenigen Stunden beschrieben (TYRELL, 1991; NUMAZAWA et al., 1997). In diesen Studien variierte die Zeit von der Induktion bis zur maximalen Expression zwischen unterschiedlichen Zelltypen. Angaben für Lymphozyten konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Aufgrund der Expressionsdaten für andere Zelltypen wurde die HO-1-Expression vor und 4 Stunden nach einer

HBO im Northern Blot untersucht. Bei zwei von vier Probanden waren deutlich erhöhte mRNA-Level zu messen. Da die RNA-Stabilität durch oxidativen Streß nicht verändert wird (KEYSE et al., 1989), könnten individuell unterschiedliche Transkriptionsraten dafür verantwortlich sein, daß im Northern Blot nicht bei allen Probanden eine erhöhte RNA-Menge, wohl aber bei allen 8 untersuchten Probanden 24 Stunden nach HBO ein erhöhter Proteingehalt meßbar ist. Die Funktion der HO-1-Induktion als adaptive Antwort ist noch nicht vollständig geklärt, die Struktur und Bindungsstellen in der Nähe des Promotors geben allerdings Aufschluß über mögliche Induktionsmechanismen.

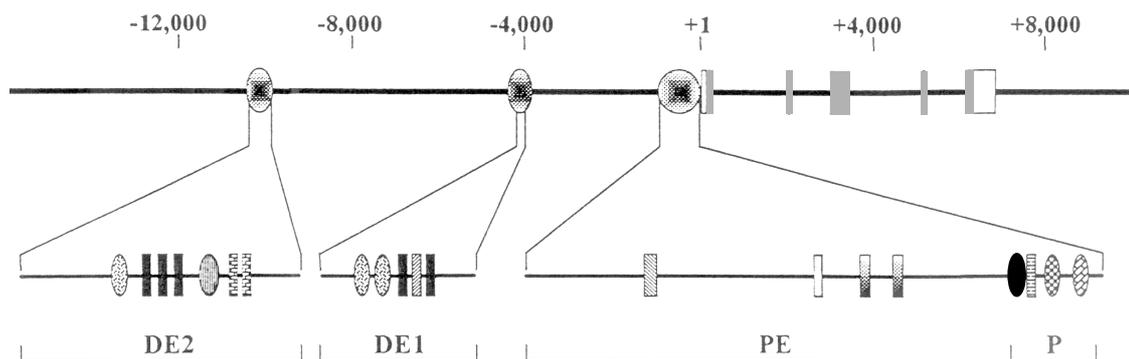


Abbildung 41: Darstellung der responsive elements und Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren des Maus-HO1-Gens mit den 5 Exons . P: Promotor, PE: proximaler Enhancer, DE1 und DE2: distale Enhancer mit den induzierbaren responsive elements AP-1 und Protein-bindungsstelle für NF-κB (nach CHOI und ALAM, 1996).

Das humane HO-1 Gen ist 14 kb lang, besteht aus 5 Exons und ist homolog zu dem in Abbildung 41 gezeigten HO-1 Gen der Maus. In drei Regionen des Gens wurden induzierbare Elemente für eine zelluläre Antwort (inducer responsive elements, IRE) identifiziert. Zum einen die „Proximale Enhancer Region“ (PE) direkt 5' von dem Promotor sowie zwei „Distale Enhancer“ (DE1 und DE2). Das hauptsächliche IRE ist eine 10 bp lange Sequenz (T/C)GCTGAGTCA, die fünfmal in den beiden DEs vorkommt und als „Streß response element“ bezeichnet wird (Übersicht bei CHOI und ALAM, 1996). Die darin enthaltene Sequenz TGAGTCA ist Bindungsstelle für die Familie der AP-1 Transkriptionsfaktoren. AP-1 Proteine setzen sich als Homo- oder Heterodimer aus den Transkriptionsfaktoren der Jun- und Fos-Familie zusammen. Die für Jun und Fos kodierenden Gene *c-jun* und *c-fos* können ohne vorherige Proteinsynthese induziert werden und tragen daher die Bezeichnung tertiäre Botenstoffe. Der Anstieg von c-Jun, c-Fos und AP-1 als Komponenten der HO-1-Induktion nach Glutathiondepletierung wurde von OGURO et al. (1996) und NUMAZAWA et al. (1997) beschrieben. Auch die Bindungsstelle für einen weiteren, durch oxidativen Streß induzierbaren Transkriptionsfaktor, das NF-κB wurde 5' vom Promotor beschrieben

(CHOI und ALAM, 1996). Für den adaptiven Effekt, der in vivo nach Exposition von Probanden gegenüber hyperbarem Sauerstoff gemessen wurde, kann folgender Reaktionsmechanismus vermutet werden: Durch oxidativen Streß werden die Transkriptionsfaktoren c-Jun und c-Fos freigesetzt, sowie NF- κ B aktiviert. Bei Bindung von AP-1 oder NF- κ B kommt es zu einem Anstieg der Expression von Hämoxxygenase. Das bei dem Abbau des Häms entstehende Bilirubin kann den antioxidativen Schutz der Zellen erhöhen.

Die Spaltung des Häms kann aber noch andere Reaktionen induzieren. Bei der Spaltung entsteht neben Kohlenmonoxid auch Fe^{3+} . Eisen kann die Ferritin-Synthese induzieren (EISENSTEIN et al., 1991; PADGAONKAR et al., 1997). Für das Ferritinprotein wird vermutet, daß es neben seiner Eigenschaft als Eisenspeicher für den Eisentransport von der Plasmamembran zu den Mitochondrien verantwortlich ist (SPEYER und FIELDING, 1979). In Säugetieren besteht das Protein mit einem Molekulargewicht von 450 kDa aus 24 Untereinheiten. Diese Untereinheiten sind Ferritin L (leichte Kette mit 19 kDa) und Ferritin H (schwere Kette mit 21 kDa). Die Anteile der beiden Untereinheiten variieren je nach Gewebetyp und Eisenstatus der Zelle. In der durch die Untereinheiten gebildeten Pore kann Ferritin bis zu 4500 Eisenatome binden (MUNRO et al., 1988). Aufgrund der Tatsache, daß die H-Kette außerdem eine Ferroxidaseaktivität besitzt, kann vermutet werden, daß im Ferritin gebundenes Eisen nicht für Redoxreaktionen zur Verfügung steht (BALLA et al., 1992). Beide Untereinheiten werden von verschiedenen Genen kodiert, desweiteren sind im Genom einige Pseudogene nachgewiesen worden. Hohe Übereinstimmungen zwischen den Aminosäuresequenzen der Untereinheiten verschiedener Säugerspezies demonstrieren die hohe Konservierung dieses Proteins (Übersicht bei MUNRO et al., 1988). Von QI und DAWSON (1994) wurde die Synthese von Ferritin nach Hypoxie in Oligodendrozyten gezeigt. Nach Behandlung mit Häm wurde für endotheliale Zellen ein erhöhter Schutz vor oxidativem Streß nachgewiesen, der mit einer Induktion von Ferritin einherging (BALLA et al., 1992). Bei in vivo-Behandlung von Ratten mit Eisen war eine erhöhte Ferritin-Synthese nachweisbar (AZIZ und MUNRO, 1986). Die Synthese von Ferritin wurde als neuer antioxidativer Mechanismus, der durch Aspirin ausgelöst werden kann, beschrieben (OBERLE et al., 1998). Die Autoren behandelten endotheliale Lungenzellen mit Aspirin und beobachteten einen mit erhöhtem Ferritingehalt einhergehenden Schutz vor H_2O_2 . Die mRNA-Level der Ferritin H-Kette in Lymphozyten von Probanden vor und 24 Stunden nach HBO in dieser Arbeit zeigten keine deutlichen Veränderungen. In den oben zitierten Arbeiten wurde allerdings eine erhöhte Ferritin-Synthese nicht aufgrund von verstärkter Transkription, sondern aufgrund erhöhter Translation nachgewiesen. Beide Untereinheiten des Ferritins in der Ratte werden auf translationaler Ebene reguliert (AZIZ und MUNRO, 1986). Von Bedeutung für diese Regulation ist eine 28-Nukleotide

lange Sequenz in der 5'untranslatierten Region (5'UTR), die für beide Untereinheiten und verschiedene Spezies vollständig identisch ist (Übersichten bei EISENSTEIN und MUNRO, 1990; MUNRO, 1990). Dieses Motiv in der Nähe der Cap-Region der 5'UTR formt eine Schleife und wird auch „iron responsive element“ (IRE) genannt, da es sich in Anwesenheit von Eisen entfaltet (Abbildung 42).

