

Verschiedene Modi der  
Transkriptionshemmung durch  
8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxoG)  
in der DNA

Dissertation zum Erlangen des Grades  
Doktor der Naturwissenschaften  
im Promotionsfach Pharmazie  
am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Julia Allgayer  
geboren am 20.07.1987 in Idar-Oberstein  
Mainz, 2016

Tag der mündlichen Prüfung: 24.10.2016

*To raise new questions, new possibilities, to regard old problems from a new angle, requires creative imagination and marks real advance in science.*

Albert Einstein (1879-1955)

*Indeed I have always been of the opinion that hard work is simply the refuge of people who have nothing to do.*

Oscar Wilde (1854-1900)

# Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	VIII
ZUSAMMENFASSUNG .....	1
1. EINLEITUNG .....	3
1.1 OXIDATIVE DNA-BASENMODIFIKATIONEN: ENTSTEHUNG UND BIOLOGISCHE RELEVANZ .....	3
1.2 DIE BASEN-EXZISIONS-REPARATUR .....	5
1.2.1 <i>Substrate und Mechanismus der BER</i> .....	5
1.2.2 <i>Bedeutung der BER beim Schutz vor Mutationen und Krebs</i> .....	9
1.2.3 <i>Bedeutung der BER in der epigenetischen Regulation</i> .....	11
1.2.4 <i>Bedeutung der BER für die Genexpression</i> .....	14
1.3 8-oxoG IN DER DNA: ENTSTEHUNG UND MUTAGENES POTENTIAL .....	15
1.4 REPARATUR VON 8-OXOG IN SÄUGERZELLEN .....	18
1.4.1 <i>8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase 1 (OGG1): die BER von 8-oxoG</i> .....	19
1.4.2 <i>Humanes MutY Homolog (hMYH)</i> .....	25
1.4.3 <i>Humane MutT-Homologe (hMTH1, hMTH2 und NUDT5)</i> .....	25
1.5 EINFLUSS VON 8-OXOG IN DER DNA AUF DIE TRANSKRIPTION: KENNTNISSTAND UND OFFENE FRAGEN .....	26
2. MATERIAL UND METHODEN .....	29
2.1 MATERIAL .....	29
2.1.1 <i>Geräte und Software</i> .....	29
2.1.2 <i>Zelllinien und Bakterienstämme</i> .....	30
2.1.3 <i>Vektoren</i> .....	31
2.1.4 <i>PCR- und Sequenzierungsprimer</i> .....	32
2.1.5 <i>Oligonukleotide zur Klonierung</i> .....	33
2.1.6 <i>Oligonukleotide für den Einbau einzelner DNA-Basenmodifikationen</i> .....	34
2.1.7 <i>Oligonukleotide für RNA-Interferenz (siRNA)</i> .....	35
2.1.8 <i>Chemikalien</i> .....	35
2.1.9 <i>Enzyme für die Molekularbiologie</i> .....	36
2.1.10 <i>Antikörper</i> .....	37
2.1.11 <i>Medien und Supplemente für die Zellkultur</i> .....	38
2.1.12 <i>Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel</i> .....	38
2.1.13 <i>Puffer und Arbeitslösungen</i> .....	39
2.2 METHODEN .....	42
2.2.1 <i>Grundlegende Techniken zum Arbeiten mit humanen Zellen</i> .....	42
2.2.1.1 <i>Kultivierung von humanen Zellen</i> .....	42
2.2.1.2 <i>Auftauen von humanen Zellen</i> .....	42
2.2.1.3 <i>Einfrieren von humanen Zellen</i> .....	43
2.2.1.4 <i>Transfektion von menschlichen Zellen mit Plasmid-DNA</i> .....	43

2.2.1.5	Transfektion von HeLa-Zellen in Anwesenheit von TSA .....	43
2.2.1.6	Transfektion von HeLa-Zellen mit siRNA .....	44
2.2.2	<i>Grundlegende Techniken zum Arbeiten mit Bakterien</i> .....	44
2.2.2.1	Herstellung ultra-kompetenter Bakterien mittels DMSO-Methode .....	44
2.2.2.2	Transformation von Bakterien .....	45
2.2.2.3	Mini- und Mega-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien .....	45
2.2.3	<i>Grundlegende Methoden zum Arbeiten mit DNA</i> .....	46
2.2.3.1	Isolierung von DNA aus Reaktionsansätzen mit Hilfe einer Silico-Membran-Säule..	46
2.2.3.2	Isolierung von DNA aus Reaktionsansätzen mittels Phenol/Chloroform-Extraktion	46
2.2.3.3	Präzipitation von DNA mit Isopropanol bzw. Ethanol .....	46
2.2.3.4	Spektrophotometrische Quantifizierung der DNA .....	47
2.2.3.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	47
2.2.3.6	DNA-Extraktion aus einem Agarose-Gel.....	47
2.2.3.7	Isolierung von Gesamt-DNA aus Säugerzellen.....	48
2.2.3.8	Realtime quantitative PCR (RT-qPCR).....	48
2.2.4	<i>Grundlegende Methoden zum Arbeiten mit Proteinen</i> .....	50
2.2.4.1	Herstellung von Zellextrakten zur Verwendung in Cleavage-Assays .....	50
2.2.4.2	Herstellung von Proteinextrakten für Western Blot.....	50
2.2.4.3	Quantifizierung von Proteinen nach Bradford .....	51
2.2.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	51
2.2.4.5	Übertragung der Proteine auf eine Trägermembran (Blotting).....	52
2.2.4.6	Immundetektion (Western Blot) .....	52
2.2.5	<i>Klonierung durch Ligation eines doppelsträngigen DNA-Inserts</i> .....	53
2.2.5.1	Doppelverdau des pZAJ-Vektors mit den Restriktionsendonukleasen NheI und AgeI 55	
2.2.5.2	Linearisierung des pZAJ-Vektors mit der Restriktionsendonuklease PciI .....	56
2.2.5.3	Dephosphorylierung der linearisierten DNA mit Antarctic Phosphatase .....	57
2.2.5.4	Generierung von Inserts für die Klonierung durch Annealing und Phosphorylierung synthetischer Oligonukleotide.....	57
2.2.5.5	Ligation des linearisierten Vektors mit dem phosphorylierten Insert .....	58
2.2.5.6	Nachweis des Einbaus der BsrDI-Schnittstellen durch Restriktionsverdau mit BsrDI .....	59
2.2.5.7	Sequenzierung der Plasmid-Klone.....	59
2.2.6	<i>Klonierung durch PCR mit überhängenden Primern</i> .....	60
2.2.6.1	Klonierungs-PCR .....	61
2.2.6.2	Verdau der Template-DNA mit DpnI .....	62
2.2.7	<i>Stabiler Knockdown von OGG1 mittels shRNA-Expressionsvektoren</i> .....	63
2.2.7.1	Doppelverdau des shRNA-Expressionsvektors mit HindIII und BglII.....	63
2.2.7.2	PCR-Screening der klonierten shRNA-Expressionsvektoren .....	65
2.2.7.3	Generierung einer stabil transfizierten monoklonalen HeLa-Zelllinie .....	66
2.2.8	<i>Insertion von synthetischen Oligonukleotiden (mit oder ohne DNA-Basenmodifikation) in Plasmid-DNA</i> .....	66
2.2.8.1	Herstellung und Überprüfung doppelt genickter Plasmid-DNA .....	68
2.2.8.2	Präparativer Einbau eines synthetischen Oligonukleotids in doppelt genickte Plasmid-DNA.....	69
2.2.8.3	Nachweis des Einbaus von 8-oxoG mittels Umsetzung mit der spezifischen DNA- Glykosylase Fpg .....	70
2.2.8.4	Nachweis des Einbaus von DNA-Modifikationen mittels Restriktionsverdau .....	71
2.2.9	<i>Bestimmung von DNA-Glykosylase-Aktivitäten (Cleavage Assay)</i> .....	71
2.2.9.1	Cleavage Assay mit Zellextrakten .....	72
2.2.9.2	Cleavage Assay mit rekombinantem OGG1 .....	72
2.2.9.3	Cleavage Assay mit rekombinantem OGG1 in Anwesenheit von APE1 .....	73

2.2.10	<i>In vitro</i> -Methylierung mit der bakteriellen DNA-Methyltransferase M.SssI .....	73
2.2.10.1	<i>In vitro</i> -Methylierung .....	73
2.2.10.2	Nachweis der Methylierung durch Restriktionsverdau mit ApaLI .....	74
2.2.11	<i>Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)</i> .....	75
2.2.11.1	Doppelverdau von Plasmid-DNA mit PciI und BmtI .....	76
2.2.11.2	EMSA mit rekombinantem CREB .....	77
2.2.12	<i>Host Cell Reactivation Assay</i> .....	78
2.2.12.1	Fixierung von Zellen mit Formaldehyd .....	78
2.2.12.2	Messung der EGFP-Expression mittels Durchflusszytometrie .....	78
3.	ERGEBNISSE.....	80
3.1	QUANTITATIVER ZUSAMMENHANG ZWISCHEN DER BEEINTRÄCHTIGUNG DER GENTRANSKRIPTION DURCH 8-OXOG UND DER EXZISIONSAKTIVITÄT VON OGG1 .....	80
3.1.1	<i>Reporter-Vektoren, die ein einzelnes 8-oxoG entweder im 5'-A[8-oxoG]C oder im 5'-C[8-oxoG]G-Kontext im 5'-UTR des EGFP-Gens enthalten</i> .....	80
3.1.2	<i>8-oxoG im Sequenzkontext 5'-C[8-oxoG]G inhibiert unabhängig vom DNA-Strang die Genexpression schwächer als 8-oxoG im Sequenzkontext 5'-A[8-oxoG]C</i> .....	83
3.1.3	<i>Die Exzision von 8-oxoG aus dem 5'-C[8-oxoG]G-Sequenzkontext ist schwach im Vergleich zur Exzision aus dem 5'-A[8-oxoG]C-Sequenzkontext</i> .....	85
3.1.4	<i>Der transkriptionshemmende Effekt und die Exzisionsaktivität von OGG1 in Anwesenheit von drei 8-oxoG in der Vektor-DNA sind stärker als bei einem einzelnen 8-oxoG</i> .....	90
3.1.5	<i>8-oxoG inhibiert die Genexpression in humanen Zellen proportional zur Menge der spezifischen DNA-Glykosylase OGG1</i> .....	94
3.2	DIE GENERIERUNG EINES DNA-EINZELSTRANGBRUCHS DURCH APE1 IST VORAUSSETZUNG FÜR DAS AUFTRETEN EINES NEGATIVEN EFFEKTS AUF DIE GENEXPRESSION .....	99
3.3	8-oxoG-BEDINGTE GENREPRESSION: HINWEISE AUF EINEN INDIREKTEN MECHANISMUS .....	111
3.3.1	<i>Ein einzelnes 8-oxoG außerhalb des transkribierten Bereichs inhibiert die Genexpression ebenso stark wie bei einer Positionierung innerhalb des transkribierten Bereichs</i> .....	111
3.3.2	<i>Innerhalb des verwendeten CMV-IE Promoters gibt es kein regulatorisches Element, das eine sequenzspezifische Genrepression vermittelt</i> .....	114
3.3.3	<i>8-oxoG inhibiert die Gentranskription unabhängig davon welche Art von Promotor die Transkription des Reportergens kontrolliert</i> .....	121
3.3.4	<i>Histon-Deacetylierung ist an der Entstehung der durch ein einzelnes 8-oxoG verursachten Expressionshemmung beteiligt</i> .....	123
3.4	NACHWEIS EINER DIREKTEN INHIBIERUNG DER GENTRANSKRIPTION DURCH 8-OXOG INNERHALB EINES REGULATORISCHEN ELEMENTS .....	129
3.4.1	<i>CpG-DNA-Methylierung als Modell für die Repression transient transfizierter Reportervektoren</i> .....	129
3.4.2	<i>pCRE-UNO als Vektorsystem für die Untersuchung des Effekt einzelner DNA-Basenmodifikationen in CRE</i> .....	137
3.4.3	<i>8-oxoG innerhalb von CRE inhibiert die Bindung von CREB und inhibiert die Genexpression auf diese Weise direkt</i> .....	147
3.5	DIE ART DER PROZESSIERUNG VERSCHIEDENER OXIDATIVER DNA-BASENMODIFIKATIONEN BESTIMMT DEREN AUSWIRKUNGEN AUF DIE GENTRANSKRIPTION .....	150

3.5.1	<i>5-hmU im Basenpaar mit Adenin inhibiert die Genexpression indirekt nach seiner Exzision durch die DNA-Glykosylase Smug1 und direkt durch seine Anwesenheit in CRE.....</i>	151
3.5.2	<i>5-hmC inhibiert die Gentranskription ausschließlich direkt bei Anwesenheit innerhalb des regulatorischen Elements CRE.....</i>	159
3.5.3	<i>5-fC und 5-caC innerhalb des regulatorischen Elements CRE hemmen die Genexpression direkt, aber zusätzlich indirekt nach ihrer Exzision durch die DNA-Glykosylase TDG..</i>	162
4.	DISKUSSION.....	168
4.1	TRANSKRIPTIONSHEMMUNG DURCH DIE BER VON 8-OXOG .....	168
4.2	DIREKTE TRANSKRIPTIONSHEMMUNG DURCH 8-OXOG IN FUNKTIONELLEN PROMOTORELEMENTEN .....	176
4.3	AUSWIRKUNGEN WEITERER DNA-BASENMODIFIKATIONEN AUF DIE GENEXPRESSION: VERGLEICH MIT 8-OXOG .....	178
5	LITERATURVERZEICHNIS.....	184
	ANHANG I .....	205
	ANHANG II .....	209
	ANHANG III .....	215
	ANHANG IV .....	230
	ANHANG V .....	232
	ANHANG VI .....	248
	CURRICULUM VITAE .....	249

## Abkürzungsverzeichnis

5-caC	5-Carboxycytosin
5-fC	5-Formylcytosin
5-hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5-hmU	5-Hydroxymethyluracil
5-mC	5-Methylcytosin
8-oxoA	8-Oxo-7,8-dihydroadenin
8-oxoG	8-Oxo-7,8-dihydroguanin
8-oxodGDP	8-Oxo-7,8-dihydro-desoxyguanosin-5'-diphosphat
8-oxodGTP	8-Oxo-7,8-dihydro-desoxyguanosin-5'-triphosphat
6-4-PP	6-4-Photoprodukt
A	Adenin
ACTB	Actin, $\beta$
AID	Activation-induced cytidine deaminase
AP	aprimidinisch/apurinisch
APE1	AP-Endonuklease 1
APC	Adenomatous Polyposis Coli
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
C	„complementary“, transkribierter DNA-Strang
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
cc	kovalent-geschlossen (covalently closed)
CMV-IE	Cytomegalovirus Immediate-Early
CoREST	Corepressor of RE1-silencing transcription factor
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
CpG	Deoxycytidin-Phosphat-Deoxyguanosin
CPI	CpG-Island
CRE	cAMP response element
CREB	cAMP response element-binding protein
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats



CSB	Cockayne Syndrom B
C <sub>T</sub>	Zyklus-Grenzwert (cycle threshold)
Cys	Cystein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
dRP	Desoxyribosephosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA (double-stranded DNA)
DTT	1,4-Dithiothreitol
dUMP	2'-Deoxyuridin-5'-monophosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
EMSA	Electrophoretic mobility shift assay
Endo IV	Endonuklease IV
EtBr	Ethidiumbromid
F	forward
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FapyA	4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin
FapyG	2,6-Diamino-4-oxo-5-formamidopyrimidin
FBS	Fötale Rinder Serum (fetal bovine serum)
FEN1	Flap-Endonuklease 1
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase
G	Guanin
G418	Geneticin
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GO-System	8-oxoG-Reparatursystem
HCR	Host Cell Reactivation
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HhH	Helix-Hairpin-Helix
His	Histidin
hMTH	humanes MutT Homolog

---

hMYH	humanes MutY Homolog
HPSF	High Purity Salt Free
kDa	Kilodalton
LB	lysogeny broth
LIG1/3	Ligase I / III
Lin	linear
LRC	Läsions-Erkennungs-Komplex (lesion recognition complex)
Lys	Lysin
MAP	MUTYH assoziierte Polyposis
MBD4	Methyl-CpG-bindende Domäne 4 Protein
MeCP	methyl CpG binding protein
MEF	Maus-Embryo-Fibroblasten
mESC	murine embryonale Stammzellen
MMR	Mismatch-Reparatur
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
MPG	N-Methylpurin-DNA-Glykosylase
MRC5	Medical Research Council 5
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MUTYH	MutY-Homolog
MYH	MutY-Homolog, MUTYH
N-Cor	nuclear receptor corepressor
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NfKB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NEIL1/2	Nei-Endonuklease VIII-like 1/2
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
Nt	Nukleotid(e)
NTH1	Endonuclease III-like protein 1
NTS	nicht-transkribierter DNA-Strang
NUDT5	Nucleoside Diphosphate-Linked Moiety X Motif 5
NuRD	Nucleosome remodelling and deacetylation
oc	offen-zirkulär (open circular)
OGG1	8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase
PARP1	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
PBSCMF	Phosphat-gepufferte Salzlösung Mg <sup>2+</sup> - und Ca <sup>2+</sup> -frei (phosphate-buffered saline calcium and magnesium free)
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)

Phe	Phenylalanin
PIPES	Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonsäure)
PMSF	Phenylmethyl-Sulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
PNKP	Polynukleotidkinase/-phosphatase
Pol $\beta$	Polymerase $\beta$
Pro	Prolin
R	reverse
RASSF1	Ras association domain-containing protein 1
RFC	Replication factor C
RIPA	Radioimmuno precipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	Umdrehungen pro Minuten (revolutions per minute)
RT-qPCR	Realttime quantitative PCR
S	Phosphothioat-Bindung
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Ser	Serin
shRNA	short hairpin RNA
Sin3	Swi-independent
siRNA	Small interfering RNA
SIRT1	SIRTUIN-1, silent mating type information regulation 2-like Protein 1
SMRT	silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor
Smug1	Single-strand selective monofunctional Uracil-DNA-Glykosylase 1
SNP	Single Nukleotid Polymorphismus
SOB	Super optimal broth
Sp-1	specificity protein 1
SSB	DNA-Einzelstrangbruch (single-strand break)
ssDNA	einzelsträngige DNA (single-stranded DNA)
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (tris-buffered saline)
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20 (tris-buffered saline with tween 20)
TDG	Thymin-DNA-Glykosylase
TE	Tris-EDTA

---

TEMED	Tetramethylethylendiamin
TET	Ten eleven translocation Methylcytosin-Deoxygenasen
Tg	Thyminglykol
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	transkribierter DNA-Strang
TSA	Trichostatin A
Tyr	Tyrosin
U	Uracil
U	Einheiten (units)
UDG	Uracil-DNA-Glykosylase
UNG	Uracil-DNA-Glykosylase 1/2
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
W	„written“, nicht-transkribierter DNA-Strang
WRN	Werner syndrome ATP-dependent helicase, aka DNA helicase, RecQ-like type 3
XPA	Xeroderma pigmentosum, complementation group A
XRCC1	X-ray repair cross-complementing protein 1
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Zusammenfassung

8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxoG) ist eine der am häufigsten auftretenden oxidativen DNA-Basenmodifikation, deren Entfernung aus der DNA über den Mechanismus der Basen-Exzisions-Reparatur verläuft. Neben seinen prämutagenen Eigenschaften durch die Fähigkeit zur Fehlpaarung mit Adenin während der DNA-Replikation hat 8-oxoG auch Auswirkungen auf die Gentranskription. Mit Hilfe eines Vektor-basierten Reportersystems konnte bereits früher gezeigt werden, dass die Exzision eines einzelnen 8-oxoG innerhalb des EGFP-Reportergens durch die BER-initiiierende DNA-Glykosylase OGG1 zu einer Hemmung der Genexpression führt. Ein Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen inwieweit sich der direkte DNA-Sequenzkontext von 8-oxoG auf die Stärke dieser Expressionshemmung auswirkt. Des Weiteren sollte untersucht werden welches Reparaturintermediat des 8-oxoG diese Hemmung verursacht, welcher Mechanismus ihr zu Grunde liegt und wie ein einzelnes 8-oxoG die Genexpression beeinflusst, wenn es innerhalb eines regulatorischen Elements positioniert ist. Zu diesem Zweck wurden EGFP-Reportervektoren konstruiert, die 8-oxoG in verschiedenen DNA-Sequenzen an verschiedenen Positionen innerhalb des Vektors enthielten. Die Auswirkungen von 8-oxoG und dessen Reparatur auf die Expression des Reportergens wurde durch Transfektion humaner Zelllinien und Messung der EGFP-Expression bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen, dass 8-oxoG im DNA-Sequenzkontext 5'-A[8-oxoG]C die Genexpression stärker hemmt als 8-oxoG im Kontext 5'-C[8-oxoG]G, was darauf zurückgeführt werden konnte, dass die Exzision von 8-oxoG durch OGG1 aus ersterem DNA-Kontext etwa drei- bis viermal effizienter verläuft. Die Bedeutung von OGG1 für die Entstehung der Transkriptionshemmung wurde auch dadurch erneut bestätigt, dass 8-oxoG in HeLa-Zellen, in denen OGG1 durch shRNA permanent herunterreguliert worden war, deutlich geringere Auswirkungen auf die EGFP-Expression zeigte. Da die beobachtete Hemmung der Genexpression auch auftrat, wenn sich 8-oxoG innerhalb des nicht-transkribierten DNA-Strangs befand, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei nicht um eine direkte Blockade der transkribierenden RNA-Polymerase, sondern um einen bisher unbekanntem Mechanismus der negativen Regulation der transkriptionellen Aktivität handelt.

Um nun herauszufinden welches Reparaturintermediat nach der Exzision des 8-oxoG durch OGG1 für die Hemmung der Genexpression verantwortlich ist, wurden Vektoren verwendet, bei denen 8-oxoG auf einer oder beiden Seiten von Phosphothioatbindungen flankiert war, um dadurch verschiedene Nukleaseaktivitäten zu inhibieren. Vektoren mit einem Phosphothioat 5' von 8-oxoG waren inert gegenüber der Exzision von 8-oxoG durch Zellextrakte und bei der EGFP-Expressionsanalyse in Zellen zeigte sich bei diesen Vektoren keine Hemmung der Genexpression durch 8-oxoG. Dies deutet darauf hin, dass die Transfektionshemmung durch die APE1-vermittelte Überführung der AP-Läsion in einen

DNA-Einzelstrangbruch verursacht wird und die  $\beta$ -Lyase-Aktivität des OGG1 *in vivo* vernachlässigbar ist.

Der durch 8-oxoG ausgelöste Genrepressionsmechanismus wurde weiter untersucht und es konnte gezeigt werden, dass diese Genstilllegung nicht von einem spezifischen Element des verwendeten, viralen CMV-IE-Promotors abhängig ist und auch bei anderen, einschließlich humanen Promotoren auftritt. Da der transkriptionshemmende Effekt von 8-oxoG durch den HDAC-Inhibitor TSA vollständig aufgehoben werden konnte, scheinen Histondeacetylasen (HDACs) eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Reporter-genrepression zu spielen. Durch einen transienten Knockdown der HDACs 1, 2 und 3 sollte die Beteiligung spezifischer HDACs an der 8-oxoG bedingten Genrepression ermittelt werden, doch die Ergebnisse blieben – wahrscheinlich aufgrund der funktionellen Redundanz der HDACs – inkonklusiv.

Doch nicht nur innerhalb des transkribierten Bereichs kann 8-oxoG die Genexpression beeinträchtigen: Befand sich das einzelne 8-oxoG innerhalb des regulatorischen Elements CRE (cAMP response element) zeigte sich dieselbe Genrepression, die auch an allen anderen Positionen beobachtet wurde. Besteht der Promotor des Reportergens allerdings nur aus diesem einen CRE, zeigt sich bereits zum frühesten untersuchten Zeitpunkt eine Hemmung der Genexpression, was auf eine direkte Hemmung hindeutet. Tatsächlich konnte mittels eines Bandshift-Assays bewiesen werden, dass diese direkte Hemmung durch die Beeinträchtigung der Bindung des Transkriptionsfaktors CREB zu CRE verursacht wird. Weitere Experimente mit Vektoren, die 5-mC, 5-hmC, 5-fC, 5-caC oder 5-hmU enthielten, konnten zeigen, dass all diese DNA-Basenmodifikationen bei einer Positionierung innerhalb von CRE ebenfalls die Bindung von CREB beeinträchtigen und so die Genexpression direkt hemmen. Die Modifikationen 5-fC, 5-caC und 5-hmU zeigten zusätzlich eine zu 8-oxoG analoge kontinuierliche Abnahme der Genexpression, die ebenfalls auf die Exzision der Modifikationen durch DNA-Glykosylasen – TDG im Falle von 5-fC und 5-caC, Smug1 im Falle von 5-hmU – zurückgeführt werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei der durch 8-oxoG verursachten Genstilllegung nicht um einen für 8-oxoG spezifischen Mechanismus handelt, sondern um einen Mechanismus der allen Substraten der Basen-Exzisions-Reparatur gemein ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass 8-oxoG unabhängig von seiner Position die Genexpression durch einen HDAC-abhängigen Stilllegungsmechanismus hemmt. Des Weiteren kann 8-oxoG, wenn es innerhalb eines funktionellen Promotorelements positioniert ist, die Genexpression auch direkt durch Modulation der Transkriptionsfaktorbindung beeinflussen.

## 1. Einleitung

### 1.1 Oxidative DNA-Basenmodifikationen: Entstehung und biologische Relevanz

Die DNA ist tagtäglich verschiedenen exogenen und endogenen Agenzien ausgesetzt, die ihre chemische Struktur verändern und beeinträchtigen können. Zu den exogenen genotoxischen Agenzien zählen Noxen aus der Umwelt, wie beispielsweise Industriechemikalien (z.B. Asbest, Pestizide), Medikamente (z.B. Chemotherapeutika), Naturstoffe (z.B. Psoralen) und Strahlung (z.B. UVA, ionisierende Strahlung) (Vallyathan & Shi, 1997). Neben diesen exogenen Einflüssen gefährden aber auch endogene Substanzen die Integrität der DNA. Die Reaktion dieser Stoffe mit der DNA kann unter anderem zu deren Oxidation, Hydrolyse oder Methylierung führen (Lindahl, 1993). Vor allem die oxidativen DNA-Modifikationen stellen dabei eine allgegenwärtige Bedrohung für die genomische Integrität dar. Diese oxidativen Veränderungen der DNA-Struktur entstehen hauptsächlich durch die Reaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS, reactive oxygen species), zu denen unter anderem Radikale wie das Hydroxyl- ( $\bullet\text{OH}$ ) und das Peroxidradikal ( $\bullet\text{OOH}$ ), sowie weitere Oxidationsmittel wie das Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) und Singulett-Sauerstoff gezählt werden (Halliwell, 2001). Diese können endogen als Nebenprodukt der mitochondrialen Atmungskette, bei durch NADH-Oxidasen vermittelten Entzündungsreaktionen, durch Phagozyten oder im Rahmen der Lipidoxidation in der Zelle gebildet werden (Ames et al., 1993), (Albright et al., 2003), (Hegde et al., 2008). Bei all diesen essentiellen Prozessen können ungepaarte Elektronen entstehen, die dann wiederum mit Sauerstoff oder anderen Molekülen zu Radikalen reagieren können (Cooke et al., 2003) – ein Vorgang, der durch den Einfluss von Enzymen, vor allem der Oxidasen, gefördert wird. Dies führt dazu, dass die DNA einer permanenten Exposition durch endogene ROS ausgesetzt ist, die ihre Integrität bedrohen. Zusätzlich können ROS aber auch durch exogene Einwirkung wie UV-Licht, ionisierende Strahlung, Zigarettenrauch und Medikamente entstehen (Nash et al., 1996), (Zhang et al., 1997), (Hegde et al., 2008). Die am häufigsten auftretende reaktive Sauerstoffspezies ist das Hydroxylradikal ( $\bullet\text{OH}$ ), das sowohl mit den DNA-Basen, als auch mit der Desoxyribose des DNA-Rückgrats und den freien Nucleotiden des Nucleotidpools reagieren kann (Girard et al., 1998). Bei der Reaktion der ROS mit den Basen der DNA entstehen verschiedene Arten von oxidativen DNA-Läsionen (Cooke et al., 2003), (Cadet & Wagner, 2014), wobei allerdings nur wenige davon intensiv erforscht worden sind. Die am häufigsten auftretenden oxidativen Purinmodifikationen sind 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxoG) und die Formamidopyrimidine (FapyA und FapyG), weniger häufig ist Guanidinhydantoin und 8-Oxoadenin (8-oxoA) (Hegde et al., 2012). Thyminglykol und 5-Hydroxycytosin sind die häufigsten oxidativen Pyrimidinmodifikationen, gefolgt von 5-Hydroxyuracil und 5-Formyluracil (Hegde et al., 2012). Obwohl diese Modifikationen den größten Teil der durch ROS entstehenden oxidativen Schäden ausmachen, konnte die Existenz von zahlreichen weiteren zumindest *in vitro*, aber teilweise

auch *in vivo* bestätigt werden – allein für Guanin konnten bisher über 20 verschiedene Oxidationsprodukte nachgewiesen werden (Neeley & Essigmann, 2006). Schätzungsweise treten pro Tag pro Zelle  $10^4$  oxidative Läsionen im humanen Genom auf (Lu et al., 2001), wozu Oxidationen der DNA-Basen, DNA-Protein-Crosslinks, sowie Oxidationen des Desoxyribose-Rückgrats, die wiederum zu Strangbrüchen und apurin/apyrimidin (AP) Läsionen führen können, gezählt werden (Lu et al., 2001), (Boiteux et al., 2002). Auch 5-Hydroxymethyluracil (5-hmU), das in somatischen Zellen vorwiegend durch ROS-induzierte Oxidation von Thymin entsteht (Mouret et al., 1991) und somit in einem Basenpaar mit Adenin vorliegt, wird zu den oxidativen DNA-Schäden gezählt. Allerdings kann 5-Hydroxymethyluracil auch noch auf andere Art entstehen. In murinen embryonalen Stammzellen (mESCs) wurden beispielsweise erhöhte 5-hmU-Spiegel gemessen, die nachweislich durch enzymatische Oxidation durch TET-Dioxygenasen (Ten-eleven Translocation Methylcytosin Dioxygenasen) bedingt werden (Pfaffeneder et al., 2014). Andererseits kann 5-hmU auch durch die Desaminierung von 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC) durch Proteine der AID/APOBEC-Familie – ein Prozess der mit der aktiven DNA-Demethylierung in Verbindung gebracht wird – entstehen (Cortellino et al., 2011) (siehe Kapitel 1.2.3). Ein durch Desaminierung entstandenes 5-hmU bildet ein Mismatch mit Guanin. Neben 5-Hydroxymethyluracil nehmen auch 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC), 5-Formylcytosin (5-fC) und 5-Carboxycytosin (5-caC) eine Sonderstellung unter den oxidativen DNA-Basenmodifikationen ein, da sie allgemein nicht als DNA-Schäden betrachtet werden. Bei ihnen handelt es sich um die Oxidationsprodukte des 5-Methylcytosins, der sogenannten 5. Base des Genoms. Diese Oxidation erfolgt jedoch nicht durch die Einwirkung reaktiver Sauerstoffspezies, sondern ausschließlich durch die Aktivität der TET-Dioxygenasen (Tahiliani et al., 2009), (Ito et al., 2011). Dabei gilt 5-hmC – wie auch 5-mC – als eigenständiger, epigenetischer Marker und wird teilweise sogar als 6. Base des Genoms bezeichnet (Song & He, 2011), während 5-fC und 5-caC hauptsächlich als Intermediate der aktiven DNA-Demethylierung gelten (siehe Kapitel 1.2.3).

Oxidative Schädigungen der DNA werden mit verschiedensten pathologischen Prozessen wie z.B. der malignen Entartung von Zellen und der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht. Des Weiteren lassen sich zahlreiche Erkrankungen auf freie Radikale und andere reaktive Spezies im Körper zurückführen (Halliwell, 2001), wobei nur wenige dieser Erkrankungen direkt durch Radikale, sondern durch die Reaktionsprodukte dieser Radikale mit zellulären Makromolekülen wie Proteinen, Lipiden oder DNA verursacht werden. Vor allem die Reaktionsprodukte der ROS mit der DNA stellen eine massive Bedrohung für die grundlegende Funktion der DNA als Speicher der genetischen Information dar. Aus diesem Grund ist die Beseitigung dieser oxidativen Modifikationen essentiell um zu verhindern, dass die korrekte Weitergabe oder das Ablesen der genetischen Information durch die DNA- bzw. die RNA-Polymerasen beeinträchtigt wird. Zu diesem Zweck benötigen Zellen hochkomplexe und spezifische Reparaturmechanismen, die in der Lage sind verschiedenartige DNA-



Modifikationen zu erkennen und effizient aus der DNA zu entfernen (Fortini et al., 2003). Die Basen-Exzisions-Reparatur (BER) stellt dabei den Hauptreparaturweg für die meisten oxidativen DNA-Basenmodifikationen dar (Hegde et al., 2012).

## 1.2 Die Basen-Exzisions-Reparatur

### 1.2.1 Substrate und Mechanismus der BER

Die BER ist ein essentieller Mechanismus zur Entfernung einer Vielzahl von oxidativen Schäden aus der DNA. Er ist evolutionär stark konserviert und findet sich sowohl in Prokaryoten, als auch in Eukaryoten (Izumi et al., 2003). Beschrieben wurde dieser DNA-Reparaturweg 1974 von Lindahl, dessen Suche nach einem Enzym, das Uracil aus der DNA entfernt, zur Entdeckung der Uracil-DNA-Glycosylase (UDG) von *E.coli* führte (Lindahl, 1974). Dieser Reparaturmechanismus erkennt mehrheitlich kleine DNA-Basenmodifikationen, die typischerweise als Produkte der Desaminierung, Oxidation oder Methylierung der DNA-Basen entstehen. Diese Vorgänge, bei denen entweder funktionelle Gruppen aus dem Molekül entfernt oder Gruppen mit geringen sterischen Ansprüchen (Carbonyl- oder Methylgruppen) in das Molekül eingeführt werden, führen nur zu einer geringen Veränderung der Größe der DNA-Base, was wiederum dazu führt, dass diese Modifikation nur eine minimale Distorsion der DNA-Helix verursacht. Aber auch AP-Läsionen, die durch Depurinierung bzw. Depyrimidierung entstehen, werden über den BER-Mechanismus prozessiert. Die BER modifizierter Nukleobasen wird durch die Exzision dieser DNA-Base durch eine DNA-Glykosylase initiiert. In Säugetieren sind 11 solcher DNA-Glykosylasen bekannt, die eine Vielzahl von DNA-Basenmodifikationen spezifisch erkennen und deren Substratspezifität sich teilweise überschneidet (Jacobs & Schar, 2012) (Tabelle 1-1).

Diese Enzyme katalysieren die hydrolytische Spaltung der N-glykosidischen Bindung zwischen der modifizierten Base und dem C1-Atom der Desoxyribose und entfernen erstere so aus der DNA (Seeberg et al., 1995), (Wood et al., 2001), (Hegde et al., 2008) (Abbildung 1-1). Handelt es sich bei der DNA-Glykosylase um eine monofunktionelle Glykosylase, wie beispielsweise im Falle der Uracil-DNA-Glykosylasen UNG1/2, Smug1 und TDG, entsteht bei der Entfernung der modifizierten Base eine apyrimidinische/apurinische Stelle (AP-Läsion) im DNA-Molekül. Diese wird durch die AP-Endonuklease 1 (APE1) weiter prozessiert, indem diese die AP-Läsion an ihrem 5'-Ende einschneidet, und somit einen DNA-Einzelstrangbruch (SSB) mit einer Hydroxylgruppe am 3'-Ende und einer Desoxy-Ribosephosphat-Gruppe (dRP) am 5'-Ende hinterlässt (Wood et al., 2001). Dieser DNA-Einzelstrangbruch bildet ein Substrat für die DNA-Polymerase  $\beta$ , die die entstandene Lücke innerhalb der DNA durch den Einbau eines Nukleosids am 5'-Ende wieder füllt (Frosina et al., 1996), (Pascucci et al., 2002) (Abbildung 1-1). Der unbeschädigte DNA-Strang dient während dieses Vorgangs als

Matrize um den Einbau des korrekten, korrespondierenden Nukleosids zu gewährleisten (Svilar et al., 2011). Abgeschlossen wird die Reparatur durch die Ligase I (LIG1) oder einem Komplex aus Ligase III (LIG3) und XRCC1, die die beiden Enden miteinander ligiert. XRCC1 fungiert dabei in Partnerschaft mit PARP1 und der DNA-Polymerase  $\beta$  als Gerüstprotein der BER-Reparatur-Komplexe (Kubota et al., 1996), (Masson et al., 1998), (Marsin et al., 2003).

Tabelle 1-1 Humane DNA-Glykosylasen der Basen-Exzisions-Reparatur und ihre Substrate. Adaptiert aus (Krokan & Bjørås, 2013).

Enzym	<u>Mono-</u> <u>/Bifunktionell</u>	Substrate
OGG1 <sup>1</sup>	M/B	8-oxoG (gepaart mit C), FapyG (gepaart mit C)
MUTYH	M	A (gepaart mit 8-oxoG/C/G)
NEIL1/NEIL2	B	Tg, FapyG, FapyA, 8-oxoG, 5-hU, DHU, Sp, Gh
NEIL3	M/B	FapyG, FapyA, Sp, Gh (in ssDNA)
NTHL1	B	Tg, FapyG, 5-hC, 5-hU
UNG1/UNG2	M	U (gepaart mit A oder G), 5-FU
SMUG1	M	5-hmU, U (gepaart mit A oder G), 5-FU, $\epsilon$ C
TDG	M	U (gepaart mit G), T (gepaart mit G), 5-fC, 5-caC
MBD4	M	U (gepaart mit G), T (gepaart mit G), 5-hmU im CpG-Kontext
MPG	M	3meA, 7meG, 3meG, Hx, $\epsilon$ A

<sup>1</sup>Abkürzungen: 3-meA, 3-Methyladenin; 3-meG, 3-Methylguanin; 5-caC, 5-Carboxycytosin; 5-fC, 5-Formylcytosin; 5-FU, 5-Fluorouracil; 5-hmU, 5-Hydroxymethyluracil; 5-hU, 5-Hydroxyuracil; 7-meG, 7-Methylguanin; 8-oxoG/C/A, 8-Oxo-7,8-dihydroguanin;  $\epsilon$ C, 3,N4-Ethenocytosin; A, Adenin; B, Bifunktionell; C, Cytosin; CpG, Deoxycytidin-Phosphat-Deoxyguanin; DHU, Dihydrouracil; FapyA, 4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin; FapyG, 2,6-Diamino-4-oxo-5-formamidopyrimidin; G, Guanin; M, Monofunktionell; MBD4, Methyl-CpG-bindende Domäne 4 Protein; MPG, N-Methylpurin-DNA-Glykosylase; MUTYH, MutY-Homolog; OGG1, 8-Oxo-7,8-dihydroguanin-Glykosylase; NEIL1/2/3, Nei-Endonuklease VIII-like 1/2/3; NTHL1, Nth-Endonuklease III-like 1; SMUG1, Single-strand selective monofunctional Uracil-DNA-Glykosylase; T, Thymin; TDG, Thymin-DNAGlykosylase; Tg, Thyminglykol; U, Uracil; UNG1/2, Uracil-DNA-Glykosylase 1/2.

Im Laufe des bisher beschriebenen Reparaturweges wird ein einzelnes DNA-Nukleotid in die Lücke des DNA-Stranges eingebaut, weswegen er auch als Short-Patch-BER bezeichnet wird. Im Gegensatz dazu werden im Laufe der Long-Patch-BER mehrere Nukleotide eingefügt (Matsumoto et al., 1999) (Abbildung 1-1). Diese Variante des BER-Wegs findet sich hauptsächlich in proliferierenden Zellen und benötigt für einen vollständigen Ablauf Komponenten der DNA-Replikation wie beispielsweise die DNA-Polymerasen  $\delta$  und  $\epsilon$ , Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Replication Factor C (RFC), Flap-Endonuklease 1 (FEN1) und Ligase I (Klungland & Lindahl, 1997), (Pascucci et al., 1999). Dabei werden ausgehend von dem nach der Exzision der Modifikation entstandenen Einzelstrangbruch 2-13 Nukleotide durch die DNA-Polymerase  $\beta$ ,  $\delta$  oder  $\epsilon$  unter Verdrängung des ursprünglichen DNA-Strangs in die Lücke eingebaut (Fortini et al., 1998), (Stucki et al., 1998). Der verdrängte DNA-Strang

wird dann durch FEN1 abgeschnitten, was der Ligase I nun ermöglicht die Lücke zu verschließen (Gary et al., 1999), (Pascucci et al., 1999). Ob die Korrektur einer DNA-Basenmodifikation letztendlich über den Short-Patch- oder den Long-Patch-Weg erfolgt, ist von zahlreichen, noch nicht vollständig geklärten Faktoren abhängig. Eine Reaktion verläuft beispielsweise nach dem Long-Patch-Weg, wenn das nach der Exzision der geschädigten Base entstehende Intermediat die dRP-Lyase-Aktivität der Polymerase  $\beta$  inhibiert (Almeida & Sobol, 2007) – ein Beispiel für ein solches, inhibierendes Intermediat stellen oxidierte AP-Läsionen dar (Guan & Greenberg, 2010), (Wong et al., 2010). Der allgemein bestehende Konsens ist, dass sowohl die Natur des vorliegenden Schadens, die initierende DNA-Glykosylase, der Zelltyp und der Zellzyklus, als auch die Verfügbarkeit der übrigen BER-Proteine bestimmende Faktoren darstellen (Fortini & Dogliotti, 2007).

Neben den monofunktionellen DNA Glykosylasen existieren auch bifunktionelle DNA-Glykosylasen, wie beispielsweise die 8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase (OGG1) und die Nei-Endonuklease VIII-like I (NEIL1). Diese Glykosylasen katalysieren ebenfalls die Abspaltung der modifizierten DNA-Base, besitzen aber auch die Fähigkeit zur Katalyse einer in einem Einzelstrangbruch resultierenden Folgereaktion (Hazra et al., 2002), (Fromme et al., 2003). Bei dieser Reaktion handelt es sich im Falle des OGG1 um eine  $\beta$ -Eliminierung, bei NEIL1 und NEIL2 um eine  $\beta,\delta$ -Eliminierung, die zur Inzision des betroffenen DNA-Strangs an der AP-Läsion führt (Abbildung 1-1). Bei der  $\beta$ -Eliminierung bleibt am 3'-Ende ein ungesättigtes Hydroxyl-Aldehyd (3-trans-4-Hydroxy-2-pental-5-phosphat) und am 5'-Ende eine Phosphat-Gruppe zurück (Svilar et al., 2011). Die Entfernung des 3'-Aldehyds und die damit verbundene Generierung einer Hydroxyl-Gruppe erfolgt durch die 3'-Phosphodiesterase-Aktivität von APE1 (Wallace, 1998), (Almeida & Sobol, 2007). Bei einer  $\beta,\delta$ -Eliminierung hingegen erfolgt der Einschnitt des Zucker-Phosphat-Rückgrats auf beiden Seiten der AP-Läsion, sodass ein ungesättigtes Hydroxylaldehyd frei wird und die einzelsträngige DNA neben dieser Lücke an beiden Enden eine Phosphatgruppe enthält (Wiederhold et al., 2004), (Das et al., 2006). Der nächste Reaktionsschritt erfordert an diesem Punkt jedoch eine OH-Gruppe am 3'-Ende der AP-Läsion. Die dafür notwendige Hydrolyse der Phosphatgruppe am 3'-Ende und somit die Generierung eines Substrates für die DNA-Synthese erfolgt mit Hilfe der Polynukleotidkinase/-phosphatase (PNKP) (Svilar et al., 2011), die mit der DNA-Einzelstrangbruch-Reparatur in Verbindung gebracht wird (Caldecott, 2002). Unabhängig vom Entstehungsweg des DNA-Einzelstrangbruchs wird dieser nun wie bereits beschrieben weiter prozessiert.

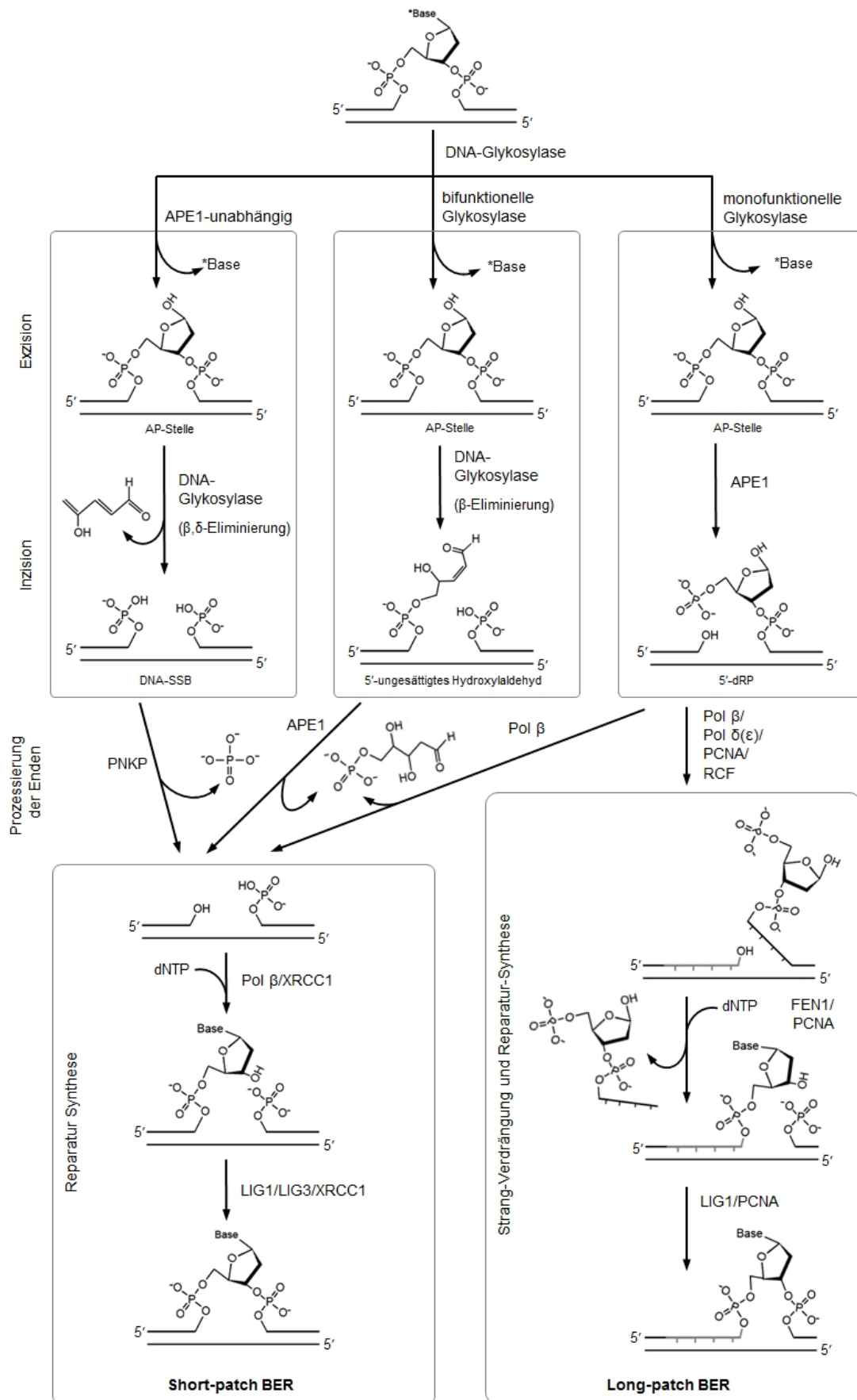


Abbildung 1-1 Mechanismus der Basen-Exzisions-Reparatur. Adaptiert aus (Krokan & Bjørås, 2013).

Neben den bereits erwähnten Reparatur-Enzymen nehmen noch weitere Proteine an der BER teil und haben dabei regulatorische und koordinierende Rollen inne (Hegde et al., 2008). Die wichtigsten dieser Proteine sind XRCC1, PARP1, PCNA, RFC, WRN und CSB. XRCC1 dient als Gerüstprotein der BER-Reparatur-Komplexe und interagiert sowohl mit der Polymerase  $\beta$ , als auch mit Reparatur-initiiierenden Proteinen (MPG, OGG1, NEIL2) und APE1 (Vidal et al., 2001), (Marsin et al., 2003), (Campalans et al., 2005), (Das et al., 2006). Aus diesem Grund wird mittlerweile angenommen, dass XRCC1 mit den meisten, wenn nicht sogar allen Komponenten des Short-Patch-Weges interagiert. PARP1 bindet an die freien DNA-Enden und schützt diese so vor Degradation, fördert die Chromatin-Relaxation und moduliert durch Interaktionen mit Poly(ADP-Ribose)-Ketten die Bindung der Reparatur-Proteine an die Position des DNA-Schadens (Caldecott et al., 1996), (Schreiber et al., 2002), (Leppard et al., 2003). PCNA ist ein unterstützendes Protein der Long-Patch-BER, RFC hilft dabei PCNA an die DNA zu rekrutieren (Moldovan, et al., 2007). Die genauen Funktionen von WRN und CSB im Rahmen der BER sind noch nicht genau bekannt, doch beide Proteine stehen in Verbindung zu schwerwiegenden Erkrankungen. WRN – eine Helikase – ist defizient im Werner-Syndrom, einer Erkrankung, die zu einer beschleunigten Alterung (Progerie) führt (Harrigan et al., 2006); CSB – eine Helikase und 3'-Exonuklease – fehlt hingegen im Cockayne Syndrom, einer neuralen Entwicklungsstörung mit einem ebenfalls durch Progerie gekennzeichneten Phänotyp (Tuo et al., 2002).

### *1.2.2 Bedeutung der BER beim Schutz vor Mutationen und Krebs*

Die wichtigste Funktion der BER liegt in der Verhinderung einer Akkumulation von DNA-Basenmodifikationen, und somit im Schutz der Zelle. Durch diese Modifikationen bedingte Fehlpaarungen können im Laufe der DNA-Replikation zu Punktmutationen führen. Treten solche Mutationen innerhalb von Tumorsuppressorgenen oder Protoonkogenen auf, können sie so eine Entartung der Zelle fördern und letztendlich zur Entstehung von Krebs beitragen. Die essentielle Bedeutung der Basen-Exzisions-Reparatur in der Vermeidung dieses pathologischen Mechanismus durch den Schutz der genomischen Integrität ist dadurch zu belegen, dass der Verlust einer spezifischen DNA-Glykosylase-Aktivität meist mit einem erhöhten Spiegel an DNA-Läsionen und einer gesteigerten Mutationsrate einhergeht. So zeigen beispielsweise Mäuse, denen die DNA-Glykosylase OGG1 fehlt, eine Akkumulation der oxidativen Basenmodifikation 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxoG) – dem spezifischen Substrat von OGG1 – sowie eine erhöhte Mutationsrate in der Leber (Klungland et al., 1999), (Osterod et al., 2001). Fehlt zusätzlich zu OGG1 auch noch die MUTYH-Glykosylase (MutY-Homolog), ist in den betroffenen Mäusen zudem eine erhöhte Tumorzinzidenz zu beobachten (Xie et al., 2004), (Chan et al., 2009).

Auch im Menschen gibt es Anzeichen für eine große Bedeutung von BER-Defekten bei der Entstehung von Krebs: Es konnte beispielsweise in zahlreichen Studien gezeigt werden, dass eine reduzierte BER-Effizienz bei der Entfernung oxidativer DNA-Schäden wie 8-oxoG mit einem erhöhten Risiko für Lungen- und andere Krebsarten einhergeht (Tudek, 2007). Ein möglicher Faktor für eine herabgesetzte Reparatur-Effizienz stellen Gen-Polymorphismen (SNP, single nucleotide polymorphism) dar. Und tatsächlich sind solche Polymorphismen für mehrere Proteine der Basen-Exzisions-Reparatur bekannt: Für die 8-oxoG-spezifische DNA-Glykosylase OGG1 konnten bisher 124 SNP nachgewiesen werden, die insgesamt 12 Aminosäuren betreffen (Karahilil et al., 2014). Der häufigste dieser SNPs ist ein C/G-Polymorphismus in Position 1245 des OGG1-Gens, der zu einem Austausch von Serin im Codon 326 durch Cystein führt (Kohno et al., 1998), (Takezaki et al., 2002), (Nohmi et al., 2005) und in 9 % der kaukasischen Population homozygot auftritt (sogar in 15-25 % innerhalb der asiatischen Population) (Karahilil et al., 2014). Dieser Ser326Cys-Polymorphismus ist der am umfassendsten untersuchte Polymorphismus von OGG1. Der Cys-Variante wird allgemein eine reduzierte Reparaturkapazität zugeschrieben (Kohno et al., 1998). Zudem bedingt sie ein zweifach erhöhtes Risiko für Lungenkrebs (Sugimura et al., 1999), (Goode et al., 2002), (Kiyohara et al., 2010) und ein erhöhtes Risiko für Prostata-Krebs und nasopharyngeale Karzinome (Chen et al., 2003), (Cho et al., 2003), allerdings nicht für Darmkrebs (Hansen et al., 2005). Zwei weitere, weniger häufige Polymorphismen von OGG1 (Arg46Gln und Arg154His) wurden in Lungen- und Magenkrebs gefunden, allerdings konnte aufgrund der Seltenheit dieser Genotypen bisher kein statistischer Zusammenhang ermittelt werden (Nohmi et al., 2005). Auch in APE1 wurden mehrere verschiedene Polymorphismen entdeckt, wobei der Asp148Glu-Polymorphismus mit einer Hypersensitivität für ionisierende Strahlung in Verbindung gebracht wird (Hu et al., 2001), der Ile64Val-Polymorphismus hingegen mit einem erniedrigten Lungenkrebs-Risiko (Zienoldiny et al., 2006). Für das Gerüstprotein XRCC1 sind sogar mehr als 60 SNPs bekannt, wobei für viele kontroverse Daten bezüglich ihrer Auswirkungen auf das Krebsrisiko – besonders bei Rauchern – existieren (Hung et al., 2005).

Auch andere Faktoren wie transkriptionelle Aktivierung/Herrunterregulation spezifischer Reparatur-Gene durch inflammatorische Prozesse oder eine Veränderung der posttranslationalen Modifikationen der Reparatur-Proteine können während der Progression der Erkrankung auftreten. Und tatsächlich findet sich in verschiedenen Krebserkrankungen eine veränderte Aktivität von BER-Enzymen und Proteinen des antioxidativen Systems (Li et al., 1995), (Ishii et al., 1996), (Kim, 1998), (Cullen et al., 2003), (Trzeciak et al., 2004). 30 % aller untersuchten humanen Tumore zeigen außerdem eine Mutation im Gen der DNA-Polymerase  $\beta$  (Starcevic et al., 2004). Und zudem finden sich erhöhte Spiegel von 8-oxoG und anderen oxidativen Läsionen im Urin, sowie auch im Tumorgewebe von Patienten mit verschiedensten malignen Krebserkrankungen (Cooke et al., 2002), (Lu et al., 2001), (Jüngst et al., 2004), (Trzeciak et al., 2004), (Cooke et al., 2006), (Karihtala & Soini, 2007).

Generell werden auch viele gravierende, erbliche Erkrankungen im Menschen mit Defekten der zellulären Antwort auf DNA-Schäden in Verbindung gebracht. Doch dabei sind Erkrankungen, die durch Mutationen im BER-Reparatur-Weg verursacht werden, um einiges seltener als die, die durch Mutationen von Genen anderer Reparaturwege wie der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER), der Mismatch-Reparatur (MMR) oder der DNA-Strangbruch-Reparatur hervorgerufen werden. Ein klar mit einem BER-Defekt verbundenes Krankheitsbild ist das der MUTYH-assoziierten Polyposis (MAP) (Starcevic et al., 2004), (Cheadle & Sampson, 2007), einer erblichen Prädisposition für Dickdarmkrebs. Verursacht wird sie durch Mutationen im MUTYH-Gen, von denen etwa 73 % aller bisher bekannten Mutationen auf allein zwei Missense-Mutationen (Y165C und G382D) zurückzuführen sind (Sampson et al., 2005). Alle Mutationen haben jedoch gemeinsam, dass sie in einer reduzierten MUTYH-Aktivität resultieren und somit zu einer erhöhten G:C → T:A Mutationsrate führen (Cheadle & Sampson, 2007). Wie auch die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) ist diese Erkrankung durch die Entstehung von 100 – 1.000 kolorektalen Adenomen, von denen einige weiter zu malignen Tumoren entarten, charakterisiert. Verursacht wird dies durch Mutationen im APC-Gen, einem Regulator der Proliferation in Kolonzellen (Fearhead et al., 2001), wobei diese im Falle der MAP nicht direkt vererbt werden, sondern aus der mutationsbedingt reduzierten MUTYH-Aktivität resultieren.

### *1.2.3 Bedeutung der BER in der epigenetischen Regulation*

In den letzten Jahren kristallisiert sich, neben ihrer immensen Bedeutung für die Aufrechterhaltung der genomischen Integrität der Zelle, noch eine weitere wichtige Funktion der BER heraus: Zahlreiche Untersuchungen deuten darauf hin, dass die BER eine tragende Rolle in der aktiven DNA-Demethylierung spielt.

Die spezifische Methylierung von Cytosin zu 5-Methylcytosin (5-mC) im CpG-Dinukleotid-Kontext innerhalb der Promotorregion eines Gens stellt eine repressive Modifikation dar, die bei der gezielten epigenetischen Genstilllegung eine zentrale Rolle spielt. Diese Genrepression wird entweder durch die Rekrutierung von MBD (Methyl CpG Binding Domain)-Proteinen, die wiederum repressive Chromatin-Modifikationen platzieren, oder durch die direkte Modulation der Bindung von Transkriptionsfaktoren zu ihren spezifischen Bindestellen aufrechterhalten (Baubec & Schübeler, 2014). (Bird, 2002), (Miranda & Jones, 2007). So ist die Entstehung und Aufrechterhaltung eines korrekten Methylierungsmusters vor allem, aber nicht ausschließlich, im Laufe der Embryogenese und der Zelldifferenzierung von entscheidender Bedeutung (Li, 2002). Auch wenn DNA-Methylierung durch seine Vererbbarkeit generell als stabile Modifikation betrachtet wird, zeigt sich mehr und mehr, dass es sich bei DNA-Methylierung um einen dynamischen Prozess aus DNA-Methylierung und DNA-Demethylierung handelt. Dabei wird die Methylierung der DNA durch verschiedene DNA-

Methyltransferasen (DNMT) katalysiert (Goll & Bestor, 2005), die aktive DNA-Demethylierung erfordert jedoch einen etwas komplexeren Mechanismus.

Im Gegensatz zu pflanzlichen Zellen besitzen Säugerzellen keine DNA-Glykosylase, die in der Lage ist 5-mC aus der DNA auszuschneiden. Eine Vielzahl von Oxidations- bzw. Desaminierungsprodukten des 5-mC sind jedoch Substrate verschiedener DNA-Glykosylasen. 5-mC kann von TET (ten eleven translocation) Dioxygenasen in aufeinanderfolgenden Reaktionen erst zu 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC), und dann weiter zu 5-Formylcytosin (5-fC) und 5-Carboxycytosin (5-caC) oxidiert werden (Tahilani et al., 2009), (Ito et al., 2011) (Abbildung 1-2). Während 5-hmC, wie auch 5-mC, der Exzision durch Glykosylasen gegenüber inert zu sein scheint, werden 5-fC und 5-caC durch die DNA-Glykosylase TDG erkannt und durch die dadurch initiierte BER effizient aus der DNA entfernt (He 2011), (Maiti & Drohat, 2011). Bestätigt wird die Bedeutung von TDG im Mechanismus der DNA-Demethylierung dadurch, dass sich TDG in Versuchen mit transgenen Mäusen als unverzichtbar für die embryonale Entwicklung erwiesen hat (Cortazar et al., 2011), (Cortellino et al., 2011).

Ein alternativer Weg, um 5-meC aus der DNA zu entfernen, stellt die Desaminierung von 5-meC und dessen erstem Oxidationsprodukt 5-hmC zu Thymin bzw. 5-Hydroxymethyluracil (5-hmU) dar (Abbildung 1-2). Diese Desaminierung wird den  $Zn^{2+}$ -abhängigen Desaminasen AID und APOBEC zugeschrieben, wobei AID physiologisch Anteil an der somatischen Hypermutation und der Class-Switch-Recombination in den Immunglobulin-Genen der B-Lymphozyten hat und APOBEC3 einen Teil der retroviralen Abwehr darstellt (Muramatsu et al., 2000), (Conticello et al., 2007). Tatsächlich wurde eine Beteiligung dieser Desaminasen an der Reprogrammierung von Stammzellen und der Embryogenese festgestellt (Rai et al., 2008), (Bhutani et al., 2010), (Popp et al., 2010), (Kumar et al., 2013). Ein mit Guanin fehlgepaartes Thymin als Produkt der Desaminierung von 5-mC im vorliegenden CpG-Sequenzkontext ist ein bevorzugtes Substrat der Glykosylasen TDG und MBD4. 5-hmU, das Produkt der Desaminierung von 5-hmC, ist ein Substrat von Smug1 (Krokan & Bjørås, 2013) (Tabelle 1-1). Obwohl es plausible Beweise für diesen Reaktionsweg gibt, scheint er bei der aktiven DNA-Demethylierung jedoch eine untergeordnete Rolle zu spielen, da keinerlei signifikante Entwicklungsstörungen, die mit einer AID/APOBEC-Defizienz in Verbindung steht, nachgewiesen werden konnten (Nabel et al., 2012).

Die Prozessierung der oxidierten oder desaminierten Cytosinmodifikation durch die BER führt somit unweigerlich zu einer Demethylierung der DNA. Diese Beteiligung der BER in Vorgängen der epigenetischen Reprogrammierung liefert auch eine plausible Erklärung für den embryonal letalen Phänotyp eines Knockdowns verschiedener Komponenten dieses Reparaturwegs wie APE1 und Polymerase  $\beta$  (Gu et al., 1994), (Friedberg & Meira, 2006).



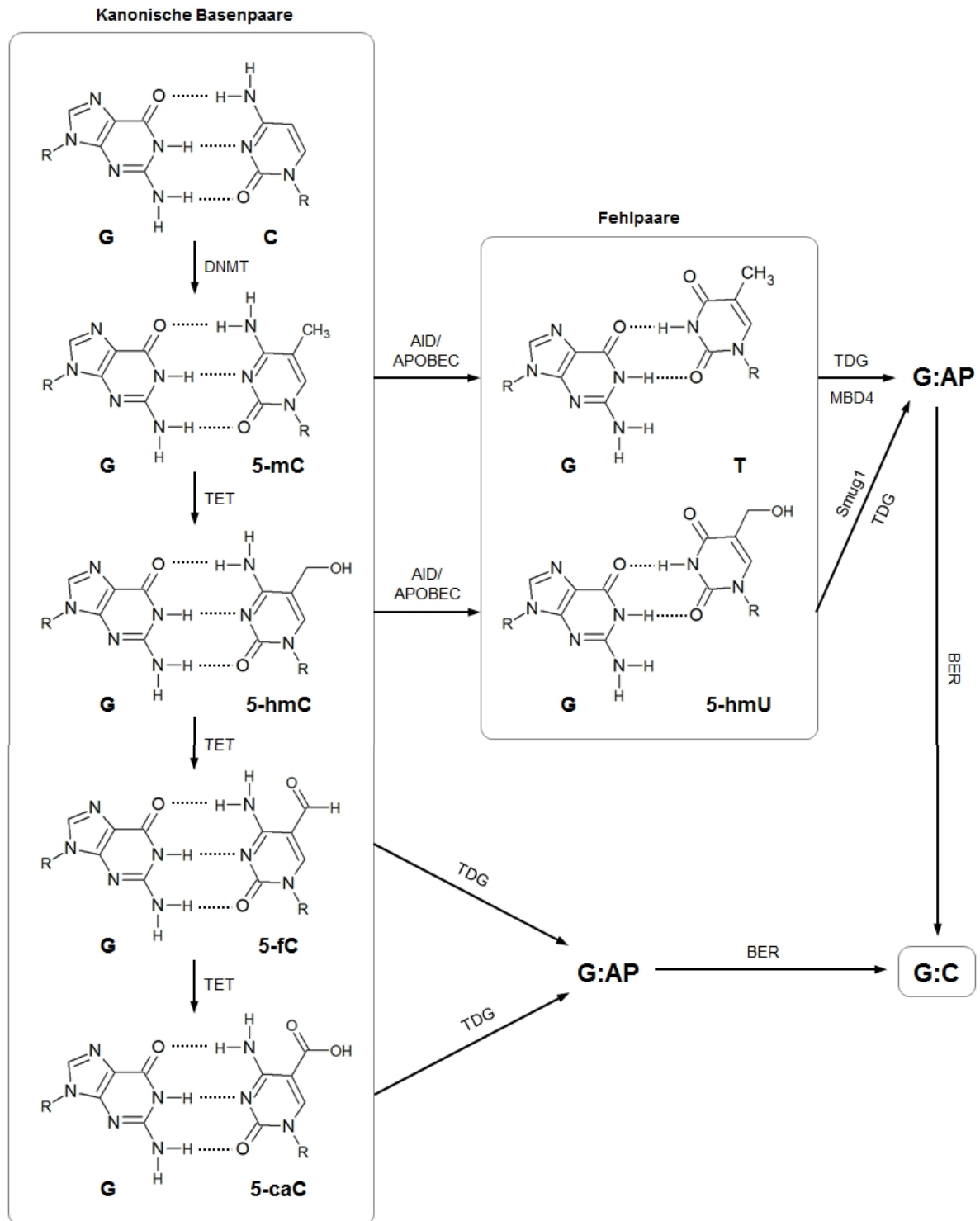


Abbildung 1-2 Angenommener Mechanismus einer aktiven DNA-Demethylierung mittels Basen-Exzisions-Reparatur. Cytosin (C) wird von DNA-Methyltransferasen (DNMT) zu 5-Methylcytosin (5-mC) methyliert. Dieses wird von TET-Proteinen (Ten eleven translocation Methylcytosin-Dioxygenasen) zu 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC), 5-Formylcytosin (5-fC) und 5-Carboxycytosin (5-caC) oxidiert. 5-fC und 5-caC werden durch die DNA Glykosylase TDG prozessiert. Ebenso können 5-mC und 5-hmC von Desaminasen der AID/APOBEC-Familie zu Thymin bzw. 5-Hydroxymethyluracil (5-hmU) desaminiert werden. Dabei handelt es sich um Substrate der DNA-Glykosylasen TDG, SMUG1 und MBD4. Durch die weitere Prozessierung der durch Exzision entstandenen AP-Läsion durch die BER erfolgt die aktive DNA-Demethylierung. Adaptiert aus (Hashimoto et al., 2012).

#### 1.2.4 Bedeutung der BER für die Genexpression

Neben ihrer Beteiligung an der Entfernung epigenetischer Markierungen in Promotorregionen kann die BER die Genexpression auch über andere Mechanismen beeinflussen. Befinden sich DNA-Basenmodifikationen in der spezifischen Bindungssequenz eines Transkriptionsfaktors, kann dessen Bindung zu dieser Sequenz eingeschränkt oder sogar völlig verhindert werden. Eine solche Reduktion der Transkriptionsfaktor-Bindungs-fähigkeit wurde bereits für viele BER-Substrate, unter anderem 8-oxoG und Uracil, nachgewiesen (Verri et al., 1990), (Ghosh & Mitchell, 1999), (Moore et al., 2013). In einem solchen Fall fördert die BER durch die Entfernung der modifizierten Base die Transkriptionsinitiation und somit auch die Genexpression. Die Anwesenheit einer DNA-Basenmodifikation kann abhängig von ihrer Position innerhalb der Erkennungssequenz aber auch den gegenteiligen Effekt haben und die Bindung des Transkriptionsfaktors zu seinem spezifischen Promotor-Element verstärken (Verri et al., 1990), (Hailer-Morrison et al., 2003). Die Entfernung dieser modifizierten Base durch die BER führt hier entsprechend dazu, dass eine abnormal hohe Transkriptionsrate wieder gesenkt wird. Da die BER-initiiierende DNA-Glykosylase gezwungen ist mit dem Transkriptionsfaktor um das geschädigte Promotorelement zu konkurrieren, kann es vor allem im Falle einer verstärkten Transkriptionsfaktorbindung zur Hemmung der BER kommen (Moore et al., 2016).

Einige DNA-Basenmodifikationen können, sofern sie sich im transkribierten Bereich befinden, die transkribierende RNA Polymerase II blockieren und dadurch die Genexpression behindern. Obwohl dies eher bei sperrigen und sterisch anspruchsvollen, Helix-disturierenden Läsionen, wie beispielsweise den UV-induzierten Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPDs), der Fall ist (Donahue et al., 1994), besitzen auch verschiedene Substrate der BER das Potential zur Hemmung der Transkriptionselongation. So stellen beispielsweise 8-Oxoadenin (8-oxoA) und Thyminglykol (Tg) einen Block der RNA Polymerase II dar, während 8-oxoG und Uracil nahezu ohne Probleme passiert werden können (Kuraoka et al., 2003), (Larsen et al., 2004), (Kuraoka et al., 2007). Treten diese blockierenden Läsionen im transkribierten DNA-Strang auf, ist deren Entfernung durch die BER unerlässlich, um eine effiziente Transkription zu gewährleisten. Jedoch stellt ebendiese Entfernung modifizierter Basen gleichzeitig auch eine Gefahr für die Gentranskription dar. Während des Reparaturwegs entstehen nach der initialen Exzision der modifizierten Base zuerst eine AP-Läsion und im folgenden Reaktionsschritt ein DNA-Einzelstrangbruch. Beide Intermediate können die Elongation der Transkription hemmen (Kathe et al., 2004), (Tornaletti et al., 2006), sodass auch DNA-Basenmodifikationen, die normalerweise kein Hindernis für die RNA-Polymerase II darstellen, durch die BER in transkriptionsblockierende Strukturen umgesetzt werden können. So haben Khobta und Mitarbeiter gezeigt, dass ein einzelnes 8-oxoG innerhalb eines aktiv transkribierten Gens dessen Expression inhibiert – allerdings nur nach Exzision des 8-oxoG durch die DNA-Glykosylase OGG1

(Kitsera et al., 2011) (Kapitel 1.5). Da diese Exzision letzten Endes – entweder durch die intrinsische  $\beta$ -Lyase-Aktivität des OGG1 oder durch die Aktivität von APE1 - zu einem DNA-Einzelstrangbruch führt, stellt eine Kollision der transkribierenden RNA-Polymerase II mit diesem Einzelstrangbruch einen naheliegenden Mechanismus für die beobachtete Hemmung der Gentranskription dar. Aber da diese Hemmung der Gentranskription ebenfalls beobachtet wurde, wenn das einzelne 8-oxoG innerhalb des nicht transkribierten DNA-Strangs positioniert war (Kitsera et al., 2011), deutet dies darauf hin, dass ein anderer Mechanismus an der Generierung der Inhibition beteiligt sein muss. Da eine Inhibition der Transkriptionselongation aus dem zuvor genannten Grund eher unwahrscheinlich ist, bleibt als möglicher Mechanismus eine Hemmung der Transkriptionsinitiation. Diese Genstilllegung kann entweder über spezifische regulatorische Promotor-Elemente oder durch einen epigenetischen Stilllegungsmechanismus vermittelt werden. Da in einer früheren Studie derselben Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass nach Transfektion von oxidativ geschädigter Plasmid-DNA die Spiegel an acetyliertem Histon H4 in der Promotorregion des Reportergens um 25 % zurückgegangen sind, die Spiegel an methyliertem Histon H3 jedoch unverändert blieben (Khobta et al., 2010), scheint die Histondeacetylierung von allen bekannten Modi der epigenetischen Stilllegung – CpG-DNA-Methylierung, Histonmethylierung bzw. -deacetylierung und RNA-Interferenz – der wahrscheinlichste zu sein. Die Deacetylierung von Histonen und die damit einhergehende Genstilllegung wird zellulär durch Histondeacetylasen (HDACs) vermittelt. Diese lassen sich in drei Klassen (I, II, III) einteilen, wobei vor allem die HDACs der Klasse I (HDAC1, 2, 3) und weniger prominent die HDACs der Klasse II (HDAC 6) mit transkriptioneller Genstilllegung in Verbindung gebracht werden (Yang & Seto, 2008), (Haberland et al., 2009). Inwieweit Histondeacetylasen oder auch andere epigenetische Mechanismen tatsächlich mit der von Khobta und Mitarbeitern beobachteten Transkriptionshemmung nach der Initiation der BER in Verbindung stehen, ist bisher allerdings noch nicht weiter untersucht worden.

### 1.3 8-oxoG in der DNA: Entstehung und mutagenes Potential

8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxoG) ist eine der am häufigsten auftretenden und stabilsten oxidativen Purin-Basenmodifikation – eine Tatsache die nicht verwunderlich ist, wenn man in Betracht zieht, dass Guanin das geringste Oxidationspotential aller DNA-Basen aufweist und somit besonders anfällig für Oxidation durch Ein-Elektron-Oxidantien, Hydroxylradikale und Singulett-Sauerstoff ist (Steenken & Jovanovic, 1997), (Cadet et al., 1999).

8-oxoG entsteht durch den oxidativen Angriff von ROS am C8-Kohlenstoff des Guanins (Girard et al., 1998) und kann in mehreren tautomeren Formen vorliegen, wobei unter physiologischen Bedingungen die 6,8-Diketoform dominiert (McAuley-Hecht et al., 1994) (Abbildung 1-3).

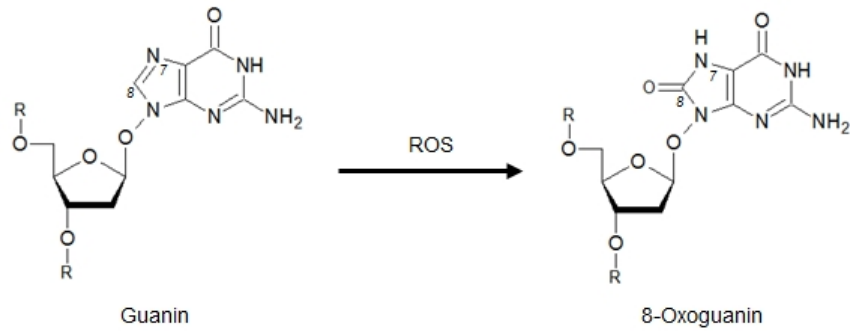


Abbildung 1-3 Entstehung von 8-oxoG durch Oxidation von Guanin am C8-Atom durch ROS. Adaptiert aus (Hsu et al., 2004).

Neben seiner Fähigkeit analog zu Guanin eine Watson-Crick-Basenpaarung mit Cytosin (8-oxoG:C) einzugehen, kann 8-oxoG auch ein Hoogsten-Basenpaar mit Adenin (8-oxoG:A) ausbilden (Shibutani et al., 1991) (Abbildung 1-4). Um diese Basenfehlpaarung einzugehen, rotiert das 8-oxoG um 180° aus der *anti*- in die *syn*-Konformation (Damsma & Cramer, 2009). Dieser Torsionswinkel der glykosidischen Bindung wird durch eine sterische Abstoßung zwischen dem O8-Sauerstoff und der Desoxyribose begünstigt (Uesugi & Ikehara, 1977).

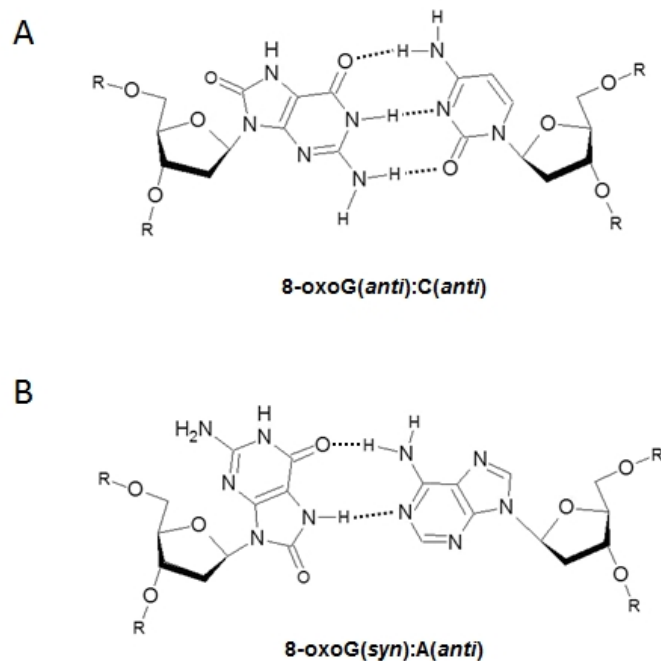


Abbildung 1-4 Strukturen der möglichen Basenpaarungen von 8-oxoG. (A) Watson-Crick-Basenpaarung von 8-oxoG (*anti*-Konformation) mit Cytosin (8-oxoG:C). (B) Hoogsten-Basenpaarung von 8-oxoG (*syn*-Konformation) mit Adenin (8-oxoG:A). Adaptiert aus (Delaney et al., 2012).

Entsteht nun durch einen oxidativen Angriff 8-oxoG in der DNA, können – sofern die Läsion nicht zuvor repariert wird – bei der DNA-Replikation sowohl neue Tochterstränge entstehen, die an der dem 8-oxoG gegenüberliegenden Stelle Cytosin enthalten, als auch Tochter-Stränge, die an dieser

Position Adenin enthalten (McAuley-Hecht et al., 1994). Die Häufigkeit von letzterem ist allerdings von der DNA-Polymerase abhängig (Tabelle 1-2).

Tabelle 1-2 Insertionseffizienz verschiedener DNA-Polymerasen gegenüber 8-oxoG. Polymerasen sind nach absteigender dCTP/dATP-Spezifität geordnet. Adaptiert aus (Batra et al., 2012).

DNA-Polymerase	dCTP:dATP Insertions-Verhältnis	Organismus
Dpo4	61:1	<i>S. solfataricus</i>
Pol η	43:1	<i>H. sapiens</i>
RB69	20:1	<i>Enterobakteria phage RB69</i>
Klenow	6:1	<i>E. coli</i>
φ29	5:1	<i>Bacillus subtilis phage phi29</i>
T7	2:1	<i>Enterobakteria phage T7</i>
Pol β	2:1	<i>H. sapiens</i>
Pol λ	1:1	<i>H. sapiens</i>
Pol ζ	1:1	<i>H. sapiens</i>
Pol δ	1:1	<i>H. sapiens</i>
Pol II	1:1	<i>E. coli</i>
Pol α	1:7	<i>H. sapiens</i>
Pol κ	1:53	<i>H. sapiens</i>

Eine 8-oxoG:A Fehlpaarung ist sterisch unauffällig und kann deshalb von der intrinsischen Proof-Reading-Aktivität der replizierenden DNA-Polymerase nicht erkannt werden (Hsu et al., 2004), (Maga et al., 2007). Wird die Fehlpaarung nicht vor dem nächsten Replikationszyklus aus dem DNA-Strang entfernt und dieser dann als Template für die weitere DNA-Synthese verwendet, kommt es im Folgenden zu einer G:C → T:A Transversion (Friedberg & Meira, 2006) (Abbildung 1-5). Dabei handelt es sich um eine Mutation, die mit einem weiten Spektrum an Krebserkrankungen in Verbindung gebracht wird (Greenman et al., 2007). Somit stellt 8-oxoG eine prämutagene Läsion dar (McAuley-Hecht et al., 1994), (Lu et al., 2001).

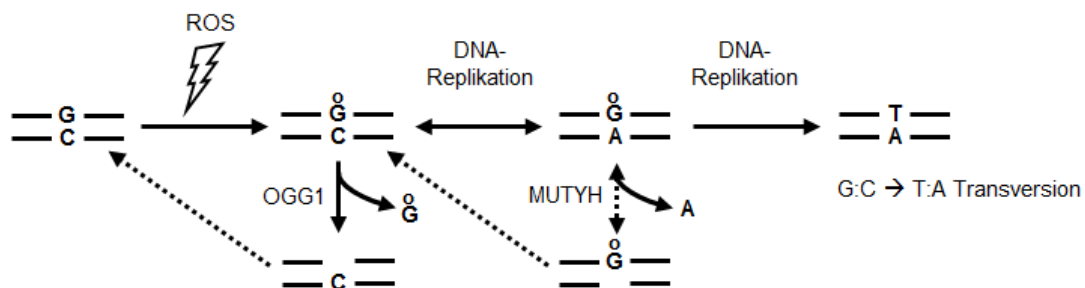


Abbildung 1-5 Entstehung von G:C → T:A Transversionen durch 8-oxoG innerhalb der DNA. 8-oxoG entsteht durch Einwirkungen von ROS auf die DNA und kann durch die von OGG1 initiierte BER wieder entfernt werden (schräge gepunktete Linien). Bei der DNA-Replikation kann entweder dCTP oder dATP gegenüber 8-oxoG eingebaut werden. Adenin kann durch die Aktivität der DNA-Glykosylase MUTYH aus einer solchen Fehlpaarung entfernt werden (gepunktete Linie). Replikation eines nicht reparierten, Adenin-enhaltenden DNA-Stranges führt zu einer G:C → T:A-Transversion. Adaptiert aus (Beard et al., 2010).

Eine weitere Quelle für 8-oxoG-bedingte Mutationen ist der Einbau von 8-oxodGTP, das durch ROS-vermittelte Oxidation des dGTPs des zellulären Nukleotidpools entsteht (Abbildung 1-6). Wird 8-oxodGTP während der DNA-Replikation verwendet, besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass es gegenüber eines Adenins eingebaut wird (Batra et al., 2010). Ist 8-oxodGTP erst einmal in den DNA-Strang eingebaut, gibt es keine Möglichkeit diese Fehlpaarung mittels Reparatur-Mechanismen zu beseitigen. Ein weiterer Replikationszyklus kann nun zu einer A:T → C:G-Transversion führen, wobei dieser ungünstige Ausgang durch zelluläre Reparaturaktivitäten gefördert wird (Abbildung 1-6).

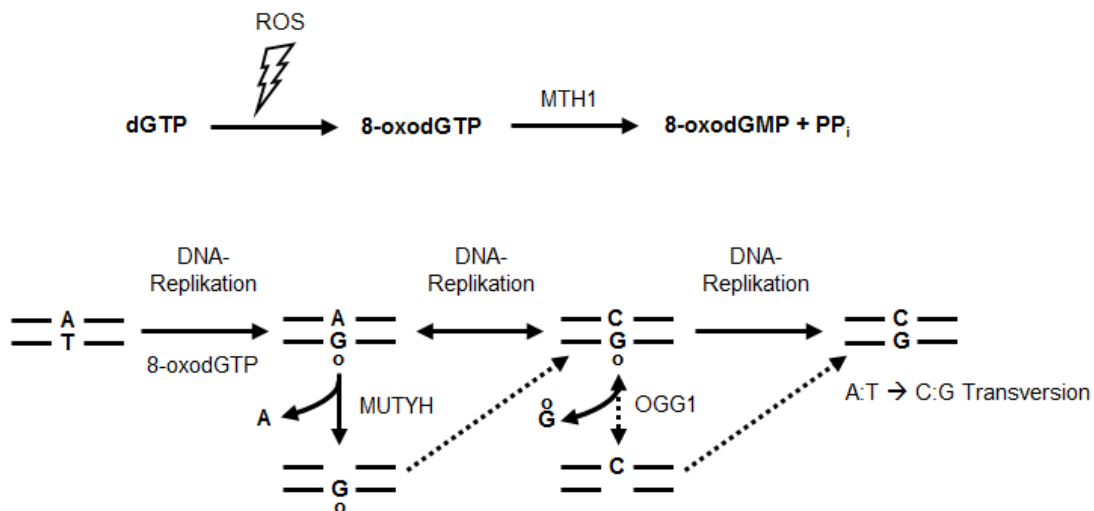


Abbildung 1-6 Entstehung von A:T → C:G Transversionen durch Einbau von 8-oxodGTP. 8-oxodGTP entsteht durch Einwirkungen von ROS auf dGTP im zellulären Nukleotidpool und kann durch MTH1 wieder entfernt werden. Bei der DNA-Replikation kann 8-oxodGTP gegenüber von Adenin eingebaut werden. Bei einem weiteren Replikationszyklus wird potentiell Cytosin gegenüber 8-oxoG eingebaut und es kommt zu einer A:T → C:G Transversion. Diese kann nicht durch die Reparaturaktivität von MUTYH oder OGG1 vermieden werden. Adaptiert aus (Beard et al., 2010).

Das Steady-State-Level von 8-oxoG im humanen Genom wird auf etwa 3 Läsionen pro 10<sup>6</sup> Desoxyguanine geschätzt, was etwa 10.000 8-oxoG pro nukleares Genom entspricht (Epe, 2002), (Ohno et al., 2006). Dieses Steady-State-Level spiegelt das Gleichgewicht zwischen der permanenten Generierung von Schäden durch endogene Faktoren wie ROS und der Entfernung von 8-oxoG durch die entsprechenden zellulären Reparaturwege wieder.

#### 1.4 Reparatur von 8-oxoG in Säugerzellen

Da 8-oxoG aufgrund seines hohen mutagenen Potentials eine ernstzunehmende Gefahr für die Integrität des Genoms darstellt (Kasai et al., 1986), existieren in der Zelle verschiedene, stark konservierte enzymatische Mechanismen, die dieser Replikationsmutagenität entgegenwirken. Dieses Zusammenspiel verschiedener Reparaturaktivitäten zur Entfernung von 8-oxoG wird oft auch als GO-System bezeichnet (Abbildung 1-7). Von diesen Mechanismen kommt der OGG1-initiierten BER die größte Bedeutung zu (Larsen et al., 2004).

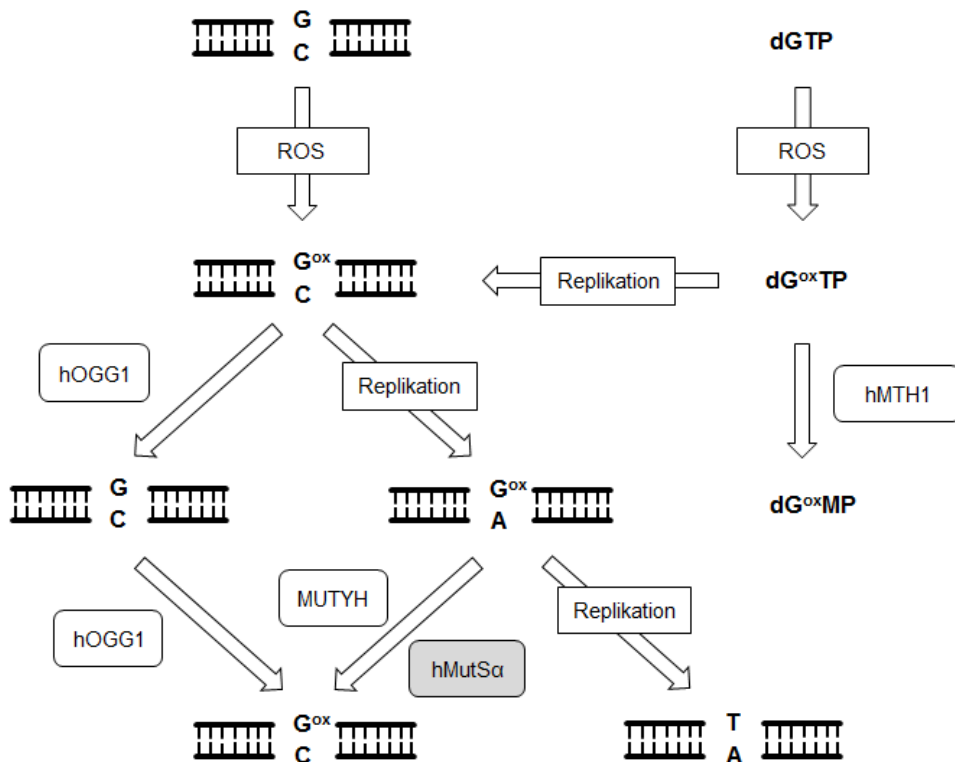


Abbildung 1-7 Zusammenfassendes Schema aller 8-oxoG-Reparaturwege im Menschen (GO-Reparatur-System). Abgerundete Kästen stellen die beteiligten, 8-oxoG-spezifischen Enzyme dar. Enzyme im grau hinterlegten Kasten gehören zum Mismatch-Reparatur-System (MMR). Adaptiert aus (Lu et al., 2001).

#### 1.4.1 8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase 1 (OGG1): die BER von 8-oxoG

Die DNA-Glykosylase OGG1 ist das Schlüsselenzym der BER von 8-oxoG, da sie die Modifikation erkennt, aus der DNA entfernt und somit die BER initiiert (Radicella et al., 1997), (Rosenquist et al., 1997), (Klungland et al., 1999), (Osterod et al., 2001), (Fortini et al., 2003), (Hegde et al., 2008). Bei OGG1 handelt es sich um ein funktionelles, aber nicht strukturelles, Homolog der bakteriellen DNA Glykosylase Fpg (MutM). In humanen Zellen existieren zwei OGG1-Isoformen, die durch alternatives Splicing des Transkripts entstehen:  $\alpha$ -OGG1 (39 kDa), das im Nukleus lokalisiert ist, und  $\beta$ -OGG1 (47 kDa), das in den Mitochondrien lokalisiert ist und bisher ausschließlich beim Menschen nachgewiesen wurde (Lu, 1997). Beide Isoformen gleichen sich in ihrem N-Terminus, während sich der C-Terminus vollständig unterscheidet (Radicella et al., 1997). Da für die  $\beta$ -Isoform ein Fehlen von jeglicher Glykosylase-Aktivität berichtet wurde und dessen Funktion aufgrund dessen nicht klar ist (Hashiguchi et al., 2004), bezieht sich die Bezeichnung OGG1 im Folgenden ausschließlich auf die im Zellkern lokalisierte  $\alpha$ -Isoform des humanen OGG1.

In menschlichen Zellen gibt es durchschnittlich nur ungefähr 50.000 Moleküle OGG1 pro Zelle. Dies erscheint eine recht geringe Menge zu sein, um das gesamte Genom einer Zelle ( $6 \times 10^9$  Basenpaare) vor der Mutagenität des 8-oxoG zu schützen (Cappelli et al., 2001). Dieses Unterfangen stellt somit eine enorme Herausforderung für OGG1 dar, wenn man zusätzlich die relativ geringen Mengen an 8-

oxoG in der DNA und dessen große strukturelle Ähnlichkeit zu Guanin in Betracht zieht. Für eine effiziente Entfernung von 8-oxoG aus der DNA ist es also unabdingbar, dass OGG1 in der Lage ist, 8-oxoG schnell und effizient von den vier kanonischen DNA-Basen zu unterscheiden. Dabei stellt sich die Frage, wie genau OGG1 8-oxoG überhaupt in der DNA findet. Eine Suche durch Herausdrehen einzelner Basen aus der Doppelhelix und anschließender Identitätsprüfung erscheint energetisch eher verschwenderisch und ineffizient. Strukturanalysen von OGG1 und anderen Glykosylasen deuten darauf hin, dass OGG1 8-oxoG durch intrahelikales Abfragen lokalisiert. Dabei führt das Enzym probeweise einen Aminosäurerest an verschiedenen Basenpaaren in die DNA-Helix ein, um deren Stabilität und/oder die Deformierung des DNA-Duplexes zu untersuchen (Abbildung 1-8). Bei Insertion dieses Aminosäurerestes an einem normalen, kanonischen Basenpaar wird dieses nur gestaucht. Ein abnormales Basenpaar wie 8-oxoG:C würde hingegen getrennt. Auf diese Weise wird bevorzugt 8-oxoG aus einem 8-oxoG:C-Basenpaar aus der Helix verdrängt und schnell in die 8-oxoG-Bindetasche weitergeleitet (Fromme & Verdine, 2003), (Banerjee et al., 2006). Diese Art der Suche wäre extrem schnell, birgt aber das Risiko 8-oxoG-Läsionen zu übersehen. Dies könnte jedoch durch eine extrem hohe Suchgeschwindigkeit kompensiert werden, wodurch wiederholte Möglichkeiten entstehen die Läsion zu finden. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass sich OGG1 an der DNA mit einer Diffusionskonstanten, die sich der theoretischen Obergrenze für eindimensionale Diffusion annähert, bewegt (Blainey et al., 2006). Auf diese Weise würde es OGG1 gelingen pro Sekunde Millionen Basenpaare zu überprüfen.

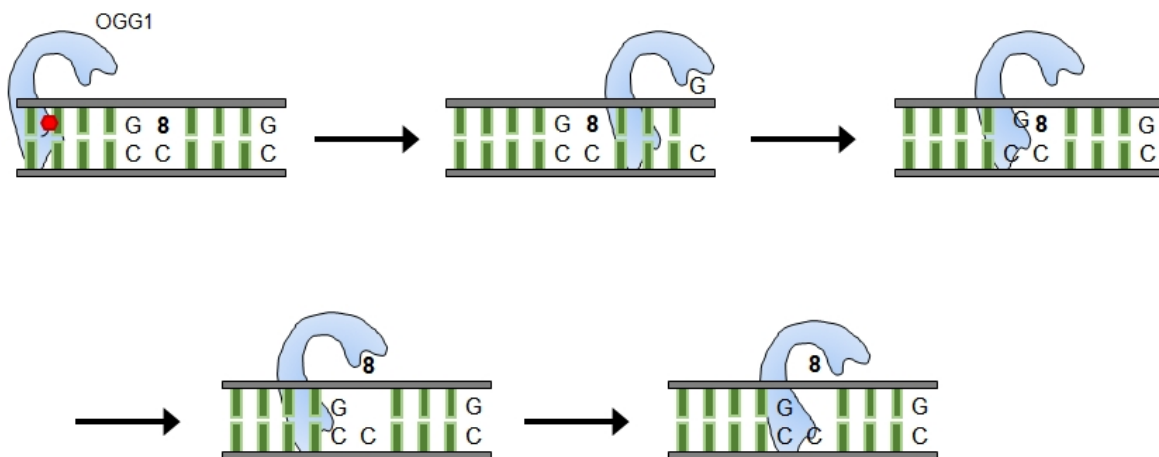


Abbildung 1-8 Mechanismus der Suche nach 8-oxoG durch die DNA-Glykosylase OGG1. Das Enzym bewegt sich mit hoher Geschwindigkeit entlang der DNA und führt eine Tester-Aminosäure (rotes Sechseck) in die Helix ein, um die Stabilität des Duplex zu erproben. Dies führt zu einem bevorzugten Herausdrehen von 8-oxoG (8) aus der DNA. Im Falle, dass fälschlicherweise G herausgedreht wird, wird dieses von der Exo-Tasche abgefangen und zurück in die Helix gedreht. Trifft das Enzym auf ein G:C-Basenpaar in direkter Nachbarschaft zu einem 8-oxoG, erleichtert dies das Erkennen von 8-oxoG zusätzlich, da dieses G nicht weit aus der Helix gedreht werden kann. Dies fördert eine Bewegung des Enzyms zum 8-oxoG. Dieses wird zuerst in die Exo-Tasche gedreht und von dort schnell in die 8-oxoG-spezifische Bindungstasche weitergeleitet, wo es letztendlich ausgeschnitten wird. Adaptiert aus (David et al., 2007).



Die Unterscheidung zwischen dem unmodifizierten Guanin und 8-oxoG verläuft über einen Vorgang, der auch als „base flipping“ oder „nucleotide flipping“ bezeichnet wird (Huffman et al., 2005). Durch strukturelle und biophysikalische Untersuchungen wurde gezeigt, dass es sich bei diesem Modus der Läsionserkennung um einen gemeinsamen Mechanismus zahlreicher BER-Glykosylasen, einschließlich OGG1, handelt (Bruner et al., 2000), (Parikh et al., 2000), (Fromme et al., 2004), (Stivers, 2004), (Huffman et al., 2005), (Hitomi et al., 2007). Dieser enzymvermittelte Vorgang beginnt mit dem Aufeinandertreffen der DNA-Glykosylase mit einer DNA-Läsion und verläuft in spezifischen, klar definierten Schritten („pinch-push-plug-pull“) (Parikh et al., 2000), (Stivers, 2004). Bei Läsionskontakt induziert die DNA-Glykosylase einen Knick und somit eine Distorsion der DNA-Doppelhelix („pinch“). Dieser Schritt erfolgt durch die Interkalation eines Aminosäurerestes (Tyr203) in der DNA-Helix. Ein Aminosäurerest (Asn149) verdrängt die modifizierte Base („push“) und nimmt deren Platz ein, wodurch die Verformung des DNA-Duplexes stabilisiert wird („plug“). Substratspezifische Aminosäurereste (Gly42, Cys253, Gln315, Phe319) stabilisieren die herausgedrehte, modifizierte Base zusätzlich innerhalb der Erkennungstasche und des aktiven Zentrums („pull“). Dieser Enzymkomplex mit der Läsions-enthaltenden DNA wird auch als Läsions-Erkennungs-Komplex (LRC, Lesion recognition complex) bezeichnet (Abbildung 1-9). Die Erkennungstasche des OGG1 besteht aus einem Helix-Hairpin-Helix Strukturelement (HhH-GPD-Motiv), dem ein Gly/Pro-reicher Loop und ein konservierter Aspartat-Rest folgen, wobei diese Struktur allen Proteinen der Superfamilie der BER-Glykosylasen gemein ist (Bruner et al., 2000). Im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern dieser Superfamilie enthält die Struktur von OGG1 zusätzlich eine anti-parallele  $\beta$ -Faltblatt Domäne, deren genaue Funktion noch unklar ist (Nash et al., 1996). Die HhH-Struktur ermöglicht OGG1 eine feste Bindung an das Zuckerphosphatrückgrat des 8-oxoG-enthaltenden DNA-Strangs, wobei das Rückgrat des komplementären DNA-Strangs nicht berührt wird (Bruner et al., 2000). Wird das 8-oxoG bei der Bildung des LRC dann vollständig aus der DNA-Helix heraus in die  $\alpha$ -helikale Tasche des Enzyms gedreht, erfolgt die Stabilisierung dieses Zustandes durch zahlreiche Wasserstoffbrückenbindungen zwischen OGG1 und den Phosphaten des 8-oxoG-enthaltenden DNA-Stranges (Abbildung 1-9). Zusätzliche Stabilität erfährt der ausgeklappte Zustand durch den Aspartatrest Asp149, der die von 8-oxoG hinterlassene Lücke füllt und gleichzeitig das gegenüberliegende Cytosin über Wasserstoffbrücken bindet, sowie dem Tyrosinrest Tyr203, der zwischen das gegenüberliegende Cytosin und dessen 5'-positionierte Nachbarbase gekeilt wird und den scharfen Knick von 70-80° in der DNA verursacht. In dieser ausgeklappten Konformation erfolgt dann die eigentliche Erkennung von 8-oxoG. 8-oxoG passt aufgrund seiner Struktur perfekt in die Bindungstasche, wobei sein Harnstofffragment (C8-Carbonyl, N7, N9) von den Aminosäureresten der Bindungstasche erkannt wird. Von allen Interaktionen der Bindungstasche mit der modifizierten Base

ist die Interaktion des Carbonyls von Gly42 zum N7-Atom des 8-oxoG die einzige, bei der sich 8-oxoG und Guanin voneinander unterscheiden (Bruner et al., 2000).

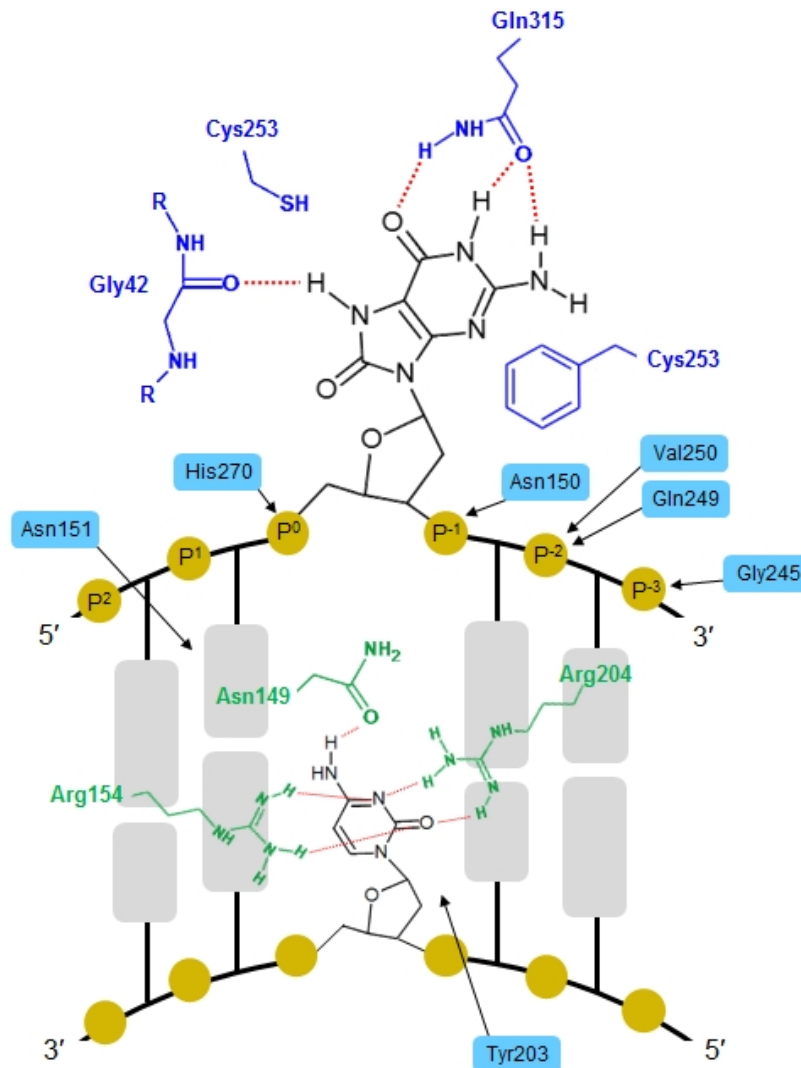


Abbildung 1-9 Interaktionen der Bindetasche von OGG1 mit dem herausgedrehten 8-oxoG-Rest. Aminosäurereste der 8-oxoG-Bindungstasche sind in blau, Aminosäurereste, die mit dem gegenüberliegenden Cytosin interagieren, in grün dargestellt. Rot-gepunktete Linien stellen Wasserstoffbrückenbindungen dar. Hellblaue Kästen stehen für Aminosäurereste, die den ausgeklappten, geknickten Zustand des DNA-Strangs stabilisieren. Phosphatreste sind mit „P“ gekennzeichnet, der Index gibt die Position relativ zum Phosphatrest 5' des 8-oxoG. Adaptiert aus (Bruner et al., 2000), (Kuznetsov et al., 2011).