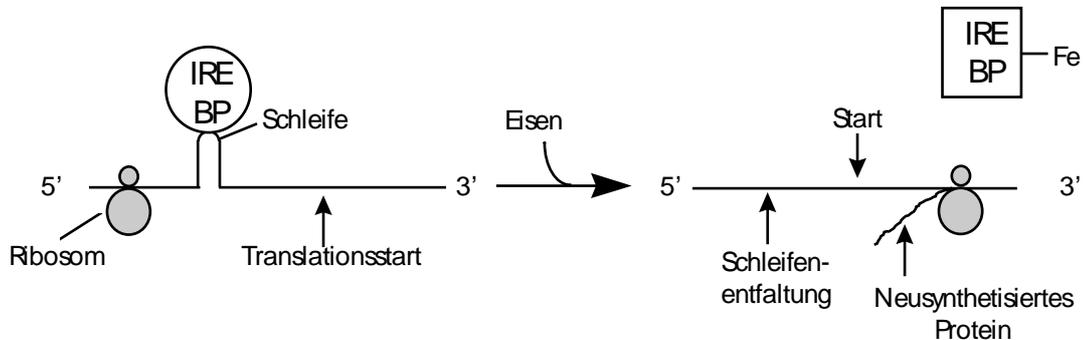


Abbildung 42: Schematische Darstellung der Regulation der Ferritin-Translation durch Eisen. IRE BP (IRE-bindendes Protein)

Diese Schleifenbildung und Regulierung der Translation durch Eisen ist auch von der 3'UTR, der Transferrinrezeptor-mRNA bekannt (Übersicht bei LATCHMAN, 1995). Allerdings wird in dem Beispiel des Transferrinrezeptors durch Eisen eine negative Regulation der RNA-Stabilität erzielt, da Entfaltung die RNA angreifbar für Nukleasen macht. Befindet sich das IRE aber in der 5'UTR, so kann überschüssiges Eisen, das IRE-bindende Protein inaktivieren (IRP-1) oder degradieren (IRP-2) (HENTZE und KÜHN, 1996). Die RNA wird dann entfaltet, dadurch können die Ribosomen an den Translationsstart gelangen und die Translation des Ferritins kann erfolgen. Es kann so zu einer erhöhten Ferritin-Synthese kommen, die auf der RNA-Ebene nicht detektiert werden kann. Für die Ferritin L-Kette wurde neben der Regulation auf post-transkriptionaler Ebene auch ein Anstieg der mRNA nach Behandlung der Zellen mit Eisen (WHITE und MUNRO, 1988) oder Häm (BALLA et al., 1992) beschrieben. Die erhöhten mRNA-Level wurden bereits eine Stunden nach Injektion von Eisen in Ratten gemessen und blieben bei Behandlung von endothelialen Zellen mit Häm auch nach 20 Stunden erhöht. In den Lymphozyten von Probanden wurde 4 und 24 Stunden nach HBO der mRNA-Gehalt von der Ferritin L-Kette bestimmt und zeigte einen deutlichen Anstieg vier Stunden und leicht erhöhte Werte 24 Stunden nach HBO. Für die Rolle des Ferritins bei den in dieser Arbeit beobachteten adaptiven Prozessen spricht auch, daß nach HBO kein Schutz vor γ -Strahlung gemessen wurde. Bei DNA-schädigenden Prozessen, die nicht über die Fenton-Reaktion ablaufen, kann durch verstärkte Eisenbindung kein Schutz erreicht werden. Außerdem wurde ein proliferationshemmender Einfluß von Ferritin in Lymphozyten beschrieben (FARGION et al., 1991). Eine erhöhte

Ferritinsynthese könnte demzufolge auch für die langsamere Proliferation der Lymphozyten im Mikronukleustest nach HBO verantwortlich sein. Ein in der Abbildung 43 dargestellter Mechanismus für die Adaptation und den Schutz vor oxidativem Streß scheint aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit für die in vivo-Situation im Menschen wahrscheinlich.

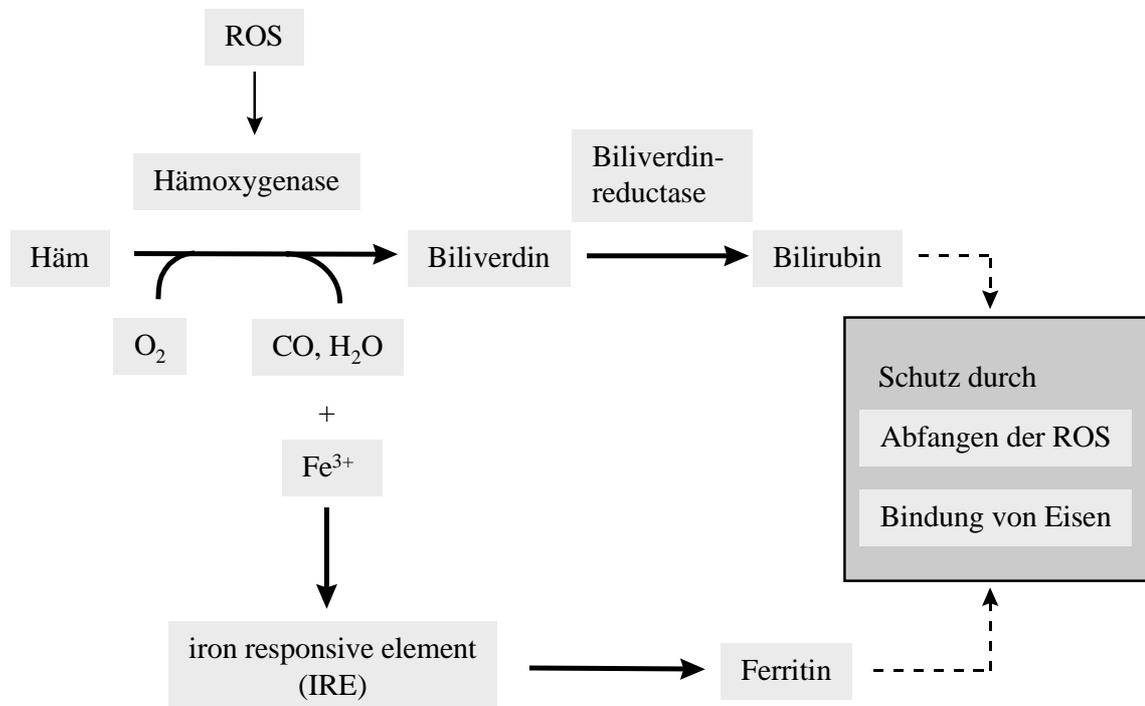


Abbildung 43: Schematisch dargestellter Mechanismus der Adaptation im Menschen nach HBO.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zur Untersuchung von DNA-Effekten nach wiederholter Exposition gegenüber hyperbarem Sauerstoff zeigen, daß im Menschen ein adaptiver Schutz vor HBO-induzierten DNA-Schäden aufgebaut wurde. Mit den in vitro-Experimenten erfolgte der Nachweis, daß es sich bei diesem Schutz um einen zellulären Mechanismus handelt, der zum protektiven Schutz vor H_2O_2 , nicht aber vor γ -Strahlung führte. Als wahrscheinlicher Mechanismus für die adaptive Antwort auf oxidativen Streß im menschlichen Körper wurde in dieser Arbeit die Induktion der Hämoxxygenase und des Ferritin nachgewiesen. Bilirubin als Abbauprodukt der Hämoxxygenase besitzt ein antioxidatives Potential und das beim Hämabbau freiwerdende Eisen führt zu einer erhöhten Ferritinsynthese. Ferritin bindet Eisen redoxinaktiv das dadurch für die Fentonreaktion nicht zur Verfügung steht.

5. Literaturverzeichnis

- Albertini, R.J., Castle, K.L., Borcharding, W.R.: T-cell cloning to detect the mutant 6-thioguanine-resistant lymphocytes present in human peripheral blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 6617-6621 (1982)
- Albertini, R.J.: Somatic gene mutations in vivo as indicated by the 6-thioguanine-resistant T-Lymphocytes in human blood. *Mutat. Res.* 150: 411-422 (1985)
- Albertini, R.J., Nicklas, J.A., Fuscoe, J.C., Skopek, T.R., Branda, R.F., O'Neill, J.P.: In vivo mutations in human blood cells: Biomarkers for molecular epidemiology. *Environm. Health Persp.* 99: 135-141 (1993)
- Almeling, M.: Definition und historischer Überblick. In Almeling, M., Welslau, W. (Hrsg): *Grundlagen der hyperbaren Sauerstofftherapie*. Archimedes Verlag, Strande (1996)
- Ames, B., Shigenaga, M.: Oxidants are a major contributor to cancer and aging. In Halliwell, B., Aruoma, O. (Eds.): *DNA and free radicals*. p.1-18. Ellis Horwood, New York (1993)
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., Hagan, T.M.: Oxidants, antioxidants and the degenerative disease of aging. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 90:7915-7922 (1993)
- Ammenheuser, M.M., Ward Jr, J.B., Whorton, E.B., Killian, J.M., Legator, M.S.: Elevated frequencies of 6-thioguanine-resistant lymphocytes in multiple sclerosis patients treated with cyclophosphamide: a prospective study. *Mutat. Res.* 204: 509-520 (1988)
- Anderson, D., Yu, T., Philipps, B., Schmezer, P.: The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA-damage in human lymphocytes in the Comet Assay. *Mutat. Res.* 307: 261-271 (1994)
- Anderson, D.: Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat. Res.* 350: 103-108 (1996)
- Ansari, A.A., Mayne, A., Sundstrom, J.B., Gravanis, M.B., Kanter, K., Sell, K.W., Villinger, F., Siu, C.O., Herskowitz, A.: Frequency of hypoxanthine guanine

phosphoribosyltransferase (HPRT-) T cells in the peripheral blood of cardiac transplant recipients. A noninvasive technique for the diagnosis of allograft rejection. *Circulation* 92 (4): 862-874 (1995)

Arrigo, A.P., Kretz-Remy, C.: Regulation of mammalian gene expression by free radicals. In: O.I. Aruoma and B.Halliwell (Hrsg) *Molecular Biology of free radicals in human diseases*, OICA International, Santa Lucia, London: S. 183-223 (1998)

Aruoma, O.I.: Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food and Chem. Tox.* 32: 671-683 (1994)

Aruoma, O.I., Halliwell, B. (Hrsg) *Molecular Biology of free radicals in human diseases*, OICA International, Santa Lucia, London (1998)

Asami, S., Hirano, T., Yamaguchi, R., Tomioka, Y., Itho, H., Kasai, H.: Increase of a type of oxidative damage, 8-hydroxyguanine, and its repair activity in human leukocytes by cigarette smoking. *Cancer Res.* 56: 2546-2549 (1996)

Aucoin, M.M., Barhoumi, R., Kochevar, D.T., Granger, H.J., Burghardt, R.C.: Oxidative injury of coronary venular endothelial cells depletes intracellular glutathione and induces HSP 70 mRNA. *Am. J. Physiol.* 268 (4 Pt 2):H1651-1658 (1995)

Aziz, N., Munro, H.N.: Both subunits of rat liver ferritin are regulated at a translational level by iron induction. *Nucl. Acids Res.* 14 (2): 915-927 (1986)

Babior, B.M., Woodman, R.C.: Chronic granulomatous disease. *Semin-Hematol.* 27(3): 247-259 (1990)

Balla, G., Jacob, H.S., Balla, J., Rosenberg, M., Nath, K., Apple, F., Eaton, J.W., Vercellotti, G.M.: Ferritin: A cryoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J. Biol. Chem.* 267 (25): 18148-18153 (1992)

Barnett, Y.A., King, C.M.: An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. *Mutat. Res.* 338: 115-128 (1995)

- Bashir, S., Harris, G., Denmann, M.A., Blake, D.R., Winyard, P.G.: Oxidative DNA damage and cellular sensitivity to oxidative stress in human autoimmune diseases. *Ann. Rheum. Dis.* 52: 659-666 (1993)
- Bastlová, T., Vodicka, P., Peterková, K., Hemminki, K., Lambert, B.: Styrene oxide-induced HPRT mutations, DNA adducts and DNA strand breaks in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis* 16(10): 2357-2362. (1995)
- Bell, D.A., Taylor, J.A., Paulson, D.F., Robertson, C.N., Mohler, J.L., Lucier, G.W.: Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 85: 1159-1164 (1993)
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J.: The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of „antioxidant power“: The FRAP assay. *Analyt. Biochem.* 239: 70-76 (1996)
- Bessho, T., Tano, K., Kasai, H., Ohtsuka, E., Nishimura, S.: Evidence for two DNA repair enzymes for 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine) in human cells. *J. Biol. Chem.* 258: 19416-19421. (1993)
- Betancourt, M., Ortiz, R., Gonzyles, C. Perez, P., Cortes, L., Rodriguez, L., Villasenor, L.,: Assessment of DNA damage in leukocytes from infected and malnourished children by single cell gel electrophoresis/comet assay. *Mutat. Res.* 331: 65-77 (1995)
- Betti, C., Davini, T., Gianessi, L., Loprieno, N., Barale, R.: Microgel electrophoresis assay (comet assay) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. *Mutat. Res.* 307: 323-333 (1994)
- Betti, C., Davini, T., Gianessi, L., Loprieno, N., Barale, R.: Comparative studies by comet test and SCE analysis in human lymphocytes from 200 healthy subjects. *Mutat. Res.* 343: 201-207 (1995).
- Bishop, J.: The molecular genetics of cancer. *Science* 235: 305-311 (1987)

- Boadi, W.Y., Thaire, L., Kerem, D., Yannai, S.: Effects of dietary factors on antioxidant enzymes in rats exposed to hyperbaric oxygen. *Vet. Hum. Toxicol* 33 (2): 105-109 (1991a)
- Boadi, W.Y., Thaire, L., Kerem, D., Yannai, S.: Effects of dietary supplementation with vitamin E, riboflavin and selenium on central nervous system oxygen toxicity. *Pharmacol. Toxicol.* 68: 77-82 (1991b)
- Boiteux, S., Gajewski, E., Laval, J., Dizdaroglu, M.: Substrate specificity of the *Escherichia coli* Fpg protein (formamidopyrimidine-DNA-glycosylase): excision of purine lesions in DNA produced by ionizing radiation or photosensitization. *Biochem.* 31: 106-110 (1992)
- Borgström, L., Kagedahl, B., Paulsen, O.: Pharmacokinetics of N-Acetylcysteine in man. *Eur. J. Pharmacol.* 31: 217-222 (1986)
- Branda, R.F., O'Neill, J.P., Sullivan, L.M., Albertini, R.J.: Factors influencing mutation at the hprt Locus In T-lymphocytes: Woman treated for breast cancer. *Cancer Res.* 51: 6603-6607 (1991)
- Branda, R.F., Sullivan, L.M., O'Neill, J.P., Falta, M.T., Nicklas, J.A., Hirsch, B., Vacek, P.M., Albertini, R.J.: Measurement of HPRT mutant frequencies in T-lymphocytes from healthy human populations. *Mutat-Res.* 285(2): 267-279 (1993)
- Branda, R.F., Albertini, R.J.: Effect of dietary components on hprt mutant frequencies in human T-lymphocytes. *Mutat Res* 346: 121-127 (1995)
- Brawn, K., Fridovich, I.: DNA strand scission by enzymically generated oxygen radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 206(2): 414-419 (1981)
- Burckhart-Schultz, K.J., Thomas, C.B., Thompson, C.L., Strout, C.L., Brinson, E., Jones, I.: Characterization of in vivo somatic mutations at the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene of a human control population. *Environm. Health Persp.* 101: 68-74 (1993)

- Burckhart-Schultz, K.J., Thompson, C.L., Jones, I.M.: Spectrum of somatic mutation at the hypoxanthine phosphoribosyltransferase (hprt) gene of healthy people. *Carcinogenesis* 17 (9): 1871-1883 (1996)
- Buschfort, C., Müller, M.R., Seeber, S., Rajewsky, M.F., Thomale, J.: DNA-excision repair profiles of normal and leukemic human lymphocytes: functional analysis at the single-cell level. *Cancer Res.* 57:651-658 (1997)
- Cadet, J., Berger, M., Douki, T., Ravanat, J.: Oxidative damage to DNA: formation, measurement, and biological significance. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 131: 1-87 (1997)
- Camporesi, E., Mascia, M., Thom, S.: Physiologic principles of hyperbaric oxygenation. In: Oriani, G., Marroni, A., Wattel, F. (Hrsg): *Handbook on hyperbaric medicine.*, S. 35-58, Springer Verlag, Berlin (1996)
- Cariello, N.F., Craft, T.R., Vrieling, H., van-Zeeland, A.A., Adams, T., Skopek, T.R.: Human HPRT mutant database: software for data entry and retrieval. *Environ. Mol. Mutagen.* 20(2): 81-83 (1992)
- Carlson, L.M., Jonsson, J., Edlund, T., Marklund, S.L.: Mice lacking extracellular superoxide dismutase are more sensitive to hyperoxia. *Proc. Natl. Acad. Sc. USA* 92: 6264-6268 (1995)
- Cerruti, P.A.: Proxidant states and tumor activation. *Science* 227: 375-381 (1985)
- Cheeseman, K.H.: Lipid peroxidation and Cancer. In: Halliwell B. und Aruoma O.I. *DNA and Free radicals* Ellis Horwood, London, S. 109-144 (1993)
- Choi, A.M.K., Alam, J.: Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15: 9-19 (1996)
- Choi, J., Liu, R.M., Forman, H.J.: Adaptation to oxidative stress: quinone-mediated protection of signaling in rat lung epithelial L2 cells. *Biochem. Pharmacol.* 53(7): 987-993 (1997)