Dennoch erscheint eine Unterscheidung zwischen der kanonischen Base und der potentiell schädlichen Läsion durch eine einzelne Wasserstoffbrückenbindung relativ unsicher und fehleranfällig – der Mechanismus der Substratspezifität ist wahrscheinlich weitaus komplexer. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass auch wenn Guanin dem Enzym durch Herausklappen präsentiert wird, es keinen Zugang zur 8-oxoG-Bindungstasche und somit dem aktiven Zentrum erhält (Banerjee et al., 2005). Stattdessen findet es sich in einer alternativen, peripheren Exo-Tasche. Berechnungen der Unterschiede der freien Energie zeigen, dass Interaktionen mit 8-oxoG energetisch um ein  $10^5$ -faches begünstigt sind – sowohl in der Exo-Tasche als auch im aktiven

Zentrum. Zusätzlich wurde festgestellt, dass 8-oxoG und Guanin jeweils lokale Dipole mit entgegengesetzter Orientierung besitzen. Das aktive Zentrum von OGG1 besitzt einen zu 8-oxoG komplementären Dipol, der durch das Lys249-NH<sub>3</sub><sup>+</sup> und Cys253-S<sup>-</sup> Aminosäurenpaar gebildet wird. Diese Dipol-Dipol-Wechselwirkung scheint einen ebenso großen Anteil an der Substratspezifität von OGG1 zu haben, wie die Wasserstoffbrückenbindung zu NH7 des 8-oxoG (Radom et al., 2007). Sowohl die Existenz der Exo-Tasche, als auch die energetische Präferenz für die Bindung von 8-oxoG an beiden Bindepositionen, deuten auf die Existenz klar abgrenzbarer Schritte beim Herausdrehen von 8-oxoG hin. Im ersten Schritt wird 8-oxoG in der Exo-Tasche positioniert, im finalen Schritt erfolgt dann die Bindung im aktiven Zentrum. Ein solcher, mehrstufiger Prozess bietet den Vorteil, dass es mehrere Möglichkeiten gibt, die Identität der herausgeklappten Base zu überprüfen, sodass wirklich nur 8-oxoG bis ins aktive Zentrum vordringen kann (David et al., 2007).

Wenn man die massive Verformung der DNA-Helix während der Bildung des LRC in Betracht zieht, scheint es unwahrscheinlich, dass die Entstehung des 70-80°-Knicks, der essentiell für die Positionierung des 8-oxoG im katalytischen Zentrum ist, keinerlei sterischen Einflüssen durch die Basen in der direkten Nachbarschaft des ausgeklappten 8-oxoG unterworfen ist. Vor allem, da beispielsweise für die DNA-Glykosylasen UNG, deren Mechanismus der Läsionserkennung dem von OGG1 entspricht, Sequenzpräferenzen bei der Exzision der modifizierten DNA-Base nachgewiesen werden konnten (Eftedal et al., 1993) (Nilsen et al., 1995). Bislang existieren nur wenige Untersuchungen zur Sequenzspezifität der 8-oxoG-Exzision durch OGG1. In einer Studie von Kirpota et al. (2011) wurden verschiedene kinetische Parameter in 8-oxoG-enthaltenden Oligonukleotid-Substraten bestimmt und anhand derer vorhergesagt, dass die DNA-Sequenz von 10-13 Nukleotide um 8-oxoG Auswirkungen auf die Bindungsfähigkeit und die katalytische Aktivität von OGG1 haben kann. Eine andere Studie, in der ebenfalls die Steady-State-Kinetik und Turnover-Kinetik von OGG1 in Oligonukleotid-Substraten mit unterschiedlichem DNA-Sequenzkontext um 8-oxoG ermittelt wurde, konnte gezeigt werden, dass die Identität der Base 5' von 8-oxoG keinen Einfluss auf die Exzisionsaktivität hat, aber ein Mismatch in direkter Nachbarschaft diese massiv beeinträchtigt (Sassa et al., 2012). Ob und inwieweit sich diese Daten jedoch von Oligonukleotiden auf DNA in stabileren helikalen Strukturen wie beispielsweise Vektor-DNA oder genomische DNA übertragen lassen, ist nur schwer abzuschätzen. Dabei wäre genau dies in Hinblick auf die Entstehung von sogenannten Mutationshotspots von besonderem Interesse.

Bei OGG1 handelt es sich um eine bifunktionelle DNA-Glykosylase, die zusätzlich zu ihrer N-Glykosylase-Aktivität, die die N-glykosidische Bindung zwischen der modifizierten Base und der Desoxyribose spaltet und so eine AP-Läsion generiert, eine AP-Lyase-Aktivität aufweist, durch die die entstandene AP-Läsion auf ihrer 3'-Seite durch eine  $\beta$ -Eliminierung in einen Einzelstrangbruch

überführt wird (Nash et al., 1997), (Dherin et al., 1999), (Friedberg & Meira, 2006). Der detaillierte katalytische Mechanismus der 8-oxoG-Exzision durch OGG1 ist in Abbildung 1-10 dargestellt. Im ersten Schritt greift die  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>-Gruppe von Lys249 das C1-Atom der Desoxyribose nukleophil an. Die glykosidische Bindung wird gespalten und es entsteht ein 8-oxoG<sup>-</sup>-Anion, sowie Intermediat 2. Das 8-oxoG<sup>-</sup>-Anion abstrahiert nun ein Proton des Lysin-Restes, wodurch sich ein Aminal (3) bildet. Das protonierte 8-oxoGH gibt sein Proton dann an das O4'-Atom der Desoxyribose weiter, wodurch sich das Aminal in eine Schiff'sche Base mit offenem Furanose-Ring (4) umlagert. Das zusätzliche Proton der Schiff'schen Base (4) geht nun auf das 8-oxoG<sup>-</sup>-Anion über, wodurch wiederum die umgelagerte Schiff'sche Base (5) entsteht. Eine  $\beta$ -Eliminierung unter Spaltung der 3'-Phosphodiesterbindung führt nun zur Bildung einer Verbindung mit  $\alpha$ ,  $\beta$ -ungesättigter, positiv geladener Schiff'schen Base an ihrem 3'-Ende (6) und eines DNA-Fragments mit 5'-Phosphat. Die Hydrolyse des Intermediats (6) resultiert schließlich in einem DNA-Fragment mit einem 4-Hydroxy-2,3-Pental-1-Rest an seinem 3'-Ende und dem freien Enzym (Fromme et al., 2003).

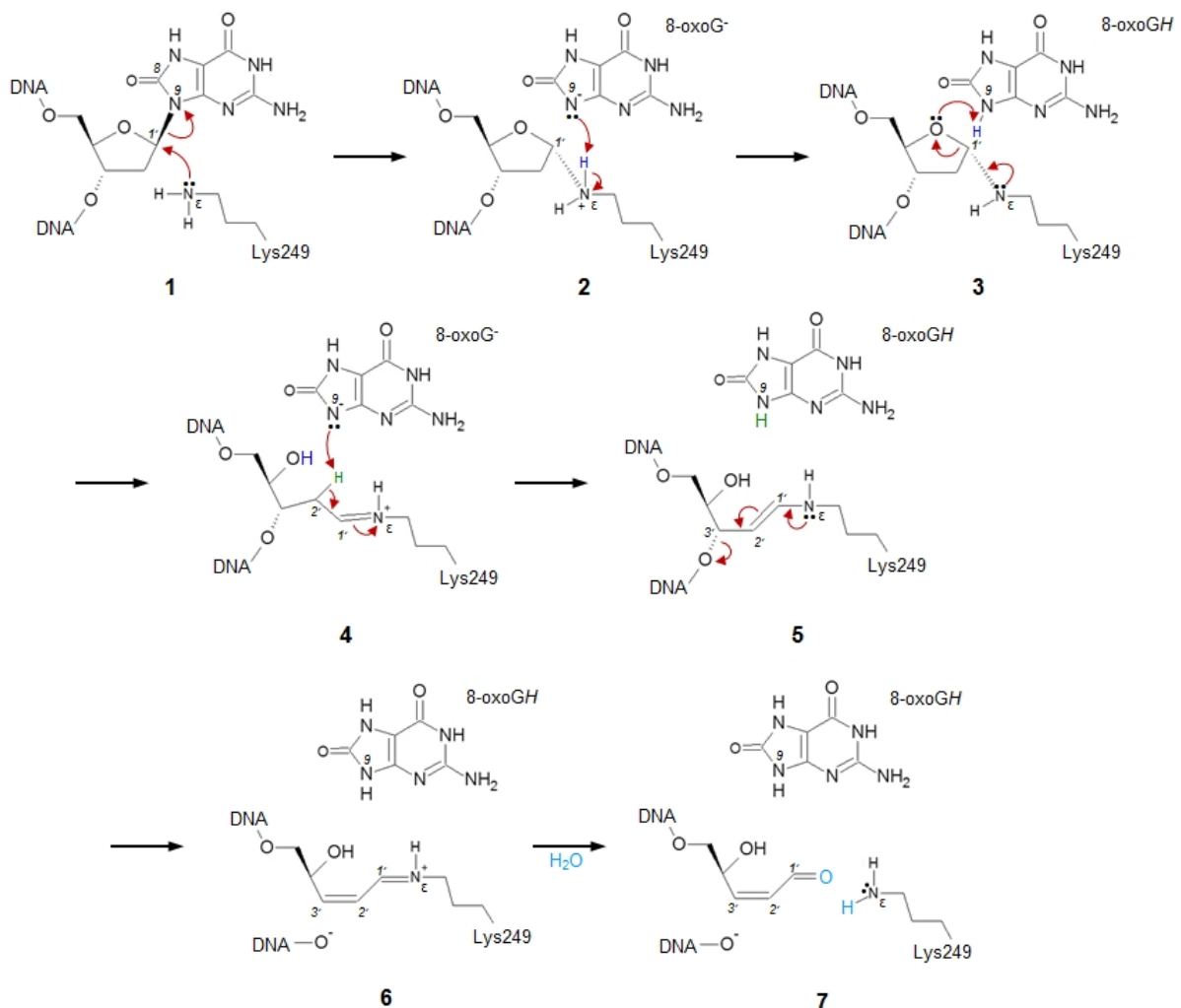


Abbildung 1-10 Katalytischer Mechanismus von OGG1. Die Reaktionsschritte 1-3 stellen hierbei die N-Glykosylase-Aktivität, die Schritte 4-7 die AP-Lyase-Aktivität dar. Protonen und Sauerstoff-Atome, die im Laufe der Reaktion ihre Position verändern, sind in den betreffenden Reaktionsschritten farblich markiert. Adaptiert aus (Fromme et al., 2003).

Die AP-Lyase-Aktivität des OGG1 ist nachgewiesenerweise um ein Vielfaches schwächer als dessen N-Glykosylase Aktivität, was dazu führt, dass das Hauptprodukt der von OGG1 katalysierten Reaktion *in vivo* wahrscheinlich eine AP-Läsion ist (Hegde et al., 2008). Des Weiteren kann die Effizienz der 8-oxoG-Exzision durch OGG1 durch andere Proteine der BER moduliert werden. Einer der bedeutendsten Modulatoren der OGG1-Aktivität ist dabei APE1. APE1 erniedrigt die Affinität von OGG1 zu seinem Reaktionsprodukt (AP-Stelle), fördert dadurch dessen Dissoziation von der DNA und umgeht somit den langsamen AP-Lyase-Schritt. Letztendlich führt dies zu einem erhöhten Turnover von OGG1 (Hill et al., 2001), (Vidal et al., 2001). Das Gerüstprotein XRCC1 erhöht durch seine Interaktion mit OGG1 ebenfalls dessen Aktivität um etwa das Dreifache (Marsin et al., 2003). Im Gegensatz dazu wurde berichtet, dass die Interaktion von aktiviertem PARP1 mit OGG1 dessen Aktivität inhibiert (Noren Hooten et al., 2011).

Für den Abschluss der OGG1-initiierten BER von 8-oxoG gilt der Short-Patch-Weg als bevorzugter Mechanismus. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von DNA Ligase I während der DNA-Synthese im Rahmen der Reparatur ausschließlich ein Nukleotid eingebaut wurde, was dem Mechanismus der Short-Patch-BER entspricht (Pascucci et al., 2002). Dieses Ergebnis wird zusätzlich auch durch *in vivo*-Daten unterstützt: Reparatur-Raten von 8-oxoG in Zellen von Polymerase  $\beta$ -Knockout Mäusen sind im Vergleich mit den entsprechenden Wildtyp-Zellen signifikant erniedrigt (Fortini et al., 1999), was ebenfalls ein klares Indiz für die Bevorzugung des Short-Patch-Weges darstellt.

#### 1.4.2 *Humanes MutY Homolog (hMYH)*

Die DNA-Glykosylase hMYH (human MutY Homolog, MUTYH), das menschliche Homolog der bakteriellen Glykosylase MutY, spielt eine bedeutende Rolle bei der Vermeidung mutagener Ereignisse durch 8-oxoG. Dieses Enzym besitzt eine Adenin-Glykosylase-Aktivität, deren bedeutsamstes Substrat die 8oxoG:A-Fehlpaarung darstellt (Michaels & Miller, 1992). Dabei entfernt sie, im Gegensatz zu OGG1 und den anderen DNA-Glykosylasen der BER, nicht die modifizierte Base, sondern das fehlerhaft eingebaute Adenin. Diese Entfernung verläuft post-replikativ über einen Mechanismus analog zur Long-Patch-BER (Parlanti et al., 2002). Nach dem Ausschneiden des Adenins aus der Fehlpaarung führt der BER-Reparaturweg zur Generierung eines 8-oxoG:C-Basenpaars, sodass 8-oxoG immer noch in der DNA vorhanden ist. Die Entfernung von 8-oxoG erfolgt im Anschluss durch Exzision von 8-oxoG durch OGG1 (Lu et al., 2001).

#### 1.4.3 *Humane MutT-Homologe (hMTH1, hMTH2 und NUDT5)*

Die menschlichen Homologe des bakteriellen MutT-Proteins hMTH1, hMTH2 und NUDT5 finden sich hauptsächlich im Cytosol und in der mitochondrialen Matrix (Kang et al., 1995). Durch ihre Nukleosid-

Triphosphatase-Aktivität sind sie in der Lage das durch ROS gebildete 8-oxodGTP in 8-oxodGMP und Pyrophosphat zu spalten und es auf diese Weise aus dem Nukleotid-Pool zu eliminieren (Maki & Sekiguchi, 1992), (Fujikawa et al., 1999). Dadurch verhindern sie den Einbau von modifizierten Nukleotiden in die DNA (Friedberg & Meira, 2006), (Hori et al., 2010). Das Degradierungsprodukt 8-oxodGMP kann nicht zellulär rezykliert werden, da es kein Substrat der Guanylatkinase, die sowohl GMP als auch dGMP zu GTP bzw dGTP phosphorylieren kann, darstellt (Hayakawa et al., 1999). Während das bakterielle MutT nur 8-oxodGTP und 8-oxoGTP hydrolysiert, hydrolysiert das menschliche Homolog hMTH1 allgemein oxidierte Purin-Nukleosidtriphosphate und deckt somit ein weitaus größeres Spektrum an Basenmodifikationen ab (Fujikawa et al., 1999).

### 1.5 Einfluss von 8-oxoG in der DNA auf die Transkription: Kenntnisstand und offene Fragen

Neben seiner mutagenen Eigenschaften in Hinblick auf die Replikation kann 8-oxoG auch bei der Transkription durch die RNA Polymerase II zum Fehleinbau von Adenin führen. Auch in diesem Fall entgeht die Fehlpaarung der intrinsischen Proof-Reading-Aktivität der RNA-Polymerase (Damsma & Cramer, 2009). Dieses Phänomen – bei dem durch fehlerhafte mRNA auch potentiell Proteine mit veränderter Funktion entstehen können – wird allgemein als „Transkriptions-Mutagenese“ bezeichnet (Saxovsky et al., 2008). Diese 8-oxoG-vermittelte Transkriptions-Mutagenese steht sogar im Verdacht an der Pathogenese verschiedener humaner neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt zu sein (Bregeon et al., 2009). Zusätzlich zu dieser transkriptionellen Mutagenese kann 8-oxoG die Transkription aber auch anderweitig beeinflussen. Es wurde beispielsweise gezeigt, dass die Anwesenheit von 8-oxoG in bestimmten regulatorischen Elementen wie Transkriptionsfaktor-Bindestellen wie NfκB zu einem veränderten Bindungsverhalten des betreffenden Transkriptionsfaktors führt, was sich wiederum sowohl positiv als auch negativ auf die Genexpression auswirken kann (Gosh & Mitchell, 1999), (Ramon et al., 1999), (Hailer-Morrison et al., 2003). Es wurde auch spekuliert, dass 8-oxoG möglicherweise auch in der Lage ist die Transkriptionselongation zu hemmen, allerdings konnte in mehreren *in vitro*-Untersuchungen kein signifikanter Block der transkribierenden RNA-Polymerase durch 8-oxoG nachgewiesen werden (Kuraoka et al., 2003), (Larsen et al., 2004), (Charlet-Berguerand et al., 2006). Auch wenn 8-oxoG auf diese Weise keinen direkten Einfluss auf die Elongation der Transkription hat, hat sich experimentell gezeigt, dass 8-oxoG, sofern es in der Zelle durch die BER prozessiert wird, dennoch einen maßgeblichen Effekt auf die Transkription in Säugerzellen ausübt: In der dieser Arbeit vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass schon ein einzelnes 8-oxoG, positioniert innerhalb des für ein Enhanced green fluorescence protein (EGFP) kodierenden Bereichs eines Reportervektors, in der Lage ist die Genexpression zu beeinträchtigen (Kitsera et al., 2011). Dieser Effekt trat allerdings nur in

Anwesenheit von OGG1 auf, was darauf hindeutet, dass die Prozessierung von 8-oxoG und somit wahrscheinlich eines seiner Reparatur-Intermediate wie die AP-Läsion oder der DNA-Einzelstrangbruch dieser Inhibition zugrunde liegt. Die einzelne DNA-Basenmodifikation befand sich bei diesen Versuchen entweder innerhalb des transkribierten (TS) oder des nicht-transkribierten DNA-Stranges (NTS). Dabei wurde festgestellt, dass ein einzelnes 8-oxoG im transkribierten DNA-Strang nur einen minimalen Effekt auf die Genexpression ausübt, während ein einzelnes 8-oxoG innerhalb des nicht-transkribierten Stranges überraschenderweise eine vielfach stärkere Inhibition der Genexpression verursachte. Welche Faktoren aber letztlich für diese Diskrepanz in der Stärke der Inhibition verantwortlich sind, wurde im Rahmen dieser Studie nicht geklärt.

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Position von 8-oxoG auf die Inhibition der Genexpression ausübt, wurden Vektoren konstruiert, die den Einbau von 8-oxoG in den transkribierten oder nicht-transkribierten DNA-Strang der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) oder der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) des EGFP-Reportergens ermöglichen (Diplomarbeit J. Allgayer, 2011). EGFP-Expressionsanalysen der 8-oxoG-enthaltenen Vektorkonstrukte zeigte weiterhin, dass die Stärke des inhibitorischen Effekts von 8-oxoG weder vom Abstand der Basenmodifikation zum Transkriptionsstart, noch vom DNA-Strang (NTS oder TS) abhängig ist. Dies steht dem ersten Anschein nach im klaren Widerspruch zu der Beobachtung der vorangegangenen Untersuchung (Kitsera et al., 2011).

Einen weiteren, bisher nicht näher untersuchten Faktor, der ebenfalls als Ursache für die unterschiedliche Ausprägung des inhibitorischen Effekts in den Untersuchungen von Kitsera et al. (2011) in Betracht gezogen werden sollte, stellt der lokale DNA-Sequenzkontext in unmittelbarer Nachbarschaft zur modifizierten Base dar. Dieser wurde bei der genannten Untersuchung der Strang- und Positionsabhängigkeit des inhibitorischen Effekts von 8-oxoG gezielt konstant gehalten, während er sich in der ersten Studie, in der ungleiche Effektstärken beobachtet werden konnten, zwischen den DNA-Strängen unterschied – im nicht transkribierten DNA-Strang 5'-C[8-oxoG]C, im transkribierten 5'-C[8-oxoG]G.

Da bereits ein einzelnes 8-oxoG eine massive Beeinträchtigung der Genexpression verursachen kann, ist es von immensem Interesse die Hintergründe dieser Expressionshemmung aufzuklären – vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass 8-oxoG durch die Einwirkung von endogenen ROS täglich in der DNA entsteht und somit nicht nur eine permanente Bedrohung für die genetische Information, sondern auch die transkriptionelle Aktivität darstellt. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, welchen Einfluss der lokale DNA-Sequenzkontext und die Anzahl an 8-oxoG auf die Stärke der von 8-oxoG ausgelösten Expressionshemmung hat. Zudem wurde den mechanistischen Hintergründen dieser Expressionshemmung auf den Grund gegangen, wobei unter anderem das für

die Expressionshemmung verantwortliche Reparatur-Intermediat und die verantwortliche enzymatische Aktivität, sowie eine Beteiligung epigenetischer Regulationsmechanismen untersucht wurden. Zusätzlich wurden auch direkte Auswirkungen von 8-oxoG innerhalb eines regulatorischen Elements, sowie die Übertragbarkeit der beobachteten Effekte auf andere oxidative DNA-Basenmodifikationen untersucht.



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Software

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller/Distributor</i>
<i>Autoklav</i>	
Technoclav 50 6.0 bzw. 2.0	Fedegari Autoclav SPA, Albuzzo, Italien
<i>Brutschränke</i>	
CO <sub>2</sub> -Inkubator BB16	Heraeus Instruments, Hanau
BB6060 O2	Heraeus Instruments, Hanau
Hera-Cell	Heraeus Instruments, Hanau
<i>Destillationsapparatur</i>	
Destamat®	Heraeus Instruments, Hanau
<i>Durchflusszytometer</i>	
BD FACSCalibur™ FACS System	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
<i>Entwicklungskassette</i>	
Hypercassette™	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
<i>Geldokumentationssystem</i>	
Gel Doc™ XR+ Molecular Imager®	Bio-Rad; Hercules, USA
<i>Gelelektrophoresekammern</i>	
Agarose-Gel-Kammer	Bio-Rad; Hercules, USA
SDS-PAGE: MGV 202	C.B.S. Scientific; Del Mar, USA
<i>Inkubator</i>	
25D Incubator Shaker	New Brunswick Scientific, New Jersey, USA
<i>Lichtmikroskop</i>	
Telaval 31 Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen
<i>pH-Meter</i>	
PHM 62	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
<i>Photometer</i>	
Biowave S2100 Spectrophotometer	WPA, Cambridge, UK
Nanodrop 2000 Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
<i>Power Supply</i>	
Power Pac 300	Bio-Rad, Hercules, USA
Power Pac Basic™	Bio-Rad, Hercules, USA
<i>Realtime PCR Cycler</i>	
Lightcycler® 1.5 Real Time PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Schüttler</i>	
Vortex Genie 2™ Vortex Schüttler	Bender & Hohbein AG, Zürich, Schweiz
Schüttler Labnet Orbit™ LS	Labnet International Inc., Edison, USA
<i>Sonifizierer</i>	
Bachofer GM 70 HD ultrasonic processor	Bachofer GmbH, Reutlingen
<i>Thermocycler/-block</i>	
Progene Thermocycler	Techne, Cambridge, UK
Biometra® T Gradient Thermocycler	Biometra®, Göttingen

MJMini Personal Thermal Cycler	Bio-Rad, Hercules, USA
Thermoblock – Thermostat	Gebr. Liebisch, Karlsruhe
<i>Transferkammer</i>	
Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad, Hercules, USA
<i>Waagen</i>	
PB 3002, Delta Range, max. 3.100g	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
AG 245, max. 210g	Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
<i>Wasserbad</i>	
Köttermann Typ 3042	Köttermann, Uetze-Hänigsen
<i>Zellzählsystem</i>	
Z2 Coulter® Particle Count and Size Analyzer	Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA
<i>Zentrifugen</i>	
Heraeus® Laborfuge® 400R Zentrifuge	Kendro Laboratory Products, Osterode
Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR International, Darmstadt
Universal 320R Zentrifuge	Hettisch Zentrifugen, Tuttlingen
Eppendorf Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Preparative Ultracentrifuge Optima LE-80K	Beckman Instruments Inc., Palo Alto, USA

<i>Software</i>	<i>Firma</i>
ClustalW2 Software	EBI; Cambridge, UK
<i>Durchflusszytometrie</i>	
CellQuest™ Pro	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
<i>Geldokumentationssystem</i>	
Image Lab™	Bio-Rad, Hercules, USA
Oligoengine 2.0 Software	Oligoengine, Seattle, USA
Primer Designer 4 V4.1	Scientific & Educational Software, Cary NC, USA
<i>Realtime PCR Cycler</i>	
LightCycler Software Version 3.5.3.	Roche Diagnostics, Mannheim
Trev 1.9	MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK

### 2.1.2 Zelllinien und Bakterienstämme

#### Zelllinien

<i>Zelllinie</i>	<i>Beschreibung</i>	<i>Herkunft/Referenz</i>
GM04321	Menschliche SV40 transformierte Hautfibroblasten, defizient in Xeroderma pigmentosum complementation group A (XPA)	NIGMS Human Genetic Cell Repository, Coriell Institute for Medical Research; Camden, New Jersey, USA
HeLa	Humane Cervix-Karzinom-Zellen; Verdopplungszeit 17 Stunden	R. J. Wiesner (Institut für Vegetative Physiologie, Universität Köln)

HeLa OGG1-GFP (Ser/Cys)	Humane Cervix-Karzinom-Zellen, die ein OGG1-GFP Fusionsprotein überexprimieren; Verdopplungszeit 17 Stunden	J. Pablo Radicella (Fontenay aux Roses, Frankreich) (Campalans et al., 2007)
HeLa SMUG1sh (Klon J22)	Mit shRNA für hSMUG1 permanent transfizierte Humane Cervix-Karzinom-Zellen	B. Lühnsdorf (Mainz) (Lühnsdorf et al., 2014)
HeLa TDGsh (Klon B6)	Mit shRNA für TDG permanent transfizierte Humane Cervix-Karzinom-Zellen	B. Lühnsdorf (Mainz) (Lühnsdorf et al., 2014)
HeLa UNGsh (Klon 12)	Mit shRNA für UNG1/2 permanent transfizierte Humane Cervix-Karzinom-Zellen	B. Lühnsdorf (Mainz) (Lühnsdorf et al., 2014)
LN428	shRNA Lentiviral transduzierte Glioblastoma-Zellen mit Knockdown des UNG-, SMUG1- oder TDG-Gens und isogene Kontrollzelllinie	Trevigen Inc., Gaithersburg; USA/AMS Biotechnology, Frankfurt
MRC-5 VA1	Menschliche SV40 transformierte Lungenfibroblasten	NIGMS Human Genetic Cell Repository, Coriell Institute for Medical Research, Camden, New Jersey, USA

### Bakterien

Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i> SCS-8	<i>recA1 endA1 mcrA Δ(mcrBC-hsdRMS-mrr) Δ (argF-lac)U169 Φ 80dlacZ Δ M15 Tn10 (Tetr)</i>

### 2.1.3 Vektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft/Referenz
pcDNA3	codierend für ein Genitocin-Resistenz-Gen zur stabilen Transfektion der shRNA-Vektoren	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
pDsRed Monomer N1	Codierend für DsRed-Monomer N1 als Transfektionsmarker	Clontech Laboratories Inc, Saint Germain en Laye, Frankreich
pEGFP-mODC-AZ (pAZ)	Modifiziertes pEGFP-C3 mit zusätzlicher ODC-Sequenz, codierend für kurzlebige EGFP; Kanamycin-Resistenz	Dr. A. Khobta (Mainz) (Kitsera et al., 2007)
pEGFP-mODC-ZA (pZA)	Modifiziertes pEGFP-C3 mit zusätzlicher, invertierter ODC-Sequenz, codierend für stabiles EGFP; Kanamycin-Resistenz	Dr. A. Khobta (Mainz)
pENTR/pSuper+	shRNA Expressionsvektor, Kanamycin-Resistenz	Addgene, Cambridge, MA, USA
pSB-ACTB-5C	EGFP-Reportervektor unter Kontrolle des humanen ACTB-Promotors	S. Bartelt (Mainz)
pSB-RASSF1-5C	EGFP-Reportervektor unter Kontrolle des humanen ACTB-Promotors	S. Bartelt (Mainz)

### 2.1.4 PCR- und Sequenzierungsprimer

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen. Die Reinigung erfolgte mittels Reverse-Phase-Chromatographie und entsprach dem HPSF-Grad (High purity salt free).

#### Sequenzierungsprimer

Oligonukleotid	Template	Position	Sequenz (5' → 3')
pCHIP_pZA_A2	pZA, pAZ, pZAJ, pJAZ, etc.	765(-)	GGTGGTGCAGATGAACTTC
pZASS-PLUS-A1	pZA, pAZ, pZAJ, pJAZ, etc.	4707(+)	TTCGCCACCTCTGACTTGA

#### PCR-Primer (PCR-Screening)

Die Primer, die für das PCR-Screening verwendet wurden, dienten gleichzeitig als Sequenzierungsprimer für ihre entsprechenden Template-Vektoren.

Oligonukleotid	Template	Position	Sequenz (5' → 3')	Produktlänge
pEpS+	pENTR/pSuper+	589(+) 1777(-)	TGGCAGGAAGATGGCTGTGA TTAATCGCGCCTCGACGTT	1189 bp (496 bp mit shRNA-Insert)
pDsRed	pDsRed-Monomer N1	1112(+) 1394(-)	CCTCCACCGAGAAGCTGTA TGTGGTATGGCTGATTATGA	283 bp

#### PCR-Primer (RT-qPCR)

Primerpaar	Templat	Position	Sequenz (5' → 3')	Produktlänge
pEGFP 2	pZA, pZAJ	1153(+) 1368(-)	GACCACTACCAGCAGAACAC GCCTGTGCTTCTGCTAGGAT	216 bp
pDsRed	pDsRed-Monomer N1	701(+) 939(-)	TCAAGGAGTTCATGCAGTTC GAAGGACAGCTTCATGTAGT	239 bp

#### PCR-Primer (Klonierung)

Vektor	Templat	Primer	Sequenz (5' → 3')	Produktlänge
pCMV-1111-W	pZAJ, pJAZ	Forward	CATTGCGTGACGTCAGCGCATTGCCCT GGCATTATGCCAGTACA	4872 bp
		Reverse	GCAATGCGCTGACGTCACGCAATGGCG TACTTGGCATATGATACT	
pCMV-1111-C	pZAJ, pJAZ	Forward	GCAATGCGCTGACGTCACGCAATGCCT GGCATTATGCCAGTACA	4872 bp
		Reverse	CATTGCGTGACGTCAGCGCATTGCGCG TACTTGGCATATGATACT	

pCMV-11x11-W	pZAJ, pJAZ	Forward	CATTGCGTGATGTCAGCGCATTGCCCT GGCATTATGCCAGTACA	4872 bp
		Reverse	GCAATGCGCTGACATCACGCAATGGCG TACTTGGCATATGATACT	
pCMV-1011-W	pZAJ, pJAZ	Forward	CATTGCGTGACGTCAGCGCATTGCCCT GGCATTATGCCAGTACA	4790 bp
		Reverse	GCAATGCGCTGACGTCACGCAATGAGT CCCTATTGGCGTTACTATGG	
pCMV-0011-W	pZAJ, pJAZ	Forward	CATTGCGTGACGTCAGCGCATTGCCCT GGCATTATGCCAGTACA	4664 bp
		Reverse	GCAATGCGCTGACGTCACGCAATGATG AACTAATGACCCCGTAATTGA	
pCMV-1101-W	pZAJ, pJAZ	Forward	CATTGCGTGACGTCAGCGCATTGCGTG GATAGCGGTTTGACTCAC	4758 bp
		Reverse	GCAATGCGCTGACGTCACGCAATGGCG TACTTGGCATATGATACT	
pCMV-1100-W	pZAJ, pJAZ	Forward	CATTGCGTGACGTCAGCGCATTGCTGT ACGGTGGGAGGTCTATATAA	4616 bp
		Reverse	GCAATGCGCTGACGTCACGCAATGGCG TACTTGGCATATGATACT	
pCRE-UNO-W	pZAJ, pJAZ	Forward	CATTGCGTGACGTCAGCGCATTGCTGT ACGGTGGGAGGTCTATATAA	4408 bp
		Reverse	GCAATGCGCTGACGTCACGCAATGATG AACTAATGACCCCGTAATTGA	
pCRE-UNO-C	pZAJ, pJAZ	Forward	GCAATGCGCTGACGTCACGCAATGTGT ACGGTGGGAGGTCTATATAA	4408 bp
		Reverse	CATTGCGTGACGTCAGCGCATTGCATG AACTAATGACCCCGTAATTGA	
pCRE-NULL	pZAJ, pJAZ	Forward	CATTGCGACTGACTGGCGCATTGCTGT ACGGTGGGAGGTCTATATAA	4408 bp
		Reverse	GCAATGCGCCAGTCAGTCGCAATGATG AACTAATGACCCCGTAATTGA	

### 2.1.5 Oligonukleotide zur Klonierung

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

<i>Insert</i>	<i>Oligonukleotid</i>	<i>Sequenz (5' → 3')</i>
OGG1sh-A	Forward	GATCCCCCAACAACAACATCGCCCGTTCAAGAGACGGGCGATG TTGTTGTTGGTTTTTA
	Reverse	AGCTTAAAAACCAACAACAACATCGCCCGTCTCTTGAACGGGCG ATGTTGTTGTTGGGGG
OGG1sh-B	Forward	GATCCCCGATCAAGTATGGACACTGTTCAAGAGACAGTGTCCA TACTTGATCCTTTTTTA
	Reverse	AGCTTAAAAAGGATCAAGTATGGACACTGTCTCTTGAACAGTGT CCATACTTGATCCGGG
CGG-5'UTR-W	Forward	CTAGACATTGCAGGGCGGACTGACATTGCCTA
	Reverse	CCGGTAGGCAATGTCAGTCCGCCCTGCAATGT
CGG-5'UTR-C	Forward	CTAGAGCAATGTCAGTCCGCCCTGCAATGCTA
	Reverse	CCGGTAGCATTGCAGGGCGGACTGACATTGCT
UPS	Forward	CATGACATTGCTTCGCTAGCACGATTGCA
	Reverse	CATGTGCAATGCGTGCTAGCGAAGCAATGT

### 2.1.6 Oligonukleotide für den Einbau einzelner DNA-Basenmodifikationen

Unmodifizierte Oligonukleotide, sowie Oligonukleotide mit Uracil oder 5-meC wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen (HPLC-Grad).

Oligonukleotide, die 8-oxoG und Phosphothioate enthielten, stammen von der Firma Biospring (Frankfurt a. M.). Oligonukleotide mit 5-hmC und 5-hmU wurden von Benjamin Hackner, Oligonukleotide mit 5-fC und 5-caC von Edris Parsa (beide LMU München, AG Carell) synthetisiert, mit HPLC gereinigt und massenspektrometrisch verifiziert.

<i>Oligonukleotid</i>	<i>Sequenz</i>
<i>Einbau in 5'-UTR, 3'-UTR und upstream, 5'-AG*C-Kontext</i>	
unmodifiziert	CATTGCTTCGCTAGCACG
8-oxoG	CATTGCTTCGCTA <u>8</u> CACG
3× 8-oxoG	CATT <u>8</u> CTTC <u>8</u> CTA <u>8</u> CACG
5-hmU	CATTGCTTCGCh <u>hmU</u> AGCACG
3× 5-hmU	CAT <u>hmU</u> GCT <u>hmU</u> CGCh <u>hmU</u> AGCACG
Uracil	CATTGCTTCGCUAGCACG
5-mC	CATTGCTT <u>mC</u> GCTAGCACG
2× 5-mC	CATTGCTT <u>mC</u> GCTAGCA <u>mC</u> G
<i>Einbau in 5'-UTR, 5'-CG*G-Kontext</i>	
unmodifiziert	CATTGCAGGGCGGACTGA
8-oxoG	CATTGCAGGGC <u>8</u> GACTGA
<i>Einbau in den EGFP-kodierenden Bereich, NTS</i>	
unmodifiziert	TGAGCACCCAGTCCGCC
8-oxoG	TGAGCACCCAGTCC <u>8</u> CCC
S*8-oxoG	TGAGCACCCAGTCC* <u>8</u> CCC
8-oxoG*S	TGAGCACCCAGTCC <u>8</u> *CCC
S*8-oxoG*S	TGAGCACCCAGTCC* <u>8</u> *CCC
<i>Einbau in den CMV-IE-Promotor und dessen Varianten</i>	
unmodifiziert	CATTGCGTGACGTCAGCG
8-oxoG	CATTGCGTGAC <u>8</u> TCAGCG
5-hmU	CATTGCGTGACGCh <u>hmU</u> CAGCG
3× 5-hmU	CAT <u>hmU</u> GCGCh <u>hmU</u> GACGCh <u>hmU</u> CAGCG
5-mC	CATTGCGTGAm <u>C</u> GTCAGCG
3× 5-mC	CATTG <u>mC</u> GTCGAm <u>C</u> GTCAG <u>mC</u> G
5-hmC	CATTGCGTGAh <u>hmC</u> GTCAGCG
3x 5-hmC	CATTG <u>hmC</u> GTCGAh <u>hmC</u> GTCAG <u>hmC</u> G
5-fC	CATTGCGTGAF <u>fC</u> GTCAGCG
3x 5-fC	CATTG <u>fC</u> GTCGAF <u>fC</u> GTCAG <u>fC</u> G
5-caC	CATTGCGTGACa <u>C</u> GTCAGCG
3x 5-caC	CATTG <u>caC</u> GTCGACa <u>C</u> GTCAG <u>caC</u> G

## 2.1.7 Oligonukleotide für RNA-Interferenz (siRNA)

<i>Target-Gen</i>	<i>siRNA</i>	<i>Herkunft</i>	<i>Beschreibung/Sequenz</i>
HDAC1	siMAX siRNA HDAC1	Eurofins MWG Operon (Ebersberg)	5'-CUAAUGAGCUUCCAACAATT
HDAC2	siMAX siRNA HDAC2	Eurofins MWG Operon (Ebersberg)	5'-UCCGUAAUGUUGCUCGAUGTT
HDAC3	siMAX siRNA HDAC3	Eurofins MWG Operon (Ebersberg)	5'- GAUGCUGAACCAUGCACCUTT
OGG1	SMARTpool: ON-TARGETplus OGG1 siRNA	GE Healthcare, Little Chalfont, UK	Mix aus 4 verschiedenen, spezifischen siRNAs
Smug1	MISSION® esiRNA human Smug1	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze	Endoribonuklease generierte siRNA, heterogener Mix aus verschiedenen siRNAs, die dieselbe mRNA angreifen

## 2.1.8 Chemikalien

<i>Chemikalie</i>	<i>Herkunft</i>
Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA) (Protease-frei)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Bacto-Agar	Hartenstein, Würzburg
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
BioRad Protein Assay (Bradford Reagenz)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA
Bovines Serumalbumin (BSA) (20 mg/ml)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Coomassie Brilliant Blue G	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Eisessig	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol absolut	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Formaldehyd (37 %)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
G418, Genitcin®	Life Technologies, UK
Glycerol	VWRTM International, Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Hefe Extrakt	Life Technologies, Darmstadt
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Hepes)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kanamycin	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Manganchlorid (MnCl <sub>2</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Methanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumacetat (NaAc)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Orange G	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Phenol	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Phenol:Chloroform:Isoamyl (25:24:1)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
1,4-Piperazindiethansulfonsäure (PIPES)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Rotiphorese® Gel 30 (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sulfosalicylsäure	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tetracyclin	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
TopVision Agarose	Thermo Scientific, Dreieich
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trichostatin A (TSA)	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X100	Sigma-Aldrich GmbH, Seelze
Trypton/Pepton aus Casein	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

### 2.1.9 Enzyme für die Molekularbiologie

<i>Enzym/Protein</i>	<i>Herkunft</i>
AatII (20 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Agel-HF (20 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Antarctic Phosphatase (5 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
ApaI (10 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
APE 1 (10 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
BglIII (10 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
BsrDI (2 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Btmi (10 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
CREB (50 μg)	BioCat, Heidelberg



CpG Methyltransferase M.SssI (4 U/μL) mit S-Adenosylmethionin (32 mM)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
DpnI (10 U/μl) mit Puffer Tango 10x	Fermentas (Thermo Scientific), St. Leon-Rot
Endonuclease IV (10 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Fpg (8 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
HindIII (15 U/μL)	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
hOGG1 (189 ng/μl)	J. Pablo Radicella, CEA, Fontenay aux Roses, Frankreich
hOGG1 (1,6 U/μL)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Nb.BsrDI (10 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
NheI-HF (20 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Nt.Bpu10I	Fermentas (Thermo Scientific), St. Leon-Rot
PciI (10 U/μL)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Pfu Turbo DNA Polymerase (2 U/μl) mit Pfu Puffer (10x)	Fermentas (Thermo Scientific), St. Leon-Rot
Proteinase K	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
T4 DNA Ligase (30 U/μl) mit T4 DNA Ligase Puffer	Fermentas (Thermo Scientific), St. Leon-Rot
T4 Polynukleotidkinase (10 U/μl)	Fermentas (Thermo Scientific), St. Leon-Rot
Tfi DNA-Polymerase (5 U/μl) mit Tfi PCR Reaktionspuffer (5x) und MgCl <sub>2</sub> dNTP-Mix	Life Technologies GmbH, Darmstadt  Fermentas (Thermo Scientific), St. Leon-Rot
Uracil-DNA-Glykosylase (5 U/μl)	New England Biolabs, Frankfurt am Main

### 2.1.10 Antikörper

Ziel	Bezeichnung	Herkunft
OGG1	Monoclonal rabbit OGG1 antibody: EPR4664(2)	Abcam, Cambridge UK
HDAC1	Mouse monoclonal HDAC1 antibody: 2E10	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
HDAC2	Rabbit polyclonal HDAC2-Antibody (ab7029)	Abcam, Cambridge UK
HDAC3	Rabbit polyclonal HDAC3-Antibody (ab16047)	Abcam, Cambridge UK
β-Actin	Monoclonal mouse antibody β-Actin (C4): sc-47778	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Maus	Goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Hase	Goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

### 2.1.11 Medien und Supplemente für die Zellkultur

<i>Material</i>	<i>Herkunft</i>
DMEM High Glucose Medium	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Fötales Rinder Serum Gold (FBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching
L-Glutamin 200 mM	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Penicillin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Sodium Pyruvat 100 mM	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching
Trypsin-EDTA in PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching

### 2.1.12 Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel

#### Allgemein

<i>Material</i>	<i>Herkunft</i>
Baysilone-Paste (Schliff fett)	Bayer AG, Leverkusen
Coulter Counter Döschen	Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA
Faltenfilter (Rotilabo®, Typ 601P)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Gewebekulturschalen (21, 58 und 143 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-ONE, Frickenhausen
Glasgeräte	Schott Spezialglas GmbH, Mainz
Greiner-Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml) (steril)	Greiner Bio-ONE, Frickenhausen
<i>Kapillaren</i>	
LightCycler® Capillaries (20 µl)	Roche Diagnostics, Mannheim
Kryoröhrchen Nalgene®	Nunc International, Rochester, USA
Petrischalen für die Bakterienkultur (steril)	Greiner Bio-ONE, Frickenhausen
Platten (6-Well und 24-Well)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
<i>Pipetten</i>	
Glas (Zellkultur)	Hartenstein, Würzburg
Kolbenpipetten BioPette A (10, 20, 200 und 1.000µl)	Labnet International, Edison, USA
Pasteurpipetten	Hartenstein, Würzburg
<i>Pipettenspitzen</i>	
Ohne Filter 10, 20 und 1.000µl	Sarstedt, Nümbrecht
Ohne Filter 5 und 10 ml	Hartenstein, Würzburg
Mit Filter ART® 10, 200 und 1.000 µl	Thermo Scientific, Dreieich
<i>Pipettierhilfe</i>	
Pipetus®-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
<i>Reaktionsgefäße</i>	
0,5, 1,5 und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
0,2 ml	Greiner Bio-ONE, Frickenhausen
Zellkulturflaschen (25cm <sup>2</sup> -, 75 cm <sup>2</sup> -, 125 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-ONE, Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht

*Materialien zur DNA Aufarbeitung & Transfektion*

<i>Material</i>	<i>Herkunft</i>
Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices 30k	Merck Millipore, Darmstadt
<i>DNA-Ladepuffer</i>	
Gel Loading Dye, Purple (6×)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Gel Loading Dye, Blue (6×)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Effectene® Transfection Reagent	Qiagen GmbH, Hilden
Mit EC Puffer	
Mit Enhancer	
Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
LightCycler® FastStart DNA Master <sup>PLUS</sup> SYBR Green I Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Marker</i>	
GeneRuler 100 bp (Plus) DNA ladder	Fermentas (Thermo Scientific), St. Leon-Rot
GeneRuler 1 kb DNA ladder	Fermentas (Thermo Scientific), St. Leon-Rot
Lambda DNA/HindIII Marker	Fermentas (Thermo Scientific), St. Leon-Rot
QuickLoad® 1kb	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Qiagen Plasmid Mega Kit	Qiagen GmbH, Hilden
ZR Plasmid Miniprep <sup>TM</sup> -Kit	Zymo Research, Irvine, USA

*Materialien für Western Blot*

<i>Material</i>	<i>Herkunft</i>
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Filterpapier</i>	
Grade GB003 Blotting Paper	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Ilford Multigrad Developer	HARMAN Technology Limited, Mobberly, UK
Ilford Rapid Fixer	HARMAN Technology Limited, Mobberly, UK
<i>Marker</i>	
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas (Thermo Scientific), St. Leon-Rot
<i>Nitro-Cellulose-Membran</i>	
Amersham Hybond-C Extra	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
<i>Photofilm</i>	
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Western Lightning®- ECL	PerkinElmer, Waltham, USA

*2.1.13 Puffer und Arbeitslösungen*

<i>Puffer/Arbeitslösung</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Band-Shift-Puffer (2×)	40 µl 1 M Tris-HCl, pH 8 (40 mM) 40 µl 2,5 M KCl (100 mM) 2 µl 0,1 M EDTA (0,2 mM) 100 µl Glycerol (10 %)

	<p>2 <math>\mu</math>l 1 M DTT (2 mM)  200 <math>\mu</math>l 50 mM MgCl<sub>2</sub> (10 mM)  616 <math>\mu</math>l H<sub>2</sub>O dest.  Kurz vor Verwendung ansetzen</p>
BEH-Puffer	<p>10 mM Hepes pH 7,5  200 mM NaCl  1 mM EDTA</p>
Blocking-Lösung für Western Blot	<p>5 % Albumin Fraktion V  In 0,1 % TBS-T</p>
Coomassie Brilliant Blue Lösung	<p>0,25 g Coomassie Brilliant Blue  45 ml H<sub>2</sub>O dest.  45 ml Ethanol  10 ml Eisessig</p>
DNA-Ladepuffer (6 $\times$ )	<p>6 mL Glycerol  1,2 mL 50x TAE-Puffer  15 mg Orange G Pulver  2,8 mL H<sub>2</sub>O dest.</p>
Entfärbelösung	<p>450 ml H<sub>2</sub>O dest.  450 ml Ethanol  100 ml Eisessig</p>
Geneticin-Lsg.	<p>100 mg/mL in 100 mM HEPES, pH 7,5  Filter sterilisiert, Aliquote bei -20°C</p>
Kanamycin-Lsg.	<p>30 mg/ml in H<sub>2</sub>O dest.  Aliquote bei -20°C</p>
Laufpuffer (5 $\times$ ) für SDS-PAGE	<p>15,1 g Tris-HCl  94 g Glycin  25 ml 20 % SDS  ad 1 l H<sub>2</sub>O dest.</p>
LB-Medium 1 $\times$ (2 $\times$ )	<p>5 (10) g Trypton  2,5 (5) g Hefe-Extrakt  5 g NaCl  pH 7,5-8 einstellen  ad 500 ml H<sub>2</sub>O dest.; autoklavieren</p>
Lysepuffer (Sonifizierung)	<p>100 <math>\mu</math>l 1 M Tris-HCl (20 mM)  10 <math>\mu</math>l 0,5 M EDTA, pH 8 (1 mM)  250 <math>\mu</math>l 5M NaCl (250 mM)  500 <math>\mu</math>l Protease-Inhibitor Coctail 10x (1x)  4.140 <math>\mu</math>l H<sub>2</sub>O dest.  Kurz vor Verwendung ansetzen</p>
PBSCMF (1x)	<p>137 mM NaCl  2,7 mM KCl  8,3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  pH 7,4; autoklaviert</p>

Ponceau-Rot-Lösung (10x)	0,2 g Ponceau-Rot 3 g Trichloressigsäure 3 g Sulfosalicylsäure Ad 100 ml H <sub>2</sub> O dest.
Protease Inhibitor Cocktail (10x)	1 Tablette cOmplete mini Protease Inhibitor 1 ml H <sub>2</sub> O dest.
Protein-Ladepuffer (6x)	8 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8 2 g SDS 10 ml Glycerol Spatelspitze Bromphenolblau 1,4 ml beta-Mercaptoethanol
RIPA-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 1 % v/v Triton-X100 0,5 % w/v Natriumdeoxycholat 0,1 % w/v SDS 5 mM EDTA Lichtgeschützt, bei 4°C
SOB-Medium	0,5 % Hefe-Extrakt 2 % Trypton 10 mM NaCl 2,5 mM KCl Ad H <sub>2</sub> O dest. Autoklavieren 10 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM MgSO <sub>4</sub>
TAE-Puffer (50x)	2 M Tris 3,4 M Eisessig 0,05 M EDTA (freie Säure)
TBE-Puffer (5x)	54 g Tris (445 mM) 27,5 g Borat (445 mM) 20 ml 0,5M EDTA, pH 8 (10 mM) Ad 1 l H <sub>2</sub> O
TB-Puffer	10 mM MOPS 15 mM CaCl <sub>2</sub> 250 mM KCl 55 mM MnCl <sub>2</sub> Filter sterilisiert; Lagerung bei 4°C
TBS (10x)	24,2 g Tris (200 mM) 87,8 g NaCl (1.500 mM) pH 7,4 mit HCl (konz.) ad 1 l H <sub>2</sub> O dest. Autoklaviert
TBS-T 0,5 % (0,1 %)	100 ml TBS (10x) 5 (1) ml Tween 20 Ad 1 l H <sub>2</sub> O dest.
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 8 1 mM EDTA, pH 8

Tetracyclin-Lsg.	20 mg/ml in Methanol Aliquote lichtgeschützt, bei -20°C
Topagar-Platten (mit Kanamycin)	4,5g Bacto-Agar 300 ml LB-Medium (1x) Autoklavieren, leicht abkühlen lassen 30 µg/ml Kanamycin (Zugabe unter Flow)
Transferpuffer	5,8 g Tris 2,9 g Glycin 200 ml Ethanol Ad 1 l H <sub>2</sub> O dest.

---

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Grundlegende Techniken zum Arbeiten mit humanen Zellen

#### 2.2.1.1 Kultivierung von humanen Zellen

Alle Arbeiten mit Säugerzellkulturen wurden an einer Sterilbank durchgeführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, mit 5 % CO<sub>2</sub>-Anteil und 99 % Luftfeuchtigkeit. Als Kulturmedium wurde DMEM-Medium, das mit 10 % v/v FCS, 2 mM L-Glutamin, 2 mM Natriumpyruvat, 100 U/ml Penicillin und 10 mg/l Streptomycin versetzt wurde, verwendet. Im Falle der stabil mit einem auf dem Vektor pENTR/pSuper+ basierenden shRNA-Expressionsvektor transfizierten HeLa-Zellen, sowie der HeLa-Zellen mit OGG1-GFP-Überexpression, wurde das Kulturmedium zusätzlich mit Geneticin (G418) auf eine Endkonzentration von 1.100 µg/ml versetzt, um den Selektionsdruck aufrecht zu erhalten. Das Medium für die lentiviral transduzierten LN428-Glioblastoma-Zellen enthielt zur Selektion Puromycin (1 µg/ml).

Bei Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen in eine frische Kulturflasche überführt. Dazu wurden die adhärennten Zellen zunächst zweimal mit PBSCMF gewaschen und dann mit Trypsin bis zum Ablösen im Brutschrank inkubiert (ca. 5-10 Minuten). Zur Inaktivierung des Trypsins wurde danach erneut das entsprechende DMEM-Medium zugegeben, die Zellen darin aufgenommen, gründlich vereinzel, verdünnt und in die neue Zellkulturflasche ausgestreut.

Zum Zählen der Zellen wurde der Z2 Coulter® Particle Count and Size Analyzer (Beckmann Coulter Inc.) verwendet, wobei die Zellen vor der Zählung gründlich in DMEM-Medium resuspendiert und vereinzel wurden.

#### 2.2.1.2 Auftauen von humanen Zellen

Zum Auftauen und Rekultivieren von kryokonservierten Humanzellen wurden diese zunächst im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, dann vorsichtig in 3 ml DMEM-Medium aufgenommen und

anschließend zentrifugiert (5 Minuten, 1.000 rpm, 4°C). Danach wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet sorgfältig in 5 ml DMEM-Medium resuspendiert und in eine 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt. Nach einem Tag wurden die Zellen, sofern sie ausreichende Konfluenz erreicht hatten, in eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche überführt und wie bereits beschrieben weiter kultiviert, andernfalls wurde schlicht das Kulturmedium ausgetauscht.

#### 2.2.1.3 Einfrieren von humanen Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurden diese mit Trypsin abgelöst, in Medium resuspendiert und zentrifugiert (5 Minuten, 1.000 rpm, 4°C). Das erhaltene Zellpellet wurde vorsichtig in DMSO-haltigem Medium (10 % v/v) aufgenommen und in Kryoröhrchen aliquotiert. Diese Aliquots wurden dann für 2 Stunden bei -20°C, über Nacht bei -80°C und danach in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 2.2.1.4 Transfektion von menschlichen Zellen mit Plasmid-DNA

Für alle Transfektionen kovalent geschlossener Plasmid-DNA wurde das Transfektions-Reagenz Effectene® (Qiagen) verwendet. Zur Vorbereitung wurden 16 bis 24 Stunden vor der Transfektion jeweils  $5-7 \times 10^5$  Zellen pro Vertiefung einer 6-Well-Platte ausgestreut und im Brutschrank bei 37°C kultiviert, damit sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 70-80 % aufwiesen. Im Falle von Zellen, die gewöhnlich unter Selektionsdruck kultiviert werden, wurde vom Moment des Ausstreuens an nur Geneticin-freies Medium verwendet. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Medium über den Zellen durch 1,5 ml frisches, auf 37°C vorgewärmtes Zellkulturmedium ersetzt. Es wurden jeweils 800 ng Plasmid-DNA transfiziert (in 5 – 10 µL TE- oder BEH-Puffer). Die Plasmid-DNA wurde mit EC Puffer auf ein Gesamtvolumen von 100 µL gebracht und dann mit 3,2 µl Enhancer versetzt. Es wurde kurz mit einem Vortex-Schüttler gemischt und für 2-5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden dem Transfektionsmix 4,5 µl Effectene® Transfektions-Reagenz zugegeben, es wurde auf dem Vortexer für 10 Sekunden gemischt und dann erneut für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsmix mit 500 µl vorgewärmtem Zellkulturmedium vermischt, tropfenweise auf die Zellen gegeben und durch leichtes Schwenken verteilt. Bis zu ihrem Ablösen wurden die transfizierten Zellen bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

#### 2.2.1.5 Transfektion von HeLa-Zellen in Anwesenheit von TSA

Zur Transfektion in Anwesenheit des HDAC Inhibitors Trichostatin A (TSA) wurden 16 Stunden vor der Transfektion  $5 \times 10^5$  HeLa-Zellen pro Vertiefung einer 6-Well-Platte ausplattiert. Kurz vor der Transfektion wurde das vorhandene Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit 1,5 ml TSA-haltigem Medium versetzt. Die Konzentrationen an TSA (Stammlösung 3,3 mM in Ethanol) in diesem

Medium wurden so gewählt, dass nach Zugabe der rund 600 µl Transfektionsmix eine TSA-Endkonzentration von 0 nM, 220 nM bzw. 440 nM erreicht wurde. Bei der Transfektion der Plasmid-DNA wurde ebenfalls das Transfektions-Reagenz Effectene® verwendet und wie bereits in Kapitel 2.2.1.4 beschrieben verfahren. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden die Zellen abgelöst und fixiert (siehe Kapitel 2.2.12.2).

#### 2.2.1.6 Transfektion von HeLa-Zellen mit siRNA

Für die Transfektion von siRNA zum transienten Knockdown von Proteinen wurde das Transfektions-Reagenz HiPerFect® (Qiagen) verwendet. 16 Stunden vor der Transfektion wurden  $3,5 \times 10^5$  HeLa-Zellen in 60 mm Platten ausgestreut und im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Zum Zeitpunkt der Transfektion wurde das Medium über den Zellen abgenommen, mit PBSCMF gewaschen und die Zellen mit 4 ml frischem, auf 37°C vorgewärmten und serum-freiem DMEM-Medium versetzt. Es wurde jeweils 1 µg der entsprechenden siRNA transfiziert. Dazu wurde zur in einem Eppendorfgesäß vorgelegten siRNA 100 µl des serum-freien Kulturmediums gegeben und dann 20 µl des HiPerFect® Transfektions-Reagenz hinzugefügt. Es wurde kurz mit einem Vortex-Schüttler gemischt und der Ansatz dann für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Bildung der Transfektions-Komplexe zu erlauben. Im Anschluss daran wurde der Transfektionsmix tropfenweise zu den Zellen gegeben und durch gleichmäßiges Schwenken der Platte mit dem Medium vermischt. Die Zellen wurden danach wieder bei 37°C im Brutschrank inkubiert, wobei 4 Stunden nach der Transfektion das serum-freie Kulturmedium durch serum-haltiges Medium ersetzt wurde. 24 Stunden nach der Transfektion wurde die gesamte Transfektions-Prozedur wiederholt. Die Zellen wurden 32-48 Stunden nach der ersten Transfektion dann je nach Versuchsplan entweder für die Transfektion von Plasmid-DNA oder die Herstellung von Zellextrakten ausgestreut.

### 2.2.2 Grundlegende Techniken zum Arbeiten mit Bakterien

#### 2.2.2.1 Herstellung ultra-kompetenter Bakterien mittels DMSO-Methode

Der bei -80°C gelagerte Glycerol-Stock (Glycerol 15 % v/v) der Bakterien wurde mit einer Pipettenspitze angekratzt und diese dann wiederum in 2 ml LB-Medium versetzt mit Antibiotikum (20 µg/ml Tetracyclin im Falle des scs-8-Stamms) unter beständigem Schütteln (250 rpm) bei 37°C inkubiert. Diese Übertagkultur wurde ungefähr 8 Stunden nach dem Ansetzen dazu verwendet eine Übernachtskultur in 120 ml SOB-Medium anzupfen und diese dann unter kontinuierlichem Schütteln bei 18-22°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte solange, bis die Kultur eine optische Dichte ( $OD_{600}$ ) von 0,4-0,6 aufwies (ungefähr 16 Stunden). Der Schikanekolben mit der Kultur wurde für 10 Minuten auf Eis gestellt und währenddessen vorsichtig geschwenkt, um die Kultur abzukühlen. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation gesammelt (10 Minuten,  $1.800 \times g$ , 4°C) und



das Pellet behutsam in 40 ml eiskaltem TB-Puffer resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis stehen gelassen. Daraufhin wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert (10 Minuten,  $1.800 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ) und das Pellet in 10 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen. Es wurde DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7 % v/v zugegeben, sachte gemischt und dann erneut für 10 Minuten auf Eis gekühlt. Die Bakteriensuspension wurde schließlich aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 2.2.2.2 Transformation von Bakterien

Zur Transformation ultra-kompetenter Bakterien wurden 95  $\mu\text{l}$  der Bakteriensuspension mit 5  $\mu\text{l}$  DNA-Lösung (bis zu 25 ng DNA pro 50  $\mu\text{l}$  kompetenter Bakterien) vermischt und für 30 Minuten auf Eis gekühlt. Danach erhielt die Bakteriensuspension einen Hitzeschock bei  $42^{\circ}\text{C}$  für genau 90 Sekunden und wurden erneut auf Eis gestellt. Nachdem sie 1-2 Minuten abkühlen konnte, wurde die Suspension in 600  $\mu\text{l}$  LB-Medium überführt und zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz für eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  geschüttelt (100 rpm). Anschließend wurden 50  $\mu\text{l}$  des LB-Bakteriengemisches auf Antibiotikum-haltigen Agarplatten ausplattiert und bis zur Bildung von Kolonien im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert (ungefähr 16-20 Stunden).

#### 2.2.2.3 Mini- und Mega-Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Mini-Präparation von Plasmid-DNA wurde mit einer Übernachtskultur mit 2 ml  $1\times\text{LB}$ -Medium supplementiert mit Antibiotikum (30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Kanamycin für alle aus pEGFP-mODC-ZAJ/pEGFP-mODC-JAZ oder pENTR/pSuper+ hervorgegangenen Vektoren) durchgeführt. Zum Animpfen dieser Übernachtskultur wurde entweder ein 15 % v/v Glycerol-Stock von Bakterien, die bereits zuvor mit dem gewünschten Vektor transformiert worden waren, mit einer Pipettenspitze angekratzt, oder eine Kolonie transformierter Bakterien mit einer Pipettenspitze direkt von einer Agarplatte gepickt. In beiden Fällen wurde die Pipettenspitze in das Kulturmedium geworfen und die Kultur dann für 16 Stunden (über Nacht) bei  $37^{\circ}\text{C}$  im Schüttler inkubiert (200 rpm). Die eigentliche Mini-Präparation der Plasmid-DNA wurde dann mit dem ZR Plasmid Miniprep<sup>TM</sup>-Classic Kit (Zymo Research) durchgeführt. Dabei wurde generell nach dem Protokoll des Herstellers verfahren, aber die Inkubation nach Zugabe des Neutralisationspuffers wurde auf 10 Minuten verlängert. Anstelle des beiliegenden Elutionspuffers wurde 10 mM Tris-HCl Lösung (pH 8) verwendet.

Für die Mega-Präparation wurde zunächst eine Übertagkultur in 2 ml Antibiotikum-haltigem Medium angesetzt, wobei das Animpfen analog zur Mini-Präparation erfolgte. Die Übertagkultur wurde dann für 8 Stunden unter ständigem Schütteln inkubiert (200 rpm) und dann verwendet, um eine Übernachtskultur bestehend aus 500 ml Antibiotikum-haltigem  $1\times\text{LB}$ -Medium in einem Schikanekolben anzuzüchten. Diese Kultur wurde daraufhin ebenfalls bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter beständigem

Schütteln ungefähr 16 Stunden (über Nacht) inkubiert. Die Aufarbeitung der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Qiagen Plasmid Mega Kits (Qiagen). Es wurde größtenteils nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll vorgegangen, jedoch wurde das Bakterienlysat nach Zugabe des Neutralisationspuffers nur für 10 – 15 Minuten auf Eis inkubiert und danach anstatt des Zentrifugationsschrittes durch einen Faltenfilter filtriert. Am Ende der Präparation wurde das DNA-Pellet in 2 ml TE-Puffer gelöst.

### 2.2.3 Grundlegende Methoden zum Arbeiten mit DNA

#### 2.2.3.1 Isolierung von DNA aus Reaktionsansätzen mit Hilfe einer Silico-Membran-Säule

Zur DNA-Isolierung mittels Silico-Membran-Säule wurde das illustra GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) verwendet. Das Protokoll des Herstellers wurde dahingehend verändert, dass alle Zentrifugationsschritte für 1 Minute bei  $6.000 \times g$  durchgeführt wurden. Anstelle des im Kit enthaltenen Elutionspuffers wurde 10 mM Tris-HCl-Lösung (pH 8) verwendet und nach Zugabe dieser Elutionslösung auf die Säule vor der folgenden, finalen Zentrifugation noch 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

#### 2.2.3.2 Isolierung von DNA aus Reaktionsansätzen mittels Phenol/Chloroform-Extraktion

Zu Beginn der Prozedur wurde der DNA-Lösung SDS-Lösung (10 % oder 20 % w/v) zugesetzt, sodass die SDS-Endkonzentration in der Probe bei 0,1 % w/v lag. Für die Extraktion wurde den Proben dann das dem Probenvolumen entsprechende Volumen an Phenol zugegeben, die Proben für eine Minute auf einem Vortex-Schüttler gründlich durchmischt und danach für 5 Minuten bei  $2.500 \times g$  und Raumtemperatur zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase des Zwei-Phasen-Gemisches wurde nun in ein neues Reaktionsgefäß überführt und der Extraktionsschritt zwei weitere Male – zuerst mit Phenol/Chloroform/Isomamyl (25:24:1), dann mit Chloroform – wie beschrieben durchgeführt. Die beim letzten Extraktionsschritt erhaltene wässrige Phase wurde dann mittels Isopropanol- oder Ethanol-Fällung präzipitiert (siehe Kapitel 2.2.3.3).

#### 2.2.3.3 Präzipitation von DNA mit Isopropanol bzw. Ethanol

Um DNA aus wässriger Lösung zu präzipitieren wurde der DNA-haltigen Lösung zuerst ein einem Zehntel ihres Eigenvolumens entsprechendes Volumen an Natriumacetat (3 M, pH 5,2) beigemischt. Nach kurzem Mischen wurde dann jeweils das dem Probenvolumen entsprechende Volumen an Isopropanol bzw. das 2,5-fache Volumen an absolutem Ethanol zugeben. Die Probe wurde 6- bis 8-mal invertiert und dann zentrifugiert ( $14.000 \times g$ , 30 Minuten,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Im Falle einer Präzipitation mit Ethanol wurde die Probe vor der Zentrifugation über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und

erneut zentrifugiert ( $14.000 \times g$ , 20 Minuten,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Der Überstand wurde ein weiteres Mal verworfen und das Pellet an der Luft getrocknet, bis die Reste des Ethanols verdampft waren (ungefähr 10-15 Minuten). Das getrocknete Pellet wurde dann mit BEH- oder TE-Puffer bedeckt, für 10-15 Minuten auf Eis stehen gelassen und dann vorsichtig mit einer Pipette resuspendiert.

#### 2.2.3.4 Spektrophotometrische Quantifizierung der DNA

Die Konzentration der dsDNA-Lösungen wurde spektrophotometrisch (Biowave S2100 oder Nanodrop 2000) über ihre Absorption bei 260 nm bestimmt, wobei eine Einheit A<sub>260</sub> jeweils 50 ng/μl dsDNA entspricht. Der Quotient A<sub>260</sub>/280 diente dabei als Maß der Reinheit der Proben und lag bei DNA-Proben stets zwischen 1,8 und 2,0. Die Lagerung der Proben erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$  und nach dem Auftauen wurden sie stetig auf Eis aufbewahrt.

#### 2.2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gele zur Analyse von Plasmid-DNA wurden immer mit 0,8 % w/v Agarose und einfachem TAE-Puffer gegossen. Letzterer diente auch während der Elektrophorese als Laufpuffer. Die DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 6× Ladepuffer versetzt, der bei Vorhandensein von nicht Hitze-inaktivierbaren Proteinen in der Probe zusätzlich mit 0,1 % w/v SDS versetzt war. Als Längenstandard wurden DNA-Marker von Thermo Scientific verwendet (GeneRuler 100 bp (Plus) DNA Ladder; GeneRuler 1 kb DNA Ladder; Lambda DNA/HindIII Marker). Die Gele liefen 45-60 Minuten bei einer angelegten Spannung von 80-100 V. Anschließend wurden sie für 30 Minuten in Ethidiumbromid-haltigem, einfachen TAE-Puffer (0,5 μg/ml) gefärbt. Nach dem Färben wurden die Gele kurz in entionisiertem Wasser geschwenkt, bevor das Bild mit dem Molecular Imager<sup>®</sup> Gel Doc<sup>™</sup> XR+ (Bio-Rad) aufgenommen und mit der zugehörigen Software (Image Lab<sup>™</sup>; Bio-Rad) analysiert wurde. Die UV-Belichtungszeit der Bilder wurde so gewählt, dass das Fluoreszenzsignal der zu analysierenden Banden keine Sättigung aufwies. Bei der Elektrophorese von Plasmid-DNA, die durch Ligation mit T4 DNA Ligase hergestellt wurde, wurden sowohl das Agarose-Gel, als auch der Laufpuffer mit 0,5 μg/ml Ethidiumbromid versetzt, was eine nachträgliche Färbung des Gels obsolet macht. Das Gel wurde direkt nach Ende der Elektrophorese in Wasser geschwenkt und das Gelbild aufgenommen.

#### 2.2.3.6 DNA-Extraktion aus einem Agarose-Gel

Um DNA aus einem Agarose-Gel (0,8 %) zu isolieren, wurde zunächst ein kleines Aliquot in einer einzelnen Auftrage tasche des Gels aufgetragen (analytischer Teil), der Rest als präparativer Ansatz in zwei bis drei vereinte Taschen gefüllt (präparativer Teil). Nach Beendigung der einstündigen Elektrophorese (80-100 V) wurde das Gel zwischen der analytischen und der präparativen Tasche

geteilt und der analytische Teil für 30 Minuten im Ethidiumbromidbad gefärbt, während der präparative Teil in dieser Zeit in 1× TAE-Puffer gelagert wurde. Anhand der Laufweite der gewünschten DNA-Bande im gefärbten, analytischen Teil des Gels konnte die Position der gewünschten Bande im ungefärbten, präparativen Teil abgeschätzt und diese dann mit einem Skalpell ausgeschnitten werden. Die Extraktion der DNA aus diesem Gelstück wurde mit Hilfe des illustra GFX PCR and Gel Band Purification Kits (GE Healthcare) durchgeführt. Es wurde wie im Protokoll des Herstellers angegeben verfahren, allerdings wurden sämtliche Zentrifugationsschritte für eine Minute bei  $6.000 \times g$  durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung der extrahierten DNA nach der Elution mit 10 mM Tris-HCl-Lösung (pH 8) erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese und Vergleich zu einem DNA Marker mit bekannter Konzentration.

#### 2.2.3.7 Isolierung von Gesamt-DNA aus Säugerzellen

Die Isolierung von Gesamt-DNA erfolgte, nachdem HeLa-Zellen zuvor in 6-Well-Platten ausgestreut und nach dem in Kapitel 2.2.1.4 beschriebenen Protokoll transfiziert worden waren. Dazu wurde das Medium über den Zellen abgenommen, zweimal mit PBSCMF gewaschen und die Zellen mit 350  $\mu\text{l}$  des RNase-enthaltenden Qiagen Resuspensionspuffers (Bestandteil des Qiagen Plasmid Mega Kits) überschichtet. Es wurde für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und dann 350  $\mu\text{l}$  einer 1 % w/v SDS-Lösung in TE-Puffer dazugegeben. Die Lyse der Zellen erfolgte durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren. Die hoch viskose Lösung wurde im Anschluss mit Proteinase K (Carl Roth GmbH) zu einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  versetzt und für 2-3 Stunden bei 50°C inkubiert. Es folgte die Phenol-Chloroform-Extraktion der DNA (siehe Kapitel 2.2.3.2), allerdings ohne erneute Zugabe von SDS. Die Präzipitation der DNA erfolgte in Isopropanol (siehe Kapitel 2.2.3.3). Nach dem Waschschrift in 70 %igem Ethanol wurde das luftgetrocknete DNA-Pellet in 100  $\mu\text{l}$  Wasser aufgenommen und die Konzentration der Proben spektrophotometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.2.3.4). Vor der Quantifizierung der DNA mittels Realtime quantitativer PCR wurden alle Proben mit Wasser auf 50 ng/ $\mu\text{l}$  verdünnt.

#### 2.2.3.8 Realtime quantitative PCR (RT-qPCR)

Die Realtime quantitative PCR wurde verwendet, um die DNA-Menge der transfizierten Reportervektoren zu bestimmen. Für die Analyse der zuvor aus HeLa-Zellen isolierten DNA wurde der LightCycler 1.5 (Roche Diagnostics) und das LightCycler FastStart DNA-MasterPLUS SYBR Green I Kit (Roche Diagnostics) verwendet. Pro Reaktion wurden 11  $\mu\text{l}$  eines für alle Reaktionen angesetzten LightCycler-Mixes, der wie in Tabelle 2-1 beschrieben angesetzt wurde, in den Kapillaren vorgelegt. Dann wurde 1  $\mu\text{l}$  der Probenlösung zugegeben und die Kapillaren nach Zentrifugation ( $600 \times g$ , 1

Minute, Raumtemperatur) in das Karussell des LightCyclers eingesetzt. Die Amplifizierung erfolgte anhand des in Tabelle 2-2 dargestellten Programms.

Tabelle 2-1 Zusammensetzung des LightCycler-Mixes für die Amplifizierung im Rahmen der RT-qPCR.

Reagenz	Endkonzentration/Probe
PLUS Mix 10× (35 mM MgCl <sub>2</sub> )	1x
Forward Primer (2 µM)	0,5 µM
Reverse Primer (2 µM)	0,5 µM
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,75 mM
H <sub>2</sub> O bis zum Gesamtvolumen von 11 µl	

Tabelle 2-2 Programm der Realtime quantitativen PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Aktion	Funktion
1	95°C	10 Minuten		Initielle Denaturierung /Aktivierung Polymerase
2	95°C	10 Sekunden		Denaturierung
3	65°C	10 Sekunden		Anlagerung der Primer
4	72°C	15 Sekunden		Extension
5	88°C	5 Sekunden	zu 2, 27-30×	Fluoreszenz-Messung am Ende des Cyclus
6	68°C → 95°C	10 Minuten		Erstellung der Schmelzkurve
7	40°C	30 Sekunden	20°C/s	Abkühlung

Der erste 10-minütige Programmschritt bei 95°C diente zur Aktivierung der DNA-Polymerase. Die darauf folgenden PCR-Zyklen (insgesamt 27-30 Zyklen) bestanden jeweils aus der Denaturierung, der Anlagerung der Primer an das Template, der Extension der DNA-Stränge und der Fluoreszenzmessung. Am Ende jeder RT-qPCR-Messung wurde zusätzlich noch eine Schmelzkurve erstellt, wobei die Temperatur unter ständiger Messung der Fluoreszenz langsam von 65°C auf 95°C erhöht wurde. Der Rückgang der Fluoreszenz bei steigender Temperatur ermöglicht es, die Dissoziation der gebildeten dsDNA-Produkte zu verfolgen. Das Auftreten eines einzigen PCR-Produkts bei einer Schmelztemperatur, die der für die Größe des Produkts erwarteten entspricht, bewies jeweils die Spezifität der verwendeten Primer.

Zur Quantifizierung der PCR-Produkte wurde für jeden PCR-Durchgang manuell ein Fluoreszenz-Grenzwert festgelegt, bei dem das Amplifizierungssignal gerade aus dem Hintergrund hervortritt. Die Zyklus-Nummer, bei der dies geschieht, wurde jeweils als Zyklus-Grenzwert (C<sub>T</sub>) der jeweiligen Probe bezeichnet. Für die Erstellung einer Standardkurve wurden die Konzentrationen einer Verdünnungsreihe (5 ng/µl – 50 pg/µl, jeweils in Duplikaten) der aus den transfizierten Zellen isolierten DNA logarithmisch gegen die C<sub>T</sub>-Werte aufgetragen. Um nun den Einfluss einer DNA-Basenmodifikation auf die DNA-Menge des pZAJ-Reportervektors in den Wirtszellen zu bestimmen, wurde die DNA-Menge relativ zu der DNA, die aus den mit dem unmodifizierten Vektor transfizierten

Zellen isoliert worden war, bestimmt. Um Ungenauigkeiten, die sich aus ungleicher Transfektionseffizienz oder der DNA-Isolierung ergeben, zu korrigieren wurden die DNA-Werte jeweils in Relation zu den Werten gesetzt, die bei der Quantifizierung der DNA des pDsRed Monomers N1-Vektors derselben Probe erhalten wurden.

#### *2.2.4 Grundlegende Methoden zum Arbeiten mit Proteinen*

##### *2.2.4.1 Herstellung von Zellextrakten zur Verwendung in Cleavage-Assays*

Am Tag vor der Zellextraktion wurden  $2 \times 10^7$  Zellen in eine 175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche ausplattiert und für 16 bis 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank wachsen gelassen. Zur Zellextraktion wurde dann das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit 20 ml eiskaltem PBSCMF, das unmittelbar vor dem Beginn der Extraktion mit 0,5 mM PMSF versetzt worden war, gewaschen. Danach wurden die Zellen in 10 mL eiskaltem PBSCMF (+ 0,5 mM PMSF) abgeschabt und abzentrifugiert (200-250 × g, 5 Minuten, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 500 µl des salzhaltigen Lysepuffers (20 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA pH 8, 250 mM NaCl, 1× Protease Inhibitor) resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfggefäß überführt. Vor dem Sonifizieren der Proben wurde das Gerät gewaschen, indem für 30 Sekunden bis 1 Minute in Wasser, dann in 0,1 % SDS Lösung und dann erneut in Wasser sonifiziert wurde. Zwischen verschiedenen Proben, sowie nach dem Sonifizieren wurden diese Waschschriffe wiederholt. Das Sonifizieren der Suspension erfolgte stets auf Eis in 4 Zyklen (40 Sekunden, Power 20 %, Cycle 40 %), zwischen denen jeweils eine Pause von einer Minute lag. War die Probe nach vier Zyklen immer noch trüb, wurde für zwei weitere Zyklen mit denselben Parametern sonifiziert. Im Anschluss wurden die Proben mit einer Ultrazentrifuge (Ultrazentrifuge Optima LE-80K; Beckman Instruments Inc.) für 50 Minuten bei 50.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde danach aliquotiert und bei -80°C gelagert, wobei ein Aliquot für die Quantifizierung des Proteingehalts verwendet wurde.

Für die Herstellung von Extrakten von TSA-behandelten Zellen wurde das Medium über den Zellen 4 Stunden vor der Extraktion durch Medium mit 440 nM TSA ausgetauscht und der Lysepuffer zusätzlich mit 440 nM TSA versetzt.

##### *2.2.4.2 Herstellung von Proteinextrakten für Western Blot*

Zur Extraktion von Proteinen mittels RIPA-Puffer wurden Zellen auf Zellkulturplatten ausgestreut und bei 37°C im Brutschrank wachsen gelassen. Kurz vor dem Erreichen der Konfluenz (ungefähr 16 – 24 Stunden nach dem Ausstreuen) wurde die Extraktion durchgeführt. Zur Vorbereitung wurde dem RIPA-Puffer der Proteinase-Inhibitor PMSF (100 mM in Isopropanol) bis zu einer Endkonzentration von 1 mM zugesetzt und mit dem Vortex-Schüttler gründlich vermischt. Das Zellkulturmedium über

den Zellen wurde entfernt und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBSCMF gewaschen und das restliche PBSCMF sorgfältig mit einer Pipette entfernt. Anschließend wurde der RIPA-Puffer (ca. 0,2 mL RIPA-Puffer pro 50 cm<sup>2</sup> Oberfläche) auf die Zellen gegeben und durch Schwenken so verteilt, dass die gesamte Oberfläche benetzt war. Die Zellen wurden dann für 15 Minuten unter leichtem Schwenken auf Eis inkubiert und danach mit einem Zellschaber abgelöst. Die so erhaltene Zellsuspension wurde in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und weitere 15 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurde zentrifugiert (10.000 × g, 10 Minuten, 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Ein kleiner Teil des Überstands wurde für die spätere Konzentrationsbestimmung nach Bradford auf Eis aufbewahrt, der Rest des Zellextraktes wurde mit dem cOmplete mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers versetzt, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### 2.2.4.3 Quantifizierung von Proteinen nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte über den Bradford-Assay. Dafür wurde die für diesen Zweck aufbewahrte Proteinprobe 1:100 bzw. 1:1.000 in Wasser verdünnt und jeweils 800 µL dieser Verdünnungen mit 200 µL des Bio-Rad Protein Assay Dye Reagents (Bio-Rad) versetzt. 800 µL Wasser dienten als Blindprobe und damit wurde auf gleiche Weise wie mit den Proteinproben verfahren. Die Proben wurden durch mehrmaliges Invertieren vermischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 595 nm gemessen (Biowave S2100 Spectrophotometer, WPA). Als Kalibriergerade diente eine BSA-Verdünnungsreihe in Wasser (0,78 – 25 ng/µl).

#### 2.2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine nach Größe erfolgte in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gel nach Lämmli (Lämmli, 1970). Glasplatten, Spacer, Kämme und Elektrophoresekammern wurden von C.B.S. Scientific bezogen. Sowohl für OGG1 (39 kDa), als auch für HDAC1 (55 kDa), HDAC2 (55 kDa) und HDAC3 (50 kDa) wurde ein 12 %iges Gel verwendet, wobei jeweils 10 µg Proteinextrakt aufgetragen wurden. Als Marker diente die PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific). Das Pipettierschema für Trenn- und Sammelgel findet sich in Tabelle 2-3. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 6x Ladepuffer versetzt und für 10 Minuten im siedenden Wasserbad inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte in 1× Laufpuffer bei 80 V. Nach 2,5 - 4 Stunden (je nach Zielprotein und erwünschter Qualität der Auftrennung) wurde die Elektrophorese gestoppt, das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt und dieses auf eine Nitro-Cellulose-Membran übertragen.

Tabelle 2-3 Pipettierschema für die Herstellung eines 12 %igen Polyacrylamid-Gels für die SDS-PAGE.

Reagenz	Trenngel 12 %	Sammelgel
H <sub>2</sub> O	3,25 ml	6,85 ml
30 % Acryamid-Mix	4 ml	1,7 ml
1 M Tris-HCl pH 8,8	2,6 ml	---
1 M Tris-HCl pH 6,8	---	1,3 ml
20 % SDS	50 µl	50 µl
10 % Ammoniumpersulfat	100 µl	100 µl
Tetramethylethyldiamin	4 µl	10 µl
Gesamt (ca.)	10 ml	10 ml

#### 2.2.4.5 Übertragung der Proteine auf eine Trägermembran (Blotting)

Für den Transfer der Proteine aus dem Trenngel auf eine Nitro-Cellulose-Membran (GE Healthcare) wurde die Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) verwendet, wobei nach dem Protokoll des Herstellers verfahren wurde. Das verwendete Blotting-Filterpapier (GB003) stammte von GE Healthcare. Für den Transfer wurde der Transferpuffer (ohne SDS) verwendet. Vor Beginn des Transfers wurde das Trenngel kurz in entionisiertem Wasser gewaschen und dann gemeinsam mit der zugeschnittenen Membran, dem Filterpapier und den Schwämmen für 15-30 Minuten bei 4°C in Transferpuffer inkubiert. Der Transfer erfolgte danach bei 110 V für 80 Minuten. Im Anschluss daran wurde die Membran kurz in entionisiertem Wasser gewaschen und mit einer verdünnten Lösung Ponceau-Rot für 5-10 Minuten angefärbt, bis die Proteinbanden auf der Membran deutlich zu sehen waren. Die Membran wurde daraufhin vorsichtig kurz mit Wasser gewaschen, ein Bild aufgenommen und dann erneut in Wasser gewaschen, bis die Rotfärbung nicht mehr sichtbar war. Die so gewaschene Membran stand nun für die Immundetektion zur Verfügung. Um die Effizienz des Transfers zu überprüfen, wurde das Trenngel nach dem Transfer für eine Stunde in Coomassie-Blau angefärbt. Danach wurde es kurz mit entionisiertem Wasser gewaschen und für 16-24 Stunden in Entfärbelösung inkubiert, um die unspezifische Färbung des Gels zu entfernen. Sobald der Hintergrund hinreichend entfärbt war, wurde ein Bild des Gels aufgenommen.

#### 2.2.4.6 Immundetektion (Western Blot)

Zur Absättigung von freien Bindestellen auf der Membran wurde diese vor der Antikörperinkubation eine Stunde in einer Blocking-Lösung (0,5 % w/v BSA in 0,1 % v/v TBS-T) unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei kurze Waschschrte mit 0,1 % v/v TBS-T, sowie 3 längere (15, 10 und 5 Minuten) in 0,5 % v/v TBS-T. Dann wurde die Membran mit einer Verdünnung des primären Antikörpers in 0,1 % m/v BSA in 0,1 % v/v TBS-T versetzt und über Nacht bei 4°C unter Schwenken inkubiert. Das anschließende Waschen der Membran erfolgte nach dem oben beschriebenen Schema und im Anschluss daran wurde die Membran mit der Verdünnung des sekundären Antikörpers versetzt (in 0,1 % v/v TBS-T mit 0,1 % m/v BSA). Die zweite



Antikörperinkubation wurde unter beständigem Schütteln für eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Zum Abschluss wurde die Membran erneut nach obigem Schema gewaschen und letztendlich in 0,1 % v/v TBS-T gelagert. Die jeweiligen Verdünnungen der im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 2-4 angegeben. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Actin verwendet. Die Inkubation mit dessen primären/sekundären Antikörper erfolgte entweder nach der Immundetektion des Zielproteins analog zu dem oben beschriebenen Schema, oder gemeinsam mit den entsprechenden Antikörpern des Zielproteins.

Die Immundetektion erfolgte in einem Dunkelraum. Dazu wurden pro Membran 0,5 ml des Luminol-Reagenz im Verhältnis 1:1 mit dem Oxidations-Reagenz vermischt (Western-Lighting; PerkinElmer) und gleichmäßig auf der Membran verteilt. Nach 3-5-minütiger Inkubation wurde die Membran in Frischhaltefolie verpackt und mit der Proteinseite nach oben in die Entwicklungskassette (GE Healthcare) gespannt. Darüber wurde dann der Photofilm (GE Healthcare) befestigt und in der geschlossenen Kassette für 0,5-12 Minuten exponiert. Im Anschluss wurde der Photofilm entwickelt (Ilford Multigrad Developer, HARMAN Technology Limited), fixiert (Ilford Rapid Fixer, HARMAN Technology Limited), in entionisiertem Wasser gewaschen und trocken gelassen. Der trockene Photofilm wurde zuletzt mit dem Gel Doc™ XR+ Molecular Imager® (Bio-Rad) fotografiert und mit Hilfe der ImageLab™ Software (Bio-Rad) analysiert.

Tabelle 2-4 Verdünnungen der verwendeten Antikörper (AK) zur Immundetektion.

Zielprotein	Verdünnung primärer AK	Verdünnung sekundärer AK
OGG1	1:10.000	1:2.000
HDAC1	1:4.000	1:2.000
HDAC2	1:10.000	1:1.500
HDAC3	1:500	1:1.500
$\beta$ -Actin	1:2.000	1:2.000

### 2.2.5 Klonierung durch Ligation eines doppelsträngigen DNA-Inserts

Um 8-oxoG mittels der DNA-Strangaustauschmethode (Lühnsdorf et al., 2014) (siehe Kapitel 2.2.8) in Vektor-DNA einführen zu können, sind zwei gleichgerichtete Erkennungssequenzen für eine Nicking-Endonuklease im Abstand von 18 Basenpaaren erforderlich. Der Vektor pZAJ, der als Ausgangsvektor für die folgenden Klonierungen verwendet wurde, besitzt zwei Erkennungssequenzen für die Nicking-Endonuklease Nt.Bpu10I innerhalb des für das EGFP-Reportergen kodierenden Bereichs. Zur Untersuchung des Effekts eines einzelnen 8-oxoG (oder anderer Basenmodifikationen) an anderer Position innerhalb des Vektors müssen zuvor weitere Nicking-Sites in den Vektor eingebracht werden. Dafür wurde die Erkennungssequenz der Nicking-Endonuklease Nb.BsrDI ausgewählt, da im

Vektor pZAJ keine weitere Erkennungssequenz dieses Enzyms vorhanden ist und somit keine weiteren Klonierungsschritte erforderlich sind (Diplomarbeit J. Allgayer, 2011).

Zur Untersuchung der Sequenzabhängigkeit des inhibitorischen Effektes von 8-oxoG auf die Genexpression wurden die gleichgerichteten Nb.BsrDI-Erkennungssequenzen in das 5'-UTR des EGFP-Gens eingefügt. Dabei wurde die 12 nt DNA-Sequenz 5'-CAGGGCGGACTG flankiert von den gleichgerichteten Nb.BsrDI-Sites mit Adaptern für die Restriktionsenzyme NheI und AgeI versehen. Die unterschiedliche Positionierung der Adapter ermöglicht den Einbau der Tandem-Schnittstelle in unterschiedlichen Orientierungen. Abhängig von dieser Orientierung wurden die erhaltenen Vektoren mit „W“ („written“, Einschnitte im nicht-transkribierten DNA Strang) und „C“ („complementary“, Einschnitte im transkribierten DNA-Strang) gekennzeichnet. Da 8-oxoG in diesem Vektor im Sequenzkontext 5'-C[8-oxoG]G, der Kontext, in dem zuvor kein Effekt auf die Genexpression beobachtet worden ist, vorliegt, wurden die Vektoren daher als pZAJ-5W-CGG bzw. pZAJ-5C-CGG bezeichnet. Dabei gibt die „5“ innerhalb des Vektornamens die Position der Nb.BsrDI-Schnittstellen (5'-UTR) an.

Als Vektorgrundgerüst für den Vektor zum Einbau von 8-oxoG außerhalb des transkribierten Bereichs wurde ebenfalls der Vektor pZAJ verwendet. Die Sequenz des 18-nt-Oligonukleotids, das im Laufe der Strangaustauschreaktion durch ein synthetisches Oligonukleotid ersetzt wird, entspricht der des 18-nt Nukleotids des Vektors pZAJ-5W/C-AGC (Diplomarbeit J. Allgayer, 2011). Für das Einfügen des synthetischen Oligonukleotid-Inserts in den nicht-transkribierten Bereich wurde an beide Seiten der doppelten Nb.BsrDI-Erkennungssequenz ein Adapter für die Restriktionsendonuklease PciI angefügt. Die Nomenklatur der resultierenden Vektoren erfolgte wie auch zuvor in Abhängigkeit der Orientierung der Nb.BsrDI-Schnittstellen: Der Vektor, bei dem der von Nb.BsrDI eingeschnittene DNA-Strang dem nicht-transkribierten Strang entspricht, wurde mit pZAJ-UPS-W („UPS“ = upstream) bezeichnet. Der Vektor, bei dem der doppelte Einschnitt in dem dem transkribierten Strang entsprechenden DNA-Strang erfolgt, trug entsprechend die Bezeichnung pZAJ-UPS-C. Eine vollständige Liste aller konstruierten Vektoren findet sich in Anhang I-1.

Zum Einfügen der doppelsträngigen Inserte in das 5'-UTR oder den nicht-transkribierten Bereich des pZAJ-Vektors wurde eine Klonierung mittels Restriktionsverdau durchgeführt. Allgemein wurde der Ausgangsvektor hierbei mit Hilfe von Restriktionsendonucleasen entweder einfach oder doppelt verdaut. Der auf diese Art linearisierte Vektor wurde dann dephosphoryliert, um eine unspezifische Religation des Vektors nach der Transformation in *E.coli* zu verhindern. Mittels des illustra GFX PCR and Gel Band Purification Kits (GE Healthcare) wurde die linearisierte Plasmid-DNA aufgereinigt und dann mit einem synthetischen, doppelsträngigen DNA-Insert, das durch seine Adapter komplementäre sticky-ends besaß, ligiert. Nach Transformation in *E.coli* wurden einzelne Klone

gepickt, isoliert und analysiert (Abbildung 2-1). Die erhaltenen Plasmid-Klone wurden mittels BsrDI-Verdau auf Anwesenheit der Nb.BsrDI-Schnittstellen und durch Transfektion in HeLa-Zellen auf ein funktionelles EGFP-Gen untersucht. Klone, die in beiden Versuchen positiv getestet wurden, wurden zusätzlich durch eine Sequenzierung verifiziert und jeweils ein Klon für die folgenden Experimente verwendet.

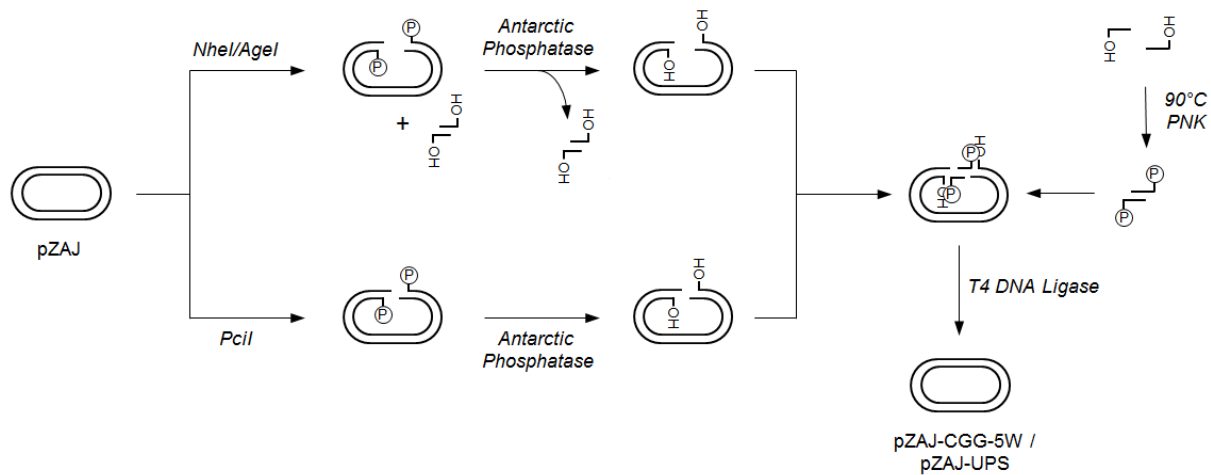


Abbildung 2-1 Einbau von Oligonukleotid-Inserts in das 5'-UTR oder die untranskribierte Region (UPS) des Vektors pZAJ. Nach doppeltem Verdau mit den Endonukleasen NheI und AgeI (5'-UTR) oder einfachem Verdau durch die Endonuklease PciI (UPS) des Vektors pZAJ und der darauf folgenden Dephosphorylierung durch die Antartic Phosphatase wurden die zuvor zusammengelagerten und mittels Polynukleotidkinase (PNK) phosphorylierten Oligonukleotid-Inserts in die Vektor-DNA ligiert (T4 DNA Ligase).

### 2.2.5.1 Doppelverdau des pZAJ-Vektors mit den Restriktionsendonukleasen NheI und AgeI

Um die für die Insertion der Nb.BsrDI-Erkennungssequenzen in die 5' untranslatierte Region (5'-UTR) des EGFP-Gens erforderliche linearisierte Vektor-DNA zu erhalten, wurde der Vektor pZAJ mit den Restriktionsendonukleasen NheI-HF und AgeI-HF (New England Biolabs) verdaut. Dazu wurden Tabelle 2-5 folgend zwei Reaktionsmischungen (A und B) mit einem Volumen von 50 µl angesetzt, die jeweils Vektor-DNA und eines der Restriktionsenzyme enthielten. Aus jeder der beiden Mischungen wurden nun jeweils 40 µL entnommen und in einem neuen Reaktionsgefäß vermischt. Zu den Resten der beiden Ansätze A und B, die als Kontrolle der Einzelreaktionen dienen, wurden nun weitere 300 ng Vektor-DNA in insgesamt 10 µl 1× NEBuffer 4 (mit 1× BSA versetzt) zugesetzt, um die Reaktionsbedingungen denen des Doppelverdaus anzugleichen. Alle drei Proben (Doppelverdau und zwei Einzelverdaus) wurden nun nach dem in Tabelle 2-6 angegebenen Programm in einem Thermocycler inkubiert.

Tabelle 2-5 Reaktionsansätze für den präparativen Doppelverdau mit NheI-HF und AgeI-HF.

Reagenz	Mix A	Mix B
Plasmid-DNA	1,5 µg	1,5 µg
NEBuffer 4 (10×)	1×	1×
BSA (10×)	1×	1×
NheI-HF	40 U	---
AgeI-HF	---	40 U
H <sub>2</sub> O bis zum Gesamtvolumen von 80 µl		

Tabelle 2-6 Programm für den präparativen Doppelverdau mit NheI-HF und AgeI-HF.

Schritt	Temperatur	Zeit
1	4°C	∞
2	37°C	2 Stunden
3	80°C	20 Minuten
4	4°C	∞

Im Anschluss an die Inkubation wurde die linearisierte Plasmid-DNA dephosphoryliert (siehe Kapitel 2.2.5.3), mit dem Illustra GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) aufgereinigt (siehe Kapitel 2.2.3.1) und die Vollständigkeit des Verdau mittels eines 0,8 %igen Agarosegels überprüft (siehe Kapitel 2.2.3.5). Eine Isolierung des linearen DNA-Fragments aus dem Agarosegel war nicht nötig, da das durch den Doppelverdau entfernte DNA-Fragment eine Länge von 9 Basenpaaren besaß und schon bei der Aufarbeitung mittels Silica-Säule aus der Reaktion entfernt wurde.

#### 2.2.5.2 Linearisierung des pZAJ-Vektors mit der Restriktionsendonuklease PciI

Zum Einfügen der gleichgerichteten Nb.BsrDI-Erkennungssequenzen in den untranskribierten Bereich des pZAJ-Vektors wurde dieser durch den Verdau mit der Restriktionsendonuklease PciI (New England Biolabs) linearisiert. Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 80 µl, wobei die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes Tabelle 2-7 zu entnehmen ist. Die Inkubation der Reaktion erfolgte nach dem in Tabelle 2-8 beschriebenen Programm.

Tabelle 2-7 Reaktionsansatz für den präparativen Restriktionsverdau mit PciI.

Reagenz	Endkonz./-menge
Plasmid-DNA	2,7 µg
NEBuffer 3 (10×)	1×
BSA (10×)	1×
PciI	45 U
H <sub>2</sub> O bis zum Gesamtvolumen von 90µl	

Tabelle 2-8 Programm für den präparativen Restriktionsverdau mit PciI.

Schritt	Temperatur	Zeit
1	4°C	∞
2	37°C	2 Stunden
3	80°C	20 Minuten
4	4°C	∞

Direkt nach der Inkubation wurden 10 µL des Reaktionsansatzes in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für spätere Verwendung in der Ligationskontrolle aufbewahrt. Danach erfolgte die Dephosphorylierung mittels Antarctic Phosphatase (siehe Kapitel 2.2.5.3), die Aufreinigung mit dem Illustra GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) (siehe Kapitel 2.2.3.1) und die Kontrolle des Verdau mit Hilfe eines 0,8 %igen Agarosegels (siehe Kapitel 2.2.3.5).

### 2.2.5.3 Dephosphorylierung der linearisierten DNA mit Antarctic Phosphatase

Die Dephosphorylierung der linearisierten Vektoren erfolgte direkt im Anschluss an die Restriktionsreaktion. Den 80 µl Reaktionsvolumen wurde dann 9 µl des 10× Antarctic Phosphatase Puffers (Endkonzentration in der Reaktionsmischung 1×) und 1 µL Antarctic Phosphatase (New England Biolabs) zugesetzt. Es wurde gründlich mit einer Pipette gemischt und die Mischung für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms folgte danach noch ein Inkubationsschritt für 5 Minuten bei 65°C.

### 2.2.5.4 Generierung von Inserts für die Klonierung durch Annealing und Phosphorylierung synthetischer Oligonukleotide

Um das für die Ligation mit der linearisierten Vektor-DNA benötigte doppelsträngige Oligonukleotid-Insert zu erhalten, mussten die jeweiligen einzelsträngigen Oligonukleotide (Eurofins Operon) mit T4 Polynukleotidkinase (Thermo Scientific) an ihrer 5'-Seite phosphoryliert und dann zu einem doppelsträngigen DNA-Fragment zusammengelagert werden. Beides erfolgte hierbei in ein und derselben Reaktion. Die zwei komplementären, synthetischen Oligonukleotide (jeweils forward (F) und reverse (R)) wurden nach dem in Tabelle 2-9 vorgegebenen Schema in 75 µl Reaktionsvolumen mit den restlichen Komponenten vermischt. Die Inkubation erfolgte in einem Thermocycler nach dem Programm in Tabelle 2-10.

Tabelle 2-9 Reaktionsansatz zur Phosphorylierung und Zusammenlagerung der Oligonukleotid-Inserts.

Reagenz	Endkonz./-menge
Oligo F (200 µM)	7,9 µM
Oligo R (200 µM)	7,9 µM
T4 DNA Ligase Puffer (10×)	1×
T4 Polynukleotidkinase (PNK, 10 U/ µl)	50 U
H <sub>2</sub> O bis zum Gesamtvolumen von 75µl	

Tabelle 2-10 Programm zur Phosphorylierung und Zusammenlagerung der Oligonukleotid-Inserts.

Schritt	Temperatur	Zeit	Aktion
1	4°C	∞	
2	37°C	30 Minuten	Phosphorylierung
3	95°C	10 Minuten	
4	50°C	---	Rate: 0,02°C/s
5	50°C	1 Minute	
6	4°C	∞	

#### 2.2.5.5 Ligation des linearisierten Vektors mit dem phosphorylierten Insert

Für die Ligation des 5'-phosphorylierten Inserts mit der dephosphorylierten, linearisierten Vektor-DNA wurde T4 DNA Ligase (New England Biolabs) verwendet. Die Zusammensetzung der Ligrationsreaktionen und der Kontrollreaktionen ist Tabelle 2-11 zu entnehmen. Pro Insert wurden zwei Reaktionsansätze hergestellt, wobei das molare Verhältnis zwischen Vektor und Insert in einem 1:1, im anderen 1:3 betrug. Als Kontrolle für unspezifische Ligation diente ein Ansatz, der nur dephosphorylierte Vektor-DNA aber kein Insert enthielt. Zur Kontrolle der Aktivität der verwendeten DNA Ligase dienten zwei Reaktionen, von denen eine mit und eine ohne T4 DNA Ligase inkubiert wurde. Anstatt der dephosphorylierten Vektor-DNA wurde für diese Kontrollproben phosphorylierte Vektor-DNA verwendet, die im Falle des Doppelverdaus aus einer der Einzelreaktionen und im Falle des Einzelverdaus aus dem vor der Dephosphorylierung entnommenen Aliquot entstammte. Das für die Ligation verwendete Programm ist in Tabelle 2-12 angegeben.

Tabelle 2-11 Zusammensetzung der Ligrationsreaktion mit linearisierter Vektor-DNA und dem Oligonukleotid-Insert.

Reagenz	Ansatz				
	No Insert	Ins:V 1:1	Ins:V 1:3	- Ligase	+ Ligase
Dephos. Vektor-DNA (ca 20 ng/µl)	100 ng	100 ng	---	---	---
Phosph. Vektor	---	---	---	100 ng	100 ng
Insert (1,5 ng/µl)	---	0,75 ng	2,25 ng	---	---
T4 DNA Ligase Puffer (10x)	1x	1x	1x	1x	1x
T4 DNA Ligase (4 U/ µl)	8 U	8 U	8 U	---	8 U
H <sub>2</sub> O bis zum Gesamtvolumen von 20 µl					

Tabelle 2-12 Programm zur Ligation der linearisierten Vektor-DNA mit dem Oligonukleotid-Insert.

Schritt	Temperatur	Zeit
1	4°C	∞
2	22°C	60 Minuten
3	60°C	20 Minuten
4°C	4°C	∞

Jeweils 5 µL der einzelnen Reaktionsansätze wurden im Anschluss daran in *E.coli* transformiert (siehe Kapitel 2.2.2.2) und jeweils 2-6 Klone gepickt, aus denen dann wiederum Plasmid-DNA isoliert und analysiert wurde.

#### 2.2.5.6 Nachweis des Einbaus der BsrDI-Schnittstellen durch Restriktionsverdau mit BsrDI

Als Nachweis, dass während der jeweiligen Klonierungsprozedur tatsächlich Nb.BsrDI-Erkennungssequenzen in die Vektor-DNA integriert wurden, wurden die erhaltenen Klone einem Verdau mit der Restriktionsendonuklease BsrDI (New England Biolabs) unterzogen. Pro Plasmid-Klon wurde jeweils dem Schema aus Tabelle 2-13 folgend eine Probe mit und eine Probe ohne BsrDI angesetzt und nach dem in Tabelle 2-14 niedergeschriebenen Programm inkubiert. Zur Analyse wurden die Proben im Anschluss auf ein 0,8 %iges Agarosegel aufgetragen und bei 80 V für 45 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt.

Tabelle 2-13 Reaktionsansätze für den analytischen Restriktionsverdau mit BsrDI.

Reagenz	Ansatz -	Ansatz +
Plasmid-DNA	200 ng	200 ng
NEBuffer 2.1 (10×)	1×	1×
BsrDI	---	2,5 U
H <sub>2</sub> O bis zum Gesamtvolumen von 10 µl		

Tabelle 2-14 Programm für den analytischen Restriktionsverdau mit BsrDI.

Schritt	Temperatur	Zeit
1	4°C	∞
2	60°C	60 Minuten
3	80°C	20 Minuten
4	4°C	∞

#### 2.2.5.7 Sequenzierung der Plasmid-Klone

Die Plasmid-Klone, die nach der Isolation mit dem ZR Plasmid Miniprep™-Classic Kit (Zymo Research) in Tris-HCl-Puffer (10 mM, pH 8) vorlagen und im vorangegangenen BsrDI-Verdau positiv auf die Anwesenheit einer BsrDI-Schnittstelle getestet worden waren, wurden abschließend zum Ausschluss von Punktmutationen während der Klonierung sequenziert. Jeweils 400 – 700 ng Plasmid-DNA in 5 µl Wasser wurden mit 2 µl einer 5 mM Lösung des entsprechenden Sequenzierungsprimers versetzt und die Proben dann an die Firma GenterPrice (Mainz) gesandt. Die Auswertung der auf diese Weise erhaltenen Sequenzdaten erfolgte mit Hilfe der Staden Package Trev 1.9 Software (MRC Laboratory of Molecular Biology).

### 2.2.6 Klonierung durch PCR mit überhängenden Primern

Eine Klonierung mittels PCR stellt eine ideale Methode dar, um einerseits kurze Inserts (20-30 Nukleotide) in Positionen innerhalb von Vektor-DNA, die durch Restriktionsverdau nicht zugänglich sind, einzuführen und andererseits um größere DNA-Fragmente aus dem Vektor zu entfernen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Technik dazu verwendet, zwei gleichgerichtete Nb.BsrDI-Schnittstellen in den CMV-IE-Promotor des pZAJ/pJAZ-Vektors einzufügen und dabei mitunter auch gleichzeitig Teile des Promotors zu deletieren (Abbildung 2-2). Innerhalb der Promotorsequenz des CMV-IE-Promotors finden sich 7 sogenannte cAMP response Elements (CRE), die Bindestellen für den aktivierenden Transkriptionsfaktor CREB (cAMP-responsive element binding Protein) darstellen, wobei es sich bei diesem Transkriptionsfaktor um die treibende Kraft der vom CMV-IE-Promotor angetriebenen Genexpression in HeLa-Zellen handelt (Schlabach et al., 2010). Von diesen 7 Bindungssequenzen entsprechen 4 exakt der Konsensus-Sequenz (5'-TCACGTGA) für eine optimale CREB-Bindung, 3 weitere sind Variationen der Konsensussequenz. Um ausgehend von diesem Promotor eine Reihe von Promotoren unterschiedlicher Länge zu erhalten, wurden ausgehend von der in der Mitte des Promotors liegenden CREB-Bindestelle verschiedene Teile des Promotors, die jeweils mindestens ein CRE enthielten, aus dem pZAJ-Plasmid entfernt. Die hierfür eingesetzten Primer bestanden aus zwei 20 – 25 Nukleotid großen Teilen: Einer zur Vektor-DNA komplementären DNA-Sequenz und einem 5'-Überhang. Erstere fungiert als gewöhnlicher PCR-Primer, wobei die Primer-Paare das Template nicht wie bei einer normalen PCR aufeinander zu, sondern voneinander weg amplifizieren. Auf diese Weise enthält das PCR-Produkt die gesamte Vektorsequenz mit Ausnahme der von den Primern eingeschlossenen DNA-Sequenz und ermöglicht so die gewünschte Deletion. Der 5'-Überhang, der jeweils komplementär zum Überhang des anderen Primers des Primerpaars ist, dient auf der einen Seite zum Einfügen der gleichgerichteten BsrDI-Schnittstellen und ermöglicht durch die Komplementarität mit dem Überhang des Gegenprimers eine Überlappung der Enden der PCR-Produkte. Er wurde jeweils so konzipiert, dass einerseits das zentrale CRE des Promotors und 1-3 benachbarte Nukleotide erhalten blieben, aber andererseits dieses CRE nun auf beiden Seiten von einer gleichgerichteten Schnittstelle für die Nicking-Endonuklease Nb.BsrDI flankiert wurde, um ein späteres Einfügen synthetischer Läsionen in dieses regulatorische Element zu ermöglichen.

Die PCR-Produkte wurden nach der Reaktion mit der DAM-methylierungsspezifischen Endonuklease DpnI (Thermo Scientific) inkubiert, um das bakteriell methylierte Template aus der Reaktionsmischung zu entfernen. Somit liegt für alle folgenden Schritte der Prozedur nur das unmethylierte PCR-Produkt vor. Nach anschließender Aufreinigung mit dem Illustra GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) wurde die DNA in *E.coli* transformiert, in denen die PCR-Produkte an ihrer Überlappung zu geschlossenen, zirkulären Vektoren ligiert werden (Abbildung 2-2).



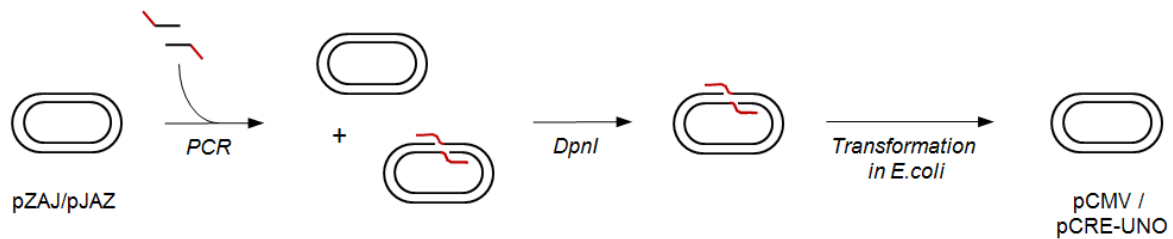


Abbildung 2-2 Einfügen eines BsrDI-Schnittstellen-Inserts mittels PCR mit überhängenden Primern. Nach der PCR wurde das aus DAM-methylierenden Bakterien stammende Template durch Verdau mit der methylierungsspezifischen Endonuklease DpnI aus der Reaktion entfernt und die PCR-Produkte durch Transformation in *E.coli* zu geschlossener Vektor-DNA rekombiniert.

Durch die Positionierung der Primer für die Deletionen ergab sich eine Aufteilung des CMV-IE-Promotors in grob vier Teile, auf deren Basis die Nomenklatur der neu gewonnenen Vektoren erfolgte, wobei ein vorhandener Promotor-Abschnitt mit „1“, ein deletierter Abschnitt mit „0“ gekennzeichnet wurde. Je nach verwendetem Ausgangsvektor wurde der Vektor zusätzlich mit „ZA“ (pZAJ) oder „AZ“ (pJAZ) gekennzeichnet, die Orientierung der Nb.BsrDI-Kassette wie schon mehrfach beschrieben mit „W“ (Einschnitt im NTS) oder „C“ (Einschnitt im TS).

Aus allen generierten Promotor-Varianten (vollständige Liste aller konstruierten Vektoren in Anhang I-1) wurden 4 Vektoren zur Verwendung in den folgenden Experimenten ausgewählt: pCMV-1111-ZA-W (vollständiger CMV-IE-Promoter mit Nb.BsrDI-Schnittstellen), pCMV-1011-ZA-W (Deletion von ungefähr 100 bp 5' des zentralen CRE), pCMV-0011-ZA-W (Deletion der 5' Seite des zentralen CRE) und pCMV-0000-ZA-W, der im Folgenden als pCRE-UNO-W bezeichnet wird (Vollständige Deletion des Promotors mit Ausnahme des zentralen CRE). Zur Kontrolle wurde auch ein CRE-loser Vektor – im Folgenden als pCRE-NULL bezeichnet – konstruiert, dessen Promotor-Struktur der von pCRE-UNO entspricht, aber dessen einzelnes CRE vollständig mutiert wurde (zu 5'-ACTGACTG).

#### 2.2.6.1 Klonierungs-PCR

Für die Klonierungs-PCR wurde die Pfu TURBO DNA-Polymerase (Thermo Scientific) verwendet, die eine intrinsische Proof-Reading-Aktivität aufweist und somit in der Lage ist PCR-Produkte von mehreren 1.000 Nukleotiden Länge zu generieren. Damit eignet sie sich hervorragend zur Amplifizierung des pZAJ/pJAZ-Vektors (Produktgröße je nach Primerpaar zwischen 4.000 und 4.800 bp). Die präparative PCR wurde in 10 Aliquoten mit jeweils 25 µl Reaktionsvolumen durchgeführt. Der Mastermix wurde nach dem in Tabelle 2-15 angegebenen Schema angesetzt, wobei das Template (1 ng Vektor-DNA) jeweils in den Deckel der Reaktionsgefäße gegeben und beides erst kurz vor der Reaktion mittels Zentrifugation vereinigt wurde. Als Kontrolle auf unspezifische Primeraktivität wurde für eine Probe Wasser anstelle des DNA-Templates verwendet. Inkubiert wurden die Proben anhand des in Tabelle 2-16 dargestellten Programms.

Tabelle 2-15 Zusammensetzung des Mastermixes für die präparative PCR-Reaktion.

Reagenz	Endkonz./-menge
Pfu DNA Polymerase reaction buffer (10×) (- MgCl <sub>2</sub> )	1×
dNTP Mix (jeweils 10 mM)	0,2 mM
Forward Primer (2 μM)	0,4 μM
Reverse Primer (2 μM)	0,4 μM
PfuTurbo DNA Polymerase (2,5 U/ μl)	0,05 U
H <sub>2</sub> O bis zum Gesamtvolumen von 23 μl	
DNA-Template (0,5 ng/μl)	1 ng

Tabelle 2-16 Programm für die präparative PCR-Reaktion.

Schritt	Temperatur	Zeit	Aktion	Funktion
1	4°C	∞		
2	95°C	2 Minuten		Initielle Denaturierung
3	95°C	30 Sekunden		Denaturierung
4	60°C	1 Minute		Anlagerung der PCR-Primer
5	68°C	10 Minuten	zu 3, 15x	Extension
6	68°C	10 Minuten		Finale Extension
7	4°C	∞		

Nach Abschluss der Reaktion wurden die Template-DNA enthaltenden Aliquote vereinigt, mit dem Illustr GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) aufgereinigt und in 20 μl TE-Puffer eluiert.

#### 2.2.6.2 Verdau der Template-DNA mit DpnI

Für den Verdau mit der Restriktionsendonuklease DpnI, die ausschließlich DAM-methylierte DNA schneidet und somit in der Lage ist das aus DAM-methylierenden Bakterien isolierte DNA-Template der PCR-Reaktion selektiv zu zerstören, wurden 17,5 μl der aufgereinigten, konzentrierten Reaktionsmischung mit 10× Puffer Tango bis zu einer 1-fachen Endkonzentration und 5 U DpnI (Thermo Scientific) versetzt. Es wurde sorgfältig mit einer Pipette gemischt und dann nach dem in Tabelle 2-17 angegebenen Programm inkubiert. Nach der Reaktion wurden 5 μL des Reaktionsansatzes in *E.coli* transformiert (siehe Kapitel 2.2.2.2), die Klone mittels BsrDI-Verdau auf die Anwesenheit der BsrDI-Schnittstelle überprüft (siehe Kapitel 2.2.5.6) und ausgewählte Klone sequenziert (siehe Kapitel 2.2.5.7).

Tabelle 2-17 Programm für den Verdau des präparativen PCR-Ansatzes mit DpnI.

Schritt	Temperatur	Zeit
1	4°C	∞
2	37°C	60 Minuten
3	80°C	20 Minuten
4	4°C	∞

### 2.2.7 Stabiler Knockdown von OGG1 mittels shRNA-Expressionsvektoren

Um eine permanente Stilllegung des OGG1-Gens in HeLa-Zellen zu erreichen wurde der shRNA-Vektor pENTR/pSuper+ verwendet (Campeau et al., 2009). Dieser Vektor basiert auf dem pSuper-Vektor, der unter Kontrolle des Polymerase-III H1-RNA Genpromotors die Expression eines siRNA-ähnlichen Transkripts fördert und bereits erfolgreich verwendet wurde, um eine Vielzahl von Genen spezifisch und effizient herunter zu regulieren (Brummelkamp et al., 2002). Für den Knockdown des OGG1-Gens wurden zwei verschiedene spezifische shRNA-Sequenzen verwendet: Konstrukt 1, das dem Algorithmus der OligoEngine 2.0 Software (OligoEngine) entstammt, und Konstrukt 2, dessen 19 nt Zielsequenz der Mission®-shRNA-Datenbank (Sigma-Aldrich-GmbH) entnommen wurde und mit der Sequenz der Haarnadelschleife von Konstrukt 1 kombiniert wurde. Die synthetischen 64-Nukleotid-Inserts, die die shRNA-Sequenz, die Haarnadelschleife und Restriktionsenzym-spezifische Überhänge enthielten, wurden phosphoryliert und aus einzelsträngigen Oligonukleotiden (Eurofins MWG Operon) zusammengelagert (Abbildung 2-3). Die Ligation erfolgte mit dem durch Doppelverdau mit den Restriktionsendonukleasen BglIII und HindIII linearisierten pENTR/pSuper-Vektor nach dessen Dephosphorylierung. Die Ligationsansätze wurden in *E.coli* transformiert, Plasmid-Klone gepickt und isoliert und diese dann mittels PCR und Sequenzierung analysiert.

Jeweils ein Klon der zwei Konstrukte wurde dann gemeinsam mit dem Vektor pCDNA3, der für eine Geniticin-Resistenz kodiert, in HeLa-Zellen transfiziert und die nach mehreren Wochen Selektionsdruck erhaltenen Klone mittels Western Blot auf ihren OGG1-Protein-Gehalt untersucht.

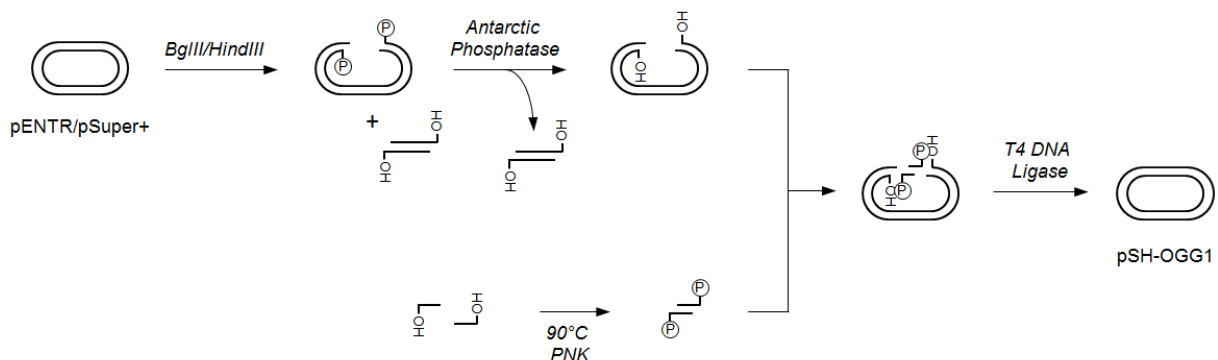


Abbildung 2-3 Einbau eines shRNA-Inserts in den Vektors pENTR/pSuper+. Nach doppeltem Verdau des Vektors mit den Restriktionsendonukleasen BglIII und HindIII und der darauf folgenden Dephosphorylierung durch die Antartic Phosphatase, wurden die zuvor zusammengelagerten und mittels Polynukleotidkinase (PNK) phosphorylierten shRNA-Inserts in die Vektor-DNA ligiert (T4 DNA Ligase).

#### 2.2.7.1 Doppelverdau des shRNA-Expressionsvektors mit HindIII und BglIII

Die für den Fortgang der Klonierung erforderliche Linearisierung des Vektors pENTR/pSuper+ erfolgte über einen Doppelverdau mit den Restriktionsendonukleasen HindIII (GE Healthcare) und BglIII (New England Biolabs). Analog zu dem bereits beschriebenen Doppelverdau mit NheI-HF und AgeI-HF

(siehe Kapitel 2.2.5.1) wurden zuerst zwei 50 µl Ansätze für einen Einzelverdau angesetzt (Tabelle 2-18), von denen dann jeweils 40 µl in einem Doppelansatz vereinigt wurden. Zu den verbliebenen 10 µl der Einzelansätze wurden dann zum Angleichen der Reaktionsbedingungen 300 ng Vektor-DNA in 10 µl 1× Puffer Tango zugegeben. Die Inkubation der Proben erfolgte nach dem in Tabelle 2-19 beschriebenen Programm.

Tabelle 2-18 Reaktionsansätze für den präparativen Doppelverdau des pENTR/pSuper+-Vektors mit BglIII und HindIII.

Reagenz	Ansatz Mix A	Ansatz Mix B
pENTR/pSuper+	1,5 µg	1,5 µg
Puffer Tango (10×)	1×	1×
HindIII (15 U/µl)	40 U	---
BglIII (10 U/µl)	---	120 U
H <sub>2</sub> O bis zum Gesamtvolumen von 80 µl		

Tabelle 2-19 Programm für den präparativen Doppelverdau des pENTR/pSuper+-Vektors mit BglIII und HindIII.

Schritt	Temperatur	Zeit
1	4°C	∞
2	37°C	2 Stunden
3	65°C	20 Minuten
4	4°C	∞

Direkt im Anschluss an den Doppelverdau wurde der lineare Vektor mit Antarctic Phosphatase dephosphoryliert (siehe Kapitel 2.2.5.3) und die Vollständigkeit der Reaktion in einem 0,8 %igen Agarosegel verifiziert (siehe Kapitel 2.2.3.5). Da BglIII im Gegensatz zu HindIII nicht Hitze-inaktivierbar ist, wurde ein Ladepuffer mit 1 % w/v SDS verwendet, um eine fehlerfreie Elektrophorese zu gewährleisten.

Das bei dem Doppelverdau entstandene und nicht für die Klonierung benötigte zweite DNA-Fragment besaß eine Länge von 757 Nukleotiden und konnte somit nicht durch einfache Aufreinigung auf einer Silica-Säule aus der Reaktionsmischung entfernt werden. Stattdessen wurde es unter Zuhilfenahme des Illustra GFX PCR and Gel Band Purification Kits (GE Healthcare) aus einem 0,8 %igen Agarosegel isoliert.

Die Phosphorylierung und das Zusammenlagern der Inserts erfolgten nach dem in Kapitel 2.2.5.4 beschriebenen Protokoll, die Ligation des Inserts in die linearisierte Vektor-DNA nach dem Protokoll aus Kapitel 2.2.5.5.

## 2.2.7.2 PCR-Screening der klonierten shRNA-Expressionsvektoren

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA für das PCR-Screening wurden 300 µl der Übernachtskultur, die im Anschluss für die Minipräparation der Plasmid-DNA verwendet wurde, zentrifugiert (1.800 × g, 5 Minuten, 4°C) und das dabei erhaltene Zellpellet in 200 µl Wasser resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch eine 10-minütige Inkubation im kochenden Wasserbad. Bis zur Durchführung der PCR-Reaktion wurden die Proben bei -20°C gelagert.

Für das Screening wurde die Tfi DNA Polymerase (Life Technologies) verwendet. Der Reaktionsansatz wurde nach dem in Tabelle 2-20 angegebenen Schema, jeweils hochgerechnet auf die benötigte Anzahl an Proben, vorbereitet, auf mehrere Reaktionsgefäße verteilt und 2 µL des Bakterienlysats durch kurze Zentrifugation zugeführt. Die Inkubation folgte dem in Tabelle 2-21 dargestellten Programm.

Tabelle 2-20 Reaktionsansatz für das PCR-Screening der aus transformierten Bakterien isolierten Vektor-DNA.

Reagenz	Endkonz./-menge pro Probe
Tfi PCR Reaktionpuffer (5×)	1×
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,5 mM
dNTP Mix (jeweils 10mM)	0,2 mM
Forward Primer (2 µM)	0,2 µM
Reverse Primer (2 µM)	0,2 µM
Tfi DNA Polymerase (5 U/µl)	0,05 U
H <sub>2</sub> O bis zum Gesamtvolumen von 23 µl	
Bakterienlysats	2 µl

Tabelle 2-21 Programm für das PCR-Screening der aus transformierten Bakterien isolierten Vektor-DNA.

Schritt	Temperatur	Zeit	Aktion	Funktion
1	4°C	∞		
2	94°C	2 Minuten		Initielle Denaturierung
3	94°C	30 Sekunden		Denaturierung
4	50°C	1 Minute		Anlagerung der PCR-Primer
5	70°C	60 Sekunden	zu 3, 15x	Extension
6	70°C	10 Minuten		Finale Extension
7	4°C	∞		

Das 757 bp große DNA-Fragment, das während der Klonierung aus dem pENTR/pSuper-Vektor entfernt wurde, wies einen überdurchschnittlich hohen GC-Gehalt auf, was die Bildung von Sekundärstrukturen in der DNA stark begünstigt. Da diese Strukturen die Denaturierung der Plasmid-DNA behindern, war es bei einem unmodifizierten pENTR/pSuper+ Vektor nicht möglich ein PCR-Produkt zu erhalten. Aus diesem Grund wurde das Plasmid pDsRed als Positiv-Kontrolle für die PCR-

Reaktion verwendet. Die Plasmid-Klone, die ein PCR-Produkt in der richtigen Größe aufwiesen, wurden im Anschluss zusätzlich noch sequenziert (siehe Kapitel 2.2.5.7).

### 2.2.7.3 Generierung einer stabil transfizierten monoklonalen HeLa-Zelllinie

16 Stunden vor der Transfektion wurden 600.000 HeLa-Zellen in eine 6 Well-Platte ausgestreut. Die Transfektion erfolgte nach dem in Kapitel 2.2.1.4 beschriebenen Protokoll, wobei der shRNA-Expressions-Vektor gemeinsam mit dem Vektor pcDNA3, der ein Genizitin-Resistenzgen trägt, transfiziert wurde (pSH-OGG1 : pcDNA Verhältnis 1:10). 4 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium abgenommen und durch frisches DMEM-Medium ersetzt. 24 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium abgenommen, mit PBSCMF gewaschen und die Zellen mit 0,5 mL Trypsin abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden dann in Genizitin-haltigem (1.100 µg/ml) DMEM-Medium verdünnt (1:20 und 1:100) und auf 143 cm<sup>2</sup>-Zellkulturplatten ausgestreut. Die Zellen wurden für 10-14 Tage unter Selektionsmedium weiterkultiviert, bis einzelne Kolonien zu erkennen waren, wobei das Medium alle 2 Tage durch frisches ersetzt wurde.

Zum Picken einzelner Kolonien wurde das Medium abgenommen, zweimal mit PBSCMF gewaschen und die Reste des PBSCMF gründlich mit einer Pipette entfernt. Über die zu pickenden Kolonien wurde jeweils ein Eppendorf-Reaktionsgefäß, dessen Deckel und Boden vorher entfernt worden waren und dessen Oberfläche mit Glycerol benetzt war, gestülpt und vorsichtig festgedrückt. In den so entstandenen Ring wurden nun 50 µL Trypsin gegeben und die Platte bis zum Ablösen der Zellen im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden dann in 150 µL DMEM-Medium (mit G418) aufgenommen und jeweils in ein Well einer 24-Well-Platte überführt. Die Klone wurden weiterhin unter Selektion kultiviert und schrittweise erst in eine 25 cm<sup>2</sup>- und dann in eine 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche übertragen. Sobald die Zellen in dieser Flasche das Stadium der Konfluenz erreicht hatten, wurde ein Teil der Zellen in 2-3 Aliquoten eingefroren (siehe Kapitel 2.2.1.3) und der Rest auf eine 10 cm-Zellkulturplatte ausgestreut. Sobald die Zellen wieder konfluent waren, wurden mittels RIPA-Puffer Extrakte angefertigt und diese dann mit Western Blot analysiert (siehe Kapitel 2.2.4.2 bis 2.2.4.6).

### 2.2.8 Insertion von synthetischen Oligonukleotiden (mit oder ohne DNA-Basenmodifikation) in Plasmid-DNA

Das Einfügen einer spezifischen DNA-Basenmodifikation an eine definierte Position innerhalb des Zielvektors erfolgte nach einer eigens dafür entwickelten Methode, welche auf der Nutzung von Nicking-Endonukleasen und dem folgenden Einbau eines synthetischen Oligonukleotids beruht (Kitsera et al., 2011), (Lühnsdorf et al., 2012). Diese Enzyme schneiden durch die Inaktivierung eines der katalytischen Zentren im Gegensatz zu ihren korrespondierenden Restriktionsenzymen spezifisch

nur einen DNA-Strang. Bei den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Nicking-Endonukleasen handelt es sich um *Nt.Bpu10I* (Thermo Scientific) und *Nb.BsrDI* (New England Biolabs). Der Expressions-Vektor pZAJ (pEGFP-mODC-ZAJ), der allen anderen verwendeten Expressionsvektoren zugrunde liegt, besitzt zwei gleichgerichtete Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease *Bpu10I* im Abstand von 18 Basenpaaren innerhalb des EGFP-Gens, die verschiedenen Varianten von pZAJ jeweils an definierter Stelle zusätzlich zwei gleichgerichtete Schnittstellen für die Restriktionsendonuklease *BsrDI*, ebenfalls mit einem Abstand von 18 Basenpaaren. *Nt.Bpu10I* wurde immer dann verwendet, wenn die DNA-Basenmodifikation im nicht-transkribierten DNA-Strang innerhalb des EGFP-Gens lokalisiert sein sollte, *Nb.BsrDI* zur Insertion von Modifikationen an allen anderen Positionen.

Durch die Umsetzung der Vektor-DNA mit der entsprechenden Nicking-Endonuklease werden zwei DNA-Einzelstrangbrüche in demselben DNA-Strang und einem Abstand von 18 Nukleotiden innerhalb des Vektors generiert (Abbildung 2-4). Das dadurch entstandene native 18-nt DNA-Fragment kann nun aus der Vektor-DNA herausgeschmolzen werden. Dies geschieht in Anwesenheit eines Überschusses des synthetischen Oligonukleotids, das die gewünschte DNA-Basenmodifikation enthält, sodass beim Abkühlen der Reaktion das synthetische Oligonukleotid das native verdrängt und sich stattdessen in die 18 nt-Lücke einlagert. Wenn das synthetische Oligonukleotid zuvor an dessen 5'-Ende phosphoryliert worden ist, können die Einzelstrangbrüche im Expressionsvektor mit Hilfe einer DNA-Ligase geschlossen und die kovalent geschlossenen modifizierten Plasmide isoliert werden.

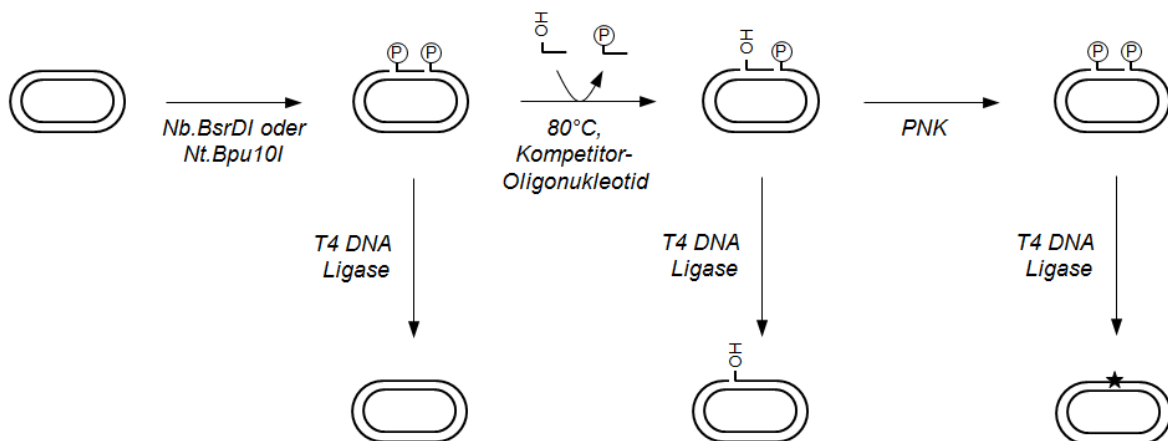


Abbildung 2-4 Einbau eines synthetischen Oligonukleotids in doppelt eingeschnittene Vektor-DNA zur Konstruktion von Reportervektoren mit spezifisch positionierter Basenmodifikation nach (Lühnsdorf et al., 2012).

### 2.2.8.1 Herstellung und Überprüfung doppelt genickter Plasmid-DNA

Unabhängig davon, ob für die Reaktion die Nicking-Endonuklease Nb.BsrDI oder Nt.Bpu10I (New England Biolabs bzw. Thermo Scientific) eingesetzt wurde, wurden für die Herstellung eines Plasmidpaares bestehend aus einem modifizierten Vektor und einem unmodifizierten Kontrollvektor 50 µg Plasmid-DNA in 250 µl Reaktionsvolumen umgesetzt. Im Falle von Plasmid-Präparationen, die mehr als zwei Vektoren umfassten, wurde die Plasmidmenge im Reaktionsansatz pro zusätzlichen Vektor um 20 µg in 100 µl erhöht. Die Vorbereitung der Reaktion folgte dem in Tabelle 2-22 angegebenen Schema, inkubiert wurde nach dem Programm aus Tabelle 2-23.

Tabelle 2-22 Reaktionsansätze für den doppelten Einschnitt des Reportervektors mit der Nicking-Endonuklease Nb.BsrDI (links) oder Nt.Bpu10I (rechts).

Reagenz	Endkonz./-menge	Reagenz	Endkonz./-menge
Plasmid-DNA	200 ng/µl	Plasmid-DNA	200 ng/µl
CutSmart Puffer (10×)	1×	NEBuffer 2.1 (10×)	1×
Nb.BsrDI (10 U/µl)	50 U	Nt.Bpu10I (5 U/µl)	100 U
H <sub>2</sub> O bis zum Gesamtvolumen von 250 µl			

Tabelle 2-23 Programm für den doppelten Einschnitt des Reportervektors mit der Nicking-Endonuklease Nb.BsrDI (links) oder Nt.Bpu10I (rechts).

Schritt	Temperatur	Zeit	Schritt	Temperatur	Zeit
1	4°C	∞	1	4°C	∞
2	65°C	2 Stunden	2	37°C	2 Stunden
3	80°C	20 Minuten	3	65°C	20 Minuten
4	4°C	∞	4	4°C	∞

Um den Erfolg des doppelten Einschnitts zu überprüfen, wurde unmittelbar im Anschluss eine analytische Ligationsreaktion durchgeführt. Es wurden zwei Proben ohne Kompetitoroligonukleotid als Kontrolle der Ligaseaktivität, und für jedes verwendete Oligonukleotid zwei weitere Proben nach dem in Tabelle 2-24 beschriebenen Schema angesetzt und wie in Tabelle 2-25 angegeben inkubiert.

Tabelle 2-24 Reaktionsansätze für die analytische Strangaustauschreaktion.

Reagenz	Ansatz			
	Ligase -	Ligase +	Oligo	Oligo + PNK
Doppelt gen. Plasmid-DNA (0,2 µg/µl)	400 ng	400 ng	400 ng	400 ng
Kompetitoroligonukleotid (2 µM)	---	---	1,5 µM	1,5 µM
T4 DNA Ligase Puffer (10×)	1×	1×	1×	1×
T4 Polynukleotidkinase (PNK, 10 U/µl)	---	---	---	5 U
H <sub>2</sub> O bis zum Gesamtvolumen von 15 µl				



Tabelle 2-25 Programm für die analytische Strangaustauschreaktion.

Schritt	Temperatur	Zeit	Aktion
1	4°C	∞	
2	37°C	30 Minuten	Phosphorylierung
3	95°C	10 Minuten	
4	50°C	---	Rate: 0,02°C/s
5	50°C	1 Minute	
6	4°C	∞	

Im Anschluss hieran wurde jeder Probe mit Ausnahme der Negativkontrolle der Ligaseaktivität 2 U der T4 DNA Ligase (Thermo Scientific) in 5 µl 1× T4 DNA Ligasepuffer zugesetzt, wohingegen die Negativkontrolle nur mit 1× T4 DNA Ligasepuffer versetzt wurde. Es folgte eine weitere Inkubation nach dem Programm aus Tabelle 2-26, wobei im Falle der Ligation des CGG-5W-Inserts der zweite Schritt des Programms bei 37°C anstelle von 22°C durchgeführt wurde.

Tabelle 2-26 Programm für die Ligation der Vektor-DNA mit dem synthetischen Oligonukleotid.

Schritt	Temperatur	Zeit
1	4°C	∞
2	22°C (37°C)	1 Stunde
3	65°C	20 Minuten
4	4°C	∞

Die Analyse der Reaktion erfolgte nach einer Agarosegelelektrophorese (0,8 % Agarose) in Anwesenheit von Ethidiumbromid.

2.2.8.2 Präparativer Einbau eines synthetischen Oligonukleotids in doppelt genickte Plasmid-DNA  
Für den ersten Schritt der präparativen Ligationsreaktion wurde die doppelt-genickte Plasmid-DNA nach dem Schema in Tabelle 2-27 mit allen Komponenten mit Ausnahme der Polynukleotidkinase (Thermo Scientific) vermischt. Vor der Zugabe des Enzyms wurde ein Aliquot von 15 µl aus dem Reaktionsansatz entnommen und zur Verwendung als PNK-freie Kontrolle in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe der Polynukleotidkinase wurden die 750 µl des Reaktionsansatzes auf zehn 200µl-Reaktionsgefäße a 75 µl aliquotiert und nach dem Programm aus Tabelle 2-25 inkubiert.

Tabelle 2-27 Zusammensetzung der präparative Strangaustauschreaktion.

Reagenz	Endkonz./-menge
Doppelt gen. Plasmid-DNA (0,2 µg/µl)	20 µg
Kompetitoroligonukleotid (200 µM)	1,5 µM
T4 DNA Ligase Puffer (10×)	1×
T4 Polynukleotidkinase (PNK, 10 U/µl)	250 U
H <sub>2</sub> O bis zum Gesamtvolumen von 750 µl	

Nach dieser Inkubation wurden jedem Aliquot des Reaktionsansatzes 10 U T4-DNA Ligase in 25  $\mu$ l 1 $\times$  T4 DNA Ligase Puffer, bzw. 2 U in 5  $\mu$ l im Falle der PNK-freien Kontrolle, zugesetzt und nach sorgfältigem Mischen nach dem Programm aus Tabelle 2-26 inkubiert. Danach wurden die Aliquots wieder in einem 2 ml-Reaktionsgefäß vereinigt und die Plasmid-DNA mittels Phenol-Chloroform-Extraktion gefolgt von einer Amicon-Säule (Merck Milipore; Verwendung nach Anweisung des Herstellers) aufgereinigt und die Plasmid-Konzentration photometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.1.3.2 bis 2.1.3.4).

### 2.2.8.3 Nachweis des Einbaus von 8-oxoG mittels Umsetzung mit der spezifischen DNA-Glykosylase Fpg

Der Nachweis der Anwesenheit von 8-oxoG innerhalb der Vektor-DNA beruht auf der Exzision dieser Modifikation durch die spezifische Formamidopyrimidin DNA Glykosylase (Fpg) – ein funktionelles Homolog der humanen Glykosylase OGG1 – aus *E.coli*. Diese erkennt 8-oxoG, schneidet es aus der Plasmid-DNA aus und generiert durch ihre intrinsische  $\beta$ -Lyase-Aktivität einen DNA-Einzelstrangbruch. Dessen Entstehung lässt sich in einem ethidiumbromidhaltigen Agarosegel anhand der Konversion der superspiralisierten in die offenzirkuläre Plasmid-Form quantitativ bestimmen. Für jeden Vektor wurden zwei Proben, je einmal mit und einmal ohne Fpg (New England Biolab), nach dem in Tabelle 2-28 beschriebenen Schema angesetzt und dem Programm in Tabelle 2-29 folgend inkubiert.

Tabelle 2-28 Reaktionsansätze für den analytischen Fpg-Verdau der Vektoren mit eingebautem, synthetischem Oligonukleotid.

Reagenz	Ansatz -	Ansatz +
Plasmid-DNA	100 ng	100 ng
Fpg (8 U/ $\mu$ l)	---	2 U
BEH-Puffer (mit 67 mg/l BSA) bis zum Gesamtvolumen von 15 $\mu$ l		

Tabelle 2-29 Programm für den analytischen Fpg-Verdau der Vektoren mit eingebautem, synthetischem Oligonukleotid.

Schritt	Temperatur	Zeit
1	4°C	$\infty$
2	37°C	1 Stunde
3	65°C	20 Minuten
4	4°C	$\infty$

Die Analyse erfolgte nach einer Elektrophorese im 0,8 % Agarosegel (+ Ethidiumbromid) und der Aufnahme des Gelbilds mit dem GelDoc System mit Hilfe der ImageLab Software (Bio-Rad).

#### 2.2.8.4 Nachweis des Einbaus von DNA-Modifikationen mittels Restriktionsverdau

Da für die übrigen im Rahmen dieser Arbeit verwendeten DNA-Modifikationen (5-meC, 5-hmC, 5-fC, 5-caC und 5-hmU) keine spezifische DNA-Glykosylase zur Verfügung stand – entweder weil es sich bei der Modifikation nicht um ein Substrat der BER handelte oder die Glykosylaseaktivität des kommerziell erhältlichen Enzyms unter den beschriebenen Versuchsbedingungen zu gering war – wurde die Anwesenheit dieser Läsionen innerhalb der CRE-Konsensus-Sequenz durch einen Restriktionsverdau mit AatII (New England Biolabs), dessen Erkennungssequenz der CRE-Konsensus-Sequenz entspricht, bestätigt. Da AatII durch Methylierung des CpG-Dinucleotids innerhalb seiner Erkennungssequenz inhibiert wird, ist die Abwesenheit einer linearen Bande der Beweis für die Anwesenheit einer DNA-Basenmodifikation innerhalb der Erkennungssequenz. Die AatII-enthaltenden Proben wurden parallel zu den Kontrollproben ohne Enzym nach den Angaben in Tabelle 2-30 vorbereitet und anhand des Programms in Tabelle 2-31 inkubiert.

Tabelle 2-30 Reaktionsansätze für den analytischen Restriktionsverdau der Vektoren mit eingebautem, synthetischem Oligonukleotid durch AatII.

Reagenz	Ansatz -	Ansatz +
Plasmid-DNA	100 ng	100 ng
CutSmart Puffer (10×)	1×	1×
AatII (20 U/μl)	---	1 U
H <sub>2</sub> O bis zum Gesamtvolumen von 15 μl		

Tabelle 2-31 Programm für den analytischen Restriktionsverdau der Vektoren mit eingebautem, synthetischem Oligonukleotid durch AatII.

Schritt	Temperatur	Zeit
1	4°C	∞
2	37°C	1 Stunde
3	80°C	20 Minuten
4	4°C	∞

Zur Auftrennung der Proben wurde eine Agarosegelelektrophorese (0,8 % mit 0,5 μg/ml Ethidiumbromid) durchgeführt und das mit Hilfe GelDoc-Systems erhaltene Gelbild mit der ImageLab Software analysiert.

#### 2.2.9 Bestimmung von DNA-Glykosylase-Aktivitäten (Cleavage Assay)

Die Untersuchung der Exzisionsaktivität mittels eines Cleavage Assays beruht auf der Konversion der superspiralisierten Plasmid-Form in die offen-zirkuläre Form nach Exzision einer DNA-Basenmodifikation und der damit verbundenen Generierung eines DNA-Einzelstrangbruchs. Durchgeführt wurde dieser Assay sowohl mit Zellextrakten (siehe Kapitel 2.2.4.1), als auch mit reinem, rekombinanten OGG1-Protein (zur Verfügung gestellt von J. Pablo Radicella oder bezogen von New England Biolabs).

Die Analyse erfolgte durch Agarosegelelektrophorese im 0,8 %igen Agarosegel in Anwesenheit von 0,5 mg/l Ethidiumbromid. Das Gel wurde mit Hilfe des GelDoc Molecular Imagers fotografiert und die DNA-Menge der Banden mit Hilfe der ImageLab Software (Bio-Rad) quantifiziert. In dieser Arbeit vorangegangenen Versuchen wurde ermittelt, dass genickte, offenzirkuläre DNA unter den verwendeten Bedingungen ein 2,4-fach höheres Fluoreszenzsignal liefert als die äquivalente Menge an superspiralierter DNA. Daher wurde 2,4 als Korrekturfaktor in der Berechnung der relativen Menge der superspiralisierten Form verwendet.

#### 2.2.9.1 Cleavage Assay mit Zellextrakten

Cleavage Assays mit Zellextrakten eignen sich hervorragend um die Inzisionsaktivität am spezifischen Substrat unter zellähnlichen Bedingungen nachzuweisen. Dafür wurden die Proben jeweils mit unterschiedlichen Proteinmengen aus einer in BEH (versetzt mit 67 mg/l BSA) angefertigten Verdünnungsreihe versetzt. Je nach Experiment wurden 3 bis 4 Konzentrationen zwischen 3 µg/Reaktion und 0,125 µg/Reaktion verwendet. Pro Probe wurden jeweils 100 ng Plasmid-DNA mit 5 µl der entsprechenden Proteinlösung versetzt und das Reaktionsvolumen mit BEH-Puffer (mit 67 mg/l BSA) auf 15 µl gebracht. Der Protein-freien Kontrolle wurde statt einer Proteinlösung nur BEH-BSA zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 Stunde bei 37°C, wonach den Proben zur Beendigung der Reaktion SDS zu einer Endkonzentration von 0,1 % w/v zugesetzt und für 3 Minuten bei 50°C inkubiert wurde. Unmittelbar danach wurde den Proben 6× Ladebuffer zugesetzt und die Gelelektrophorese zur Analyse durchgeführt.

Wurden für den Cleavage Assay Extrakte von TSA-behandelten Zellen verwendet, erfolgte die Inkubation der Plasmid-DNA sowohl bei den Extrakten der Kontrollzellen, als auch bei den Extrakten der behandelten Zellen in TSA-haltigem BEH-BSA (440 nM TSA). Dies sollte dazu dienen direkte Inhibition durch TSA als mögliche Ursache für beobachtete Unterschiede von vornerein ausschließen zu können.

#### 2.2.9.2 Cleavage Assay mit rekombinatem OGG1

Für Cleavage Assays mit reinem rekombinanten OGG1 (zur Verfügung gestellt von J. Pablo Radicella; Konzentration 189 ng/µl) wurde eine Verdünnungsreihe für Gesamtproteinmengen zwischen 57 ng/Reaktion bis 0,57 ng/Reaktion eingesetzt. In jeder Probe wurden jeweils 100 ng Plasmid-DNA mit 5 µl der entsprechenden Protein-Lösung versetzt. Da die intrinsische β-Lyase-Aktivität des OGG1 um ein Vielfaches langsamer ist als die Exzisionsaktivität, wurde jeder Probe zusätzlich in BEH (versetzt mit 67 mg/l BSA) verdünnte Endonuklease IV (New England Biolabs) in einer Endkonzentration von 1 U/Reaktion zugesetzt. Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug 15 µl und wurde bei Bedarf durch

Zugabe von BEH-BSA eingestellt. Die Inkubation der Proben erfolgte anhand des in Tabelle 2-32 dargestellten Programms.

Tabelle 2-32 Programm für den Cleavage-Assay mit rekombinatem OGG1.

Schritt	Temperatur	Zeit
1	4°C	∞
2	37°C	1 Stunde
3	65°C	20 Minuten
4	4°C	∞

Für Cleavage Assays mit kommerziell erworbenem hOGG1 (New England Biolabs) wurde nur eine OGG1-Konzentration von 0,5 U/Reaktion verwendet, sowie auf die Zugaben von Endonuklease IV verzichtet, da in diesem Fall die  $\beta$ -Lyase-Aktivität des Proteins untersucht werden sollte. Ansonsten wurde nach dem oben beschriebenen Protokoll vorgegangen.

### 2.2.9.3 Cleavage Assay mit rekombinatem OGG1 in Anwesenheit von APE1

Für einen Cleavage Assay mit rekombinatem OGG1 (New England Biolabs) in Anwesenheit von APE1 (New England Biolabs) wurden die Proben nach dem in Tabelle 2-33 dargestellten Schema vorbereitet. Dabei wurde zur Verdünnung der Vektor-DNA und der verwendeten Enzyme ein modifizierter BEH-Puffer ohne EDTA (10 mM HEPES, pH 7,5; 200 mM NaCl) verwendet. Für die Inkubation wurde ebenfalls das Programm aus Tabelle 2-32 verwendet.

Tabelle 2-33 Reaktionsansätze für den Cleavage-Assay mit rekombinatem OGG1 in Anwesenheit von rekombinatem APE1.

Reagenz	Ansatz			
	Kein Enzym	Kein OGG1	Kein APE1	OGG1 + APE1
Plasmid-DNA	100 ng	100 ng	100 ng	100 ng
NEBuffer 4 (10×)	1×	1×	1×	1×
APE1 (10 U/ $\mu$ l)	---	0,5 U	---	0,5 U
OGG1 (1,6 U/ $\mu$ l)	---	---	0,25 U	0,25 U
BEH-Puffer (mit 67 mg/l BSA) bis zum Gesamtvolumen von 15 $\mu$ l				

## 2.2.10 *In vitro*-Methylierung mit der bakteriellen DNA-Methyltransferase M.SssI

### 2.2.10.1 *In vitro*-Methylierung

Zur vollständigen *in vitro* Methylierung der Vektor-DNA wurde die bakterielle DNA-Methyltransferase M.SssI (New England Biolabs) verwendet, die unselektiv eine Methylgruppe des Methylgruppendonors S-Adenosinmethionin auf Cytosinbasen im CpG-Dinukleotid-Kontext überträgt und diese somit zu 5-Methylcytosin methyliert. Die Proben wurden dem Schema in Tabelle 2-34 folgend vorbereitet. Die Inkubation folgte dem Programm in Tabelle 2-35.

Tabelle 2-34 Reaktionsansätze für die *in vitro*-Methylierung durch M.SssI.

Reagenz	- M.SssI	+ M.SssI
Plasmid-DNA	1 µg	1 µg
NEBuffer 2 (10×)	1×	1×
SAM (32 mM)	160 µM	160 µM
M.SssI (4 U/µl)	---	4 U
H <sub>2</sub> O bis zum Gesamtvolumen von 20 µl		

Tabelle 2-35 Programm für die *in vitro*-Methylierung durch M.SssI.

Schritt	Temperatur	Zeit
1	4°C	∞
2	37°C	2 Stunden
3	65°C	20 Minuten
4	4°C	∞

### 2.2.10.2 Nachweis der Methylierung durch Restriktionsverdau mit ApaLI

Um die vollständige *in vitro*-Methylierung des Vektors pZA und all seiner im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Varianten (pZAJ, pJAZ, etc.) zu überprüfen, wurde die Vektor-DNA mit der Restriktionsendonuklease ApaLI (New England Biolabs) verdaut. Das Prinzip dieses Nachweises beruht darauf, dass die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym, die in den Vektoren der pZA/pAZ-Familie genau einmal auftritt, ein CpG-Dinukleotid enthält, dessen Methylierung ein unüberwindliches Hindernis für die Restriktionsreaktion darstellt. Die Reaktion liefert nur einen direkten und eindeutigen Nachweis für die CpG-Methylierung eines einzelnen CpG-Dinukleotids, aber da die von M.SssI katalysierte DNA-Methylierung unselektiv abläuft und somit statistisch über die gesamte Vektor-DNA verteilt sein sollte, dient der Nachweis der Methylierung des CpG-Dinukleotids innerhalb der ApaLI-Schnittstelle als Stichprobe. Somit wird vom Methylierungsgrad der ApaLI-Erkennungssequenz auf den Methylierungsgrad des gesamten Vektors geschlossen. Die Proben der Nachweisreaktion wurden dem Schema in Tabelle 2-36 folgend vorbereitet.

Tabelle 2-36 Reaktionsansätze für den analytischen Restriktionsverdau mit ApaLI zum Nachweis von *in vitro*-Methylierung.

Reagenz	- ApaLI	+ ApaLI
Plasmid-DNA	250 ng	250 ng
NEBuffer 2 (10×)	1×	1×
BSA (100×)	1×	1×
ApaLI (10 U/µl)	---	10 U
H <sub>2</sub> O bis zum Gesamtvolumen von 20 µl		

Die Proben wurden für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Da das Enzym ApaLI nicht hitzeinaktivierbar ist, wurden die Proben unmittelbar nach der Inkubation mit SDS-haltigem (1 % w/v SDS) 6×

Ladepuffer versetzt und in einem 0,8 %igen Agarosegel für 45 Minuten bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt und nach Ethidiumbromid-Färbung mit der ImageLab Software (Bio-Rad) analysiert.

### 2.2.11 *Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)*

Der Electrohoretic Mobility Shift Assay (EMSA) stellt eine gängige Methode dar, die es ermöglicht Protein-DNA-Bindung nachzuweisen. Sie wird häufig dazu verwendet das Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren und anderen DNA-bindenden Proteinen zu untersuchen (Suske et al., 1989). Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass DNA, an die ein Protein gebunden hat, dadurch sperriger ist und eine niedrigere elektrophoretische Laufgeschwindigkeit aufweist. Die korrespondierende Bande ist verschoben und zeigt im Gel somit einen „Shift“. Standardgemäß wird für diesen Assay eine kurze DNA-Sonde in Form eines relativ kurzen synthetischen Oligonukleotids verwendet, die Elektrophorese erfolgt üblicherweise in einem Polyacrylamidgel.

Für den Nachweis der Bindung des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP responsive element binding Protein) an die unmodifizierte oder DNA-Basenmodifikationen enthaltende Plasmid-DNA wurde diese Methode folgendermaßen modifiziert: Als DNA-Target für die Bindung des Proteins diente die entsprechende Plasmid-DNA, die zuvor mit den Restriktionsendonukleasen PciI und BmtI umgesetzt wurde. Ergebnis dieser Reaktion waren jeweils zwei DNA-Fragmente: Ein CRE-looses Fragment von 4228 bp, das unter den verwendeten Elektrophorese-Bedingungen kaum mobil ist, und das CRE-enthaltende Promotorfragment, dessen Größe von dem verwendeten Vektor abhängt. Im Falle des pCRE-UNO/NULL-Vektors beträgt die Größe des Promotor-Fragments 180 bp und enthält eine/keine Bindestelle für CREB (CRE). Handelt es sich bei dem verwendeten Vektor um einen Vektor mit vollständigem CMV-IE-Promotor (z.B. pZAJ), beträgt die Größe des Promotor-Fragments 653 bp und es enthält 4 kanonische und 3 halb-kanonische CRE-Sequenzen. Unabhängig von der Art des verwendeten Vektors ist das untersuchte Promotor-Fragment um ein Vielfaches größer als eine gewöhnlich für diese Art von Versuch verwendete DNA-Sonde. Dies ermöglicht eine Durchführung der Elektrophorese in einem Agarosegel, was wiederum aufgrund der Möglichkeit der Ethidiumbromid-Färbung eine Radiomarkierung der Proben unnötig macht (Abbildung 2-5).

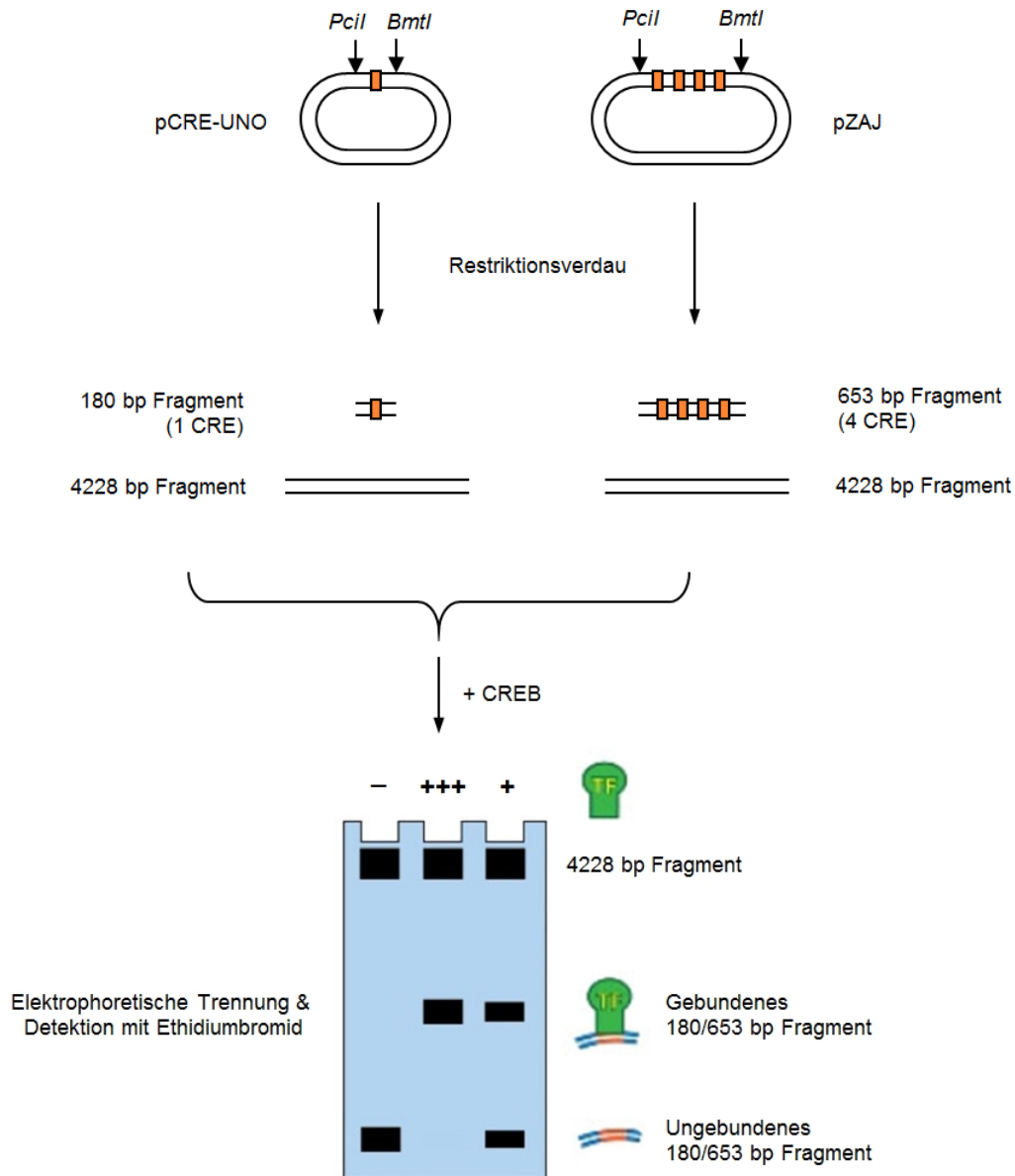


Abbildung 2-5 Modifizierter Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) mit dem Transkriptionsfaktor CREB und doppelt verdauter Vektor-DNA. Nach dem Doppelverdau der Vektoren pCRE-UNO oder pZAJ entstehen zwei DNA-Fragmente, von denen eines das CRE-enhaltende Promotor-Fragment darstellt. Kanonische CRE sind durch orange Rechtecke symbolisiert. Diese werden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Transkriptionsfaktors CREB inkubiert und dann in einem Agarosegel aufgetrennt. Adaptiert aus (Schuch et al., 2012).

### 2.2.11.1 Doppelverdau von Plasmid-DNA mit PciI und BmtI

Der Doppelverdau zur Generierung der Substrate für den Bandshift-Assay erfolgte mit den Restriktionsendonukleasen PciI und BmtI (New England Biolabs), deren Schnittstellen in der DNA-Sequenz der pZAJ-verwandten Vektoren so positioniert sind, dass sie den Promotor des EGFP-Reportergens einschließen. Der Verdau wurde unter den in Tabelle 2-37 beschriebenen Bedingungen durchgeführt und die Proben nach dem Programm aus Tabelle 2-38 inkubiert.



Tabelle 2-37 Reaktionsansatz für den Doppelverdau mit PciI und BmtI zur Herstellung von Vektor-Fragmenten zur Verwendung im EMSA.

Reagenz	Endkonzentration
Plasmid-DNA	4 µg
NEBuffer 3.1 (10×)	1×
BSA (100×)	1×
PciI (10 U/µl)	55 U
BmtI	55 U
H <sub>2</sub> O bis zum Gesamtvolumen von 28,5 µl	

Tabelle 2-38 Programm für den Doppelverdau PciI und BmtI zur Herstellung von Vektor-Fragmenten zur Verwendung im EMSA.

Schritt	Temperatur	Zeit
1	4°C	∞
2	37°C	2 Stunden
3	80°C	20 Minuten
4	4°C	∞

### 2.2.11.2 EMSA mit rekombinantem CREB

Bevor die Proben für die Bandshift-Reaktion angesetzt wurden, wurde zuvor das Agarosegel für die spätere Elektrophorese vorbereitet. Um eine bessere Sichtbarkeit der kurzen DNA-Bande zu gewährleisten wurde TopVision Agarose (Thermo Scientific) verwendet. Es wurde ein 1,5 %iges Gel in 0,5 fachem TBE-Puffer hergestellt, wobei letzterer auch als Laufpuffer der Elektrophorese diente. Da die Proben vor dem Auftragen nicht mit Laufpuffer versetzt wurden, wurden nach dem Aushärten des Gels und dem Überschichten mit dem Laufpuffer jeweils 0,5 µl eines farbigen Ladepuffers (New England Biolabs) in die Taschen pipettiert, um das spätere Auftragen der Proben zu erleichtern.

Der 2-fache Reaktionspuffer für die Bindungsreaktion wurde vor dem Ansetzen der Reaktion jeweils frisch zubereitet, die Proben danach entsprechend Tabelle 2-39 vorbereitet. Die Verdünnung des rekombinanten CREB (BioCat) erfolgte jeweils in 1-fachem Reaktionspuffer und die eingesetzten Proteinmengen wurden je nach Aktivität der jeweiligen Protein-Präparation festgelegt. Dabei wurde die Verdünnung so gewählt, dass die gewünschte Proteinmenge in 5 µl vorlag.

Tabelle 2-39 Zusammensetzung des EMSA mit rekombinantem CREB.

Reagenz	Endkonz./-menge
Plasmid-DNA	400 ng
Reaktionspuffer (2×)	1×
BSA (20 mg/ml)	2 mg/ml
H <sub>2</sub> O bis zum Gesamtvolumen von 10 µl	
CREB (verdünnt in 1× RB)	5 µl

Nach der Zugabe des Proteins wurden die Proben für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und unmittelbar danach auf Eis gestellt und auf das vorbereitete Agarosegel aufgetragen. Als Marker wurde die 100 bp Ladder (Thermo Scientific) verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 50 V für 2-3 Stunden bei 4°C durchgeführt. Im Anschluss wurde das Gel für 20 Minuten in einem Ethidiumbromidbad (0,5 mg/l) gefärbt und danach für weitere 20 Minuten in entionisiertem Wasser gewaschen. Mit Hilfe des GelDoc Imagers (Bio-Rad) wurde anschließend ein Gelbild aufgenommen, welches dann mit der ImageLab Software analysiert wurde.

### 2.2.12 Host Cell Reactivation Assay

#### 2.2.12.1 Fixierung von Zellen mit Formaldehyd

Zur Fixierung wurden die in 6-Well-Platten ausgestreuten Zellen von Medium befreit, einmal mit PBSCMF gewaschen und dann unter 500 µL Trypsin im Brutschrank bei 37°C inkubiert, bis die Zellen vollständig gelöst waren. Diese Zellen wurden dann in 800 µL DMEM-Medium gründlich resuspendiert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden dann für ungefähr eine Minute in der Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde dann mit 800 µL kaltem PBSCMF versetzt, mit dem Vortexschüttler resuspendiert und erneut für etwa eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals verworfen und das Pellet nun in 450 µl kaltem PBSCMF resuspendiert. Zuletzt wurde den Proben 0,5 ml einer 2 %igen Formaldehyd-Lösung in PBSCMF zugegeben, gründlich mit dem Vortex-Schüttler gemischt und dann bis zur Messung mit dem Durchflusszytometer bei 4°C gelagert.

#### 2.2.12.2 Messung der EGFP-Expression mittels Durchflusszytometrie

Die Vorbereitung der Proben vor der Messung erfolgte mittels Zentrifugation (1.200 × g, 2,5 Minuten, Raumtemperatur). Der Formaldehyd-haltige Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Abhängigkeit der eingesetzten Zellzahl in 400-1.000 µL PBSCMF mit Hilfe des Vortex-Schüttlers resuspendiert. Die Messung der EGFP-Expression erfolgte mittels Durchflusszytometrie im FACS Calibur™ (Becton Dickinson GmbH).

Zur späteren Analyse der Genexpression wurden 400 ng des EGFP exprimierenden Vektors mit der gleichen Menge von ungeschädigtem pDsRed Monomer-N1 cotransfiziert. Dabei wurde die grüne Fluoreszenz des auf dem pEGFP-mOCD-ZAJ-Plasmid (und seinen Variationen) kodierten EGFP Proteins im Fluoreszenzkanal 1 (FL-1, 515-545 nm) parallel zur roten Fluoreszenz des dsRed-Monomers im Fluoreszenzkanal 2 (FL-2, 564-606 nm) bestimmt. Die Angabe der Fluoreszenz erfolgte in einer einheitslosen, logarithmischen Skalierung. Zur Kalibrierung des Geräts wurden jeweils nicht-transfizierte Zellen, sowie ausschließlich mit dem für das dsRed-Monomer-kodierenden Plasmid

pDsRed transfizierte Zellen verwendet. Um nicht-transfizierte Zellen von der Auswertung auszuschließen wurde nur die EGFP-Expression von Zellen einbezogen, deren DsRed-Monomer-Expression über dem Schwellenwert von 30 (in seltenen Fällen auch 50 oder 100) lag (Abbildung 2-6). Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Cell Quest Pro Software (Becton Dickinson GmbH), wobei jeweils die die Zellzahl gegen die EGFP-Expression aufgetragen und die mediane EGFP-Expression bestimmt wurde.

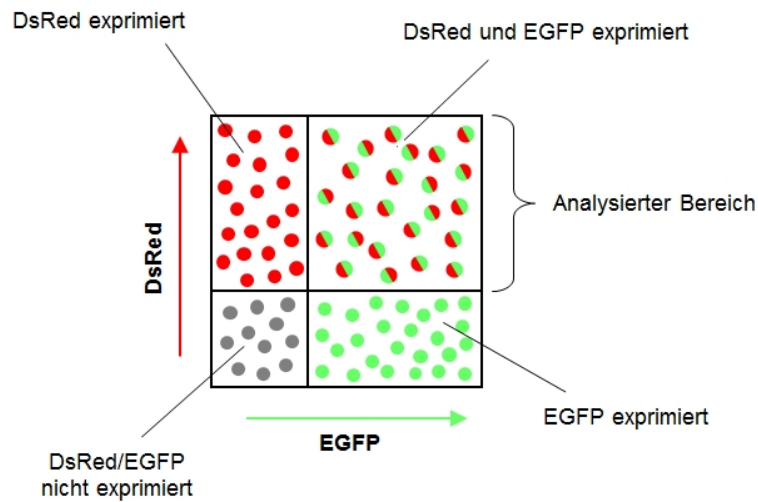


Abbildung 2-6 Prinzip der quantitativen Analyse der EGFP-Expression in transfizierten Zellen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Quantitativer Zusammenhang zwischen der Beeinträchtigung der Gentranskription durch 8-oxoG und der Exzisionsaktivität von OGG1

##### 3.1.1 Reporter-Vektoren, die ein einzelnes 8-oxoG entweder im 5'-A[8-oxoG]C oder im 5'-C[8-oxoG]G-Kontext im 5'-UTR des EGFP-Gens enthalten

Zur Untersuchung der Sequenzabhängigkeit des genexpressionshemmenden Effekts eines einzelnen 8-oxoG wurden zwei unterschiedliche DNA-Sequenzkontexte verwendet. Zum einen der Kontext 5'-A[8-oxoG]C, in dem in vorangegangenen Versuchen ein wesentlicher inhibitorischer Effekt nachgewiesen worden war (Diplomarbeit J. Allgayer, 2011). Zum anderen der Kontext 5'-C[8-oxoG]G, in dem zuvor bei einer Positionierung im kodierenden Bereich nur eine minimale Hemmung der Genexpression beobachtet werden konnte (Kitsera et al., 2011). Die zu diesem Zweck konstruierten Vektoren pZAJ-5W/5C-AGC und pZAJ-5W/5C-CGG wurden so konzipiert, dass der Einbau von 8-oxoG entweder im nicht-transkribierten (5W) oder im transkribierten DNA-Strang (5C) der 5'-untranskribierten Region (5'-UTR) des EGFP-Gens in einem der beiden zu untersuchenden DNA-Sequenzkontexte (5'-AGC oder 5'-CGG) erfolgen konnte (Abbildung 3-1). Die Positionierung beider Sequenzkontexte im 5'-UTR des Gens diente dazu, mögliche Auswirkungen des erweiterten DNA-Sequenzkontextes (> 12 bp) der Läsion im 5'-C[8-oxoG]G-Kontext auf die Intensität des inhibitorischen Effekts auszuschließen (Kitsera et al., 2011) und gleichzeitig Variablen wie die Position der Läsion in Bezug auf den Transkriptionsstart und den DNA-Strang für beide Sequenzkontexte gleich zu halten. Die Konstruktion und Verifizierung dieser Vektoren ist detailliert in Kapitel 2.2.5 und Anhang III-1 dargestellt.

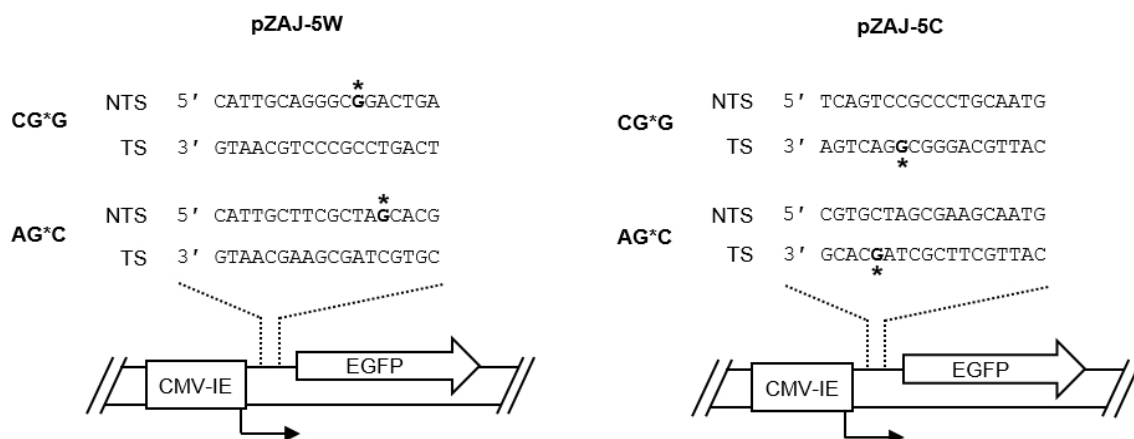


Abbildung 3-1 Schematische Darstellung der Reporter Gene, die den Einbau eines einzelnen 8-oxoG in zwei verschiedenen DNA-Sequenzkontexten im 5'-UTR des EGFP-Gens ermöglichen. DNA-Sequenz des synthetischen 18 nt Oligonukleotids innerhalb des nicht-transkribierten (NTS, pZAJ-5W) (links) oder im transkribierten DNA-Strang (TS, pZAJ-5C) (rechts) des 5'-UTR des EGFP-Gens (breiter Pfeil). Der Stern kennzeichnet die Position des modifizierten Guanins. Der gebrochene Pfeil zeigt den Start der Transkription, das Rechteck den CMV-IE-Promotor, unter dessen Kontrolle das Reporter Gen steht.

Der Einbau von 8-oxoG in die Vektoren pZAJ-5W-CGG bzw. pZAJ-5W-AGC und pZAJ-5C-CGG bzw. pZAJ-5C-AGC erfolgte mittels einer Strangaustauschreaktion nach dem doppelten Einschnitt durch die sequenzspezifische Nicking-Endonuklease Nb.BsrDI (Lühnsdorf et al. 2012) (Kapitel 2.2.8). Die Verdrängung des nativen, sowie der erfolgreiche Einbau des synthetischen Oligonukleotids mit Guanin (G) oder 8-oxoG wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Abbildung 3-2). Aufgrund der durch die Nicking-Endonuklease generierten Einzelstrangbrüche liegt die Vektor-DNA im Gel in der offenzirkulären Form (oc) vor. Zugabe von Ligase führt dazu, dass die Einzelstrangbrüche wieder geschlossen werden und das Plasmid durch das im Gel vorhandene Ethidiumbromid in die kovalent-geschlossene (cc) Form überführt wird. In Gegenwart eines unphosphorylierten Kompetitor-Oligonukleotids, das entweder G oder 8-oxoG enthält, wird das native ssDNA-Fragment durch dieses verdrängt. Durch das Fehlen einer Phosphatgruppe am 5'-Ende des synthetischen Oligonukleotids ist eine Ligation mit dem 3'-Ende der Plasmid-DNA nicht möglich, wodurch ein Einzelstrangbruch in der Vektor-DNA verbleibt. Dies wiederum verhindert die Konversion in die kovalent geschlossene Form und die Plasmid-DNA liegt im Gel offen zirkulär vor. Somit beweist die Abwesenheit der kovalent geschlossenen Form einen vollständigen Austausch des nativen ssDNA-Fragments durch das synthetische Kompetitor-Oligonukleotid. Wird dieses Kompetitor-Oligonukleotid hingegen vor dem Strangaustausch durch Inkubation mit Polynukleotidkinase (PNK) an seinem 5'-Ende phosphoryliert, erfolgt eine vollständige Ligation mit der Plasmid-DNA. Das Plasmid liegt im Gel in kovalent-geschlossener Form vor.

Der Nachweis des Vorhandenseins von 8-oxoG innerhalb der Plasmid-DNA erfolgte durch die Umsetzung der Vektoren mit der DNA-Glykosylase Fpg (Kapitel 2.2.8.3). Dabei zeigt sich, dass bei den Guanin-enthaltenden Kontrollvektoren (G) nahezu keine Umsetzung durch Fpg erkennbar ist (Abbildung 3-3). Die 8-oxoG-enthaltenden Plasmide hingegen lagen unabhängig davon, ob 8-oxoG im 5'-A[8-oxoG]C oder im 5'-C[8-oxoG]G-Kontext stand, vollständig in der offen zirkulären Form vor. Somit ist nachgewiesen, dass das 8-oxoG-enthaltende Oligonukleotid bzw. das Guanin-enthaltende Kontroll-Oligonukleotid in alle Reporterkonstrukte erfolgreich eingebaut wurde. Interessanterweise ist kein Unterschied der Exzisionsaktivität des Fpg in Bezug auf den DNA-Sequenzkontext des 8-oxoG festzustellen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass für die Nachweisreaktion ein Überschuss des Enzyms verwendet wurde, sodass eine Sequenzabhängigkeit der Exzision von Fpg nicht maßgeblich ins Gewicht fällt (Anhang IV-1).

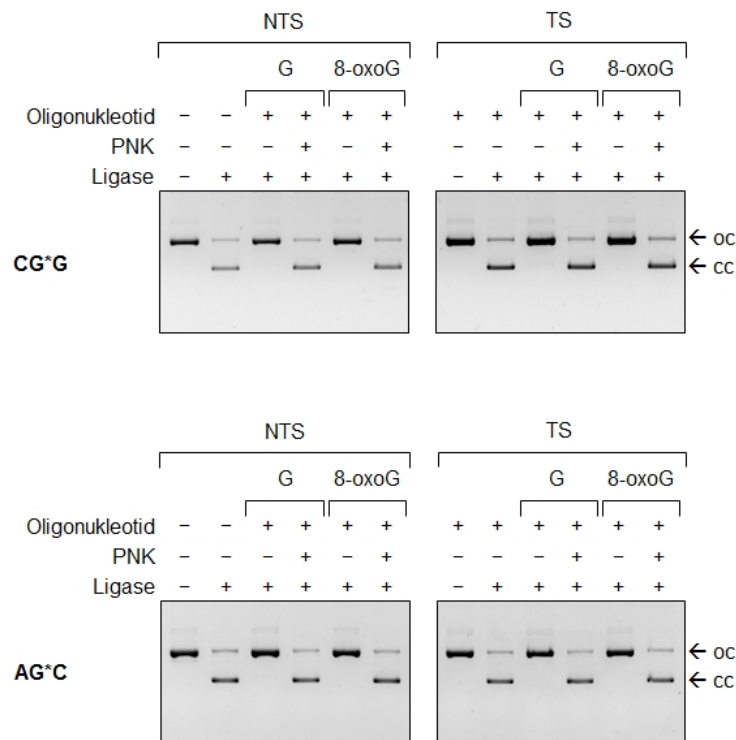


Abbildung 3-2 Konstruktion von Vektoren mit einem einzelnen 8-oxoG in zwei verschiedenen DNA-Sequenzkontexten im 5'-UTR des EGFP-Gens. Repräsentative Agarosegele nach der Strangaustauschreaktion der durch Nb.BsrDI doppelt-ingeschnittenen Vektor-DNA. Der Strangaustausch erfolgte mit einem synthetischen, Guanin (G) - bzw. 8-oxoG-enhaltenden Kompetitor-Oligonukleotid. Die Positionen der offen zirkulären (oc) und der kovalent geschlossenen Plasmidform (cc) sind jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet. Jede der angegebenen Positionen von 8-oxoG entspricht jeweils einem separaten Vektor (siehe Abbildung 3-1).

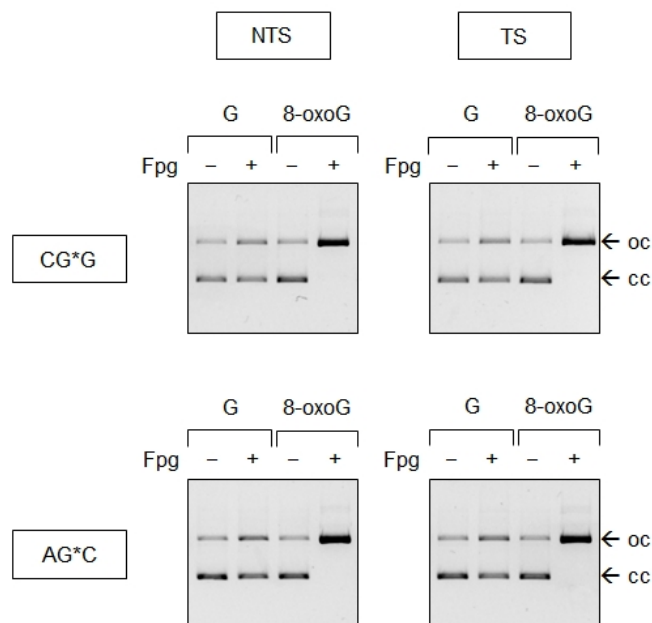


Abbildung 3-3 Nachweis der Anwesenheit von 8-oxoG innerhalb der Vektor-DNA. Repräsentative Agarosegele von Plasmiden mit 8-oxoG in verschiedenen DNA-Sequenzkontexten innerhalb des nicht-transkribierten (NTS) oder des transkribierten DNA-Strangs (TS) des 5'-UTR des EGFP-Gens nach Inkubation mit Fpg. Die Pfeile kennzeichnen jeweils die Position der offenen zirkulären (oc) und der kovalent geschlossenen (cc) Plasmidform. Jede der angegebenen Positionen von 8-oxoG entspricht jeweils einem separaten Vektor (siehe Abbildung 3-1).

### *3.1.2 8-oxoG im Sequenzkontext 5'-C[8-oxoG]G inhibiert unabhängig vom DNA-Strang die Genexpression schwächer als 8-oxoG im Sequenzkontext 5'-A[8-oxoG]C*

Um zu untersuchen wie sich der lokale DNA-Sequenzkontext eines einzelnen 8-oxoG auf die von diesem ausgelöste Inhibierung der Genexpression auswirkt, wurde die EGFP-Expression der Reportervektoren, die 8-oxoG im 5'-A[8-oxoG]C-Kontext bzw. im 5'-C[8-oxoG]G-Kontext im nicht-transkribierten bzw. dem transkribierten DNA-Strang enthielten, in HeLa-Zellen analysiert (siehe Kapitel 2.2.12.2). Dabei zeigten die Konstrukte unabhängig von der 8-oxoG enthaltenden Sequenz 8 Stunden nach der Transfektion eine ungefähr identische Expression im Vergleich zu ihren entsprechenden G-enthaltenden Kontrollvektoren (Abbildung 3-4). Dies zeigt einerseits, dass es sich bei der von 8-oxoG verursachten Inhibierung der Gentranskription nicht um eine direkte Blockade der Transkription handelt, und andererseits, dass bei der Transfektion jeweils dieselbe Menge an transkribierbarer DNA in die Zellen gelangt ist, unabhängig davon, ob die Vektoren 8-oxoG enthielten oder nicht. Zu späteren Zeitpunkten zeigt sich jedoch bei den Konstrukten mit 8-oxoG im Sequenzkontext 5'-A[8-oxoG]C eine starke, mit der Zeit stärker werdende Reduktion der Genexpression verglichen zur Kontrolle. 24 Stunden nach der Transfektion ist sie um etwa 40 % erniedrigt, nach 48 Stunden sogar um 50 %. Diese Stärke der Expressionshemmung ist unabhängig davon, ob sich die Läsion im nicht-transkribierten oder transkribierten DNA-Strang befindet. Dahingegen ist die Expression des 5'-C[8-oxoG]G-Konstrukts im Vergleich zu seiner Kontrolle nur marginal erniedrigt. Und auch in diesem Fall spielt es keine Rolle welcher DNA-Strang die Modifikation enthält. All dies zeigt, dass der lokale DNA-Sequenzkontext unabhängig vom DNA-Strang, in dem sich 8-oxoG befindet, einen bestimmenden Faktor für die Stärke des inhibitorischen Effekts eines einzelnen 8-oxoG darstellt.

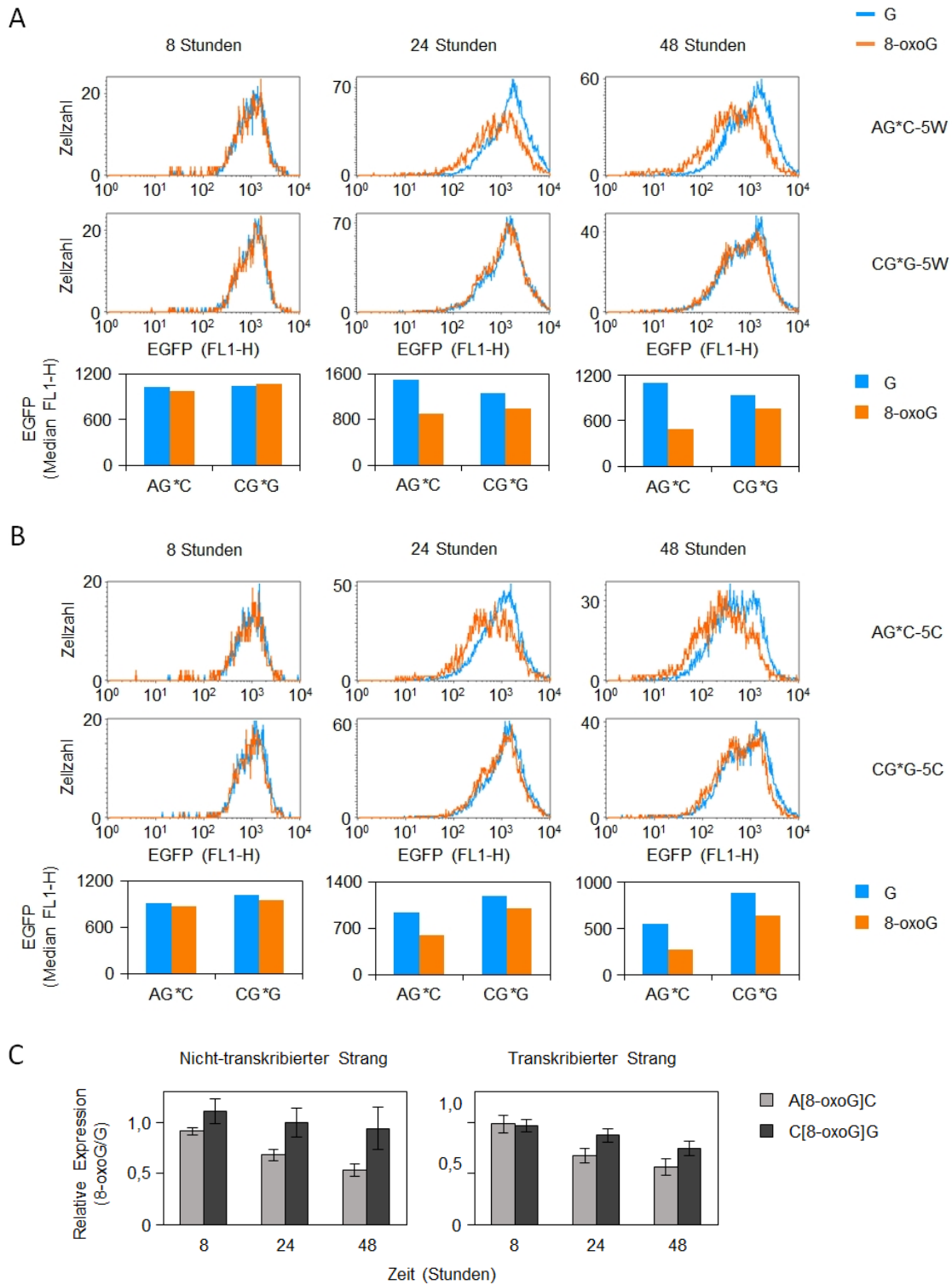


Abbildung 3-4 Einfluss des lokalen DNA-Sequenzkontextes eines einzelnen 8-oxoG im 5'-UTR des EGFP-Gens auf dessen Genexpression. Analyse der EGFP-Expression in HeLa-Zellen transfiziert mit Reportervektoren, die entweder G oder 8-oxoG in den Kontexten 5'-AG\*C bzw. 5'-CG\*G enthielten. (A + B) Überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Expression (FL1-H) pro Zelle und deren quantitative Auswertung nach Transfektion von Vektoren, die die Modifikation im nicht-transkribierten (A) oder im transkribierten DNA-Strang (B) enthielten. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment. (C) EGFP-Expression der 8-oxoG-enthaltenden Vektoren relativ zur G-enthaltenden Kontrolle. Mittelwert aus insgesamt sechs Transfektionen mit zwei unabhängig voneinander hergestellten G/8-oxoG-Vektorpaaren ( $\pm$  Standardabweichung).



Nach der Identifizierung des DNA-Sequenzkontextes in direkter Nachbarschaft zu 8-oxoG als bestimmender Faktor für die Stärke der transkriptionellen Inhibition sollte nun geklärt werden, wodurch genau die Sequenzabhängigkeit dieses Effekts bedingt wird. Dass der Effekt nicht unmittelbar nach der Transfektion der Reportervektoren, sondern erst nach einer gewissen Inkubationszeit auftritt, lässt darauf schließen, dass 8-oxoG nicht direkt die RNA-Polymerase blockiert, sondern stattdessen erst durch intrazelluläre Prozessierung in eine transkriptionsblockierende Struktur umgewandelt wird. Tatsächlich hat die Arbeit von Kitsera et al. (2011) gezeigt, dass wenn Vektoren mit einem einzelnen 8-oxoG innerhalb des EGFP-kodierenden Bereichs in embryonale Fibroblasten von *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen transfiziert wurden, kein inhibitorischer Effekt von 8-oxoG nachweisbar ist. Dies zeigt, dass die Exzision von 8-oxoG durch die 8-Oxoguanin-DNA-Glykosylase (OGG1), und somit die Initiation der Basen-Exzisions-Reparatur, eine kritische Rolle bei der Entstehung dieser Inhibition spielt. Bei dieser durch OGG1 katalysierten Exzision von 8-oxoG aus der DNA handelt es sich um einen hochkomplexen, enzymatischen Mechanismus, der zu einer temporären Verformung der DNA-Helix führt (Bruner et al., 2000) – ein Prozess, der wiederum sterischen Einflüssen des lokalen DNA-Sequenzkontextes unterworfen sein könnte.

### *3.1.3 Die Exzision von 8-oxoG aus dem 5'-C[8-oxoG]G-Sequenzkontext ist schwach im Vergleich zur Exzision aus dem 5'-A[8-oxoG]C-Sequenzkontext*

Um Einflüsse des DNA-Sequenzkontextes auf die Exzisionseffizienz von OGG1 zu untersuchen, wurde in den Vektoren pZAJ-5W/5C-AGC und pZAJ-5W/5C-CGG, die jeweils ein einzelnes 8-oxoG in unterschiedlichem DNA-Sequenzkontexten enthalten, ein Cleavage Assay mit rekombinantem, humanem OGG1 durchgeführt (siehe Kapitel 2.2.9.2). Die Konversion der superhelikalen Plasmidform in die offen zirkuläre nach der Exzision von 8-oxoG und der damit verbundenen Bildung eines Einzelstrangbruchs wurde quantitativ bestimmt. Bei OGG1 handelt es sich um eine bifunktionelle DNA-Glykosylase, die in der Lage ist durch die ihr eigene  $\beta$ -Lyase-Aktivität die AP-Läsion, die durch die Exzision der modifizierten Base entsteht, in einen DNA-Einzelstrangbruch umzuwandeln (Nash et al., 1996). Allerdings ist diese  $\beta$ -Lyase-Aktivität um ein Vielfaches langsamer als die Glykosylase-Aktivität des OGG1 (Hegde et al., 2008). Daher wurde jeder Reaktion zusätzlich die bakterielle Endonuklease IV (Endo IV) zugesetzt, um sicher zu stellen, dass nach der einstündigen Inkubation alle gebildeten AP-Läsionen in einen, im Agarosegel nachweisbaren Einzelstrangbruch umgewandelt worden sind. Für den Versuch wurden jeweils nur die 8-oxoG-enthaltenden Vektoren eingesetzt. Es zeigt sich, dass die Kontrolle, die ohne Enzym inkubiert wurde, bei allen verwendeten Plasmiden zum größten Teil in der intakten, superhelikalen Form vorliegt (Abbildung 3-5). Auch die Probe, die nur Endonuklease IV, aber nicht OGG1 enthielt, zeigt bei allen Vektoren kaum Zunahme der offen zirkulären Form. Dies beweist, dass Endonuklease IV unter den verwendeten Reaktionsbedingungen

keine signifikante unspezifische Strang-Cleavageaktivität besitzt. Hingegen wurde die Plasmid-DNA, die nur mit der höchsten verwendeten Menge an OGG1 inkubiert wurde, überwiegend in die offen zirkuläre Form überführt. Diese Kontrolle zeigt, dass OGG1 tatsächlich in der Lage ist 8-oxoG bis zu einen Einzelstrangbruch zu prozessieren. Allerdings reicht diese Aktivität nicht, um eine vollständige Umsetzung der verwendeten Plasmid-DNA zu erreichen. In Anwesenheit von OGG1 und Endonuklease IV ist zu erkennen, dass die Exzision von 8-oxoG proportional zur OGG1-Menge zunimmt. Dies gilt sowohl für 8-oxoG im 5'-A[8-oxoG]C, als auch im 5'-C[8-oxoG]G-Sequenzkontext. Allerdings ist ein deutlicher Unterschied in der Netto-Exzisionsaktivität zu beobachten: 8-oxoG wird aus dem 5'-A[8-oxoG]C-Kontext ungefähr dreimal effizienter entfernt als aus dem 5'-C[8-oxoG]G-Kontext. Dies wird dadurch deutlich, dass die dreifache Menge an OGG1 benötigt wird, um in beiden Substraten das gleiche Maß an Exzision zu erreichen. Die Tatsache, dass dieser Unterschied sowohl bei einer Positionierung von 8-oxoG im nicht-transkribierten DNA-Strang als auch im transkribierten DNA-Strang zu beobachten ist, zeigt, dass es keine strangabhängigen Einflüsse auf die Exzisionsaktivität von OGG1 gibt.

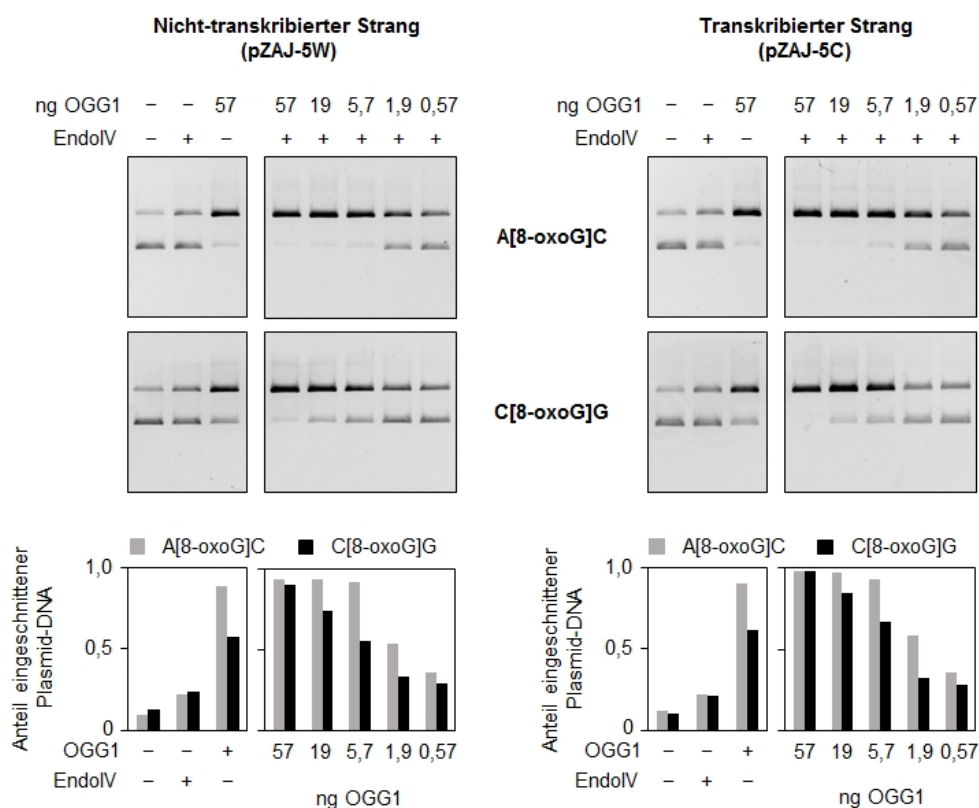


Abbildung 3-5 Einfluss des lokalen DNA-Sequenzkontexts von 8-oxoG auf die Einschnittsaktivität von rekombinanterem OGG1 in Anwesenheit von Endonuklease IV. Repräsentative Agarosegele (oben) und quantitative Analyse des Anteils an eingeschnittener Plasmid-DNA (unten) von Vektoren, die ein einzelnes 8-oxoG in verschiedenen DNA-Sequenzkontexten im nicht-transkribierten (NTS, links) oder transkribierten DNA Strang (TS, rechts) des 5'-UTRs des EGFP-Gens enthielten, nach deren Inkubation mit rekombinanten OGG1 und Endonuklease IV (Endo IV).

Um auszuschließen, dass die im vorangegangenen Experiment beobachtete Sequenzabhängigkeit der Exzision durch eine Sequenzabhängigkeit der Endonuklease IV bedingt wird, wurde derselbe Versuch ohne Zugabe von EndoIV wiederholt. Erneut liegt die ohne Enzym inkubierte Plasmid-DNA fast vollständig in der superhelikalen Form vor (Abbildung 3-6). Es lässt sich feststellen, dass ohne Endonuklease IV die allgemeine Exzisionsaktivität schwächer erscheint, da auch mit der höchsten verwendeten OGG1-Menge keine vollständige Umwandlung von der superhelikalen in die offenzirkuläre Form zu beobachten ist. Dies zeigt erneut, dass OGG1 zwar in der Lage ist AP-Läsionen in Einzelstrangbrüche umzusetzen, allerdings um einiges langsamer als die Endonuklease IV. Somit sind am Ende der Inkubationszeit nicht alle entstandenen AP-Läsionen weiter prozessiert worden und im Agarosegel nicht nachzuweisen. Wie auch im vorherigen Experiment nimmt in diesem Versuch der Anteil der offen zirkulären Form proportional zur Menge an OGG1 zu, wobei 8-oxoG erneut aus dem 5'-A[8-oxoG]C-Kontext besser ausgeschnitten wird als aus dem 5'-C[8-oxoG]G-Kontext. Es konnte ebenfalls kein Unterschied in der Sequenzabhängigkeit zwischen 8-oxoG im nicht-transkribierten und im transkribierten DNA-Strang nachgewiesen werden.

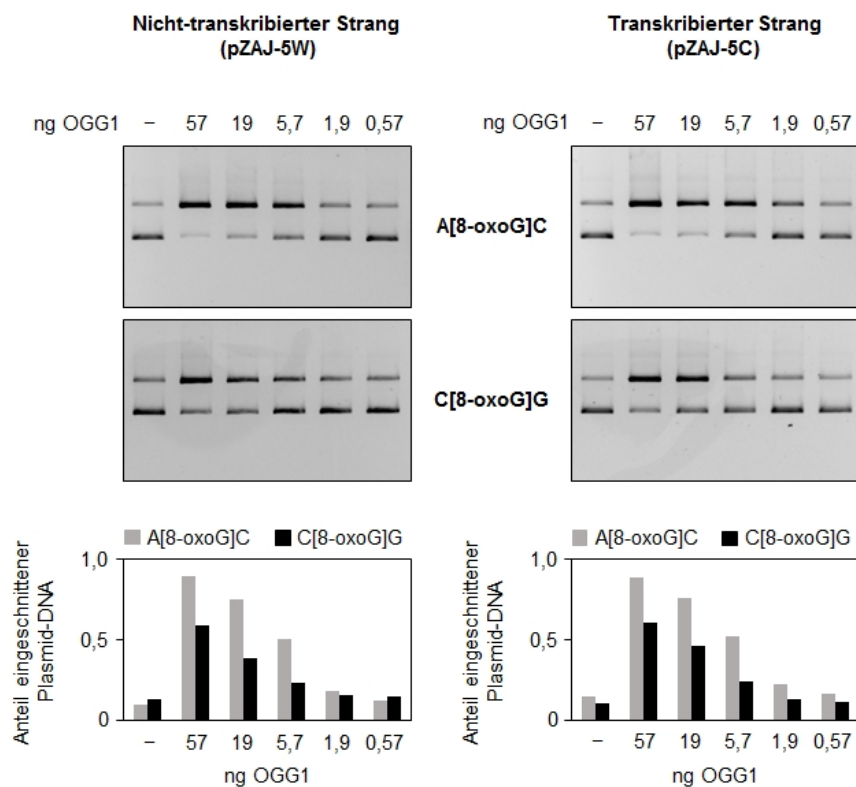


Abbildung 3-6 Einfluss des lokalen DNA-Sequenzkontexts eines einzelnen 8-oxoG auf die Einschnittsaktivität von rekombinantem OGG1 in Abwesenheit von Endonuklease IV. Repräsentative Agarosegele (oben) und quantitative Analyse des Anteils an eingeschnittener Plasmid-DNA (unten) von Vektoren, die ein einzelnes 8-oxoG in verschiedenen DNA-Sequenzkontexten im nicht-transkribierten (NTS, links) oder transkribierten DNA-Strang (TS, rechts) des 5'-UTRs des EGFP-Gens enthielten, nach deren Inkubation mit rekombinantem OGG1.

OGG1 existiert in Zellen nicht isoliert, was bedeutet, dass seine katalytische Aktivität Modulationen durch andere Proteine unterworfen ist. Dies kann beispielsweise durch posttranslationale Modifizierungen des OGG1 geschehen, oder durch Protein-Protein-Interaktionen mit anderen BER-Komponenten wie beispielsweise APE1 (Kapitel 1.4.1). Aus diesem Grund wurden in weiteren Versuchen Gesamtzellextrakte von HeLa-Zellen im Cleavage-Assay verwendet (siehe Kapitel 2.2.4.1 und 2.2.9.1). Allerdings erwiesen sich Extrakte von Wildtyp-HeLa-Zellen als ungeeignet, da selbst bei der höchstmöglichen Proteinmenge keine zufriedenstellende Umsetzung des 8-oxoG-enthaltenden Vektors stattfand (Anhang IV-2). Dies steht im Einklang mit der verhältnismäßig geringen OGG1-Menge innerhalb einer Zelle und der bereits beobachteten niedrigen 8-oxoG-Cleavage-Aktivität von Zellextrakten (Cappelli et al., 2000). Aufgrund dessen wurden für die Gewinnung exzisionsfähiger Extrakte HeLa-Zellen verwendet, die zusätzlich ein OGG1-GFP-Fusionsprotein überexprimieren (Campalans et al. 2007), (Amouroux et al. 2010) und somit eine größere Exzisions-Aktivität aufweisen (Anhang IV-2). Tatsächlich führt die Inkubation der Vektor-DNA mit diesen Extrakten zu einer konzentrationsabhängigen Inzision der 8-oxoG-enthaltenden Plasmid-DNA, wobei eine vollständige Inzision des 8-oxoG-enthaltenden Vektors bei der höchsten verwendeten Proteinmenge nur im Falle des 5'-A[8-oxoG]C-Kontexts erreicht wurde (Abbildung 3-7). Unabhängig vom DNA-Strang, in dem es positioniert war, wurde 8-oxoG aus dem 5'-A[8-oxoG]C-Kontext ungefähr viermal effizienter entfernt als aus dem 5'-C[8-oxoG]G-Kontext. Dieses Ergebnis, das in Übereinstimmung mit den mit rekombinantem OGG1 erhaltenen Ergebnissen ist, zeigt, dass auch in diesem etwas physiologischeren *in vitro*-System die Exzision von 8-oxoG aus der Vektor-DNA abhängig von den benachbarten Nukleotiden der modifizierten Base ist.

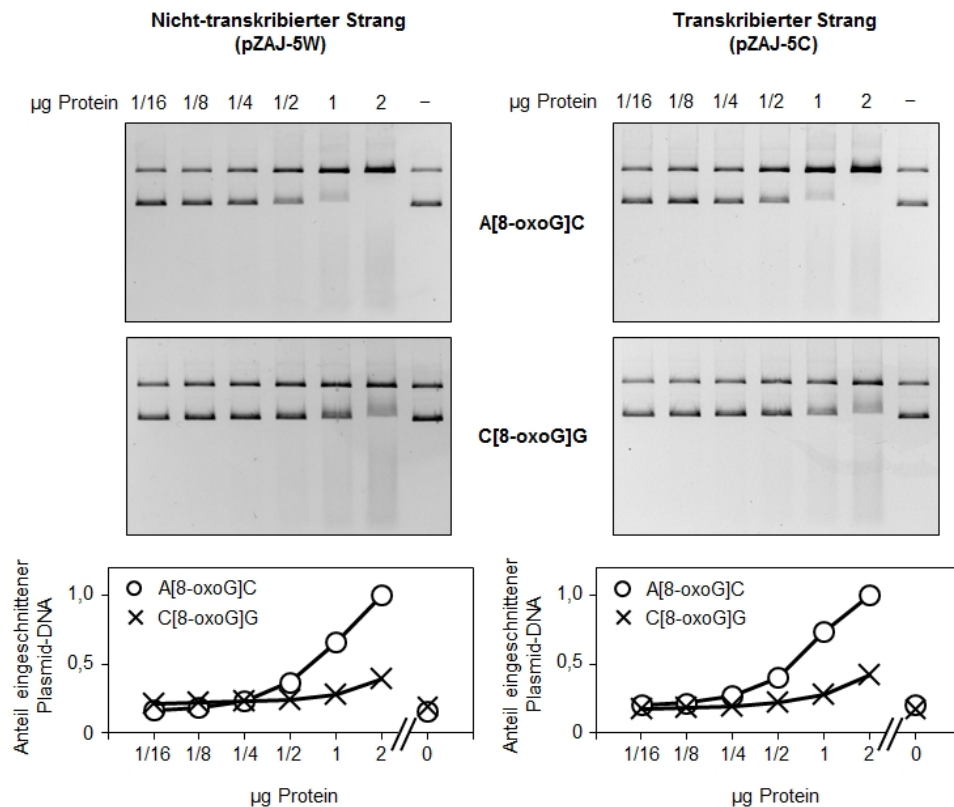


Abbildung 3-7 Einfluss des lokalen DNA-Sequenzkontexts eines einzelnen 8-oxoG auf dessen Exzision durch Zellextrakte aus HeLa-Zellen mit OGG1-GFP-Überexpression. Repräsentative Agarosegele (oben) und quantitative Analyse des Anteils an eingeschnittener Plasmid-DNA (unten) von Vektoren die ein einzelnes 8-oxoG in verschiedenen DNA-Sequenzkontexten im nicht-transkribierten (NTS, links) oder transkribierten DNA-Strang (TS, rechts) des 5'-UTRs des EGFP-Gens enthielten, nach deren Inkubation mit Zellextrakten aus HeLa-Zellen mit OGG1-GFP-Überexpression.

Bei allen bisher durchgeführten Experimenten wurde außer Acht gelassen, dass für OGG1 Gen-Polymorphismen (SNP) existieren. Da der Ser326Cys-Polymorphismus der am umfassendsten untersuchte SNP darstellt und ihm auch Auswirkungen auf die Reparaturkapazität von OGG1 zugeschrieben werden (Kohno et al., 1998), sollte nun untersucht werden, ob dieser Polymorphismus einen Einfluss auf die Sequenzabhängigkeit der Exzision von 8-oxoG hat. Dazu wurden erneut Cleavage-fähige Zellextrakte einer Zelllinie hergestellt, die ein OGG1-GFP-Fusionsprotein überexprimiert. Im Gegensatz zu den für die vorangegangenen Versuche verwendeten, OGG1(Ser)-GFP-überexprimierenden Zellen, liegt OGG1-GFP hier in der Cys-Variante vor. Der Cleavage-Assay zeigt, dass OGG1(Cys) 8-oxoG bevorzugt aus dem 5'-A[8-oxoG]C-Kontext entfernt, wobei in diesem Kontext eine drei-vierfach höhere Exzisionsaktivität als im 5'-C[8-oxoG]G-Kontext festgestellt wurde (Abbildung 3-8). Somit zeigt OGG1(Cys) dieselbe Sequenzpräferenz wie OGG1(Ser). Wie auch schon mehrfach beobachtet, spielt der DNA-Strang, in dem sich die Läsion befindet, keine Rolle für die Sequenzabhängigkeit der Exzision. Dies demonstriert, dass die durch den SNP verursachte Aminosäuresubstitution keine Auswirkungen auf die Sequenzabhängigkeit der Exzision von 8-oxoG durch OGG1 hat.