- Cole, J., Green, M.H.L., James, S.E., Henderson, L., Cole, H.: A further assessment of factors influencing measurements of thioguanine-resistant mutant frequency in circulating T-lymphocytes. *Mutat Res* 204: 493-507 (1988)
- Cole, J., Skopek, T.R.: Somatic mutant frequency, mutation rates and mutational spectra in the human population in vivo. *Mutat Res* 304: 33-105 (1994)
- Cole, J., Arlett, C.F., Green, M.H., Holdsworth, D., Tawn, E.J., Bridges, B.A.: Mutant frequencies in workers at the Sellafield installation. *Health. Phys.* 68(3): 388-393 (1995)
- Collins, A., Duthie, S., Dobson, V.: Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA. *Carcinogenesis* 14: 1733-1735 (1993)
- Collins, A.R., Ai-guo, M., Duthie, S.J.: The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat.Res.* 336: 69-77 (1995)
- Collins, A., Dusinska, M., Gedik, C., Stetina, R.: Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Env. Health Persp.* 104: 465-469 (1996).
- Collins, A., Dobson, V., Dusinka, M., Kennedy, G., Stetina, R.: The comet assay: what can it really tell us? *Mutat. Res.* 375 : 183-193 (1997)
- Davies, K.J.A.: Protein damage and degradation by oxygen radicals. *J. Biol. Chem.* 262: 9895-9901 (1987)
- Davies, M.J., Lovell, D.P., Anderson, D.: Thioguanine-resistant mutant frequency in T-lymphocytes from a healthy human population. *Mutat. Res.* 265: 165-171 (1992)
- Dean, R.T., Fu, S.-L. Stocker, R. Davies, M.J.: Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal* 324: 1-18, (1997)
- De Martino, G., Luchetti, M., De Rosa, R.: Toxic effect of oxygen. In: Oriani, G., Marroni, A., Wattel, F. (Eds.): *Handbook on hyperbaric medicine.*, p.60-74. Springer Verlag, Berlin (1996)

- Demple, B., Johnson, A.W., Fung, D.: Exonuclease III and endonuclease IV remove 3' blocks from DNA synthesis primers in H₂O₂-damaged Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sc. USA 83: 7731-7735 (1986)
- Dennerly, P.A., Wong, H.E., Sridhar, K.J., Rodgers, P.A., Sim, J.E., Spitz, D.R.: Differences in basal and hyperoxia-associated HO expression in oxidant-resistant hamster fibroblasts. Am. J. Physiol. 271(4 Pt 1): L 672-679 (1996)
- D'Errico, A., Taioli, E., Chen, X., Vineis, P: Genetic metabolic polymorphisms and the risk of cancer: a review of the literature. Biomarkers 1:149-173 (1996)
- Di Mascio, P., Kaiser, S., Sies, H.: Lycopene as the most efficient biological carotenoid singlet oxygen quencher. Arch. Biochem. Biophys. 274:532-538 (1989)
- Dix T.A. und Aitkens, J.: Mechanisms and biological relevance of lipid peroxidation. Chemical research in Toxicology 6: 2-18 (1993)
- Dizdaroglu, M.: Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. Mutat. Res. 275: 331-342 (1992)
- Dizdaroglu, M.: Chemistry of free radical damage to DNA and nucleoproteins. In: Halliwell, B., Aruoma, O. (Hrsg), DNA and free radicals., S. 19-40. Ellis Horwood, New York (1993)
- Dominguez, I., Panneerselvam, N., Escalza, P., Natarajan A., Cortes, F.: Adaptive response to radiation damage in human lymphocytes conditioned with hydrogen peroxide as measured by the cytokinesis-block micronucleus technique. Mutat. Res. 301: 135-141 (1993)
- Doumas, B.T., Kwok-Cheung, P.P., Perry, B.W., Jendrzczak, B., McComb, R.B., Schaffer, R., Hause, L.L.: Candidate reference method for determination of total bilirubin in serum: development and validation. Clin. Chem. 31(11): 1779-1789 (1985)
- Downes, C.S., Ryan, A.J., Johnson, R.T.: Fine tuning of DNA repair in transcribed genes: mechanisms, prevalence and consequences. Bioessays 15(3): 209-216 (1993)

- Duthie, S.J., Ross, M., Collins, A.R.: The influence of smoking and diet on the hypoxanthine phosphoribosyltransferase (hprt) mutant frequency in circulating T lymphocytes from a normal human population. *Mutat Res* 331: 55-64. (1995)
- Duthie, S.J., Ma, A., Ross, M.A., Collins, A.R.: Antioxidant supplementation decreases oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Cancer Res.* 56: 1291-1295 (1996)
- Edwards, A., Voss, H., Rice, P., Civitello, A., Stengemann, J., Schwager, C., Zimmermann, J., Erfle, H., Caskey, C.T., Ansorge, W.: Automated DNA sequencing of the human HPRT locus. *Genomics* 6: 593-608, (1990)
- Eisenstein, R.S., Munro, H.N.: Translational regulation of ferritin synthesis by iron. *Enzyme* 44: 42-58 (1990)
- Eisenstein, R.S., Garcia-Mayol, D., Pettingell, W., Munro, H.N.: Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 688-692, (1991)
- Epe, B., Hegler J., Wild. D.: Identification of ultimate DNA damaging oxygen species. *Environ. Health Perspect.* 88: 111-115 (1990)
- Epe, B.: Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem.-Biol. Interact* 80: 239-260 (1991)
- Epe, B., Pflaum, M., Häring, M., Hegler, J., Rüdiger H.: Use of repair endonucleases to characterize DNA damage induced by reactive oxygen species in cellular and cell-free systems. *Tox. Letters* 67: 57-72 (1993)
- Epe, B.: DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 127: 223-249 (1995)
- Esterbauer, H., Gebiki, J., Puhl, H., Jurgens, G.: The role of lipid peroxidation and antioxidants on oxidative modification of LDL. *Free Rad. Biol. and Med.* 13: 341-390 (1992)
- Fairbairn, D., Olive, P., Neill, K.: The Comet Assay: A comprehensive review. *Mutat. Res.* 339: 39-59 (1995)

- Fairburn, D.W., Walburger, D.K., Fairburn, J.J., O'Neill, K.L.: Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: discriminating apoptosis from necrosis. *Scanning* 18: 407-416 (1996)
- Fargion, S., Fracanzani, A.L., Brando, B., Arosio, P., Levi, S., Fiorelli, G.: Specific binding sites for H-ferritin on human lymphocytes: modulation during cellular proliferation and potential implication in cell growth control. *Blood* 78(4): 1056-1061 (1991)
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B.: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132(1): 6-13 (1983)
- Feinberg, A.P., Vogelstein, B.: "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal. Biochem.* 137(1): 266-267 (1984)
- Fenech, M., Morley, A.: Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.* 147: 29-36, (1985)
- Fenech, M.: The cytokinesis-block micronucleus technique. In Pfeifer, G. (Hrsg): *Technologies for detection of DNA damage and mutations*, Plenum Press, New York, S. 25-36 (1996)
- Fenwick, R.G.: Revision of a mutation affecting the molecular weight of HGPRT: intragenic suppression and localization of X-linked genes. *Somat. Cell Genet.* 6: 477-494 (1980)
- Figueras, J., Gene, M., Gomez-Catalan, J., Galan, M., Fuentes, M., Ramon, J., Rodamilans, M., Huguet, E., Corbella, J.: Glutathion S-transferase M1 (GSTM1) and T1 (GSTT1) polymorphisms and lung cancer risk among Northwestern Mediterraneans. *Carcinogenesis* 18: 1529-1533 (1997)
- Floyd, R.A., Watson, J.J., Harris, J., West, M., Wong, P.K.: Formation of 8-hydroxydeoxyguanosine, hydroxyl free radical adduct of DNA in granulocytes exposed to the tumor promoter, tetradecanoyl phorbolacetate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137: 841-846 (1986)

- Floyd, R.: The role of 8-hydroxyguanine in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 11: 1447-1450 (1990)
- Francke, U., Taggart, R.T.: Comparative gene mapping: order of loci on the X-chromosome is different in mice and humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 3593-3599 (1980)
- Frei, B., Stocker, R., Ames, B.N.: Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 9748-9752 (1988)
- Frei, B., Forte, T.M., Ames, B.N., Cross, C.E.: Gas phase oxidants of cigarette smoke induce lipid peroxidation and changes in lipoprotein properties in human blood plasma. *Biochem. J.* 277: 133-138 (1991)
- Fridovich, I.: Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 247(1): 1-11 (1986)
- Fridovich, I.: Superoxide dismutases. An adaptation to paramagnetic gas. *J. Biol. Chem.* 264: 7761-7764 (1989)
- Friedberg, E.C.: Base excision repair. In *DNA Repair*, W.H. Freeman & Co., New York (1985)
- Friedberg, E., Walker, G., Siede, W. (Eds.): *DNA repair and mutagenesis*. ASM Press, Washington (1995)
- Fu, S., Davies, M.J., Dean, R.T.: Molecular aspects of free radical damage to proteins. In: Aruoma, O.I. and Halliwell, B. (Hrsg) *Molecular Biology of free radicals in human diseases*, OICA International, Santa Lucia, London: S. 29-56 (1998)
- Gedik, C.M., Ewen, S.W.B., Collins, A.R.: Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 62: 313-320 (1992)
- Gibbs, R.A., Nguyen, P.N., Edwards, A., Civitello, A. B., Caskey, C.T.: Multiplex DNA deletion detection and exon sequencing of the hypoxanthine