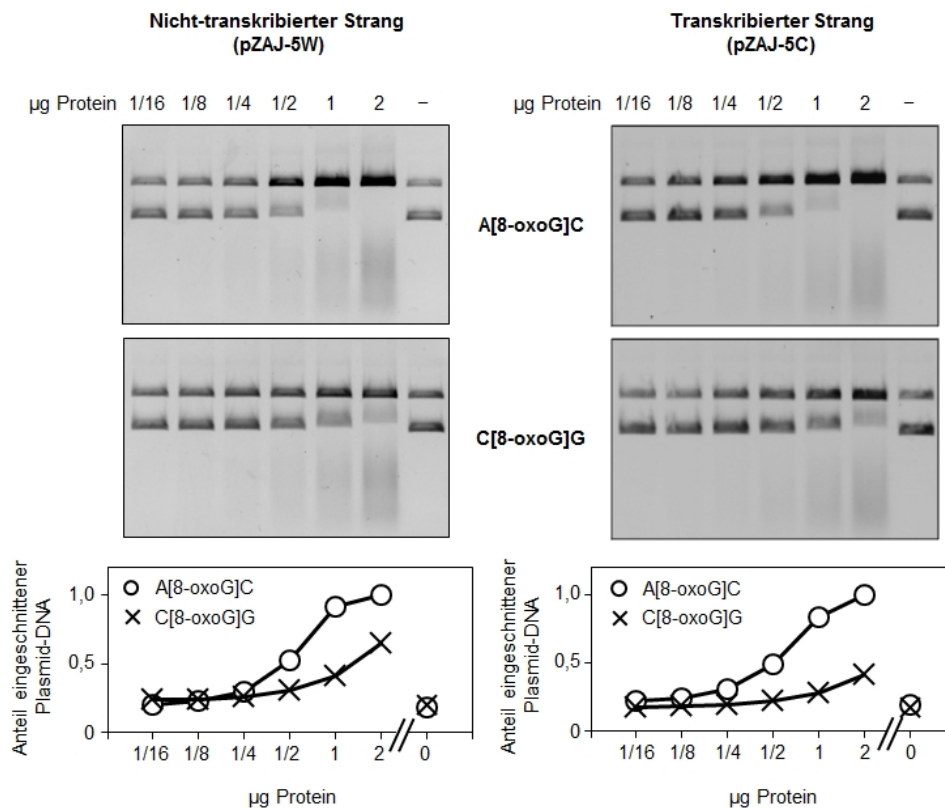


Abbildung 3-8 Einfluss des lokalen DNA-Sequenzkontexts eines einzelnen 8-oxoG auf dessen Exzision durch Zellextrakte aus HeLa-Zellen mit Überexpression der Cystein-Variante (Ser326Cys) von OGG1-GFP. Repräsentative Agarosegele (oben) und quantitative Analyse des Anteils an eingeschnittener Plasmid-DNA (unten) von Vektoren die ein einzelnes 8-oxoG in verschiedenen DNA-Sequenzkontexten im nicht-transkribierten (NTS, links) oder transkribierten DNA-Strang (TS, rechts) des 5'-UTRs des EGFP-Gens enthielten, nach deren Inkubation mit Zellextrakten aus HeLa-Zellen mit OGG1(Cys)-GFP-Überexpression.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die Effizienz der Exzision von 8-oxoG durch OGG1 von den unmittelbar benachbarten Nukleotiden (< 11) abhängig ist, und weder von dem DNA-Strang, in dem sich die Läsion befindet, noch von der vorliegenden OGG1-Variante beeinflusst wird. Außerdem bestätigen sie, dass die Sequenzabhängigkeit der Exzision die Grundlage der Sequenzabhängigkeit des inhibitorischen Effekts auf die Genexpression darstellt. Dies wiederum lässt vermuten, dass alle Faktoren, die die Exzisionsaktivität von OGG1 beeinflussen, auch einen Einfluss auf die Stärke des expressionshemmenden Effektes ausüben.

### 3.1.4 Der transkriptionshemmende Effekt und die Exzisionsaktivität von OGG1 in Anwesenheit von drei 8-oxoG in der Vektor-DNA sind stärker als bei einem einzelnen 8-oxoG

Ein Faktor, der möglicherweise die Exzisionsaktivität von OGG1 beeinflussen könnte, ist die Anzahl an 8-oxoG innerhalb der Vektor-DNA. Um zu untersuchen, welchen Einfluss dies auf den transkriptionshemmenden Effekt ausübt, wurden Reportervektoren konstruiert, die entweder ein oder drei 8-oxoG enthielten, und deren Effekt auf die Genexpression bestimmt. Als Position für den Einbau eines bzw. drei 8-oxoGs wurde das 5'-UTR des pZAJ-Vektors ausgewählt, weshalb der Vektor

pZAJ-5W-AGC (Einbau in den nicht transkribierten DNA-Strang) als Ausgangsvektor für die Plasmidkonstruktion verwendet wurde. Diese Entscheidung liegt darin begründet, dass die Guanine zwischen den Tandem-Nicking-Sites an dieser Stelle in den DNA-Sequenzkontexten 5'-C[8-oxoG]C, 5'-A[8-oxoG]C und 5'-T[8-oxoG]C vorliegen (Abbildung 3-9). Die Sequenzkontexte 5'-CGC und 5'-AGC haben sich in den vorherigen Versuchen als DNA-Sequenzkontexte, die bevorzugt von OGG1 prozessiert werden, erwiesen. Der Sequenzkontext 5'-TGC wurde bisher noch nicht untersucht, aber da es sich bei Thymin ebenfalls um eine Pyrimidinbase handelt, ist dieses Trinukleotid dem CGC-Trinukleotid strukturell sehr ähnlich. Dies wiederum legt den Schluss nahe, dass auch dieser Kontext eine Exzision von 8-oxoG begünstigt oder wenigstens nicht übermäßig blockiert. Zusätzlich zum Vektor pZAJ-AGC-5W wurde in diesem Fall auch der Vektor pJAZ-5W-AGC für die Plasmidkonstruktion verwendet (Diplomarbeit J. Allgayer, 2011). Dieser Vektor, der dem Vektor pZAJ-AGC-5W in der Position und der Sequenz der Tandem-Nicking-Stellen gleicht, kodiert für ein mit einem murinen Ornithindecaboxylase-Fragment (ODC) fusioniertes EGFP-Protein. Die Fusion mit diesem ODC-Fragment führt zu einem verstärkten proteasomalen Abbau des EGFP, sodass die Halbwertszeit dieses Proteins nur etwa 40 Minuten beträgt (Kitsera et al., 2007). Dies ermöglicht, im Gegensatz zu dem gewöhnlichen, langlebigen EGFP, eine Verfolgung der Genexpression in Echtzeit.

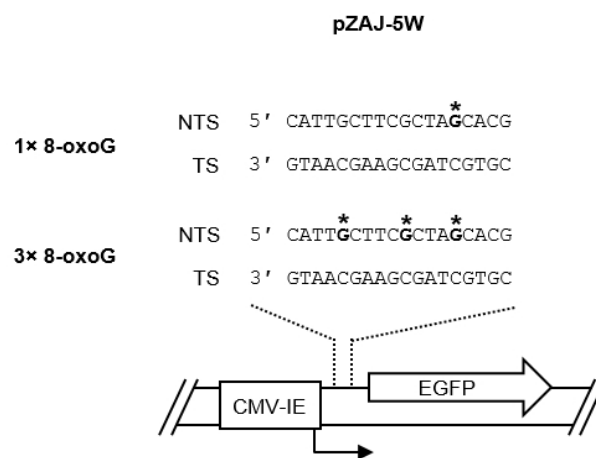


Abbildung 3-9 Schematische Darstellung des Reportergens, das ein einzelnes 8-oxoG oder drei 8-oxoG im 5'-UTR des EGFP-Gens besitzt. DNA-Sequenz des synthetischen 18 nt Oligonukleotids innerhalb des nicht transkribierten DNA-Strangs (NTS) des 5'-UTR des EGFP-Gens (breiter Pfeil). Die Sterne kennzeichnen die Positionen der modifizierten Guanine. Der gebrochene Pfeil zeigt den Start der Transkription, das Rechteck den CMV-IE-Promotor, unter dessen Kontrolle das Reportergen steht.

Der Einbau der synthetischen Oligonukleotide erfolgte parallel mit dem unmodifizierten Oligonukleotid, sowie den Oligonukleotiden mit einem bzw. drei 8-oxoG in beide Vektoren. Die Anwesenheit von 8-oxoG in den so hergestellten Vektoren wurde im Anschluss mittels eines Fpg-Verdau nachgewiesen (Anhang III-1).

In der Analyse der EGFP-Expression transfizierter HeLa-Zellen lässt sich anhand der unmodifizierten Kontrollplasmide deutlich erkennen, wie sich die unterschiedliche Lebensdauer des EGFP-Reporterproteins auf die Expressionskinetik auswirkt (Abbildung 3-10). Im Fall des stabilen EGFP zeigt sich ein Anstieg der EGFP-Expression in den ersten 24 Stunden nach der Transfektion und ein kleiner Abfall nach 48 Stunden (Abbildung 3-10 A, blaue Linie). Dahingegen erreicht die Expression des kurzlebigen EGFP ihr Maximum bereits zwischen 8 und 12 Stunden nach der Transfektion, nimmt danach rapide ab und ist spätestens 48 Stunden nach der Transfektion kaum noch nachweisbar. Dies zeigt, dass die Expression des auf der Plasmid-DNA kodierten EGFPs bereits nach weniger als 24 Stunden intrazellulär stillgelegt wird, was allerdings im Falle des langlebigen EGFP durch die Akkumulation des Proteins verschleiert und erst durch Verwendung des kurzlebigen EGFP sichtbar wird. Trotz dieser unterschiedlichen Expressionskinetik der verwendeten EGFP-Reporterproteine ist in beiden Vektoren ein eindeutiger Effekt von 8-oxoG zu beobachten. 6 Stunden nach der Transfektion entspricht die Expression der mit den 8-oxoG-enthaltenen Vektoren transfizierten Zellen der Expression der mit den Kontrollvektoren transfizierten Zellen. Dies bestätigt erneut, dass dieselben DNA-Mengen in die Zellen eingebracht wurden. Ab 12 Stunden nach der Transfektion ist dann eine Reduktion der Genexpression der einfach-8-oxoG-enthaltenden Vektoren zu beobachten, die im Laufe der Zeit größer wurde (Abbildung 3-10 A, gelbe Linie). Plasmide mit drei 8-oxoG innerhalb der Vektor-DNA zeigen ebenfalls eine zeitabhängige Verminderung der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 3-10 A, braune Linie), allerdings ist diese Verminderung um ein Vielfaches stärker als im Falle des einzelnen 8-oxoG. Bereits 12 Stunden nach der Transfektion beträgt die Expression des Plasmids mit drei 8-oxoGs nur ca. 50 % (sowohl in pZAJ, als auch in pJAZ) im Vergleich der Kontrolle, wohingegen ein einzelnes 8-oxoG zu diesem Zeitpunkt nur eine Verringerung um ungefähr 10 % bedingt (Abbildung 3-10 B). Dies belegt, dass die Anzahl der in einem Plasmid-Molekül vorhandenen 8-oxoG ebenfalls einen Einfluss auf die Stärke des inhibitorischen Effekts von 8-oxoG ausübt. Ein naheliegender Grund für diese Beobachtung ist, dass das Vorhandensein von mehreren Läsionen die Wahrscheinlichkeit, dass eine dieser Läsionen von OGG1 erkannt und in einen transkriptionshemmendes Reparaturintermediat überführt wird, erhöht und somit eine Inhibierung der Gentranskription früher auftritt als im Falle des einzelnen 8-oxoG.



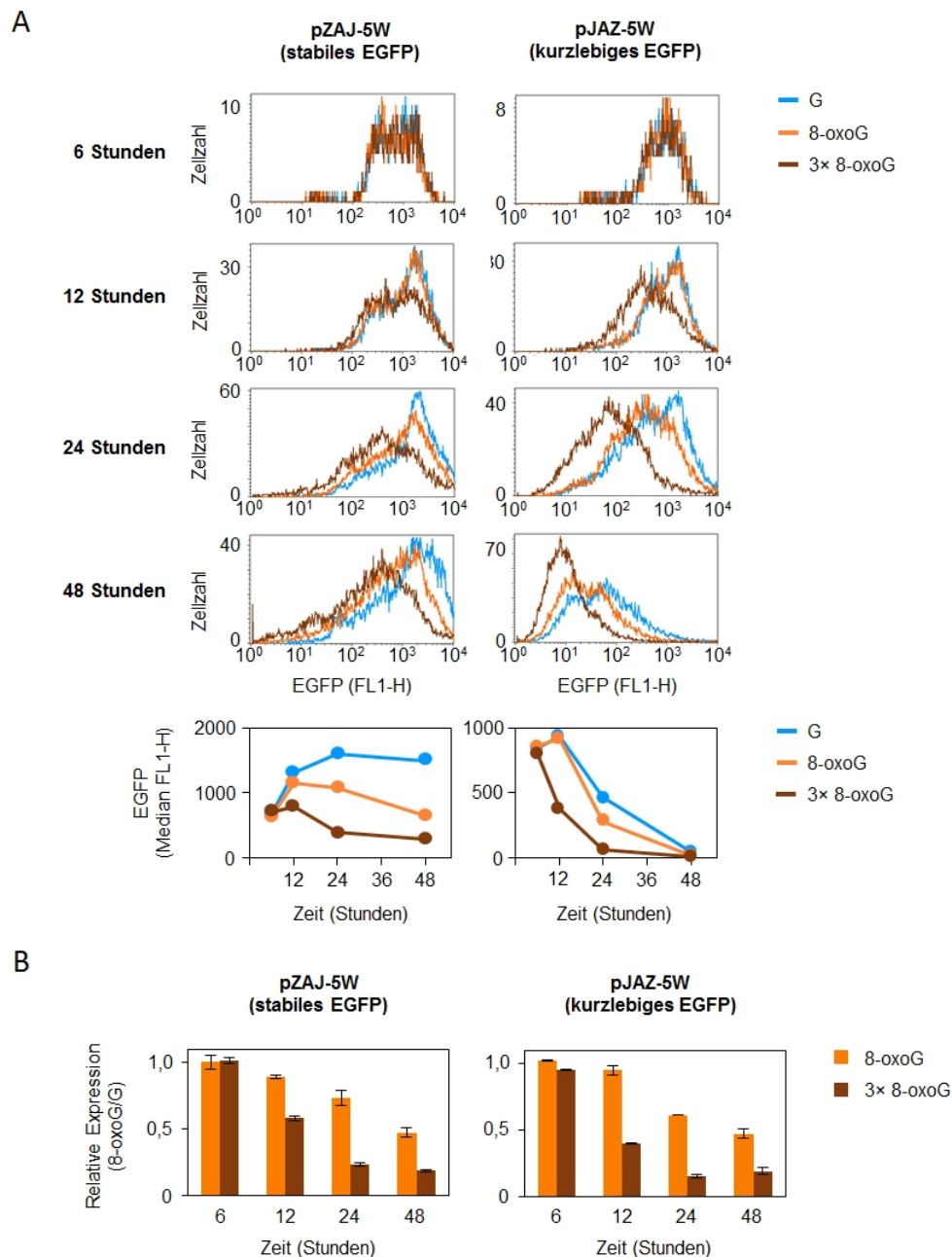


Abbildung 3-10 Einfluss der Anzahl an 8-oxoG innerhalb der Vektor-DNA auf den transkriptionshemmenden Effekt von 8-oxoG. Expression eines stabilen (links) oder kurzlebigen EGFPs (rechts) in HeLa-Zellen nach Transfektion mit Reportervektoren, die kein, ein oder drei 8-oxoG im nicht-transkribierten DNA Strang des 5'-UTR besitzen. (A) Überlagerte Verteilungs-Diagramme der EGFP-Expression pro Zelle und Quantifizierung eines repräsentativen Experiments. (B) EGFP-Expression der 8-oxoG-enthaltenden Vektoren relativ zum G-enthaltenden Kontrollvektor (G). Mittelwert aus zwei unabhängigen Transfektionen ( $\pm$  Variationsbreite).

Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde mit den Vektoren ein Cleavage-Assay mit rekombinanten OGG1 durchgeführt. Dabei wurden in diesem Fall nur die aus pZAJ-5W-AGC hervorgegangenen Vektoren verwendet. Bei der quantitativen Analyse zeigt sich, dass das G-enthaltende Kontrollplasmid kaum von OGG1 umgesetzt wird, da der größte Teil der Plasmid-DNA in der superhelikalen Form vorliegt (Abbildung 3-11). Die Vektoren, die ein bzw. drei 8-oxoG enthalten, liegen bei der höchsten verwendeten OGG1-Menge fast vollständig in der offen-zirkulären Form vor.

Deren Anteil sinkt mit abnehmender OGG1-Menge. Dabei ist der Anteil der offen zirkulären Form der Plasmide mit drei 8-oxoG immer geringfügig höher als der Anteil offen zirkulärer DNA bei den Plasmiden mit nur einem 8-oxoG aber derselben Menge an OGG1. Da bereits ein Einzelstrangbruch in der Vektor-DNA ausreicht, um die Konversion in die offen zirkuläre Form herbeizuführen, deutet dieses Ergebnis tatsächlich darauf hin, dass die erhöhte Exzisionsrate im Substrat mit drei 8-oxoG vorrangig dadurch herbeigeführt wird, dass die Wahrscheinlichkeit, dass eine Modifikation von OGG1 erkannt und ausgeschnitten wird, in diesem Vektor durch die Häufung von 8-oxoG erhöht ist.

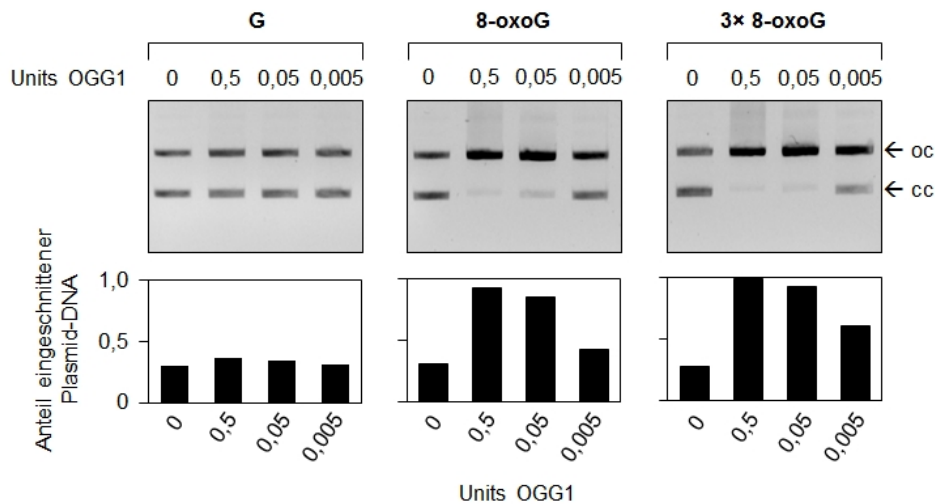


Abbildung 3-11 Einfluss der Anzahl an 8-oxoG in der Vektor-DNA auf die Einschnittsaktivität von rekombinantem OGG1. Repräsentative Agarosegelele (oben) und quantitative Analyse des Anteils an eingeschnittener Plasmid-DNA (unten) von Vektoren die kein (G), ein oder drei 8-oxoG im 5'-UTR des EGFP-Gens enthalten, nach Inkubation mit rekombinanten OGG1. Die Positionen der offen zirkulären (oc) und der kovalent geschlossenen Plasmidform (cc) sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

Insgesamt haben diese Versuche erneut bestätigt, dass die Exzisionsaktivität von OGG1 an 8-oxoG den entscheidenden Faktor für die Stärke des inhibitorischen Effekts eines einzelnen 8-oxoG auf die Genexpression darstellt und alles, was sich auf die Exzisionseffizienz auswirkt, auch gleichermaßen den expressionshemmenden Effekt beeinflusst. Folglich sollte auch die zelluläre Menge an OGG1 Auswirkungen auf die Stärke dieses Effekts haben. Durch HCR-Experimente in *Ogg1*<sup>-/-</sup>-MEFs (murinen embryonale Fibroblasten) konnte in der Tat gezeigt werden, dass in murinen Zellen die Exzision von 8-oxoG durch OGG1 die Voraussetzung für das Auftreten eines inhibitorischen Effekts auf die Genexpression darstellt (Kitsera et al., 2011), ob dies jedoch auch in menschlichen Zellen der Fall ist, ist bisher noch unklar.

### 3.1.5 8-oxoG inhibiert die Genexpression in humanen Zellen proportional zur Menge der spezifischen DNA-Glykosylase OGG1

Um die Rolle der intrazellulären Prozessierung von 8-oxoG durch OGG1 bei dessen transkriptionshemmenden Effekt in menschlichen Zellen zu untersuchen, wurde zuerst ausgehend

von HeLa-Zellen eine isogene Zelllinie generiert, bei der OGG1 permanent herunterreguliert war, und die Auswirkungen dieses Knockdowns auf den transkriptionshemmenden Effekt von 8-oxoG untersucht. Die dauerhafte Herunterregulation des OGG1-Gens in HeLa-Zellen erfolgte mit Hilfe des shRNA-Expressionsvektors pENTR/pSuper+ (Campeau et al., 2009). Zur Klonierung in den pENTR/pSuper+-Vektor wurden zwei verschiedene, auf der mRNA von OGG1 basierende shRNA-Sequenzen ausgewählt, deren korrespondierende Zielsequenz in allen 7 Transkript-Varianten der OGG1-mRNA auftritt. Die Klonierung und Verifizierung dieser Vektoren ist in Kapitel 2.2.7 und Anhang II-6 dargestellt. Nach stabiler Transfektion in HeLa-Zellen wurden insgesamt 14 Klone von Konstrukt 1 und 25 Klone von Konstrukt 2 erhalten und deren OGG1-Expression mittels Western Blot analysiert. Als Referenz dienten mit dem leeren pENTR/pSuper+-Vektor stabil transfizierte HeLa-Zellen (no sh). Kein Zellklon, der aus der Transfektion mit Konstrukt 1 hervorgegangen war, lieferte eine befriedigende Knockdown-Effizienz. Die Zellklone mit dem höchsten Maß an Genstilllegung (Klon 11, 12 und 24) entstammten alle der Transfektion mit Konstrukt 2, dessen Zielsequenz innerhalb des 2. Exons der OGG1-mRNA liegt (Abbildung 3-12 A). In der Western-Blot-Analyse zeigten alle drei Klone jeweils eine Verringerung der OGG1-Proteinmenge um etwa 70 % relativ zur Kontrollzelllinie (Abbildung 3-12 B) (siehe Kapitel 2.2.4.6). Da diese Klone auf der Proteinebene dasselbe Maß an Knockdown zeigten, wurden alle drei für das folgende Experiment verwendet.

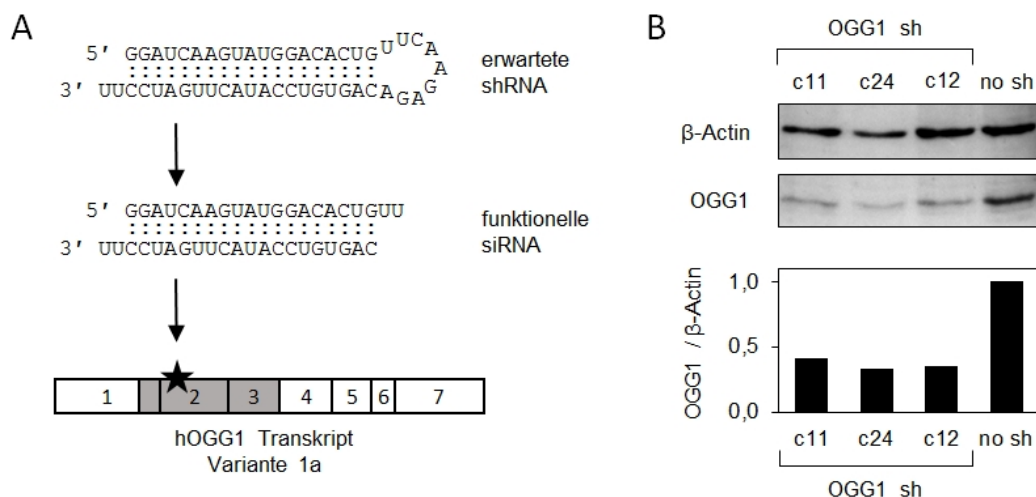


Abbildung 3-12 Knockdown von OGG1 in HeLa-Zellen mittels shRNA. (A) Sequenz der verwendeten shRNA (Konstrukt 2), vorhergesagte Struktur der erwarteten funktionellen siRNA und schematische Darstellung von deren Angriffspunkt im Transkript 1A des humanen OGG1-Gens. Graue Unterlegung zeigt die Bereiche des Transkripts, in denen die Sequenz in allen 7 Transkriptvarianten identisch ist. (B) Nachweis des Knockdowns von OGG1 mittels Western Blot.

Um den Einfluss eines OGG1-Knockdowns in menschlichen Zellen auf den inhibitorischen Effekt eines einzelnen 8-oxoG auf die Genexpression zu untersuchen, wurde das aus pZAJ-5W-AGC hergestellte G/8-oxoG-Vektorpaar verwendet, da in den vorangegangenen Versuchen bei einem 8-oxoG in dieser Position (5'-UTR, NTS) und diesem Sequenzkontext (5'-AG\*C) ein starker Effekt auf die Genexpression

zu beobachten war. Die EGFP-Expression dieser Vektoren wurde in den drei Klonen mit der höchsten Knockdown-Effizienz (Klon 11, 12 und 24) und zur Kontrolle in der mit dem Leervektor transfizierte Referenzzelllinie (no sh), sowie HeLa-Wildtyp-Zellen analysiert. Zum frühesten untersuchten Zeitpunkt (8 Stunden nach der Transfektion) ist die Expression der 8-oxoG- und G-enthaltenden Vektoren in allen Zelllinien identisch, was erneut bestätigt, dass der transkriptionshemmende Effekt von 8-oxoG indirekter Natur ist und jeweils dieselbe Menge an unmodifizierter und 8-oxoG-enthaltender DNA transfiziert wurde (Abbildung 3-13). Sowohl in Wildtyp-Zellen, als auch in der no sh-Zelllinie verursacht ein einzelnes 8-oxoG in der Vektor-DNA 24 Stunden nach der Transfektion eine um etwa 40 % verminderte Genexpression im Vergleich zum Guanin-enthaltenden Kontrollvektor. Diese steigt sich im weiteren Zeitverlauf auf 50 % relativ zur Kontrolle. In den Knockdown-Zelllinien hingegen ist deutlich zu sehen, dass die Expression des 8-oxoG-enthaltenden Plasmids 24 Stunden nach der Transfektion nur um knapp 15 % im Vergleich zum Kontrollplasmid vermindert ist. Auch 48 Stunden nach der Transfektion beträgt die Abnahme der Genexpression des 8-oxoG-enthaltenden Vektors nur 15-25 % relativ zur Kontrolle. Dies zeigt, dass in Abwesenheit von OGG1 8-oxoG keinen inhibitorischen Effekt auf die Genexpression ausübt. Der beobachtete, minimale negative Einfluss von 8-oxoG auf die Genexpression in den Knockdown-Zellen lässt sich dadurch erklären, dass trotz der hohen Knockdown-Effizienz immer noch ungefähr 30 % der ursprünglichen OGG1-Menge vorhanden sind, die in der Lage sind 8-oxoG auszuschneiden und dadurch die Genexpression zu inhibieren. Dieses Ergebnis beweist eindeutig, dass die Exzision von 8-oxoG durch die DNA-Glykosylase OGG1 und damit die Initiation der Basen-Exzisions-Reparatur auch in humanen Zellen einen essentiellen Schritt bei der Entstehung des transkriptionshemmenden Effekts von 8-oxoG darstellt.

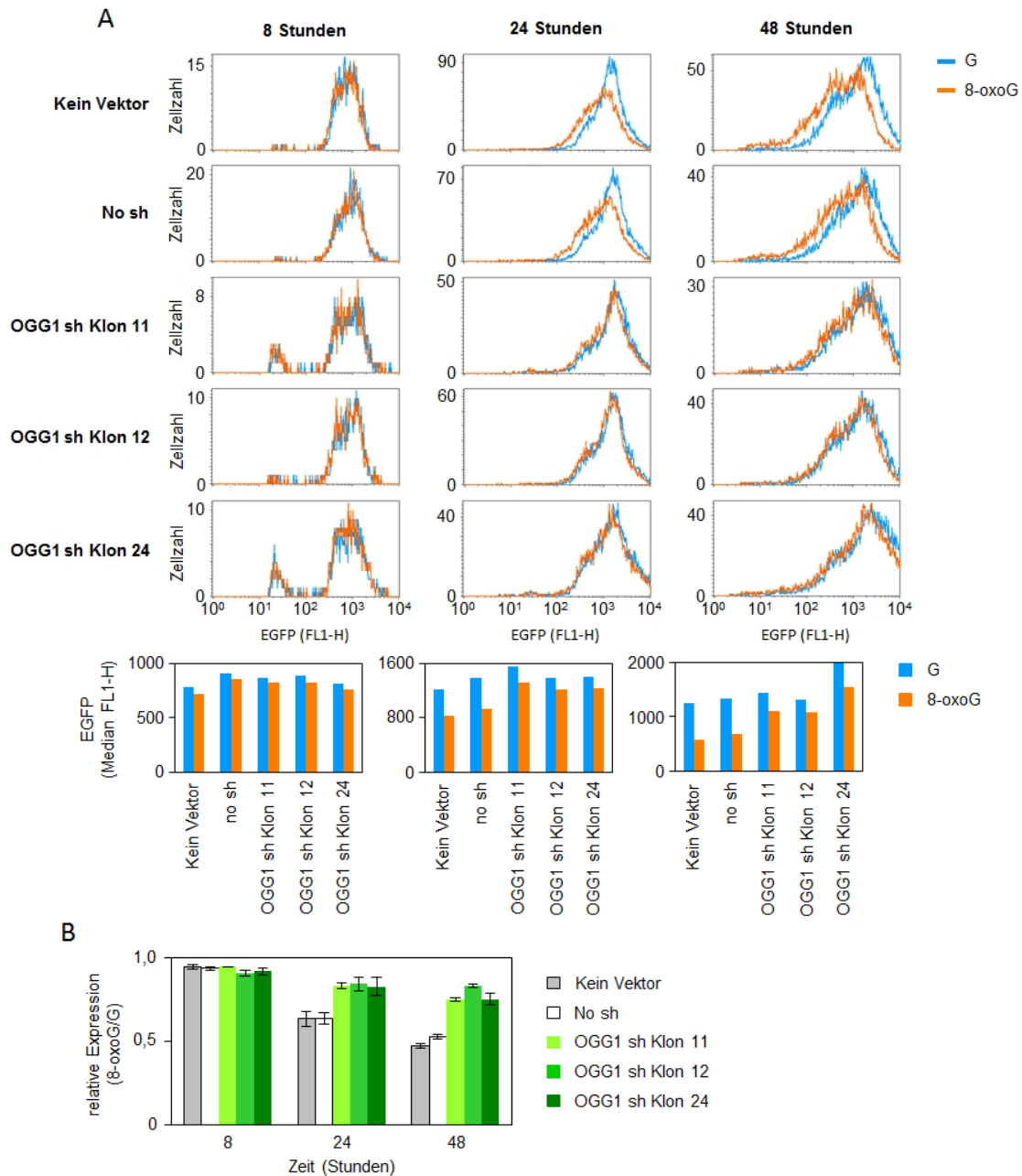


Abbildung 3-13 Einfluss des OGG1-Knockdowns auf die Expression eines Reportergens, das 8-oxoG innerhalb des NTS des 5'-UTR enthält. Durchflusszytometrische Analyse von drei OGG1-shRNA exprimierenden HeLa-Klonen (Klon 11, 12 und 24), sowie der mit dem Leervektor transfizierten Kontrolle (no sh) und HeLa-Wildtyp-Zellen (kein Vektor), die entweder mit dem 8-oxoG-enthaltenden Reportervektor oder dem Guanin-enthaltenden Kontrollvektor (G) transfiziert wurden. (A) Überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Expression (FL1-H) pro Zelle eines repräsentativen Experiments und deren quantitative Auswertung. (B) EGFP-Expression der 8-oxoG-enthaltenden Vektoren relativ zur G-enthaltenden Kontrolle. Mittelwert aus zwei Transfektionen mit unabhängig voneinander hergestellten G/8-oxoG-Vektorpaaren ( $\pm$  Variationsbreite).

Bei der Untersuchung des Effekts von mehreren 8-oxoG-Läsionen innerhalb der Vektor-DNA wurde eine positive Korrelation zwischen der Menge an 8-oxoG innerhalb der Vektor-DNA und der Stärke des transkriptionshemmenden Effekts festgestellt. Diese wurde allein darauf zurückgeführt, dass die Anwesenheit von multiplem 8-oxoG die Wahrscheinlichkeit einer Exzision der Modifikation durch OGG1 erhöht. Somit sollte auch der bei der Transfektion der Vektoren mit drei 8-oxoG beobachtete

Effekt durch den Knockdown von OGG1 beeinflusst werden. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die EGFP-Expression der Plasmide mit einem einzelnen bzw. drei 8-oxoG im 5'-UTR des EGFP-Gens in einer der drei HeLa-Zelllinien mit einem stabilen OGG1-Knockdown (Klon 12) und parallel dazu in der entsprechenden Kontrollzelllinie (no sh) analysiert. Unabhängig von der Lebensdauer des Reporterproteins ist zu erkennen, dass nach Transfektion der Plasmide mit einem einzelnen 8-oxoG in die OGG1-Knockdown-Zellen ein transkriptionshemmender Effekt erst 48 Stunden nach der Transfektion zu beobachten ist, während ein solcher in der no sh-Zelllinie schon nach 24 Stunden eine Reduktion der EGFP-Expression um 20-40 % verursacht (Abbildung 3-14). Im Falle der Plasmide mit drei 8-oxoGs ist nach Transfektion in die Knockdown-Zellen ebenfalls eine Verminderung des inhibitorischen Effekts zu erkennen, allerdings ist diese nicht vollständig: 24 Stunden nach der Transfektion ist die Genexpression 40 bzw. 60 % (in pZAJ bzw. pJAZ) im Vergleich zur G-enthaltenden Kontrolle erniedrigt, im Gegensatz zu 60 bzw. 80 % in der no sh-Kontrolle. Dies, sowie die nach 48 Stunden beobachtete minimale Reduktion der Genexpression im Falle eines einzelnen 8-oxoG, ist ebenfalls dadurch zu begründen, dass in den Knockdown-Zellen immer noch 30 % des ursprünglichen OGG1-Gehalts vorhanden sind, die immer noch in der Lage sind 8-oxoG aus der DNA auszuschneiden und somit die Bildung des transkriptionshemmenden Reparatur-Intermediats zu initiieren. Im Falle eines einzelnen 8-oxoG ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Läsion von OGG1 erkannt und ausgeschnitten wird, kleiner als im Falle der drei 8-oxoG, wodurch diese dementsprechend früher die Genexpression inhibieren können.

Die Abhängigkeit des transkriptionshemmenden Mechanismus von der Anwesenheit der DNA-Glykosylase OGG1 deutet darauf hin, dass nicht 8-oxoG direkt, sondern eines seiner Reparatur-Intermediate für die Blockade der Gentranskription verantwortlich ist. Um welches Intermediat oder welche Intermediate es sich dabei genau handelt, konnte jedoch bisher noch nicht näher geklärt werden. Durch die Exzision von 8-oxoG durch OGG1 entsteht als erstes eine AP-Läsion, die dann wiederum entweder durch die dem OGG1 eigene  $\beta$ -Lyase-Aktivität oder die AP-Endonuklease 1 (APE1) in einen DNA-Einzelstrangbruch überführt wird (Svilar et al., 2011). Für beide Läsionen konnte *in vitro* bereits ein Potential für die Inhibierung der RNA-Polymerase nachgewiesen werden (Kathe et al. 2004), (Tornaletti et al., 2006). Beide Strukturen stellen damit potentielle Auslöser des beobachteten transkriptionshemmenden Effekts dar.

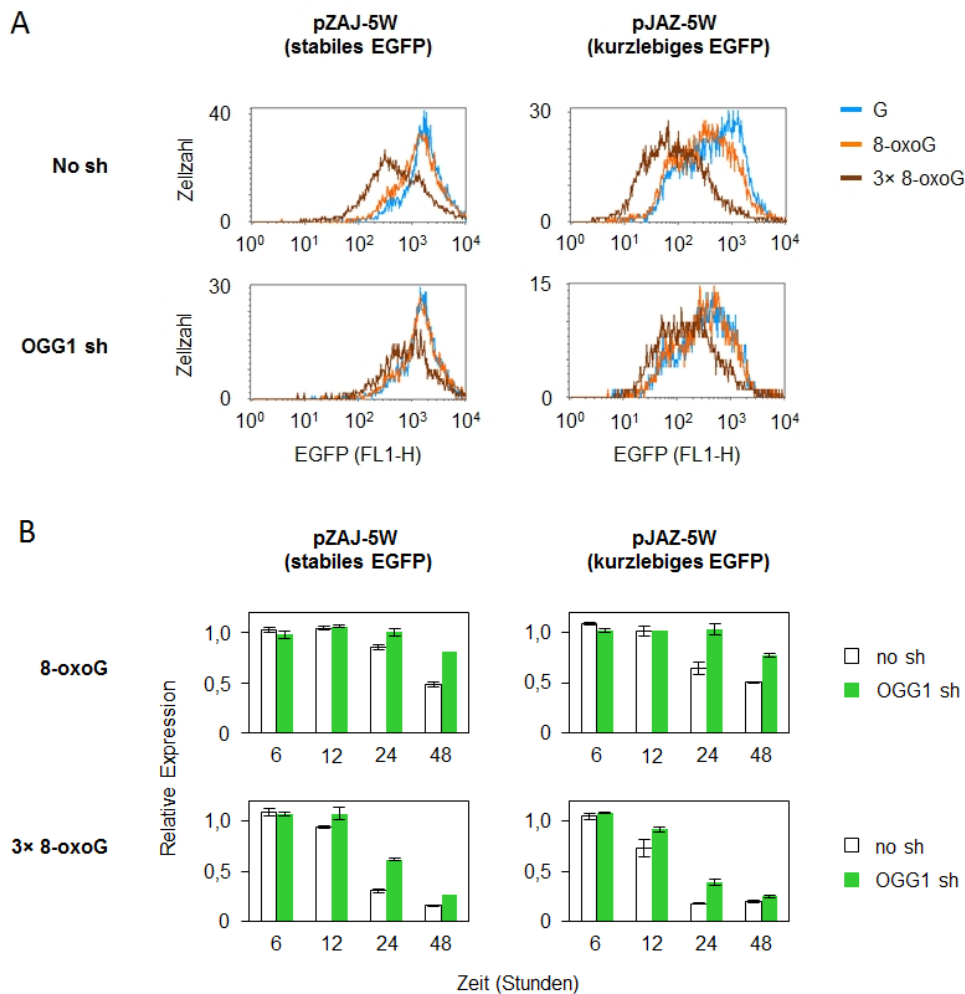


Abbildung 3-14 Einfluss des OGG1-Knockdowns auf die Expression eines Reportergens, das entweder ein oder drei 8-oxoG innerhalb des NTS des 5'-UTR enthält. EGFP-Expression von HeLa-Zellen mit stabilem OGG1-Knockdown (Klon 12) und der mit einem Leervektor stabil transfizierten Kontrolle, die mit für ein stabiles (links) oder kurzlebiges (rechts) EGFP kodierenden Reportervektoren, die kein, ein oder drei 8-oxoG enthielten, transfiziert wurden. (A) Überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Expression (FL1-H) pro Zelle 24 Stunden nach der Transfektion und die quantitative Auswertung eines repräsentativen Experiments. (B) EGFP-Expression der 8-oxoG-enhaltenden Vektoren relativ zur G-enhaltenden Kontrolle zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion. Mittelwert aus zwei unabhängigen Transfektionen ( $\pm$  Variationsbreite).

### 3.2 Die Generierung eines DNA-Einzelstrangbruchs durch APE1 ist Voraussetzung für das Auftreten eines negativen Effekts auf die Genexpression

Für die Untersuchung, welche Strukturen innerhalb der DNA die beobachtete Expressionshemmung bedingen, wäre eine Modulation der Expression und Aktivität von APE1, aufgrund dessen universeller Roller innerhalb der Basen-Exzisionsreparatur, von besonderem Interesse. Ein stabiler Knockdown analog zum bereits durchgeführten shRNA-vermittelten Knockdown von OGG1 ist jedoch leider nicht möglich, da der Knockout von APE1 in Mäusen zu einem letalen Phänotyp führt (Xanthoudakis et al., 1996). Somit ist eine Einflussnahme auf Ebene des APE1-Proteingehalts für *in vivo*-Systeme nicht praktikabel. Um dennoch feststellen zu können, welches der Reparatur-Intermediate letztendlich für

den beobachteten Effekt verantwortlich ist, wurden 8-oxoG-enhaltende Plasmide hergestellt, bei denen die das 8-oxoG flankierenden Phosphodiesterbindungen entweder auf einer Seite oder auf beiden durch ein Phosphothioat ersetzt wurden. Diese chemische Struktur, die sich von einem gewöhnlichen Phosphosäureester durch die Anwesenheit eines an das zentrale Phosphoratom gebundenen Schwefelatoms auszeichnet, gilt als inert gegenüber der enzymatischen Hydrolyse der Zucker-Phosphat-Bindung durch zahlreiche Nukleasen (Wilson et al., 1995). Dies sollte somit die Bildung eines Einzelstrangbruches im Laufe der BER verhindern und die Identifizierung der verantwortlichen Struktur ermöglichen. Als Zielvektor für den Einbau von 8-oxoG wurde in diesem Fall der pZAJ-Vektor ausgewählt, wobei die Läsion im nicht-transkribierten DNA-Strang innerhalb des EGFP-Gens positioniert wurde (Abbildung 3-15). An dieser Position befindet sich das einzelne 8-oxoG im Sequenzkontext 5'-C[8-oxoG]C, der in vorangegangenen Experimenten als Sequenzkontext mit der höchsten beobachteten Exzisionseffizienz und somit dem maximalen Einfluss auf die Genexpression identifiziert wurde (Kitsera et al., 2011). Einflüsse des die Läsion umgebenden DNA-Sequenzkontexts sollten somit für die folgenden Untersuchungen auf ein Minimum reduziert sein.

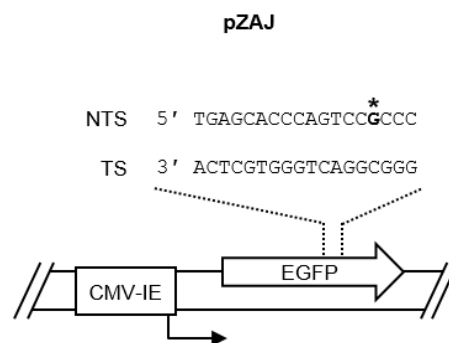


Abbildung 3-15 Schematische Darstellung des EGFP-Reportergens, das ein einzelnes 8-oxoG innerhalb des nicht-transkribierten DNA-Strangs besitzt. DNA-Sequenz des synthetischen 18 nt Oligonukleotids innerhalb des nicht-transkribierten DNA-Strangs (NTS) des EGFP-Gens (breiter Pfeil). Der Stern kennzeichnet die Position des modifizierten Guanins. Der gebrochene Pfeil zeigt den Start der Transkription, das Rechteck den CMV-IE-Promotor, unter dessen Kontrolle das Reportergen steht.

Die Herstellung dieser Vektoren erfolgte durch die bereits beschriebene Strangaustauschreaktion (Anhang III-2) (siehe Kapitel 2.2.8). Durch Einsatz entsprechend modifizierter, synthetischer Oligonukleotide wurden zusätzlich zu einem 8-oxoG-haltigen Vektor (pZAJ-Nt-8oG) und der G-enhaltenden Kontrolle (pZAJ-Nt-G) noch drei weitere, Phosphothioat-enhaltene Substrate hergestellt (Abbildung 3-16). Jeweils ein Vektor, in dem das Phosphatrückgrat auf der 5'- bzw. der 3'-Seite des 8-oxoGs durch ein Phosphothioat substituiert worden war (pZAJ-Nt-S\*8oG bzw. pZAJ-Nt-8oG\*S), und einer, bei dem die Läsion beidseitig von Phosphothioaten flankiert war (pZAJ-Nt-S\*8oG\*S).



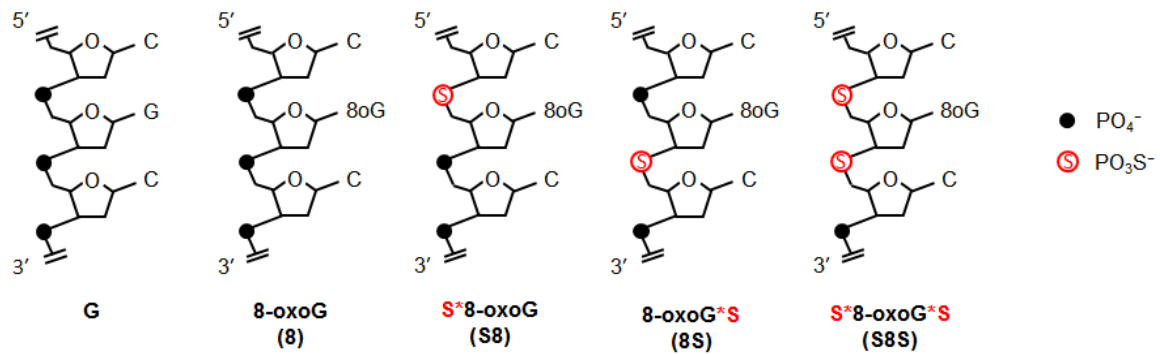


Abbildung 3-16 Schematische Darstellung der DNA-Rückgrat-Modifikationen innerhalb der für die Strangaustauschreaktion verwendeten Oligonukleotide. Gezeigt ist jeweils das modifizierte CGC-Trinukleotid. (G) stellt das unmodifizierte Kontrolloligonukleotid dar. Ausgefüllte schwarze Punkte entsprechen gewöhnlichen Phosphodiesterbindungen, rote Kreise Phosphothioatbindungen.

Die Anwesenheit von 8-oxoG in den hergestellten Reportervektoren wurde mittels Inkubation mit Fpg überprüft (Abbildung 3-17). Die Vektoren, die in Abwesenheit von PNK ligiert worden waren und in denen die Austauschreaktion daher mit 5'-unphosphorylierten Oligonukleotiden ablief, zeigten ausschließlich die offen zirkuläre Plasmidform. Dies beweist, dass der Austausch des nativen ssDNA-Fragments durch das synthetische Oligonukleotid bei allen hergestellten Vektoren vollständig abgelaufen ist. Ohne Phosphorylierung der Oligonukleotide ist eine beidseitige Ligation in die Vektor-DNA nicht möglich und somit verbleibt ein Einzelstrangbruch im Plasmid, der die Ausbildung der superhelikalen Form verhindert. Das Guanin-enthaltende Kontrollplasmid hat durch die Inkubation mit Fpg kaum Veränderung erfahren, wohingegen die Plasmide mit 8-oxoG und S\*8-oxoG vollständig in die offen zirkuläre Form überführt wurden. Damit ist gezeigt, dass jedes dieser Plasmid-Moleküle die DNA-Basenmodifikation enthält. Bei den Plasmiden mit 8-oxoG\*S und S\*8-oxoG\*S ist trotz überwiegender Konversion zur offen zirkulären Form noch ein geringer Anteil an superhelikaler Form verblieben. Dies ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass die DNA-Glykosylase Fpg, bei der es sich wie auch bei OGG1 um eine bifunktionelle DNA-Glykosylase handelt, die entstandene AP-Läsion auf der 3'-Seite einschneidet (Nash et al., 1996). Da Phosphothioate die Spaltung der Phosphodiesterbindung erschweren, war der für die Reaktion eingesetzte Überschuss an Fpg-Protein nicht ausreichend um innerhalb der zugestandenen Reaktionszeit alle Substrate mit 3'-substituierter Phosphatgruppe umzusetzen. Da der vollständige Ablauf der Austauschreaktion in diesen Substraten durch die PNK-freie Kontrolle jedoch bestätigt wurde, wurde auch bei diesen Vektoren davon ausgegangen, dass jedes Vektormolekül die Läsion enthält.

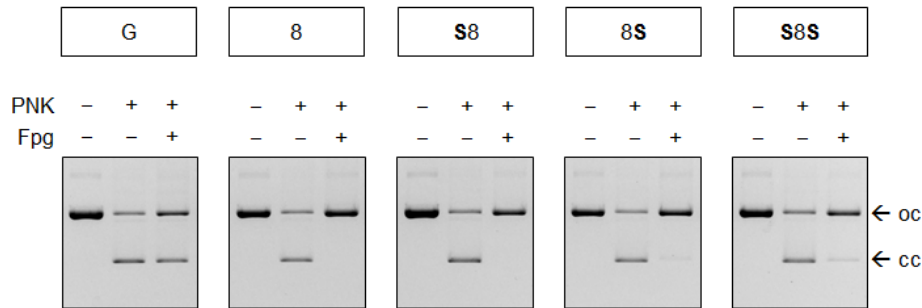


Abbildung 3-17 Nachweis der Anwesenheit von 8-oxoG mit benachbarten DNA-Rückgratsmodifikationen innerhalb der Vektor-DNA. Repräsentative Agarosegele von Plasmiden mit 8-oxoG und den angegebenen DNA-Rückgratsmodifikationen (S) innerhalb des NTS des EGFP-Gens nach Inkubation mit Fpg. Die Pfeile kennzeichnen die Position der offen zirkulären (oc) und der kovalent geschlossenen (cc) Plasmidform. Ein Ansatz ohne Polynukleotidkinase (PNK) dient als zusätzliche Kontrolle der Strangaustauschreaktion.

Bevor die Vektoren mit Phosphothioatsubstitution in ihrem DNA-Rückgrat zur Untersuchung der Genexpression in Zellen verwendet wurden, sollte ihr Potential nukleolytische Spaltung zu inhibieren, in *in vitro*-Versuchen bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurde mit den hergestellten Vektoren ohne bzw. mit Rückgrat-Modifizierung ein Cleavage Assay durchgeführt, um die Exzisionseffizienz in diesen Substraten zu bestimmen. Dieser Cleavage Assay wurde mit rekombinantem, humanen OGG1 durchgeführt, was dazu dienen sollte, den Einfluss der Phosphothioaten auf die  $\beta$ -Lyase Aktivität des OGG1 festzustellen (siehe Kapitel 2.2.9.2). Da diese  $\beta$ -Lyase Aktivität um ein Vielfaches langsamer abläuft als die vorangegangene Exzision der Basenmodifikation (Zharkov et al., 2000), wurde für die Reaktion ein Überschuss an OGG1 verwendet. Die Analyse des Agarosegels zeigt kaum Umsetzung des Kontrollplasmids (G), aber eine fast vollständige Konversion der superhelikalen in die offen zirkuläre Form bei dem 8-oxoG-enthaltenden Plasmid (8) (Abbildung 3-18). Das Substrat mit einem 5'-Phosphothioat (S8) wird ebenso effizient umgesetzt wie das mit 8-oxoG umgeben von gewöhnlichen Phosphatresten. Im Falle der Substrate, die hingegen ein Phosphothioat auf der 3'-Seite der Modifikation besaßen (8S und S8S), ist die Konversion von superhelikal zu offen zirkulär weitaus weniger effizient. Dies zeigt, dass ein 3'-Phosphothioat die  $\beta$ -Lyase-Aktivität des OGG1 – in Übereinstimmung mit dem katalytischen Mechanismus - behindert, auch wenn diese Inhibierung in Anwesenheit eines Überschuss an OGG1 nicht vollständig ist.

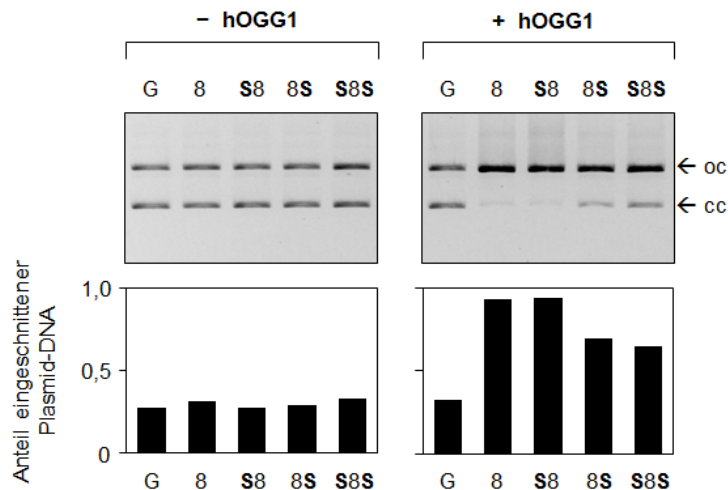


Abbildung 3-18 Einschnittsaktivität von rekombinanten OGG1 in 8-oxoG-enthaltendem Plasmidsubstraten mit Substitution der flankierenden Phosphatgruppen durch Phosphothioate. Repräsentative Agarosegelelektrophorese (oben) und quantitative Analyse des Anteils der eingeschnittenen Plasmid-DNA (unten) von Vektoren mit einem einzelnen 8-oxoG (8) und substituierten Phosphatgruppen (S) innerhalb des nicht-transkribierten DNA-Strangs des EGFP-Gens nach Inkubation mit 0,5 U rekombinanten hOGG1. Die Pfeile kennzeichnen die Position der offenen zirkulären (oc) und der kovalent geschlossenen (cc) Plasmidform. Vektor-DNA ohne DNA-Basenmodifikation (G) dient als Kontrolle.

Um nun zu untersuchen, wie sich die Substitution von Phosphatgruppen in unmittelbarer Nachbarschaft zu 8-oxoG durch Phosphothioate auf die Exzisionsaktivität *in vivo* und somit auch auf den transkriptionsinhibierenden Effekt von 8-oxoG auswirkt, wurde die EGFP-Expression der Plasmide mit diesen Modifikationen in HeLa-Zellen analysiert. Diese Expressionsanalyse zeigt 6 Stunden nach der Transfektion keinen Unterschied in der EGFP-Expression der mit dem Kontrollplasmid transfizierten und der mit 8-oxoG-enthaltender Plasmid-DNA transfizierten Zellen (Abbildung 3-19). Dies zeigt erneut die indirekte Natur der Genexpressionshemmung durch 8-oxoG und dient außerdem als Kontrolle dafür, dass jeweils dieselbe Menge Plasmid-DNA transfiziert wurde. Zu späteren Zeitpunkten verursacht das 8-oxoG enthaltende Plasmid-Konstrukt ohne Phosphothioate die schon mehrfach beobachtete, zeitabhängig zunehmende Reduktion der Genexpression verglichen mit der G-enthaltenden Kontrolle. Ist die Phosphatgruppe auf der 3'-Seite des 8-oxoG durch ein Phosphothioat ersetzt, tritt derselbe transkriptionshemmende Effekt ein, wie bei dem von zwei Phosphatgruppen umgebenen 8-oxoG. Befindet sich die Substitution hingegen auf der 5'-Seite des 8-oxoG (unabhängig von der Natur der Bindung auf der 3'-Seite der Läsion) ist nur eine minimale Abnahme der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass in Zellen die nukleolytische Spaltung des Phosphosäureesters – und damit die Bildung eines DNA-Einzelstrangbruchs – auf der 5'-Seite von 8-oxoG für das Auftreten der Hemmung der Genexpression verantwortlich ist. Da die  $\beta$ -Lyase-Aktivität des OGG1 eine nukleolytische Spaltung auf der 3'-Seite der Läsion katalysiert, muss diese Inzision durch APE1, dessen Stranginzision 5' der entfernten DNA-Basenmodifikation erfolgt, katalysiert sein. Somit zeigt

dieses Ergebnis, dass *in vivo* die Bildung von Einzelstrangbrüchen während der Basen-Exzisions-Reparatur von 8-oxoG fast ausschließlich durch APE1 erfolgt, wohingegen die Umsetzung durch die  $\beta$ -Lyase-Aktivität des OGG1 vernachlässigbar ist.

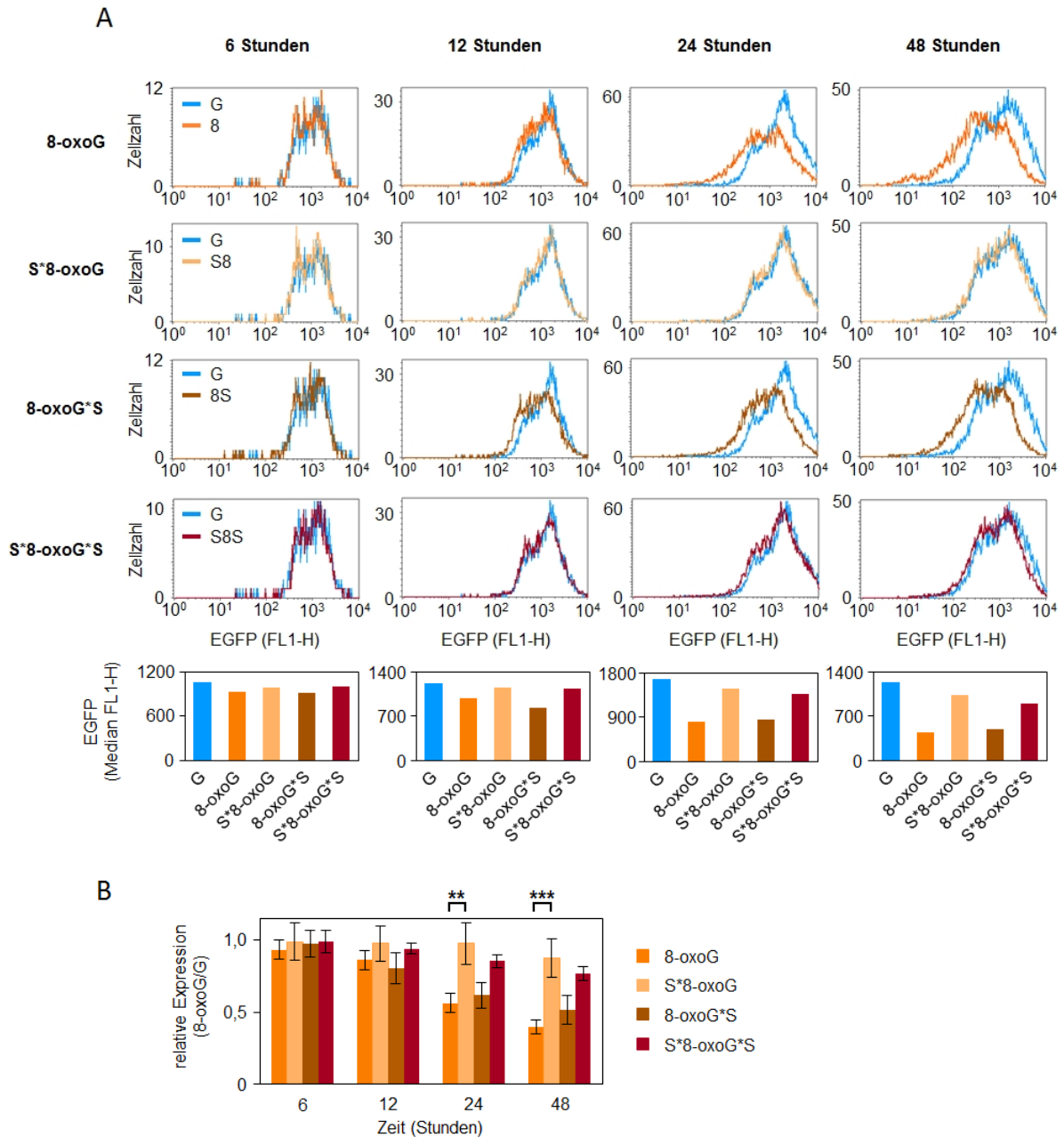


Abbildung 3-19 Einfluss von DNA-Rückgrats-Modifikationen auf die Expression eines Reportergens, das 8-oxoG innerhalb seines nicht-transkribierten DNA-Strangs enthält. EGFP-Expression von HeLa-Wildtyp-Zellen, die entweder mit einem der 8-oxoG enthaltenden Reportervektoren (8-oxoG, S\*8-oxoG, 8-oxoG\*S, S\*8-oxoG\*S) oder dem Guanin-enthaltenden Kontrollvektor (G) transfiziert wurden. (A) Überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Expression (FL1-H) pro Zelle und quantitative Auswertung eines repräsentativen Experiments. (B) EGFP-Expression der 8-oxoG-enthaltenden Vektoren relativ zur G-enthaltenden Kontrolle. Mittelwert aus 6 Transfektionen mit zwei unabhängig voneinander hergestellten Vektorpräparationen ( $\pm$  Standardabweichung). Zweiseitig gepaarter Student's T-test: \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ .

Da das 3'-Phosphothioat die  $\beta$ -Lyase-Aktivität des OGG1 inhibiert, sollte ausgeschlossen werden, dass der transkriptionshemmende Effekt im Falle des Substrats mit einem Phosphothioat 3' von 8-oxoG (8-oxoG\*S) durch die Aktivität anderer Reparatur-Proteine ausgelöst wird. Dazu wurde die EGFP-Expression der 8-oxoG-enthaltenden Plasmide auch in der HeLa-basierten OGG1-Knockdown-Zelllinie (OGG1 sh) und der Leervektor-transfizierte Kontrollzelllinie (no sh) analysiert. Bei den Plasmide, in denen 8-oxoG auf der 5'- bzw. auf beiden Seiten von einem Phosphothioat flankiert ist, zeigt sich weder in der Knockdown- noch in der Kontrollzelllinie ein Effekt auf die Genexpression (Abbildung 3-20). Dahingegen ist die in der Kontrollzelllinie beobachtete Reduktion der EGFP-Expression im Vergleich zur G-enthaltenden Kontrolle, sowohl beim von Phosphatgruppen umgebenen als auch im auf der 3'-Seite mit einem Phosphothioat flankierten 8-oxoG, in der Knockdown-Zelllinie um einiges schwächer ausgeprägt. Dies bestätigt, dass auch der transkriptionshemmende Effekt eines auf der 3'-Seite mit einem Phosphothioat flankierten 8-oxoG durch die Exzision von 8-oxoG durch OGG1 initiiert werden muss.

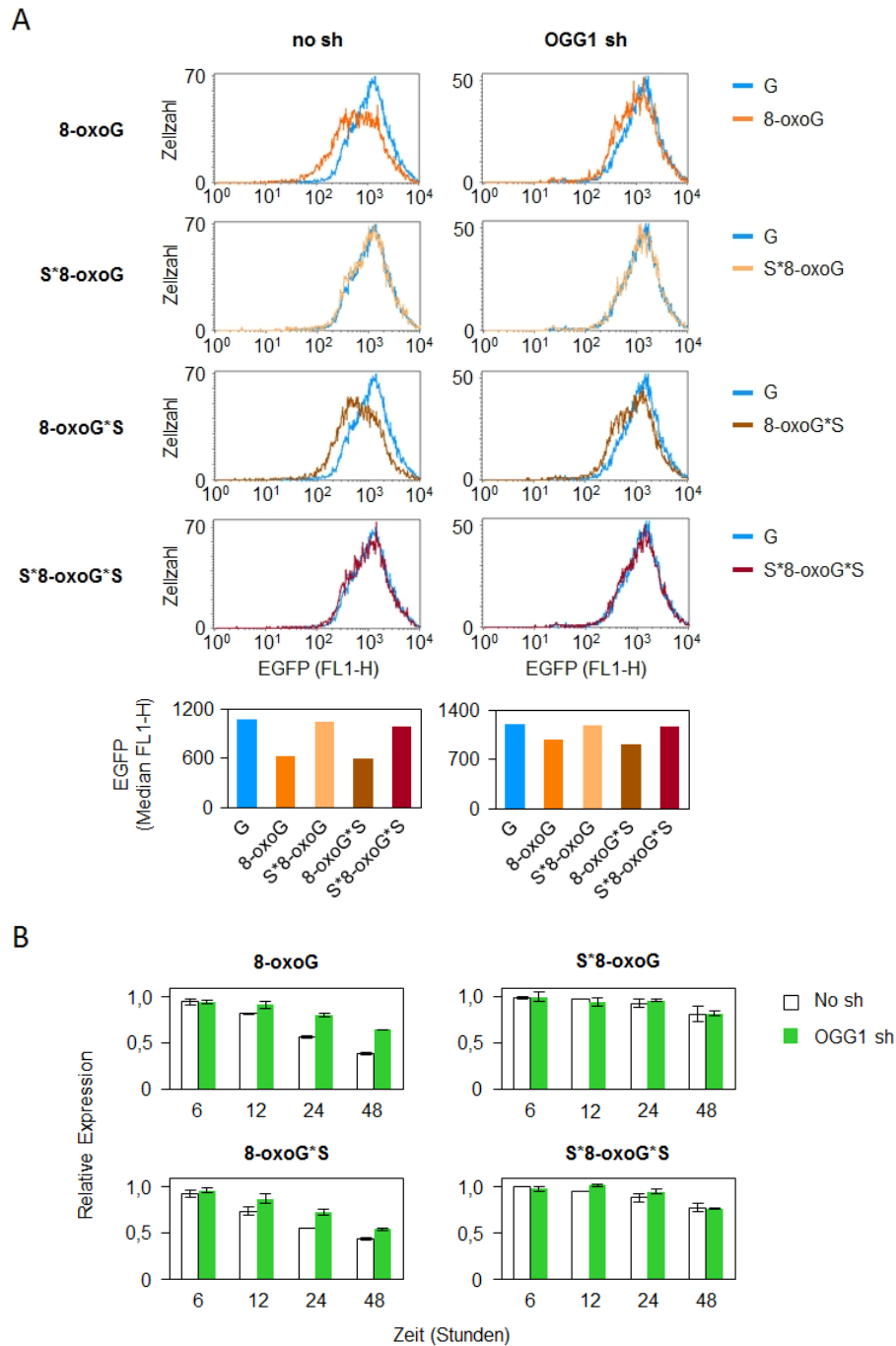


Abbildung 3-20 Einfluss des OGG1-Knockdowns auf die Expression eines EGFP-Reportergens, das 8-oxoG innerhalb des NTS des EGFP-Gens, sowie Modifikationen des 8-oxoG-flankierenden Phosphatrückgrats enthält. EGFP-Expression einer HeLa-Zelllinie mit stabilem OGG1-Knockdown und deren isogener Kontrollzelllinie (no sh), die entweder mit einem der 8-oxoG-enthaltenden Reportervektoren (8-oxoG, S\*8-oxoG, 8-oxoG\*S, S\*8-oxoG\*S) oder dem Guanin-enthaltenden Kontrollvektor (G) transfiziert wurden. (A) Überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Expression (FL1-H) pro Zelle 24 Stunden nach der Transfektion und die quantitative Auswertung eines repräsentativen Experiments. (B) EGFP-Expression relativ zur G-enthaltenden Kontrolle für jeden der 8-oxoG-enthaltenden Vektoren. Mittelwerte aus zwei unabhängigen Transfektionen ( $\pm$  Variationsbreite).

Da ein DNA-Einzelstrangbruch eine potentiell fatale Modifikation darstellen kann und es sich bei der für die Versuche verwendeten DNA um Plasmid-DNA handelt, ist die Möglichkeit nicht von der Hand zu weisen, dass die Vektor-DNA nach Exzision von 8-oxoG nicht repariert, sondern schlicht degradiert wird. Um nun zu beweisen, dass es sich bei dem beobachteten inhibitorischen Effekt nicht um ein Artefakt der Degradierung der Vektoren handelt, wurden die Level an Plasmid-DNA nach der Transfektion von OGG1-Knockdown-Zellen (OGG1 sh) und deren Kontrollzellen (no sh) mittels Realtime quantitativer PCR (RT-qPCR) bestimmt (siehe Kapitel 2.2.3.). Das Primerpaar für die Amplifizierung der pZAJ-Vektoren wurde so gewählt, dass das PCR-Produkt über der modifizierten Base gebildet wird. Parallel dazu wurde die Plasmid-DNA des pDsRed-Monomer N1-Vektors amplifiziert, was eine Normalisierung gegenüber ungleicher DNA-Isolierung und Transfektionseffizienz ermöglichen sollte. Als zusätzliche Kontrolle wurde ein Teil der transfizierten Zellen nicht für die DNA-Isolierung, sondern für die Analyse der EGFP-Expression verwendet. Diese zeigt, dass 6 Stunden nach der Transfektion alle Vektoren im gleichen Maße exprimiert werden (Abbildung 3-21 A). Somit ist sichergestellt, dass jeweils dieselbe Menge an Vektor-DNA in die Zellen gelangt ist. 24 und 48 Stunden nach der Transfektion ist in den no sh-Zellen der inhibitorische Effekt von 8-oxoG (8) und 8-oxoG\*S (8S) deutlich zu erkennen: 24 Stunden nach der Transfektion zeigt sich eine Reduktion der Genexpression um 30 % relativ zur Kontrolle, 48 Stunden nach der Transfektion beträgt die Reduktion 50 %. In den Zellen mit OGG1-Knockdown ist diese Reduktion wie erwartet weitaus weniger stark ausgeprägt. Wie auch in den vorangegangenen Versuchen zeigen S\*8-oxoG (S8) und S\*8oxoG\*S (S8S) in keiner der beiden Zelllinien einen negativen Einfluss auf die Genexpression. Die Bestimmung der DNA-Menge in diesen Zellen mittels RT-qPCR zeigte, dass die Level der vier 8-oxoG-enthaltendem Vektoren (8, S8, 8S, S8S) in beiden untersuchten Zelllinien ungefähr dem Level des unmodifizierten Vektors (G) entspricht (Abbildung 3-21 B). Dies bedeutet, dass 48 Stunden nach der Transfektion immer noch dieselbe Menge aller Vektoren in den Zellen vorliegt und somit die beobachtete Reduktion der Genexpression um bis zu 50 % nicht durch eine Degradierung der Vektor-DNA erklärt werden kann.

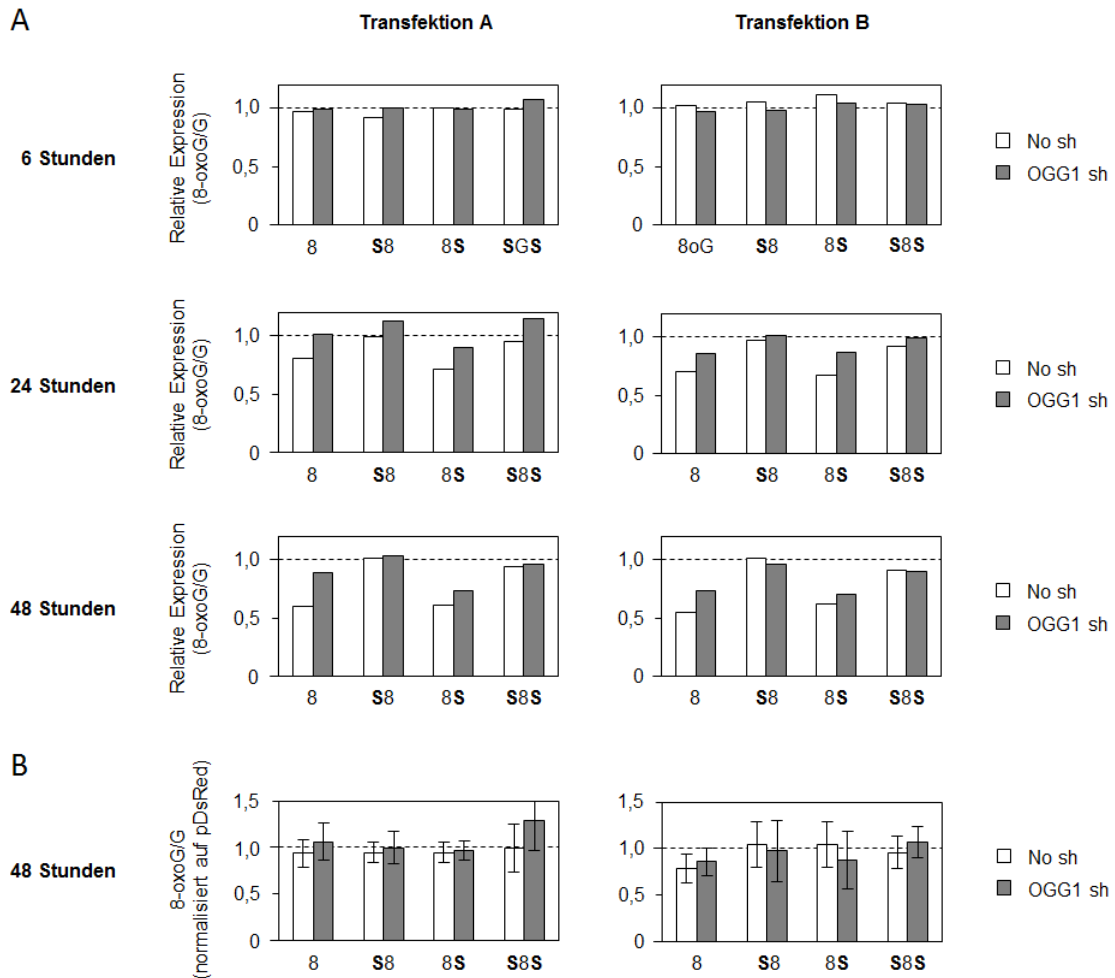


Abbildung 3-21 Vektor-DNA-Mengen in HeLa-Zellen nach Transfektion von Vektoren, die 8-oxoG und DNA-Rückgratsmodifikationen enthalten. EGFP-Expression und relative DNA-Menge in HeLa-Zellen mit stabilem OGG1-Knockdown (OGG1 sh) und der Leervektor-transfizierten Kontrollzelllinie (no sh) nach Transfektion von Vektoren, die G oder 8-oxoG (8) flankiert von verschiedenen Kombinationen von Phosphosäureestern und Phosphothioaten (S) im NTS des EGFP-Gens enthielten. (A) EGFP-Expression relativ zur Kontrolle (G) für zwei unabhängige Transfektionen. (B) DNA-Quantifizierung mittels Realtime quantitativer PCR (RT-qPCR) für zwei unabhängige Transfektionen. DNA-Menge relativ zur Menge der G-enthaltenden Kontrolle. Die relative Menge an pDsRed-Vektor wurde zur Normierung verwendet. Mittelwerte aus jeweils 4 Messwerten ( $\pm$  Standardabweichung).

Die Tatsache, dass nur ein Phosphothioat auf der 5'-Seite von 8-oxoG in der Lage ist einen inhibitorischen Effekt zu initiieren, deutet darauf hin, dass unter physiologischen Bedingungen keine durch OGG1 katalysierte Spaltung des 3'-Phosphatesters auftritt. Aus diesem Grund wurde ein Cleavage Assay mit den Extrakten der OGG1-überexprimierenden HeLa-Zellen durchgeführt. Die Analyse des erhaltenen Gelbildes zeigt, dass das 8-oxoG-enthaltene Plasmid proportional zur eingesetzten Proteinmenge eingeschnitten wird, das G-enthaltende Kontrollplasmid hingegen kaum umgesetzt wird (Abbildung 3-22). Das Plasmid, dessen 8-oxoG auf der 3'-Seite von einem Phosphothioat flankiert ist (8S), wird ebenfalls effizient und in Abhängigkeit von der Proteinmenge ausgeschnitten. Im Gegensatz dazu erfahren die Substrate, bei denen 8-oxoG auf seiner 5'-Seite (S8) bzw. auf beiden Seiten (S8S) von Phosphothioaten flankiert wird, unter denselben



Reaktionsbedingungen nur eine geringe Umsetzung. Diese ist nur marginal stärker als die des G-enthaltenden Plasmids. Trotz eines fast 10-fachen Überschusses an OGG1 und somit einer im Vergleich zum Wildtyp um ein Vielfaches erhöhten Exzisionsaktivität, wird die Inzision auf der 3'-Seite nur geringfügig durch die Anwesenheit eines Phosphothioats gehemmt. Da aber die Umsetzung der AP-Läsion zu einem Einzelstrangbruch durch die  $\beta$ -Lyase-Aktivität des OGG1 auf eben dieser Seite der Modifikation erfolgt (Svilar et al. 2011), ist gezeigt, dass auch *in vitro* der Großteil der gebildeten Einzelstrangbrüche nicht durch OGG1 entstanden ist, sondern durch APE1. Dies wird dadurch bewiesen, dass nur ein Phosphothioat 5' von 8-oxoG die Bildung eines Einzelstrangbruches und die resultierende Umwandlung in die offen zirkuläre Form verhindert.

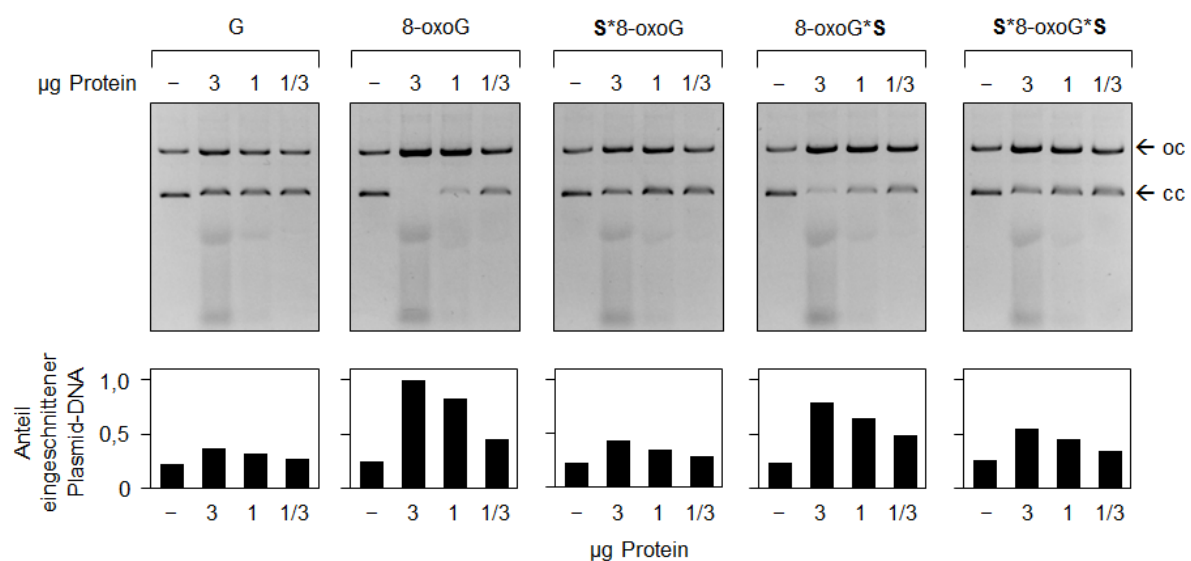


Abbildung 3-22 Einschneidungsaktivität von Zellextrakten in 8-oxoG-enthaltendem Plasmidsubstraten mit Substitution der flankierenden Phosphatgruppen durch Phosphothioate. Repräsentative Agarosegelelektrophorese (oben) und quantitative Analyse des Anteils der eingeschnittenen Plasmid-DNA (unten) von Vektoren mit einem einzelnen 8-oxoG (8) und substituierten Phosphatgruppen (S) innerhalb des nicht-transkribierten DNA-Strangs des EGFP-Gens nach Inkubation mit Extrakten von HeLa-Zellen, die ein OGG1-GFP-Fusionsprotein überexprimieren. Die Pfeile kennzeichnen die Position der offen zirkulären (oc) und der kovalent geschlossenen (cc) Plasmidform. Der Vektor ohne DNA-Basenmodifikation (G) diente als Kontrolle.

Diese bevorzugte Exzision eines Substrates mit einem 3'-Phosphothioat in Zellextrakten lässt sich auch in einem Cleavage Assay mit rekombinantem Protein reproduzieren, wenn die Vektor-Konstrukte zusätzlich zu OGG1 auch noch mit rekombinantem APE1 inkubiert werden (siehe Kapitel 2.2.9.3). In dieser Kombination erfolgt die Exzision des Substrates mit einem 3'-Phosphothioat weitaus effizienter als die der Substrate mit 5'-Phosphothioat, aber weniger effizient als die des von 8-oxoG enthaltenden Vektors ohne Modifikation des DNA-Rückgrats (Abbildung 3-23).

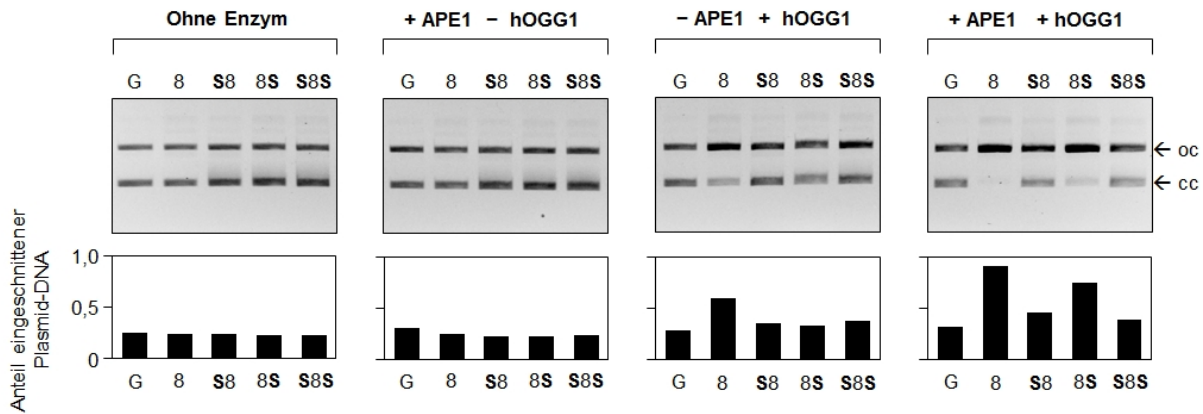


Abbildung 3-23 Einschnittsaktivität von rekombinanten hOGG1 in 8-oxoG-enthaltendem Plasmidsubstraten mit Substitution der flankierenden Phosphatgruppen durch Phosphothioate in Anwesenheit von rekombinantem APE1. Repräsentative Agarosegele (oben) und quantitative Analyse des Anteils der eingeschnittenen Plasmid-DNA (unten) von Vektoren mit einem einzelnen 8-oxoG (8) und substituierten Phosphatgruppen (S) innerhalb des nicht-transkribierten DNA-Strangs des EGFP-Gens nach Inkubation 0,1 U rekombinantem OGG1 und 0,5 U rekombinantem APE1. Die Pfeile kennzeichnen die Position der offen zirkulären (oc) und der kovalent geschlossenen (cc) Plasmidform. Der Vektor ohne DNA-Basenmodifikation (G) diente als Kontrolle.

Zusammengefasst zeigen all diese Ergebnisse, dass der bei der Reparatur von 8-oxoG entstehende DNA-Einzelstrangbruch für die beobachtete Inhibierung der Genexpression verantwortlich ist, wobei die Bildung dieses Einzelstrangbruchs *in vivo* fast ausschließlich durch APE1 erfolgt. Auf welche Art und Weise dieser Einzelstrangbruch die Transkription genau hemmt, ist allerdings noch unklar. In *in vitro* Experimenten wurde gezeigt, dass ein Einzelstrangbruch in der Lage ist die RNA Polymerase direkt zu blockieren (Kathe et al. 2004). Allerdings wurde der inhibitorische Effekt nicht nur bei einer Positionierung der Läsion im transkribierten Strang, sondern auch wenn sich die Läsion im nicht-transkribierten Strang befand, beobachtet (Kitsera et al., 2011). Dies schließt somit eigentlich einen direkten Block der Transkriptionsmaschinerie durch deren Kollision mit dem Einzelstrangbruch als mechanistischen Hintergrund der beobachteten Inhibition aus. Das wiederum legt den Schluss nahe, dass die Inhibierung auf Ebene der Transkriptionsinitiation erfolgt. Für diese Art der Inhibition wäre ein intrazellulärer Signal-Mechanismus vonnöten, der die Genstilllegung vermittelt. Diese Genstilllegung erfolgt potentiell über einen von zwei Mechanismen: Entweder durch die Generierung einer repressiven Chromatin-Struktur, die die Bindung transkriptioneller Aktivoren an die Promotor-Region verhindert oder zur Bildung weiterer repressiver Strukturen wie beispielsweise DNA-Methylierung führt, oder durch die Modulation der Bindungsaktivitäten von Aktivoren oder Repressoren der Genexpression zu ihren spezifischen Promotor-Sequenzen.

### 3.3 8-oxoG-bedingte Genrepression: Hinweise auf einen indirekten Mechanismus

#### 3.3.1 Ein einzelnes 8-oxoG außerhalb des transkribierten Bereichs inhibiert die Genexpression ebenso stark wie bei einer Positionierung innerhalb des transkribierten Bereichs

In den bereits beschriebenen Versuchen zeigte sich, dass die Gentranskription auch durch ein einzelnes 8-oxoG im nicht-transkribierten DNA-Strang inhibiert wird, was darauf hindeutet, dass die beobachtete Inhibition auf Ebene der Transkriptionsinitiation und nicht der Transkriptionselongation abläuft. Letzteres ist dabei jedoch nicht vollständig auszuschließen. Der bei der BER entstehende Einzelstrangbruch könnte im Laufe der Transkription, unabhängig davon, ob es sich um den transkribierten oder den nicht-transkribierten DNA-Strang handelt, eine sekundäre Struktur ausbilden, die dann wiederum einen direkten Block der Transkription darstellt (Roy et al., 2010). Um nun herauszufinden inwieweit die aktive Transkription tatsächlich an der Entstehung der Transkriptionshemmung beteiligt ist, wurden Vektoren konstruiert, die es ermöglichen, 8-oxoG in jeweils einen der beiden DNA-Stränge des nicht transkribierten Bereichs 652 bp upstream des Transkriptionsstarts einzubauen (pZAJ-UPS-W/C) und somit durch die Analyse der EGFP-Expression dieser Vektoren direkt die Transkriptionsabhängigkeit des Effektes zu untersuchen (Abbildung 3-24). Die Klonierung dieser Vektoren ist in Kapitel 2.2.5 und Anhang II-2 beschrieben.

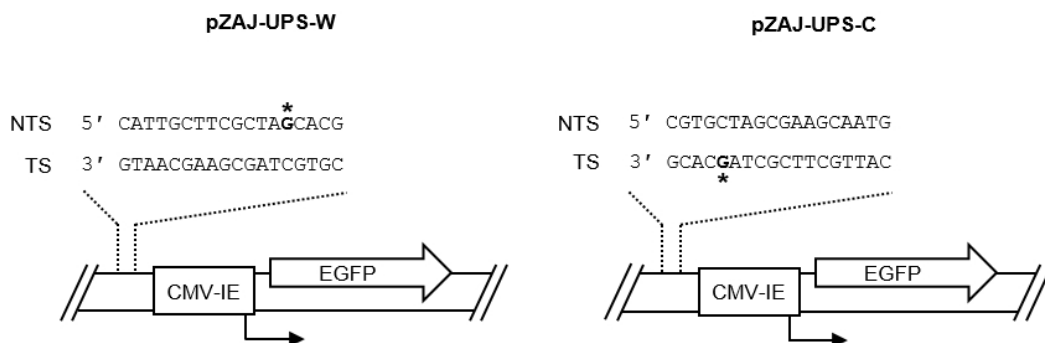


Abbildung 3-24 Schematische Darstellung des EGFP-Reportergens, das ein einzelnes 8-oxoG innerhalb des nicht-transkribierten Bereichs besitzt. DNA-Sequenz des synthetischen 18 nt Oligonukleotids innerhalb des top-Strangs (NTS) oder des bottom-Strangs (TS) des EGFP-Gens (breiter Pfeil). Der Stern kennzeichnet die Position des modifizierten Guanins. Der gebrochene Pfeil zeigt den Start der Transkription, das Rechteck den CMV-IE-Promotor, unter dessen Kontrolle das Reportergen steht.

Der Einbau des synthetischen 8-oxoG enthaltenden Oligonukleotids in den nicht-transkribierten Bereich upstream des EGFP-Gens erfolgte dann nach der bereits beschriebenen Strangaustauschmethode. Der Erfolg der Reaktion und die daraus folgende Anwesenheit von 8-oxoG in der Plasmid-DNA wurde dann durch einen Verdau der Plasmide mit Fpg nachgewiesen (Anhang III-6). Um den Effekt eines einzelnen 8-oxoGs außerhalb des transkribierten Bereichs auf die Genexpression zu untersuchen, wurden die Vektoren pZAJ-UPS-W-8oG (8oG im „top“-Strang) bzw. pZAJ-UPS-C-8oG (8oG im „bottom“-Strang) jeweils parallel zu ihrem entsprechenden unmodifizierten

Kontrollvektor (G) in HeLa-Zellen transfiziert. Die Analyse der EGFP-Expressionsdaten ergab, dass die EGFP-Expression des 8-oxoG enthaltenden Vektors 8 Stunden nach der Transfektion der des G-enthaltenden Kontrollvektors entspricht. Dies zeigt erneut, dass einerseits dieselbe Menge an Vektor-DNA in die Zellen eingebracht wurde und andererseits auch, dass es zu diesem Zeitpunkt keinen direkten Effekt auf die Genexpression durch ein außerhalb des transkribierten Bereich positioniertes 8-oxoG gibt (Abbildung 3-25). Zu späteren Zeitpunkten (24 und 48 Stunden) ist jedoch eine deutliche Reduktion in der Genexpression des 8-oxoG enthaltenden Vektors im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Diese entspricht in ihrer Größenordnung (etwa um 30 % verringert) der von einem einzelnen, im 5'-UTR positionierten 8-oxoG verursachten und bereits mehrfach beobachteten Reduktion. 8-oxoG war in den für dieses Experiment verwendeten Vektoren weit upstream des transkribierten Bereichs positioniert. Von daher kann aufgrund der Entfernung der Läsion zum aktiven Transkriptionsgeschehen keine Kollision mit der transkribierenden RNA-Polymerase auftreten. Deswegen kann ein direkter Block der RNA-Polymerase als mechanistische Grundlage der Inhibition der Genexpression zweifelsfrei ausgeschlossen werden. Die Tatsache, dass der inhibitorische Effekt ebenfalls wieder unabhängig vom DNA-Strang, in dem die Läsion positioniert ist, auftritt, unterstützt diese Schlussfolgerung zusätzlich.

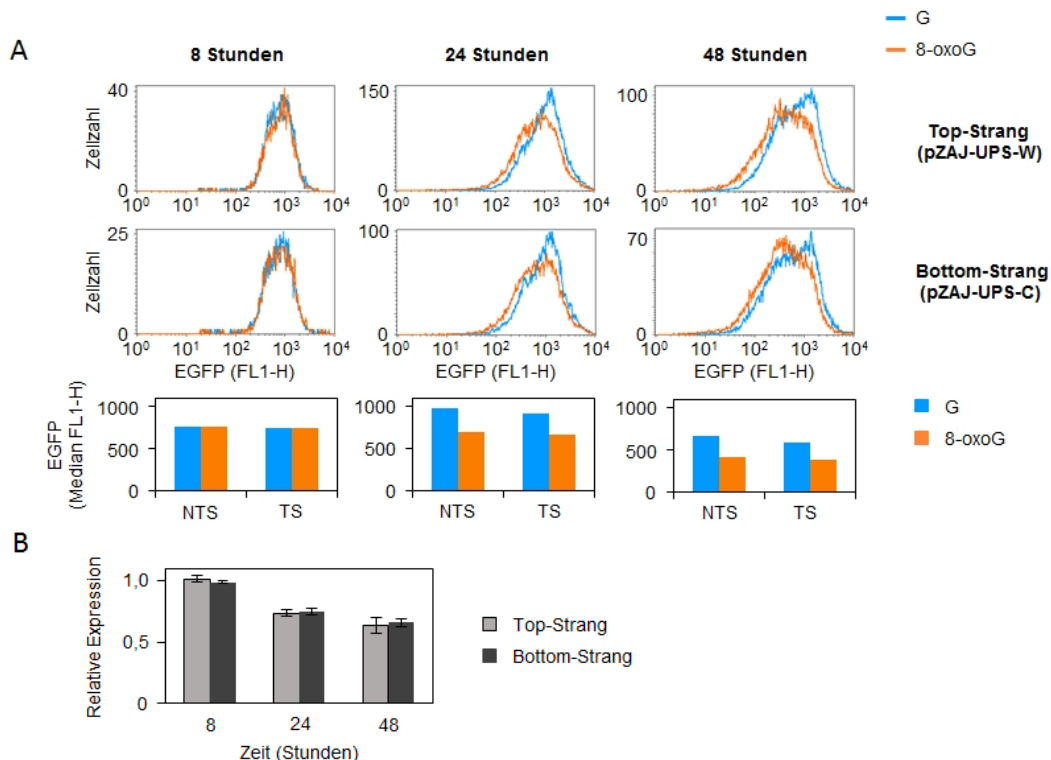


Abbildung 3-25 Einfluss eines einzelnen 8-oxoG außerhalb des transkribierten Bereichs auf die Genexpression. (A) Überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Expression (FL1-H) pro Zelle und deren quantitative Auswertung nach Transfektion von Vektoren, die 8-oxoG im nicht-transkribierten (NTS) oder im transkribierten DNA-Strang (TS) enthielten. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment. (B) EGFP-Expression der 8-oxoG-enthaltenden Vektoren relativ zur G-enthaltenden Kontrolle. Mittelwert aus insgesamt sechs Transfektionen mit zwei unabhängig voneinander hergestellten G/8-oxoG-Vektorpaaren ( $\pm$  Standardabweichung).

Zur Feststellung, ob es sich bei der Inhibition der Genexpression durch ein einzelnes 8-oxoG außerhalb des transkribierten Bereichs um den durch die Exzision von 8-oxoG initiierten Mechanismus handelt, wurde die EGFP-Expression der Vektorpaare (pZAJ-UPS-W-8oG/G, pZAJ-UPS-C-8oG/G) auch in der HeLa-Zelllinie mit einem shRNA-induzierten, stabilen OGG1-Knockdown bestimmt. Vektoren, die ein einzelnes Uracil im upstream-Bereich enthielten, dienten als Negativkontrolle für den Einfluss des OGG1-Knockdowns. Die Analyse der EGFP-Expression zeigt deutlich, dass ein einzelnes 8-oxoG außerhalb des transkribierten Bereichs unabhängig vom DNA-Strang die Genexpression sowohl in Wildtyp-Zellen, als auch in der stabil mit dem leeren Vektor transfizierten, isogenen Kontrollzelllinie nach 24 Stunden um ca. 30 % im Vergleich zum G-enthaltenden Kontrollvektor reduziert (Abbildung 3-26). Auch Uracil verursacht außerhalb des transkribierten Bereichs eine Reduktion der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle, allerdings ist dieser Effekt um einiges stärker ausgeprägt als im Falle von 8-oxoG. In der Knockdown-Zelllinie zeigt sich zum selben Zeitpunkt nur eine Reduktion der Genexpression des 8-oxoG enthaltenden Vektors um etwa 10 % im Vergleich zur Kontrolle, während Uracil die Genexpression im gleichen Maße hemmt wie in der Kontrollzelllinie. Diese Daten bestätigen, dass die beobachtete durch 8-oxoG verursachte Stilllegung der Genexpression wie auch bei den vorangegangenen Versuchen durch die Exzision von 8-oxoG durch OGG1 initiiert wird.

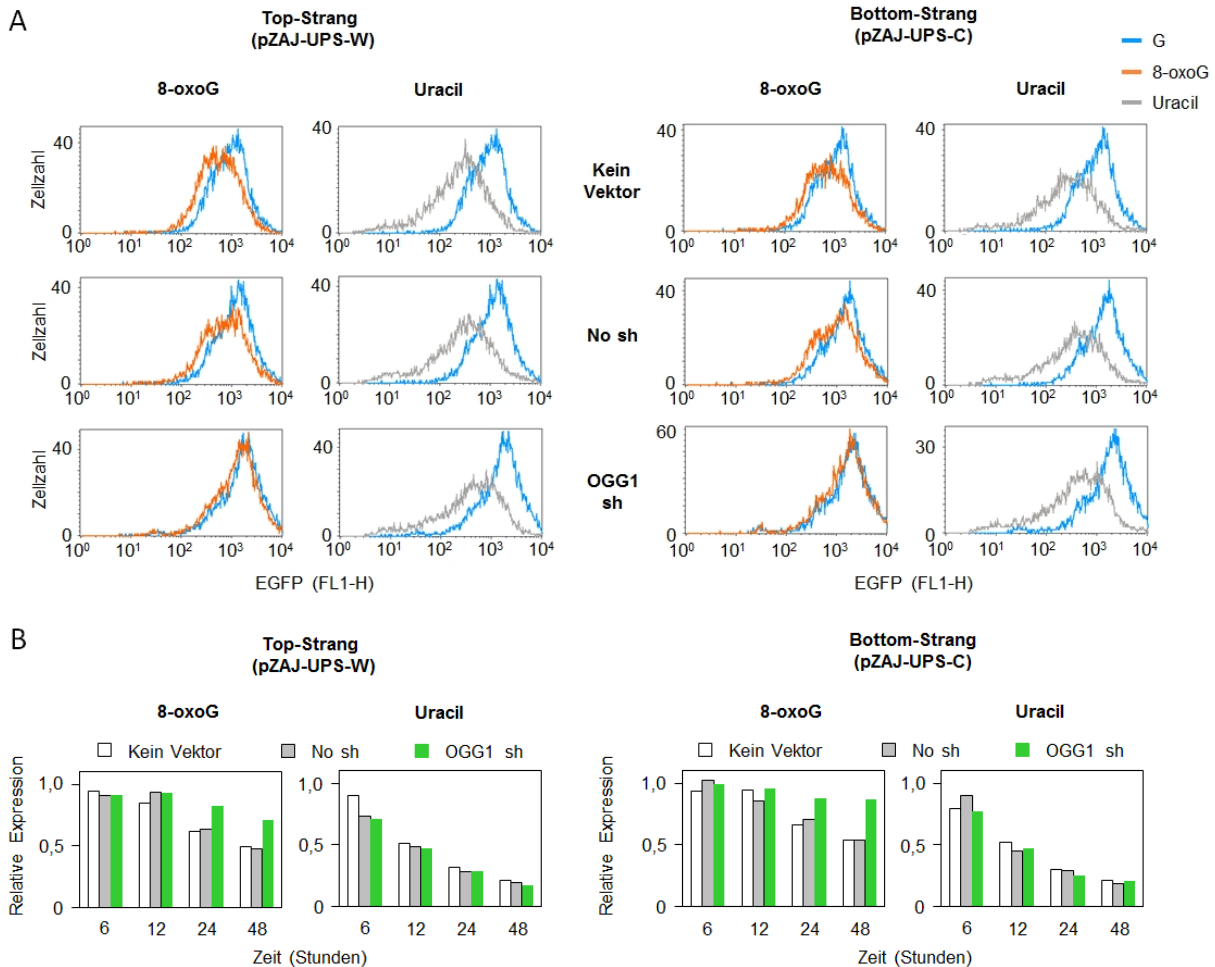


Abbildung 3-26 Einfluss des zellulären OGG1-Gehalts auf den transkriptionshemmenden Effekt eines einzelnen 8-oxoG außerhalb des transkribierten Bereichs. EGFP-Expression von HeLa-Wildtyp-Zellen, sowie HeLa-Zellen mit stabilem OGG1-Knockdown und deren Kontrollzellen nach Transfektion von Vektoren, die entweder Guanin (G), 8-oxoG oder Uracil im nicht-transkribierten (links) oder dem transkribierten Strang (rechts) des nicht-transkribierten Bereichs enthielten. Die Uracil-enthaltenden Vektoren dienen als Negativkontrolle für den Einfluss des OGG1-Knockdowns. (A) Überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Expression (FL1-H) pro Zelle 24 Stunden nach der Transfektion. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. (B) EGFP-Expression relativ zur den mit Kontroll-Vektoren transfizierten Zellen einer repräsentativen Transfektion.

### 3.3.2 Innerhalb des verwendeten CMV-IE Promoters gibt es kein regulatorisches Element, das eine sequenzspezifische Genrepression vermittelt

Bei dem Promoter, der das EGFP-Reportergen aller bisher verwendeten Vektoren kontrolliert, handelt es sich um den viralen immediate early Cytomegalovirus-Promotor (CMV-IE), einen ungewöhnlich starken Promotor. Dessen hohe Transkriptionsrate in HeLa-Zellen wird in erster Linie durch den Transkriptionsfaktor CREB (cAMP response element binding protein) bedingt (Schlabach et al., 2010), der insgesamt 7 Bindestellen (cAMP responsive element, CRE) – 4 davon mit der vollen, 3 mit der halben Konsensus-Sequenz – innerhalb der Promotorsequenz besitzt. Um diesen CMV-IE-Promotor auf die Anwesenheit regulatorischer Elemente, die eine Repression des Reportergens vermitteln können, zu untersuchen, wurden Vektoren mit verkürzten CMV-IE-Promotoren konstruiert und der Effekt eines einzelnen 8-oxoGs innerhalb dieser Vektoren auf die Genexpression

untersucht. Das Design und die Generierung der Vektoren mit verkürzten CMV-IE-Promotoren (pCMV-1111, pCMV-1011, pCMV-0011, pCRE-UNO) und des CRE-losen Promotors (pCRE-NUL) sind in Kapitel 2.2.6 und Anhang II-3, II-4 und II-5 dargestellt.

Um die Promotorstärken der verschiedenen Deletions-Promotoren zu untersuchen, wurde deren EGFP-Expression in HeLa-Zellen analysiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass nicht dieselbe Menge an Plasmid-DNA, sondern jeweils dieselbe Anzahl an Plasmid-Molekülen für die Transfektion eingesetzt wurde. Anhand der EGFP-Expression 24 Stunden nach der Transfektion ist zu erkennen, dass die Stärke der Promotoren proportional zu ihrer Länge bzw. der Anzahl an CREs in ihrer Sequenz ist (Abbildung 3-27 A+B). Anhand dieser Expressionswerte wurde jedem Vektor eine relative Promotor-Stärke zugeordnet, wobei die Stärke des vollen CMV-IE Promotors (pCMV-1111) auf 1 festgelegt wurde. Daraus ergibt sich für den Vektor pCMV-1011, dessen Median der EGFP-Expression bei ca. 1.000 liegt, eine relative Promotorstärke von 0,75 und für den Vektor pCMV-0011, dessen Median der EGFP-Expression bei ca. 750 liegt, von 0,5. Der Vektor pCRE-UNO besitzt eine relative Promotorstärke von 0,03, seine Expression liegt 24 Stunden nach der Transfektion bei ca. 50 und ist somit um fast 30 Mal geringer als die des vollen CMV-IE-Promotors. Trotz ihrer unterschiedlichen absoluten Expression zeigen die Promotoren pCMV-1111, pCMV-1011 und pCMV-0011 eine ähnliche Kinetik in ihrer EGFP-Expression. So nimmt diese bei dem Vektor mit dem vollen CMV-IE-Promotor (pCMV1111-ZA) zu Beginn der Zeitreihe graduell zu und erreicht bei 24 Stunden ihr Maximum (Median der EGFP- Expression bei ca. 1.500), wonach sie wieder geringfügig abnimmt (Abbildung 3-27 C). Die Plasmide pCMV-1011 und pCMV-0011 mit partiell deletierten Promotoren weisen einen ähnlichen Verlauf in ihrer EGFP-Expression auf, allerdings liegt bei ihnen das Maximum der EGFP-Expression niedriger. Im Gegensatz dazu ist bei dem Plasmid mit dem minimalen, aus einem einzigen CRE bestehenden Promotor (pCRE-UNO), keine Abnahme der Expression innerhalb der untersuchten 48 Stunden zu erkennen (Abbildung 3-27 D). Stattdessen nimmt diese kontinuierlich zu. Interessanterweise zeigt auch der promotorlose Vektor pCRE-NUL eine kontinuierliche Zunahme an EGFP-Expression mit einem Median von etwa 25 nach 24 Stunden. Diese „leaky expression“ wird vermutlich durch den SV40-Promotor, unter dessen Kontrolle das auf dem Vektor kodierte Resistenzgen steht, verursacht und ist im Vergleich zu der Expression der anderen Vektoren vernachlässigbar gering. Insgesamt demonstriert dieser Versuch, dass alle konstruierten Vektoren mit partiellen Promotor-Deletionen eine messbare EGFP- Expression zeigen und somit für weitere Untersuchungen nutzbar sind.

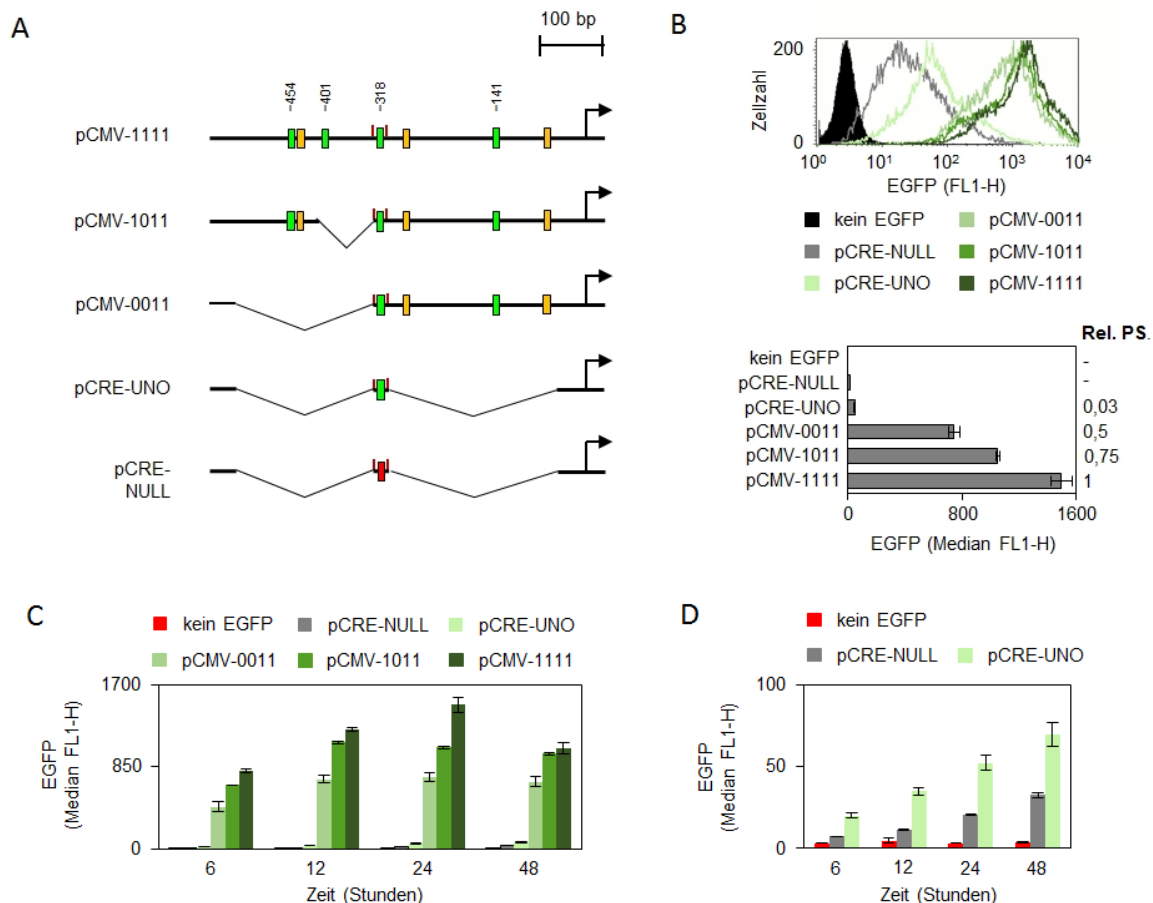


Abbildung 3-27 Charakterisierung des Expressionsprofils von EGFP-Reportervektoren mit partiellen Deletionen des CMV-IE-Promotors. (A) Schematische Darstellung der Promotor-Regionen der verwendeten Reportervektoren. Gepunktete Linien symbolisieren eine Deletion, grüne Rechtecke ein kanonisches cAMP response Element (CRE), gelbe/rote Rechtecke eine variierte/voll mutierte CRE-Konsensus-Sequenz, rote Striche die Nb.BsrDI-Schnittstellen und der gebrochene Pfeil den Transkriptionsstart. Die Zahlen geben den Abstand des entsprechenden kanonischen CRE zum Transkriptionsstart bei einem vollständigen CMV-IE-Promotor an. (B) EGFP-Expression von HeLa-Zellen nach der Transfektion der Vektoren mit partieller Promotor-Deletion. Überlagertes Verteilungs-Diagramm der EGFP-Expression pro Zelle 24 Stunden nach der Transfektion (oben) und Quantifizierung (unten). Angegeben ist die jeweilige Promotorstärke relativ zum vollen CMV-IE-Promotor des Vektors pCMV-1111 (rel. PS.). Mittelwerte aus zwei Transfektionen ( $\pm$  Variationsbreite). (C + D) Quantifizierung der EGFP-Expression nach Transfektion der Vektoren mit Promotordeletionen zu angegebenen Zeiten nach der Transfektion. Dargestellt sind entweder alle Deletionsvarianten (C) oder diejenigen mit einer EGFP-Expression < 100 (D). Mittelwert aus zwei Transfektionen ( $\pm$  Variationsbreite).

Die Herstellung von Plasmiden, die ein einzelnes 8-oxoG in einem EGFP-Gen unter Kontrolle der verschieden starken Promotoren besitzen, erfolgte mittels der Strangaustauschreaktion. Die Bestätigung der Anwesenheit von 8-oxoG innerhalb der Vektor-DNA erfolgte erneut mittels Fpg-Verdau und anschließender Agarosegelelektrophorese (Anhang III-3).

Zur Untersuchung der Auswirkung der einzelnen Promotordeletionen auf die von 8-oxoG verursachte Genstilllegung wurde die EGFP-Expression der vier G/8-oxoG enthaltenden Vektorpaare in HeLa-Zellen analysiert. Unabhängig davon, um welche Promotor-Variante es sich handelte, ist die Expression des 8-oxoG enthaltenden Plasmids 6 Stunden nach der Transfektion genauso stark wie die des zugehörigen, G-enthaltenden Kontrollplasmids (Abbildung 3-28). Im weiteren Verlauf jedoch



nimmt die Genexpression des 8-oxoG-Plasmids im Vergleich zur Kontrolle stetig ab. 24 Stunden nach der Transfektion ist die Expression des 8-oxoG enthaltenden Plasmids in allen Plasmidpaaren um ungefähr 40 % im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt, 48 Stunden nach der Transfektion sogar um 50-60 %. Dies deutet darauf hin, dass innerhalb des CMV-Promotors kein spezifisches, regulatorisches Sequenzelement existiert, dass die beobachtete Genstilllegung vermittelt, da diese unabhängig davon, welcher Teil des Promotors entfernt wurde, auftritt.

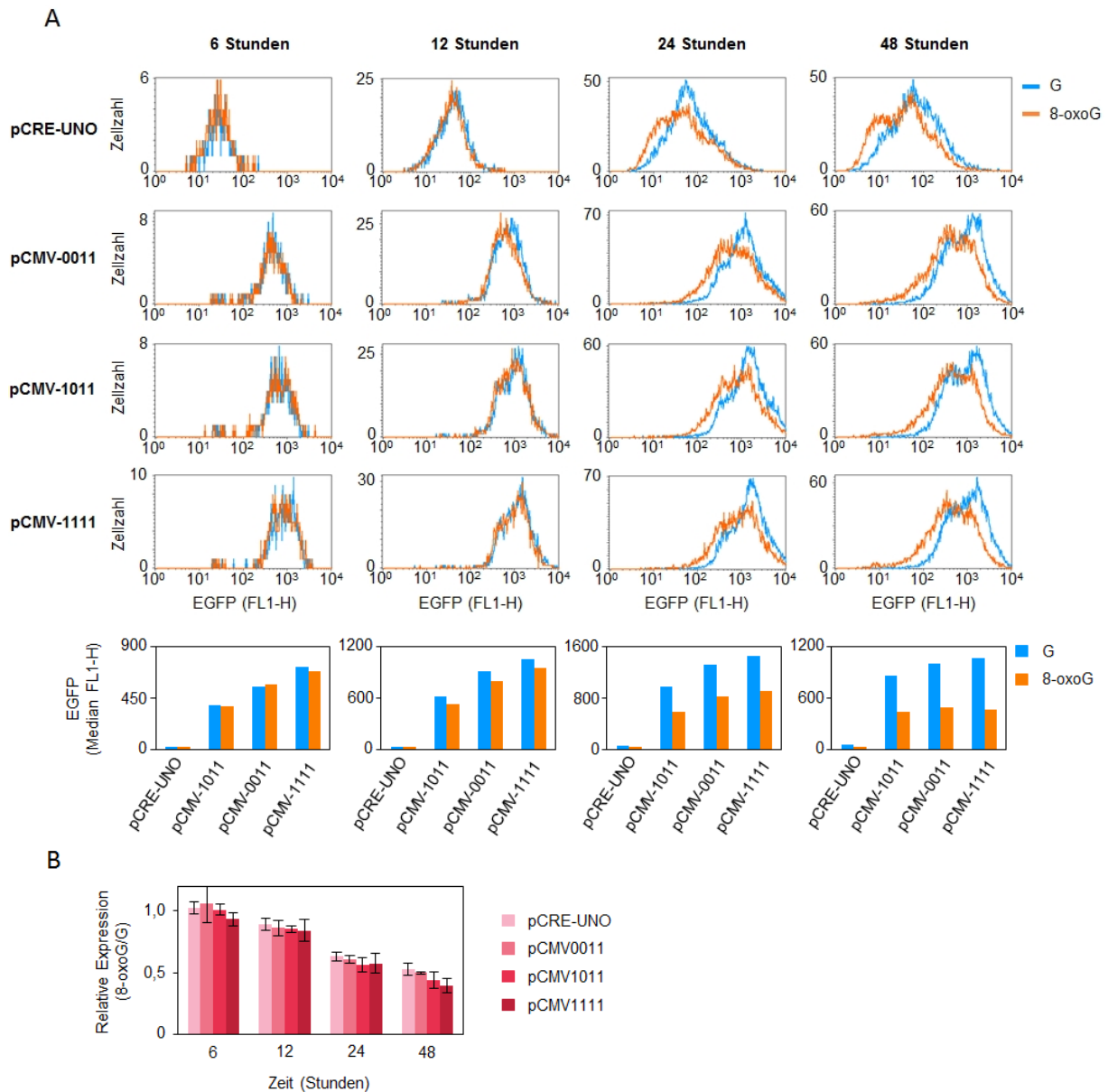


Abbildung 3-28 Einfluss der Deletionen des CMV-IE-Promotors auf den inhibitorischen Effekt eines einzelnen 8-oxoG innerhalb des EGFP-kodierenden Bereichs des Reportervektors. EGFP-Expression von HeLa-Zellen nach Transfektion mit Vektoren die entweder G oder 8-oxoG innerhalb des nicht-transkribierten Stranges des kodierenden Bereichs des EGFP-Gens besitzen. (A) Überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Expression pro Zelle und Quantifizierung eines repräsentativen Experiments. (B) EGFP-Expression relativ zur Kontrolle (G). Mittelwert von drei unabhängigen Transfektionen ( $\pm$  Standardabweichung).

Zusätzlich zeigt dieses Ergebnis, dass die Stärke des inhibitorischen Effekts von 8-oxoG auf die Genexpression unabhängig von der Stärke des Promotors ist. Trägt man nämlich die Stärke des Effekts an einzelnen Messpunkten gegen den Median der EGFP-Expression bzw. die relative Promotorstärke im Vergleich zu der des Vektors mit dem vollen CMV-Promotor auf, ist klar zu erkennen, dass keinerlei Relation zwischen der Promotorstärke und dem Ausmaß der Inhibition besteht (Abbildung 3-29). Die Steigungen der in die Diagramme gelegten Regressionsgeraden betragen für alle verwendeten Vektoren ungefähr 0.

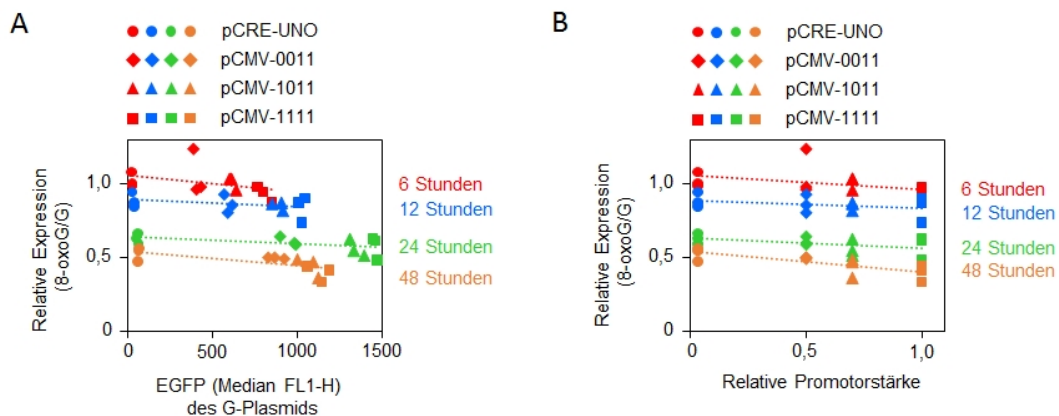


Abbildung 3-29 Einfluss der Promotorstärke auf den inhibitorischen Effekt eines einzelnen 8-oxoG innerhalb des EGFP-kodierenden Bereichs des Reportervektors. Auftragung der relativen Expression des 8-oxoG-enthaltenden Vektors nach Transfektion in HeLa-Zellen (siehe Abbildung 3-24) gegen die korrespondierende absolute Expression der G-enthaltenden Kontrolle (A) oder die relative Promotorstärke der entsprechenden Promotor-Variante (B). Gepunktete Linien entsprechen den Regressionsgeraden.

Auch die EGFP-Expressionsanalyse in HeLa-Zellen mit OGG1-Knockdown (OGG1 sh) und der dazugehörige Kontrollzelllinie (no sh) zeigt keinen Unterschied zwischen den vier G/8-oxoG-Plasmidpaaren mit unterschiedlich starkem Promotor. Alle 8-oxoG enthaltenden Plasmide erniedrigen 24 Stunden nach der Transfektion in die no sh-Kontrollzelllinie die Genexpression um ungefähr 40 % im Vergleich ihrer entsprechenden G-enthaltenden Kontrolle (Abbildung 2-30). Dahingegen beträgt die Abnahme zum selben Zeitpunkt bei Transfektion in die Knockdown-Zelllinie nur ca. 10 %. Dies bestätigt, dass es sich bei der in der Transfektion in Wildtyp-HeLa-Zellen beobachteten Hemmung der Genexpression ebenfalls um den OGG1-abhängigen Mechanismus der Genstilllegung handelt.

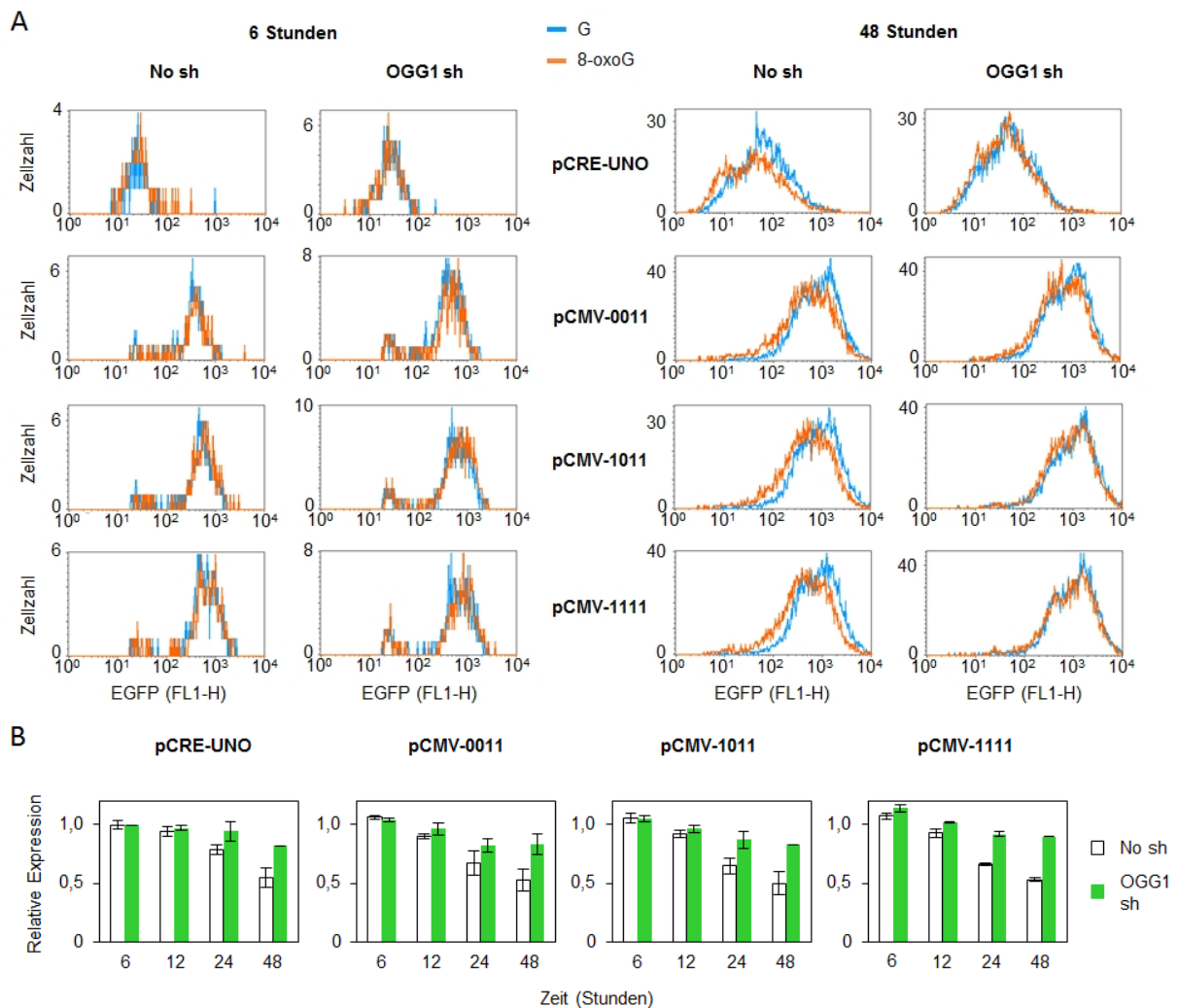


Abbildung 3-30 Einfluss des OGG1-Gehalts auf den Effekt eines einzelnen 8-oxoG im kodierenden Bereich der Vektoren mit Deletionen des CMV-IE-Promotors. Analyse der EGFP-Expression von OGG1-shRNA exprimierenden HeLa-Zellen, sowie der mit dem Leervektor transfizierten Kontrolle (no sh), die entweder mit dem 8-oxoG-enthaltenden Reportervektor oder dem Guanin-enthaltenden Kontrollvektor transfiziert wurden. (A) Überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Expression (FL1-H) pro Zelle und die quantitative Auswertung eines repräsentativen Experiments. (B) EGFP-Expression der 8-oxoG-enthaltenden Vektoren relativ zur G-enthaltenden Kontrolle. Mittelwert aus zwei unabhängigen Transfektionen ( $\pm$  Variationsbreite).

Da jeder in den vorangegangenen Experimenten verwendete Promotor wenigstens ein CRE enthielt, wurde nun zusätzlich ein einzelnes 8-oxoG in das Reportergen des CRE-losen Vektors pCRE-NUL eingfügt und dessen Anwesenheit durch einen Fpg-Verdau bewiesen (Anhang III-4). Dieser Versuch sollte ausschließen, dass die CRE-Sequenz als verursachendes, regulatorisches Element bei der Entstehung der 8-oxoG-induzierten Genstilllegung fungiert. Die Analyse der EGFP-Expression dieses Vektors und seines G-enthaltenden Kontrollvektors, sowie des pCRE-UNO-W/G/8oG-Vektorpaar in HeLa-Zellen zeigte, dass der inhibitorische Effekt von 8-oxoG auch in kompletter Abwesenheit von CRE auftritt und sich auch in seinem Ausmaß nicht wesentlich von dem in pCRE-UNO beobachteten Effekt unterscheidet (Abbildung 2-31). 8 Stunden nach der Transfektion beträgt das Verhältnis der Expression des 8-oxoG-enthaltenden pCRE-NUL-Vektors zu der seiner unmodifizierten Kontrolle

nicht 1, was allerdings in diesem Fall nicht auf eine ungleiche Menge an transfizierter Vektor-DNA, sondern auf eine durch zu geringe EGFP-Expression verursachte Ungenauigkeit bei der Errechnung der relativen Expression zurückgeführt wurde.

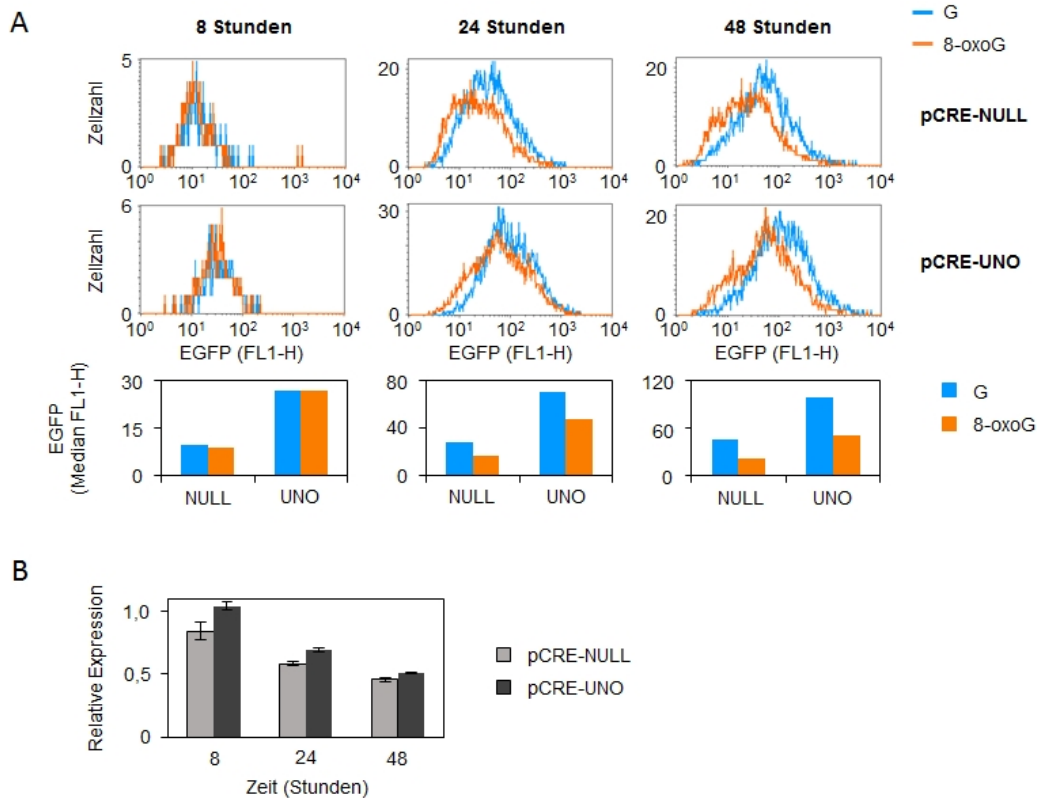


Abbildung 3-31 Einfluss der vollständigen Deletionen des CMV-IE-Promotors auf den inhibitorischen Effekt eines einzelnen 8-oxoG innerhalb des für EGFP-kodierenden Bereichs des Reportervektors. EGFP-Expression von HeLa-Zellen nach Transfektion mit Vektoren die entweder G oder 8-oxoG innerhalb des nicht-transkribierten Stranges des kodierenden Bereichs des EGFP-Gens besitzen, das unter Kontrolle des CRE-losen Promotors (pCRE-NULL) oder des single-CRE-Promotors (pCRE-UNO) steht. (A) Überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Expression pro Zelle und Quantifizierung eines repräsentativen Experiments. (B) EGFP-Expression relativ zur Kontrolle (G). Mittelwert von zwei unabhängigen Transfektionen ( $\pm$  Variationsbreite).

Eine darauf folgende Expressionsanalyse in HeLa-Zellen mit OGG1-Knockdown bestätigt, dass es sich auch in diesem Fall um den von einem Einzelstrangbruch verursachten Stilllegungs-Mechanismus handelt. Der Effekt eines einzelnen 8-oxoGs bleibt auch in diesem Fall in Abwesenheit der DNA-Glykosylase OGG1 aus (Abbildung 3-32). Zusammenfassend wurde mit diesen Versuchen nachgewiesen, dass auch CRE in Bezug auf die beobachtete Genstilllegung nach Exzision von 8-oxoG kein Silencing-vermittelndes, regulatorisches Element darstellt.

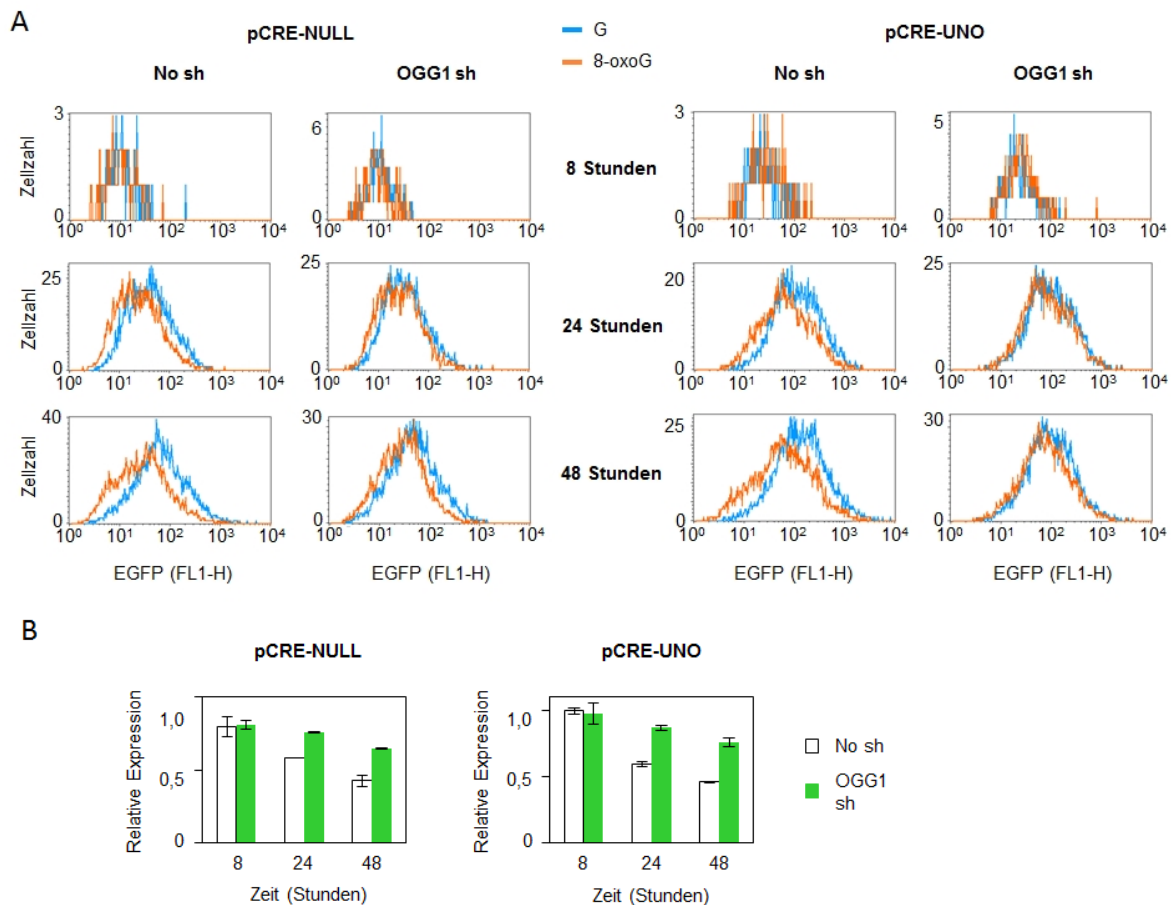


Abbildung 3-32 Einfluss des OGG1-Gehalts auf den Effekt eines einzelnen 8-oxoGs innerhalb des EGFP-kodierenden Bereichs des CRE-losen Vektors. Analyse der EGFP-Expression von OGG1-shRNA exprimierenden HeLa-Zellen, sowie der mit dem Leervektor transfizierten Kontrolle (no sh), die entweder mit dem 8-oxoG-enthaltenden Reportervektor oder dem Guanin-enthaltenden Kontrollvektor transfiziert wurden. Der Reportervektor enthielt dabei entweder den CRE-losen (pCRE-NULL) oder den CRE-UNO-Promotor (pCRE-UNO). (A) Überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Expression (FL1-H) pro Zelle eines repräsentativen Experiments. (B) EGFP-Expression der 8-oxoG-enthaltenden Vektoren relativ zur Kontrolle. Mittelwert aus zwei unabhängigen Transfektionen ( $\pm$  Variationsbreite).

Da es sich bei dem bisher verwendeten CMV-IE-Promotor um einen viralen Promotor handelt, wird die Frage nach der Relevanz der beobachteten Stilllegung für humane Gene unter Kontrolle humaner Promotoren aufgeworfen – vor allem in Anbetracht der Tatsache, dass das humane Genom kontinuierlich endogenen reaktiven Sauerstoff-Spezies und somit der Bildung von 8-oxoG ausgesetzt ist.

### 3.3.3 8-oxoG inhibiert die Gentranskription unabhängig davon welche Art von Promotor die Transkription des Reportergens kontrolliert

Um diese Frage nach der Relevanz der beobachteten Genstilllegung für humane Promotoren zu beantworten, wurde 8-oxoG (5' entweder von einem Phosphosäureester oder einem Phosphothioat flankiert) in den für EGFP-kodierenden Bereich von Vektoren eingebaut, deren Reportergen unter der Kontrolle eines humanen Promotors steht (Abbildung 3-33) (Anhang III-5). Bei den untersuchten

Promotoren handelt es sich dabei einerseits um den Promotor des House-Keeping-Gens ACTB (pSB-ACTB-5C) und andererseits um den Promotor des Tumor-Suppressor-Gens RASSF1 (pSB-RASSF1-5C), der in vielen Krebserkrankungen stillgelegt ist (Chan & Katan, 2013).

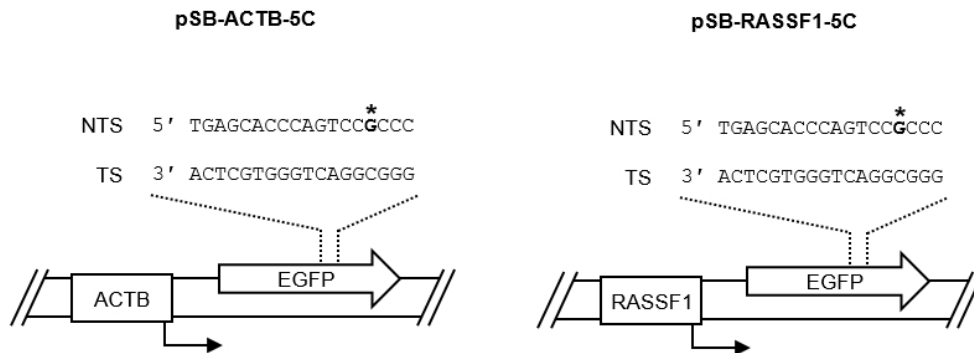


Abbildung 3-33 Schematische Darstellung des EGFP-Reportergens unter Kontrolle humaner Promotoren, das ein einzelnes 8-oxoG innerhalb des nicht-transkribierten DNA-Strangs besitzt. DNA-Sequenz des synthetischen 18 nt Oligonukleotids innerhalb des nicht-transkribierten DNA-Strangs (NTS) des EGFP-Gens (breiter Pfeil). Der Stern kennzeichnet die Position des modifizierten Guanins. Der gebrochene Pfeil zeigt den Start der Transkription, das Rechteck den ACTB- bzw. den RASSF1-Promotor, unter dessen Kontrolle das Reportergen steht.

Die Untersuchung der Auswirkung eines einzelnen 8-oxoGs auf die Expression eines Reportergens unter Kontrolle humaner Promotoren erfolgte über Transfektion der Vektor-Konstrukte pSB-ACTB-G/8oG/S\*8oG bzw. pSB-RASSF1-G/8oG/S\*8oG in HeLa-Zellen mit stabilem OGG1-Knockdown, sowie in deren isogene Kontrollzelllinie (no sh). In den mit einem leeren shRNA-Vektor transfizierten Kontrollzellen zeigen beide 8-oxoG-enthaltenden Konstrukte unabhängig vom Promotor eine kontinuierliche Abnahme der EGFP-Expression verglichen zur G-enthaltenden Kontrolle (Abbildung 3-34). Die S\*8oG-enthaltenden Konstrukte zeigen hingegen keine derartige Reduktion der EGFP-Expression. In den Zellen mit OGG1-Knockdown ist der in den Kontrollzellen beobachtete Effekt eines einzelnen 8-oxoGs deutlich vermindert, die Konstrukte mit S\*8oG zeigen auch hier keine Abnahme der Genexpression. Diese Ergebnisse beweisen, dass die Genstilllegung nach Exzision von 8-oxoG nicht nur bei Genen unter Kontrolle eines viralen, sondern bei Genen unter Kontrolle humaner Promotoren auftritt und es sich hierbei somit um Mechanismus von möglicher physiologischer Relevanz handelt.

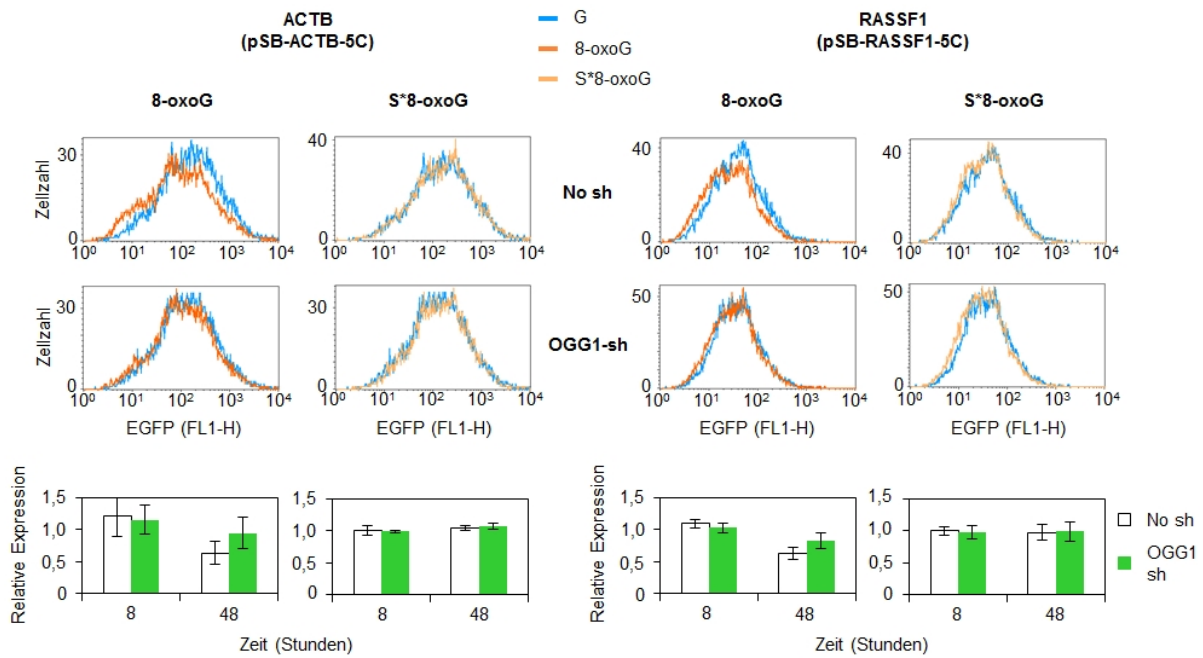


Abbildung 3-34 Einfluss des OGG1-Gehalts auf den Effekt eines einzelnen 8-oxoG im kodierenden Bereich des EGFP-Reportergens unter Kontrolle humaner Promotoren. Analyse der EGFP-Expression von OGG1-shRNA exprimierenden HeLa-Zellen, sowie der mit dem Leervektor transfizierten Kontrolle (no sh), die entweder mit einem 8-oxoG-enthaltenden Reportervektor (8-oxoG oder S\*8-oxoG) oder dem Guanin-enthaltenden Kontrollvektor (G) transfiziert wurden. Der Reportervektor enthielt dabei entweder den ACTB- oder den RASSF1-Promotor. Überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Expression (FL1-H) pro Zelle 48 Stunden nach der Transfektion eines repräsentativen Experiments (oben) und EGFP-Expression der 8-oxoG-enthaltenden Vektoren relativ zur Kontrolle (unten). Mittelwert aus drei unabhängigen Transfektionen ( $\pm$  Standardabweichung).

### 3.3.4 Histon-Deacetylierung ist an der Entstehung der durch ein einzelnes 8-oxoG verursachten Expressionshemmung beteiligt

Da eine Genstilllegung über spezifische regulatorische Promotor-Elemente aufgrund der vorangegangenen Versuche ausgeschlossen werden kann, könnte ein epigenetischer Stilllegungsmechanismus einen möglichen Grund für die erst verzögert einsetzende Inhibition darstellen, wobei die Histondeacetylierung als wahrscheinlichster Mechanismus angenommen wird (Kapitel 1.2.4). Um zu untersuchen welchen Einfluss Histondeacetylierung auf die durch 8-oxoG verursachte Hemmung der Genexpression hat, wurde das antifungale Antibiotikum Trichostatin A (TSA) verwendet, das selektiv HDACs der Klasse I und II inhibiert (Haberland et al., 2009) (siehe Kapitel 2.2.1.5). Die Analyse der EGFP-Expression von HeLa-Zellen, die mit Reportervektoren, die jeweils ein einzelnes 8-oxoG an verschiedenen Positionen (5'-UTR, 3'-UTR, upstream des transkribierten Bereich) und in verschiedenen DNA-Strängen (NTS und TS) besitzen, transfiziert wurden, zeigt klar, dass die Inhibition der Genexpression des 8-oxoG-Plasmids im Vergleich zur Kontrolle bei allen verwendeten Vektorpaaren nach Inkubation mit 440 nM TSA abnimmt und sich das Verhältnis der EGFP-Expression des 8-oxoG-enthaltenden Vektors zu seinem G-enthaltenden Konterpart wieder 1 annähert, während das einzelne 8-oxoG in unbehandelten Zellen eine Reduktion

der Genexpression um etwa 30 % verursacht (Abbildung 3-35). Dieses Ergebnis liefert einen weiteren Hinweis auf eine mögliche Beteiligung von HDACs an der beobachteten Genstilllegung nach Exzision von 8-oxoG. Auf welche Art diese Beteiligung genau erfolgt, ist allerdings noch unklar.

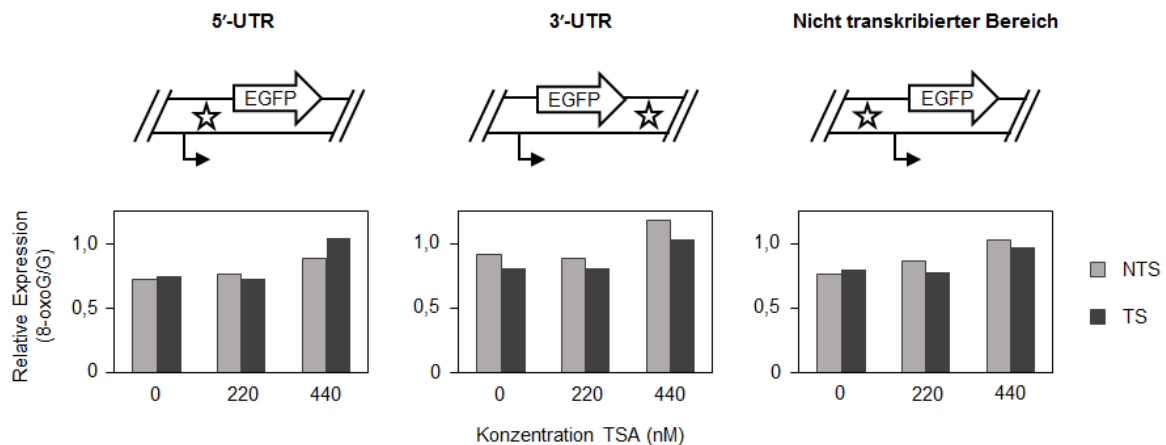


Abbildung 3-35 Einfluss von Trichostatin A (TSA) auf den expressionshemmenden Effekt eines einzelnen 8-oxoG an verschiedenen Positionen innerhalb des Reportervektors. EGFP-Expression von HeLa-Wildtyp-Zellen nach Transfektion von Vektoren, die entweder Guanin (G) oder 8-oxoG im 5'-UTR (links), 3'-UTR (Mitte) oder dem nicht-transkribierten Bereich (rechts), entweder im nicht-transkribierten (NTS) oder transkribierten Strang (TS), enthielten, nach 24-stündiger Behandlung mit TSA. Schematische Darstellung der Position von 8-oxoG (Stern) relativ zum Transkriptionsstart (gebrochener Pfeil) (oben). EGFP-Expression relativ zur den mit den G-enthaltenden Vektoren transfizierten Zellen einer repräsentativen Transfektion (unten).

Es ist bekannt, dass HDACs nicht nur Histone sondern auch zahlreiche andere zelluläre Proteine deacetylieren (Glozak et al., 2005). Somit könnte die Anwesenheit von TSA den Effekt von 8-oxoG durch eine Einflussnahme auf OGG1, das Enzym, das durch seine Exzisionsaktivität die Stilllegungskaskade initiiert, beeinflussen. OGG1 kann durch Acetylierung an zwei Lysinresten in seiner Affinität sowohl für das Edukt (8-oxoG:C) als auch für sein Produkt (AP:C) modifiziert werden (Bhakat et al., 2006). Daher könnte eine Beeinflussung der zellulären Deacetylaseaktivität durchaus Auswirkungen auf die Aktivität von OGG1 haben. Um allerdings einen solchen Cleavage Assay mit den Extrakten der OGG1-GFP-überexprimierenden Zellen durchführen zu können, muss sichergestellt werden, dass diese Zellen ebenso wie die Wildtyp-Zellen durch TSA beeinflussbar sind. Dafür wurde die EGFP-Expression des 8-oxoG enthaltenden Vektors pZAJ-UPS-W-8oG (8-oxoG außerhalb des transkribierten Bereichs, top-Strang) und seines G-enthaltenden Äquivalents in diesen Zellen unter Einfluss von TSA analysiert. Zusätzlich zu Zellen, die zum Zeitpunkt der Transfektion mit TSA versetzt wurden, wurden zusätzlich auch Zellen verwendet, die bereits für eine Stunde mit TSA vorinkubiert worden waren. In der Analyse der EGFP-Expression ist zu erkennen, dass der Effekt von 8-oxoG bei unbehandelten Zellen ca. 45 % Reduktion der Genexpression im Vergleich zur unmodifizierten Kontrolle beträgt, aber mit steigender TSA-Konzentration abnimmt und bei der höchsten Konzentration (440 nM) sogar vollständig aufgehoben ist (Abbildung 3-36 A), wobei es keinen Unterschied zwischen vorbehandelten und nicht-vorbehandelten Zellen gibt. Die Betrachtung der



absoluten EGFP-Expression zeigt zudem deutlich, dass die EGFP-Genexpression durch die Behandlung mit TSA erhöht wird, aber die einstündige Vorinkubation keinen zusätzlichen Anstieg der Expression bewirkt: Die Expression von vorbehandelten und nicht vorbehandelten Zellen ist annähernd identisch (Abbildung 3-36 B).

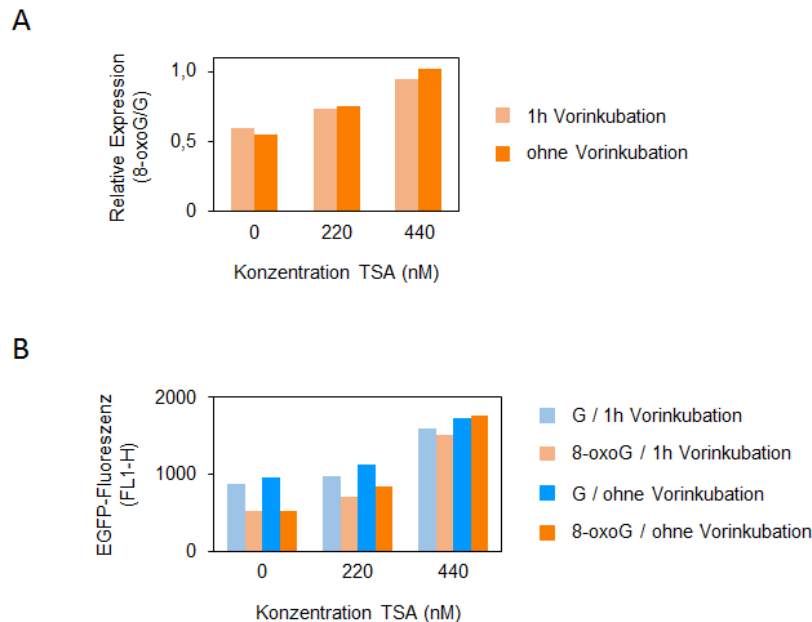


Abbildung 3-36 Einfluss von Trichostatin A (TSA) auf den expressionshemmenden Effekt eines einzelnen 8-oxoGs in Zellen mit OGG1-GFP-Überexpression. EGFP-Expression von HeLa-OGG1-GFP-Zellen nach Transfektion von Vektoren, die entweder Guanin (G) oder 8-oxoG im top-Strang des nicht-transkribierten Bereichs enthielten nach 24-stündiger Behandlung mit TSA mit oder ohne einstündiger Vorinkubation. (A) EGFP-Expression relativ zu den mit G-enthaltenen Vektoren transfizierten Zellen einer repräsentativen Transfektion. (B) Median der EGFP-Expression einer repräsentativen Transfektion.

Da somit auch in den OGG1-GFP-überexprimierenden Zellen der Effekt von TSA nachgewiesen werden konnte, wurden nun Cleavage-fähige Extrakte TSA-behandelter Zellen hergestellt (Kapitel 2.2.4.1). Für den Cleavage Assay wurde dann der Vektor pZAJ-UPS-W-8oG verwendet. Bei der Auswertung des Assays ist deutlich zu erkennen, dass beide Extrakte bei der höchsten eingesetzten Proteinmenge den Vektor vollständig in die offen zirkuläre Form überführt haben, und somit alle 8-oxoG aus der DNA ausgeschnitten wurden (Abbildung 3-37). Bei niedrigeren Proteinmengen hingegen zeigen die Extrakte aus den unbehandelten Zellen eine doppelt so große Einschnittsaktivität wie die Extrakte aus den mit TSA behandelten Zellen. Somit scheint TSA tatsächlich einen Einfluss auf die Cleavage-Aktivität von OGG1 auszuüben, dennoch kann eine Halbierung der Cleavage-Aktivität nicht das vollständige Verschwinden der durch 8-oxoG verursachten Stilllegung erklären. Dies deutet darauf hin, dass tatsächlich ein zusätzlicher, durch Histondeacetylierung verursachter Stilllegungsmechanismus vorliegen könnte.

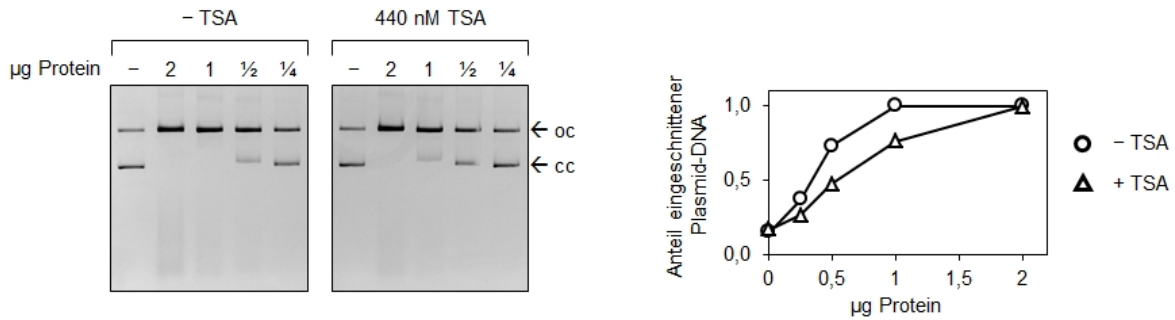


Abbildung 3-37 Einfluss von Trichostatin A (TSA) auf die Einschnittsaktivität von Zellextrakten von OGG1-überexprimierenden HeLa-Zellen in 8-oxoG-enhaltenden Plasmidsubstraten. Repräsentative Agarosegele (links) und Quantifizierung des Anteils der eingeschnittenen Vektor-DNA (rechts) nach Inkubation von Vektoren mit einem einzelnen 8-oxoG im nicht-transkribierten Bereich mit Zellextrakten von OGG1-GFP-überexprimierenden Zellen, die vier Stunden vor der Extraktion entweder mit TSA-freiem (- TSA) oder TSA-haltigem (440nM) Medium inkubiert worden waren.

Um zu untersuchen, ob sich die Behandlung der Zellen mit TSA auf die Expression von OGG1 auswirkt, wurde mit den für den Cleavage Assay verwendeten Extrakten ein Western Blot mit für OGG1 spezifischen Antikörpern durchgeführt. Auf dem Blot ist deutlich zu erkennen, dass die Expression von OGG1 in den vor der Extraktion mit TSA behandelten Zellen etwa dreifach höher ist als in den unbehandelten Extrakten (Abbildung 3-38). Dies stellt auf den ersten Blick einen gravierenden Widerspruch zum vorherigen Cleavage Assay dar, da eine größere OGG1-Menge auch in einer höheren Cleavage-Aktivität resultieren sollte. Bei genauerer Betrachtung zeigt sich allerdings, dass die erhöhte Expression nur für das native OGG1 (bei ~37 kDa) zu beobachten ist, während das Expressionslevel des OGG1-GFP-Fusionsproteins von der TSA-Behandlung nicht signifikant verändert zu sein scheint. Da die sichtbare Cleavage-Aktivität der Extrakte ausschließlich auf die Überexpression des Fusionsproteins zurückzuführen ist, kann die Zunahme des nativen Proteins – auch wenn sich die Menge um den Faktor 3 erhöht hat – in Bezug auf die Cleavage-Aktivität der Extrakte vernachlässigt werden.

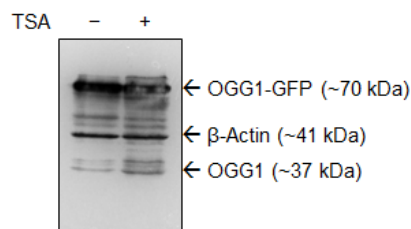


Abbildung 3-38 Einfluss von TSA auf den OGG1-Gehalt in HeLa-Zellen. Western Blot von Zellextrakten von OGG1-GFP-überexprimierenden Zellen, die vier Stunden vor der Extraktion entweder mit TSA-freiem (-) oder TSA-haltigem (+) Medium inkubiert worden sind.

Da TSA eine Vielzahl von HDACs, sowohl aus Klasse I als auch aus Klasse II, inhibiert (Haberland et al., 2009), ist es nicht möglich auf diesem Weg die Beteiligung einzelner HDACs an der Repression nachzuweisen. Aus diesem Grund wurde versucht, einzelne HDACs mit Hilfe spezifischer siRNA in

HeLa-Zellen transient herunter zu regulieren (siehe Kapitel 2.2.1.6). Als Zielproteine für diesen Versuchsansatz wurden die Klasse I HDACs 1, 2 und 3 ausgewählt, da diese nachgewiesenerweise Bestandteile zellulärer Silencing-Komplexe (u.a. Sin3, CoREST, Mi-2/NuRD, N-Cor/SMRT) darstellen. Nach Transfektion der siRNA wurde die Proteinmengen der HDACs mittels Western Blot bestimmt. Dabei konnte für alle drei untersuchten HDACs ein signifikanter Knockdown auf Proteinebene festgestellt werden (Abbildung 3-39). Für HDAC1 wurde ein durchschnittlicher Knockdown von etwa 90 %, für HDAC2 von 40 % und für HDAC3 von 60 % erzielt. Als Positivkontrolle wurde siRNA gegen OGG1 verwendet, die zu einem Knockdown von etwa 55 % 56 Stunden nach der Transfektion führte. Allerdings zeigte sich bei der Bestimmung des Proteingehalts zu späteren Zeitpunkten nach der siRNA-Transfektion (12-24 Stunden später), dass die erreichte Knockdown-Effizienz nicht konstant bleibt. Sowohl im Falle von OGG1, HDAC2, als auch bei HDAC3 war eine erneute Zunahme der Proteinmenge innerhalb des untersuchten Zeitraums zu beobachten.

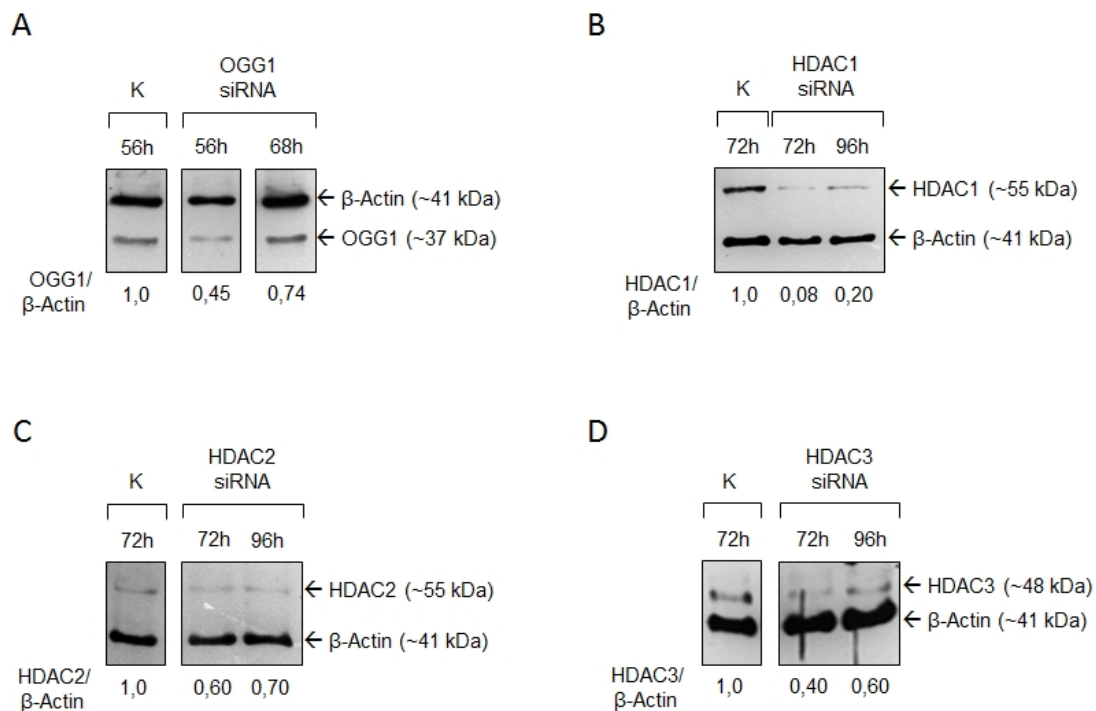


Abbildung 3-39 Knockdown von OGG1, HDAC1, HDAC2 und HDAC3 mit siRNA. Nachweis des Knockdowns mittels Western Blot. Zellextrakte wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach der ersten siRNA-Transfektion hergestellt, als Kontrolle (K) wurde unspezifische siRNA verwendet. Bei den Targets der spezifischen siRNA handelt es sich um (A) OGG1, (B) HDAC1, (C) HDAC2 und (D) HDAC3.

Ausgehend von den in Abbildung 3-39 dargestellten Western Blots wurde 48 Stunden nach der ersten siRNA-Transfektion als Zeitpunkt für die Transfektion des 8-oxoG-enthaltende Vektors gewählt. Die Wahl fiel auf diesen Zeitpunkt, da zu späteren Zeitpunkten die Expression von OGG1 wieder so stark zunimmt, dass die Zellen zu diesem Zeitpunkt schon nicht mehr als Positivkontrolle für die Rettung der Expression nutzbar waren. Der transiente Knockdown der HDACs erschien hingegen um einiges stabiler und es wurde davon ausgegangen, dass die zweite siRNA-Transfektion

(48 Stunden vor der Herstellung der Zellextrakte) die Effizienz des Knockdowns nicht signifikant erhöht, sondern nur dessen Dauer verlängert. (Abbildung 3-40 A). Bei dem für diese Versuche verwendeten Vektor handelte es sich um den Vektor pZAJ, der ein einzelnes 8-oxoG innerhalb des für EGFP-kodierenden Bereichs – der Position mit dem größten beobachteten Effekt – besaß (siehe Abbildung 3-15). Die EGFP-Expressionanalyse zeigt, dass der Effekt von 8-oxoG in den Zellen mit einem transienten OGG1-Knockdown fast vollständig verhindert wird (Abbildung 3-40 B), genauso wie es auch in den Zellen mit einem stabilen, shRNA-vermittelten OGG1-Knockdown der Fall war. Dahingegen zeigt keiner der anderen Knockdowns (HDAC1, HDAC2, HDAC3, sowie die Kombination der drei HDACs) einen Einfluss auf die Stärke des inhibitorischen Effekts von 8-oxoG. Die Genexpression ist in diesen Zellen genauso stark beeinträchtigt wie in den Zellen die ohne siRNA bzw. mit der unspezifischen siRNA transfiziert wurden. Somit konnte auf diese Weise für keine der drei untersuchten HDACs eine Beteiligung an der 8-oxoG vermittelten Genstilllegung nachgewiesen werden. Dennoch kann eine Beteiligung dieser Enzyme daran nicht ausgeschlossen werden, da der Knockdown der einzelnen HDACs in keinem Fall vollständig war und die verbliebene Restmenge (20 – 50 % der Proteine) ausreichend sein könnte, um eine Stilllegung des Reportergens zu vermitteln.

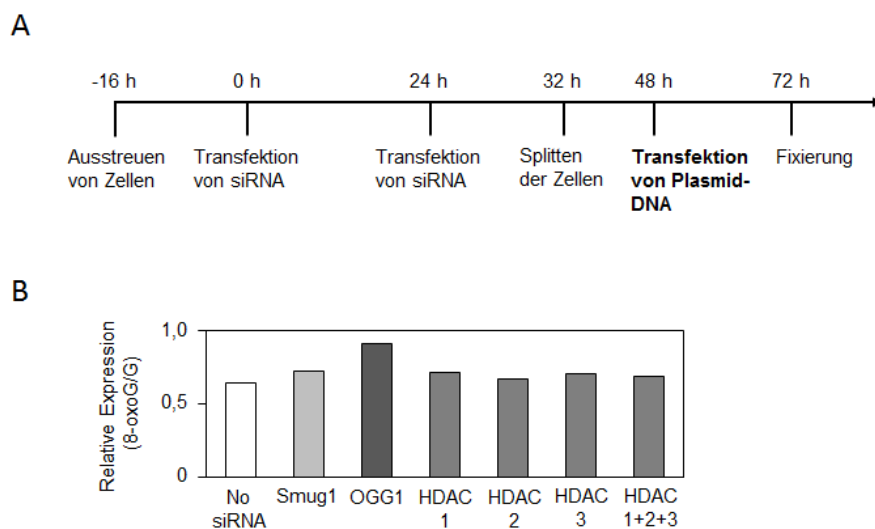


Abbildung 3-40 Einfluss von siRNA-vermittelten Protein-Knockdowns auf den expressionshemmenden Effekt von 8-oxoG innerhalb des kodierenden Bereichs. EGFP-Expression von HeLa-Zellen, die zuvor bereits mit den angegebenen siRNAs transfiziert worden waren, 24 Stunden nach der Transfektion von Vektoren, die entweder 8-oxoG oder G innerhalb des nicht-transkribierten Strangs des EGFP-Gens enthielten. (A) Zeitplan der durchgeführten Transfektionen. Der Zeitpunkt der ersten siRNA-Transfektion wurde als Zeitpunkt 0 definiert. (B) EGFP-Expression der 8-oxoG-enthaltenden Vektoren relativ zur G-enthaltenden Kontrolle eines repräsentativen Experiments.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Histondeacetylierung eine zentrale Rolle bei der Entstehung des inhibitorischen Effekts von 8-oxoG spielt, aber welche HDAC genau dafür verantwortlich ist, bleibt weiterhin offen.

### 3.4 Nachweis einer direkten Inhibierung der Gentranskription durch 8-oxoG innerhalb eines regulatorischen Elements

#### 3.4.1 CpG-DNA-Methylierung als Modell für die Repression transient transfizierter Reportervektoren

Zusätzlich zu dem bereits beobachteten, expressionshemmenden Effekt von 8-oxoG häufen sich Anzeichen, dass 8-oxoG, wenn es sich in regulatorischen Elementen befindet, die Genexpression auch auf andere Art beeinflussen kann (Kapitel 1.5). Um möglichst sensitiv direkte Effekt einzelner DNA-Basenmodifikation innerhalb eines regulatorischen Elements auf die Genexpression untersuchen zu können, wird jedoch ein Expressionssystem benötigt, das empfindlich genug ist, um von einer einzigen modifizierten Nukleobase beeinflusst zu werden. Um wiederum die Eignung dieses Systems für die gewünschten Untersuchungen zu beweisen, ist zuerst allerdings eine geeignete Kontrolle vonnöten. Eine Basenmodifikation, die einen geeigneten Kandidaten für diese Rolle darstellt, ist 5-Methylcytosin (5-mC), das nicht durch DNA-Glykosylasen aus der DNA entfernt werden kann und generell als repressiver, epigenetischer Marker gilt. Um zu prüfen, ob die Expression des EGFP-Reportergens unter Kontrolle des CMV-IE-Promotors durch CpG-Methylierung und somit durch 5-mC beeinflussbar ist, wurden die Vektoren pZA und pAZ, die jeweils für ein langlebiges bzw. ein kurzlebiges EGFP kodieren, mit Hilfe der bakteriellen Methyltransferase M.SssI *in vitro* methyliert (siehe Kapitel 2.2.10). Die quantitative Analyse des Restriktionsverdaus mit ApaLI zeigt, dass 97 % aller CpGs der M.SssI behandelten Vektoren methyliert vorliegen, da nur 3 % der Vektor-DNA in die lineare Form überführt wurden (Abbildung 3-41). In Abwesenheit von M.SssI hingegen wurde die Vektor-DNA vollständig in die lineare Form umgewandelt.

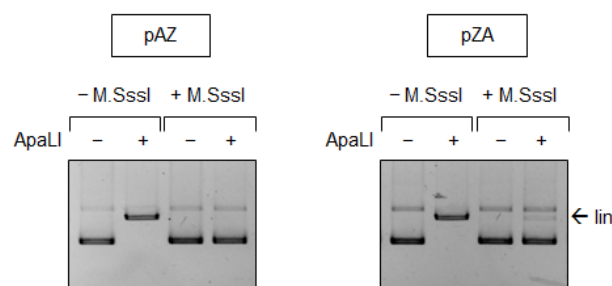


Abbildung 3-41 Nachweis der M.SssI-vermittelten *in vitro*-Methylierung der Vektoren pAZ und pZA mittels Restriktionsverdaus. Repräsentative Gelbilder von unmethylierter (- M.SssI) bzw. M.SssI-methylierter Vektor-DNA (+ M.SssI) nach Inkubation mit der Restriktionsendonuklease ApaLI. Die Position der linearen Bande (lin) ist mit einem Pfeil markiert.

Bei der Expressionsanalyse zeigten die mit den unmethylierten Vektoren transfizierten Zellen jeweils die für den jeweiligen Vektor typische Expressionskinetik. Im Falle des Vektors pAZ, der für das kurzlebige EGFP kodiert, ist die höchste EGFP-Expression bereits am ersten Messpunkt 6 Stunden

nach der Transfektion erreicht und nimmt im Laufe der Zeit kontinuierlich ab, bis 48 Stunden nach der Transfektion keinerlei EGFP-Expression mehr messbar ist (Abbildung 3-42), was erneut zeigt, dass auch unmodifizierte Vektoren nach einiger Zeit intrazellulär stillgelegt werden. Die Zellen, die mit den CpG-methylierten Vektoren transfiziert wurden, zeigten grundsätzlich keine EGFP-Expression, was eindeutig bestätigt, dass der CMV-IE-Promotor des Reportergens durch CpG-DNA-Methylierung vollständig stillgelegt wird.

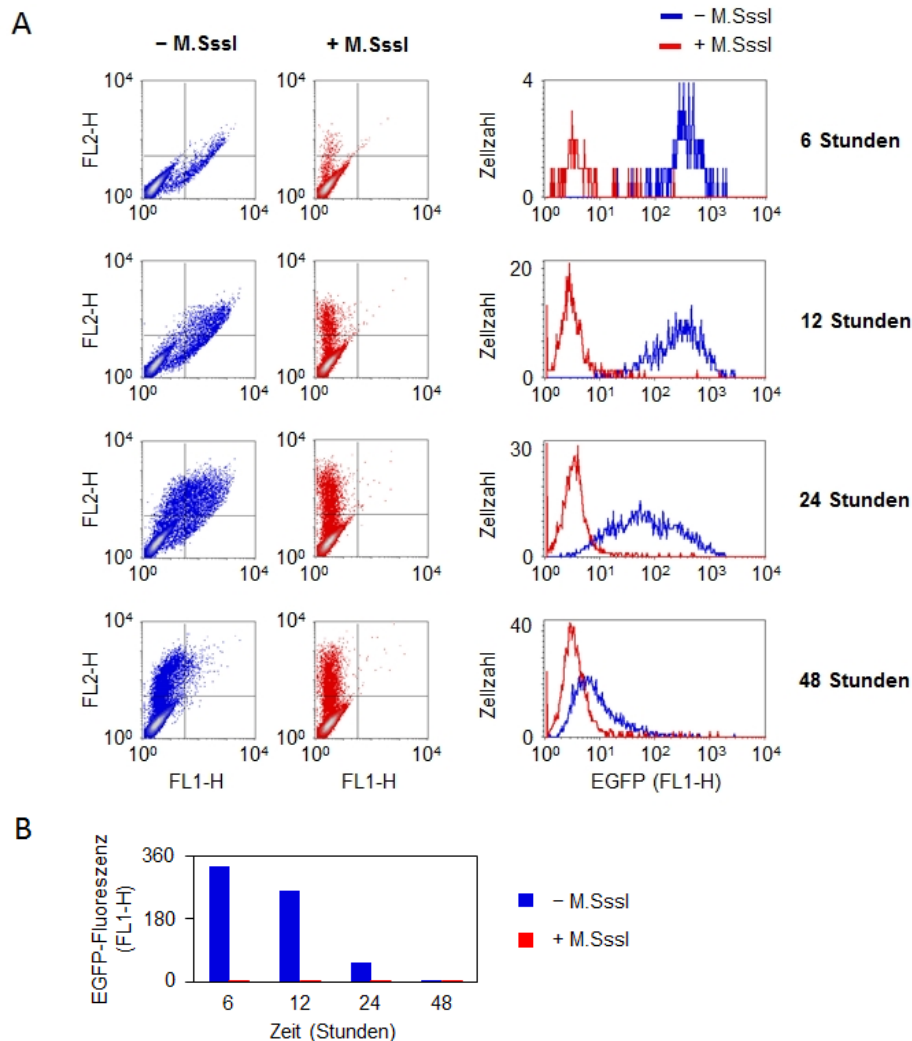


Abbildung 3-42 Einfluss einer *in vitro*-Methylierung des Vektors pAZ auf die Genexpression. EGFP-Expression von HeLa-Zellen die mit unmethyliertem (- M.SssI) oder mit M.SssI-methyliertem pAZ-Vektor (+ M.SssI) transfiziert wurden. (A) Dot-Plots und überlagerte Verteilungsdiagramme. (B) Quantitative Analyse der EGFP-Expression eines repräsentativen Experiments.

Im Falle des Vektors pZA, der für das stabile und langlebige EGFP kodiert, steigt die EGFP-Expression bis 24 Stunden nach der Transfektion an und erst nach 48 Stunden ist ein Rückgang der EGFP-Expression zu beobachten (Abbildung 3-43). Allgemein zeigt sich eine etwa vierfach höhere maximale EGFP-Expression, als im Falle des kurzlebigen EGFP-ODC, und somit auch einen größeren Messbereich. Aber sogar bei diesem Vektor verursacht eine vollständige CpG-Methylierung zu allen

untersuchten Zeitpunkten ein fast komplettes Verschwinden des EGFP-Signals in den FACS-Plots (Abbildung 3-34). Dieses Ergebnis bestätigt somit eine sehr effiziente und andauernde Stilllegung der Genexpression durch CpG-Methylierung.

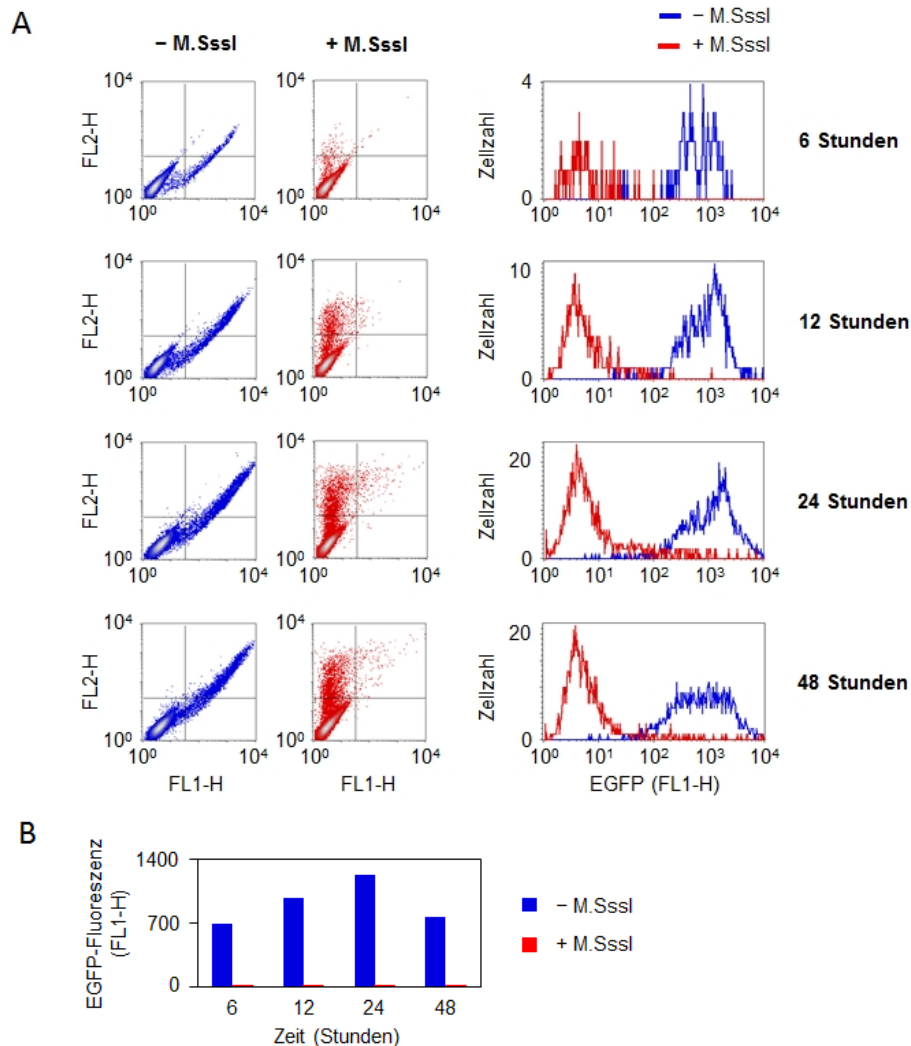


Abbildung 3-43 Einfluss einer *in vitro*-Methylierung des Vektors pZA auf die Genexpression. EGFP-Expression von HeLa-Zellen die mit unmethyliertem (- M.SssI) oder mit M.SssI-methyliertem pZA-Vektor (+ M.SssI) transfiziert wurden. (A) Dot-Plots und überlagerte Verteilungsdiagramme. (B) Quantitative Analyse der EGFP-Expression eines repräsentativen Experiments.

Es ist bekannt, dass Histondeacetylierung an der an der 5-mCpG-vermittelten, transkriptionellen Repression des CMV-Promotors beteiligt ist (Prösch et al., 1996), (Grassi et al., 2003), (Brooks et al., 2004). Daher wurde weiterhin die Wirkung des HDAC-Inhibitors TSA auf die EGFP-Expression in transfizierten HeLa-Zellen untersucht (Abbildung 3-44). Diese Expressionsanalyse zeigt, dass die Behandlung mit TSA konzentrationsabhängig die EGFP-Expression der unmethylierten Vektoren pAZ und pZA erhöht, wobei sowohl die Zunahme der EGFP-Expression als auch die Konzentrationsabhängigkeit im Falle des Vektors pAZ weitaus deutlicher ist. Auch die EGFP-Expression der voll-methylierten Vektoren nimmt zu. Im Falle des Vektors pAZ verdoppelt sie sich durch 220 nM TSA im Vergleich zur unbehandelten Probe, die Expression des Vektors pZA erhöht sich

sogar um ein 20-faches, was aber im Vergleich zur Expression des unmethylierten Vektors unter denselben Bedingungen immer noch vernachlässigbar gering ist. Man kann somit davon ausgehen, dass CpG-Methylierung für eine sehr effiziente Genstilllegung sorgt, die weitestgehend unabhängig von Histondeacetylierung ist.

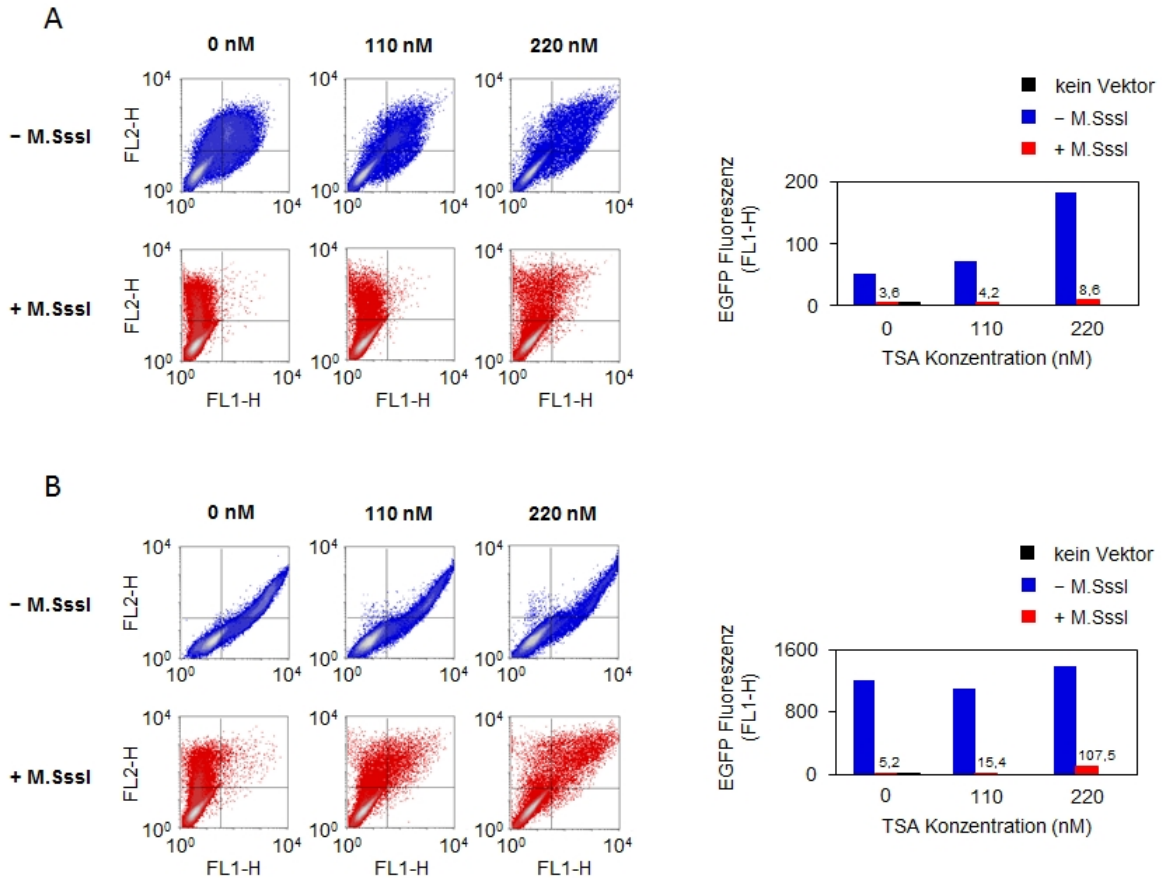


Abbildung 3-44 Einfluss von TSA auf die Expression der *in vitro*-methylierten Vektoren pAZ und pZA. EGFP-Expression von HeLa-Zellen, die mit unmethyliertem (- M.SssI) oder mit M.SssI-methyliertem pAZ oder pZA-Vektor (+ M.SssI) transfiziert und für 24 Stunden mit TSA behandelt wurden. (A + B) Dot-Plots (links) und quantitative Analyse der EGFP-Expression (rechts) nach Transfektion der Zellen mit (A) pAZ und (B) pZA. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment.

Das Vorhandensein von 5-Methylcytosin (5-mC) innerhalb von spezifischen Transkriptionsfaktor-Bindestellen kann die Bindungsaffinität der Transkriptionsfaktoren zu diesen Sequenzen beeinflussen. Dies gilt auch für die CRE-Konsensus-Sequenz des innerhalb des CMV-IE-Promotors dominierenden Transkriptionsfaktors CREB. Diese enthält ein CpG-Dinukleotid, dessen Methylierung zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit des Transkriptionsfaktors an diese Sequenz führt (Iguchi-Ariga et al. 1989), (Moore et al., 2013). Um nun zu überprüfen, ob dies in dem verwendeten Reportersystem auch der Fall ist, wurde ein Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) durchgeführt. Um in diesem Bandshift-Assay die Bindung des Transkriptionsfaktors CREB spezifisch für das in den Host Cell Reactivation-Experimenten Plasmidsubstrat zu untersuchen, wurde der Bandshift-Assay wie in Kapitel 2.2.11 beschrieben durchgeführt (Abbildung 2-5). Die CREB-



Bindungsreaktion mit unmethylierten pZAJ zeigte das für die Auswertung relevante, die Promotorregion umfassende kleinere DNA-Fragment (653 bp) und den linearisierten Rest des Vektors (4228 bp), der aufgrund seiner Größe im oberen Teil des Gels verblieben ist (Abbildung 3-45). In Anwesenheit von CREB ist eine deutliche Verschiebung des 653 bp-DNA-Fragments zu erkennen, wobei die Intensität und die Anzahl der verschobenen Banden mit steigender CREB-Menge zunehmen. So sind bei der höchsten Menge an CREB, die 9 CREB-Dimeren pro DNA-Fragment entspricht, oberhalb einer schwachen Bande ungebundener DNA vier weitere DNA-Banden sichtbar, bei denen es sich um CREB-Promotor-Komplexe handelt. Das Vorhandensein von mehreren verschieden stark verschobenen Banden lässt sich dadurch erklären, dass der im DNA-Fragment enthaltene CMV-IE-Promotor 7 Bindestellen für CREB enthält, von denen 4 in der optimalen Konsensus-Sequenz vorliegen. Da dadurch der Überschuss an CREB-Dimeren in der Reaktion nur 1,3 Dimere pro vorhandenes CRE beträgt, ist zu erwarten, dass die DNA-Fragmente jeweils von unterschiedlichen Mengen an CREB-Dimeren gebunden werden. Im Falle des mit M.SssI CpG-methylierten pZAJ-Vektors ist hingegen bei gleichen CREB-Mengen nur eine relativ schwache verschobene Bande zu sehen, was zeigt, dass die CREB-Bindung deutlich vermindert ist. Das Auftreten dieser einzelnen verschobenen Bande ist wahrscheinlich dadurch zu erklären, dass der Vektor nur zu etwa 97 % methyliert ist und in den Fällen, in denen ein CpG innerhalb CRE unmethyliert geblieben ist, ein CREB-Dimer gebunden haben kann. An den Proben des CRE-losen Vektors pCRE-NULL ist zu erkennen, dass bei den verwendeten Proteinmengen keine Verschiebung des 180 bp-großen Promotorfragments zu erkennen ist, was wiederum zeigt, dass die Bindung des Transkriptionsfaktors CREB bei diesen Konzentrationen spezifisch für seine Erkennungssequenz ist. Dieser Versuch demonstriert deutlich, dass die Bindung der CREB-Dimere zu ihrer spezifischen Bindungssequenz durch CpG-Methylierung fast vollständig inhibiert wird und auf diese Weise das in Abbildung 3-42 und 3-43 beschriebene, völlige Fehlen von EGFP- Expression nach Transfektion der CpG-methylierten Vektoren zu erklären ist.

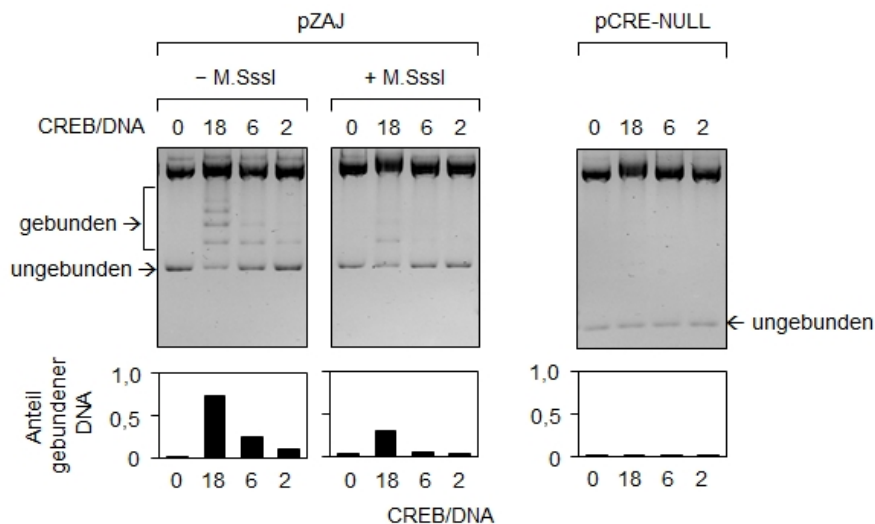


Abbildung 3-45 Einfluss von globaler CpG-Methylierung auf die Bindung des Transkriptionsfaktors CREB zu seiner Konsensus-Sequenz CRE. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) mit den PciI/BmtI-Fragmenten des unmethylierten (-M.SssI) und des M.SssI-behandeltem (+ M.SssI) pZAJ-Vektors. Die untere Bande enthält entweder 7 (pZAJ) oder kein CRE (pCRE-NULL). Der promotorlose Vektor pCRE-NULL dient als Kontrolle auf unspezifische Bindungsaktivität. Die Zahlen repräsentieren das molare Verhältnis von CREB-Molekülen zu DNA-Fragmenten.

Um zu untersuchen, ob 5-mC außerhalb des Genpromotors einen Effekt auf die EGFP-Genexpression ausübt, wurden Vektoren hergestellt, die jeweils ein bzw. zwei 5-mC enthielten und somit ein bzw. zwei hemimethylierte CpG-Dinukleotide besaßen. Als Zielvektoren der Austauschreaktion wurden die mit der Nicking-Endonuklease Nb.BsrDI doppelt eingeschnittenen Vektoren pZAJ-5W/pZAJ-5C verwendet, die den Einbau der synthetischen Oligonukleotide in den nichttranskribierten bzw. den transkribierten DNA-Strang des 5'UTR ermöglichen (Abbildung 3-46). Da keines der zwei CpG-Dinukleotide innerhalb der 18 nt-Sequenz zwischen den gleichgerichteten BsrDI-Schnittstellen in einer Erkennungssequenz eines methylierungssensitiven Restriktionsenzym liegt, wurde das Vorhandensein der Modifikationen in diesem Fall nur indirekt durch den Nachweis des vollständigen Oligonukleotid-Austauschs in den Kontrollen ohne PNK überprüft (Anhang III-7).

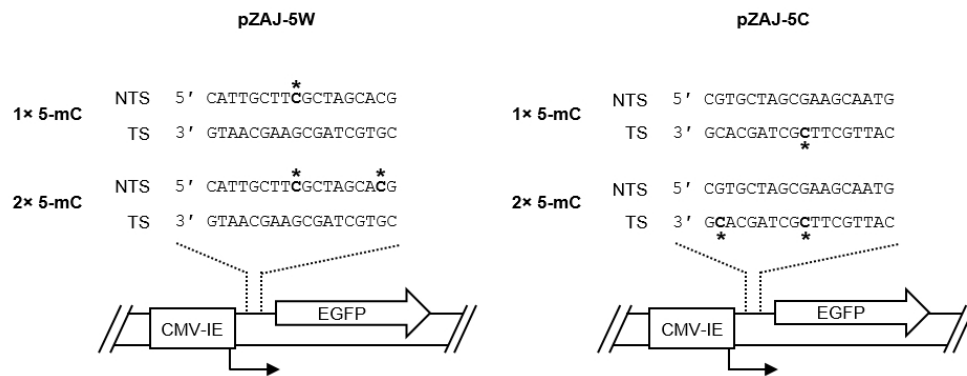


Abbildung 3-46 Schematische Darstellung des EGFP-Reportergens, das ein oder zwei 5-mC innerhalb des 5'-UTRs besitzt. DNA-Sequenz des synthetischen 18 nt Oligonukleotids innerhalb des nicht-transkribierten DNA-Strangs (NTS) des EGFP-Gens (breiter Pfeil). Der Stern kennzeichnet die Position der modifizierten Cytosine. Der gebrochene Pfeil zeigt den Start der Transkription, das Rechteck den CMV-IE-Promotor, unter dessen Kontrolle das Reportergen steht.

Um nun den Effekt einer einzelnen bzw. doppelten Hemimethylierung außerhalb regulatorischer Elemente auf die Genexpression zu untersuchen, wurde die EGFP-Expression von 5-mC enthaltenden pZAJ-5W/5C-Vektoren parallel zu Kontrollvektoren mit unmethylierten CpG-Dinukleotiden in HeLa-Wildtyp-Zellen analysiert. Diese Analyse zeigte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte einen Unterschied in der EGFP-Expression zwischen dem unmethylierten Kontrollvektor und dem einfach bzw. an zwei CpG-Dinukleotiden hemimethylierten Vektor (Abbildung 3-47). Dieses Ergebnis war unabhängig davon, in welchem der DNA-Stränge sich die Hemimethylierung befand.

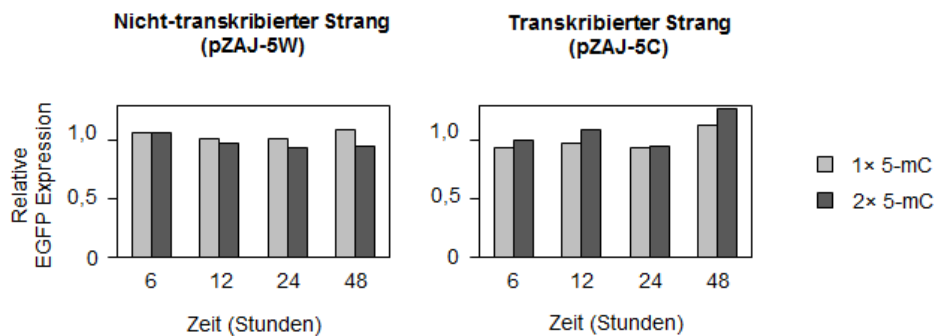


Abbildung 3-47 Expression von Vektoren mit einem oder zwei 5-mC im 5'-UTR des EGFP-Gens. EGFP-Expression von Zellen, die mit pZAJ-Vektoren, die entweder kein, ein oder zwei 5-mC im nicht-transkribierten (NTS) oder im transkribierten DNA-Strang (TS) des 5'-UTR enthielten, transfiziert wurden. EGFP-Expression der 5-mC-enthaltenden Vektoren relativ zur C-enthaltenden Kontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

Um sicherzustellen, dass ein möglicherweise sehr schwacher Effekt eines einzelnen 5-mC nicht von der Akkumulation des von den pZAJ-Vektoren kodierten, langlebigen EGFPs verschleiert wird, wurden ein bzw. zwei 5-mC in das 5'-UTR der Vektoren pZAJ-5W/5C eingebaut (Anhang III-7) und deren EGFP-Expression in HeLa-Zellen analysiert. Die pZAJ-Vektoren kodieren für eine kurzlebige Variante des EGFPs und bieten somit die Möglichkeit die Genexpression in Echtzeit zu verfolgen

(Kitsera et al., 2007). Dies sollte es ermöglichen auch kleine und möglicherweise nur kurzzeitig auftretende Veränderungen der Genexpression zu erkennen. Die Analyse der Expressionsdaten zeigt jedoch unabhängig vom DNA-Strang, in dem sich die Modifikation befindet – trotz der durch das verwendete Vektorsystem besseren zeitlichen Auflösung – zu keinem der untersuchten Zeitpunkte einen Unterschied zwischen der Expression der C-enthaltenden Kontrolle und den Vektoren mit einer bzw. zwei Hemimethylierungen (Abbildung 3-48). Dies untermauert die Schlussfolgerung, dass ein einzelnes 5-mC außerhalb von regulatorischen Elementen keinen Einfluss auf die Genexpression ausübt.

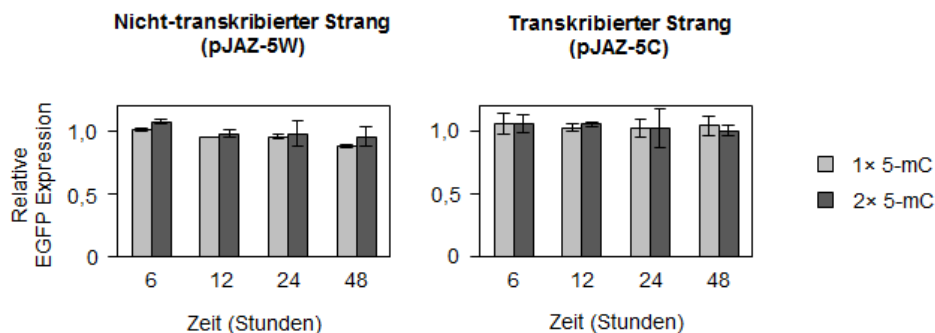


Abbildung 3-48 Expression von Vektoren mit einem oder zwei 5-mC im 5'-UTR des Gens, das für ein kurzlebiges EGFP kodiert. EGFP-Expression von Zellen, die mit pJAZ-Vektoren, die entweder kein, ein oder zwei 5-mC im nicht-transkribierten (NTS) oder im transkribierten DNA-Strang (TS) des 5'-UTR enthalten, transfiziert wurden. EGFP-Expression der 5-mC-enthaltenden Vektoren relativ zur C-enthaltenden Kontrolle. Mittelwert aus zwei unabhängigen Transfektionen ( $\pm$  Variationsbreite).

Es wäre ebenfalls möglich, dass etwaige Effekte, die ein einzelnes 5-mC auf die Genexpression haben könnte, dadurch verhindert werden, dass die DNA aktiv demethyliert wird. Eine Publikation von Barreto et al. (2007) beschreibt eine Demethylierung von Plasmid-DNA unter Beteiligung der Nukleotid-Exzisions-Reparatur. Um auszuschließen, dass ein derartiger Vorgang die Hemimethylierung nach der Transfektion aus der Vektor-DNA entfernt und so mögliche Effekte, die zu späteren Zeitpunkten auftreten, nicht mehr festgestellt werden können, wurden die auf pJAZ-5W/5C basierenden Vektoren mit einem einzelnen bzw. mit zwei 5-mC, sowie deren unmodifizierten Kontrollen zunächst in die NER-defizienten XP-A (GM04321) Zellen transfiziert. Zur Kontrolle wurden MRC5-Zellen, bei denen es sich um NER-profiziente Zellen handelt, verwendet. Die Analyse der durch Durchflusszytometrie erhaltenen Daten zur EGFP-Expression zeigt, dass sowohl in den NER-profizienten MRC5-, als auch in den NER-defizienten XPA-Zellen kein signifikanter Einfluss eines einzelnen 5-mC zu erkennen ist (Abbildung 3-49). Die EGFP-Expression der hemimethylierten Vektoren ist im Vergleich zur entsprechenden nicht methylierten Kontrolle nur minimal bis gar nicht verringert. Die relative Expression der hemimethylierten Vektoren zeigt keine Unterschiede zwischen den beiden verwendeten Zelllinien, was zeigt, dass wahrscheinlich keine Demethylierung unter Beteiligung der Nukleotid-Exzisions-Reparatur auftritt, die einen etwaigen Effekt von 5-mC

verhindern könnte. Unter Einbeziehung der Ergebnisse aus Abbildung 3-47 und 3-38 kann angenommen werden, dass einzelne Hemimethylierungen außerhalb der Promotorregion keine Auswirkungen auf die Expression des Reportergens haben.

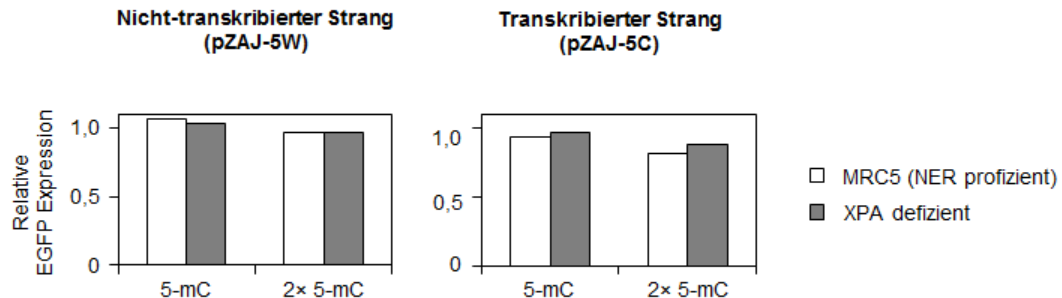


Abbildung 3-49 Expression von Vektoren mit einem oder zwei 5-mC im untranslatierten Bereich des EGFP-Gens in XPA-defizienten Zellen. EGFP-Expression von XPA-profizienten (MRC5) und XPA-defizienten Zellen, die mit pZAJ-Vektoren, die entweder kein, ein oder zwei 5-mC im nicht-transkribierten (NTS) oder im transkribierten DNA-Strang (TS) des 5'-UTR enthalten, transfiziert wurden. EGFP-Expression der 5-mC-enthaltenden Vektoren 24 Stunden nach der Transfektion relativ zur C-enthaltenden Kontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

### 3.4.2 pCRE-UNO als Vektorsystem für die Untersuchung des Effekts einzelner DNA-Basenmodifikationen in CRE

Um zu prüfen, ob die Hemimethylierung eines einzelnen oder mehrerer CpG-Dinukleotide in einem CRE-Element ausreichen, um die Expression des CMV-IE-kontrollierten Reportergens zu beeinflussen, wurden nun ausgehend von dem Vektor pCMV-1111-AZ-W, der für das kurzlebige EGFP-ODC kodiert, Vektoren hergestellt, die entweder eine Hemimethylierung, drei Hemimethylierungen oder keine Methylierung innerhalb des CMV-IE-Promotors enthielten (Abbildung 3-50). Dabei befand sich die einzelne CpG-Hemimethylierung im zentralen CpG-Dinukleotid eines CRE, die beiden weiteren in den das CRE flankierenden CpG-Dinukleotiden. Nachgewiesen wurde die Anwesenheit eines einzelnen 5-mC innerhalb der CREB-Erkennungssequenz mittels Restriktionsverdau durch AatII (Anhang III-8)

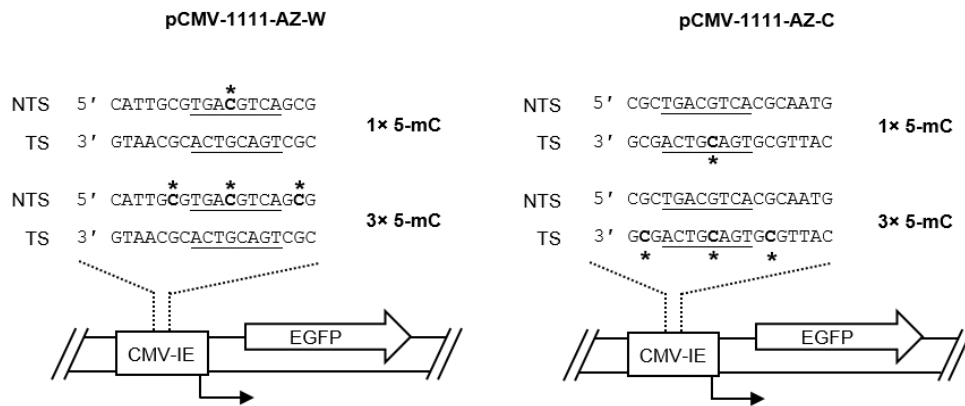


Abbildung 3-50 Schematische Darstellung des EGFP-Reportergens, das ein oder drei 5-mC innerhalb des CMV-IE-Promotors besitzt. DNA-Sequenz des synthetischen 18 nt Oligonukleotids innerhalb des top-Strangs (NTS) des EGFP-Gens (breiter Pfeil). Der Stern kennzeichnet die Position der modifizierten Cytosine, die CRE-Sequenz ist unterstrichen. Der gebrochene Pfeil zeigt den Start der Transkription, das Rechteck den CMV-IE-Promotor, unter dessen Kontrolle das Reportergen steht.

Die Analyse der EGFP-Expression dieser Vektoren ergab, dass weder eine noch drei Hemimethylierungen innerhalb eines einzelnen Promotor-Elements einen nachweisbaren Einfluss auf die Expression des Reportergens haben (Abbildung 3-51). Dieses Ergebnis ist konstant über alle untersuchten Zeitpunkte und unabhängig davon, in welchem DNA-Strang sich die Hemimethylierungen befinden. Das bedeutet, dass die Hemimethylierung eines einzelnen CRE des CMV-IE-Promotors nicht ausreicht, um sich negativ auf die Genexpression auszuwirken. Wahrscheinlich werden alle möglichen Effekte der einzelnen Hemimethylierung durch die Aktivität der anderen 6 unmodifizierten CRE des CMV-IE-Promotors und der anderen vorhandenen Transkriptionsfaktoren überspielt und kompensiert (Abbildung 3-27). Somit ist der Vektor pCMV-1111 nicht zur quantitativen Untersuchung von Effekten einzelner Modifikationen innerhalb regulatorischer Elemente geeignet, da seine Hintergrund-Promotoraktivität zu hoch ist.

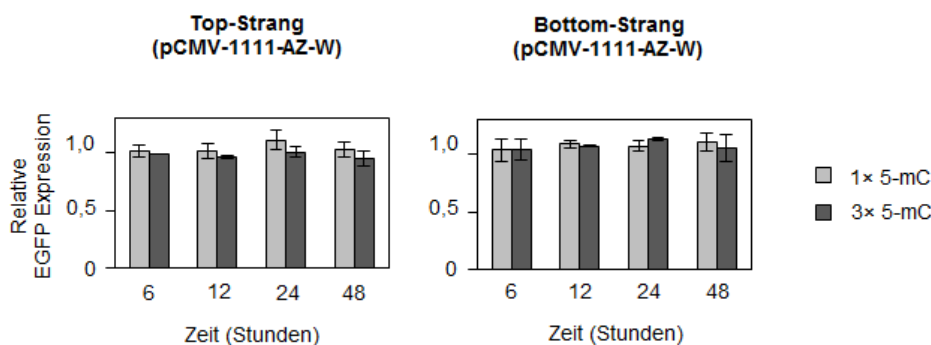


Abbildung 3-51 Expression von Vektoren mit einem oder drei 5-mC innerhalb des CMV-IE-Promotors eines für ein kurzlebiges EGFP-kodierenden Gens. EGFP-Expression von Zellen, die mit pCMV-1111-AZ-Vektoren, die entweder kein, ein oder drei 5-mC Top-Strang oder im Bottom-Strang enthalten, transfiziert wurden. EGFP-Expression der 5-mC-enthaltenden Vektoren relativ zur C-enthaltende Kontrolle. Mittelwert aus zwei unabhängigen Transfektionen ( $\pm$  Variationsbreite).

Da der Vektor pCMV-1111-AZ-W, dessen CMV-IE-Promotor vollständig war, eine zu starke Promotoraktivität aufwies, um quantitativ den Effekt einzelner DNA-Basenmodifikationen in einem einzelnen regulatorischen Element nachzuweisen, wurde der Vektor pCMV-0011 in Erwägung gezogen. Der CMV-IE-Promoter dieses Vektors ist auf 5'-Seite des modifizierten CRE vollständig deletiert und besitzt somit nur noch insgesamt 4 CREs (2x optimaler Konsensus) und eine in etwa halb so große Promotoraktivität wie der Promotor von pCMV-1111. Der Einbau der synthetischen Oligonukleotide erfolgte mittels Strangaustausch analog zu pCMV-1111, wobei allerdings nur das Oligonukleotid mit drei 5-mC verwendet wurde (Abbildung 3-52). Der Nachweis der Anwesenheit von 5-mC innerhalb des CRE erfolgte wie bei pCMV-1111 durch einen Verdau mit der Restriktionsendonuklease AatII (Anhang III-9).