- phosphoribosyltransferase gene in Lesch-Nyhan families. *Genomics* 7: 235-244, (1990)
- Goldstein, B.D., Witz, G., Amoruso, M., Stone, D.S., Troll W.: Stimulation of human polymorphonuclear leukocyte superoxide anion radical production by tumor promoters. *Cancer Lett.* 11(3): 257-62 (1981)
- Gonzales, F.J.: Xenobiotic-metabolizing enzymes in biomarker research. In: Mendelsohn, M.L., Peeters, J.P., Normandy, M.J. (Hrsg): *Biomarkers and Occupational Health*, Washington D.C., Joseph Henry Press, S. 238-256 (1995)
- Green, M.H.L., Lowe, J.E., Waugh, A.P.W., Aldridge, K.E., Cole, J., Arlett, C.F.: Effect of diet and vitamin C on DNA strand breakage in freshly-isolated human blood cells. *Mutat. Res.* 316: 91-102 (1994)
- Guerrero, I., Villasante, A., Corcer, V., Pellicer, A.: Activation a c-k-ras oncogene by somatic mutations in mouse lymphomas induced by γ -radiation. *Science* 225: 1159-1162 (1984)
- Guskov, E., Shkurat, T., Shimanskaja, E., Guskova, S.: Genetic effect of hyperbaric oxygen therapie. *Mutat. Res.* 241: 341-347 (1990)
- Gutteridge, J.: Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemo. Biol. Int.* 91: 133-140 (1994)
- Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B.: *Antioxidants in nutrition, health and disease*. Oxford University Press, Oxford (1996)
- Hakoda, M., Akiyama, M., Kyozumi, S., Kobuke, K., Awa, A.A., Yamakido, M.: Increased somatic cell mutant frequency in atomic bomb survivors. *Mutat. Res.* 201: 39-48 (1988)
- Halliday, J.W., Powell, L.W.: Ferritin and cellular iron metabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 526: 101-112 (1988)
- Halliwell B.: The chemistry of free radicals. *Toxicol. Ind. Health.* 9(1-2): 1-21 (1993a)

- Halliwell, B.: Oxidative DNA damage, meaning and measurement. In: Halliwell, B., Aruoma, O. (Hrsg), DNA and free radicals., S. 67-82. Ellis Horwood, New York (1993b)
- Halliwell, B.: Free radicals, antioxidants and human disease: curiosity, cause or consequence? *The Lancet* 344: 721-724 (1994)
- Halliwell, B.: Antioxidants in human health and disease. *Ann. Rev. Nutr.* 16: 33-50 (1996)
- Halliwell, B., Aruoma, O.: DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS* 281(1-2): 9-19 (1991)
- Halliwell, B., Dizdaroglu, M.: The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques. *Free Radic. Res. Commun.* 16: 75-87 (1992)
- Halliwell B., Gutteridge, J.M.C.: Role of iron in oxygen radical reactions. *Methods. Enzymol.* 105: 47-56 (1984)
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.: Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys* 246: 501-514 (1986)
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.: The superoxide theory of oxygen toxicity. In: Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (Hrsg) *Free radicals in biology and medicine*, Oxford University Press, New York, S. 136-176 (1989)
- Harabin, A.L., Bristed, J.C., Flynn, E.T.: Response of antioxidant enzymes to intermittent and continuous hyperbaric oxygen. *J.Appl. Physiol.* 69: 328-335 (1990)
- Hartmann, A., Plappert, U., Raddatz, K., Grünert-Fuchs M., Speit, G.: Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis* 9: 269-272 (1994)
- Hartmann, A., Speit, G.: The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol. Lett.* 90(2-3): 183-188 (1997)
- Hartmann, A., Pfuhrer, S., Dennog, C., Germadnik, D., Pilger, A., Speit, G.: Exercise-induced DNA effects in human leukocytes are not accompanied by increased

- formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine or induction of micronuclei. *Free Radic. Biol. Med.* 24(2): 245-251 (1998)
- Hayes, J., Pulford, D.: The glutathion S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30: 445-600 (1995)
- Heiliger, F.: Ascorbic acid analysis by HPLC, *Current Methods in Separation* 2: 4-5 (1980)
- Helbig, R., Speit, G.: DNA effects in repair-deficient V79 Chinese hamster cells studied with the comet assay. *Mutat.-Res.* 377(2): 279-286 (1997)
- Helzlsouer, K.J., Selmin, O., Huang, H.-Y, Strickland, P.T., Hoffman, S., Alberg, A.J., Watson, M., Comstock, G.W., Bell, D.: Association between glutathione S-Transferase M1, P1 and T1 genetic polymorphisms and development of breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 90 (7)512-518 (1998)
- Henderson, L., Cole, H., Cole, J., James, S.E., Green, M.H.L.: Detection of somatic mutations in man, evaluation of the microtiter cloning assay for T-lymphocytes. *Mutagenesis* 1: 195-200 (1986)
- Henderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bournier, C., Windebank, S.: The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis* 13(1): 89-94 (1998)
- Hentze, M.W., Kühn, L.C.: Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8175-8182 (1996)
- Hingbootham K.G., Rice, J.M., Divan, B.A., Kasprzak K.S., Reed, C.D., Perantoni, A.O.: GGT to GTT transversions in codon 12 of the K-ras oncogene in rat renal sarcomas induced with nickel subsulfide or nickel subsulfide/iron are consistent with oxidative damage to DNA. *Cancer Res.* 52: 4747- 4751 (1992)

- Hou, S.M., Stehen, A.M., Fält, S., Andersson, B.: Molecular spectrum of background mutation at the hprt locus in human T-lymphocytes. *Mutagenesis* 8(1): 43-49 (1993)
- Hou, S.M., Lambert, B., Hemminki, K.: Relationship between hprt mutant frequency, aromatic DNA adducts and genotypes for GSTM1 and NAT2 in bus maintenance workers. *Carcinogenesis* 16 (8): 1913-1917 (1995a)
- Hou, S.M., Fält, S., Stehen, A.M.: HPRT mutant frequency and GSTM1 genotype in non-smoking healthy individuals. *Environm. Mol. Mutagenesis* 25: 97-105 (1995b)
- Hussain, S.P., Aguilar, F., Amstad, P., Cerutti, P.: Oxy-radikal induced mutagenesis of hot spot codons 248 and 249 of the human p53 gene. *Oncogene* 9: 2277-2281 (1994)
- Idle, J.R.: Is environmental carcinogenesis modulated by host polymorphism? *Mutat. Res.* 247: 259-266 (1991)
- Imlay, J., Linn, S.: DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 240: 1302-1309 (1988)
- Jamieson, D., Chance, B., Cadenas, E., Boveris, A.: The relation of free radical production to hyperoxia. *Ann. Rev. Physiol.* 48: 703-719 (1986)
- Janssen, Y., Van Houten, B., Borm, P., Mossman, B.: Biology of disease. Cell and tissue responses to oxidative damage. *Lab. Inv.* 69: 261-274 (1993)
- Jendrassik, L., Grof, P.: Vereinfachte photometrische Methoden zur Bestimmung des Blut-Bilirubins. *Biochem. Z.* 297: 81-89 (1938)
- Joenje, H.: Genetic toxicology of oxygen. *Mutat. Res.* 219: 193-208 (1989)
- Jolly, D., Okayama, H., Berg, P., Esty, A., Filupa, D., Bohlen, P., Johnson, G., Shivley, J., Hunkapillar, T., Friedmann, T.: Isolation and characterization of a full-length expressible cDNA for human hypoxanthine phosphoribosyl transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:477-481 (1983)

- Jones, I.M., Moore, D.H., Thomas, C.B., Thompson, C.L., Strout, C.L., Burkhart-Schulz, K.: Factors affecting HPRT mutant frequency in T-lymphocytes of smokers and nonsmokers. *Cancer Epiderm. Biomarkers Prevention* 2: 249-260 (1993)
- Kagawa T.F., Geierstanger B.H., Wang A.H., Ho P.S.: Covalent modification of guanine bases in double-stranded DNA. The 1.2-Å Z-DNA structure of d(CGCGCG) in the presence of CuCl₂. *J. Biol. Chem.* 266(30): 20175-20184 (1991)
- Kamiya, H., Miura, K., Ishikawa, H., Nishimura, S., Ohtsuka, E.: c-Ha-ras containing 8-hydroxyguanine at codon 12 induces point mutations at the modified and adjacent positions. *Cancer Res.* 52: 3483-3485 (1992)
- Karakaya, A., Jaruga, P., Bohr, V.A., Grollman, A.P., Dizdaroglu, M.: Kinetics of excision of purine lesions from DNA by Escherichia coli FPG protein. *Nucl. Acids Res.* 25 (3): 474-479 (1997)
- Kasai, H., Nishimura, S.: Formation of 8-Hydroxyguanosin in DNA by oxygen radicals and its biological significance. In Sies, H. (Ed.): *Oxidative Stress. Oxidants and antioxidants.*, S. 99-116. Academic Press, London (1991)
- Kelsey, K.T., Wiencke, J.K., Ward, J., Bechtold, W., Fajen, J.: Sister chromatid exchanges, glutathione S-transferase θ deletion and cytogenetic sensitivity to diepoxybutane in lymphocytes from butadiene monomer production workers. *Mutat. Res.* 335: 267-273 (1995)
- Ketterer, B., Coles, B.: Glutathione transferases and products of reactive oxygen. In: Sies, H. (Ed.): *Oxidative stress. Oxidants and antioxidants.*, S. 171-193. Academic Press, London (1991)
- Keyse, S.M., Tyrell, R.M.: Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UV radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 99-103 (1989)
- King, C.M., Bristow-Craig, H.E., Gillespie, E.S., Barnett, Y.A.: In vivo antioxidant status, DNA damage, mutation and DNA repair capacity in cultured lymphocytes from healthy 75- to 80-year-old humans. *Mutat. Res.* 377: 137-147 (1997)