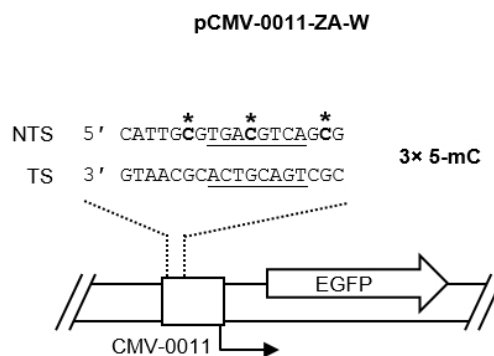


Abbildung 3-52 Schematische Darstellung des EGFP-Reportergens, das ein oder drei 5-mC innerhalb des halb-deletierten CMV-IE-Promotors besitzt. DNA-Sequenz des synthetischen 18 nt Oligonukleotids innerhalb des top-Strangs (NTS) des EGFP-Gens (breiter Pfeil). Der Stern kennzeichnet die Position der modifizierten Cytosine, die CRE-Sequenz ist unterstrichen. Der gebrochene Pfeil zeigt den Start der Transkription, das Rechteck den CMV-0011-Promotor, unter dessen Kontrolle das Reportergen steht.

Die Analyse der EGFP-Expression dieser Vektoren zeigt, dass zu jedem untersuchten Zeitpunkt die Genexpression des dreifach hemimethylierten Vektors um etwa 25 % Prozent im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt ist (Abbildung 3-53). Das unmittelbare Auftreten dieser Expressionshemmung bereits sechs Stunden nach der Transfektion deutet darauf hin, dass es sich hierbei um einen direkten Effekt, wahrscheinlich ausgelöst durch Verminderung der CREB-Bindung, handelt. Zudem beweist dieses Ergebnis, dass das verwendete Vektorsystem tatsächlich durch einzelne 5-mCs zu beeinflussen ist. Doch die Tatsache, dass drei Hemimethylierungen vonnöten sind um eine Reduktion der Genexpression von 25 % zu erreichen, zeigt, dass der Effekt der Hemimethylierungen immer noch stark durch nicht modifizierte Transkriptionsfaktor-Bindestellen kompensiert wird.

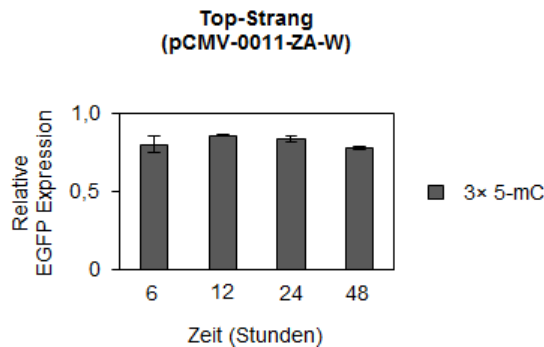


Abbildung 3-53 Einfluss von drei 5-mC innerhalb des halb-deletierten CMV-IE-Promotors auf die Genexpression. EGFP-Expression von Zellen, die mit pCMV-0011-Vektoren, die entweder kein oder drei 5-mC im top-Strang des halb deletierten CMV-IE-Promotors (pCMV-0011-W) enthalten, transfiziert wurden. EGFP-Expression der 5-mC-enthaltenden Vektoren relativ zur C-enthaltenden Kontrolle. Mittelwert aus zwei unabhängigen Transfektionen ( $\pm$  Variationsbreite).

Um störende Hintergrund-Promotoraktivität von vornerein ausschließen zu können, wurden kein, eine oder drei Hemimethylierungen in den Vektor pCRE-UNO, dessen Promotor nur ein einzelnes CRE enthält, eingeführt (Abbildung 3-54). Da die transkriptionelle Aktivität anderer Promotorelemente in allen bisher untersuchten Vektoren die quantitative Analyse der Effekte einzelner DNA-Basenmodifikationen erschwert bzw. sogar unmöglich gemacht hatte, sollte der Vektor pCRE-UNO nun ein maximal sensitives Vektor-System darstellen. Der erfolgreiche Einbau der synthetischen Oligonukleotide wurden durch parallele Inkubation einer Probe ohne PNK überprüft, sowie die Anwesenheit von 5-mC in der Vektor-DNA durch den Verdau der Vektoren mit der Restriktionsendonuklease AatII nachgewiesen (Anhang III-10).

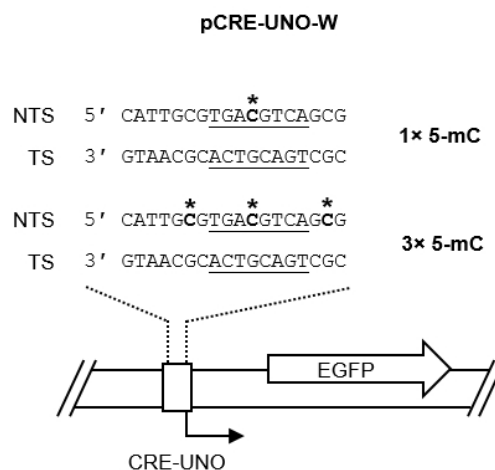


Abbildung 3-54 Schematische Darstellung des EGFP-Reportergens, das ein oder drei 5-mC innerhalb des minimalen CRE-UNO-Promotors besitzt. DNA-Sequenz des synthetischen 18 nt Oligonukleotids innerhalb des Top-Strangs (NTS) des EGFP-Gens (breiter Pfeil). Der Stern kennzeichnet die Position der modifizierten Cytosine, die CRE-Sequenz ist unterstrichen. Der gebrochene Pfeil zeigt den Start der Transkription, das Rechteck den minimalen CRE-UNO-Promotor, unter dessen Kontrolle das Reportergen steht.

Die Expressionsanalyse dieser Vektoren zeigt, dass ein einzelnes 5-mC innerhalb des CRE die Genexpression um 25 % im Vergleich zur C-enthaltenden Kontrolle erniedrigt (Abbildung 3-55). Drei



Hemimethylierungen – eine davon innerhalb der CRE-Sequenz und die anderen beiden flankierend dazu – führen zu einer Reduktion der Genexpression um 50 % in Relation zur Kontrolle.

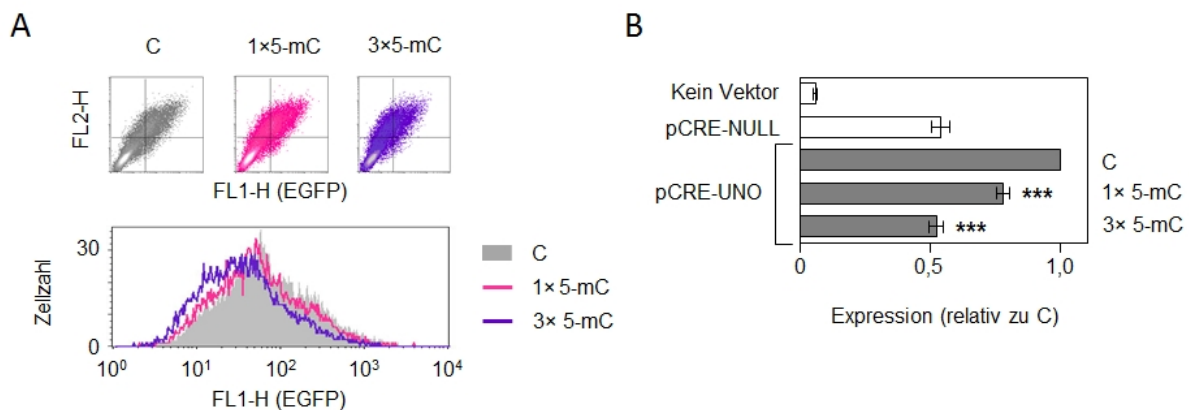


Abbildung 3-55 Einfluss von einem oder drei 5-mC innerhalb des CRE-UNO-Promotors auf die Genexpression. EGFP-Expression von HeLa-Zellen, die mit Vektoren, die kein, ein oder drei 5-mC innerhalb des Top-Strangs des CRE-UNO-Promotors enthalten, transfiziert wurden. (A) Repräsentative FACS-Daten 24 Stunden nach der Transfektion. (B) EGFP-Expression relativ zur C-enthaltenden Kontrolle 24 Stunden nach der Transfektion. Die Expression des CRE-losen Vektors pCRE-NULL dient als Referenz. Mittelwert von 7 Transfektionen mit zwei unabhängigen Plasmid-Präparationen ( $\pm$  Standardabweichung). Zweiseitig gepaarter Student's T-test: \*\*\*  $P < 0,001$ .

Die Tatsache, dass zwei zusätzliche Hemimethylierungen außerhalb von CRE in der Lage sind, den expressionshemmenden Effekt von 5-mC zu verstärken, ist auf den ersten Blick überraschend, da der Transkriptionsfaktor CREB als Dimer über dem zentralen CpG-Dinukleotid seiner Bindungssequenz bindet (Yamamoto et al., 1988), (Wu et al., 1998) und von modifizierten Cytosinen außerhalb dieser 5-8 Nukleotide nicht beeinflusst werden sollte. Um nun zu überprüfen, welchen Einfluss die flankierenden 5-mCs auf die Bindung von CREB ausüben, wurde mit der modifizierten Vektor-DNA ein EMSA durchgeführt. Die Bindungsreaktion mit den Fragmenten des unmethylierten Kontrollvektors zeigt, dass der Anteil des gebundenen 180 bp Promotor-Fragments, das das einzelne CRE enthält, mit steigender CREB-Menge zunimmt (Abbildung 3-56). Bei der größten eingesetzten Proteinmenge, die einem 18-fachen Überschuss an CREB-Molekülen pro CRE entspricht, liegt es vollständig gebunden und somit im Gel verschoben vor. Demgegenüber ist im Falle der 5-mC und dreimal 5-mC enthaltenden DNA-Fragmente selbst bei einem 9-fachen Dimerüberschuss keine vollständige Bindung des DNA-Fragments zu beobachten, nur etwa die Hälfte der DNA findet sich in der verschobenen Bande. Eine unspezifische Bindung des Transkriptionsfaktors kann ausgeschlossen werden, da die DNA-Fragmente des Vektors pCRE-NULL, der keine Bindestelle für CRE besitzt, bei denselben CREB-Mengen vollkommen ungebunden vorliegt. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Hemimethylierung die Bindung des Transkriptionsfaktors zwar erschwert, sie aber nicht vollständig verhindert. Die Diskrepanz zwischen der Beobachtung, dass ein und drei 5-mC die CREB-Bindung im gleichen Maße behindern, aber einen quantitativen Unterschied in ihrem Effekt auf die

Genexpression aufweisen, lässt sich möglicherweise darin begründen, dass für die von CREB angetriebene Transkription weitere Proteine in einen Komplex rekrutiert werden müssen (Kwok et al., 1994), (Swope et al., 1996), und dass deren Anlagerung durch flankierende Hemimethylierungen erschwert werden könnte.

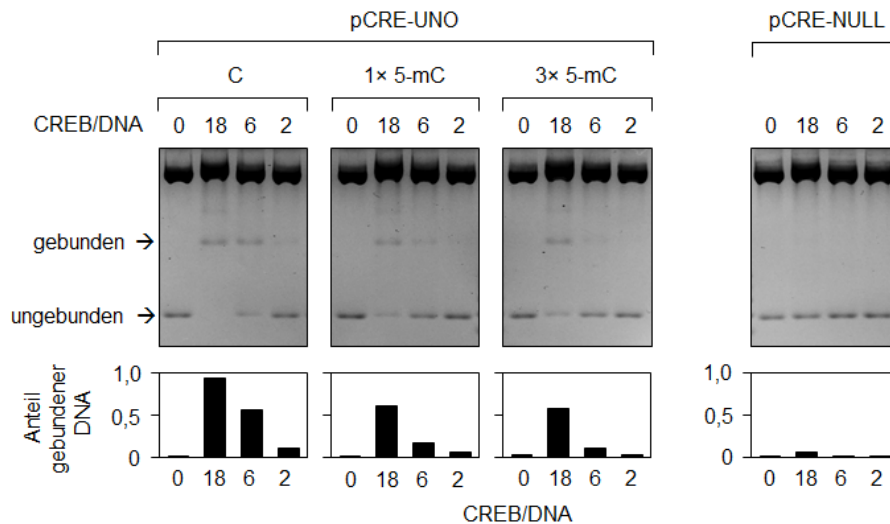


Abbildung 3-56 Einfluss von einem bzw. drei 5-mC innerhalb von CRE auf die Bindung des Transkriptionsfaktors CREB zu seiner Konsensus-Sequenz. EMSA mit den PciI/BmtI-Fragmenten des Vektors pCRE-UNO mit keinem, einem oder drei 5-mCs in Promotor-Region. Die untere Bande enthält entweder ein (pCRE-UNO) oder kein CRE (pCRE-NULL). Der promotorlose Vektor pCRE-NULL dient als Kontrolle auf unspezifische Bindungsaktivität. Die Zahlen repräsentieren das molare Verhältnis von CREB-Molekülen zu DNA-Fragmenten.

Um zu überprüfen, ob die Verstärkung der Expressionshemmung durch flankierende Hemimethylierungen durch eine vermehrte Rekrutierung von MeCps und damit verbundener Histondeacetylierung verursacht wird, wurde die Wirkung des HDAC-Inhibitors TSA auf die EGFP-Expression transfizierter HeLa-Zellen untersucht. Die Expressionsanalyse zeigt, dass ein einzelnes 5-mC sowohl in den unbehandelten als auch mit den mit TSA behandelten Zellen die Genexpression um 25 % verglichen mit der C-enthaltenden Kontrolle reduziert (Abbildung 3-57). Drei Hemimethylierungen reduzieren die Genexpression um 50 % ebenfalls in unbehandelten, wie auch in TSA-behandelten Zellen. Da die Stärke des Effekts von 5-mC bzw. von drei 5-mC unabhängig von der Anwesenheit von TSA ist, kann davon ausgegangen werden, dass Histondeacetylierung keine Rolle bei dieser Inhibierung spielt.

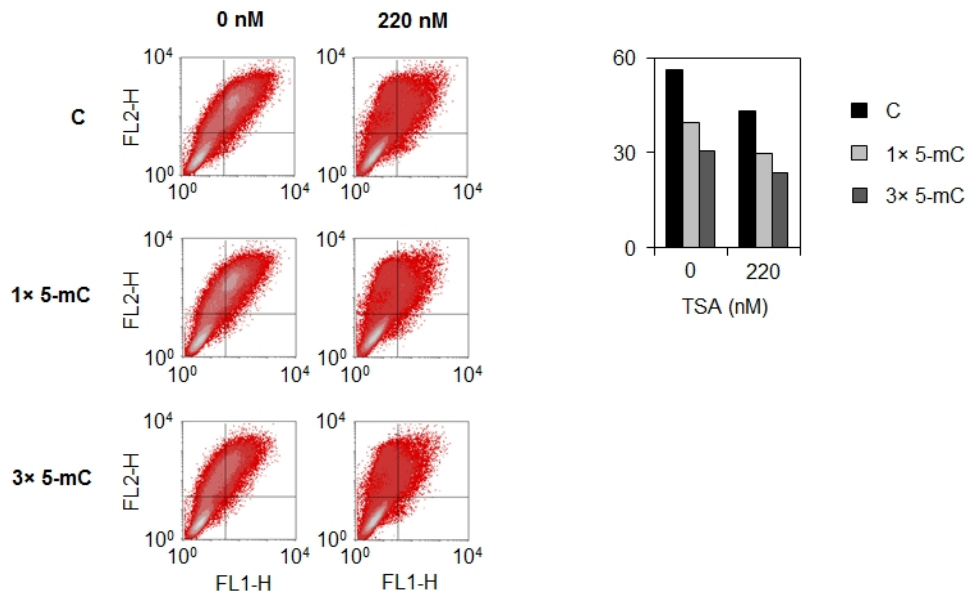


Abbildung 3-57 Expression der pCRE-UNO-Vektoren mit keinem, einem oder drei 5-mC in TSA-behandelten Zellen. EGFP-Expression von HeLa-Zellen, die mit pCRE-UNO-Vektoren, die kein, ein oder drei 5-mC innerhalb des top-Strangs des minimalen CRE-UNO-Promotors enthalten, transfiziert und für 24 Stunden mit 220 nM TSA behandelt wurden. (A + B) Dot-Plots (links) und quantitative Analyse der EGFP-Expression (rechts) eines repräsentativen Experiments.

Um nun zu untersuchen, welche Auswirkung die vollständige, symmetrische Methylierung des zentralen CpG-Dinukleotids des CRE im Vergleich zu dessen Hemimethylierung auf die Genexpression hat, wurde zunächst der Vektor pCRE-UNO unter Verwendung der DNA-Methyltransferase M.SssI *in vitro* methyliert. Eine gleichzeitige Methylierung beider DNA-Stränge mittels Strangaustausch ist in diesem Fall nicht möglich, da die korrespondierende Nicking-Endonuklease zu BsrDI nur mit einer Selektivität für einen DNA-Strang existiert. Die quantitative Analyse des Restriktionsverdau mit AatII zeigt, dass 98 % der M.SssI-behandelten Vektor-DNA im zentralen CpG-Dinukleotid des CRE methyliert sind – nur 2 % der Vektor-DNA wurden durch AatII linearisiert (Abbildung 3-58). Die unbehandelte Vektor-DNA wurde hingegen vollständig in die lineare Form überführt.

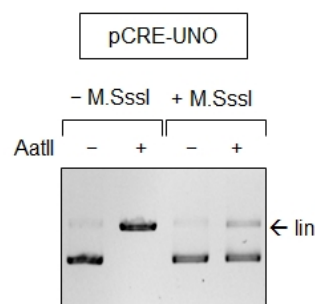


Abbildung 3-58 Nachweis der M.SssI-vermittelten *in vitro*-Methylierung des Vektors pCRE-UNO mittels Restriktionsverdau. Pepräsentatives Gelbild von unmethylierter (- M.SssI) bzw. M.SssI-methylierter (+ M.SssI) Vektor-DNA nach Inkubation mit der Restriktionsendonuklease AatII. Position der linearen Bande (lin) ist mit einem Pfeil markiert.

Zur Bestimmung des Effektes einer beidsträngigen CpG-Methylierung des einzelnen CRE von pCRE-UNO wurden die *in vitro* methylierten Plasmide in HeLa-Zellen transfiziert. In der Expressionsanalyse ist deutlich erkennbar, dass die Genexpression des unmethylierten Kontrollvektors im Laufe der Zeit stetig kontinuierlich ansteigt (Abbildung 3-59). Dahingegen ist eine Genexpression im Falle des vollständig CpG-methylierten Vektors hingegen zu keinem Zeitpunkt quantitativ nachweisbar. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine vollständige CpG-Methylierung auch in diesem Vektor eine effiziente Stilllegung der Genexpression vermittelt.

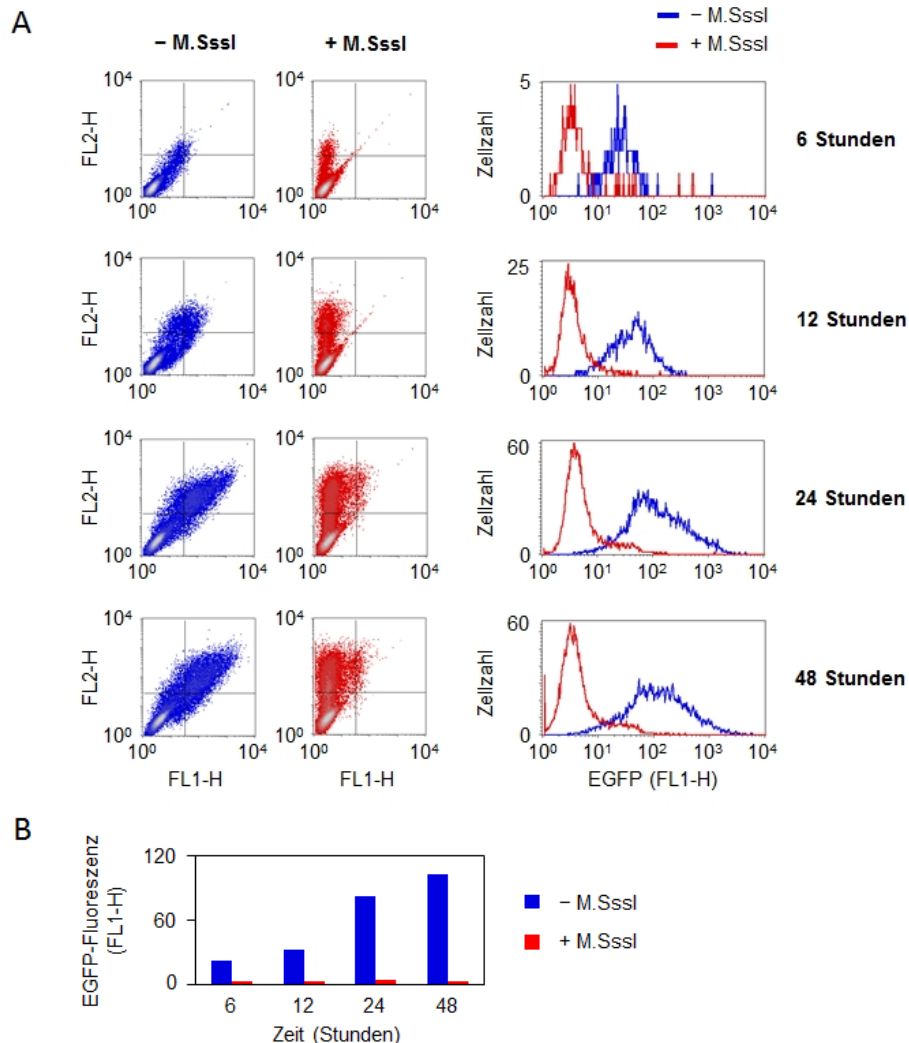


Abbildung 3-59 Einfluss einer *in vitro*-Methylierung des Vektors pCRE-UNO auf die Genexpression. EGFP-Expression von HeLa-Zellen die mit unmethyliertem (- M.SssI) oder mit M.SssI-methyliertem (+ M.SssI) pCRE-UNO-Vektor transfiziert wurden. (A) Dot-Plots und überlagerte Verteilungsdiagramme. (B) Quantitative Analyse der EGFP-Expression eines repräsentativen Experiments.

Die Durchführung eines Bandshift-Assays mit dieser *in vitro* methylierten DNA beweist, dass die beidsträngige Methylierung des CpG-Dinukleotids innerhalb des CRE die CREB-Bindung an das Promotor-Fragment vollständig verhindert (Abbildung 3-60). Im Gegensatz dazu nimmt der Anteil des gebundenen Promotorfragments des unmethylierten Vektors mit steigender CREB-Menge zu und

liegt bei der höchsten verwendeten Proteinmenge vollständig als CREB-DNA-Komplex vor. Da das Promotor-Fragment des CRE-losten Vektors pCRE-NULL bei denselben Mengen an CREB vollständig ungebunden vorliegt, kann eine unspezifische CREB-Bindung ausgeschlossen werden. Das Ergebnis dieses EMSA liegt in Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Host Cell Reactivation Assays (Abbildung 3-59), liefert aber keine Erklärung für die beobachtete Diskrepanz der korrespondierenden Ergebnisse im Falle der Hemimethylierung (Abbildung 3-55 und 3-56).

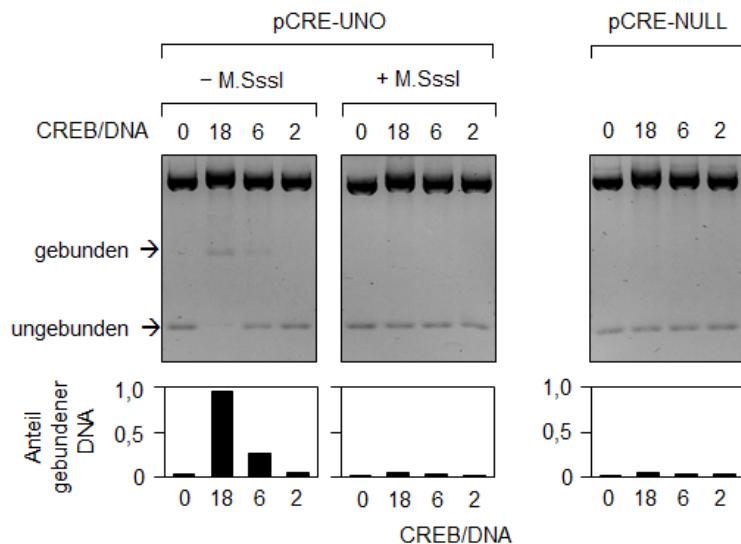


Abbildung 3-60 Einfluss von globaler CpG-Methylierung des pCRE-UNO-Vektors auf die Bindung des Transkriptionsfaktors CREB zu seiner Konsensus-Sequenz CRE. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) mit den PciI/BmtI-Fragmenten des unmethylierten (- M.Sssl) und des M.Sssl-methylierten (+ M.Sssl) pCRE-UNO-Vektors. Die untere Bande enthält entweder ein (pCRE-UNO) oder kein CRE (pCRE-NULL). Die Zahlen repräsentieren das molare Verhältnis von CREB-Molekülen zu DNA-Fragmenten.

Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte ein Hintergrund bei der durchflusszytometrischen Messung der EGFP-Expression sein. Der Vektor pCRE-NULL, der sich vom verwendeten Reportervektor pCRE-UNO nur durch 8 Punktmutationen, die das einzelne CRE aus seiner Sequenz entfernt haben, unterscheidet und daher als „CRE-lose“ Kontrolle verwendet wurde, zeigt nach Transfektion in HeLa-Zellen trotz völligem Fehlen regulatorischer Promotorelemente direkt upstream des EGFP-Gens ein geringes, mit der Zeit kontinuierlich wachsendes Maß an EGFP-Expression (Abbildung 3-24). Diese „leaky expression“ wurde der Anwesenheit weiterer regulatorischer Elemente im Promotor der im Vektor kodierten Resistenzgene zugeschrieben und konnte allen bisher verwendeten Reportersystemen aufgrund der vielfach höheren, spezifischen EGFP-Expression vernachlässigt werden. Da aber der Vektor pCRE-UNO durch seine fast vollständige Promotor-Deletion eine äußerst geringe spezifische EGFP-Expression aufweist, kann ein Einfluss durch leaky Expression anderer Promotoren nicht mehr ohne weiteres von der Hand gewiesen werden. Vergleicht man die EGFP-Expression 24 Stunden nach der Transfektion eines Vektors mit einem bzw. drei 5-mC mit der des C-enthaltenden Vektors sowie mit der von pCRE-NULL, zeigt sich,

dass die EGFP-Expression der Vektoren mit drei 5-mC der des CRE-losen Vektors pCRE-NULL entspricht (Abbildung 3-55). Dies könnte darauf hindeuten, dass der Effekt eines einzelnen 5-mC auf die Genexpression in Wirklichkeit noch deutlich stärker ist, aber durch die leaky Expression in nicht unbeachtlichem Maße verdeckt wird. Um dieser Vermutung nachgehen zu können, ist es vonnöten den Einfluss von einem einzelnen oder von drei 5-mCs in einem von jedweder Hintergrundexpression freien Vektorsystem untersuchen zu können. Da die Entfernung aller weiteren regulatorischen Elemente aus der Vektor-DNA experimentell nur schwer oder gar unmöglich zu bewältigen ist, wurde ein indirekter Weg gewählt. Vollständig *in vitro*-methylierte Vektor-DNA zeigte zu keinem untersuchten Zeitpunkt eine messbare EGFP-Expression (Abbildung 3-59), sodass hier davon ausgegangen werden kann, dass die Methylierung der DNA nicht nur die spezifische, sondern auch die unspezifische Genexpression inhibiert. Um nun den Effekt von Hemimethylierungen in diesem System nachzuweisen, wurde in den vollständig CpG-methylierten Vektor pCRE-UNO an der Position der einzelnen CRE-Sequenz ein Oligonukleotid ohne 5-mC und somit drei Hemimethylierungen eingeführt. Nachgewiesen wurde die Vollständigkeit der Strangaustauschreaktion durch die parallele Inkubation einer Probe ohne PNK (Anhang III-11). Das so erhaltende 3x CG Plasmid entspricht, mit Ausnahme der im methylierten Zustand abgestellten leaky Expression, dem pCRE-UNO-Vektor mit drei Hemimethylierungen. Die Expressionsanalyse nach Transfektion in HeLa-Zellen zeigt, dass in einem Vektor ohne unspezifische EGFP-Expression eine dreifache Hemimethylierung in bzw. um CRE die Genexpression ebenso komplett stilllegt, wie eine beidsträngige Methylierung innerhalb des zentralen CpG-Dinukleotids des CRE (Abbildung 3-61).

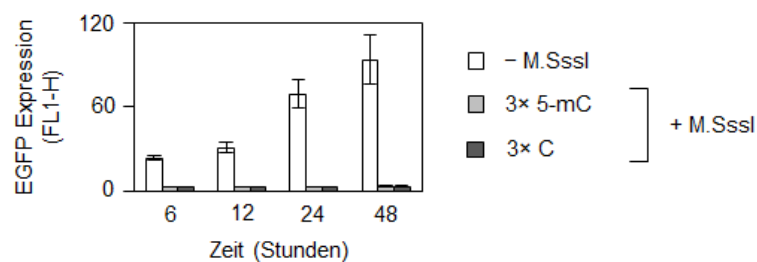


Abbildung 3-61 Expression von Vektoren mit drei Hemimethylierungen innerhalb eines regulatorischen Elements eines global methylierten Vektors. Quantitative Analyse der EGFP-Expression von HeLa-Zellen nach der Transfektion von M.Sssl-methylierten pCRE-UNO-Vektoren, die innerhalb ihres regulatorischen Elements drei Hemimethylierungen enthalten. Mittelwert von zwei unabhängigen Präparationen ( $\pm$  Variationsbreite).

Somit kann davon ausgegangen werden, dass die unspezifische leaky Expression einen nicht zu vernachlässigen Einfluss auf die quantitative Messung der Effekte eines einfachen 5-mC innerhalb von pCRE-UNO ausübt. Dadurch ist auch die festgestellte Diskrepanz zwischen dem Effekt des einzelnen 5-mC auf die Genexpression und dessen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit von CREB zu erklären. Da aber die Effekte durch ein einzelnes 5-mC trotz unspezifischer Hintergrund-Expression quantitativ bestimmbar sind, kann pCRE-UNO trotzdem als geeignetes System für den Nachweis der

Effekte einzelner DNA-Basenmodifikationen innerhalb eines regulatorischen Elements betrachtet werden.

### 3.4.3 8-oxoG innerhalb von CRE inhibiert die Bindung von CREB und inhibiert die Genexpression auf diese Weise direkt

Um nun den Effekt eines einzelnen 8-oxoGs innerhalb des regulatorischen Elements CRE auf die Genexpression zu untersuchen, wurde 8-oxoG in das einzelne CRE des Vektors pCRE-UNO, sowie in ein CRE des vollen CMV-IE-Promotors des Vektors pCMV-1111-W eingeführt (Abbildung 3-62). Die Anwesenheit von 8-oxoG in den Vektoren wurde durch Inkubation mit der 8-oxoG-spezifischen DNA Glykosylase Fpg bewiesen (Anhang III-12).

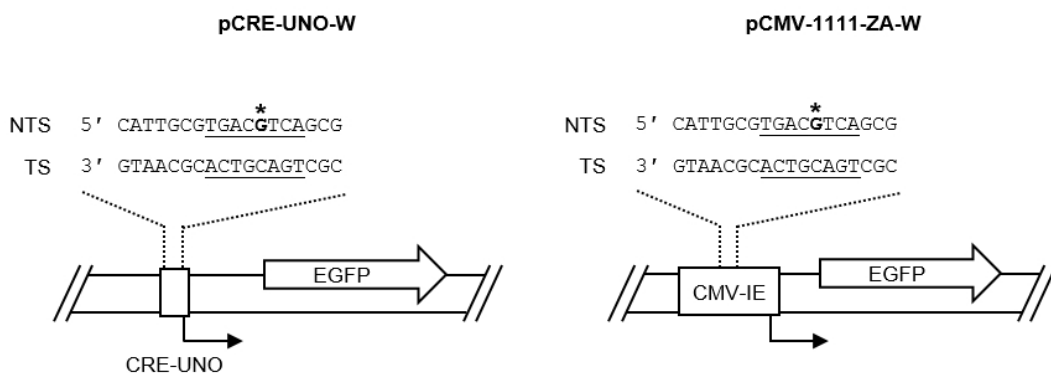


Abbildung 3-62 Schematische Darstellung des EGFP-Reportergens, das ein 8-oxoG innerhalb seines Promotors besitzt. DNA-Sequenz des synthetischen 18 nt Oligonukleotids innerhalb des Top-Strangs (NTS) des EGFP-Gens (breiter Pfeil). Der Stern kennzeichnet die Position des modifizierten Guanins, die CRE-Sequenz ist unterstrichen. Der gebrochene Pfeil zeigt den Start der Transkription, das Rechteck den minimalen CRE-UNO- bzw. den CMV-IE-Promotor, unter dessen Kontrolle das Reportergen steht.

Die Expressionsanalyse der mit dem Vektoren pCMV-1111-W-8oG bzw. pCMV-1111-G transfizierten Zellen zeigt, dass 6 Stunden nach der Transfektion die EGFP-Expression der 8-oxoG-enthaltenden Vektoren identisch zu der der G-enthaltenden Kontrollvektoren ist (Abbildung 3-63). Dies bestätigt, dass dieselbe Menge an Vektor-DNA während der Transfektion in die Zellen eingebracht wurde. Zu späteren Zeitpunkten zeigt sich eine zeitabhängige Abnahme der Expression des 8-oxoG-enthaltenden Vektors, die in ihrer Stärke (ca. 50 % nach 24 Stunden) in etwa dem an anderen Positionen beobachteten Effekt entspricht. Bei der Analyse der mit den Vektoren pCRE-UNO-W-8oG bzw. pCRE-UNO-W-G transfizierten Zellen zeigt sich hingegen bereits 6 Stunden nach der Transfektion eine im Vergleich zur Kontrolle um 15 % erniedrigte EGFP-Expression (Abbildung 3-63). Im weiteren Zeitverlauf nimmt die EGFP-Expression dann kontinuierlich und zeitabhängig weiter ab. Die kontinuierliche Abnahme der EGFP-Expression des 8-oxoG-enthaltenden Vektors im Vergleich zur G-enthaltenden Kontrolle zeigt, dass die schon mehrfach beschriebene Transkriptionshemmung durch 8-oxoG auch bei dessen Positionierung innerhalb des minimalen Promotors auftritt. Die ungleiche EGFP-Expression 6 Stunden nach der Transfektion – einem Zeitpunkt an dem der von der

Exzision von 8-oxoG ausgelöste Stilllegungsmechanismus noch nicht angelaufen sein sollte – deutet allerdings darauf hin, dass ohne weitere kompensierende Transkriptionsfaktoren im Promotor 8-oxoG einen direkten Effekt auf die Genexpression ausübt. Eine ungleiche Menge an für die Transfektion verwendeten Vektoren aufgrund eines Quantifizierungsfehlers wurde nach eingehender Betrachtung des während des Fpg-Verbaus angefertigten Gelbilds verworfen, da sich dort kein Unterschied in den aufgetragenen Vektormengen zeigt (Anhang III-12).

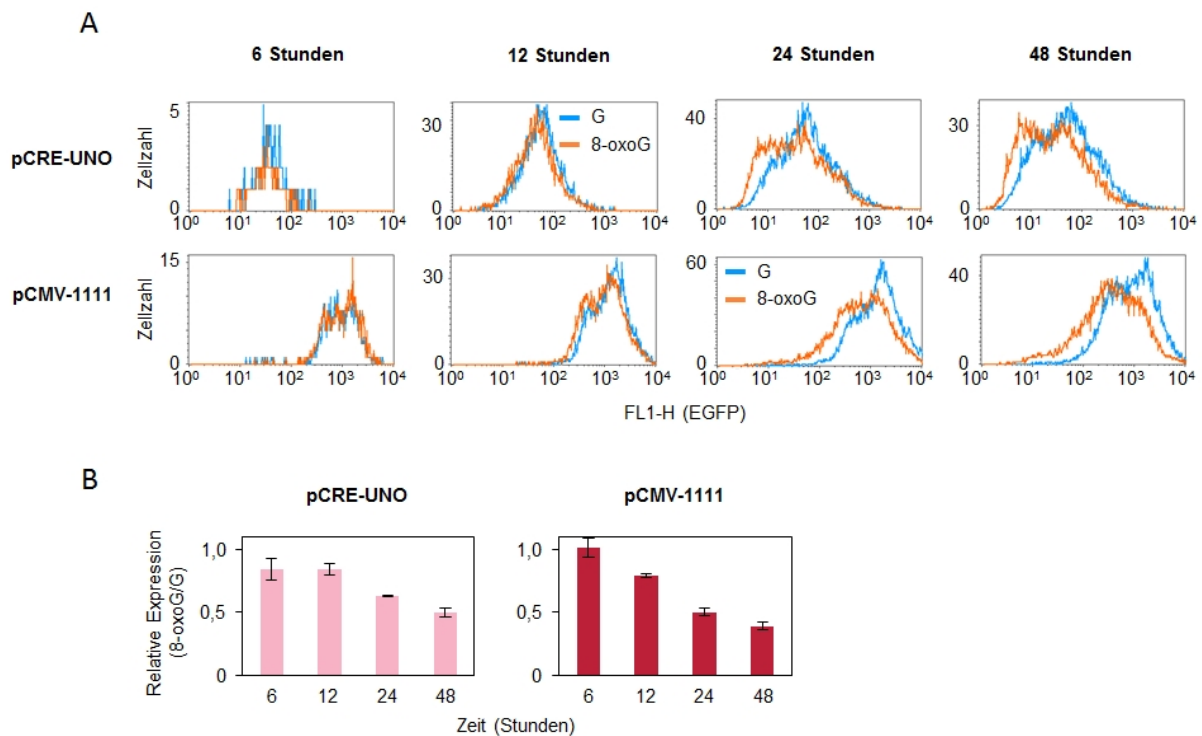


Abbildung 3-63 Einfluss eines einzelnen 8-oxoG innerhalb eines CRE auf die Genexpression. (A) Überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Expression (FL1-H) pro Zelle nach Transfektion von Vektoren, die die Modifikation innerhalb eines CRE im Top-Strang des CRE-UNO-Promotors (pCRE-UNO) oder des vollen CMV-IE-Promotors (pCMV-1111) enthielten. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment. (B) EGFP-Expression der 8-oxoG-enthaltenden Vektoren relativ zur G-enthaltenden Kontrolle. Mittelwert aus zwei unabhängigen Transfektionen ( $\pm$  Variationsbreite).

Um zu überprüfen, ob es sich bei dem beobachteten, zeitverzögerten Effekt eines einzelnen 8-oxoGs auf die Genexpression ebenfalls um die von der Exzision der Modifikation durch OGG1 induzierte Genstilllegung handelt, wurden die Vektoren, die 8-oxoG innerhalb von Promotoren von unterschiedlicher Stärke enthielten, in die HeLa-Zellen mit dem stabilen, shRNA vermittelten OGG1-Knockdown transfiziert. Im Falle eines einzelnen 8-oxoG innerhalb des vollen CMV-IE-Promotors zeigt die Expressionsanalyse der stabil mit dem Leervektor transfizierten Kontrollzellen nach 6 Stunden eine identische EGFP-Expression der 8-oxoG- und des G-enthaltenden Vektoren (Abbildung 3-64). Zu späteren Zeitpunkten nimmt die EGFP-Expression der 8-oxoG-enthaltenden Vektoren kontinuierlich ab, wobei die Größenordnung dieser Reduktion der in den Wildtyp-Zellen beobachteten entspricht. In den Knockdown-Zellen zeigt sich ebenfalls eine zeitabhängige Abnahme der EGFP-Expression des



8-oxoG-enthaltenden Vektors, die allerdings deutlich langsamer verläuft als die in den Kontrollzellen. Dies zeigt deutlich, dass der beobachtete Effekt eines einzelnen 8-oxoGs innerhalb des CMV-IE-Promotors ebenfalls durch dessen Exzision durch OGG1 verursacht wird – die schwache Abnahme der Genexpression in den Knockdown-Zellen kann der in den Zellen verbliebene Restmenge an OGG1 (30 % der Menge in den Kontrollzellen) zugeschrieben werden. Diese Rettung der Genexpression des 8-oxoG-haltigen Vektors durch den Knockdown von OGG1 kann auch im Falle eines einzelnen 8-oxoG innerhalb des minimalen Promotors von pCRE-UNO beobachtet werden. Interessanterweise hat der Mangel an OGG1 keinerlei Einfluss auf die relative Erniedrigung der EGFP-Expression des 8-oxoG-enthaltenden Vektors 6 Stunden nach der Transfektion, was das Vorhandensein eines zusätzlichen, direkten Effekts auf die Gentranskription eines einzelnen 8-oxoGs innerhalb der regulatorischen CRE-Sequenz wahrscheinlich macht.

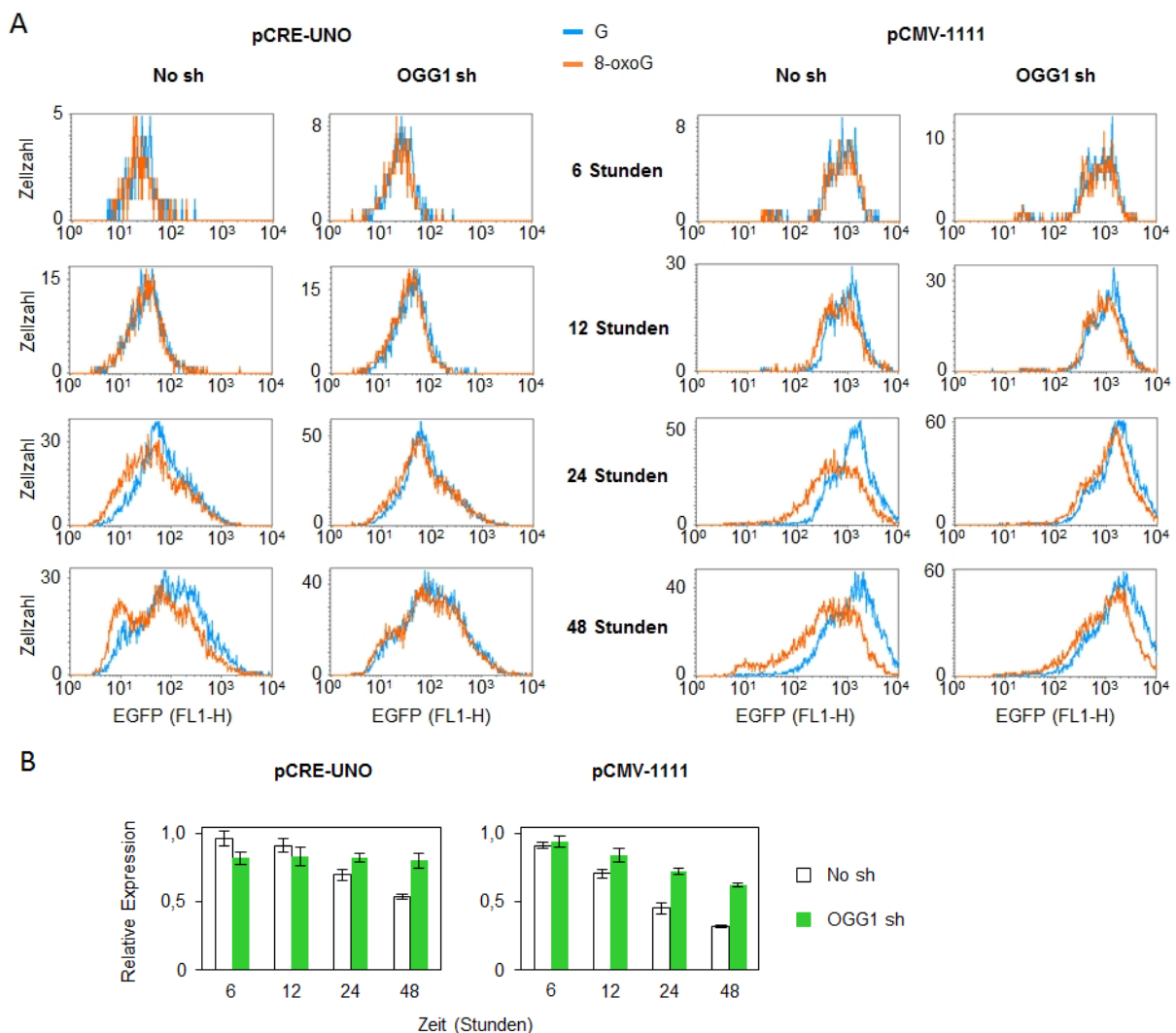


Abbildung 3-64 Einfluss eines OGG1-Knockdowns auf den inhibitorischen Effekt von 8-oxoG innerhalb eines CRE. EGFP-Expression von HeLa-Zellen mit stabilem OGG1-Knockdown und der mit einem Leervektor stabil transfizierten Kontrolle, die mit pCRE-UNO- oder pCMV-1111-Vektoren, die entweder 8-oxoG oder G innerhalb eines CRE ihres Promotors enthielten, transfiziert wurden. (A) Überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Expression (FL1-H) pro Zelle eines repräsentativen Experiments. (B) EGFP-Expression der 8-oxoG-enthaltenden Vektoren relativ zur G-enthaltenden Kontrolle. Mittelwert aus zwei unabhängigen Transfektionen ( $\pm$  Variationsbreite).

Um zu untersuchen, ob der beschriebene direkte Effekt eines einzelnen 8-oxoG in CRE durch eine Beeinträchtigung der CREB-Bindung verursacht wird, wurde mit dem Vektorpaar mit G bzw. 8-oxoG innerhalb des einzelnen CRE von pCRE-UNO ein EMSA durchgeführt. Diese Bindungsreaktion zeigt, dass das CRE-enhaltende Promotor-Fragment des G-enhaltenden Kontrollvektors konzentrationsabhängig von CREB gebunden wird und im Falle der höchsten CREB-Menge (24-facher Überschuss an CREB-Dimeren pro DNA-Fragment) fast vollständig verschoben ist (Abbildung 3-65). Enthält das CRE-Fragment hingegen 8-oxoG wird diese Bindung und damit auch die Verschiebung der Bande fast komplett verhindert. Das 180 bp-Fragment des promotorlosen Vektors pCREnull liegt vollständig ungebunden vor, was die Spezifität der Bindung von CREB zu seinem Konsensmotiv bei den verwendeten Proteinmengen beweist. Dieses Ergebnis bestätigt, dass der bei den Transfektionsversuchen beobachtete direkte Effekt auf eine beeinträchtigte CREB-Bindung zurückzuführen ist und 8-oxoG durch seine Anwesenheit in CRE dementsprechend die Genexpression CREB-kontrollierter Gene auch auf diese Art negativ beeinflussen kann.

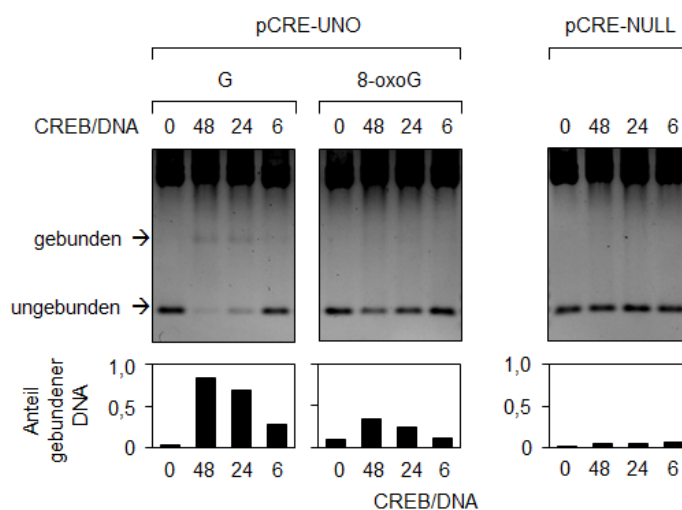


Abbildung 3-65 Einfluss von 8-oxoG innerhalb des CRE auf die Bindung des Transkriptionsfaktors CREB. EMSA mit den PciI/BmtI-Fragmenten des Vektors pCRE-UNO ohne oder mit 8-oxoG innerhalb der Promotor-Region. Die untere Bande enthält entweder ein (pCRE-UNO) oder kein CRE (pCRE-NULL). Der promotorlose Vektor pCRE-NULL dient als Kontrolle auf unspezifische Bindungsaktivität. Die Zahlen repräsentieren das molare Verhältnis von CREB-Molekülen zu DNA-Fragmenten.

### 3.5 Die Art der Prozessierung verschiedener oxidativer DNA-Basenmodifikationen bestimmt deren Auswirkungen auf die Gentranskription

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass 8-oxoG die Genexpression auf verschiedene Weise inhibieren kann. Interessanterweise ist 8-oxoG nicht die einzige oxidative DNA-Basenmodifikation, der diese oder ähnliche Mechanismen der Transkriptionshemmung zugeschrieben werden können – so zeigen beispielsweise Thyminglykol und Uracil eine vergleichbare indirekte Transkriptionshemmung (Lühnsdorf et al., 2014), (Dissertation B. Lühnsdorf, 2015),

während 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC) die Bindung von Transkriptionsfaktoren und anderen DNA-bindenden Proteinen zur DNA modulieren kann (Spruijt et al. 2013) (Valinluck et al., 2004). Um nun zu untersuchen, inwieweit es sich bei den beobachteten Mechanismen der Inhibition um ubiquitäre Mechanismen handelt, sollten Plasmid-Konstrukte hergestellt werden, die verschiedene oxidative DNA-Modifikationen (5-hmU, 5-hmC, 5-fC, 5-caC) enthielten und deren Auswirkungen auf die Genexpression untersucht werden.

### 3.5.1 5-hmU im Basenpaar mit Adenin inhibiert die Genexpression indirekt nach seiner Exzision durch die DNA-Glykosylase Smug1 und direkt durch seine Anwesenheit in CRE

Durch ROS entstandenes 5-hmU ist, wie auch 8-oxoG als oxidativer DNA-Schaden zu betrachten. Im Folgenden wurden daher die Auswirkungen von 5-hmU gepaart mit Adenin untersucht. Zu diesem Zweck wurde ein einzelnes bzw. drei 5-hmU mit der bereits mehrfach beschriebenen Strangaustauschmethode in den nicht-transkribierten DNA-Strang des 5'-UTR des EGFP-Reportergens eingebaut (Abbildung 3-66). Dabei wurde die Vollständigkeit des Einbaus der synthetischen Oligonukleotide durch Proben, die jeweils ohne PNK inkubiert wurden, verifiziert (Anhang III-13). Vektoren, die ein einzelnes Uracil an derselben Position im 5'-UTR enthielten, wurden als Kontrolle verwendet.

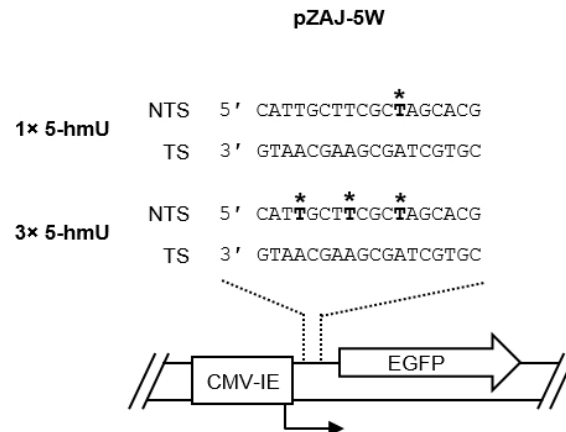


Abbildung 3-66 Schematische Darstellung des EGFP-Reportergens, das ein oder drei 5-hmU innerhalb des 5'-UTRs besitzt. DNA-Sequenz des synthetischen 18 nt Oligonukleotids innerhalb des nicht-transkribierten Strangs (NTS) des EGFP-Gens (breiter Pfeil). Der Stern kennzeichnet die Position der modifizierten Thymine. Der gebrochene Pfeil zeigt den Start der Transkription, das Rechteck den CMV-IE-Promotor, unter dessen Kontrolle das Reportergen steht.

Zur Untersuchung des Effekts von 5-hmU auf die Genexpression die EGFP-Expression dieser Vektoren in HeLa-Zellen analysiert. Dies zeigt, dass 6 Stunden nach der Transfektion die Expression aller Vektoren ungefähr gleich ist, was bedeutet, dass jeweils dieselbe Menge an Vektor-DNA in die Zellen eingebracht wurde (Abbildung 3-67). Zu späteren Zeitpunkten sinkt sowohl die Expression des Vektors mit Uracil als auch die der Vektoren mit 5-hmU im Vergleich zu der des Thymin-enthaltenden

(T) Kontrollvektors kontinuierlich ab. Dabei ist der Effekt eines einzelnen 5-hmU auf die Genexpression deutlich schwächer als der von drei 5-hmU, dessen Stärke der des Effekts eines einzelnen Uracils entspricht. Dies zeigt, dass 5-hmU innerhalb des transkribierten Bereichs (5'-UTR) die Genexpression inhibiert und es sich hierbei um einen indirekten Effekt handelt. Die Stärke dieses Effektes ist proportional zur Menge an 5-hmU in der Vektor-DNA.

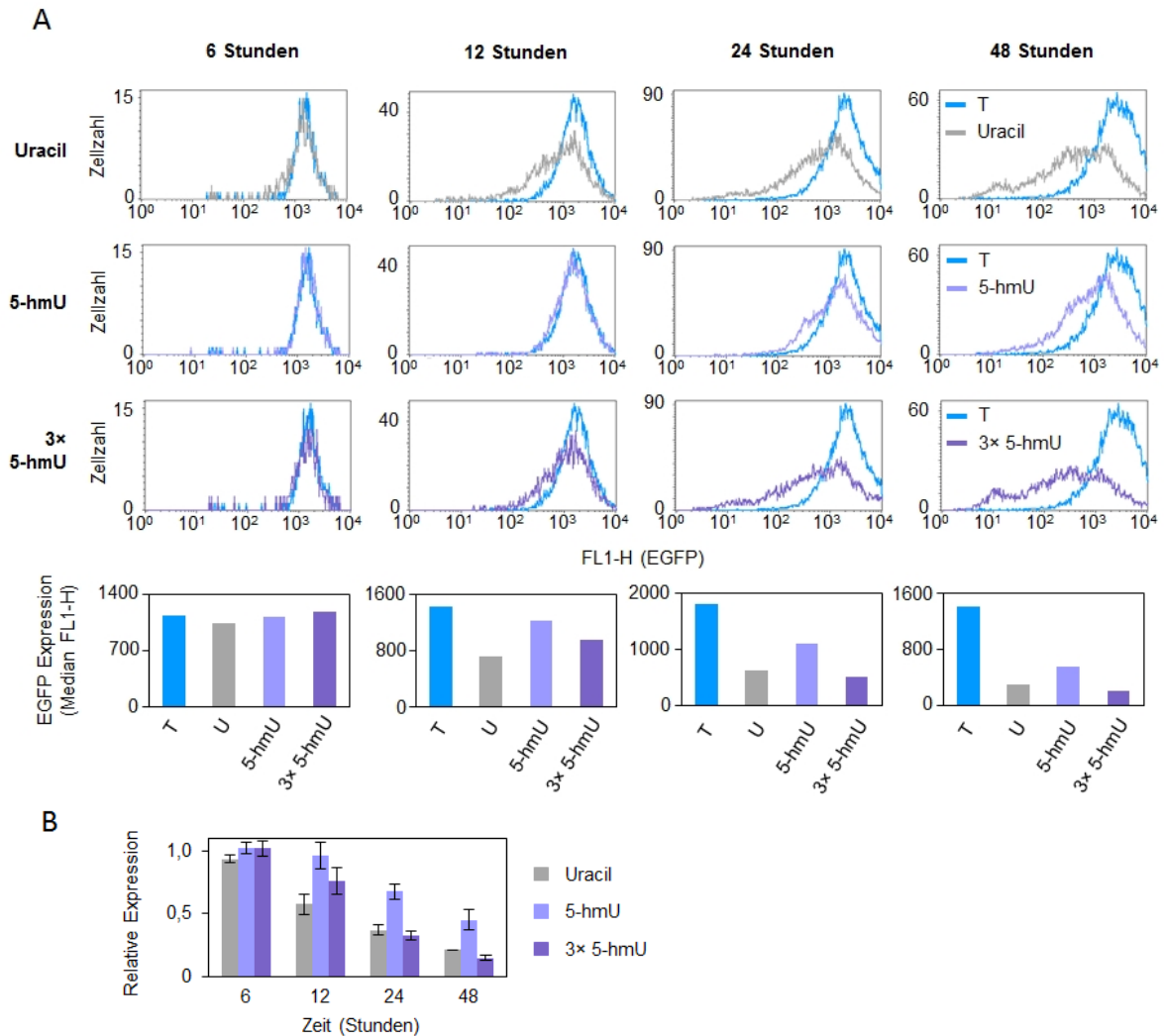


Abbildung 3-67 Einfluss eines oder drei 5-hmUs innerhalb des 5'-UTRs des EGFP-Gens auf die Genexpression. (A) Überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Expression (FL1-H) pro Zelle und deren quantitativer Analyse nach Transfektion von Vektoren, die entweder Thymin, Uracil, ein oder drei 5-hmU innerhalb des nicht-transkribierten DNA-Strangs des 5'-UTRs enthielten. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment. (B) EGFP-Expression der Uracil- und 5-hmU-enthaltenden Vektoren relativ zur T-enthaltenden Kontrolle. Mittelwert aus drei unabhängigen Transfektionen ( $\pm$  Standardabweichung).

Um zu untersuchen, welchen Effekt 5-hmU innerhalb eines regulatorischen Elements auf die Genexpression ausübt, wurden ein bzw. drei 5-hmU in die Promotor-Region des Vektors pCMV-1111-ZA-W (vollständiger CMV-IE-Promotor) eingebaut (Anhang III-13). In diesen Vektoren befanden sich jeweils ein bzw. zwei 5-hmU innerhalb der von Nb.BsrDI-Schnittstellen flankierten CRE-Sequenz (Abbildung 3-68).

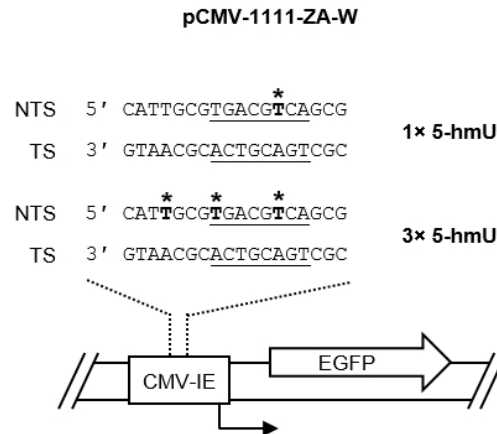


Abbildung 3-68 Schematische Darstellung des EGFP-Reportergens, das ein oder drei 5-hmU innerhalb des CMV-IE-Promotors besitzt. DNA-Sequenz des synthetischen 18 nt Oligonukleotids innerhalb des top-Strangs (NTS) des EGFP-Gens (breiter Pfeil). Der Stern kennzeichnet die Position der modifizierten Thymine, die CRE-Sequenz ist unterstrichen. Der gebrochene Pfeil zeigt den Start der Transkription, das Rechteck den CMV-IE-Promotor, unter dessen Kontrolle das Reportergen steht.

Die Untersuchung des Einflusses von 5-hmU an dieser Position erfolgte ebenfalls durch die Analyse der EGFP-Expression in HeLa-Zellen. Es zeigt sich, dass während alle drei Vektoren (T, 5-hmU und 3× 5-hmU) 6 Stunden nach der Transfektion annähernd gleich stark exprimiert werden, die EGFP-Expression im Falle der 5-hmU-enthaltenden Konstrukte zu späteren Zeitpunkten jedoch rapide abnimmt (Abbildung 3-69). Die Reduktion der Genexpression, die durch drei 5-hmUs hervorgerufen wird, ist auch an dieser Position der Läsionen stärker als die durch ein einzelnes 5-hmU bedingte Reduktion. Dieses Ergebnis beweist, dass 5-hmU die Genexpression unabhängig von seiner Position innerhalb oder außerhalb regulatorischer Elemente zu hemmen vermag und es sich bei dieser Hemmung möglicherweise auch um eine Genstilllegung handelt.

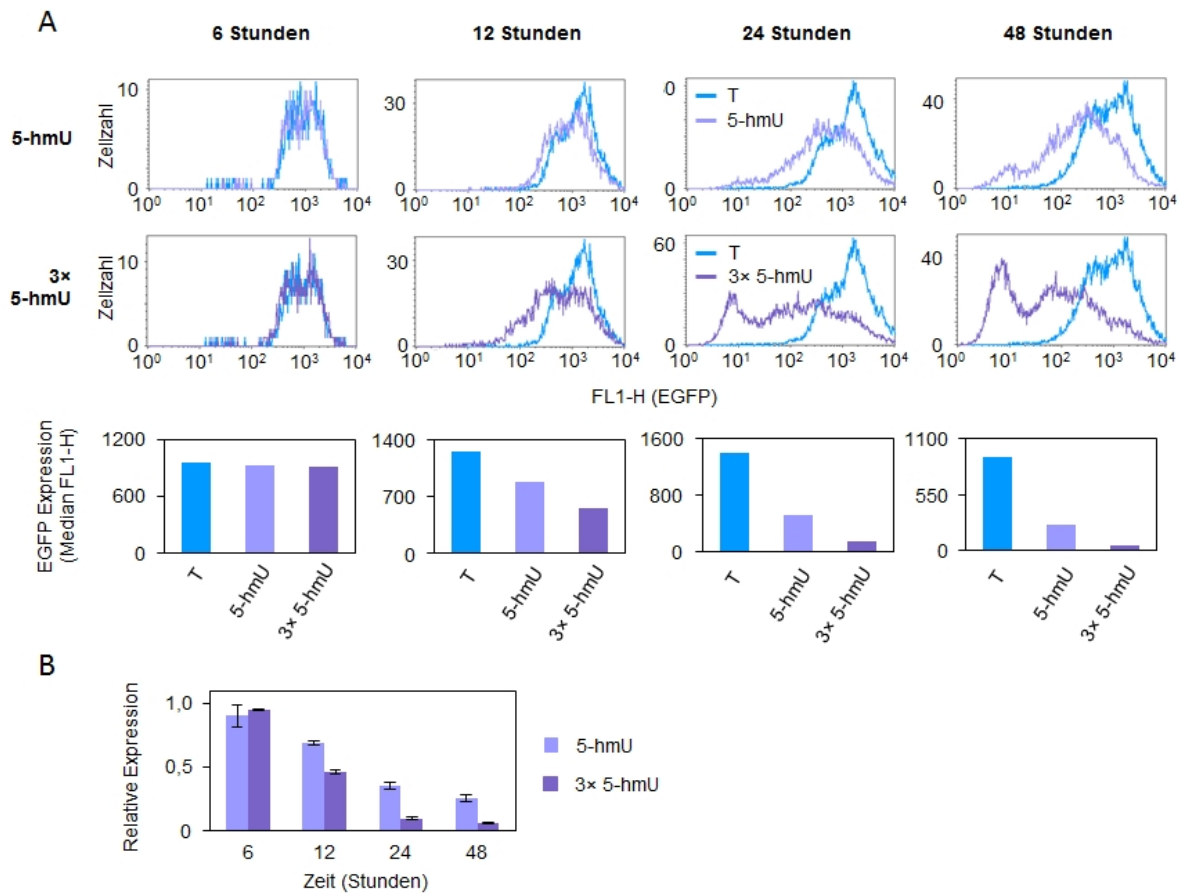


Abbildung 3-69 Einfluss eines oder drei 5-hmUs innerhalb des CMV-IE-Promotors auf die Genexpression. (A) Überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Expression (FL1-H) pro Zelle und deren quantitativer Analyse nach Transfektion von Vektoren, die die entweder kein, ein oder drei 5-hmU innerhalb des CMV-IE-Promotors enthielten. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment. (B) EGFP-Expression der 5-hmU-enthaltenden Vektoren relativ zur T-enthaltenden Kontrolle. Mittelwert aus zwei unabhängigen Transfektionen ( $\pm$  Variationsbreite).

Des Weiteren wurden pCRE-UNO-Vektoren mittels Oligonukleotidaustausch mit keinem, einem oder drei 5-hmU im bzw. in Nachbarschaft zum einzigen CRE des CRE-UNO-Promotors hergestellt (Abbildung 3-70). Dabei wurde 5-hmU entweder im top- oder im bottom-Strang eingefügt. Die Verifizierung der Vektoren erfolgte erneut durch den Nachweis eines vollständigen Oligonukleotid-Austauschs durch eine PNK-freie Kontrolle (Anhang III-13).

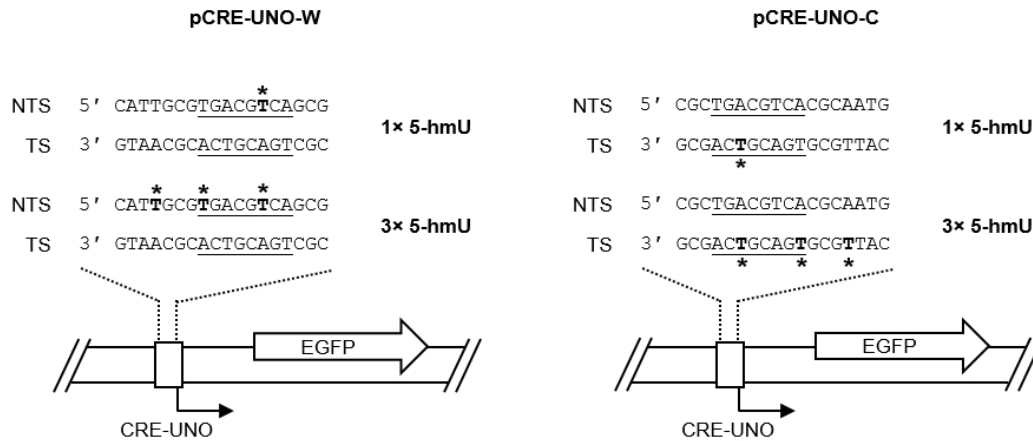


Abbildung 3-70 Schematische Darstellung des EGFP-Reportergens, das ein oder drei 5-hmU innerhalb des minimalen CRE-UNO-Promotors besitzt. DNA-Sequenz des synthetischen 18 nt Oligonukleotids innerhalb des top-Strangs (NTS) des EGFP-Gens (breiter Pfeil). Der Stern kennzeichnet die Position der modifizierten Thymine, die CRE-Sequenz ist unterstrichen. Der gebrochene Pfeil zeigt den Start der Transkription, das Rechteck den minimalen CRE-UNO-Promotor, unter dessen Kontrolle das Reportergen steht.

Auch die Analyse der EGFP-Expression der pCRE-UNO-Konstrukte mit einem einzelnen bzw. drei 5-hmU in HeLa-Zellen zeigt eine kontinuierliche Abnahme der EGFP-Expression der 5-hmU-enthaltenden Vektoren (Abbildung 3-71). Diese ist umso stärker, je mehr 5-hmU in der Vektor-DNA vorhanden ist. In diesem Falle ist jedoch bereits 6 Stunden nach der Transfektion eine Reduktion der Genexpression der 5-hmU-enthaltenden Vektoren von 10 – 20 % relativ zur T-enthaltenden Kontrolle zu beobachten. Da diese Reduktion bei den Transfektionen unabhängig voneinander hergestellter Plasmid-Präparationen auftrat, wurden Quantifizierungsfehler und Ungenauigkeiten während der Transfektion als Ursache ausgeschlossen. In diesem Falle deutet die beobachtete Reduktion zum frühesten untersuchten Zeitraum eher auf eine direkte Inhibition der Genexpression hin. Der Effekt von 5-hmU manifestiert sich in dieser Form, sowohl wenn 5-hmU im top-, als auch im bottom-Strang positioniert ist. Dies zeigt, dass auch die durch 5-hmU bedingten Effekte nicht von dem die Modifikation-enthaltenden DNA-Strang abhängig sind.

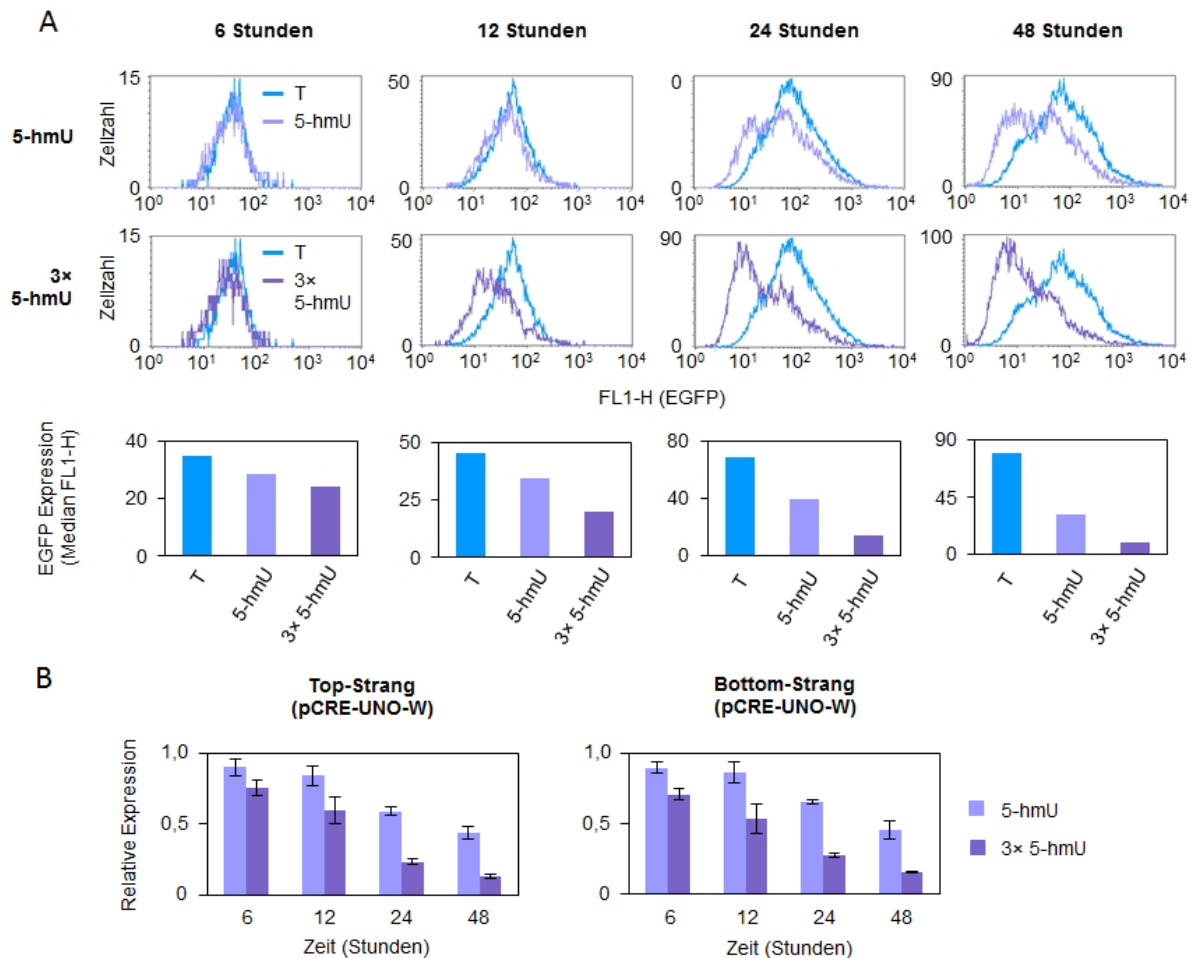


Abbildung 3-71 Einfluss eines oder drei 5-hmUs innerhalb des CRE-UNO-Promotors auf die Genexpression. (A) Überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Expression (FL1-H) pro Zelle und deren quantitativer Analyse nach Transfektion von Vektoren, die die entweder kein, ein oder drei 5-hmU innerhalb des minimalen Promotors des Vektors pCRE-UNO enthielten. Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment. (B) EGFP-Expression der 5-hmU-enthaltenden Vektoren relativ zur T-enthaltenden Kontrolle. Mittelwert aus neun Transfektionen mit drei unabhängigen Plasmidpräparationen ( $\pm$  Standardabweichung).

Die von 8-oxoG verursachte Genstilllegung und der dadurch bedingte indirekte Effekt auf die Genexpression wird durch dessen Exzision durch die DNA-Glykosylase OGG1 im Rahmen der BER hervorgerufen. Auch 5-hmU stellt ein Substrat für die BER dar, wobei die initiiierende Exzisions-Reaktion durch die Uracil-DNA-Glykosylase Smug1 katalysiert wird (Boorstein et al., 2001). Um nun den Einfluss der Exzision von 5-hmU auf dessen Effekt auf die Genexpression zu untersuchen, wurden die pCRE-UNO-W-Vektoren, die kein, ein oder drei 5-hmU enthielten, in HeLa-Zellen, die shRNA gegen die Uracil-DNA-Glykosylasen UNG1/2, Smug1 oder TDG exprimieren, sowie die entsprechende, isogene Kontroll-Zelllinie (no sh) transfiziert. Die Analyse der EGFP Expression der no sh-Zellen zeigt 6 Stunden nach der Transfektion eine geringfügige Reduktion der Genexpression (etwa 10-15 %) der 5-hmU-enthaltenden Vektoren im Vergleich zur T-enthaltenden Kontrolle (Abbildung 3-72). Dies wiederum deutet erneut auf einen direkten, von DNA-Glykosylasen unabhängigen Inhibitionsmechanismus hin. Diese starke, kontinuierliche Abnahme der Genexpression bei einem



bzw. drei 5-hmU innerhalb der Vektor-DNA tritt nicht nur in den Kontrollzellen (no sh), sondern auch in den Zellen mit einem stabilen Knockdown von UNG1/2 und TDG auf. Dieser Befund zeigt deutlich, dass keine der beiden Glykosylasen an der durch 5-hmU verursachten Genstilllegung beteiligt ist. In den Zellen mit einem stabilen Knockdown der DNA-Glykosylase Smug1 hingegen ist eine Abnahme der Genexpression durch 5-hmU erkennbar, aber deutlich geringer, wobei die Rettung der Expression bei Anwesenheit eines einzelnen 5-hmU effizienter erfolgt, als wenn der Vektor drei 5-hmU enthält. Dies lässt sich durch den unvollständigen Knockdown von Smug1 und die dadurch verbliebene Exzisionsaktivität erklären (Lühnsdorf et al., 2014). Durch dieses Ergebnis konnte bewiesen werden, dass die von 5-hmU verursachte Genstilllegung ausschließlich durch dessen Exzision durch die DNA-Glykosylase Smug1 verursacht wird – UNG1/ und TDG sind an dieser Transkriptionshemmung nicht beteiligt. Dies zeigt indirekt auch, dass keine der beiden Glykosylasen *in vivo* eine signifikante Exzisionsaktivität gegenüber 5-hmU:A besitzt.

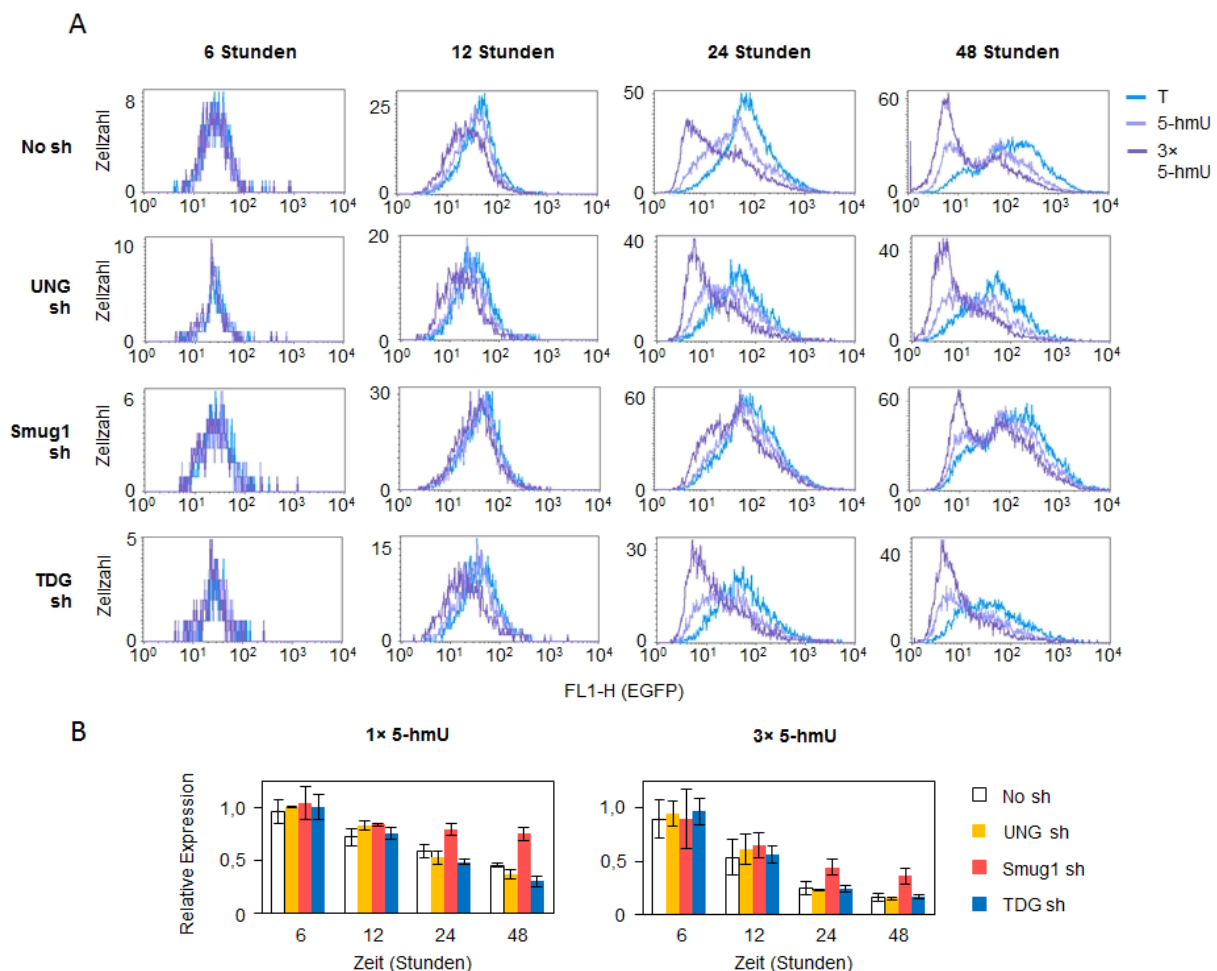


Abbildung 3-72 Einfluss eines Knockdowns der DNA-Glykosylasen UNG, Smug1 oder TDG auf den Effekt von 5-hmU auf die Genexpression. EGFP-Expression von HeLa-Zellen mit stabilem UNG-, Smug1- oder TDG-Knockdown und der mit einem Leervektor stabil transfizierten Kontrolle, die pCRE-UNO-Vektoren, die kein, ein oder drei 5-hmU innerhalb des minimalen Promotors enthielten, transfiziert wurden. (A) Überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Expression (FL1-H) pro Zelle eines repräsentativen Experiments. (B) EGFP-Expression der 5-hmU-enthaltenden Vektoren relativ zur T-enthaltenden Kontrolle zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfektion. Mittelwert aus zwei bis drei unabhängigen Transfektionen ( $\pm$  Variationsbreite bzw. Standardabweichung).

Nachdem nun Smug1 als Ursache der von 5-hmU verursachten Genstilllegung identifiziert wurde, bleibt noch zu untersuchen, wodurch der beobachtete, unmittelbare Effekt im Falle der pCRE-UNO-Vektoren verursacht wird. Da sich ein bzw. zwei der 5-hmUs in der Vektor DNA innerhalb des einzigen CRE des minimalen Promotors von pCRE-UNO befanden (Abbildung 3-70), wurde der Einfluss dieser Modifikationen auf die Bindung von CREB an den minimalen Promotor mittels eines EMSA überprüft. Das Promotor-Fragment des T-enthaltenden pCRE-UNO-Vektors wird von CREB gebunden und ist zum größten Teil verschoben, wobei der Anteil der gebundenen DNA proportional zur eingesetzten Proteinmenge ist (Abbildung 3-73). Enthielt das CRE des Promotor-Fragments ein 5-hmU, ist die Bindung von CREB zu seiner Bindungssequenz deutlich verringert. Diese Hemmung der Bindung ist noch stärker, wenn innerhalb des Promotor-Fragments zwei weitere 5-hmU, von denen eines ebenfalls in CRE positioniert ist, auftreten. Das CRE-lose Promotor-Fragment des Vektors pCRE-NULL liegt unabhängig von der verwendeten Menge an CREB ungebunden vor, was die spezifische Bindung des Transkriptionsfaktors zu seiner Bindungssequenz beweist. Dies belegt, dass 5-hmU in CRE die Bindung von CREB beeinträchtigt und liefert somit gleichzeitig eine Erklärung für die beobachtete, direkte Inhibierung der Genexpression.

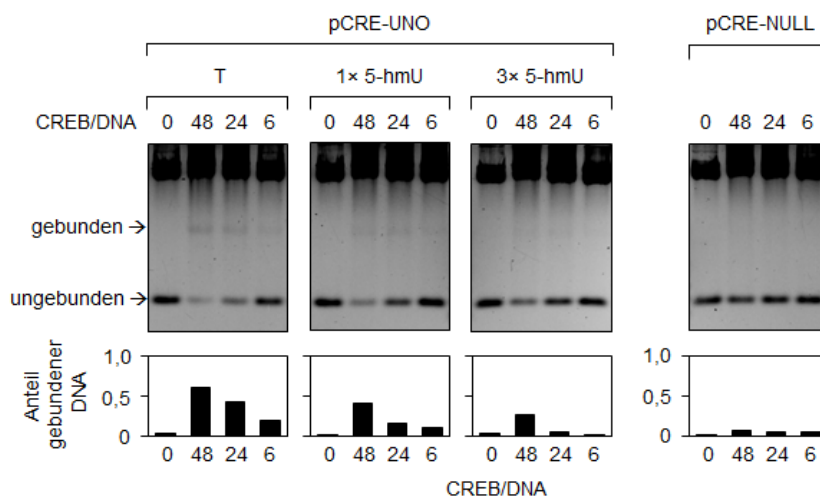


Abbildung 3-73 Einfluss von einem bzw. drei 5-hmU in CRE auf die Bindung des Transkriptionsfaktors CREB zu seiner Konsensus-Sequenz. EMSA mit den PciI/BmtI-Fragmenten des Vektors pCRE-UNO mit keinem, einem oder drei 5-hmUs in der Promotor-Region. Die untere Bande enthält entweder ein (pCRE-UNO) oder kein CRE (pCRE-NULL). Der promotorlose Vektor pCRE-NULL dient als Kontrolle auf unspezifische Bindungsaktivität. Die Zahlen repräsentieren das molare Verhältnis von CREB-Molekülen zu DNA-Fragmenten.

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass 5-hmU, analog zu 8-oxoG, die Genexpression auf verschiedene Arten – entweder direkt durch Modulation von Transkriptionsfaktorbindung oder indirekt durch Genstilllegung – beeinflussen kann.

### 3.5.2 5-hmC inhibiert die Gentranskription ausschließlich direkt bei Anwesenheit innerhalb des regulatorischen Elements CRE

Neben 5-hmU gibt es weitere oxidative Pyrimidin-Modifikationen, die in der jüngsten Zeit immens an Bedeutung gewonnen haben. 5-hmC, 5-fC und 5-caC sind oxidative Derivate des 5-mC und entstehen durch dessen TET-katalysierte Oxidation. Während 5-fC und 5-caC primär nur als Intermediate der aktiven DNA-Demethylierung gelten, wird 5-hmC auch als ein eigenständiger epigenetischer Marker angesehen, auch wenn seine genaue Funktion noch unklar ist (Ye & Li, 2014). Um zu untersuchen, welche Auswirkungen diese drei oxidativen Modifikationen auf die Genexpression ausüben, wurde jeweils ein oder drei 5-hmC, 5-fC oder 5-caC in die Promotor-Region der Vektoren pCRE-UNO-W und pCRE-UNO-C eingeführt (Abbildung 3-74), wobei die Anwesenheit der Modifikationen durch die Inkubation der Vektor-DNA mit dem Restriktionsenzym AatII verifiziert wurde (Anhang III-14 und III-15).

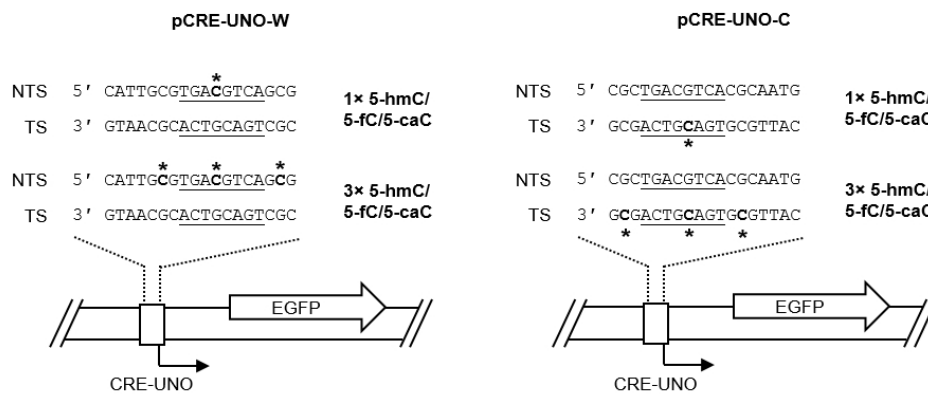


Abbildung 3-74 Schematische Darstellung des EGFP-Reportergens, das ein oder drei Cytosinmodifikationen innerhalb des minimalen CRE-UNO-Promotors besitzt. DNA-Sequenz des synthetischen 18 nt Oligonukleotids innerhalb des top-Strangs (NTS) oder des bottom-Strangs (TS) des EGFP-Gens (breiter Pfeil). Der Stern kennzeichnet die Position der modifizierten Cytosine, die CRE-Sequenz ist unterstrichen. Der gebrochene Pfeil zeigt den Start der Transkription, das Rechteck den minimalen CRE-UNO-Promotor, unter dessen Kontrolle das Reportergen steht.

Um nun zuerst den Effekt von 5-hmC auf die Genexpression zu untersuchen, wurde die EGFP-Expression der Vektoren, die entweder kein, ein oder drei 5-hmC enthielten, in HeLa-Zellen analysiert. Diese Analyse zeigt, dass 24 Stunden nach der Transfektion ein einzelnes 5-hmC innerhalb des einzelnen CRE die Genexpression um etwa 25 % im Vergleich zur C-enthaltenden Kontrolle senkt (Abbildung 3-75). Enthält der Vektor zwei weitere, CRE flankierende 5-hmC ist die Genexpression sogar um 50 % relativ zu Kontrolle erniedrigt.

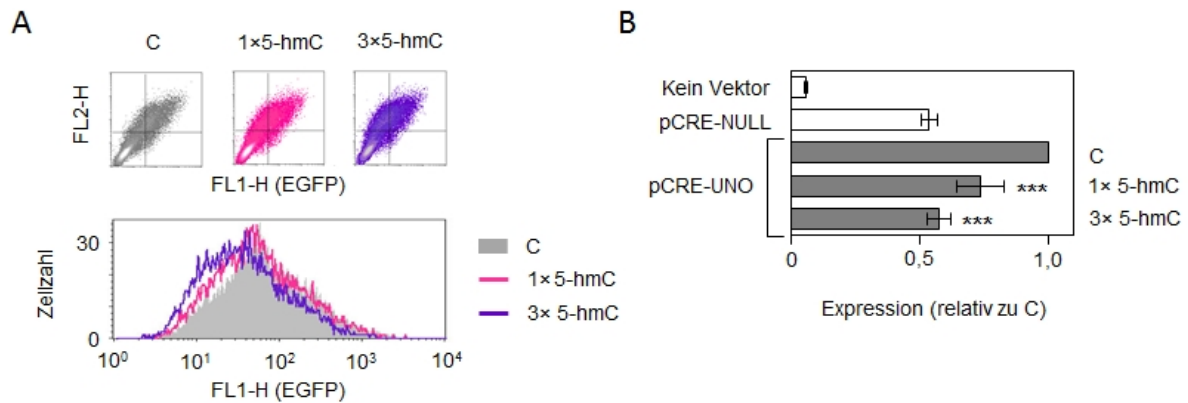


Abbildung 3-75 Einfluss von einem oder drei 5-hmC innerhalb des CRE-UNO-Promotors auf die Genexpression. EGFP-Expression von HeLa-Zellen, die mit Vektoren, die kein, ein oder drei 5-hmC innerhalb des top-Strands CRE-UNO-Promotors enthalten, transfiziert wurden. (A) Repräsentative FACS-Daten 24 Stunden nach der Transfektion. (B) EGFP-Expression relativ zur C-enthaltenden Kontrolle 24 Stunden nach der Transfektion. Die Expression des CRE-losen Vektors pCRE-NULL dient als Referenz. Mittelwert von 9 Transfektionen mit zwei unabhängigen Plasmid-Präparationen ( $\pm$  Standardabweichung). Zweiseitig gepaarter Student's T-test: \*\*\*  $P < 0,001$ .

Dies entspricht genau dem Effekt, den ein bzw. drei 5-mCs an derselben Position aufweisen (Abbildung 3-55). Aus diesem Grund wurden für die Analyse der EGFP-Expression im Zeitverlauf zusätzlich die Vektoren mit einem bzw. drei 5-mC herangezogen. Diese Analyse zeigt, dass sowohl für 5-mC als auch für 5-hmC die Stärke des Effekts zu allen untersuchten Zeitpunkten identisch ist (Abbildung 3-76). Dies gilt unabhängig davon, in welchem DNA-Strang sich die DNA-Modifikationen befinden.

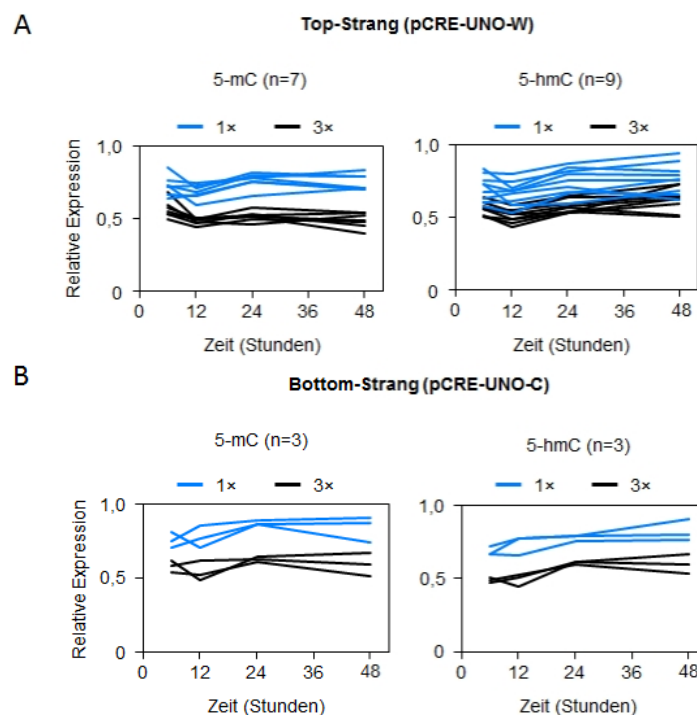


Abbildung 3-76 Einfluss von einem oder drei 5-mC oder 5-hmC innerhalb des CRE-UNO-Promotors auf die Genexpression. EGFP-Expression von HeLa-Zellen, die mit Vektoren, die kein, ein oder drei 5-hmC innerhalb des CRE-UNO-Promotors enthalten, transfiziert wurden. EGFP-Expression relativ zur C-enthaltenden Kontrolle. Jede Linie repräsentiert eine unabhängige Transfektion. 5-mC bzw. 5-hmC im Top-Strang. (B) 5-mC bzw. 5-hmC im Bottom-Strang.

Für den Effekt von 5-mC konnte bereits die Inhibierung der CREB-Bindung als maßgeblich an dieser Expressionshemmung beteiligter Faktor identifiziert werden. Um nun die Auswirkungen von 5-hmC auf die Bindung von CREB zu untersuchen, wurde mit den pCRE-UNO-Vektoren mit keinem, einem oder drei 5-hmC ein EMSA durchgeführt. Die Analyse der Bindungsreaktion zeigt deutlich, dass das C-enthaltende Promotor-Fragment bei der höchsten eingesetzten Proteinmenge vollständig gebunden wird, wobei der Anteil gebundener DNA mit sinkender Proteinmenge abnimmt (Abbildung 3-77). Das Promotor-Fragment, das ein einzelnes 5-hmC enthält, wird dahingegen kaum gebunden. Das Fragment, das drei 5-hmC enthält, wird ebenfalls nur sehr schwach gebunden. Dies zeigt, dass 5-hmC innerhalb von CRE die Bindung von CREB effizient verhindert, was wiederum den im Host Cell Reactivation beobachteten inhibitorischen Effekt erklären kann.

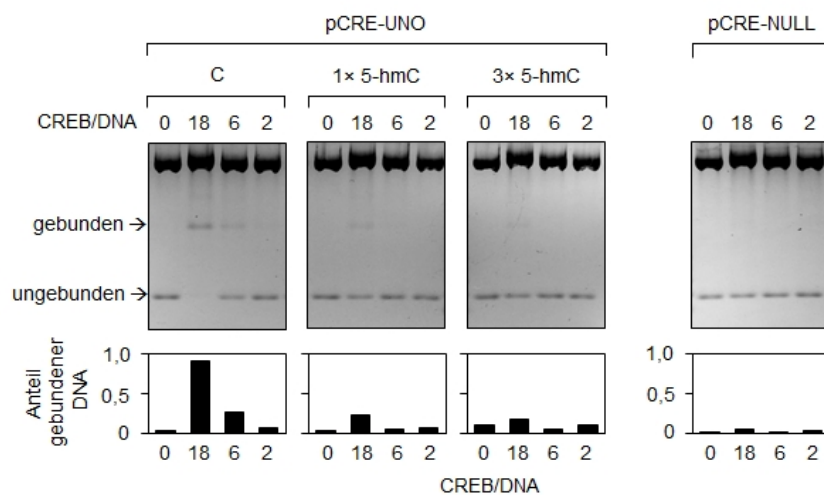


Abbildung 3-77 Einfluss von einem bzw. drei 5-hmC in CRE auf die Bindung des Transkriptionsfaktors CREB zu seiner Konsensus-Sequenz. EMSA mit den PciI/BmtI-Fragmenten des Vektors pCRE-UNO mit keinem, einem oder drei 5-hmCs in der Promotor-Region. Die untere Bande enthält entweder ein (pCRE-UNO) oder kein CRE (pCRE-NULL). Der promotorlose Vektor pCRE-NULL dient als Kontrolle auf unspezifische Bindungsaktivität. Die Zahlen repräsentieren das molare Verhältnis von CREB-Molekülen zu DNA-Fragmenten.

Vergleicht man nun in einem weiteren EMSA die Beeinträchtigung der CREB-Bindung durch 5-mC und durch 5-hmC, erkennt man, dass 5-mC die Bindung von CREB weitaus weniger behindert als 5-hmC (Abbildung 3-78). In Anbetracht der Tatsache, dass das Ausmaß des expressionshemmenden Effektes bei beiden Läsionen gleich ist, deutet dieses Ergebnis daraufhin, dass die Inhibition der Bindung des Transkriptionsfaktors wahrscheinlich nicht der einzige Faktor ist, der die Expression beeinflusst, obwohl ein Stilllegungsmechanismus wie im Falle von 8-oxoG aufgrund der konstanten Größe der Expressionshemmung ausgeschlossen werden kann.

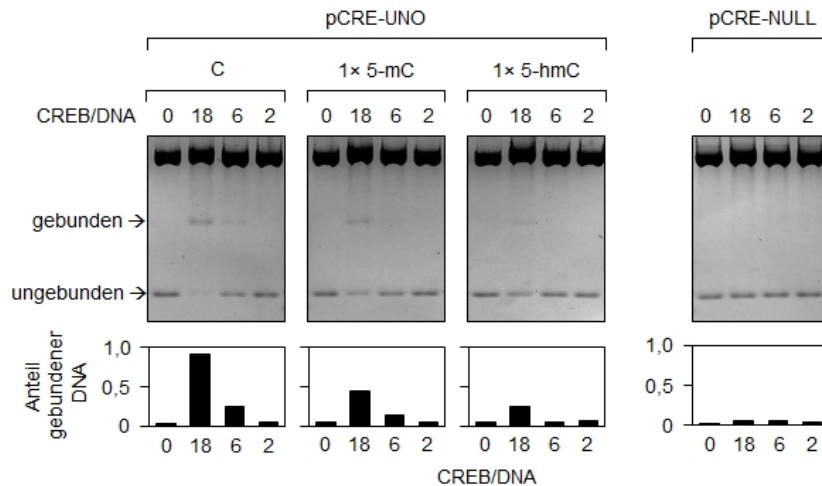


Abbildung 3-78 Einfluss von einem 5-mC bzw. 5-hmC in CRE auf die Bindung des Transkriptionsfaktors CREB zu seiner Konsensus-Sequenz. EMSA mit den PciI/BmtI-Fragmenten des Vektors pCRE-UNO mit entweder einem 5-mC oder einem 5-hmC in der Promotor-Region. Die untere Bande enthält entweder ein (pCRE-UNO) oder kein CRE (pCRE-NULL). Der promotorlose Vektor pCRE-NULL dient als Kontrolle auf unspezifische Bindungsaktivität. Die Zahlen repräsentieren das molare Verhältnis von CREB-Molekülen zu DNA-Fragmenten.

### 3.5.3 5-fC und 5-caC innerhalb des regulatorischen Elements CRE hemmen die Genexpression direkt, aber zusätzlich indirekt nach ihrer Exzision durch die DNA-Glykosylase TDG

Da sowohl für 5-mC, als auch für 5-hmC eine negative Beeinflussung der Bindung des Transkriptionsfaktors CREB zu CRE nachgewiesen werden konnte, wurde nun auch die Fähigkeit mit der CREB-Bindung zu interferieren von deren Oxidationsprodukten 5-fC und 5-caC untersucht. Ein EMSA mit den pCRE-UNO-Vektoren, die entweder kein, ein oder drei 5-fC enthalten (Abbildung 3-74), zeigt, dass während das C-enthaltende Promotor-Fragment zwar effizient und proportional zur eingesetzten Proteinmenge von CREB gebunden wird, die Bindungseffizienz durch die Anwesenheit von 5-fC im Promotor-Fragment deutlich erniedrigt wird (Abbildung 3-79 A). Dabei ist die Bindung stärker beeinträchtigt, wenn drei 5-fCs im Fragment enthalten sind. Ein analog durchgeführter EMSA unter Verwendung der pCRE-UNO-Vektoren mit keinem, einem oder drei 5-caC liefert ein identisches Ergebnis (Abbildung 3-79 B). 5-caC innerhalb des Promotor-Fragments inhibiert die Bindung von CREB zu seiner Bindungssequenz, ein Effekt, der durch die Anwesenheit von CRE-flankierenden 5-caC noch weiter verstärkt wird. Somit lässt sich zusammenfassen, dass sowohl 5-fC, als auch 5-caC in der Lage sind die Bindung des Transkriptionsfaktors CREB zu beeinträchtigen, wenn sie in dessen spezifischer Bindungssequenz positioniert sind.

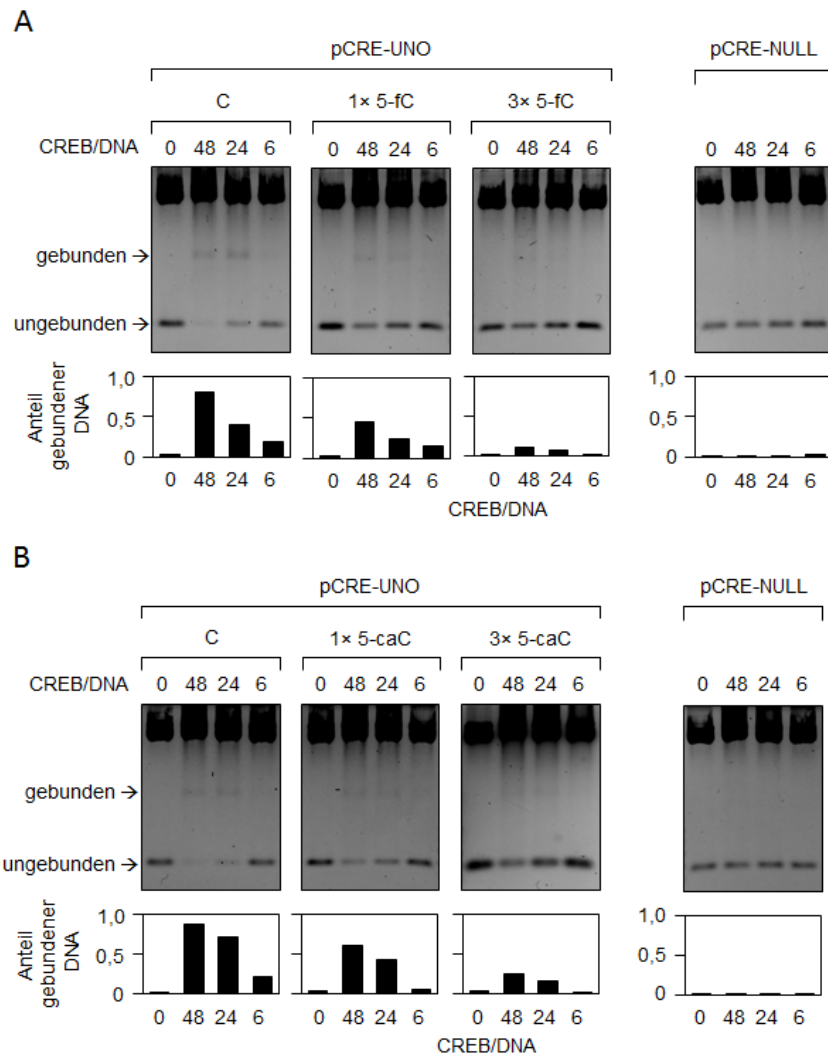


Abbildung 3-79 Einfluss von einem bzw. drei 5-fC oder 5-caC in CRE auf die Bindung des Transkriptionsfaktors CREB zu seiner Konsensus-Sequenz CRE. (A) EMSA mit den PciI/BmtI-Fragmenten des Vektors pCRE-UNO mit keinem, einem oder drei 5-fCs in der Promotor-Region. Die untere Bande enthält entweder kein (pCRE-NULL) oder ein CRE (pCRE-UNO). Der promotorlose Vektor pCRE-NULL dient als Kontrolle auf unspezifische Bindungsaktivität. Die Zahlen repräsentieren das molare Verhältnis von CREB-Molekülen zu DNA-Fragmenten. (B) EMSA mit Vektoren, die kein, ein oder drei 5-caC-enthalten, analog zu (A).

Um nun den Effekt von 5-fC und 5-caC auf die Gentranskription zu untersuchen, wurden die EGFP-Expression der Vektoren mit 5-fC bzw. 5-caC in ihrem top-Strang in HeLa-Zellen analysiert. Diese Expressionsanalyse zeigt, dass 6 Stunden nach der Transfektion sowohl 5-fC als auch 5-caC eine erniedrigte EGFP-Expression im Vergleich zur C-enthaltenden Kontrolle verursachen (Abbildung 3-80). Dieser unmittelbare Effekt von 5-fC und 5-caC ist wahrscheinlich durch die beeinträchtigte CREB-Bindung zu erklären. Zu späteren Zeitpunkten nimmt die Expression der 5-fC bzw. 5-caC enthaltenden Vektoren im Vergleich zur C-enthaltenden Kontrolle rapide ab, wobei drei der entsprechenden Modifikation jeweils einen marginal stärkeren Effekt haben als eine einzelne Modifikation. Diese Expressionskinetik – die der der Vektoren mit einem einzelnen 8-oxoG ähnelt – zeigt, dass im Gegensatz zu 5-hmC, das die Genexpression nur direkt inhibiert, 5-fC und 5-caC die

Genexpression auch über einen anderen Mechanismus beeinträchtigen können, bei dem es sich potentiell um eine Genstilllegung handelt, wie sie auch im Falle des 8-oxoG auftritt.

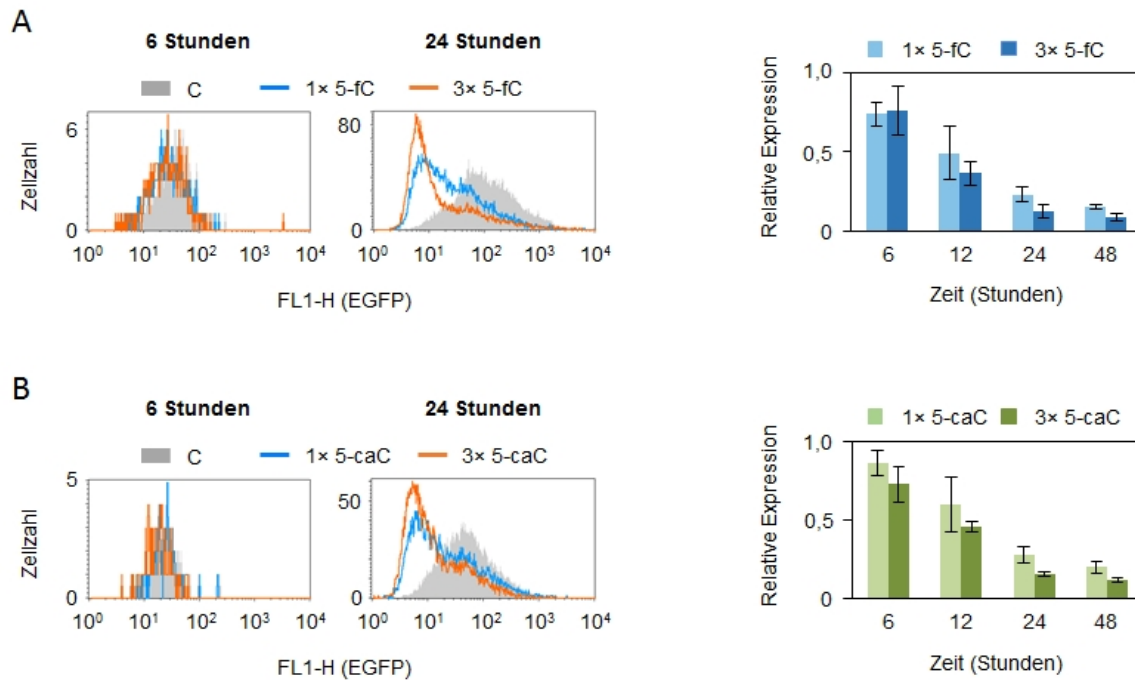


Abbildung 3-80 Einfluss eines oder drei 5-fC oder 5-caC innerhalb des CRE-UNO-Promotors auf die Genexpression. (A) Repräsentative überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Expression (FL1-H) pro Zelle (links) nach Transfektion von Vektoren, die die entweder kein, ein oder drei 5-fC innerhalb des top-Strangs minimalen CRE-UNO-Promotors enthielten und EGFP-Expression der 5-fC-enthaltenden Vektoren relativ zur C-enthaltenden Kontrolle (rechts). Mittelwert aus sechs Transfektionen mit zwei unabhängigen Plasmidpräparationen ( $\pm$  Standardabweichung). (B) Repräsentative überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Expression (FL1-H) pro Zelle (links) und nach Transfektion von Vektoren, die die entweder kein, ein oder drei 5-caC innerhalb des top-Strangs des minimalen CRE-UNO-Promotors enthielten und EGFP-Expression der 5-caC-enthaltenden Vektoren relativ zur C-enthaltenden Kontrolle (rechts). Mittelwert aus vier Transfektionen mit zwei unabhängigen Plasmidpräparationen ( $\pm$  Standardabweichung).

Der von 8-oxoG verursachte Stilllegungsmechanismus ist unabhängig vom DNA-Strang, in dem sich die DNA-Modifikation befindet. Um die Strangabhängigkeit der Effekte von 5-fC und 5-caC zu untersuchen wurde nun auch die EGFP-Expression der pCRE-UNO-Vektoren, die 5-fC oder 5-caC im bottom-Strang enthalten, in HeLa-Zellen analysiert. Diese Analyse zeigt, dass die Effekte von 5-fC und 5-caC tatsächlich auch dann auftreten, wenn sich die Modifikationen im gegenüberliegenden DNA-Strang befinden (Abbildung 3-81), was die Strangunabhängigkeit des Effektes bestätigt und eine weitere Parallele zum expressionshemmenden Effekt von 8-oxoG darstellt.



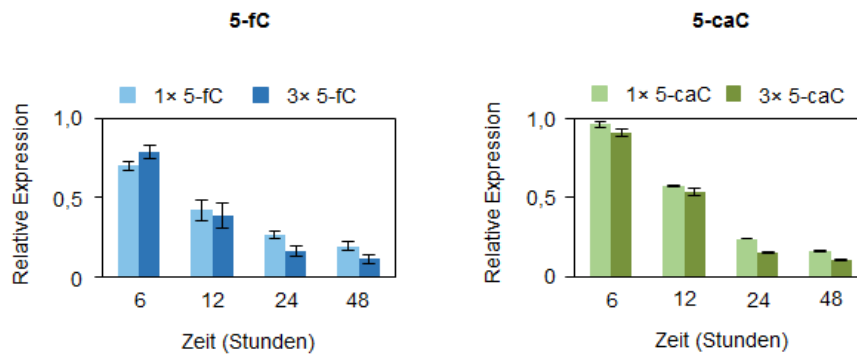


Abbildung 3-81 Einfluss eines oder drei 5-fC oder 5-caC innerhalb des „bottom“-Strangs des CRE-UNO-Promotors auf die Genexpression. EGFP-Expression von HeLa-Zellen nach Transfektion von Vektoren, die die entweder kein, ein oder drei 5-fC oder 5-caC innerhalb des „bottom“-Strands des minimalen CRE-UNO-Promotors enthielten (A) EGFP-Expression der 5-fC-enthaltenden Vektoren relativ zur C-enthaltenden Kontrolle. Mittelwert aus drei unabhängigen Transfektionen ( $\pm$  Standardabweichung). (B) EGFP-Expression der 5-caC-enthaltenden Vektoren relativ zur C-enthaltenden Kontrolle (rechts). Mittelwert aus drei unabhängigen Transfektionen ( $\pm$  Standardabweichung).

Es ist bekannt, dass 5-fC und 5-caC im abschließenden Schritt in der aktiven DNA-Demethylierung durch die DNA Glykosylase TDG ausgeschnitten werden (He et al., 2011), (Maiti et al., 2011). Somit besteht die Vermutung, dass – wie auch bei 8-oxoG – die Exzision der Modifikation den Auslöser der beobachteten Transkriptionshemmung darstellt. Um dies zu untersuchen wurden die Vektoren, die ein 5-fC oder 5-caC innerhalb des top-Strangs enthielten, in HeLa-Zellen transfiziert, bei denen jeweils UNG1/2, Smug1 oder TDG durch shRNA stabil herunterreguliert wurden. In der Analyse der EGFP-Expression ist zu erkennen, dass die Expression der Vektoren mit 5-fC und 5-caC im Vergleich zu der des C-enthaltenden Kontrollvektors in der mit einem leeren shRNA-Vektor transfizierten Kontrollzelllinie rapide abnimmt (Abbildung 3-82). Diese rapide Abnahme der Expression der 5-fC und 5-caC enthaltenden Vektoren ist auch in den Zellen mit Knockdown von UNG1/2 und Smug1 zu beobachten. In der Zelllinie mit dem Knockdown von TDG hingegen ist die durch 5-fC und 5-caC verursachte Reduktion der Genexpression verlangsamt. Im Falle von 5-fC ist diese Verlangsamung nur geringfügig, im Falle von 5-caC aber deutlich erkennbar. Dadurch ist bewiesen, dass sowohl 5-fC, als auch 5-caC von der DNA Glykosylase TDG ausgeschnitten werden und diese Exzision die beobachtete Transkriptionshemmung verursacht. Die Diskrepanz im Einfluss des TDG-Knockdowns auf die Effekte von 5-fC und 5-caC ist wahrscheinlich durch die unterschiedliche Exzisions-Effizienz in den beiden Substraten (Maiti & Drohat, 2011) und die Restmenge an TDG in den Knockdown-Zellen erklärbar (Lühnsdorf et al., 2014).

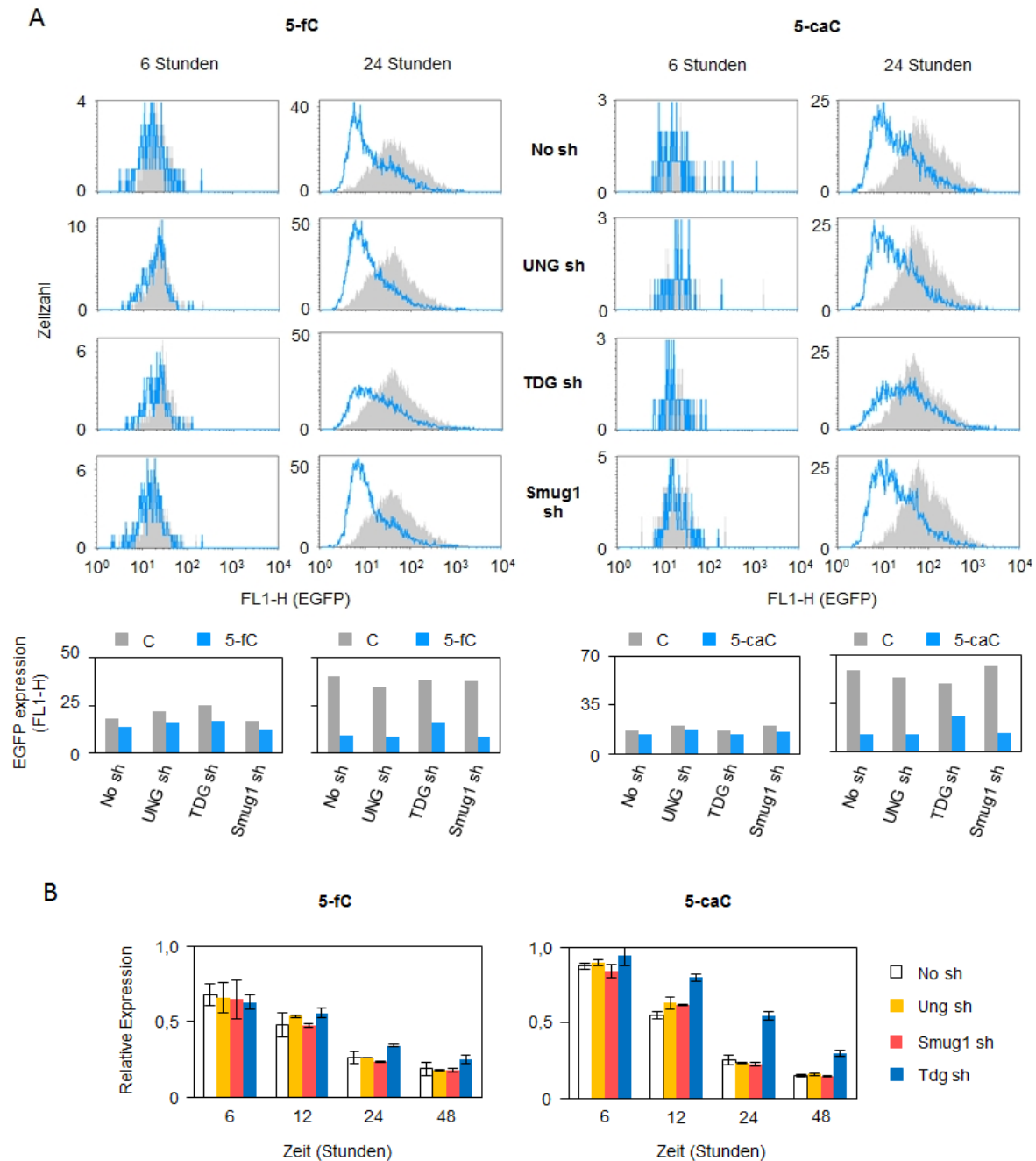


Abbildung 3-82 Einfluss eines Knockdowns der DNA-Glykosylasen UNG, Smug1 oder TDG auf den Effekt von 5-fC und 5-caC auf die Genexpression. EGFP-Expression von HeLa-Zellen mit stabilem UNG-, Smug1- oder TDG-Knockdown und der mit einem Leervektor stabil transfizierten Kontrolle, die pCRE-UNO-Vektoren, die kein oder ein 5-fC oder 5-caC innerhalb des minimalen Promotors enthielten, transfiziert wurden. (A) Überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Expression (FL1-H) pro Zelle und die quantitative Analyse eines repräsentativen Experiments. (B) EGFP-Expression der 5-fC- oder 5-caC-enthaltenden Vektoren relativ zur C-enthaltenden Kontrolle. Mittelwert aus zwei unabhängigen Transfektionen ( $\pm$  Variationsbreite).

Die EGFP-Expressionsanalyse der Vektoren mit drei 5-fC oder drei 5-caC in den verschiedenen shRNA-Zelllinien zeigt, dass sich auch in diesem Fall nur der Knockdown von TDG positiv auf die EGFP-Expression auswirkt (Abbildung 3-83). Und erneut ist die Verlangsamung des inhibitorischen Effekts im Falle des 5-caC deutlicher zu erkennen als im Falle des 5-fC.

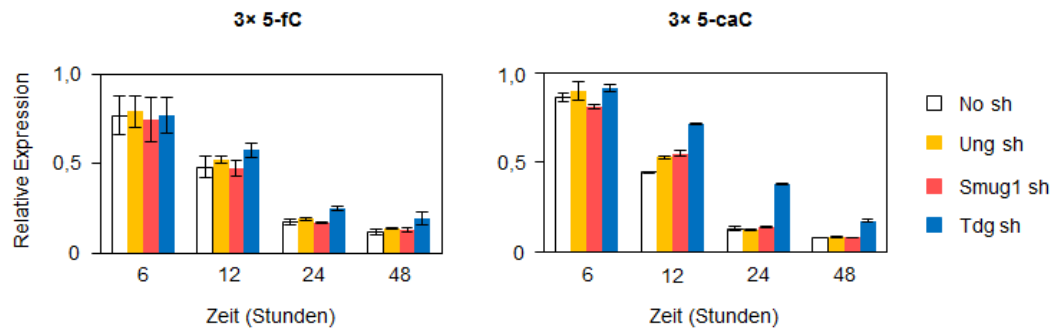


Abbildung 3-83 Einfluss eines Knockdowns der DNA-Glykosylasen UNG, Smug1 oder TDG auf den Effekt von drei 5-fC und drei 5-caC auf die Genexpression. EGFP-Expression von HeLa-Zellen mit stabilem UNG-, Smug1- oder TDG-Knockdown und der mit einem Leervektor stabil transfizierten Kontrolle, die pCRE-UNO-Vektoren, die kein oder drei 5-fC oder 5-caC innerhalb des minimalen Promotors enthielten, transfiziert wurden. EGFP-Expression der 5-fC- oder 5-caC-enthaltenden Vektoren relativ zur C-enthaltenden Kontrolle. Mittelwert aus zwei unabhängigen Transfektionen ( $\pm$  Variationsbreite).

Zusammengenommen lassen die Ergebnisse darauf schließen, dass es sich bei der im Falle von 8-oxoG beobachteten Expressionshemmung durch einen zellulären Silencing-Mechanismus um einen Mechanismus handelt, der allen Substraten der Basen-Exzisions-Reparatur gemein ist und durch deren DNA-Glykosylasen-katalysierte Exzision und die darauf folgende Konversion in einen DNA-Einzelstrangbruch ausgelöst wird.

## 4. Diskussion

### 4.1 Transkriptionshemmung durch die BER von 8-oxoG

Neben seiner Replikationsmutagenität kann 8-oxoG, wie viele andere DNA-Schäden auch, die Expression des geschädigten Gens beeinträchtigen. Es konnte gezeigt werden, dass bereits ein einzelnes 8-oxoG innerhalb eines Reportergens genügt, um die Expression dieses Gens signifikant zu reduzieren (Kitsera et al., 2011). Diese Auswirkung von 8-oxoG auf die Transkription ist potentiell biologisch relevant, da messbare Mengen an 8-oxoG immer (auch unter physiologischen Bedingungen) im Genom vorhanden sind. Die früheren Befunde deuten darauf hin, dass die Stärke des Effekts eines einzelnen 8-oxoGs auf die Genexpression von verschiedenen, bisher noch unbekanntem Faktoren beeinflusst wird. Der DNA-Strang (NTS oder TS) und der Abstand von 8-oxoG zum Transkriptionsstart konnten in einer folgenden Studie als einflussnehmende Größen ausgeschlossen werden (Diplomarbeit J. Allgayer, 2011). Eines der Ziele dieser Arbeit war es durch Positionierung von synthetischem 8-oxoG in verschiedenen DNA-Sequenzkontexten zu untersuchen, ob die Beschaffenheit der benachbarten Nucleobasen die Stärke des transkriptionshemmenden Effekts beeinflusst. Diese Experimente zeigten, dass 8-oxoG im 5'-C[8oG]G-Kontext die Genexpression weniger stark inhibiert als 8-oxoG im 5'-A[8oG]C-Kontext, unabhängig vom DNA-Strang (Abbildung 3-4). Eine mögliche Ursache für diese Sequenzabhängigkeit der Inhibition der Genexpression könnte in einer Sequenzabhängigkeit der Exzision von 8-oxoG durch OGG1 liegen. Es konnte nämlich bereits zuvor mittels Host Cell Reactivation Assays in MEFs von OGG1<sup>-/-</sup> Mäusen gezeigt werden, dass die Inhibition der Genexpression von 8-oxoG nur im Falle seiner durch die Exzision durch OGG1 initiierten Reparatur auftreten kann (Kitsera et al., 2011). Durch Cleavage Assays mit den 8-oxoG enthaltenden Vektoren unter Verwendung von rekombinantem OGG1-Protein konnte nun gezeigt werden, dass OGG1 8-oxoG mit höherer Effizienz aus dem DNA-Sequenzkontext 5'-A[8oG]C als aus dem Kontext 5'-C[8oG]G ausschneidet (Abbildung 3-5). Somit existiert eine positive Korrelation zwischen der OGG1-vermittelten Stranginzisionsaktivität und dem Ausmaß der Transkriptionshemmung in Abhängigkeit von der lokalen DNA-Sequenz. Ausgehend von der Bestimmung verschiedener kinetischer Parameter in Oligonukleotid-Substraten wurde vorhergesagt, dass die DNA-Sequenz von 10-13 Nucleotide um 8-oxoG die Bindungsfähigkeit und die katalytische Aktivität von OGG1 beeinflussen kann (Kirpota et al., 2011). Inwieweit diese Daten auf Vektor-DNA oder sogar genomische DNA, die in einer weitaus stabileren helikalen Struktur vorliegt, übertragbar sind, ist allerdings schwer abzuschätzen.

Durch das Design der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente muss die DNA-Sequenz, die für die Unterschiede in der Exzisionseffizienz verantwortlich ist, zwischen den Positionen -6 und +5 in Bezug zu 8-oxoG liegen. Da die Erklärung für die Sequenzabhängigkeit sich wahrscheinlich im

katalytischen Mechanismus der Exzision von 8-oxoG finden lässt, und im Laufe dieser Reaktion nur die direkt benachbarten Nukleotide mit den Aminosäureresten des aktiven Zentrums in Berührung kommen (Bruner et al., 2000), wird davon ausgegangen, dass die Nukleotide -1 und +1 den größten Einfluss auf die Exzisionseffizienz haben. Im Laufe der Exzisionsreaktion wird 8-oxoG aus dem DNA-Strang heraus in das aktive Zentrum von OGG1 gedreht. Dabei wird der DNA-Doppelstrang eingeknickt und die von 8-oxoG hinterlassene Lücke im DNA-Strang durch den Asn149-Rest des OGG1-Proteins gefüllt, was wiederum diesen Zustand stabilisiert (Bruner et al., 2000). Purinbasen wie z.B. Guanin in direkter Nachbarschaft zu 8-oxoG können durch ihre sperrige Zwei-Rings-Struktur die Ausbildung des Knicks durch sterische Hemmung behindern und so die Bildung eines stabilen OGG1-DNA-Komplexes erschweren oder gar verhindern, wodurch die Exzision von 8-oxoG entweder nur verlangsamt oder sogar gar nicht ablaufen kann. Ausgehend von den in dieser und den vorangegangenen Studien verwendeten Sequenzkontexten und der Stärke des inhibitorischen Effektes eines in ihnen platzierten 8-oxoGs lässt sich folgende Reihenfolge der Exzisionseffizienz von 8-oxoG durch OGG1 aufstellen: 5'-C[8oG]G < 5'- A[8oG]C < 5'-C[8oG]C. Aus dieser Reihenfolge lässt sich wiederum vermuten, dass eine Purin-Base 3' von 8-oxoG einen gravierenderen Einfluss auf die Exzision von 8-oxoG ausübt als eine Purin-Base 5' von 8-oxoG, wobei Guanin durch seine sterisch anspruchsvolleren Seitengruppen (Keto- und Aminogruppe) wahrscheinlich einen größeren Effekt hat als Adenin. Ein 8-oxoG, das auf beiden Seiten von Pyrimidinbasen umgeben ist (wie z.B. in der 5'-C[8-oxoG]C-Sequenz), wird somit effizienter ausgeschnitten, da Pyrimidinbasen durch ihre Struktur ein weitaus geringeres sterisches Hindernis darstellen als die Purin-Basen mit ihrer Zwei-Ring-Struktur. Ein Einfluss der Nukleobasen, die nicht in direkter Nachbarschaft zu 8-oxoG stehen, kann nicht ausgeschlossen werden, wird aber im Vergleich zum Einfluss der direkt benachbarten Basen als vernachlässigbar angesehen. Die Unterschiede in der Exzisionseffizienz von 8-oxoG aus den verschiedenen DNA-Sequenzkontexten bestätigten sich auch in Cleavage Assays, für die statt rekombinantem OGG1 Zellextrakte OGG1-überexprimierender HeLa-Zellen eingesetzt wurden (Abbildung 3-7). Diese Ergebnisse demonstrieren, dass die Sequenzabhängigkeit der Exzision *in vitro* spezifisch auf OGG1 zurückzuführen ist, im Gegensatz beispielsweise zur allgemeinen Effizienz der Exzisionsreaktion, für die eine Modulation durch APE1 nachgewiesen wurde (Hill et al., 2001), (Vidal et al., 2001). Ein analog durchgeführter Cleavage-Assay zeigte zudem, dass auch der Polymorphismus Ser326Cys des OGG1-Proteins keinen Einfluss auf die Sequenzabhängigkeit der Exzision von 8-oxoG aus der Plasmid-DNA (Abbildung 3-8) ausübt. Wenn man davon ausgeht, dass der katalytische Mechanismus der Exzision der Sequenzabhängigkeit zugrunde liegt, ist dieses Ergebnis nicht überraschend, da der Aminosäure-Rest 326 – unabhängig um welche Aminosäure es sich handelt – nicht am aktiven katalytischen Geschehen beteiligt ist. Auch wenn der Ser326Cys-Variante in der Literatur eine verminderte Exzisions-Aktivität nachgesagt wird (Kohno et al., 1998), wird generell

davon ausgegangen, dass der Grund dafür in einer Änderung der DNA-Bindung oder einer geringeren Stimulation durch andere Proteine (Hill & Evans, 2006) und nicht in einer strukturellen Änderung des aktiven Zentrums liegt.

Es ist bereits bekannt, dass die Exzision von 8-oxoG durch dessen Positionierung in der Nähe zu den Enden linearer DNA (Hirano et al., 2001), (Derevyanko et al., 2012) oder in DNA-Sequenzen, die einzelstängige Strukturen wie beispielsweise Hairpins, D-Loops oder ähnliches ausbilden können, beeinträchtigt wird (Jarem et al., 2009), (Kirpota et al., 2011), (Rhee et al., 2011). Auch AP-Läsionen, Mismatches oder Einzelstrangbrüche in Nachbarschaft zu 8-oxoG stellen ein Hindernis für eine effiziente Exzision durch OGG1 dar (David-Cordonnier et al., 2001), (Sassa et al., 2012). Dass auch die DNA-Sequenz einen direkten Einfluss auf die Exzisionsaktivität ausübt, kann auch abgesehen von den Auswirkungen auf die Stärke des durch die Exzision initiierten, transkriptionshemmenden Effekts andere biologisch relevante Folgen haben. Eine ineffiziente Exzision von 8-oxoG aus für die Exzision ungünstigen DNA-Sequenzkontexten würde unweigerlich zu einer Akkumulation von 8-oxoG an eben diesen Positionen führen, was damit einhergehend unweigerlich in einer erhöhten Mutationsrate resultiert. Zieht man zusätzlich in Betracht, dass aufgrund der Redox-Potentiale der Nukleobasen 8-oxoG bevorzugt in GG-Sequenzen entsteht, liefert dies eine mögliche Erklärung für die tatsächlich beobachtete, heterogene Verteilung von 8-oxoG im humanen Genom (Ohno et al., 2006). Einen weiteren, bisher wenig untersuchten Faktor, der diese Verteilung beeinflussen könnte, stellt die Art des Chromatins dar (Menoni et al., 2012). Unterstützt wird die Bedeutung der DNA-Sequenz auf die Verteilung von 8-oxoG durch die Beobachtungen von Al-Tassan et al. (2002), dass die somatischen Mutationen im APC-Gen bei Menschen mit MAP (MYH-assoziierte Polyposis), die in der MYH-vermittelten Reparatur von 8-oxoG:A Mismatches defizient sind, fast ausschließlich im Kontext 5'-GAA auftreten – ein Kontext, in dem die Exzision von 8-oxoG durch OGG1 durch die 3'-positionierte Purinbase Adenin potentiell erschwert werden könnte.

Ein weiterer Faktor, der die Stärke des inhibitorischen Effekts von 8-oxoG beeinflusst und direkt mit der Exzision von 8-oxoG durch OGG1 in Verbindung steht, ist die Menge an 8-oxoG innerhalb der Vektor-DNA. Es konnte gezeigt werden, dass der inhibitorische Effekt von 8-oxoG mit der Anzahl an 8-oxoG an Stärke gewinnt (Abbildung 3-10), was auch durch eine erhöhte Exzisionsaktivität von OGG1 in diesen Substraten zusätzlich untermauert wurde (Abbildung 3-11). Dass die Anwesenheit von mehreren Modifikationen in der Vektor-DNA allerdings die Exzisionseffizienz der DNA-Glykosylase steigert, ist eher unwahrscheinlich. Vielmehr wird wohl durch die Anwesenheit von mehreren 8-oxoGs schlicht die Wahrscheinlichkeit, dass OGG1 eine Läsion erkennt, erhöht. OGG1 gleitet bei der Suche nach 8-oxoG die DNA-Doppelhelix entlang und testet deren Stabilität durch stichprobenartiges Einführen eines Aminosäurerestes (David et al., 2007). Da 8-oxoG dabei nicht

vollständig aus der Helix herausgedreht wird und die Geschwindigkeit der Diffusion von OGG1 äußerst hoch ist, ist dieser Prozess der Differenzierung zwischen Guanin und 8-oxoG nicht fehlerfrei und gelegentlich entgeht ein 8-oxoG der Suche – was durch wiederholtes Absuchen eines DNA-Abschnittes wieder ausgeglichen wird. Befinden sich somit drei 8-oxoG statt einem einzelnen in einem von OGG1 abgesuchten DNA-Bereich, ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine Modifikation bereits beim ersten Durchgang erkannt und ausgeschnitten wird, dreimal so groß.

In murinen Zellen konnte die Notwendigkeit der Anwesenheit von OGG1 für die Etablierung des transkriptions-hemmenden Effektes von 8-oxoG bereits früher gezeigt werden (Kitsera et al., 2011), doch ob dies auch in humanen Zellen der Fall ist, wurde bisher nur indirekt durch den Nachweis der Korrelation zwischen der Stärke der Inhibition und der Exzisionseffizienz gezeigt. Zum Erbringen eines direkten Nachweises wurde die DNA-Glykosylase OGG1 mit Hilfe eines shRNA-Vektors in HeLa-Zellen permanent herunterreguliert (30 % Restprotein) (Abbildung 3-12). Diese Reduktion der OGG1-Menge manifestierte sich auch als ein funktioneller Knockdown, da in diesen Zellen unter Verwendung der alkalischen Elutions-Methode eine verminderte Reparaturaktivität gegenüber oxidativen, durch Kaliumbromat verursachten Schäden nachgewiesen werden konnte (Allgayer et al., 2013; Versuch durchgeführt von Carina von der Lippen). Die Transfektion von Vektoren, die 8-oxoG in einem Kontext mit guter Exzisionseffizienz enthielten, in diese Knockdown-Zellen zeigte, dass auch in humanen Zellen die Entstehung des inhibitorischen Effektes von der Menge an OGG1 in den Zellen abhängig ist (Abbildung 3-13).

Um nun das Protein und die DNA-Struktur, die letztendlich die Hemmung der Genexpression verursachen, zu identifizieren, wurden Vektoren hergestellt, die 8-oxoG im nicht-transkribierten DNA-Strang des kodierenden Bereichs des Reportergens enthielten, wobei jeweils eine oder beide der 8-oxoG-flankierenden Phosphodiesterbindungen durch Phosphothioate ersetzt wurden. Diese Modifizierungen des DNA-Rückgrats gelten als resistent gegenüber der enzymkatalysierten, nukleolytischen Spaltung (Wilson et al., 1995) und sollten somit in der Lage sein, die Entstehung des Einzelstrangbruchs während der Prozessierung von 8-oxoG zu modulieren. Dabei können zwei Arten von Einzelstrangbrüchen entstehen: einerseits durch direkte Umsetzung der von OGG1 generierten AP-Läsion durch die intrinsische  $\beta$ -Lyase-Aktivität von OGG1 und andererseits durch Umsetzung der von OGG1 generierten AP-Läsion durch APE1 (Svilar et al., 2011). Dementsprechend sollte ein Phosphothioat auf der 5'-Seite von 8-oxoG die Spaltung des Zucker-Phosphat-Rückgrats durch APE1 verhindern, während ein Phosphothioat auf der 3'-Seite die  $\beta$ -Lyase Aktivität von OGG1 inhibiert. Letztes konnte in einem Cleavage Assay unter Verwendung von rekombinantem OGG1 auch direkt nachgewiesen werden (Abbildung 3-18). Transfektion der Vektoren mit 8-oxoG umgeben von keinem, jeweils einem oder zwei Phosphothioaten in HeLa-Zellen ergab, dass bei beiden Konstrukten

mit einem Phosphothioat 5' von 8-oxoG das Auftreten eines inhibitorischen Effektes verhindert wurde (Abbildung 3-19). Dies zeigt, dass die von OGG1 generierte AP-Läsion *in vivo* nur von APE1 umgesetzt wird und lässt vermuten, dass die  $\beta$ -Lyase-Aktivität des OGG1 vernachlässigbar gering ist und sich OGG1 somit wie eine monofunktionelle DNA-Glykosylase verhält. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit der gängigen Annahme, dass die  $\beta$ -Lyase Aktivität von OGG1 um ein Vielfaches geringer ist als seine N-Glykosylase-Aktivität (Zharkov et al., 2000) und die Dissoziation von OGG1 von der generierten AP-Läsion durch die Anwesenheit von APE1 beschleunigt wird (Vidal et al., 2001). Auch in einem Cleavage Assay mit den Extrakten der OGG1-überexprimierenden Zellen, in denen somit ein > 10 facher Überschuss an OGG1 vorhanden war, zeigte, dass die Bildung des Einzelstrangbruches fast ausschließlich über APE1 erfolgte (Abbildung 3-22). Somit konnte in den Experimenten eindeutig gezeigt werden, dass der entstehende DNA-Einzelstrangbruch, der durch die Umsetzung der durch OGG1 gebildeten AP-Läsion durch APE1 gebildet wird, das inhibierende Reparatur-Intermediat darstellt.

Eine Beteiligung der Nei-homologe NEIL1 und NEIL2, denen in verschiedenen Publikationen eine Exzisionsaktivität für 8-oxoG zugeschrieben wird (Hazra et al., 2002), (Morland et al., 2002), (Dou et al., 2003), (Parsons et al., 2005), (Dobbs et al., 2008), an der Exzision und damit Reparatur von 8-oxoG scheint aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse unwahrscheinlich zu sein: Bei dem katalytischen Mechanismus dieser bifunktionellen Glykosylasen handelt es sich um eine  $\beta$ ,  $\delta$ -Eliminierung, wobei die  $\beta$ -Lyase-Aktivität den ersten Schritt dieser Reaktion darstellt. Diese  $\beta$ -Lyase-Aktivität wiederum sollte durch ein Phosphothioat auf der 3'-Seite der DNA-Basenmodifikation inhibiert werden. Da aber für ein derart positioniertes Phosphothioat in Nachbarschaft zu 8-oxoG keinen Einfluss auf dessen Exzision gezeigt werden konnte (Abbildung 3-18), kann auch eine Exzision von 8-oxoG durch NEIL1 und NEIL2 *in vivo* ausgeschlossen werden. Dies steht in Übereinstimmung mit dem bereits publizierten Befund, dass die 8-oxoG-Exzisionsaktivität von OGG1 bei Weitem bedeutsamer ist als die 8-oxoG-Exzisionsaktivität aller anderen Glykosylasen (Klungland et al., 1999).

Da die Aufrechterhaltung der Transkription essentiell ist, um das Überleben einer Zelle zu gewährleisten und in den vorangegangenen Experimenten gezeigt werden konnte, dass eine einzelne oxidative Modifikation nach ihrer Prozessierung durch die Basen-Exzisions-Reparatur in der Lage ist die Transkription eines Reportergens zu beeinträchtigen, ist die Aufklärung dieses Inhibitionsmechanismus von Bedeutung. Der DNA-Einzelstrangbruch wurde als das den inhibierenden Effekt auslösendes Reparatur-Intermediat identifiziert, jedoch ist der genaue Modus dieser Inhibition noch unklar. Viele DNA-Schäden sind, sofern sie im transkribierten DNA-Strang auftreten, in der Lage die elongierende RNA-Polymerase zu hemmen (Khobta & Epe, 2012), wodurch dann die Expression der betreffenden Gene beeinträchtigt wird. Diese Art von Inhibition wurde vor



allem bei großen, sterisch anspruchsvollen Läsionen, wie den durch UV-Strahlung gebildeten CPDs oder den 6-4 PPs (Donahue et al., 1994), (Selby et al., 1997), (Tornaletti et al., 1997), (Mei Kwei et al., 2004), beobachtet. Es ist bekannt, dass auch DNA-Einzelstrangbrüche das Potential besitzen die RNA-Polymerase direkt zu blockieren (Kathe et al., 2004). Aber da der Effekt eines einzelnen 8-oxoGs unabhängig vom DNA-Strang, in dem sich die Läsion befand, beobachtet wurde, scheint ein direkter Block der Transkriptionsmaschinerie und somit eine Hemmung auf Ebene der Elongation nicht der Grund für die beobachtete Inhibition zu sein. Dennoch sollte die Möglichkeit, dass sich durch den Einzelstrangbruch im Laufe der Transkription sekundäre DNA-Strukturen bilden, die dann wiederum einen direkten Block der Transkription darstellen könnten (Roy et al., 2010), nicht außer Acht gelassen werden. Zur Untersuchung, ob die beobachtete Inhibition der Gentranskription durch Kollision des DNA-Einzelstrangbruchs oder einer durch ihn verursachten Sekundärstruktur mit der RNA-Polymerase verursacht wird, wurden Reportervektoren hergestellt, die 8-oxoG upstream des EGFP-Gens im untranskribierten Bereich der Vektor-DNA enthielten. Transfektion dieser Vektoren in HeLa Wildtyp-Zellen, sowie in die HeLa-Zellen mit permanentem OGG1-Knockdown zeigte, dass ein einzelnes 8-oxoG, auch wenn es außerhalb des transkribierten Bereichs positioniert ist, fähig ist die Expression des Reportergens zu inhibieren (Abbildung 3-25) und diese Inhibition abhängig von der Exzision von 8-oxoG durch OGG1 ist (Abbildung 3-26). Diese Ergebnisse sprechen eindeutig gegen eine Inhibierung der Genexpression durch Hemmung der Transkriptionselongation, sondern für eine Hemmung der Transkriptionsinitiation. Eine solche Hemmung erfordert einen zellulären Stilllegungsmechanismus, der die beobachtete Repression der Genexpression vermittelt. Mögliche Mechanismen, über die dieses repressive Signal vermittelt werden könnte, ist einerseits die Rekrutierung von Proteinkomplexen, die wiederum eine repressive Chromatin-Struktur im Bereich des Transkriptionsstarts etablieren und die dann die Bindung von transkriptionellen Aktivatoren verhindert. Um zu untersuchen, ob ein solcher Repressionsmechanismus spezifisch für einen transkriptionellen Regulator oder eine Transkriptionsfaktorbindestelle innerhalb des in den bisherigen Experimenten verwendeten CMV-IE-Promotors ist, wurden Reportervektoren mit unterschiedlich großen Promotordeletionen konstruiert und 8-oxoG in den für das Reportergen kodierenden Bereich eingebaut. Die Expressionsanalyse in HeLa-Zellen zeigte, dass der inhibitorische Effekt von 8-oxoG in jedem Konstrukt auftrat – selbst in dem Konstrukt, in dem die gesamte Promotersequenz mit Ausnahme eines einzelnen regulatorischen Promotorelements (cAMP responsive element, CRE) deletiert worden war (Abbildung 3-28). Um sicherzustellen, dass es sich bei dem einzelnen, noch in der Promotor-Sequenz vorhandenen, CRE nicht um ein mit der Repression zusammenhängendes Sequenz-Element handelt, wurde 8-oxoG auch in den Vektor pCRE-NULL, ein Vektor mit einem minimalen Promotor, dessen einziges CRE mutiert wurde, eingeführt. Auch in diesem Vektor zeigte 8-oxoG einen inhibitorischen Effekt auf die Genexpression, sodass

bewiesen wurde, dass das Vorhandensein eines CRE nicht die Voraussetzung für die Initiation der Genstilllegung darstellt (Abbildung 3-31). Zusammen zeigen diese Ergebnisse, dass es innerhalb des CMV-IE-Promoters kein spezifisches funktionelles Promotorelement gibt, das an der Entstehung der beobachteten Genstilllegung beteiligt ist. Zusätzlich konnte, da 8-oxoG unabhängig von der Größe der Promotor-Deletion dasselbe Ausmaß an Transkriptions-Repression verursachte (Abbildung 3-29), gezeigt werden, dass der inhibitorische Effekt von 8-oxoG unabhängig von der Stärke des Promotors ist.

Da es sich bei dem bisher untersuchten CMV-IE Promotor um einen viralen Promotor handelt, bleibt die Frage, ob dieser Mechanismus der Genstilllegung auch auf humane Gene übertragbar ist, deren DNA kontinuierlich der reaktiven Sauerstoffspezies und somit der Bildung von 8-oxoG und deren Folgen ausgesetzt ist. Um diese Frage zu beantworten wurde 8-oxoG in den kodierenden Bereich von EGFP-Reportergenen, die unter Kontrolle der humanen Promotoren des ACTB bzw. des RASSF1-Gens standen, eingebaut. Die Expressionsanalyse zeigte, dass ein einzelnes 8-oxoG auch in Genen unter Kontrolle humaner Promotoren eine Genstilllegung zu initiieren vermag (Abbildung 3-34). Somit lässt sich festhalten, dass die Genstilllegung nach Exzision von 8-oxoG unabhängig von der Art des Promotors auftritt und es sich somit um einen potentiell physiologisch relevanten Mechanismus handelt.

Durch den Ausschluss einer durch die Bindung von Repressoren an spezifische DNA-Elemente vermittelten Hemmung der Transkriptionsinitiation wird die Etablierung repressiver Chromatin-Strukturen als mechanistische Grundlage der Genstilllegung wahrscheinlich. Sowohl Histonmethylierung als auch Histondeacetylierung vermitteln einen repressiven Zustand. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass nach Transfektion oxidativ geschädigter Plasmid-DNA diese Vektoren tatsächlich in Chromatin verpackt wurden und die Level an acetyliertem Histon H4 in der Promotor-Region des Reportergens um etwa 25 % im Vergleich zur ungeschädigten Kontrolle erniedrigt waren, aber keine signifikante Änderung der Methylierung von Histon H3 auftrat (Khobta et al., 2010). Daher wurden alle weiterführenden Untersuchungen auf die Rolle des Histondeacetylases (HDAC) fokussiert. Eine Behandlung der mit 8-oxoG-enthaltenden Vektoren transfizierten HeLa-Zellen (wildtyp) mit dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A zeigte, dass der expressionshemmende Effekt von 8-oxoG mit steigender TSA-Konzentration geringer wurde und bei der höchsten verwendeten Konzentration fast vollständig aufgehoben wurde (Abbildung 3-35). Auch bei der TSA-Behandlung der OGG1-GFP-überexprimierenden HeLa-Zellen bleibt der Effekt eines einzelnen 8-oxoGs in der höchsten verwendeten Konzentration vollständig aus (Abbildung 3-36). Dies deutet tatsächlich auf die Beteiligung der HDACs bei der durch 8-oxoG ausgelösten Stilllegung des Reportergens hin, wobei auch hier der genaue Wirkmechanismus nicht eindeutig festzumachen

ist. TSA inhibiert einerseits verschiedene HDACs der Klasse I und II und somit Deacetylierung von Histonen, aber auch die Deacetylierung anderer Nicht-Histonproteine (Glozak et al., 2005). Auch OGG1 gehört zu den Proteinen, deren Aktivität durch Acetylierung und Deacetylierung modulierbar ist und anscheinend auch ein nicht-histon Substrat der HDACs ist (Bhakat et al., 2006), sodass sich die Behandlung mit TSA auch auf dessen Exzisions-Effizienz auswirken könnte. Aus diesem Grund wurden aus mit TSA vorbehandelten, OGG1-überexprimierenden Zellen Zellextrakte gewonnen und mit diesen Extrakten und 8-oxoG enthaltenden Vektoren ein Cleavage Assay durchgeführt. Dieser Cleavage Assay zeigte, dass die Extrakte der behandelten Zellen eine geringere Einschnittsaktivität an 8-oxoG zeigen als die Extrakte von unbehandelten Zellen (Abbildung 3-37). Dies könnte tatsächlich eine Begründung für den verminderten Effekt von 8-oxoG auf die Genexpression in TSA-behandelten Zellen darstellen. Da Acetylierung von OGG1 an Lys338/Lys341 durch die HAT p300 generell mit einer gesteigerten Exzisionsaktivität in Verbindung gebracht wird (Bhakat et al., 2006), kann die beobachtete Reduktion der Exzisionsaktivität allerdings nicht durch einen geänderten Acetylierungszustand des OGG1 erklärt werden. In der Western Blot Analyse der Zellextrakte der TSA-behandelten Zellen wurde eine etwa vierfach erhöhte Menge an OGG1 nachgewiesen (Abbildung 3-38). Jedoch wurde die Menge des OGG1-GFP-Fusionsproteins, das sich für die hohe 8-oxoG-Cleavageaktivität der Extrakte verantwortlich zeigt, durch die TSA-Behandlung nur unwesentlich verändert. Die Zunahme an nativem OGG1 ist somit nicht groß genug um die Exzisionsaktivität der Extrakte signifikant zu erhöhen. Da in dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte, dass *in vivo* und auch in Zellextrakten die Konversion der von OGG1 generierten AP-Läsion zu einem DNA-Einzelstrangbruch fast ausschließlich durch APE1 erfolgt, können Unterschiede in der Exzisionsaktivität nicht nur durch Modulation von OGG1, sondern auch von APE1 verursacht werden. Auch APE1 wird intrazellulär ebenfalls durch die HAT p300 acetyliert und diese Acetylierung führt zu einer Abnahme der Endonukleaseaktivität (Yamamori et al. 2010). Somit lässt sich die verminderte Exzisionsaktivität der TSA-behandelten Extrakte wahrscheinlich auf eine durch Acetylierung verminderte APE1-Aktivität zurückführen, da APE1 ebenfalls ein Substrat der HDACs der Klasse I und II darstellt (Yamamori et al. 2010). Aber auch wenn die Behandlung mit TSA die 8-oxoG-Exzisionsaktivität beeinträchtigt, erklärt dies nicht das vollständige Ausbleiben des expressionshemmenden Effekts von 8-oxoG und deutet weiterhin auf einen Histon-vermittelten Mechanismus hin.

Um die Beteiligung spezifischer HDACs bei der Entstehung der Genstilllegung genauer zu untersuchen, wurde daraufhin versucht, spezifische HDACs, die an der Stilllegung beteiligt sind, zu identifizieren. Dazu wurden mit Hilfe von siRNA jeweils transiente Knockdowns der HDACs 1, 2 und 3 in HeLa-Zellen durchgeführt und deren Effekte auf die Genstilllegung durch 8-oxoG untersucht. Die Entscheidung, die Untersuchung auf diese drei HDACs der Klasse I zu konzentrieren, liegt darin

begründet, dass diese drei HDACs nachgewiesenerweise Bestandteile von nukleären Multi-Protein-Komplexen, die transkriptionelle Repression vermitteln, sind: HDAC1 und HDAC2 interagieren miteinander (Grozinger & Schreiber, 2002) und bilden das katalytische Zentrum des Sin3-, des NuRD- (nucleosom remodelling deacetylase) und des CoREST-Komplexes (Corepressor of RE1-silencing transcription factor) (Ahringer, 2000), (You et al., 2001), (Denslow & Wade, 2007); HDAC3 bildet Komplexe mit den homologen, transkriptionellen Korepressoren N-CoR (nuclear receptor corepressor) und SMRT (silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor) (Wen et al., 2000) (Zhang et al., 2002), (Karagianni & Wong, 2007). Obwohl für alle drei untersuchten HDACs ein Knockdown von 50 – 80 % erreicht werden konnte (Abbildung 3-39), konnte jedoch unter verschiedenen Versuchsbedingungen kein Einfluss der betreffenden HDACs auf den inhibitorischen Effekt von 8-oxoG nachgewiesen werden (Abbildung 3-40). Trotz allem kann die Beteiligung dieser Enzyme nicht ausgeschlossen werden. Da der Knockdown der einzelnen HDACs nicht vollständig und auch nicht konstant über die untersuchte Zeit war, besteht die Möglichkeit, dass immer noch ausreichend Protein vorhanden war, um eine Stilllegung der Genexpression zu vermitteln. Zusätzlich sind HDAC1 und HDAC2 bis auf wenige Ausnahmen in ihrer Funktion redundant (Lagger et al., 2002), (Montgomery et al., 2007), (Guan et al., 2009). Somit könnte ein partieller Knockdown eines der beiden Enzyme durch die Anwesenheit des anderen ausgeglichen und etwaige Effekte verschleiert werden. Ein experimentelles System mit einem vollständigen Knockout einzelner HDACs, gegebenenfalls in Kombination mit einem transienten Knockdown, könnte in diesem Fall wahrscheinlich die benötigte Sensitivität liefern, um eine verlässliche Aussage über die Beteiligung einzelner HDACs an der Genstilllegung treffen zu können. Dass in murinen ES-Zellen mit Knockdown von entweder HDAC1 oder HDAC2 keine Einschränkung der Lebensfähigkeit der Zellen festgestellt wurde (Dovey et al., 2010), deutet darauf hin, dass ein solcher experimenteller Ansatz (z.B. durch Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems) auch tatsächlich praktisch umsetzbar ist. Da keines der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente eine Beteiligung von HDACs am transkriptionshemmenden Effekt von 8-oxoG ausschließen konnte, stellt eine HDAC-vermittelte Stilllegung immer noch als einen plausiblen Mechanismus dar.

#### 4.2 Direkte Transkriptionshemmung durch 8-oxoG in funktionellen Promotorelementen

Neben der Auslösung indirekter Genstilllegung nach seiner Exzision durch OGG1 gibt es auch Anzeichen dafür, dass 8-oxoG, sofern es sich innerhalb regulatorischer Elemente befindet, die Expression von Genen durch die Modulation der Transkriptionsfaktor-Bindung direkt beeinflussen kann (Ghosh & Mitchell, 1999), (Ramon et al., 1999), (Hailer-Morrison et al., 2003), (Moore et al., 2013). Um solche direkten Effekte von 8-oxoG innerhalb des CRE – dem dominierenden regulatorischen Element des verwendeten CMV-IE Promotors, aber auch vieler humaner Promotoren

– zu untersuchen, wurde der Vektor pCRE-UNO mit seinem single-CRE-Promotor als Modell gewählt. Dieser Vektor ermöglicht den Einbau von DNA-Basenmodifikationen in CRE und ist sensitiv genug um schon geringe Einflüsse auf die Bindungsfähigkeit des Transkriptionsfaktors CREB zu CRE auf Ebene der Genexpression quantitativ zu bestimmen. Dies wurde unter Verwendung von 5-meC als Kontrollläsion, die fähig ist die Bindung von CREB an CRE zu inhibieren (Abbildung 3-45 und 3-56), nachgewiesen. Die Transfektion von Vektoren, die 8-oxoG innerhalb von CRE enthielten, ergab ebenfalls den indirekten, durch Genstilllegung verursachten inhibierenden Effekt von 8-oxoG – allerdings zeigte sich im Falle von 8-oxoG im minimalen Promotor bereits 6 Stunden nach der Transfektion ein schwacher inhibitorischer Effekt (Abbildung 3-63). Da dieser Effekt nicht durch Transfektion der Vektoren in Zellen mit einem OGG1-Knockdown aufgehoben werden konnte (Abbildung 3-64), ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um einen direkten Effekt durch Interferenz mit der Bindung des Transkriptionsfaktors CREB handelt. Tatsächlich konnte dies sowohl durch einen am 8-oxoG-enthaltenden Plasmid-Substrat durchgeführten Bandshift-Assay (Electrophoretic mobility shift assay, EMSA) (Abbildung 3-65) als auch durch die Literatur bestätigt werden (Moore et al., 2013). Dies zeigt, dass je nach Positionierung 8-oxoG nicht nur Genstilllegung auslösen, sondern auch direkt Einfluss auf die Genexpression nehmen kann. Ein Einfluss der Oxidation von Guanin auf die DNA-Bindungsfähigkeit von Proteinen ist vom sterischen Standpunkt aus nicht überraschend – durch die Oxidation wird nicht nur Keto-Gruppe in das Guanin eingeführt, sondern auch die Orientierung der lokalen Dipole innerhalb des Moleküls umgekehrt (Radom et al., 2007).

Tatsächlich wurde ein Einfluss auf die DNA-Bindungsfähigkeit von Transkriptionsfaktoren und anderen Proteinen durch 8-oxoG nicht nur bei CREB festgestellt: Befindet sich 8-oxoG beispielsweise innerhalb der Bindungssequenz der Transkriptionsfaktoren AP-1 oder SP-1, ist deren Bindung zu dieser Sequenz behindert (Ghosh & Mitchell, 1999), (Ramon et al., 1999). Interessanterweise führt eine Oxidation des ersten Guanins des GGGG-Quadruplets innerhalb des NFkB-Bindungselements, das gegenüber Oxidation am anfälligsten ist (Saito et al., 1995), zu einer verstärkten Bindung der p50-Untereinheit des Transkriptionsfaktors (Hailer-Morrison et al., 2003). Doch nicht nur die DNA-Bindungsaktivität von Transkriptionsfaktoren wird durch 8-oxoG moduliert: Die Anwesenheit von 8-oxoG in CpG-Dinukleotiden behindert die Methyltransferase-Aktivität von DNMT3, dem Enzym, das für die *de novo* Methylierung und die damit verbundene Genstilllegung verantwortlich ist, und kann so möglicherweise zu der Generierung eines aberranten Methylierungsmusters während der Krebsentstehung beitragen (Maltseva et al., 2009). Und auch die Fähigkeit von MeCP2 zu methylierten CpG-Dinukleotiden zu binden wird durch 8-oxoG eingeschränkt (Valinluck et al., 2004). Es existieren vereinzelte Publikationen, die 8-oxoG unter anderen aus diesem Grund und seiner relativen Anreicherung in transkriptionell aktiven Bereichen des Genoms eine Funktion als globaler,

epigenetischer Marker zuschreiben (Moore et al., 2013). Ob es sich bei 8-oxoG jedoch tatsächlich um einen stabilen epigenetischen Marker wie 5-meC handelt, ist aufgrund der generell sehr effizienten Erkennung und Reparatur durch OGG1 fraglich. Allerdings könnte die im Rahmen dieser Arbeit bewiesene Sequenzabhängigkeit der Exzision tatsächlich zu einer längeren Verweildauer von 8-oxoG in Guanin-reichen Transkriptionsfaktor-Bindestellen wie Sp-1 oder NfκB führen, da vor allem Guanin in direkter Nachbarschaft zu 8-oxoG dessen Exzision behindert. Im Falle von NfκB, dessen Bindung zu seiner G-reichen Bindesequenz durch 8-oxoG sogar gefördert werden kann (Hailer-Morrison et al., 2003), könnte 8-oxoG als zellulärer Marker für oxidativen Stress dienen. Durch die gesteigerte Bindung des Transkriptionsfaktors könnte 8-oxoG die Expression von NfκB-kontrollierten Genen erhöhen, zu denen unter anderem Gene des antioxidativen Systems gehören (Hoesel & Schmid, 2013), und somit erhöhten Spiegeln oxidativer Schäden im Genom entgegenwirken. Somit ist eine regulatorische Funktion von 8-oxoG nicht vollständig von der Hand zu weisen, aber eine Funktion als epigenetischer Marker ist dennoch eher unwahrscheinlich.

Selbst ohne eine Funktion als epigenetischer Marker kann die Anwesenheit von 8-oxoG innerhalb von CRE weitreichende Folgen haben. Der Transkriptionsfaktor CREB, dessen Bindung zu seiner kanonischen Bindesequenz durch 8-oxoG innerhalb des zentralen CpG-Dinukleotids stark eingeschränkt wird, ist an der Expression von etwa 25 % des eukaryotischen Genoms beteiligt (Impey et al., 2004), (Zhang et al., 2005). Eine Vielzahl seiner Target-Proteine spielen eine wichtige Rolle für die Entwicklung und das Überleben von Neuronen (Lonze & Ginty, 2002), (Sakamoto et al., 2011) und eine CREB Dysregulation wird mit einigen angeborenen Störungen des ZNS wie beispielsweise Chorea Huntington in Verbindung gebracht (Giampa et al., 2006), (Sakamoto et al., 2011). Der massive Einfluss eines einzelnen 8-oxoGs in CRE auf die Bindungsfähigkeit von CREB könnte bedeuten, dass Gene, die unter der Kontrolle von CREB stehen, besonders empfindlich gegenüber oxidativen Schäden sind.

#### 4.3 Auswirkungen weiterer DNA-Basenmodifikationen auf die Genexpression: Vergleich mit 8-oxoG

Auch wenn 8-oxoG die am häufigsten auftretende oxidative DNA-Basenmodifikation darstellt, so ist es mitnichten die einzige. So hat 5-hmU, das primär nur als Intermediat der aktiven DNA-Demethylierung über die Proteine der AID/APOBEC-Familie galt, in jüngster Zeit auch als oxidativer Schaden von Thymin an Bedeutung gewonnen (Mouret et al., 1991). 5-hmU aus dieser Quelle tritt generell im Basenpaar mit Adenin auf. Transfektion von Vektoren mit einem einzelnen 5-hmU in HeLa-Zellen zeigt, dass auch diese oxidative DNA-Basenmodifikation einen inhibierenden Effekt auf die Genexpression ausübt (Abbildung 3-67). Wie auch bei 8-oxoG nimmt die EGFP-Expression der 5-hmU enthaltenden Vektoren kontinuierlich ab und tritt unabhängig von der Position des 5-hmU auf

(Abbildung 3-67, 3-69 und 3-71). Durch Transfektion in HeLa-Zellen mit einem stabilen shRNA-vermittelten Knockdown jeweils einer der Uracil-DNA-Glykosylasen UNG1/2, Smug1 und TDG, konnte des weiteren Smug1 als die diesen Effekt initiiierende DNA-Glykosylase identifiziert werden (Abbildung 3-72). Dies steht in Übereinstimmung mit der Literatur – Smug1 ist bisher die einzige DNA-Glykosylase, die mit der Exzision von 5-hmU aus dem 5-hmU:A-Basenpaar in Verbindung gebracht wird (Boorstein et al., 2001) – im Gegensatz zu 5-hmU gepaart mit Guanin, das zusätzlich durch die DNA-Glykosylasen TDG und MBD4 ausgeschnitten wird (Sjolund et al., 2013). Befand sich 5-hmU innerhalb des CRE des minimalen CRE-UNO-Promotors, zeigt sich eine weitere Gemeinsamkeit mit 8-oxoG: Auch 5-hmU ist in der Lage die Bindung des Transkriptionsfaktors CREB an sein Sequenzelement zu inhibieren und so in geringem Maße die Genexpression direkt zu hemmen (Abbildung 3-73). Aus eben diesem Grund wird auch für 5-hmU eine Funktion als epigenetischer Marker diskutiert (Moore et al., 2013), jedoch erscheint dies – wie auch im Falle von 8-oxoG – eher unwahrscheinlich.

Des Weiteren wurden die Auswirkungen weiterer oxidativer Modifikationen auf die CREB-Bindung und die CRE-regulierte Genexpression untersucht. Bei diesen Modifikationen handelte es sich um die oxidativen Derivate des 5-mC, namentlich 5-hmC, 5-fC und 5-caC. Auch wenn es sich bei diesen Verbindungen um oxidative DNA-Modifikationen handelt, so unterscheiden sie sich in ihrer Entstehung wesentlich von 8-oxoG und 5-hmU(:A). Während letztere durch die Einwirkung reaktiver Sauerstoffspezies als DNA-Schäden entstehen, entstehen 5-hmC, 5-fC und 5-caC ausschließlich durch aktive, TET-Enzym-katalysierte Oxidation von 5-meC (Tahiliani et al., 2009), (Ito et al., 2011) und werden, da für sie bisher noch kein mutagenes Potential nachgewiesen werden konnte, nicht als DNA-Schäden gehandelt (Münzel et al., 2011). Da alle drei Modifikationen Intermediate der aktiven DNA-Demethylierung darstellen und ihre Verteilung im Genom mit der Kontrolle transkriptioneller Aktivität in Verbindung gebracht wird (Wu et al., 2011), (Song et al., 2013), wurde das regulatorische Element des CRE-UNO Promotors als Position der Läsionen innerhalb der Vektor-DNA gewählt. Interessanterweise zeigte die Transfektion dieser Vektoren in HeLa-Zellen, dass 5-hmC die Genexpression über den gesamten untersuchten Zeitraum in einer konstanten Stärke inhibiert, während 5-fC und 5-caC eine kontinuierliche, mit der Zeit zunehmende Inhibition der Genexpression analog zu 8-oxoG und 5-hmU verursachen (Abbildung 3-76, 3-80 und 3-81). Zieht man in Betracht, dass der Effekt im Falle von 8-oxoG und 5-hmU durch die Exzision der modifizierten Base durch die jeweilige spezifische DNA-Glykosylase verursacht wird, lässt sich dieses unterschiedliche Verhalten der drei oxidativen 5-mC-Derivate leicht erklären: In Säugerzellen existiert keine DNA-Glykosylase, die in der Lage ist 5-hmC aus der DNA auszuschneiden. Dahingegen gelten 5-fC und 5-caC als Substrate der DNA-Glykosylase TDG (He et al., 2011), (Maiti et al., 2011). Tatsächlich konnte die Beteiligung an der Generierung der Genstilllegung durch Transfektion der 5-fC bzw. 5-caC

enthaltenden Vektoren in TDG-Knockdown Zellen bewiesen werden (Abbildung 3-82 und 3-83). Der Knockdown von TDG verzögerte das Eintreten der Genstilllegung bei beiden DNA-Modifikationen, jedoch um einiges effizienter im Falle von 5-caC. Die ist jedoch durch die unterschiedliche Exzisionseffizienz von TDG an beiden Substraten zu erklären (Maiti & Drohat, 2011). Obwohl beide Modifikationen sehr schnell aus der DNA entfernt werden, ist die Exzision von 5-fC noch um ein Vielfaches effizienter als die von 5-caC, sodass die in den Zellen enthaltene Restmenge an TDG einen entsprechend höheren Effekt verursacht als im 5-caC enthaltenden Substrat.

Auch weitere Substrate der Basen-Exzisionsreparatur zeigen einem repressiven Effekt analog zu dem eines einzelnen 8-oxoGs: So inhibiert Uracil, das entweder durch fehlerhaften Einbau von dUMP oder die spontane Desaminierung von Cytosin entsteht (Krokan et al., 2002), die Genexpression nach seiner Exzision durch die DNA-Glykosylasen UNG1/2 (Lühnsdorf et al., 2014). Auch Thyminglykol, wie 5-hmU auch ein Oxidationsprodukt von Thymin, zeigt eine analoge Hemmung der Gentranskription. Über eine Beteiligung der spezifischen DNA-Glykosylase NTH1 wurde allerdings nur gemutmaßt (Dissertation Bork Lühnsdorf, 2015). Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse stark auf die Existenz eines allgemeinen Silencing-Mechanismus hin, der von dem nach der Exzision einer Basenmodifikation im Rahmen der BER auftretenden DNA-Einzelstrangbruch ausgeht und zu einer dauerhaften Stilllegung des betroffenen Gens führt. Über die Funktion und die biologische Relevanz eines solchen Mechanismus kann jedoch nur spekuliert werden. Doch wenn man bedenkt, dass die Kollision der Transkriptionsmaschinerie mit den DNA-Reparaturkomplexen, die um den Einzelstrangbruch herum rekrutiert werden, fatale Folgen haben kann, da dadurch weder die Transkription noch die DNA-Reparatur korrekt ablaufen können, erscheint ein solcher Mechanismus physiologisch sinnvoll. Durch die Stilllegung des Gens auf Ebene der Initiation wird sichergestellt, dass während der Reparatur keine weiteren Transkriptionszyklen gestartet werden. Somit werden mögliche Kollisionen verschiedener Proteinkomplexe verhindert. Es sollte jedoch beachtet werden, dass alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit extrachromosomaler DNA durchgeführt wurden, da eine adäquate Methode zum gezielten Einführen einer spezifischen DNA-Basenmodifikation in chromosomale DNA zum jetzigen Zeitpunkt nicht existiert. Sollte eine solche Methode entwickelt werden, wäre es von großem Interesse auch die Auswirkungen einzelner DNA-Basenmodifikationen an spezifischen Positionen in der chromosomalen DNA zu untersuchen – vor allem in Hinblick auf die offene Frage nach einer möglichen biologischen Relevanz der beobachteten Genstilllegung.

Interessanterweise zeigt 5-mC (wie auch 5-hmC) im Laufe der Zeit keine Zunahme des inhibitorischen Effekts auf die Genexpression, was darauf hindeutet, dass wenigstens in dem untersuchten Zeitraum keine aktive DNA-Demethylierung über enzymatische Oxidation stattfindet, da in diesem Fall die



Genstilllegung – wenn auch verzögert – nach Exzision der Demethylierungsintermediate 5-fC und 5-caC einsetzen müsste. Bei 5-mC und 5-hmC handelt es sich um stabile DNA-Basenmodifikationen, was die Annahme, dass es sich bei beiden Modifikationen um epigenetische Marker handelt, unterstützt. Im Gegensatz dazu ist die Bedeutung von 5-fC und 5-caC aufgrund ihrer rapiden Entfernung aus der DNA wahrscheinlich hauptsächlich auf ihre Funktion als Intermediat der DNA-Demethylierung beschränkt. Für alle vier Läsionen konnte im EMSA eine eingeschränkte CREB-Bindung zu dem modifizierten CRE nachgewiesen werden (Abbildung 3-56, 3-77 und 3-79). Abgesehen davon, dass diese Ergebnisse mit 5-mC und 5-hmC zusätzlich bestätigen, dass eine Exzision durch eine spezifische DNA-Glykosylase für das Auftreten einer Genstilllegung erforderlich ist, zeigen diese Daten, dass auch einzelne Hemimethylierungen bzw. Hemihydroxymethylierungen signifikante Auswirkungen auf die Genexpression haben können.

Während die Konsequenzen verschiedener Methylierungsgrade – wobei CpG-Methylierung in diesem Kontext immer die symmetrische, beidstängige Methylierung des CpG-Dinukleotids impliziert – einen Gegenstand intensiver Forschung darstellen, ist nur wenig über die Folgen von Hemimethylierung bekannt. Hemimethylierte CpGs können über mehrere unterschiedliche Mechanismen in der DNA entstehen. Im Rahmen der DNA-Replikation entsteht hemimethylierte DNA, die dann durch die sogenannte „Maintenance“-DNA-Methyltransferase DNMT1 wieder voll methyliert wird (Bestor, 2000). Diese DNA-Methyltransferaseaktivität ist nicht vollkommen fehlerfrei – die Frequenz der ausgelassenen hemimethylierten CpG-Dinukleotide beträgt nur etwa 0,3 % (Pfeiffer et al., 1990), (Goyal et al., 2006). Dennoch führt dies dazu, dass nach jedem Replikationszyklus ein Teil der CpG-Dinukleotide eine Hemimethylierung davontragen (Jones & Liang, 2009). Auch die *de novo*-Methylierung durch die DNA-Methyltransferase DNMT3 kann eine Quelle für hemimethylierte CpG-Dinukleotide darstellen, da der verantwortliche DNMT3a-Komplex nicht in der Lage ist beide DNA-Stränge in demselben Bindungsvorgang zu methylieren (Jia et al., 2007), (Jurkowska et al., 2008). Auf diese Weise entstehen hemimethylierte CpGs – was wiederum auch eine zusätzliche Rolle von DNMT1 im Rahmen der *de novo* DNA-Methylierung suggeriert. Die dritte Quelle von CpG-Hemimethylierung ist die aktive DNA-Demethylierung durch Oxidation von 5-mC und die darauf folgende Entfernung von 5-fC und 5-caC durch die Basen-Exzisions-Reparatur (He et al., 2011), (Maiti et al., 2011). Wird ein 5-mC durch diesen Vorgang aus der DNA entfernt und durch C ersetzt, entsteht automatisch ein hemimethyliertes CpG-Dinukleotid. Auch wenn hemimethylierte CpGs allgemein als ein transienter Zustand betrachtet werden (Couldrey et al., 2015), wurden dennoch signifikante Mengen davon (ungefähr 5 %) im Genom nachgewiesen (Laird et al., 2004), (Burden et al., 2005), (Arand et al., 2012). Dadurch stellt sich die Frage, ob dieser Zustand nicht doch deutliche Auswirkungen, beispielsweise auf die Genexpression, haben kann. Aus den Ergebnissen dieser Arbeit folgt, dass bereits eine einzelne CpG-Hemimethylierung innerhalb des CRE des minimalen Promotors

des Vektors pCRE-UNO einen signifikanten, negativen Effekt auf die Genexpression hat (Abbildung 3-55). Dieser Effekt konnte des Weiteren auf eine Beeinträchtigung der Bindung des Transkriptionsfaktors CREB zurückgeführt werden (Abbildung 3-56), während Histondeacetylierung dabei keine Rolle zu spielen scheint (Abbildung 3-57). Inwieweit sich eine einzelne Hemimethylierung innerhalb eines Promotors auf die Genexpression auswirkt, ist wahrscheinlich nicht nur von der Position des einzelnen 5-mC abhängig, sondern auch von der Stärke des Promotors. So zeigte eine einzelne CpG-Hemimethylierung innerhalb eines CRE des starken CMV-IE-Promotors keine Auswirkungen auf die Reporterexpression (Abbildung 3-51), während sich bei der Verwendung schwächerer Varianten dieses Promotors eine Hemmung der Genexpression zeigte, deren Intensität mit abnehmender Promotorstärke zunahm (Abbildung 3-53). Davon ausgehend lässt sich mutmaßen, dass einzelne Hemimethylierungen je nach Beschaffenheit des Promotors unterschiedliche Auswirkungen haben können. So enthalten etwa 70 % aller humanen Promotoren CpG-reiche Regionen (CpG-Islands, CPI) und werden gemeinhin als CPI-Promotoren bezeichnet (Saxonov et al., 2006). Diese Promotoren kontrollieren konstitutiv exprimierte House-Keeping-Gene und sind unter physiologischen Bedingungen unmethyliert (Larsen et al., 1992), (Zhu et al., 2008). Ihre Hypermethylierung wird mit stabilen, transkriptionell inaktiven Zuständen in Verbindung gebracht (Bartolomei & Tilghman, 1997), (Panning & Jaenisch, 1998), was bereits in einer Vielzahl an Krebserkrankungen beobachtet wurde. Auch wenn in ein paar Fällen von Auswirkungen einer Methylierung eines einzelnen, spezifischen CpG-Dinukleotids berichtet wurden (Zhang et al., 2010), (Bui et al., 2012), (Claus et al., 2012), (Kim et al., 2013), ist es eher unwahrscheinlich, dass ein einzelnes 5-mC in einem Promotor mit überdurchschnittlich hoher CpG-Dichte physiologisch wirklich eine derart signifikante Auswirkung auf die Promotoraktivität und Genexpression haben kann. In Promotoren jedoch, die keine CpG Islands besitzen (Non-CPI-Promotoren) und deren CpG-Dichte daher gering ist, könnte bereits die Hemimethylierung eines einzelnen CPG-Dinukleotids gravierende Auswirkungen auf die Aktivität des Promotors haben. Auch wenn die Auswirkungen von Methylierung in diesen Promotoren weitaus weniger exzessiv erforscht ist als im Falle der CPI-Promotoren, existieren Hinweise darauf, dass auch bei Non-CPI-Promotoren eine inverse Korrelation zwischen DNA-Methylierung und der Genexpression besteht (Han et al., 2011). Der genaue Mechanismus ist allerdings noch nicht aufgeklärt. Sicher ist nur, dass die Repression nicht durch inaktivierende Histonmodifikationen verursacht wird (Zhou et al., 2011), Auswirkungen der Methylierung auf die Transkriptionsfaktorbindung hingegen stellen immer noch einen möglichen Mechanismus dar. Da es sich bei dem im Rahmen dieser Arbeit verwendeten CMV-IE-Promotors und vor allem seinen schwächeren Varianten um Non-CPI-Promotoren handelt und die durch Hemimethylierung einzelner CpG-Dinukleotide hervorgerufene Reduktion der Genexpression hauptsächlich durch Verminderung der CREB-Bindung hervorgerufen wird (Abbildung 3-56), deuten

diese Ergebnisse tatsächlich darauf hin, dass eine einzelne CpG-Hemimethylierung innerhalb regulatorischer Elemente in der Lage ist, die Aktivität von Non-CPI-Promotoren, die hauptsächlich Gewebe-spezifische Gene kontrollieren, signifikant zu beeinflussen.

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte ein einzelnes 5-hmC einen zu 5-mC vergleichbaren, hemmenden Effekt auf die Genexpression (Abbildung 3-75 und 3-76), der ebenfalls auf eine Verminderung der CREB-Bindung zurückführbar war (Abbildung 3-77). Dies deutet daraufhin, dass auch eine einzelne Hemihydroxymethylierung gravierende Auswirkungen auf die Expression von Genen unter Kontrolle von Non-CPI-Promotoren hat. Dies deckt sich mit der Beobachtung von Guo et al. (2011), dass 5-hmC innerhalb des Promotors einen repressiven Effekt auf *in vitro* Transkription ausübt, was wahrscheinlich durch die Hemmung essentieller Transkriptionsfaktoren zu erklären ist. Jedoch sollte davon Abstand genommen werden die Effekte von 5-mC und 5-hmC allgemein gleichzusetzen. Während nämlich das Einführen einer Methylgruppe am C5-Atom des Cytosins die Hydrophilie in der DNA erniedrigen und die Helix so lokal stabilisieren (Ehrlich et al., 1975), führt die Hydroxymethylierung zu einer Erhöhung der Hydrophilie und einer lokalen Destabilisierung der Helix (Wanunu et al., 2011). Auch wenn einige DNA-bindende Proteine – wie im Rahmen dieser Arbeit für den Transkriptionsfaktor CREB gezeigt – nur zwischen unmodifiziertem und modifiziertem Cytosin unterscheiden, sollten 5-mC und 5-hmC aufgrund ihrer chemischen Unterschiede bei einigen DNA-bindenden Proteinen entgegengesetzte Effekte auf die Bindungsfähigkeit ausüben (Spruijt et al., 2013). Ein tatsächliches Beispiel dafür stellt MeCP2 dar, das methylierte DNA, aber nicht hydroxymethylierte DNA bindet (Valinluck et al., 2004). Zusätzlich gibt es Anzeichen dafür, dass 5-hmC, dem allgemein eine Funktion als eigenständiger epigenetischer Marker zugeschrieben wird, eigene, spezifische Bindungsproteine besitzt (Yildirim et al., 2011), obwohl deren Bedeutung bisher unklar ist.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass DNA-Basenmodifikationen wie beispielsweise 8-oxoG und 5-hmU, die Substrate der BER darstellen, nach ihrer Exzision durch eine spezifische DNA-Glykosylase die Gentranskription durch einen intrazellulären Genstilllegungsmechanismus signifikant beeinträchtigen können. Zusätzlich können diese Modifikationen, sofern sie innerhalb regulatorischer Promotor-Elemente positioniert sind, die Genexpression direkt durch Beeinträchtigung der Transkriptionsfaktor-Bindung hemmen, wobei sich diese Art der Inhibition nicht nur auf Substrate der BER begrenzt, sondern auch durch stabile DNA-Basenmodifikationen wie 5-mC und 5-hmC vermittelt wird.

## 5 Literaturverzeichnis

- AHRINGER, J. (2000). NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development. *Trends Genet* 16, 351-356.
- ALBRIGHT, C.D., SALGANIK, R.I., CRACIUNESCU, C.N., MAR, M.H. & ZEISEL, S.H. (2003). Mitochondrial and microsomal derived reactive oxygen species mediate apoptosis induced by transforming growth factor-beta1 in immortalized rat hepatocytes. *J Cell Biochem* 89, 254-261.
- ALLGAYER, J. (2012). Untersuchung des Einflusses der Position einer DNA-Basenmodifikation (8-Oxo-7,8-dihydroguanin) auf die Expression eines Reportergens. *Diplomarbeit, Institut für Pharmazie und Biochemie, Johannes Gutenberg- Universität Mainz, Arbeitskreis Prof. Dr. B. Epe.*
- ALLGAYER, J., KITSER, N., VON DER LIPPEN, C., EPE, B. & KHOBTA, A. (2013). Modulation of base excision repair of 8-oxoguanine by the nucleotide sequence. *Nucleic Acids Res* 41, 8559-8571.
- ALMEIDA, C.D. & SOBOL, R.W. (2007). A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair (Amst)* 6, 695-711.
- AL-TASSAN, N., CHMIEL, N.H., MAYNARD, J., FLEMING, N., LIVINGSTON, A.L., WILLIAMS, G.T., HODGES, A.K., DAVIES, D.R., DAVID, S.S., SAMPSON, J.R. & CHEADLE, J.P. (2002). Inherited variants of MYH associated with somatic G:C --> T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 30, 227-232.
- AMES, B.N., SHIGENAGA, M.K. & HAGEN, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 90, 7915-7922.
- AMOUROUX, R., CAMPALANS, A., EPE, B. & RADICELLA, J.P. (2010). Oxidative stress triggers the preferential assembly of base excision repair complexes on open chromatin regions. *Nucleic Acids Res* 38, 2878-2890.
- ARAND, J., SPIELER, D., KARIUS, T., BRANCO, M.R., MEILINGER, D., MEISSNER, A., JENUWEIN, T., XU, G., LEONHARDT, H., WOLF, V. & WALTER, J. (2012). In vivo control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases. *PLoS Genet* 8, e1002750.
- BANERJEE, A., SANTOS, W.L. & VERDINE, G.L. (2006). Structure of a DNA glycosylase searching for lesions. *Science* 311, 1153-1157.
- BANERJEE, A., YANG, W., KARPLUS, M. & VERDINE, G.L. (2005). Structure of a repair enzyme interrogating undamaged DNA elucidates recognition of damaged DNA. *Nature* 434, 612-618.
- BARRETO, G., SCHÄFER, A., MARHOLD, J., STACH, D., SWAMINATHAN, S.K., HANDA, V., DÖDERLEIN, G., MALTRY, N., WU, W., LYKO, F. & NIEHRS, C. (2007). Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature* 445, 671-675.
- BARTOLOMEI, M.S. & TILGHMAN, S.M. (1997). Genomic imprinting in mammals. *Annu Rev Genet* 31, 493-525.
- BATRA, V.K., BEARD, W.A., HOU, E.W., PEDERSEN, L.C., PRASAD, R. & WILSON, S.H. (2010). Mutagenic conformation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-dGTP in the confines of a DNA polymerase active site. *Nat Struct Mol Biol* 17, 889-890.

- BATRA, V.K., SHOCK, D.D., BEARD, W.A., McKENNA, C.E. & WILSON, S.H. (2012). Binary complex crystal structure of DNA polymerase  $\beta$  reveals multiple conformations of the templating 8-oxoguanine lesion. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 109, 113-118.
- BAUBEC, T. & SCHÜBELER, D. (2014). Genomic patterns and context specific interpretation of DNA methylation. *Curr Opin Genet Dev* 25, 85-92.
- BEAL, M.F. (2002). Oxidatively modified proteins in aging and disease. *Free Radic Biol Med* 32, 797-803.
- BEARD, W.A., BATRA, V.K. & WILSON, S.H. (2010). DNA polymerase structure-based insight on the mutagenic properties of 8-oxoguanine. *Mutat Res* 703, 18-23.
- BESTOR, T.H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9, 2395-2402.
- BHAKAT, K.K., MOKKAPATI, S.K., BOLDOGH, I., HAZRA, T.K. & MITRA, S. (2006). Acetylation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by p300 and its role in 8-oxoguanine repair in vivo. *Mol Cell Biol* 26, 1654-1665.
- BHUTANI, N., BRADY, J.J., DAMIAN, M., SACCO, A., CORBEL, S.Y. & BLAU, H.M. (2010). Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature* 463, 1042-1047.
- BIRD, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6-21.
- BLAINEY, P.C., VAN OIJEN, A.M., BANERJEE, A., VERDINE, G.L. & XIE, X.S. (2006). A base-excision DNA-repair protein finds intrahelical lesion bases by fast sliding in contact with DNA. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 103, 5752-5757.
- BOITEUX, S., GELLON, L. & GUIBOURT, N. (2002). Repair of 8-oxoguanin in *Saccharomyces cerevisiae*: interplay of DNA repair and replication mechanisms. *Free Radic Biol Med* 32, 1244-1253.
- BOORSTEIN, R.J., CUMMINGS, A., MARENSTEIN, D.R., CHAN, M.K., MA, Y., NEUBERT, T.A., BROWN, S.M. & TEEBOR, G.W. (2001). Definitive identification of mammalian 5-hydroxymethyluracil DNA N-glycosylase activity as SMUG1. *J Biol Chem* 276, 41991-41997.
- BRÉGEON, D., PEIGNON, P.A. & SARASIN, A. (2009). Transcriptional mutagenesis induced by 8-oxoguanine in mammalian cells. *PLoS Genet* 5, e1000577.
- BROOKS, A.R., HARKINS, R.N., WANG, P., QIAN, H.S., LIU, P. & RUBANYI, G.M. (2004). Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med* 6, 395-404.
- BRUMMELKAMP, T. R., BERNARDS, R. & AGAMI, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-3.
- BRUNER, S.D., NORMAN, D.P., VERDINE, G.L. (2000). Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature* 403, 859-866.

- BUI, C., BARTER, M.J., SCOTT, J.L., XU, Y., GALLER, M., REYNARD, L.N., ROWAN, A.D. & YOUNG, D.A. (2012). cAMP response element-binding (CREB) recruitment following a specific CpG demethylation leads to the elevated expression of the matrix metalloproteinase 13 in human articular chondrocytes and osteoarthritis. *FASEB J* 26, 3000-3011.
- BURDEN, A.F., MANLEY, N.C., CLARK, A.D., GARTLER, S.M., LAIRD, C.D. & HANSEN, R.S. (2005). Hemimethylation and non-CpG methylation levels in a promoter region of human LINE-1 (L1) repeated elements. *J Biol Chem* 280, 14413-14419.
- CADET, J., DELATOUR, T., DOUKI, T., GASPARUTTO, D., POUGET, J.P., RAVANAT, J.L., SAUVAIGO, S. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res* 424, 9-21.
- CADET, J. & WAGNER, J.R. (2014). Oxidatively generated base damage to cellular DNA by hydroxyl radical and one-electron oxidants: similarities and differences. *Arch Biochem Biophys* 557, 47-54.
- CALDECOTT, K.W. (2002). Polynucleotide kinase: a versatile molecule makes a clean break. *Structure* 10, 1151-1152.
- CALDECOTT, K.W., AOUFOUCHI, S., JOHNSON, P. & SHALL, S. (1996). XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res* 24, 4387-4394.
- CAMPALANS, A., AMOUROUX, R., BRAVARD, A., EPE, B. & RADICELLA, J.P. (2007). UVA irradiation induces relocalisation of the DNA repair protein hOGG1 to nuclear speckles. *J Cell Sci* 120, 23-32.
- CAMPALANS, A., MARSIN, S., NAKABEPPU, Y., O'CONNOR, T.R., BOITEUX, S. & RADICELLA, J.P. (2005). XRCC1 interactions with multiple DNA glycosylases: a model for its recruitment to base excision repair. *DNA Repair (Amst)* 4, 826-835.
- CAMPEAU, E., RUHL, V.E., RODIER, F., SMITH, C.L., RAHMBERG, B.L., FUSS, J.O., CAMPISI, J., YASWEN, P., COOPER, P.K. & KAUFMAN, P.D. (2009). A versatile viral system for expression and depletion of proteins in mammalian cells. *PLoS One* 4, e6529.
- CAPPELLI, E., DEGAN, P. & FROSINA, G. (2000). Comparative repair of endogenous 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoG), uracil and abasic site by mammalian cell extracts: 8-oxoG is poorly repaired by human cell extracts. *Carcinogenesis* 21, 1135-1141.
- CAPPELLI, E., HAZRA, T., HILL, J.W., SLUPPHAUG, G., BOGLIOLO, M. & FROSINA, G. (2001). Rates of base excision repair are not solely dependent on levels of initiating enzymes. *Carcinogenesis* 22, 387-397.
- CHAN, J.J. & KATAN, M. (2013). PLC $\epsilon$  and the RASSF family in tumour suppression and other functions. *Adv Biol Regul* 53, 258-279.
- CHAN, M.K., OCAMPO-HAFALLA, M.T., VARTANIAN, V., JARUGA, P., KIRKALI, G., KOENIG, K.L., BROWN, S., LLOYD, R.S., DIZDAROGLU, M. & TEEBOR, G.W. (2009). Targeted deletion of the genes encoding NTH1 and NEIL1 DNA N-glycosylases reveals the existence of novel carcinogenic oxidative damage to DNA. *DNA Repair (Amst)* 8, 786-94.

- CHARLET-BERGUERAND, N., FEUERHAHN, S., KONG, S.E., ZISERMAN, H., CONAWAY, J.W., CONAWAY, R. & EGLY, J.M. (2006). RNA polymerase II bypass of oxidative DNA damage is regulated by transcription elongation factors. *EMBO J* 25, 5481-5491.
- CHEADLE, J.P. & SAMPSON, J.R. (2007). MUTYH-associated polyposis – from defect in base excision repair to clinical genetic testing. *DNA Repair (Amst)* 6, 274-279.
- CHEN, L., ELAHI, A., POW-SANG, J., LAZARUS, P. & PARK, J. (2003). Association between polymorphism of human oxoguanine glycosylase 1 and risk of prostate cancer. *J Urol* 170, 2471-2474.
- CHO, E.Y., HILDESHEIM, A., CHEN, C.J., HSU, M.M., CHEN, I.H., MITTL, B.F., LEVINE, P.H., LIU, M.Y., CHEN, J.Y., BRINTON, L.A., CHENG, Y.J. & YANG, C.S. (2003). Nosopharyngeal carcinoma and genetic polymorphisms of DNA repair enzymes XRCC1 and hOGG1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12, 1100-1104.
- CLAUS, R., LUCAS, D.M., STILGENBAUER, S., RUPPERT, A.S., YU, L., ZUCKNICK, M., MERTENS, D., BÜHLER, A., OAKES, C.C., LARSON, R.A., KAY, N.E., JELINECK, D.F., KIPPS, T.J., RASSENTI, L.Z., GRIBBEN, J.G., DÖHNER, H., HEEREMA, N.A., MARCUCCI, G., PLASS, C. & BYRD, J.C. (2012). Quantitative DNA methylation analysis identifies a single CpG dinucleotide important for ZAP-70 expression and predictive of prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 30, 2483-2491.
- CONTICELLO, S.G., LANGLOIS, M.A., YANG, Z. & NEUBERGER, M.S. (2007). DNA deamination in immunity: AID in the context of its APOBEC relatives. *Adv Immunol* 94, 37-73.
- COOKE, M., EVANS, M., DIZDAROGLU, M. & LUNEC, J., (2003). Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease. *FASEB J* 17, 1195-1214.
- COOKE, M.S., LUNEC, J. & EVANS, M.D. (2002). Progress in the analysis of urinary oxidative DNA damage. *Free Radic Biol Med* 33, 1601-1614.
- COOKE, M.S., ROZALSKI, R., DOVE, R., GACKOWSKI, D., SIOMEK, A., EVANS, M.D. & OLINSKI, R. (2006). Evidence for attenuated cellular 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine removal in cancer patients. *Biol Chem* 387, 393-400.
- CORTAZAR, D., KUNZ, C., SELFRIDGE, J., LETTIERI, T., SAITO, Y., MACDOUGALL, E., WIRZ, A., SCHUERMANN, D., JACOBS, A.L., SIEGRIST, F., STEINACHER, R., JIRICNY, J., BIRD, A. & SCHAR, P. (2011). Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability. *Nature* 470, 419-23.
- CORTELLINO, S., XU, J., SANNAI, M., MOORE, R., CARETTI, E., CIGLIANO, A., LE COZ, M., DEVARAJAN, K., WESSELS, A., SOPRANO, D., ABRAMOWITZ, L.K., BARTOLOMEI, M. S., RAMBOW, F., BASSI, M.R., BRUNO, T., FANCIULLI, M., RENNER, C., KLEIN-SZANTO, A.J., MATSUMOTO, Y., KOBİ, D., DAVIDSON, I., ALBERTI, C., LARUE, L. & BELLACOSA, A. (2011). Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination base excision repair. *Cell* 146, 67-79.
- COULDREY, C., BRAUNING, R., HENDERSON, H.V. & MCEWAN, J.C. (2015). Genome-wide DNA methylation analysis: no evidence for stable hemimethylation in the sheep muscle genome. *Anim Genet* 46, 185-189.

- CULLEN, J.J., MITROS, F.A. & OBERLEY, L.W. (2003). Expression of antioxidant enzymes in diseases of the human pancreas: another link between chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Pancreas* 26, 23-27.
- DAMSMA, G.E. & CRAMER, P. (2009). Molecular basis of transcriptional mutagenesis at 8-oxoguanine. *J Biol Chem* 284, 31658-31663.
- DAS, A., WIEDERHOLD, L., LEPPARD, J.B., KEDAR, P., PRASAD, R., WANG, H., BOLDOGH, I., KARIMI-BUSHERI, F., WEINFELD, M., TOMKINSON, A.E., WILSON, S.H., MITRA, S. & HAZRA, T.K. (2006). NEIL2-initiated, APE-independent repair of oxidized bases in DNA: evidence for a repair complex in human cells. *DNA Repair (Amst)* 5, 1439-1448.
- DAVID, S.S., O'SHEA, V.L. & KUNDU, S. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 447, 941-950.
- DAVID-CORDONNIER, M.H., BOITEUX, S. & O'NEILL, P. (2001). Efficiency of excision of 8-oxo-guanine within DNA clustered damage by XRS5 nuclear extracts and purified human OGG1 protein. *Biochemistry* 40, 11811-11818.
- DELANEY, S., JAREM, D.A., VOLLE, C.B. & YENNIE, C.J. (2012). Chemical and biological consequences of oxidatively damaged guanine in DNA. *Free Radic Res* 46, 420-441.
- DENSLOW, S.A. & WADE, P.A. (2007). The human Mi-2/NuRD complex and gene regulation. *Oncogene* 26, 5433-5438.
- DEREVYANKO, A.G., ENDUTKIN, A.V., ISHCENKO, A.A., SAPARBAEV, M.K. & ZHARKOV, D.O. (2012). Initiation of 8-oxoguanine base excision repair within trinucleotide tandem repeats. *Biochemistry (Mosc)* 77, 270-279.
- DHERIN, C., RADICELLA, J.P., DIZDAROGLU, M. & BOITEUX, S. (1999). Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human alpha-hOgg1 protein and the polymorphic alpha-hOgg1(Ser326Cys) protein which is frequently found in human populations. *Nucleic Acids Res* 27, 4001-4007.
- DOBBS, T.A., PALMER, P., MANIOU, Z., LOMAX, M.E. & O'NEILL, P. (2008). Interplay of two major repair pathways in the processing of complex double-strand DNA breaks. *DNA Repair (Amst)* 7, 1372-1383.
- DONAHUE, B.A., YIN, S., TAYLOR, J.S., REINES, D. & HANAWALT, P.C. (1994). Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 91, 8502-8506.
- DOU, H., MITRA, S. & HAZRA, T.K. (2003). Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2. *J Biol Chem* 278, 49679-49684.
- DOVEY, O.M., FOSTER, C.T. & COWLEY, S.M. (2010). Histone deacetylase 1 (HDAC1), but not HDAC2, controls embryonic stem cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 107, 8242-8247.
- EFTEDAL, I., GUDDAL, P.H., SLUPPHAUG, G., VOLDEN, G. & KROKAN, H.E. (1993). Consensus sequence for good and poor removal of uracil from double stranded DNA by uracil-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res* 21, 2095-2101.



- EHRlich, M., EHRlich, K. & MAYO, J.A. (1975). Unusual properties of the DNA from Xanthomonas phage XP-12 in which 5-methylcytosine completely replaces cytosine. *Biochim Biophys Acta* 395, 109-119.
- EPE, B. (2002). Role of endogeneous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice? *Biol Chem* 383, 467-475.
- FEARNHEAD, N.S., BRITTON, M.P. & BODMER, W.F. (2001). The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 10, 721-733.
- FORTINI, P., PASCUCCHI, B., PARLANTI, E., SOBOL, R.W., WILSON, S.H. & DOGLIOTTI, E. (1998). Different DNA polymerases are involved in the short- and long-patch base excision repair in mammalian cells. *Biochemistry* 37, 3575-3580.
- FORTINI, P., PARLANTI, E., SIDORKINA, O.M., LAVAL, J. & DOGLIOTTI, E. (1999). The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells. *J Biol Chem* 274, 15230-15236.
- FORTINI, P., PASCUCCHI, B., PARLANTI, E., D'ERRICO, M., SIMONELLI, V. & DOGLIOTTI, E. (2003) 8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways. *Mutat Res* 531, 127-139.
- FORTINI, P. & DOGLIOTTI, E. (2007). Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst.)* 6, 398-409.
- FRIEDBERG, E.C. & MEIRA, L.B. (2006). Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting biological responses to DNA damage Version 7. *DNA Repair (Amst.)* 5, 189-209.
- FROMME, J.C., BANERJEE, A. & VERDINE, G.L. (2004). DNA glycosylase recognition and catalysis. *Curr Opin Struct Biol* 14, 43-49.
- FROMME, J.C., BRUNER, S.D., YANG, W., KARPLUS, M. & VERDINE, G.L. (2003). Product-assisted catalysis in base-excision DNA repair. *Nat Struct Biol* 10, 204-211.
- FROMME, J.C. & VERDINE, G.L. (2003). DNA lesion recognition by the bacterial repair enzyme MutM. *J Biol Chem* 278, 51543-51548.
- FROSINA, G., FORTINI, P., ROSSI, O., CARROZZINO, F., RASPAGLIO, G., COX, L.S., LANE, D.P., ABBONDANDOLO, A. & DOGLIOTTI, E. (1996). Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 271, 9573-9578.
- FUJIKAWA, K., KAMIYA, H., YAKUSHIJI, H., FUJII, Y., NAKABEPPU, Y., & KASAI, H. (1999). The oxidized forms of dATP are substrates for the human MutT homologue, the hMTH1 protein. *J Biol Chem* 274, 18201-18205.
- GARY, R., KIM, K., CORNELIUS, H.L., PARK, M.S. & MATSUMOTO, Y. (1999). Proliferating cell nuclear antigen facilitates excision in long-patch base excision repair. *J Biol Chem* 274, 4354-4363.
- GHOSH, R. & MITCHELL, D.L. (1999). Effect of oxidative DNA damage in promoter elements on transcription factor binding. *Nucleic Acids Res* 27, 3213-3218.

- GIAMPÀ, C., DEMARCH, Z., D'ANGELO, V., MORELLO, M., MARTORANA, A., SANCESARIO, G., BERNARDI, G. & FUSCO, F.R. (2006). Striatal modulation of cAMP-response-element-binding protein (CREB) after excitotoxic lesions: implications with neuronal vulnerability in Huntington's disease. *Eur J Neurosci* 23, 11-20.
- GIRARD, P.M., D'HAM, C., CADET, J. & BOITEUX, S. (1998) Opposite base-dependent excision of 7,8-dihydro-8-oxoadenine by the Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Carcinogenesis* 7, 1299-1305.
- GLOZAK, M.A., SENGUPTA, N., ZHANG, X. & SETO, E. (2005). Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363, 15-23.
- GOODE, E.L., ULRICH, C.M. & POTTER, J.D. (2002). Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11, 1513-1530.
- GOLL, M.G. & BESTOR, T.H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74, 481-514.
- GOYAL, R., REINHARDT, R. & JELTSCH, A. (2006). Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 34, 1182-1188.
- GRASSI, G., MACCARONI, P., MEYER, R., KAISER, H., D'AMBROSIO, E., PASCALE, E., GRASSI, M., KUHN, A., DI NARDO, P., KANDOLF, R. & KÜPPER, J.H. (2003). Inhibitors of DNA methylation and histone deacetylation activate cytomegalovirus promoter-controlled reporter gene expression in human glioblastoma cell line U87. *Carcinogenesis* 24, 1625-1635.
- GREENMAN, C., STEPHENS, P., SMITH, R., DALGLIESH, G.L., HUNTER, C., BIGNELL, G., DAVIES, H., TEAGUE, J., BUTLER, A., STEVENS, C., EDKINS, S., O'MEARA, S., VASTRIK, I., SCHMIDT, E.E., AVIS, T., BARTHORPE, S., BHAMRA, G., BUCK, G., CHOUDHURY, B., CLEMENTS, J., COLE, J., DICKS, E., FORBES, S., GRAY, K., HALLIDAY, K., HARRISON, R., HILLS, K., HINTON, J., JENKINSON, A., JONES, D., MENZIES, A., MIRONENKO, T., PERRY, J., RAINE, K., RICHARDSON, D., SHEPHERD, R., SMALL, A., TOFTS, C., VARIAN, J., WEBB, T., WEST, S., WIDAA, S., YATES, A., CAHILL, D.P., LOUIS, D.N., GOLDSTRAW, P., NICHOLSON, A.G., BRASSEUR, F., LOOIJENGA, L., WEBER, B.L., CHIEW, Y.E., DEFAZIO, A., GREAVES, M.F., GREEN, A.R., CAMPBELL, P., BIRNEY, E., EASTON, D.F., CHENEVIXTRENCH, G., TAN, M.H., KHOO, S.K., TEH, B.T., YUEN, S.T., LEUNG, S.Y., WOOSTER, R., FUTREAL, P.A. & STRATTON, M.R. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446, 153-158.
- GROZINGER, C.M. & SCHREIBER, S.L. (2002). Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem Biol* 9, 3-16.
- GU, H., MARTH, J.D., ORBAN, P.C., MOSSMANN, H. & RAJEWSKY, K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265, 103-106.
- GUAN, J.S., HAGGARTY, S.J., GIACOMETTI, E., DANNENBERG, J.H., JOSEPH, N., GAO, J., NIELAND, T.J., ZHOU, Y., WANG, X., MAZITSCHKE, R., BRADNER, J.E., DEPINHO, R.A., JAENISCH, R. & TSAI, L.H. (2009). HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature* 459, 55-60.
- GUAN, L. & GREENBERG, M.M. (2010). Irreversible inhibition of DNA polymerase beta by an oxidized abasic lesion. *J Am Chem Soc* 132, 5004-5005.

- GUO, J.U., SU, Y., ZHONG, C., MING, G.L. & SONG, H. (2011). Hydroxylation of 5-methylcytosine by TET1 promotes active DNA demethylation in the adult brain. *Cell* 145, 423-434.
- HABERLAND, M., MONTGOMERY, R.L. & OLSON, E.N. (2009). The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* 10, 32-42.
- HAILER-MORRISON, M.K., KOTLER, J.M., MARTIN, B.D. & SUGDEN, K.D. (2003). Oxidized guanine lesions as modulators of gene transcription. Altered p50 binding affinity and repair shielding by 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine lesions in the NF-kappaB promoter element. *Biochemistry* 42, 9761-9770.
- HALLIWELL, B. (2001). Free radicals and other reactive species in Disease. *Encyclopedia of life Science*, 1-7.
- HAN, H., CORTEZ, C.C., YANG, X., NICHOLS, P.W., JONES, P.A. & LIANG, G. (2011). DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter. *Hum Mol Genet* 20, 4299-4310.
- HANSEN, R., SAEBØ, M., SKJELBRED, C.F., NEXØ, B.A., HAGEN, P.C., BOCK, G., BOWITZ LOTHE I.M., JOHNSON, E., AASE, S., HANSTEEN, I.L., VOGEL, U. & KURE, E.H. (2005). GPX Pro198Leu and OGG1 Ser326Cys polymorphisms and risk of development of colorectal adenomas and colorectal cancer. *Cancer Lett* 229, 85-91.
- HARRIGAN, J.A., WILSON, D.M., PRASAD, R., OPRESKO, P.L., BECK, G., MAY, A., WILSON, S.H. & BOHR, V.A. (2006). The Werner syndrome protein operates in base excision repair and cooperates with DNA polymerase beta. *Nucleic Acids Res* 34, 745-754.
- HASHIGUCHI, K., STUART, J.A., DE SOUZA-PINTO, N.C. & BOHR, V.A. (2004). The C-terminal alphaO helix of human Ogg1 is essential for 8-oxoguanine DNA glycosylase activity: the mitochondrial beta-Ogg1 lacks this domain and does not have glycosylase activity. *Nucleic Acids Res* 32, 5596-5608.
- HASHIMOTO, H., HONG, S., BHAGWAT, A.S., ZHANG, X. & CHENG, X. (2012). Excision of 5-hydroxymethyluracil and 5-carboxylcytosine by the thymine DNA glycosylase domain: its structural basis and implications for active DNA demethylation. *Nucleic Acids Res* 40, 10203-10214.
- HAYAKAWA, H., HOFER, A., THELANDER, L., KITAJIMA, S., CAI, Y., OSHIRO, S., YAKUSHIJI, H., NAKABEPPU, Y., KUWANO, M. & SEKIGUCHI, M. (1999). Metabolic fate of oxidized guanine ribonucleotides in mammalian cells. *Biochemistry* 38, 3610-3614.
- HAZRA, T.K., IZUMI, T., BOLDOGH, I., IMHOFF, B., KOW, Y.W., JARUGA, P., DIZDAROGLU, M. & MITRA, S. (2002). Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 99, 3523-3528.
- HAZRA, T.K., KOW, Y.W., HATAHET, Z., IMHOFF, B., BOLDOGH, I., MOKKAPATI, S.K., MITRA, S. & IZUMI, T. (2002). Identification and characterization of a novel human DNA glycosylase for repair of cytosine-derived lesions. *J Biol Chem* 277, 30417-30420.
- HE, Y.F., LI, B.Z., LI, Z., LIU, P., WANG, Y., TANG, Q., DING, J., JIA, Y., CHEN, Z., LI, L., SUN, Y., LI, X., DAI, Q., SONG, C.X., ZHANG, K., HE, C. & XU, G.L. (2011). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 333, 1303-7.

- HEGDE, M.L., HAZRA, T.K. & MITRA, S. (2008). Early steps in the DNA base excision/singlestrand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res* 18, 27-47.
- HEGDE, M.L., IZUMI, T. & MITRA, S. (2012). Oxidized base damage and single-strand break repair in mammalian genomes: role of disordered regions and posttranslational modifications in early enzymes. *Prog Mol Biol Transl Sci* 110, 123-153.
- HILL, J.W. & EVANS, M.K. (2006). Dimerization and opposite base-dependent catalytic impairment of polymorphic S326C OGG1 glycosylase. *Nucleic Acids Res* 34, 1620-1632.
- HILL, J.W., HAZRA, T.K., IZUMI, T. & MITRA, S. (2001). Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial step in base excision repair. *Nucleic Acids Res* 29, 430-438.
- HIRANO, T., HIRANO, H., YAMAGUCHI, R., ASAMI, S., TSURUDOME, Y. & KASAI, H. (2001). Sequence specificity of the 8-hydroxyguanine repair activity in rat organs. *J Radiat Res* 42, 247-254.
- HITOMI, K., IWAI, S. & TAINER, J.A. (2007). The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: implications for DNA damage recognition, removal, and repair. *DNA Repair (Amst)* 6, 410-428.
- HOESEL, B. & SCHMID, J.A. (2013). The complexity of NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Mol Cancer* 12, 86.
- HORI, M., SATOU, K., HARASHIMA, H. & KAMIYA, H. (2010). Suppression of mutagenesis by 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate (7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate) by human MTH1, MTH2 and NUDT5. *Free Radic Biol Med* 48, 1197-1201.
- HSU, G.W., OBER, M., CARELL, T. & BEESE, L.S. (2004). Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase. *Nature* 431, 217-212.
- HU, J.J., SMITH, T.R., MILLER, M.S., MOHRENWEISER, H.W., GOLDEN, A. & CASE, L.D. (2001). Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis* 22, 917-922.
- HUFFMAN, J.L., SUNDHEIM, O. & TAINER, J.A. (2005). DNA base damage recognition and removal: new twists and grooves. *Mutat Res* 577, 55-76.
- HUNG, R.J., HALL, J., BRENNAN, P. & BOFFETTA, P. (2005). Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol* 162, 925-942.
- IGUCHI-ARIGA, S.M. & SCHAFFNER, W. (1989). CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev* 3, 612-619.
- IMPEY, S., MCCORCLE, S.R., CHA-MOLSTAD, H., DWYER, J.M., YOCHUM, G.S., BOSS, J.M., MCWEENEY, S., DUNN, J.J., MANDEL, G. & GOODMAN, R.H. (2004). Defining the CREB regulon: a genome wide analysis of transcription factor regulatory regions. *Cell* 119, 1041-1054.