- Kindwall, E., Gottlieb, L., Larson, D.: Hyperbaric oxygen therapie in plastic surgery: a review article. *Plastic Rec. Surg.* 88: 898-908 (1991)
- Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., Ahnström, G.: The Comet Assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat. Res.* 363: 89-96 (1996)
- Kolachana, P., Subrahmanyam, V.V., Meyer, K.B., Zhang, L., Smith, M.T.: Benzene and ist phenolic metabolites produce oxidative DNA damage in HL60 cells in vitro and in the bone marrow in vivo. *Cancer Res.* 53:1023-1026 (1993)
- Krenitzky, T., Papaionannou, R., Elion, G.: Human hypoxanthine phosphoribosyltransferase. *J. Biol. Chem.* 244:1263-1270 (1969)
- Kuchino, Y., Mori, F., Kasai, H., Inoue, H., Iwai, S., Miura, K., Ohtsuka, E., Nishimura, S. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxy-guanosine at the modified base and at adjacent residues. *Nature* 327: 77-79 (1987)
- Kuchling, H.: Taschenbuch der Physik. Fachbuchverlag Leipzig (1994)
- Latchman, D.: Gene regulation: a eukaryotic perspective. Second Edition, Chapman and Hall, S. 86-95 (1995)
- Laval, F.: Pretreatment with oxygen species increases the resistance of mammalian cells to hydrogen peroxide and γ -rays. *Mutat. Res.* 201: 73-79 (1988)
- Laval, J.: Role of DNA repair enzymes in the cellular resistance to oxidative stress. *Path. Biol.* 1: 14-24 (1996)
- Lesch M., Nyhan W.: A familial disorder of uric acid metabolism and central nervous system function. *Am. J. Med.* 36: 561-570 (1964)
- Li, Y., Trush, M.A.: DNA damage resulting from the oxidation of hydroquinone by copper: role for a Cu(II)/Cu(I) redox cycle and reactive oxygen generation. *Carcinogenesis* 14(7): 1303-1311 (1993)
- Lindahl, T.: DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/apyrimidinic sites, and base excision-repair. *Prog. Nucl. Acids Res. Mol. Biol.* 22: 135-192 (1979)

- Lindahl, T.: Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362: 709-715 (1993)
- Lindquist, S.: The heat shock response. *Ann Rev. Biochem.* 55: 1151-1191 (1986)
- Lodge, P.A., Johnson, C., Sriram, S.: Frequency of MBP and MBP peptide-reactive T cells in the HPRT mutant T-cell population of MS patients. *Neurology*, 46 (5): 1410-1415 (1996)
- Loft, S., Vistisen, K.M., Ewertz, M., Tjønneland, A., Overvad, K., Poulsen, H.E.: Oxidative DNA damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in man: Influence of smoking, gender and body mass index. *Carcinogenesis* 13:2441-2447 (1992)
- Loft, S., Poulsen, H.E.: Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J. Mol. Med.* 74: 297-312 (1996)
- Lucas, M.C., Ludena, M.A., Barbero, E.A., Sanchez-Gascon, A.: Effects of N-acetylcysteine on hyperoxic lung in the rat. *Resp. Med.* 89:311-314 (1995)
- Maines, M.D., Kappas, A.: Cobalt induction of hepatic heme oxygenase; with evidence that cytochrome P-450 is not essential for this enzyme activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 4293-4297 (1974)
- Maines, M.D. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J.* 2: 2557-2568 (1988)
- Maiorino, M., Chu, F.F., Ursini, F., Davies, K., Doroshov, J.H., Esworthy, R.S.: Phospholipid Hydroperoxide glutathione peroxidase is the 18 kDa selenoprotein expressed in human tumor cell lines. *J. Biol. Chem.* 266:7728-7732 (1991)
- Marks, D., Fox, R.M.: DNA damage, poly(ADP-ribosyl)ation and apoptotic cell death as a common pathway of drug action. *Biochem. Pharmacol.* 42: 1859-1867 (1991)

- McKelvey-Martin, V., Green, M., Schmezer, P., Pool-Zobel, B., De M eo, M., Collins, A.: The single cell gel electrophoresis assay (Comet Assay): A European review. *Mutat. Res.* 288: 47-63 (1993)
- Meneghini, R., Martins, E.: Hydrogen peroxide and DNA damage. In: Halliwell, B., Aruoma, O. (Hrsg): *DNA and free radicals.*, S. 83-94. Ellis Horwood, New York (1993)
- Messing, K., Bradley, W.E.: In vivo mutant frequency rises among breast cancer patients after exposure to high doses of gamma-radiation. *Mutat. Res.* 152(1): 107-112 (1985)
- Miller, D.M., Buettner, G.R., Aust, S.D.: Transition metals as catalysts of autoxidation reactions. *Free Rad. Biol. Med.* 8: 95-108 (1990)
- Moller, P., Wallin, H.: Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product. *Mutat Res.* 410: 271-290 (1998)
- Morley, A.A., Trainor, K.J., Seshadri, R., Ryall, R.G.: Measurement of in vivo mutations in human lymphocytes. *Nature.* 302: 155-156 (1983)
- Mulvag, S.L., Roberts, R., Schneider, M.D.: Cellular oncogenes in cardiovascular disease. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 20: 657-662 (1988)
- Munro, H.N., Aziz, N., Leibold, E., Murray, M., Rogers, J., Vass, J.K., White, K.: The ferritin genes: Structure, expression and regulation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 526: 113-123 (1988)
- Munro, H.N.: Iron regulation of ferritin gene expression. *J. Cell. Biochem.* 44: 107-115 (1990)
- Nackerdien, Z., Olinski, R., Dizdaroglu, M.: DNA base damage in chromatin of gamma-irradiated cultured human cells. *Free Rad. Res. Commun.* 16: 259-273 (1992)
- Nagashima, M., Kasai, H., Yokota, J., Nagamachi, Y., Ichinose, T., Sagai, M.: Formation of an oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in mouse lung DNA after intratracheal instillation of diesel exhaust particles and effects of

- high dietary fat and beta-carotene on this process. *Carcinogenesis* 16: 1441-1445 (1995)
- Narkowicz, C., Vial, J., McCartney, P.: Hyperbaric oxygen therapie increases free radical levels in the blood of humans. *Free Rad. Res. Comm.* 19: 71-80 (1993)
- Nebert, D.W.: Polymorphisms in Drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? *Am. J. Hum. Genet.* 60: 265-271 (1997)
- Nelson, H., Wiencke, J., Christiani, D., Cheng, T., Zuo, Z., Schwartz, B., Lee, B., Spitz, M., Wang, M., Xu, X., Kelsey, K.: Ethnic differences in the prevalence of the homozygous deleted genotype of glutathione S-transferase theta. *Carcinogenesis* 16: 1243-1245 (1995)
- Newcomb, T.G., Loeb, L.A.: Mechanisms of mutagenicity of oxidatively-modified bases. In: Aruoma, O.I., Halliwell, B. (Hrsg) *Molecular Biology of free radicals in human diseases*; S. 139-166; OICA International, Santa Lucia, London (1998)
- Niki, E.: Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids* 44: 227-253 (1987)
- Norppa, H.: Cytogenetic markers of suscebility: influence of polymorphic carcinogen-metabolizing enzymes. *Env. Health Persp.* 105: 829-835 (1997)
- Numazawa, S., Yamada, H., Furusho, A., Nakahara, T., Oguro, T., Yoshida, T.: Cooperative induction of c-fos and heme oxygenase gene products und oxidative stress in human fibroblastic cells. *Exper. Cell Res.* 237: 434-444 (1997)
- Nyhan, W.L., Wong, D.F.: New approaches to understanding Lesch-Nyhan disease [editorial; comment]. *N. Engl. J. Med.* 334(24): 1602-1604 (1996)
- Oberle, S., Polte, T., Abate, A. Podhaisky, H.P., Schroder, H.: Aspirin increases ferritin synthesis in endothelial cells: a novel antioxidant pathway. *Circ. Res.* 82(9): 1016-1020 (1998)
- O'Brien, P.J.: Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* 80(1): 1-41 (1991)

- Österholm, A.M., Fält, S., Lambert, B., Hou, S.M.: Classification of mutations at the human hprt-locus in T-lymphocytes of bus maintenance workers by multiplex-PCR and reverse transcriptase-PCR analysis. *Carcinogenesis* 16(8): 1909-1912 (1995)
- O'Farrell, F.J., Hannigan, B.M., Barnett, Y. A.: An Investigation of the response of lymphoblastoid cells to hydrogen peroxide-derived oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* 24: 71S (1996)
- Oguro T., Hayashi, M., Numazawa, S., Asakawa, K., Yoshida, T.: Heme oxygenase-1 gene expression by a glutathione depletor, phorone, mediated through AP-1 activation in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 221: 259-265 (1996)
- Olive, P.L., Frazer, G., Banath, J.P.: Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Radiat Res* 136: 130-136 (1993)
- O'Neill, J.P., Sullivan, L.M., Albertini, R.J.: In vitro induction, expression and selection of thioguanine-resistant mutants with human T-lymphocytes. *Mutat. Res.* 240: 135-142 (1990)
- Oriani, G., Michael, M., Marroni, A., Longoni, C.: Physiologie and physiopathologie of hyperbaric oxygen. In Oriani, G., Marroni, A., Wattel, F. (Hrsg): *Handbook on hyperbaric medicine.*, S.1-34. Springer Verlag, Berlin (1996)
- Ossola, J.O., Tomaro, M.L.: Heme oxygenase induction by UVA radiation. A response to oxidative stress in rat. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30: 285-292 (1998)
- Östling, O., Johanson, K.: Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell. *Int. J. Radiat. Biol.* 52: 683-691 (1987)
- Padgaonkar, V.A., Giblin, F.J., Fowler, K., Leverenz, V.R., Reddan, J.R., Dziedzic, D.C.: Heme oxygenase synthesis is induced in cultured lens epithelium by hyperbaric oxygen or puromycin. *Exp. Eye Res.* 65: 435-443 (1997)
- Pai, G.S., Sprenkle, J.A., Do, T.T., Mareni, C.E., Migeon, B.R.: Localization of loci for hypoxanthine phosphoribosyltransferase and glucose-6-phosphate

- dehydrogenase and biochemical evidence of nonrandom X chromosome expression from studies of a human X-autosome translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 2810-2813 (1980)
- Papas, A.M.: Determinants of antioxidant status in humans. *Lipids* 31: S77-S82
- Patel, P.I., Framson, P.E., Caskey, T., Chinault, A.C.: Fine structure of the human hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene. *Mol. Cell. Biol.* 6: 393-403 (1986)
- Pemble, S., Schroeder, K., Spencer, S., Meyer, D., Hallier, E., Bolt, H., Ketterer, B., Taylor, J.: Human glutathione S-transferase Theta (GSTT1): cDNA cloning and the characterization of a genetic polymorphism. *Biochem. J.* 300: 271-276 (1994)
- Pflaum, M., Will, O., Epe, B.: Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis* 18 (11): 2225-2231 (1997)
- Piette, J.: Biological consequences associated with DNA oxidation mediated by singlet oxygen. *J. Photochem. Photobiol. B.* 11(3-4): 241-60 (1991)
- Plappert, U., Raddatz, K., Molt, S., Rieth, R., Fliedner, T.M.: Der Comet Assay- ein neuer Indikatorstest zum Nachweis genotoxischer Beanspruchung. *Arbeitsmed. Sozialmed. Umweltmed.* 30: 60-65 (1995)
- Poot, M., Joenje, H.: Oxidative stress and cell proliferation in vitro. In: Halliwell, B., Aruoma, O. (Hrsg) *DNA and free radicals*; S. 211-228; Ellis Horwood; New York (1993)
- Pryor, W.: Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Ann. Rev. Physiol.* 48: 657-667 (1986)
- Qi, Y., Dawson, G.: Hypoxia specifically and reversibly induces the synthesis of ferritin in oligodendrocytes and human oligodendrogliomas. *J. Neurochem.* 63(4): 1485-1490 (1994)

- Quinlan, T., Spivack, S., Mossman, B.T.: Regulation of antioxidant enzymes in lung after oxidant injury. *Environm. Health Persp.* 102 (2): 79-87 (1994)
- Radford, N.B., Fina, M., Benjamin, I.J., Moreadith, R.W., Graves, K.H., Zhao, P., Gavva, S., Weithoff, A., Sherry, A.D., Malloy, C.R., Williams, R.S.: Cardioprotective effects of 70-kDa heat shock protein in transgenic mice. 93: 2339-2342 (1996)
- Ramana, C.V., Boldogh, I., Izuni, T., Mitra, S.: Activation of apurinic/aprimidinic endonuclease in human cells by reactive oxygen species and its correlation with their adaptive response to genotoxicity of free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:5061-5066 (1998)
- Ramotar, D., Demple, B.: Enzymes that repair oxidative damage to DNA. In: Halliwell, B., Aruoma, O. (Hrsg) *DNA and free radicals*; S. 165-92, Ellis Horwood; New York (1993)
- Ravanat, J.L., Tureskey, R.J., Gremaud, E., Trudel, L.J., Stadler, R.H.: Determination of 8-oxoguanine in DNA by gas chromatography-mass spectrometry and HPLC-electrochemical detection: Overestimation of the background level of the oxidized base by the gas chromatography-mass spectrometry assay. *Chemical Research in Toxicology* 8: 1039-1045 (1995)
- Riley, P.: Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 65: 27-33 (1994)
- Robberecht, W., Sapp, P., Viaene, M.K., Rosen, D., McKenna-Yasek, D., Haines, J., Horvitz, R., Theys, P., Brown, R. Jr.: Cu/Zn superoxide dismutase activity in familial and sporadic myotrophic lateral sclerosis. *J. Neurochem.* 62: 384-387 (1994)
- Robinson, D.R., Goodall, K., Albertini, R.J., O'Neill, J.P., Finette, B., Sala-Trepat, M., Moustacci, E., Bates, A.D., Beare, D.M., Green, M.H.L., Cole, J.: An analysis of in vivo mutant frequency in circulating T-Lymphocytes in the normal human population: a comparison of four datasets. *Mutat. Res.* 313: 227-247 (1994)

- Rosenquist, T.A., Zharkov, D.O., Grollman, A.P.: Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 94: 7429-7434 (1997)
- Rossi, F., Bianca, V.D., de Tongi, P.: Mechanism and functions of the oxygen radicals producing respiration of phagocytes. *Comparative Immunology and Microbial Infectious Diseases* 8: 187-204 (1985)
- Ryberg, D., Skaug, V., Hewer, A., Phillips, D., Harries, L., Wolf, C., Ogreid, D., Ulvik, A., Vu, P., Haugen, A.: Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis* 18: 1285-1289 (1997)
- Sala-Trepat, M., Cole, J., Green, M.H.L., Rigaud, O., Vilcoq, J.R., Moustacchi, E.: Genotoxic effects of radiotherapy and chemotherapy on the circulating lymphocytes of breast cancer patients. III. Measurement of mutant frequency to 6-thioguanine resistance. *Mutagenesis* 5: 593-598 (1990)
- Sanger, E. Nickelsen, S., Coulson, A.R.: DNA sequencing with chainterminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463-5467 (1977)
- Scarpato, R., Hirvonen, A., Migliore, L., Falck, G., Norppa, H.: Influence of GSTM1 and GSTT1 polymorphisms of smokers and pesticide-exposed greenhouse workers. *Mutat. Res.* 389: 227-235 (1997)
- Scully, D.G., Dawson, P.A., Emmerson, B.T., Gordon, R.B.: A review of the molecular basis of hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase (HPRT) deficiency. *Hum. Genet.* 90: 195-207 (1992)
- Seegmiller, J., Rosenbloom, F., Kelly, W.: Enzyme defect associated with a sex-linked human neurological disorder and excessive purine synthesis. *Science* 155: 1682-1684 (1967)
- Seidegard, J., De Pierre, J., Birberg, W., Pilotti, A., Pero, R.W.: Characterization of soluble glutathione transferase activity in resting mononuclear leukocytes from human blood. *Biochem. Pharmacol.* 33: 3053-3058 (1984)

- Shager, D., Strauss, B.: Insertion of nucleotides opposite apurinic/aprimidinic sites in deoxyribonucleic acid during in vitro synthesis. Uniqueness of adenine nucleotides. *Biochemistry* 22: 4518-4526 (1983)
- Shen, H.M., Ong, C.N., Lee, B.L., Shi, C.Y.: Aflatoxin B1-induced 8-hydroxy-deoxyguanosine formation in rat hepatic DNA. *Carcinogenesis* 16: 419-422 (1995)
- Shibahara, S., Müller, R., Taguchi, H., Yoshida, T.: Cloning and expression of cDNA for rat heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 7865-7869 (1985)
- Shibutani, S., Takeshita, M., Grollman, A.P.: Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349: 431-434 (1991)
- Shull, S., Heintz, N.H., Periasamy, M., Manohar, M., Janssen, Y.M.W., Marsh, J.P., Mossman, B.T.: Differential regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. *J. Biol. Chem.* 266 (36): 24398-24403 (1991)
- Sies, H. (Hrsg): *Oxidative stress. Oxidants and Antioxidants.* Academic Press, London. (1991)
- Singh, N., McCoy, M., Tice, R., Schneider, E.: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175: 184-191 (1988)
- Singh, N.P., Danner, D.B., Tice, R.R., Pearson, J.D., Brant, L.J., Morrell, C.H., Schneider, E.L.: Basal DNA damage in individual human lymphocytes with age. *Mutat. Res.* 256: 1-6 (1991)
- Sjöstrom, K., Crapo, J.D.: Structural and biochemical adaptive changes in rat lungs after exposure to hypoxia. *Lab. Invest.* 48(1): 68-79 (1983)
- Smith, G., Smith, C., Wolf, R.: Pharmacogenetic polymorphisms. In: *Environmental Mutagenesis*, BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, S. 83-106 (1995)

- Skowyra, D., Georgopoulos, C., Zylicz, M.: The E. coli dnaK gene product, the hsp70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner. *Cell* 62(5): 939-944 (1990)
- Speit, G., Hartmann, A.: The contribution of excision repair to the DNA-effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* 10: 555-559 (1995)
- Speit, G., Hartmann, A.: Nachweis von genotoxischen Umweltschadstoffen mit dem Comet Assay. *Berichte Umweltforschung, Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg* (1996)
- Speyer, B.E., Fielding, J.: Ferritin as a cytosol iron transport intermediate in human reticulocytes. *Br. J. Haematol.* 42: 255-267 (1979)
- Stevens, B., Small, R.D.: The photoperoxidation of unsaturated organic molecules-XV. O₂ quenching by bilirubin and biliverdin. *Photochem. Photobiol.* 23: 33-36 (1976)
- Stocker, R., Ames, B.N.: Potential role of conjugated bilirubin and copper in the metabolism of lipid peroxides in bile. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 8130-8134 (1987)
- Stocker, R., Frei B.: Endogenous antioxidant defences in human blood plasma. In Sies (Hrsg): *Oxidative stress. Oxidants and antioxidants.*, S. 213-243. Academic Press; London (1991)
- Stone, W.L., Henderson, R.A., Howard, G.H. Jr, Hollis, A.L., Payne, P.H., Scott, R.L.: The role of antioxidant nutrients in preventing hyperbaric oxygen damage to the retina. *Free Radic. Biol. Med.* 6(5): 505-512 (1989)
- Stryer, L.: *Biochemie.* Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, S. 620-623 (1994)
- Su, C.Y., Chong, K.Y., Owen, O.E., Dillmann, W.H., Chang, C., Lai, C.C.: Constitutive and inducible hsp70s are involved in oxidative resistance evoked by heat shock or ethanol. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 30: 587-598 (1998)

- Tates, A.D., van Dam, F.J., Natarajan, A.T., Zwinderman, A.H., Osanto, S.: Frequencies of HPRT mutants and micronuclei in lymphocytes of cancer patients under chemotherapy: a prospective study. *Mutat-Res.* 307(1): 293-306 (1994)
- Tchou, J., Grollman, A.: Repair of DNA containing the oxidatively-damaged base, 8-Oxoguanine. *Mutat. Res.* 299: 277-287 (1993)
- Teixeira, A.J.R., Gommers-Ampt, J.H., van de Werken, G., Westra, J.G., Stavenviter, J.F.C., de Jong, A.P.J.M.: Method for the analysis of oxidized nucleosides by gas chromatography. *Anal. Biochem.* 214: 474-483 (1993)
- Thurnham, D.I., Smith, E.F.: Concurrent Liquid-Chromatographic assay of retinol, α -tocopherol, β -carotene, α -carotene, lycopene and β -cryptoxanthine in plasma, with tocopherol acetate as an internal standard. *Clin. Chem.* 34: 377-381 (1988)
- Tibbles, P., Edelsberg, J. : Hyperbaric-oxygen therapie. *New England J. Med.* 334: 1642-1648 (1996)
- Tice, R.: The single cell gel/ comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: *Environmental Mutagenesis.*, S. 315-339. BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford (1995)
- Tice R.R., Andrews, P.W., Singh, N.P.: The single cell gel assay: A sensitive technique for evaluation intercellular differences in DNA damage and repair. In: Sutherland BM und Woodhead AD (Hrsg) *DNA Damage and Repair in Human Tissues*, Plenum Press, New York, S. 291-301 (1990)
- Tice, R., Strauss, G.: The single cell gel Electrophoresis/Comet Assay: A potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells* 13: 207-214 (1995)
- Trush, M., Kensler, T.: Role of free radicals in carcinogen activation. In: Sies, H. (Hrsg): *Oxidative stress. Oxidants and antioxidants.*, S. 277-317. Academic Press, London (1991)
- Tyrell, R.M.: UVA (320-380 nm) radiation as an oxidative stress. In Sies (Hrsg): *Oxidative stress. Oxidants and antioxidants.*, S. 57-84. Academic Press; London (1991)

- Van Klaveren, R.J., Dinsdale, D., Pype, J.L., Demedts, M., Nemery, B.: N-acetylcystein does not protect against type II cell injury after prolonged exposure to hyperoxia in rats. *Am. J. Physiol.* 273 (3 Pt 1): L548-555 (1997)
- Visvardis, E., Tassiou, A., Piperakis, S.: Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H₂O₂ and γ -irradiation with the alkaline comet assay. *Mutat. Res.* 383: 71-80 (1997)
- Vodicka, P., Bastlová, T., Vodická, L., Peterková, K., Lambert, B., Hemminki, K.: Biomarkers of styrene exposure in lamination workers: level of O⁶-guanine, DNA adducts, DNA strand breaks and mutant frequencies in the hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase gene in T-lymphocytes. *Carcinogenesis* 16: 1473-1481 (1995)
- von Sonntag, C.: *The Chemical Basis of Radiation Biology*. Taylor and Francis, London (1987)
- Vrieling, H., Simons, J.W., van Zeeland, A.A.: Nucleotide sequence determination of point mutations at the mouse HPRT locus using in vitro amplification of HPRT mRNA sequences. *Mutat-Res.* 198(1): 107-113 (1988)
- Vrieling, H., Thijssen, J.C., Rossi, A.M., van-Dam, F.J., Natarajan, A.T., Tates, A.D., van-Zeeland, A.A.: Enhanced hpert mutant frequency but no significant difference in mutation spectrum between a smoking and a non-smoking human population. *Carcinogenesis*. 13(9): 1625-1631 (1992)
- Weinert, T.: DNA damage checkpoints update: getting molecular. *Current Opinion in Genetic & Development* 8: 185-193 (1998)
- Welslau, W.: Physiologische Grundlagen. In: Almeling und Welslau (Hrsg): *Grundlagen der hyperbaren Sauerstofftherapie*, S. 13-19. Archimedes-Verlag, Strande (1996)
- White, K., Munro, H.N.: Induction of ferritin subunit synthesis by iron is regulated at both the transcriptional and translational levels. *J. Biol. Chem.* 263(18): 8938-8942 (1988)

- Wiese, A., Pacifici, R., Davies, K.: Transient adaptation to oxidative stress in mammalian cells. *Arch. Biochem. Biophys.* 318: 231-240 (1995)
- Willis, D., Moore, A.R., Frederick, R., Willoughby, D.A.: Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nature Med.* 2 (1): 87-90 (1996)
- Wilson, V.L., Taffe, B.G., Shields, P.G., Povey, A.C., Harris, C.C.: Detection and quantification of 8-hydroxydeoxyguanosine adducts in peripheral blood of people exposed to ionizing radiation. *Environ. Health. Perspect.* 99: 261-263 (1993)
- Wiseman, H., Halliwell, B.: Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem. J.* 313: 17-29 (1996)
- Wolff, S.: Aspects of the adaptive response to very low doses of radiation and other agents. *Mutat. Res.* 358: 135-142 (1996)
- Würgler, F.: Genetische Endpunkte. In: Fahrig, R. (Hrsg.): *Mutationsforschung und genetische Toxikologie.*, S 18-29. Wiss. Buchges. Darmstadt (1993)
- Wyllie, A.H.: Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer Metastasis Rev.* 11(2): 95-103 (1992)
- Yamaguchi, T., Horio, F., Hashizume, T., Tanaka, M., Ikeda, S., Kakinuma, A., Nakajima, H.: Bilirubin is oxidized in rats treated with endotoxin and act as a physiological antioxidant synergistically with ascorbic acid in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214 (1): 11-19 (1995)
- Yamaguchi, T., Terakado, M., Horio, F., Aoki, K., Tanaka, M., Nakajima, H.: Role of bilirubin as an antioxidant in an ischemia-reperfusion of rat liver and induction of heme oxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223: 129-135 (1996)
- Zimmer, D.M., Aaron, C.S.: In vivo mutagenesis in the Cynomolgus Monkey: Time course of HPRT Mutant frequency at long time points following ethylnitrosourea exposure. *Environm. Mol. Mutagen.* 29: 117-123 (1997)