- ISHII, K., HEN, L.X., WANG, D.H., FUNAMORI, Y., OGAWA, K. & TAKETA, K. (1996). Prevention of mammary tumorigenesis in acatalasemic mice by vitamin E supplementation. *Jpn J Cancer Res* 87, 680-684.
- ITO, S., SHEN, L., DAI, Q., WU, S.C., COLLINS, L.B., SWENBERG, J.A., HE, C. & ZHANG, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxycytosine. *Science* 333, 1300-1303.
- IZUMI, T., WIEDERHOLD, L.R., ROY, G., ROY, R., JAISWAL, A., BHAKAT, K.K., MITRA, S. & HAZRA, T.K. (2003). Mammalian DNA base excision repair proteins: their interactions and role in repair of oxidative DNA damage. *Toxicology* 193, 43-65.
- JACOBS, A. L. & SCHAR, P. (2012). DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma* 121, 1-20.
- JAREM, D.A., WILSON, N.R. & DELANEY, S. (2009). Structure-dependent DNA damage and repair in a trinucleotide repeat sequence. *Biochemistry* 48, 6655-6663.
- JIA, D., JURKOWSKA, R.Z., ZHANG, X., JELTSCH, A. & CHENG, X. (2007). Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature* 449, 248-251.
- JONES, P.A. & LIANG, G. (2009). Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet* 10, 805-811.
- JÜNGST, C., CHENG, B., GEHRKE, R., SCHMITZ, V., NISCHALKE, H.D., RAMAKERS, J., SCHRAMMEL, P., SCHIRMACHER, P., SAUERBRUCH, T. & CASELMANN, W.H. (2004). Oxidative damage is increased in human liver tissue adjacent to hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 39, 1663-1672.
- JURKOWSKA, R.Z., ANSPACH, N., URBANKE, C., JIA, D., REINHARDT, R., NELLEN, W., CHENG, X. & JELTSCH, A. (2008). Formation of nucleoprotein filaments by mammalian DNA methyltransferase Dnmt3a in complex with regulator Dnmt3L. *Nucleic Acids Res* 36, 6656-6663.
- KANG, D., NISHIDA, J., IYAMA, A., NAKABEPPU, Y., FURUICHI, M., FUJIWARA, T., SEKIGUCHI, M. & TAKESHIGE, K. (1995). Intracellular localization of 8-oxo-dGTPase in human cells, with special reference to the role of the enzyme in mitochondria. *J Biol Chem* 270, 14659-14665.
- KARAGIANNI, P. & WONG, J. (2007). HDAC3: taking the SMRT-N-CoRrect road to repression. *Oncogene* 26, 5439-5449.
- KARAHALIL, B., ENGIN, A.B. & COSKUN, E. (2014). Could 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 Ser326Cys polymorphism be a biomarker of susceptibility in cancer?. *Toxicol Ind Health* 30, 814-825.
- KARIHTALA, P. & SOINI, Y. (2007). Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. *APMIS* 115, 81-103.
- KASAI, H., CRAIN, P.F., KUCHINO, Y., NISHIMURA, S., OOTSUYAMA, A., TANOOKA, H. (1986). Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair. *Carcinogenesis* 7, 1849-1851.

- KATHE, S.D., SHEN, G. & WALLACE S.S. (2004). Single-strand breaks but not oxidative DNA base damages block transcriptional elongation by RNA polymerase II in HeLa cell nuclear extracts. *J Biol Chem* 279, 18511-18520.
- KHOBTA, A., ANDERHUB, S., KITSER, N. & EPE, B. (2010). Gene silencing induced by oxidative DNA base damage: association with local decrease of histone H4 acetylation in promoter region. *Nucleic Acids Res* 38, 4285-4295.
- KHOBTA, A. & EPE, B. (2012). Interactions between DNA damage, repair and transcription. *Mutat Res* 736, 5-14.
- KIM, I.S. (1998). Down-regulation of human FEN-1 gene expression during differentiation of promyelocytic leukemia cells. *Exp Mol Med* 30, 252-256.
- KIM, K.I., PARK, Y.S. & IM, G.I. (2013). Changes in the epigenetic status of the SOX-9 promoter in human osteoarthritic cartilage. *J Bone Miner Res* 28, 1050-1060.
- KIRPOTA, O.O., ENDUTKIN, A.V., PONOMARENKO, M.P., PONOMARENKO, P.M., ZHARKOV, D.O. & NEVINSKY, G.A. (2011). Thermodynamic and kinetic basis for recognition and repair of 8-oxoguanine in DNA by human 8-oxoguanine-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res* 39, 4836-4850.
- KITSER, N., KHOBTA, A. & EPE, B. (2007). Destabilized green fluorescent protein detects rapid removal of transcription blocks after genotoxic exposure. *Biotechniques* 43, 222-227.
- KITSER, N., STATHIS, D., LÜHNSDORF, B., MULLER, H., CARELL, T., EPE, B. & KHOBTA, A. (2011). 8-Oxo-7,8-dihydroguanine in DNA does not constitute a barrier to transcription, but is converted into transcription-blocking damage by OGG1. *Nucleic Acids Res* 39, 5926-34.
- KIYOHARA, C., TAKAYAMA, K. & NAKANISHI, Y. (2010). Lung Cancer Risk and Genetic Polymorphisms in DNA Repair Pathways: A Meta-Analysis. *J Nucleic Acids*, 2010:701760.
- KLUNGLAND, A. & LINDAHL, T. (1997). Second pathway for completion of human DNA base excision repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J* 16, 3341-3348.
- KLUNGLAND, A., ROSEWELL, I., HOLLENBACH, S., LARSEN, E., DALY, G., EPE, B., SEEBERG, E., LINDAHL, T. & BARNES, D.E. (1999). Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96, 13300-13305.
- KOHNO, T., SHINMURA, K., TOSAKA, M., TANI, M., KIM, S., SUGIMURA, H., NOHMI, T., KASAI, H. & YOKOTA, J. (1998). Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA. *Oncogene* 16, 3219-3225.
- KROKAN, H.E. & BJØRÅS, M. (2013). Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a012583.
- KROKAN, H.E., DRABLOS, F. & SLUPPHAUG, G. (2002). Uracil in DNA – occurrence, consequences and repair. *Oncogene* 21, 8935-8948.
- KUBOTA, Y., NASH, R.A., KLUNGLAND, A., SCHÄR, P., BARNES, D.E. & LINDAHL, T. (1996). Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *EMBO J* 15, 6662-6670.

- KUMAR, R., DIMENNA, L., SCHRODE, N., LIU, T.C., FRANCK, P., MUÑOZ-DESCALZO, S., HADJANTONAKIS, A.K., ZARRIN, A.A., CHAUDHURI, J., ELEMENTO, O. & EVANS, T. (2013). AID stabilizes stem-cell phenotype by removing epigenetic memory of pluripotency genes. *Nature* 500, 89-92.
- KURAOKA, I., ENDOU, M., YAMAGUCHI, Y., WADA, T., HANDA, H. & TANAKA, K. (2003). Effects of endogenous DNA base lesions on transcription elongation by mammalian RNA polymerase II. Implications for transcription-coupled DNA repair and transcriptional mutagenesis. *J Biol Chem* 278, 7294-7299.
- KURAOKA, I., SUZUKI, K., ITO, S., HAYASHIDA, M., KWEI, J.S., IKEGAMI, T., HANDA, H., NAKABEPPU, Y. & TANAKA, K. (2007). RNA polymerase II bypasses 8-oxoguanine in the presence of transcription elongation factor TFIIS. *DNA Repair (Amst)* 6, 841-851.
- KUZNETSOV, N.A., KOVAL, V.V. & FEDOROVA, O.S. (2011). Mechanism of recognition and repair of damaged DNA by human 8-oxoguanine DNA glycosylase hOGG1. *Biochemistry (Mosc)* 76, 118-130.
- KWOK, R.P., LUNDBLAD, J.R., CHRIVIA, J.C., RICHARDS, J.P., BÄCHINGER, H.P., BRENNAN, R.G., ROBERTS, S.G., GREEN, M.R. & GOODMAN, R.H. (1994). Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature* 370, 223-226.
- LAGGER, G., O'CARROLL, D., REMBOLD, M., KHIER, H., TISCHLER, J., WEITZER, G., SCHUETTENGRUBER, B., HAUSER, C., BRUNMEIR, R., JENUWEIN, T. & SEISER, C. (2002). Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression. *EMBO J* 21, 2672-2681.
- LAIRD, C.D., PLEASANT, N.D., CLARK, A.D., SNEEDEN, J.L., HASSAN, K.M., MANLEY, N.C., VARY, J.C. Jr., MORGAN, T., HANSEN, R.S. & STÖGER, R. (2004). Hairpin-bisulfite PCR: assessing epigenetic methylation patterns on complementary strands of individual DNA molecules. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 101, 204-209.
- LARSEN, E., KWON, K., COIN, F., EGLY, J. & KLUNGLAND, A. (2004). Transcription activities at 8-oxoG lesions in DNA. *DNA Repair* 3, 1457-1468.
- LARSEN, F., GUNDERSEN, G., LOPEZ, R. & PRYDZ, H. (1992). CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* 13, 1095-1107.
- LEPPARD, J.B., DONG, Z., MACKEY, Z.B. & TOMKINSON, A.E. (2003). Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol* 23, 5919-5927.
- LI, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3, 662-673.
- LI, Y., HUANG, T.T., CARLSON, E.J., MELOV, S., URSELL, P.C., OLSON, J.L., NOBLE, L.J., YOSHIMURA, M.P., BERGER, C., CHAN, P.H., WALLACE, D.C. & EPSTEIN, C.J. (1995). Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet* 11, 376-381.
- LINDAHL, T. (1974). An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 71, 3649-3653.

- LINDAHL, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709-715.
- LONZE, B.E. & GINTY, D.D. (2002). Function and Regulation of CREB Family Transcription Factors in the Nervous System. *Neuron* 35, 605-623.
- LU, A.L., LI, X., GU, Y., WRIGHT, P.M., CHANG, D.Y. (2001). Repair of Oxidative DNA Damage: Mechanisms and Functions. *Cell Biochem Biophys* 35, 141-170.
- LÜ, J., SHI, L., WU, Z., LIAO, Y., ZHOU, C., LI, Y., BIN, X., ZENG, B. & CHEN, J. (2003). [Study of 8-OH-dG and its correlation with several cancer related gene in lung cancer tissues]. *Wei Sheng Yan Jiu* 32, 304-307.
- LÜHNSDORF, B. (2015). Einfluss von Uracil in der DNA auf die Genexpression: die Rolle der Basen-Exzisions-Reparatur. *Dissertation, Institut für Pharmazie und Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Arbeitskreis Prof. Dr. B. Epe.*
- LÜHNSDORF, B., EPE, B. & KHOBT, A. (2014). Excision of uracil from transcribed DNA negatively affects gene expression. *J Biol Chem* 289, 22008-22018.
- LÜHNSDORF, B., KITSER, N., WARKEN, D., LINGG, T., EPE, B. & KHOBT, A. (2012). Generation of reporter plasmids containing defined base modifications in the DNA strand of choice. *Anal Biochem* 425, 47-53.
- MAGA, G., VILLANI, G., CRESPIAN, E., WIMMER, U., FERRARI, E., BERTOCCHI, B. & HÜBSCHER, U. (2007). 8-oxo-guanine bypass by human DNA polymerases in the presence of auxiliary proteins. *Nature* 447, 606-608.
- MAITI, A. & DROHAT, A.C. (2011). Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *J Biol Chem* 286, 35334-35338.
- MAKI, H. & SEKIGUCHI, M. (1992). MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature* 355, 273-275.
- MALTSEVA, D.V., BAYKOV, A.A., JELTSCH, A. & GROMOVA, E.S. (2009). Impact of 7,8-dihydro-8-oxoguanine on methylation of the CpG site by Dnmt3a. *Biochemistry* 48, 1361-1368.
- MARSIN, S., VIDAL, A.E., SOSSOU, M., MÉNISSIER-DE MURCIA, J., LE PAGE, F., BOITEUX, S., DE MURCIA, G. & RADICELLA, J.P. (2003). Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1. *J Biol Chem* 278, 44068-44074.
- MASSON, M., NIEDERANG, C., SCHREIBER, V., MULLER, S., MÉNISSIER-DE MURCIA, J. & DE MURCIA, G. (1998). XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol* 18, 3563-3571.
- MATSUMOTO, Y., KIM, K., HURWITZ, J., GARY, R., LEVIN, D.S., TOMKINSON, A.E. & PARK, M.S. (1999). Reconstitution of proliferating cell nuclear-antigen-dependent repair of apurinic/aprimidinic sites with purified human proteins. *J Biol Chem* 274, 33703-33708.



- MAYNARD, S., SCHURMAN, S.H., HARBOE, C., DE SOUZA-PINTO, N.C. & BOHR, V.A. (2009). Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis* 30, 2-10.
- MCAULEY-HECHT, K.E., LEONARD, G.A., GIBSON, N.J., THOMSON, J.B., WATSON, W.P., HUNTER, W.N., BROWN, T. (1994). Crystal structure of a DNA duplex containing 8-hydroxydeoxyguanineadenine base pairs. *Biochemistry* 33, 10266-10270.
- MEI KWEI, J.S., KURAOKA, I., HORIBATA, K., UBUKATA, M., KOBATAKE, E., IWAI, S., HANDA, H. & TANAKA, K. (2004). Blockage of RNA polymerase II at a cyclobutane pyrimidine dimer and 6-4 photoprodukt. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 1133-1138.
- MENONI, H., SHUKLA, M.S., GERSON, V., DIMITROV, S. & ANGELOV, D. (2012). Base excision repair of 8-oxoG in dinucleotides. *Nucleic Acids Res* 40, 692-700.
- MICHAELS, M.L. & MILLER, J.H. (1992). The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxo-guanine). *J. Bacteriol* 174, 6321-6325.
- MIRANDA, T.B. & JONES, P.A. (2007). DNA methylation: the nuts and bolts of repression. *J Cell Physiol* 213, 384-390.
- MOLDOVAN, G.L., PFANDER, B. & JENTSCH, S. (2007). PCNA, the Maestro of the Replication Fork. *Cell* 129, 665-679.
- MONTGOMERY, R.L., DAVIS, C.A., POTTHOFF, M.J., HABERLAND, M., FIELITZ, J., QI, X., HILL, J.A., RICHARDSON, J.A. & OLSON, E.N. (2007). Histone deacetylases 1 and 2 redundantly regulate cardiac morphogenesis, growth, and contractility. *Genes Dev* 21, 1790-1802.
- MOORE, S.P., KRUCHTEN, J., TOOMIRE, K.J. & STRAUSS, P.R. (2016). Transcription Factors and DNA Repair Enzymes compete for Damaged Promoter Sites. *J Biol Chem* 291, 5452-5460.
- MOORE, S.P., TOOMIRE, K.J. & STRAUSS, P.R. (2013). DNA modifications repaired by base excision repair are epigenetic. *DNA Repair* 12, 1152-1158.
- MORLAND, I., ROLSETH, V., LUNA, L., ROGNES, T., BJØRÅS, M. & SEEBERG, E. (2002). Human DNA glycosylases of the bacterial Fpg/MutM superfamily: an alternative pathway for the repair of 8-oxoguanine and other oxidation products in DNA. *Nucleic Acids Res* 30, 4926-4936.
- MOURET, J.F., POLVERELLI, M., SARRAZINI, F. & CADET, J. (1991). Ionic and radical oxidation of DNA by hydrogen peroxide. *Chem Biol Interact* 77, 187-201.
- MÜNDEL, M., LISCHKE, U., STATHIS, D., PFAFFENEDER, T., GNERLICH, F.A., DEIML, C.A., KOCK, S.C., KARAGHIOSOFF, K. & CARELL, T. (2011). Improved synthesis and mutagenicity of oligonucleotides containing 5-hydroxymethylcytosine, 5-formylcytosine and 5-carboxycytosine. *Chemistry* 17, 13782-13788.
- MURAMATSU, M., KINOSHITA, K., FAGARASAN, S., YAMADA, S., SHINKAI, Y. & HONJO, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553-563.

- NABEL, C.S., MANNING, S.A. & KOHLI, R.M. (2012). The curious chemical biology of cytosine: deamination, methylation, and oxidation as modulators of genomic potential. *ACS Chem Biol* 7, 20-30.
- NASH, H.M., BRUNER, S.D., SCHARER, O.D., KAWATE, T., ADDONA, T.A., SPOONER, E., LANE, W.S & VERDINE, G.L. (1996). Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Curr Biol* 6, 968-980.
- NEELEY, W.L. & ESSIGMANN, J.M. (2006). Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chem Res Toxicol* 19, 491-505.
- NILSEN, H., YAZDANKHAH, S.P., EFTEDAL, I. & KROKAN, H.E. (1995). Sequence specificity for removal of uracil from U.A pairs and U.G mismatches by uracil-DNA glycosylase from *Escherichia coli*, and correlation with mutational hotspots. *FEBS Lett* 362, 205-209.
- NOHMI, T., KIM, S.R. & YAMADA, M. (2005). Modulation of oxidative mutagenesis and carcinogenesis by polymorphic forms of human DNA repair enzymes. *Mutat Res* 591, 60-73.
- NOREN HOOTEN, N., KOMPANIEZ, K., BARNES, J., LOHANI, A. & EVANS, M.K. (2011). Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) binds to 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1). *J Biol Chem* 286, 44679-44690.
- OHNO, M., MIURA, T., FURUICHI, M., TOMINAGA, Y., TSUCHIMOTO, D., SAKUMI, K. & NAKABEPPU, Y. (2006). A genome-wide distribution of 8-oxoguanine correlates with the preferred regions for recombination and single nucleotide polymorphism in the human genome. *Genome Res* 16, 567-575.
- OSTEROD, M., HOLLENBACH, S., HENGSTLER, J.G., BARNES, D.E., LINDAHL, T. & EPE, B. (2001). Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1) deficient mice. *Carcinogenesis* 22, 1459-1463.
- PANNING, B. & JAENISCH, R. (1998). RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation. *Cell* 93, 305-308.
- PARIKH, S.S., PUTNAM, C.D. & TAINER, J.A. (2000). Lessons learned from structural results on uracil-DNA glycosylase. *Mutat Res* 460, 183-199.
- PARLANTI, E., FORTINI, P., MACPHERSON, P., LAVAL, J. & DOGLIOTTI, E. (2002). Base excision repair of adenine/8-oxoguanine mispairs by an aphidicolin-sensitive DNA polymerase in human cell extracts. *Oncogene* 21, 5204-5212.
- PARSONS, J.L., ZHARKOV, D.O. & DIANOV, G.L. (2005). NEIL1 excises 3' end proximal oxidative DNA lesions resistant to cleavage by NTH1 and OGG1. *Nucleic Acids Res* 33, 4849-4856.
- PASCUCCI, B., MAGA, G., HÜBSCHER, U., BJØRÅS, M., SEEBERG, E., HICKSON, I.D., VILLANI, G., GIORDANO, C., CELLAI, L. & DOGLIOTTI, E. (2002). Reconstitution of the base excision repair pathway for 7,8-dihydro-8-oxoguanine with purified human proteins. *Nucleic Acids Res* 30, 2124-2130.
- PASCUCCI, B., STUCKI, M., JÓNSSON, Z.O., DOGLIOTTI, E. & HÜBSCHER, U. (1999). Long patch base excision repair with purified human proteins. DNA ligase I as patch size mediator for DNA polymerases delta and epsilon. *J Biol Chem* 274, 33696-33702.

PFÄFFENEDER, T., SPADA, F., WAGNER, M., BRANDMAYR, C., LAUBE, S., EISEN, D., TRUSS, M., STEINBACHER, J., HACKNER, B., KOTLIAROVA, O., SCHUERMANN, D., MICHALAKIS, S., KOSMATCHEV, O., SCHIESSER, S., STEIGENBERGER, B., RADDAOUI, N., KASHIWAZAKI, G., MÜLLER, U., SPRUIJT, C.G., VERMEULEN, M., LEONHARDT, H., SCHÄR, P., MÜLLER, M. & CARELL, T. (2014). Tet oxidizes thymine to 5-hydroxymethyluracil in mouse embryonic stem cell DNA. *Nat Chem Biol* 10, 574-581.

PFEIFFER, G.P., STEIGERWALD, S.D., HANSEN, R.S., GARTLER, S.M. & RIGGS, A.D. (1990). Polymerase chain reaction-aided genomic sequencing of an X chromosome-linked CpG island: methylation patterns suggest clonal inheritance, CpG site autonomy, and an explanation of activity state stability. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 87, 8252-8256.

POPP, C., DEAN, W., FENG, S., COKUS, S.J., ANDREWS, S., PELLEGRINI, M., JACOBSEN, S.E. & REIK, W. (2010). Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. *Nature* 463, 1101-1105.

PRÖSCH, S., STEIN, J., STAAK, K., LIEBENTHAL, C., VOLK, H.D. & KRÜGER, D.H. (1996). Inactivation of the very strong HCMV immediate early promoter by DNA CpG methylation in vitro. *Biol Chem Hoppe Seyler* 377, 195-201.

RADICELLA, J.P., DHERIN, C., DESMAZE, C., FOX, M.S. & BOITEUX, S. (1997). Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 94, 8010-8015.

RADOM, C.T., BANERJEE, A. & VERDINE, G.L. (2007). Structural characterization of human 8-oxoguanine DNA glycosylase variants bearing active site mutations. *J Biol Chem* 282, 9182-9194.

RAI, K., HUGGINS, I.J., JAMES, S.R., KARP, A.R., JONES, D.A. & CAIRNS, B.R. (2008). DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45. *Cell* 135, 1201-1212.

RAMON, O., SAUVAIGO, S., GASPARUTTO, D., FAURE, P., FAVIER, A. & CADET, J. (1999). Effects of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine on the binding of the transcription factor Sp1 to its cognate target DNA sequence (GC box). *Free Radic Res* 31, 217-229.

RHEE, D.B., GHOSH, A., LU, J., BOHR, V.A. & LIU, Y. (2011). Factors that influence telomeric oxidative base damage and repair by DNA glycosylase OGG1. *DNA Repair (Amst)* 10, 34-44.

ROSENQUIST, T.A., ZHARKOV, D.O. & GROLLMAN, A.P. (1997). Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 94, 7429-7434.

ROY, D., ZHANG, Z., LU, Z., HSIEH, C.L. & LIEBER, M.R. (2010). Competition between the RNA transcript and the nontemplate DNA strand during R-loop formation in vitro: a nick can serve as a strong R-loop initiation site. *Mol Cell Biol* 30, 146-159.

SAITO, I., TAKAYAMA, M., SUGIYAMA, H., NAKATANI, K., TSUCHIDA, A., & YAMAMOTO, M. (1995). Photoinduced DNA cleavage via electron transfer: Demonstration that guanine residues located 5' to guanine are the most electron-donating sites. *J Am Chem Soc* 117, 6406-6407.

SAKAMOTO, K., KARELINA, K. & OBRIETAN, K. (2011). CREB: a multifaceted regulator of neuronal plasticity and protection. *J Neurochem* 116, 1-9.

- SAMPSON, J.R., DOLWANI, S., JONES, S., ECCLES, D., ELLIS, A., EVANS, D.G., FRAYLING, I., JORDAN, S., MAHER, E.R., MAK, T., MAYNARD, J., PIGATTO, F., SHAW, J. & CHEADLE, J.P. (2003). Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet* 362, 39-41.
- SAMPSON, J.R., JONES, S., DOLWANI, S. & CHEADLE, J.P. (2005). MutYH (MYH) and colorectal cancer. *Biochem Soc Trans* 33, 679-683.
- SASSA, A., BEARD, W.A., PRASAD, R. & WILSON, S.H. (2012). DNA sequence context effects on the glycosylase activity of human 8-oxoguanine DNA glycosylase. *J Biom Chem* 287, 36702-36710.
- SAXONOV, S., BERG, P. & BRUTLAG, D.L. (2006). A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 31, 1412-1417.
- SAXOWSKY, T.T., MEADOWS, K.L., KLUNGLAND, A. & DOETSCH, P.W. (2008). 8-Oxoguanine-mediated transcriptional mutagenesis causes Ras activation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 105, 18877-18882.
- SCHLABACH, M.R., HU, J.K., LI, M. & ELLENDGE, S.J. (2010). Synthetic design of strong promoters. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 107, 2538-2543.
- SCHREIBER, V., AMÉ, J.C., DOLLÉ, P., SCHULTZ, I., RINALDI, B., FRAULOB, V., MÉNISSIER-DE MURCIA, J. & DE MURCIA, G. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. *J Biol Chem* 277, 23028-23036.
- SCHUCH, R., AGELOPOULOS, K., NEUMANN, A., BRANDT, B., BÜRGER, H. & KORSCHING, E. (2012). Site-specific chromatin immunoprecipitation: a selective method to individually analyze neighboring transcription factor binding sites in vivo. *BMC Res Notes* 5:109, doi 10.1186/1756-0500-5-109.
- SEEBERG, E., EIDE, L. & BJØRÅS, M. (1995). The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci* 20, 391-397.
- SELBY, C.P., DRAPKIN, R., REINBERG, D. & SANCAR, A. (1997). RNA polymerase II stalled at a thymine dimer: footprint and effect on excision repair. *Nucleic Acids Res* 25, 787-793.
- SHIBUTANI, S., TAKESHITA, M. & GROLLMAN, A.P. (1991). Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349, 431-434.
- SJOLUND, A., SENEJANI, A. & SWEASY, J. (2013). MBD4 and TDG: Multifaceted DNA glycosylases with ever expanding biological roles. *Mutat Res* 743-744, 12-25.
- SOBOL, R.W., PRASAD, R., EVENSKI, A., BAKER, A., YANG, X.P., HORTON, J.K. & WILSON, S.H. (2000). The lyase activity of the DNA repair protein beta-polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity. *Nature* 405, 807-810.
- SONG, C.X. & HE, C. (2011). The hunt for 5-hydroxymethylcytosine: the sixth base. *Epigenomics* 3, 521-523.
- SONG, C.X., SZULWACH, K.E., DAI, Q., FU, Y., MAO, S.Q., LIN, L., STREET, C., LI, Y., POIDEVIN, M., WU, H., GAO, J., LIU, P., LI, L., XU, G.L., JIN, P. & HE, C. (2013). Genome-wide profiling of 5-formylcytosine reveals its roles in epigenetic priming. *Cell* 153, 378-691.

- SPRUIJT, C.G., GNERLICH, F., SMITS, A.H., PFAFFENEDER, T., JANSEN, P.W., BAUER, C., MÜNDEL, M., WAGNER, M., MÜLLER, M., KHAN, F., EBERL, H.C., MENSINGA, A., BRINKMAN, A.B., LEPIKOV, K., MÜLLER, U., WALTER, J., BOELENS, R., VAN INGEN, H., LEONHARDT, H., CARELL, T. & VERMEULEN, M. (2013). Dynamic Readers for 5-(Hydroxy)methylcytosine and Its Oxidized Derivatives. *Cell* 152, 1146-1159.
- STARCEVIC, D., DALAL, S. & SWEASY, J.B. (2004). Is there a link between DNA polymerase beta and cancer?. *Cell Cycle* 3, 998-1001.
- STEENKEN, S. & JOVANOVIĆ, S.V. (1997). How easily oxidizable is DNA? One-electron reduction potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution. *J Am Chem Soc* 119, 617-618.
- STIVERS, J.T. (2004). Site-specific DNA damage recognition by enzyme-induced base flipping. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 77, 37-65.
- STUCKI, M., PASCUCCI, B., PARLANTI, E., FORTINI, P., WILSON, S.H., HÜBSCHER, U. & DOGLIOTTI, E. (1998). Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene* 17, 835-843.
- SUGIMURA, H., KOHNO, T., WAKAI, K., NAGURA, K., GENKA, K., IGARASHI, H., MORRIS, B.J., BABA, S., OHNO, Y., GAO, C., LI, Z., WANG, J., TAKEZAKI, T., TAJIMA, K., VARGA, T., SAWAGUCHI, T., LUM, J.K., MARTINSON, J.J., TSUGANE, S., IWAMASA, T., SHINMURA, K. & YOKOTA, J. (1999). hOGG1 Ser326Cys polymorphism and lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8, 669-674.
- SUSKE, G., GROSS, B. & BEATO, M. (1989). Non-radioactive method to visualize specific DNA-protein interactions in the band shift assay. *Nucleic Acids Res* 17, 4405.
- SVILAR, D., GOELLNER, E.M., ALMEIDA, K.H. & SOBOL, R.W. (2011). Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxid Redox Signal* 14, 2491-507.
- SWOPE, D.L., MUELLER, C.L. & CHRIVIA, J.C. (1996). CREB-binding Protein Activates Transcription through Multiple Domains. *J Biol Chem* 271, 28138-28145.
- TAHILIANI, M., KOH, K.P., SHEN, Y., PASTOR, W.A., BANDUKWALA, H., BRUDNO, Y., AGARWAL, S., IYER, L.M., LIU, D.R., ARAVIND, L. & RAO, A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxycytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324, 930-935.
- TAKEZAKI, T., GAO, C., WU, J., LI, Z., WANG, J., DING, J., LIU, Y., HU, X., XU, T., TAJIMA, K. & SUGIMURA, H. (2002). hOGG1 Ser<sup>326</sup>Cys polymorphism and modification by environmental factors of stomach cancer risk in Chinese. *Int J Cancer* 99, 624-627.
- TORNALETTI, S., DONAHUE, B.A., REINES, D. & HANAWALT, P.C. (1997). Nucleotide sequence context effect of a cyclobutane pyrimidine dimer upon RNA polymerase II transcription. *J Biol Chem* 272, 31719-31724.
- TORNALETTI, S., MAEDA, L.S. & HANAWALT, P.C. (2006). Transcription arrest at an abasic site in the transcribed strand of template DNA. *Chem Res Toxicol* 19, 1215-1220.

- TRZECIAK, A.R., NYAGA, S.G., JARUGA, P., LOHANI, A., DIZDAROGLU, M. & EVANS, M.K. (2004). Cellular response of oxidatively induced DNA base lesions is defective in prostate cancer cell lines, PC-3 and DU-145. *Carcinogenesis* 25, 1359-1370.
- TUDEK, B. (2007). Base excision repair modulation as a risk factor for human cancers. *Mol Aspects Med* 28, 258-275.
- TUO, J., CHEN, C., ZENG, X., CHRISTIANSEN, M. & BOHR, V.A. (2002). Functional crosstalk between hOgg1 and the helicase domain of Cockayne syndrome group B protein. *DNA Repair (Amst)* 1, 913-927.
- UESUGI, S. & IKEHARA, M. (1977). Carbon-13 magnetic resonance spectra of 8-substituted purine nucleosides. Characteristic shifts for the syn conformation. *J Am Chem Soc* 99, 3250-3253.
- VALINLUCK, V., TSAI, H.H., ROGSTAD, D.K., BURDZY, A., BIRD, A. & SOWERS, L.C. (2004). Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucleic Acids Res* 32, 4100-4108.
- VALLYATHAN, V. & SHI, X. (1997). The role of oxygen free radicals in occupational and environmental lung disease. *Environ Health Perspect* 105, 165-177.
- VERRI, A., MAZZARELLO, P., BIAMONTI, G., SPADARI, S. & FOCHER, F. (1990). The specific binding of nuclear protein(s) to the cAMP responsive element (CRE) sequence (TGACGTCA) is reduced by the misincorporation of U and increased by the deamination of C. *Nucleic Acids Res* 18, 5775-5780.
- VIDAL, A.E., HICKSON, I.D., BOITEUX, S. & RADICELLA, J.P. (2001). Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: bypass of the AP lyase activity step. *Nucleic Acids Res* 29, 1285-1292.
- WALLACE, S.S. (1998). Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. *Radiat Res* 150, 60-79.
- WANUNU, M., COHEN-KARNI, D., JOHNSON, R.R., FIELDS, L., BENNER, J., PETERMAN, N., ZHENG, Y., KLEIN, M.L. & DRNDIC, M. (2011). Discrimination of methylcytosine from hydroxymethylcytosine in DNA molecules. *J Am Chem Soc* 133, 486-492.
- WEN, Y.D., PERISSI, V., STASZEWSKI, L.M., YANG, W.M., KRONES, A., GLASS, C.K., ROSENFELD, M.G. & SETO, E. (2000). The histone deacetylase-3 complex contains nuclear receptor corepressors. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 97, 7202-7207.
- WIEDERHOLD, L., LEPPARD, J.B., KEDAR, P., KARIMI-BUSHERI, F., RASOULI-NIA, A., WEINFELD, M., TOMKINSON, A.E., IZUMI, T., PRASAD, R., WILSON, S.H., MITRA, S. & HAZRA, T.K. (2004). AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells. *Mol Cell* 15, 209-220.
- WILSON, D.M., TAKESHITA, M., GROLLMAN, A.P. & DEMPSEY, B. (1995). Incision Activity of Human Apurinic Endonuclease (Ape) at Abasic Site Analogs in DNA. *J Biol Chem* 270, 16002-16007.
- WONG, R.S., SCZEPANSKI, J.T. & GREENBERG, M.M. (2010). Excision of a lyase-resistant oxidized abasic lesion from DNA. *Chem Res Toxicol* 23, 766-770.

- WOOD, R.D., MITCHELL, M., SGOUROS, J. & LINDAHL, T. (2001). Human DNA repair genes. *Science* 291, 1284–1289.
- WU, H., D'ALESSIO, A.C., ITO, S., WANG, Z., CUI, K., ZHAO, K., SUN, Y.E. & ZHANG, Y. (2011). Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Genes Dev* 25, 679-684.
- WU, X., SPIRO, C., OWEN, W.G. & MCMURRAY, C.T. (1998). cAMP Response Element-binding Protein Monomers Cooperatively Assemble to Form Dimers on DNA. *J Biol Chem* 273, 20820-20827.
- XANTHOUDAKIS, S., SMEYNE, R.J., WALLACE, J.D. & CURRAN, T. (1996). The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93, 8919-8923.
- XIE, Y., YANG, H., CUNANAN, C., OKAMOTO, K., SHIBATA, D., PAN, J., BARNES, D.E., LINDAHL, T., MCILHATTON, M., FISHEL, R. & MILLER, J.H. (2004). Deficiencies in mouse Myh and Ogg1 result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors. *Cancer Res* 64, 3096-3102.
- YAMAMORI, T., DERICCO, J., NAGVI, A., HOFFMANN, T.A., MATTAGAJASINGH, I., KASUNO, K., JUNG, S.B., KIM, C.S. & IRANI, K. (2010). SIRT1 deacetylates APE1 and regulates cellular base excision repair. *Nucleic Acids Res* 38, 832-845.
- YAMAMOTO, K.K., GONZALEZ, G.A., BIGGS, W.H. & MONTMINY, M.R. (1988). Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature* 344, 494-498.
- YANG, X.J. & SETO, E. (2008). The Rpd3/Hda1 family of lysine deacetylases: from bacteria and yeast to mice and men. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 206-218.
- YE, C. & LI, L. (2014). 5-hydroxymethylcytosine: a new insight into epigenetics in cancer. *Cancer Biol Ther* 15, 10-15.
- YILDIRIM, O., LI, R., HUNG, J.H., CHEN, P.B., DONG, X., EE, L.S., WENIG, Z., RANDO, O.J. & FAZZIO, T.G. (2011). Mbd3/NURD complex regulates expression of 5-hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells. *Cell* 147, 1498-1510.
- YOU, A., TONG, J.K., GROZINGER, C.M. & SCHREIBER, S.L. (2001). CoREST is an integral component of the CoREST-human histone deacetylase complex. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 98, 1454-1458.
- ZHANG, J., KALKUM, M., CHAIT, B.T. & ROEDER, R.D. (2002). The N-CoR-HDAC3 nuclear receptor corepressor complex inhibits the JNK pathway through the integral subunit GPS2. *Mol Cell* 9, 611-623.
- ZHANG, X., ODOM, D.T., KOO, S.H., CONKRIGHT, M.D., CANETTIERI, G., BEST, J., CHEN, H., JENNER, R., HERBOLSHEIMER, E., JACOBSEN, E., KADAM, S., ECKER, J.R., EMERSON, B., HOGENESCH, J.B., UNTERMAN, T., YOUNG, R.A. & MONTMINY, M. (2005). Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 102, 4459-4464.

ZHANG, X., ROSENSTEIN, B.S., WANG, Y., LEBWOHL, M., MITCHELL, D.M., WEI, H. (1997). Induction of 8-oxo-7,8-dihydro-20-deoxyguanosine by ultraviolet radiation in calf thymus DNA and HeLa cells. *Photochem Photobiol* 65, 119–124.

ZHANG, X., WU, M., XIAO, H., LEE, M.T., LEVIN, L., LEUNG, Y.K. & HO, S.M. (2010). Methylation of a single intronic CpG mediates expression silencing of the PMP24 gene in prostate cancer. *Prostate* 70, 765-776.

ZHARKOV, D.O., ROSENQUIST, T.A., GERCHMAN, S.E. & GROLLMAN, A.P. (2000). Substrate specificity and reaction mechanism of murine 8-oxoguanine DNA glycosylase. *J Biol Chem* 275, 28607-28617.

ZHOU, V.W., GOREN, A. & BERNSTEIN, B.E. (2011). Charting histone modifications and the functional organization of mammalian genomes. *Nat Rev Genet* 12, 7-18.

ZHU, J., HE, F., HU, S. & YU, J. (2008). On the nature of human housekeeping genes. *Trends Genet* 24, 481-484.

ZIENOLDDINY, S., CAMPA, D., LIND, H., RYBERG, D., SKAUG, V., STANGELAND, L., PHILLIPS, D.H., CANZIAN, F. & HAUGEN, A. (2006). Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 27, 560-567.



## Anhang I

Tabelle der im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Vektoren. Grau dargestellte Vektoren wurden konstruiert, aber im Rahmen dieser Arbeit nicht für weitere Versuche eingesetzt.

Vektor	Konstruktion siehe
pZAJ-5W-CGG	Kapitel 2.2.5., Anhang II-1
pZAJ-5C-CGG	Kapitel 2.2.5., Anhang II-1
pZAJ-UPS-W	Kapitel 2.2.5., Anhang II-2
pZAJ-UPS-C	Kapitel 2.2.5., Anhang II-2
pCMV-1111-ZA-W	Kapitel 2.2.6., Anhang II-3
pCMV-1111-ZA-C	Kapitel 2.2.6., Anhang II-3
pCMV-11x11-ZA-W	Kapitel 2.2.6., Anhang II-3
pCMV-1111-AZ-W	Kapitel 2.2.6., Anhang II-3
pCMV-1111-AZ-C	Kapitel 2.2.6., Anhang II-3
pCMV-11x11-AZ-W	Kapitel 2.2.6., Anhang II-3
pCMV-1011-ZA-W	Kapitel 2.2.6., Anhang II-4
pCMV-0011-ZA-W	Kapitel 2.2.6., Anhang II-4
pCMV-1101-ZA-W	Kapitel 2.2.6., Anhang II-4
pCMV-1100-ZA-W	Kapitel 2.2.6., Anhang II-4
pCRE-UNO-ZA-W	Kapitel 2.2.6., Anhang II-5
pCRE-UNO-ZA-C	Kapitel 2.2.6., Anhang II-5
pCRE-NULL-ZA-W	Kapitel 2.2.6., Anhang II-5
pCRE-UNO-AZ-W	Kapitel 2.2.6., Anhang II-5
pCRE-UNO-AZ-C	Kapitel 2.2.6., Anhang II-5
pCRE-NULL-AZ-W	Kapitel 2.2.6., Anhang II-5
pSH-OGG1-K1	Kapitel 2.2.7., Anhang II-6
pSH-OGG1-K2	Kapitel 2.2.7., Anhang II-6

Tabelle der modifizierten Reportervektoren, die im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden.

Vektor	Modifikation	Position	Abbildungung
pZAJ-5W-AGC-8oG	8-oxoG	5'-UTR, NTS, AG*C-Kontext	3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-9, 3-10, 3-13, 3-14, 3-35, Anhang III-1
pZAJ-5C-AGC-8oG	8-oxoG	5'-UTR, TS, AG*C-Kontext	3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8, 3-25
pZAJ-5W-CGG-8oG	8-oxoG	5'-UTR, NTS, CG*G-Kontext	3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8
pZAJ-5C-CGG-8oG	8-oxoG	5'-UTR, TS, CGG-Kontext	3-1, 3-2, 3-3, 3-4, 3-5, 3-6, 3-7, 3-8
pZAJ-5W-AGC-3x8oG	8-oxoG (3x)	5'-UTR, NTS	3-9, 3-10, 3-11, 3-14, Anhang III-1
pJAZ-5W-AGC-8oG	8-oxoG	5'-UTR, NTS, AGC-Kontext	3-9, 3-10, 3-14, Anhang III-1
pJAZ-5W-AGC-3x8oG	8-oxoG (3x)	5'-UTR, NTS	3-9, 3-10, 3-14, Anhang III-1
pZAJ-Nt-8oG	8-oxoG	EGFP-Gen, NTS	3-15, 3-17, 3-18, 3-19, 3-20, 3-21, 3-22, 3-23, 3-40, Anhang III-2
pZAJ-Nt-S8oG	8-oxoG (5' S)	EGFP-Gen, NTS	3-15, 3-17, 3-18, 3-19, 3-20, 3-21, 3-22, 3-23, Anhang III-2
pZAJ-Nt-8oGS	8-oxoG (3' S)	EGFP-Gen, NTS	3-15, 3-17, 3-18, 3-19, 3-20, 3-21, 3-22, 3-23, Anhang III-2
pZAJ-Nt-S8oGS	8-oxoG (5' S, 3' S)	EGFP-Gen, NTS	3-15, 3-17, 3-18, 3-19, 3-20, 3-21, 3-22, 3-23, Anhang III-2
pCMV-1111-ZA-W-Nt-8oG	8-oxoG	EGFP-Gen, NTS	3-28, 3-29, 3-30, Anhang III-3
pCMV-1011-ZA-W-Nt-8oG	8-oxoG	EGFP-Gen, NTS	3-28, 3-29, 3-30, Anhang III-3
pCMV-0011-ZA-W-Nt-8oG	8-oxoG	EGFP-Gen, NTS	3-28, 3-29, 3-30, Anhang III-3
pCRE-UNO-W-Nt-8oG	8-oxoG	EGFP-Gen, NTS	3-28, 3-29, 3-30, 3-31, 3-32, Anhang III-3
pCRE-NULL-W-Nt-8oG	8-oxoG	EGFP-Gen, NTS	3-31, 3-32, Anhang III-4
pSB-ACTB-5C-Nt-8oG	8-oxoG	EGFP-Gen, NTS	3-33, 3-34, Anhang III-5
pSB-ACTB-5C-Nt-S8oG	8-oxoG	EGFP-Gen, NTS	3-33, 3-34, Anhang III-5
pSB-RASSF1-5C-Nt-8oG	8-oxoG	EGFP-Gen, NTS	3-33, 3-34, Anhang III-5
pSB-RASSF1-5C-Nt-S8oG	8-oxoG	EGFP-Gen, NTS	3-33, 3-34, Anhang III-5
pZAJ-UPS-W-8oG	8-oxoG	upstream, NTS	3-24, 3-25, 3-26, 3-35, 3-36, 3-37, Anhang III-6
pZAJ-UPS-W-U	Uracil	upstream, NTS	3-26

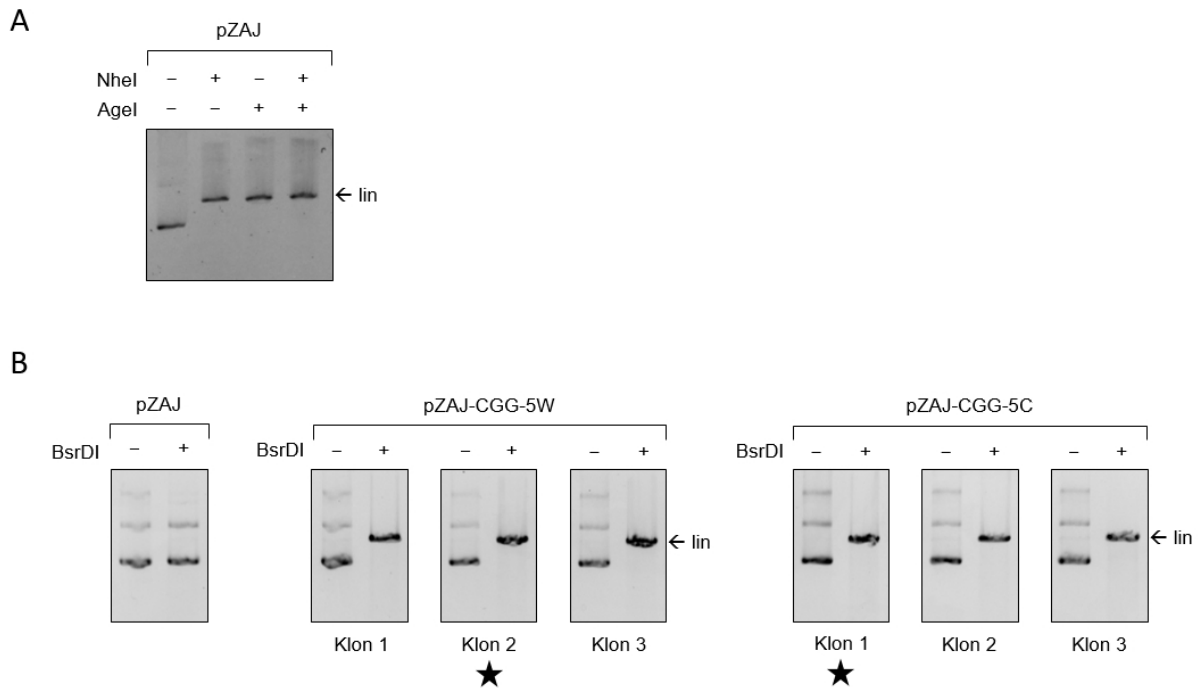
pZAJ-UPS-C-8oG	8-oxoG	upstream, TS	3-24, 3-25, 3-26, 3-35, Anhang III-6
pZAJ-UPS-C-U	Uracil	upstream, TS	3-26
pZAJ-3W-AGC-8oG	8-oxoG	3'-UTR, NTS	3-35
pZAJ-3C-AGC-8oG	8-oxoG	3'-UTR, TS	3-35
pZAJ-5W-AGC-5mC	5-mC	5'-UTR, NTS	3-46, 3-47, 3-49, Anhang III-7
pZAJ-5W-AGC-2x5mC	5-mC (2x)	5'-UTR, NTS	3-46, 3-47, 3-49, Anhang III-7
pZAJ-5C-AGC-5mC	5-mC	5'-UTR, TS	3-46, 3-47, 3-49, Anhang III-7
pZAJ-5C-AGC-2x5mC	5-mC (2x)	5'-UTR, TS	3-46, 3-47, 3-49, Anhang III-7
pJAZ-5W-AGC-5mC	5-mC	5'-UTR, NTS	3-46, 3-48, Anhang III-7
pJAZ-5W-AGC-2x5mC	5-mC (2x)	5'-UTR, NTS	3-46, 3-48, Anhang III-7
pJAZ-5C-AGC-5mC	5-mC	5'-UTR, TS	3-46, 3-48, Anhang III-7
pJAZ-5C-AGC-2x5mC	5-mC (2x)	5'-UTR, TS	3-46, 3-48, Anhang III-7
pCMV-1111-AZ-W-5mC	5-mC	CRE, NTS	3-50, 3-51, Anhang III-8
pCMV-1111-AZ-W-3x5mC	5-mC (3x)	CRE, NTS	3-50, 3-51, Anhang III-8
pCMV-1111-AZ-C-5mC	5-mC	CRE, TS	3-50, 3-51, Anhang III-8
pCMV-1111-AZ-C-3x5mC	5-mC (3x)	CRE, TS	3-50, 3-51, Anhang III-8
pCMV-0011-ZA-3x5mC	5-mC (3x)	CRE, NTS	3-52, 3-53, Anhang III-9
pCRE-UNO-ZA-W-5mC	5-mC	CRE, NTS	3-54, 3-55, 3-56, 3-57, 3-76, 3-78, Anhang III-10
pCRE-UNO-ZA-W-3x5mC	5-mC (3x)	CRE, NTS	3-54, 3-55, 3-56, 3-57, 3-76, Anhang III-10
pCRE-UNO-ZA-C-5mC	5-mC	CRE, TS	3-76, Anhang III-10
pCRE-UNO-ZA-C-3x5mC	5-mC (3x)	CRE, TS	3-76, Anhang III-10
pCRE-UNO-ZA-W-3xCG	C	CRE, NTS (+M.SssI)	3-61, Anhang III-11
pCMV-1111-ZA-W-8oG	8-oxoG	CRE, NTS	3-62, 3-63, 3-64, Anhang III-12
pCRE-UNO-ZA-W-8oG	8-oxoG	CRE, NTS	3-62, 3-63, 3-64, 3-65, Anhang III-12
pZAJ-5W-AGC-U	Uracil	5'-UTR, NTS	3-67, Anhang III-13
pZAJ-5W-AGC-5hmU	5-hmU	5'-UTR, NTS	3-66, 3-67, Anhang III-13
pZAJ-5W-AGC-3x5hmU	5-hmU (3x)	5'-UTR, NTS	3-66, 3-67, Anhang III-13
pCMV-1111-ZA-W-5hmU	5-hmU	CRE, NTS	3-68, 3-69, Anhang III-13
pCMV-1111-ZA-W-3x5hmU	5-hmU (3x)	CRE, NTS	3-68, 3-69, Anhang III-13
pCRE-UNO-ZA-W-5hmU	5-hmU	CRE, NTS	3-70, 3-71, 3-72, 3-73, Anhang III-13
pCRE-UNO-ZA-W-3x5hmU	5-hmU (3x)	CRE, NTS	3-70, 3-71, 3-72, 3-73, Anhang III-13

---

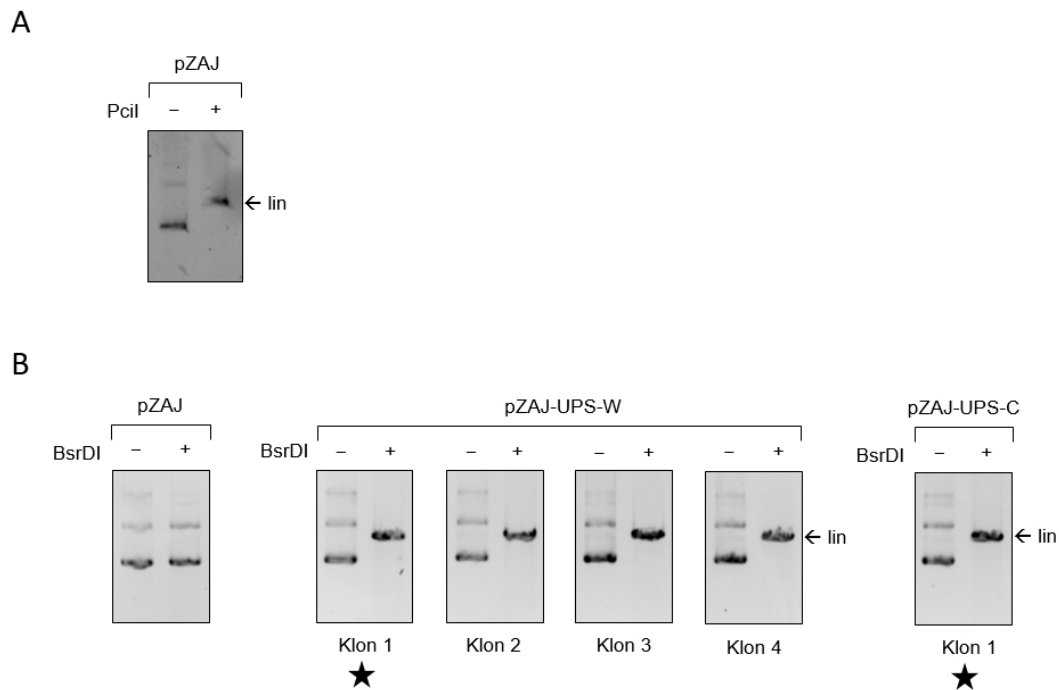
pCRE-UNO-ZA-C-5hmU	5-hmU	CRE, TS	3-70, 3-71, Anhang III-13
pCRE-UNO-ZA-C-3x5hmU	5-hmU (3x)	CRE, TS	3-70, 3-71, Anhang III-13
pCRE-UNO-ZA-W-5hmC	5-hmC	CRE, NTS	3-74, 3-75, 3-76, 3-77, 3-78, Anhang III-14
pCRE-UNO-ZA-W-3x5hmC	5-hmC	CRE, NTS	3--74, 3-75, 3-76, 3-77, Anhang III-14
pCRE-UNO-ZA-C-5hmC	5-hmC	CRE, TS	3-74, 3-76, Anhang III-14
pCRE-UNO-ZA-C-3x5hmC	5-hmC	CRE, TS	3-74, 3-76, Anhang III-14
pCRE-UNO-ZA-W-5fC	5-fC	CRE, NTS	3-74, 3-79, 3-80, 3-82, Anhang III-15
pCRE-UNO-ZA-W-3x5fC	5-fC (3x)	CRE, NTS	3-74, 3-79, 3-80, 3-83, Anhang III-15
pCRE-UNO-ZA-C-5fC	5-fC	CRE, TS	3-74, 3-81, Anhang III-15
pCRE-UNO-ZA-C-3x5fC	5-fC (3x)	CRE, TS	3-74, 3-81, Anhang III-15
pCRE-UNO-ZA-W-5caC	5-caC	CRE, NTS	3-74, 3-79, 3-80, 3-82, Anhang III-15
pCRE-UNO-ZA-W-3x5caC	5-caC (3x)	CRE, NTS	3-74, 3-79, 3-80, 3-83, Anhang III-15
pCRE-UNO-ZA-C-5caC	5-caC	CRE, TS	3-74, 3-81, Anhang III-15
pCRE-UNO-ZA-C-3x5caC	5-caC (3x)	CRE, TS	3-74, 3-81, Anhang III-15

---

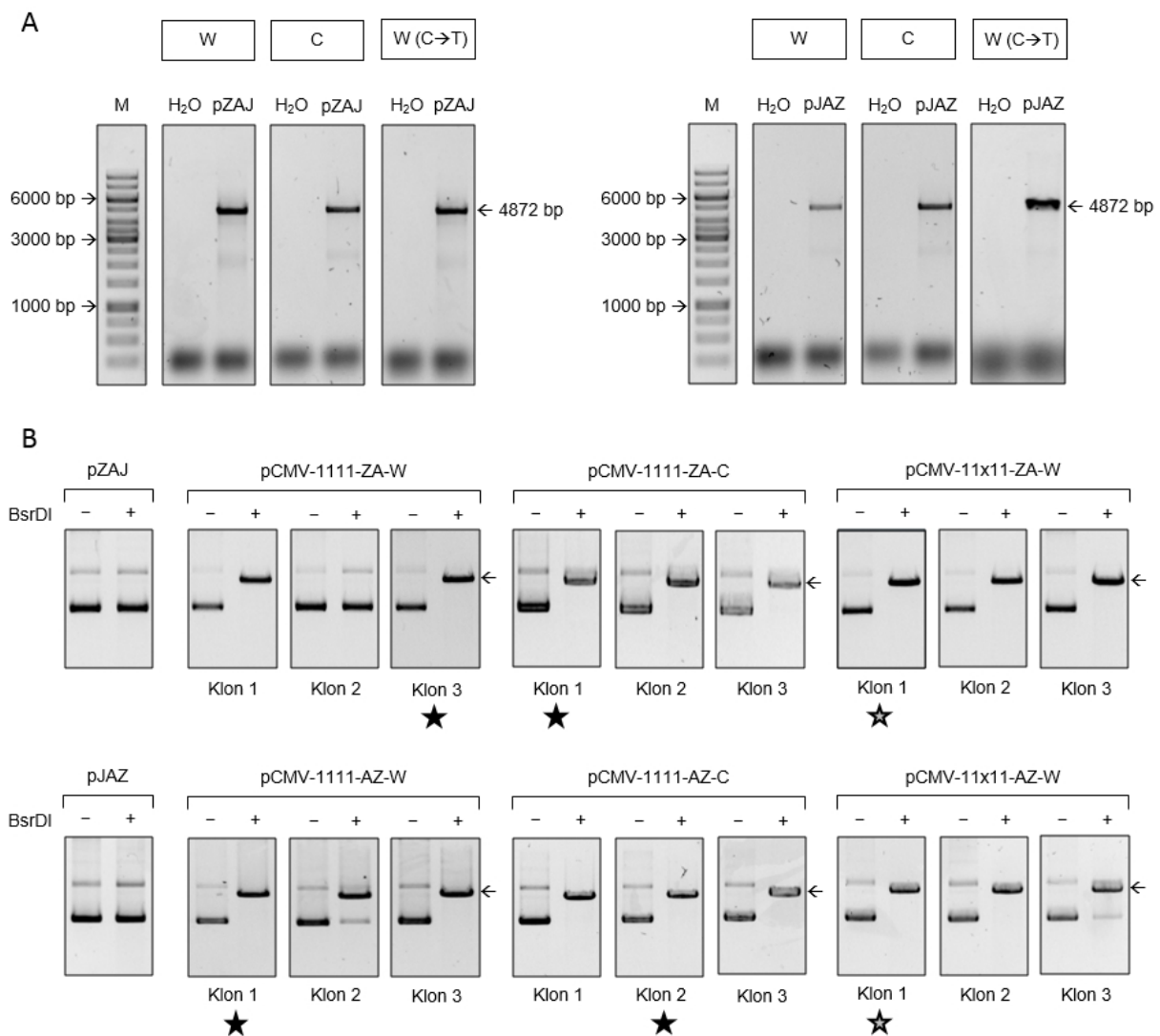
## Anhang II



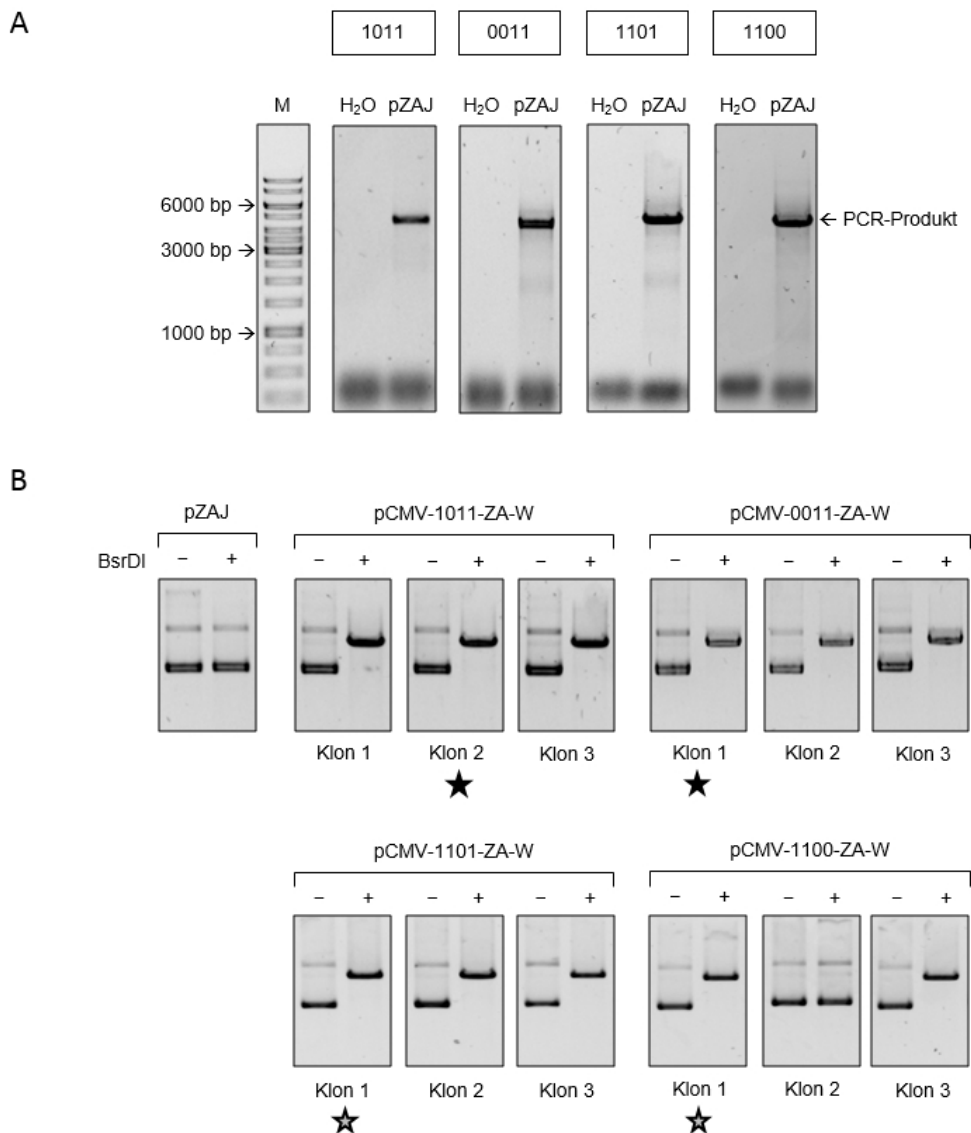
Anhang II-1 Klonierung der Vektoren pZAJ-CGG-5W und pZAJ-CGG-5C. (A) Linearisierung des Vektors pZAJ mit den Restriktionsendonukleasen NheI und AgeI. Der Doppelverdau resultiert in einem 4872 bp DNA-Fragment (lin), das für die weitere Klonierung verwendet wird und mit einem Pfeil gekennzeichnet ist, und einem 9 bp DNA-Fragment, das im Agarosegel nicht nachweisbar ist. Um sicherzustellen, dass der Verdau mit beiden Enzymen vollständig abgelaufen ist, wurden jeweils Reaktionsansätze, die mit nur einer der beiden Restriktionsendonukleasen unter identischen Reaktionsbedingungen inkubiert wurden, aufgetragen. (B) Verifizierung des Einbaus des DNA-Inserts in die Vektor-DNA mittels Restriktionsverdau mit BsrDI. Der Vektor pZAJ, der keine BsrDI-Schnittstelle enthält, dient als Kontrolle. Enthält der Vektor das BsrDI-Schnittstellen-Insert wird er von der Restriktionsendonuklease geschnitten und liegt in seiner linearen Form vor. Für jedes verwendete Insert (CGG-5W und CGG-5C) wurden drei Klone getestet. Mit einem schwarzen Stern markierte Klone wurden zusätzlich mittels Sequenzierung verifiziert und für alle weiteren Versuche verwendet.



Anhang II-2 Klonierung der Vektoren pZAJ-UPS-W und pZAJ-UPS-C. (A) Linearisierung des Vektors pZAJ mit der Restriktionsendonuklease PciI. Der Verdau resultiert in einem 4881 bp DNA-Fragment (lin), das für die weitere Klonierung verwendet wird und mit einem Pfeil gekennzeichnet ist. (B) Verifizierung des Einbaus des DNA-Inserts in die Vektor-DNA mittels Restriktionsverdau mit BsrDI. Der Vektor pZAJ, der keine BsrDI-Schnittstelle enthält, dient als Kontrolle. Enthält der Vektor das Tandem-BsrDI-Insert wird er von der Restriktionsendonuklease geschnitten und liegt in seiner linearen Form vor. Da das verwendete Insert sowohl in W- als auch in C-Orientierung eingebaut werden konnte, wurden die Klone mittels Sequenzierung identifiziert, wobei 4 Klone das Insert in W-Orientierung (pZAJ-UPS-W) und ein Klon mit einem Insert in C-Orientierung (pZAJ-UPS-C) enthielten. Mit einem schwarzen Stern markierte Klone wurden für die weiteren Versuche verwendet.

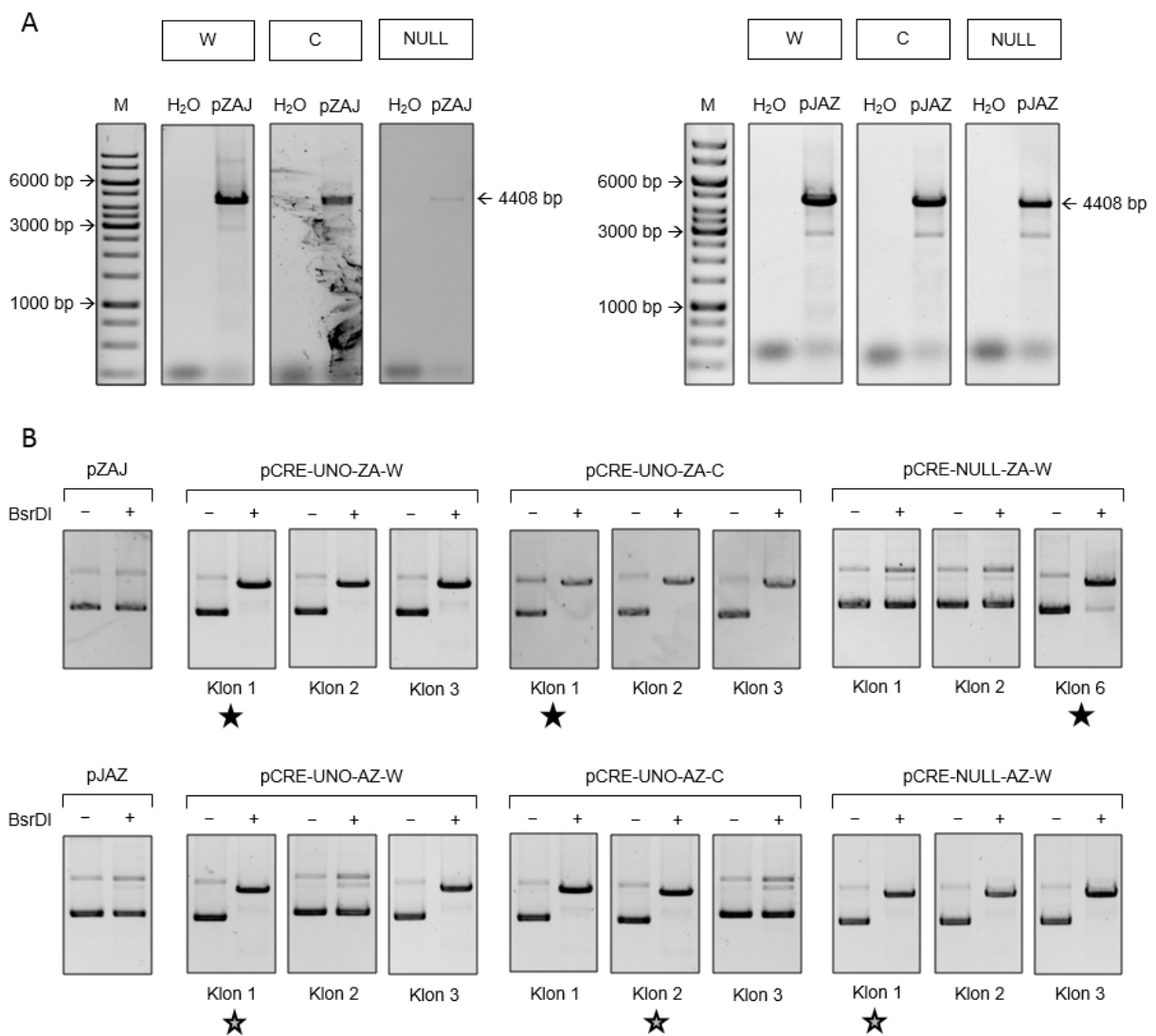


Anhang II-3 Klonierung der Vektoren mit Tandem-BsrDI-Schnittstellen innerhalb des CMV-IE-Promotors. (A) Gelbild der PCR-Produkte nach der präparativen Klonierungs-PCR mit überhängende Primern in den Vektoren pZAJ (links) und pJAZ (rechts). Die Überhänge der Primer enthalten jeweils die gleichgerichteten BsrDI-Schnittstellen, wobei deren Orientierung bei Umsetzung mit der Nicking-Endonuklease Nb.BsrDI einen Nick entweder im Top-Strang (W) oder im Bottom-Strang (C) ermöglicht. Das Primerpaar W (C→T) enthält eine C → T Punktmutation im CpG-Dinukleotid des von BsrDI-Schnittstellen eingeschlossenen CRE. (B) Verifizierung der Anwesenheit der BsrDI-Schnittstellen in der Vektor-DNA mittels Restriktionsverdau mit BsrDI. Die Vektoren pZAJ (oben) und pJAZ (unten), die keine BsrDI-Schnittstelle enthalten, dienen als Kontrolle. Enthält der Vektor das Tandem-BsrDI-Insert wird er von der Restriktionsendonuklease geschnitten und liegt in seiner linearen Form vor. Für jedes verwendete Insert (W, C, W (C→T)) wurden drei Klone getestet. Mit einem schwarzen Stern markierte Klone wurden zusätzlich mittels Sequenzierung verifiziert und für alle weiteren Versuche verwendet, mit einem grauen Stern markierte Klone wurden zwar durch Sequenzierung verifiziert, fanden aber im Rahmen dieser Arbeit keine weitere Anwendung.

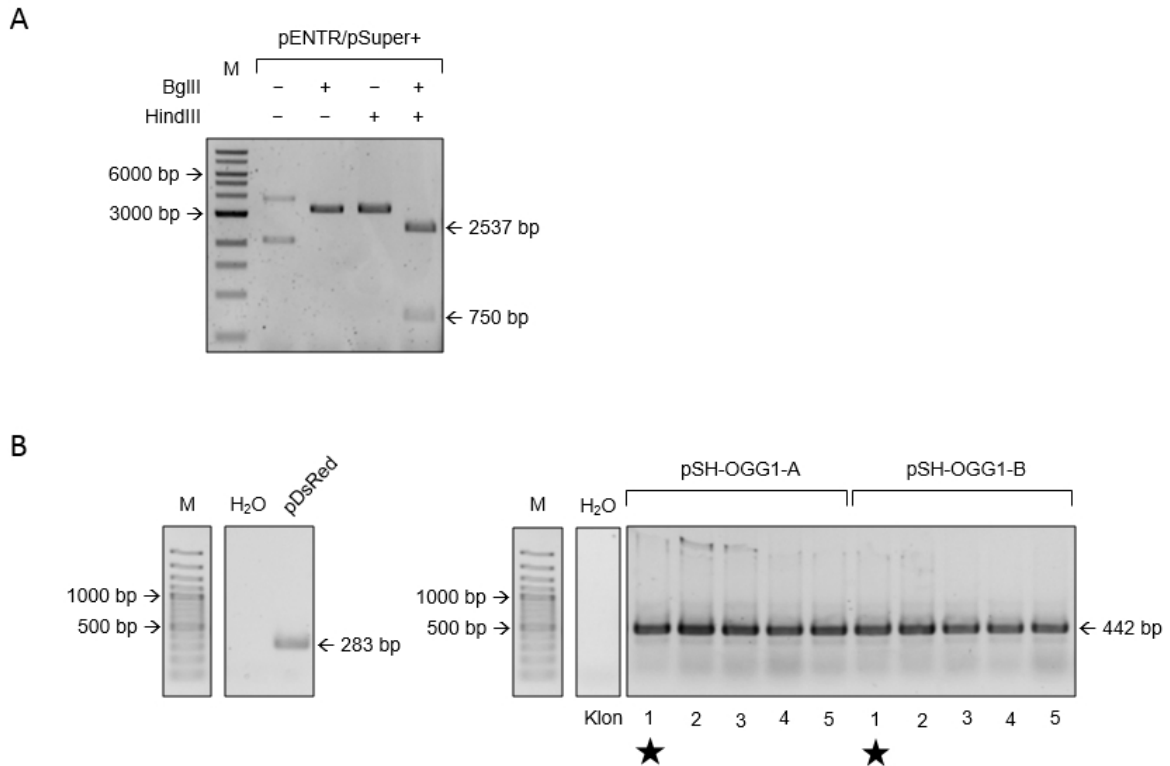


Anhang II-4 Klonierung der Vektoren mit partiellen Deletionen des CMV-IE-Promotors. (A) Gelbild der PCR-Produkte nach der präparativen Klonierungs-PCR mit überhängende Primern im Vektor pZAJ. Die Überhänge der Primer enthalten jeweils die gleichgerichteten BsrDI-Schnittstellen, wobei deren Orientierung bei Umsetzung mit der Nicking-Endonuklease Nb.BsrDI einen Nick im Top-Strang (W) ermöglicht. Der binäre Nummerncode gibt an, welche Teile des CMV-IE-Promotors durch die PCR entfernt wurden, wobei 0 für eine Deletion, 1 für vorhandene Promotorabschnitte steht. (B) Verifizierung der Anwesenheit der BsrDI-Schnittstellen in der Vektor-DNA mittels Restriktionsverdau mit BsrDI. Der Vektor pZAJ, der keine BsrDI-Schnittstelle enthält, dient als Kontrolle. Enthält der Vektor das Tandem-BsrDI-Insert wird er von der Restriktionsendonuklease geschnitten und liegt in seiner linearen Form vor. Für jede Promotor-Variante (1011, 0011, 1101, 1100) wurden drei Klone getestet. Mit einem schwarzen Stern markierte Klone wurden zusätzlich mittels Sequenzierung verifiziert und für alle weiteren Versuche verwendet, mit einem grauen Stern markierte Klone wurden zwar durch Sequenzierung verifiziert, fanden aber im Rahmen dieser Arbeit keine weitere Anwendung.



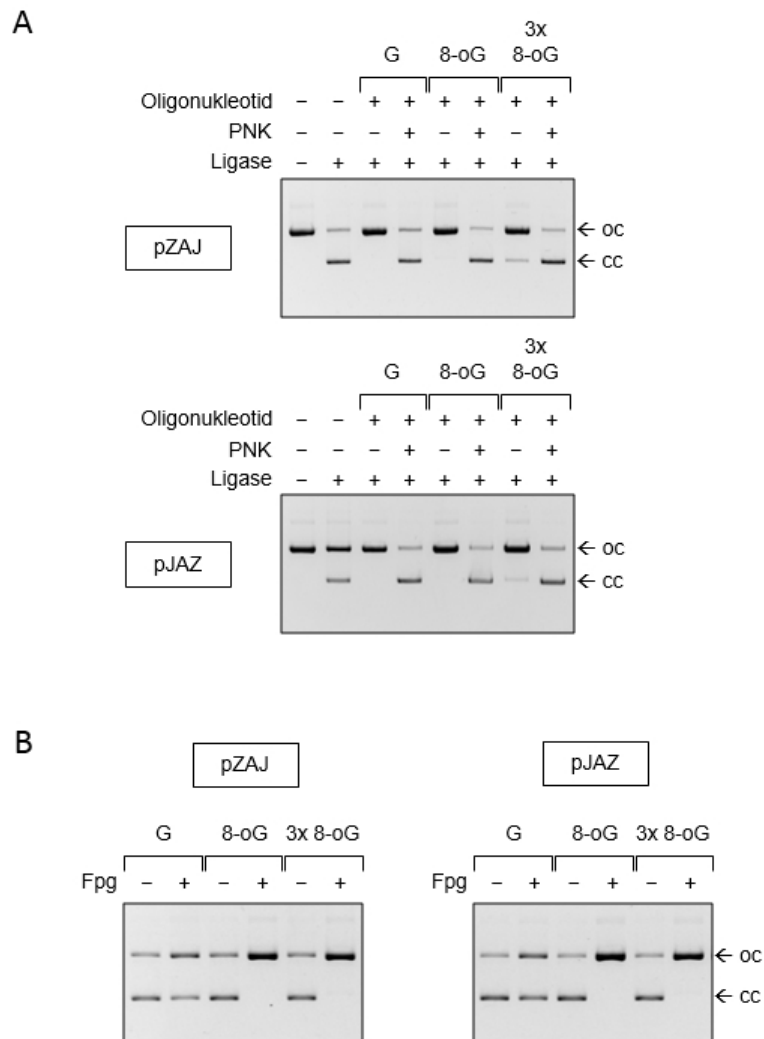


Anhang II-5 Klonierung der Vektoren mit vollständiger Deletion des CMV-IE-Promotors. (A) Gelbild der PCR-Produkte nach der präparativen Klonierungs-PCR mit überhängende Primern in den Vektoren pZAJ (links) und pJAZ (rechts). Die Überhänge der Primer enthalten jeweils die gleichgerichteten BsrDI-Schnittstellen, wobei deren Orientierung bei Umsetzung mit der Nicking-Endonuklease Nb.BsrDI einen Nick entweder im Top-Strang (W) oder im Bottom-Strang (C) ermöglicht. Das Primerpaar NULL enthält kein von BsrDI-Schnittstellen eingeschlossenes CRE. (B) Verifizierung der Anwesenheit der BsrDI-Schnittstellen in der Vektor-DNA mittels Restriktionsverdau mit BsrDI. Die Vektoren pZAJ (oben) und pJAZ (unten), die keine BsrDI-Schnittstelle enthalten, dienen als Kontrolle. Enthält der Vektor das Tandem-BsrDI-Insert wird er von der Restriktionsendonuklease geschnitten und liegt in seiner linearen Form vor. Für jedes verwendete Insert (UNO-W, UNO-C, NULL) wurden drei Klone getestet. Mit einem schwarzen Stern markierte Klone wurden zusätzlich mittels Sequenzierung verifiziert und für alle weiteren Versuche verwendet, mit einem grauen Stern markierte Klone wurden zwar durch Sequenzierung verifiziert, fanden aber im Rahmen dieser Arbeit keine weitere Anwendung.

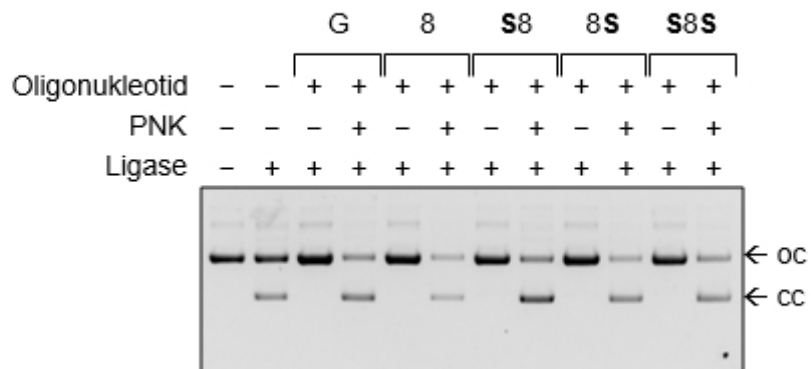


Anhang II-6 Klonierung der Vektoren mit OGG1-shRNA-Insert. (A) Linearisierung des Vektors pENTR/pSuper+ mit den Restriktionsendonukleasen BglIII und HindIII. Der Doppelverdau resultiert in einem 2537 bp DNA-Fragment, das für die weitere Klonierung verwendet wird und mit einem Pfeil gekennzeichnet ist, und einem 750 bp DNA-Fragment. Um sicherzustellen, dass der Verdau mit beiden Enzymen vollständig abgelaufen ist, wurden jeweils Reaktionsansätze, die mit nur einer der beiden Restriktionsendonukleasen unter identischen Reaktionsbedingungen inkubiert wurden, aufgetragen. (B) Verifizierung des Einbaus des DNA-Inserts in die Vektor-DNA mittels PCR. Da der Ausgangsvektor pEpS durch seinen hohen CG-Gehalt nicht unter den verwendeten PCR-Bedingungen amplifiziert werden konnte, wurde als Kontrolle für die Polymeraseaktivität der Vektor pDsRed amplifiziert (links). Von jedem OGG1-sh-Konstrukt wurden jeweils 5 Klone getestet. Die mit einem Stern markierten Klone wurden zusätzlich durch Sequenzierung verifiziert.

## Anhang III

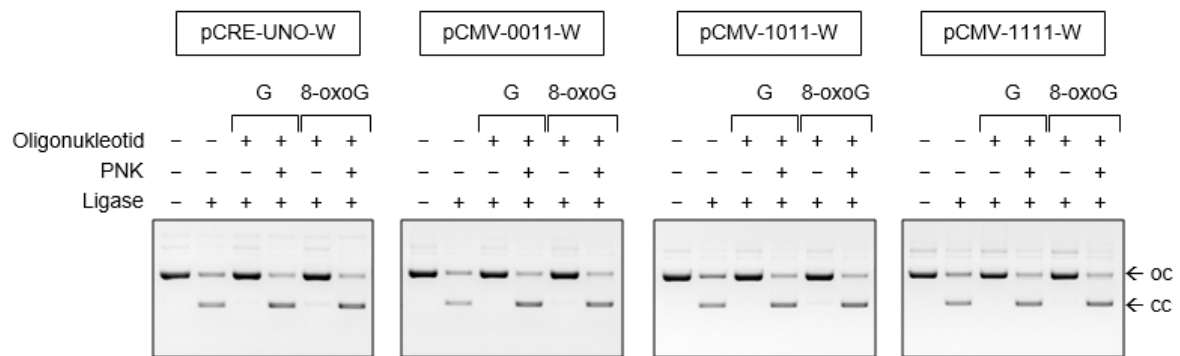


Anhang III-1 Konstruktion von Vektoren mit einem oder drei 8-oxoG im 5'-UTR des EGFP-Gens der Vektoren pZAJ und pJAZ. (A) Repräsentative Agarosegele nach der Strangaustausch-Reaktion der durch Nb.BsrDI doppelt-eingeschnittenen Vektor-DNA. Der Strangaustausch erfolgte mit einem synthetischen, Guanin (G) - bzw. 8-oxoG- oder 3 8-oxoG-enhaltenden Kompetitor-Oligonukleotid. Die Positionen der offenen zirkulären (oc) und der kovalent geschlossenen Plasmidform (cc) sind jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet. (B) Repräsentative Agarosegele von Plasmiden mit 8-oxoG innerhalb des nicht-transkribierten DNA-Strangs (NTS) des 5'-UTRs des EGFP-Gens nach Inkubation mit Fpg. Die Pfeile kennzeichnen jeweils die Position der offenen zirkulären (oc) und der kovalent geschlossenen (cc) Plasmidform.

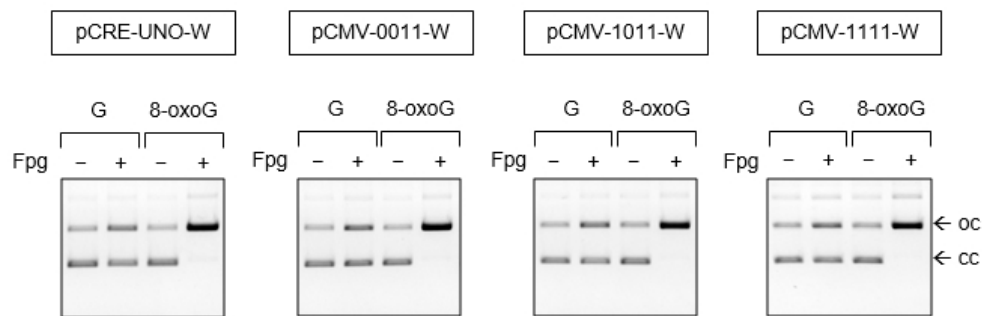


Anhang III-2 Konstruktion von Vektoren mit einem einzelnen, von Phosphothioaten flankierten 8-oxoG im NTS des EGFP-Gens. Repräsentative Agarosegele nach der Strangaustausch-Reaktion der durch *Nt.Bpu10I* doppelt-ingeschnittenen Vektor-DNA. Der Strangaustausch erfolgte mit einem synthetischen, Guanin (G) - bzw. 8-oxoG-enhaltenden Kompetitor-Oligonukleotid. Substitution des 8-oxoG-flankierenden Phosphosäureesters durch ein Phosphothioat ist mit „S“ gekennzeichnet. Die Positionen der offen zirkulären (oc) und der kovalent geschlossenen Plasmidform (cc) sind jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet.

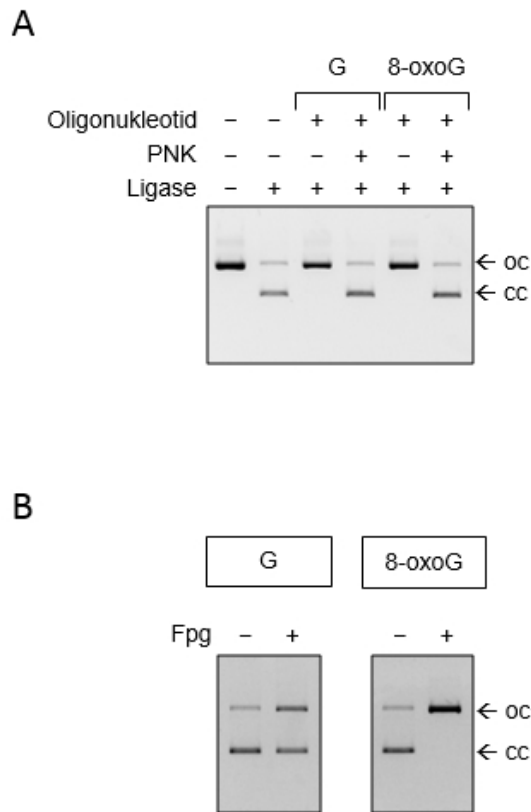
A



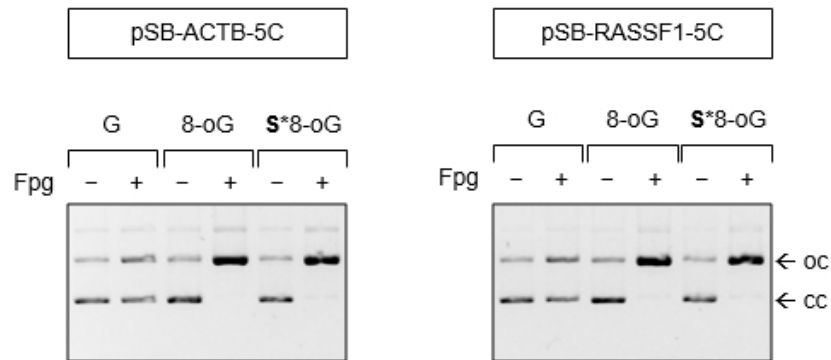
B



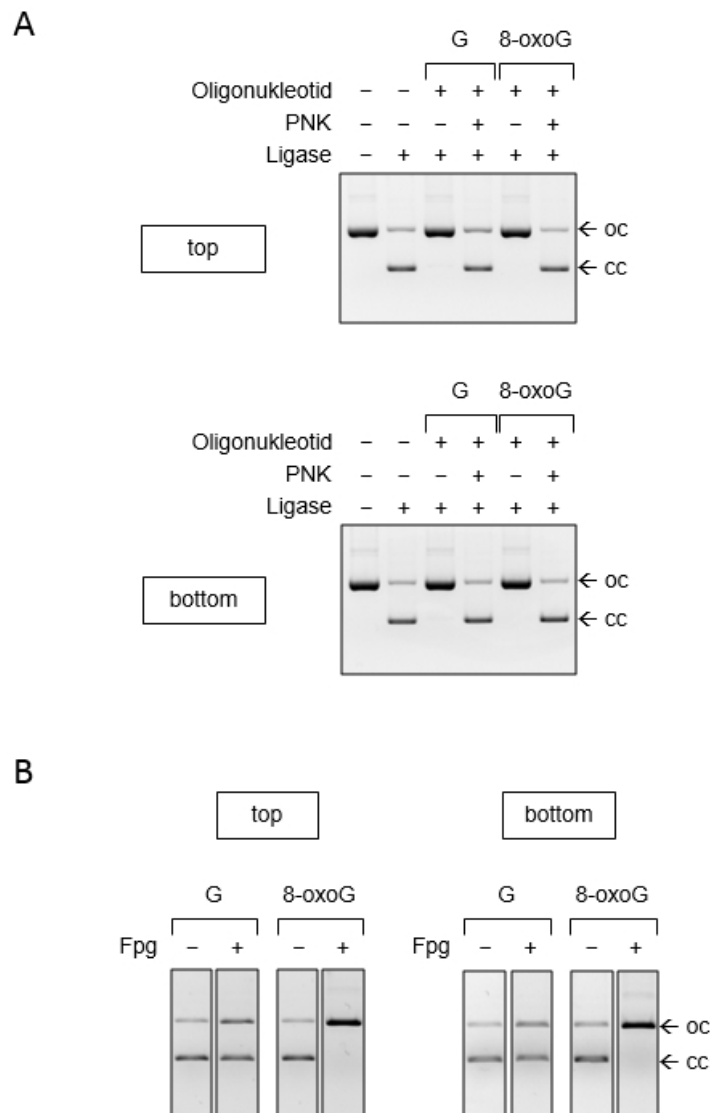
Anhang III-3 Konstruktion von Vektoren mit einem einzelnen 8-oxoG im NTS des EGFP-Gens unter Kontrolle verschiedener Deletionsvarianten des CMV-IE-Promotors. (A) Repräsentative Agarosegele nach der Strangaustausch-Reaktion der durch Nt.Bpu10I doppelt-ingeschnittenen Vektor-DNA. Der Strangaustausch erfolgte mit einem synthetischen, Guanin (G) - bzw. 8-oxoG-enhaltenden Kompetitor-Oligonukleotid. Die Positionen der offenen zirkulären (oc) und der kovalent geschlossenen Plasmidform (cc) sind jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet. (B) Repräsentative Agarosegele von Plasmiden mit 8-oxoG innerhalb des nicht-transkribierten DNA-Strangs (NTS) des EGFP-kodierenden Bereichs nach Inkubation mit Fpg. Die Pfeile kennzeichnen jeweils die Position der offenen zirkulären (oc) und der kovalent geschlossenen (cc) Plasmidform.



Anhang III-4 Konstruktion von Vektoren mit einem einzelnen 8-oxoG im NTS des EGFP-Gens eines Vektors mit kompletter Deletion des CMV-IE-Promotors. (A) Repräsentatives Agarosegel nach der Strangaustausch-Reaktion der durch *Nt.Bpu10I* doppelt-ingeschnittenen Vektor-DNA. Der Strangaustausch erfolgte mit einem synthetischen, Guanin (G) - bzw. 8-oxoG-enhaltenden Kompetitor-Oligonukleotid. Die Positionen der offenen zirkulären (oc) und der kovalent geschlossenen Plasmidform (cc) sind jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet. (B) Repräsentative Agarosegele von Plasmiden mit 8-oxoG innerhalb des nicht-transkribierten DNA-Strangs (NTS) des EGFP-kodierenden Bereichs nach Inkubation mit Fpg. Die Pfeile kennzeichnen jeweils die Position der offenen zirkulären (oc) und der kovalent geschlossenen (cc) Plasmidform.

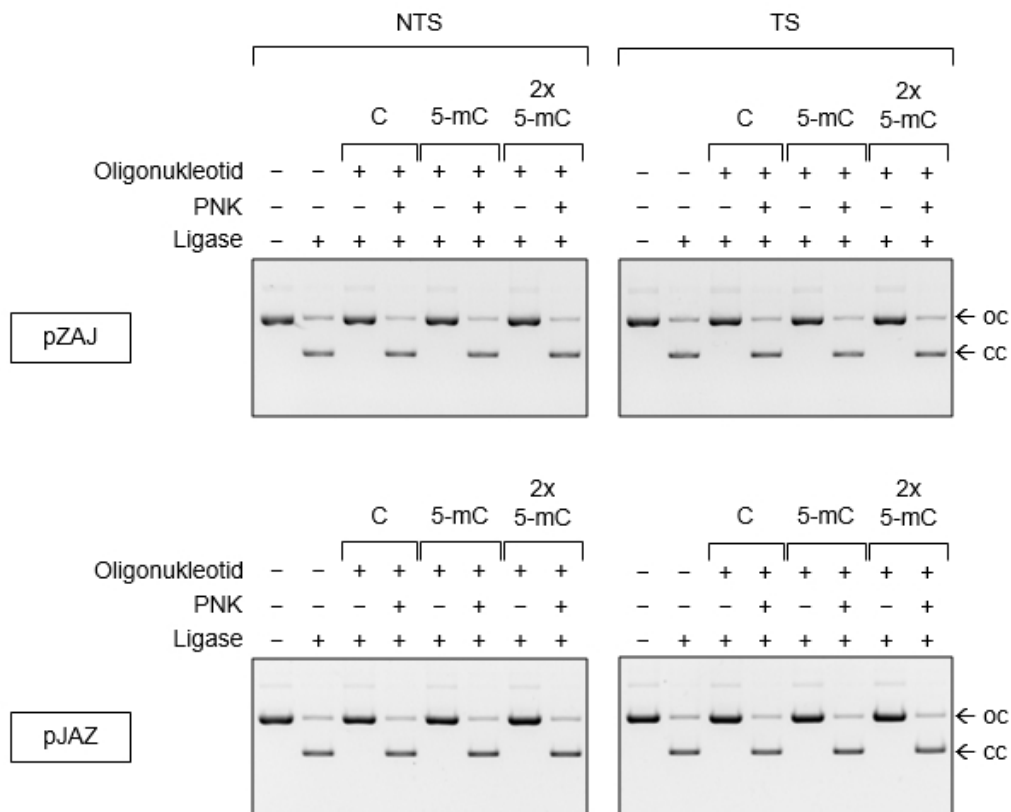


Anhang III-5 Konstruktion von Vektoren mit einem einzelnen 8-oxoG im NTS des EGFP-Gens unter Kontrolle humaner Promotoren. Repräsentative Agarosegele von Plasmiden mit 8-oxoG innerhalb des nicht-transkribierten DNA-Strangs (NTS) des EGFP-kodierenden Bereichs nach Inkubation mit Fpg. Der Strangaustausch erfolgte mit einem synthetischen, Guanin (G) - bzw. 8-oxoG-enhaltenden Kompetitor-Oligonukleotid. Substitution des 8-oxoG-flankierenden Phosphosäureesters durch ein Phosphothioat ist mit „S“ gekennzeichnet. Die Pfeile kennzeichnen jeweils die Position der offen zirkulären (oc) und der kovalent geschlossenen (cc) Plasmidform.

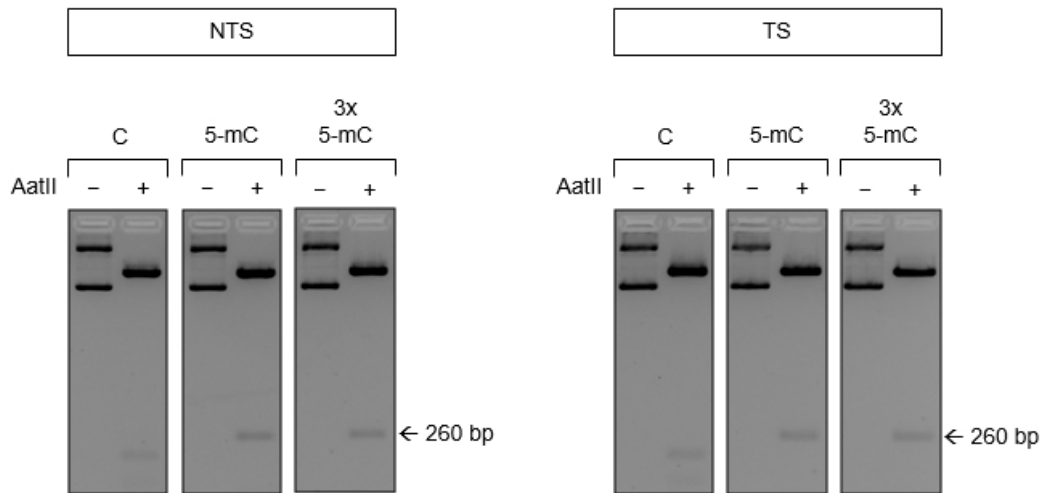


Anhang III-6 Konstruktion von Vektoren mit einem einzelnen 8-oxoG im untranskribierten Bereich. (A) Repräsentatives Agarosegel nach der Strangaustausch-Reaktion der durch Nb.BsrDI doppelt-eingeschnittenen Vektor-DNA. Der Strangaustausch erfolgte mit einem synthetischen, Guanin (G) - bzw. 8-oxoG-enhaltenden Kompetitor-Oligonukleotid. Die Positionen der offenen zirkulären (oc) und der kovalent geschlossenen Plasmidform (cc) sind jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet. (B) Repräsentative Agarosegele von Plasmiden mit 8-oxoG innerhalb des nicht-transkribierten (NTS) oder transkribierten DNA-Strangs (TS) des untranskribierten Bereichs nach Inkubation mit Fpg. Die Pfeile kennzeichnen jeweils die Position der offenen zirkulären (oc) und der kovalent geschlossenen (cc) Plasmidform.

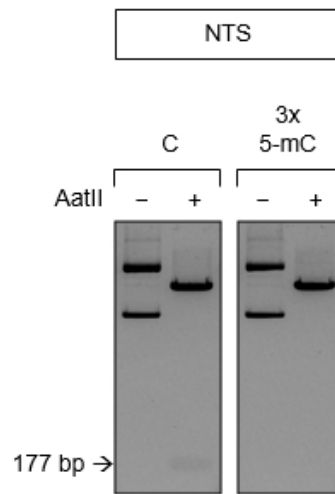




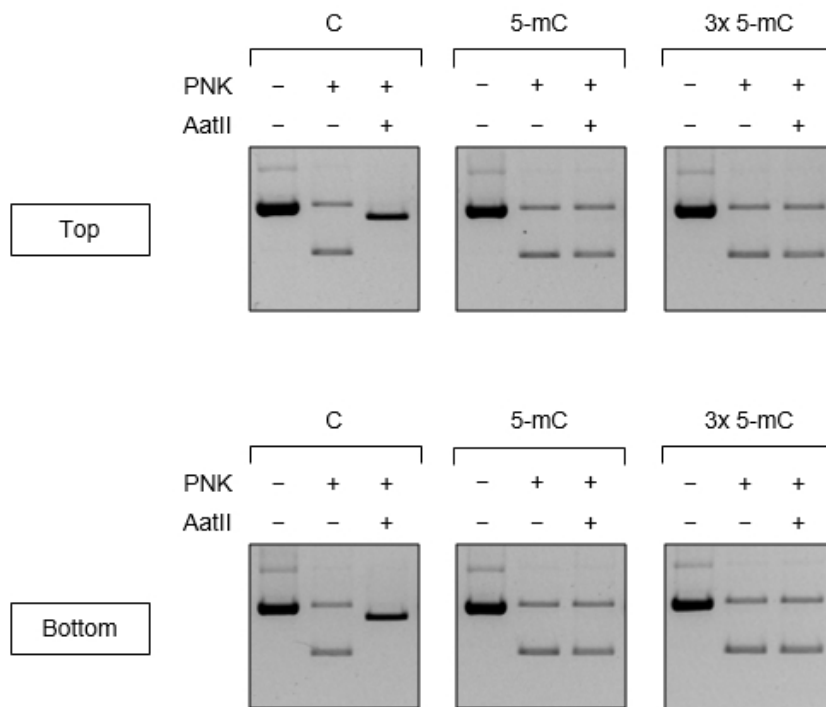
Anhang III-7 Konstruktion von Vektoren mit einem oder zwei 5-mC im 5'-UTR des EGFP-Gens der Vektoren pZAJ und pJAZ. (A) Repräsentatives Agarosegel nach der Strangaustausch-Reaktion der durch Nb.BsrDI doppelt-ingeschnittenen Vektor-DNA von pZAJ (oben) und pJAZ (unten). Der Strangaustausch erfolgte mit einem synthetischen, Cytosin (C) - bzw. 5-mC- oder zwei 5-mC-enhaltenden Kompetitor-Oligonukleotid. Die Positionen der offen zirkulären (oc) und der kovalent geschlossenen Plasmidform (cc) sind jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet.



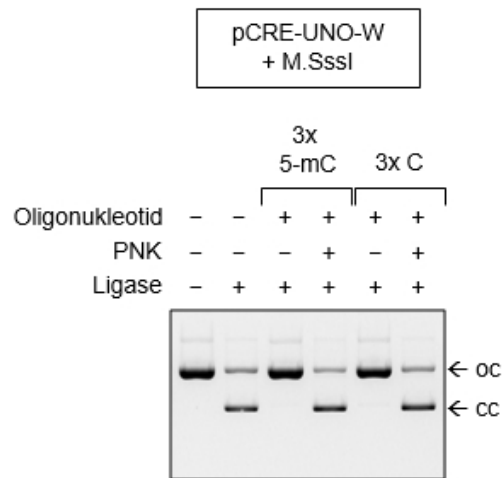
Anhang III-8 Konstruktion von Vektoren mit einem oder drei 5-mC innerhalb eines CRE des CMV-IE-Promotors. Repräsentative Agarosegele von Plasmiden mit keinem (C), einem oder drei 5-mC innerhalb des top-Strangs oder bottom-Strangs des CMV-IE-Promotors nach Inkubation mit der methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease AatII, deren Erkennungssequenz der CRE-Sequenz entspricht. Verdau eines Vektors ohne DNA-Basenmodifikation innerhalb CRE liefert vier Fragmente mit den Größen 4568 bp, 177 bp, 83 bp und 53 bp, von denen die letzteren zwei aufgrund der Gelauflösung nicht detektierbar sind. 5-MC innerhalb des durch Strangaustausch modifizierten CREs führt zur Entstehung von drei linearen Fragmenten der Größe 4568 bp, 260 bp und 53 bp.



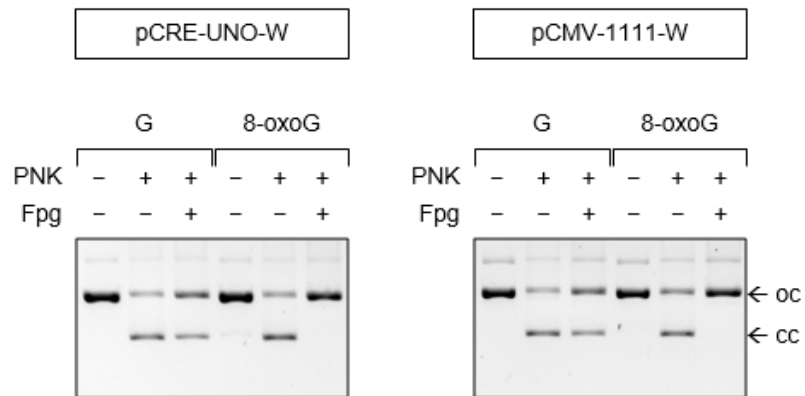
Anhang III-9 Konstruktion von Vektoren mit drei 5-mC innerhalb eines CRE des halb-deletierten CMV-IE-Promotors. Repräsentative Agarosegele von Plasmiden mit keinem (C) oder drei 5-mC innerhalb des top-Strangs des halben CMV-IE-Promotors (pCMV-0011-W) nach Inkubation mit der methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease AatII, deren Erkennungssequenz der CRE-Sequenz entspricht. Verdau dieses Vektors ohne DNA-Basenmodifikation innerhalb CRE liefert zwei Fragmente mit den Größen 4487 bp und 177 bp. 5-MC innerhalb des durch Strangaustausch modifizierten CREs führt zur Entstehung eines einzelnen linearen Fragments bei 4664 bp.



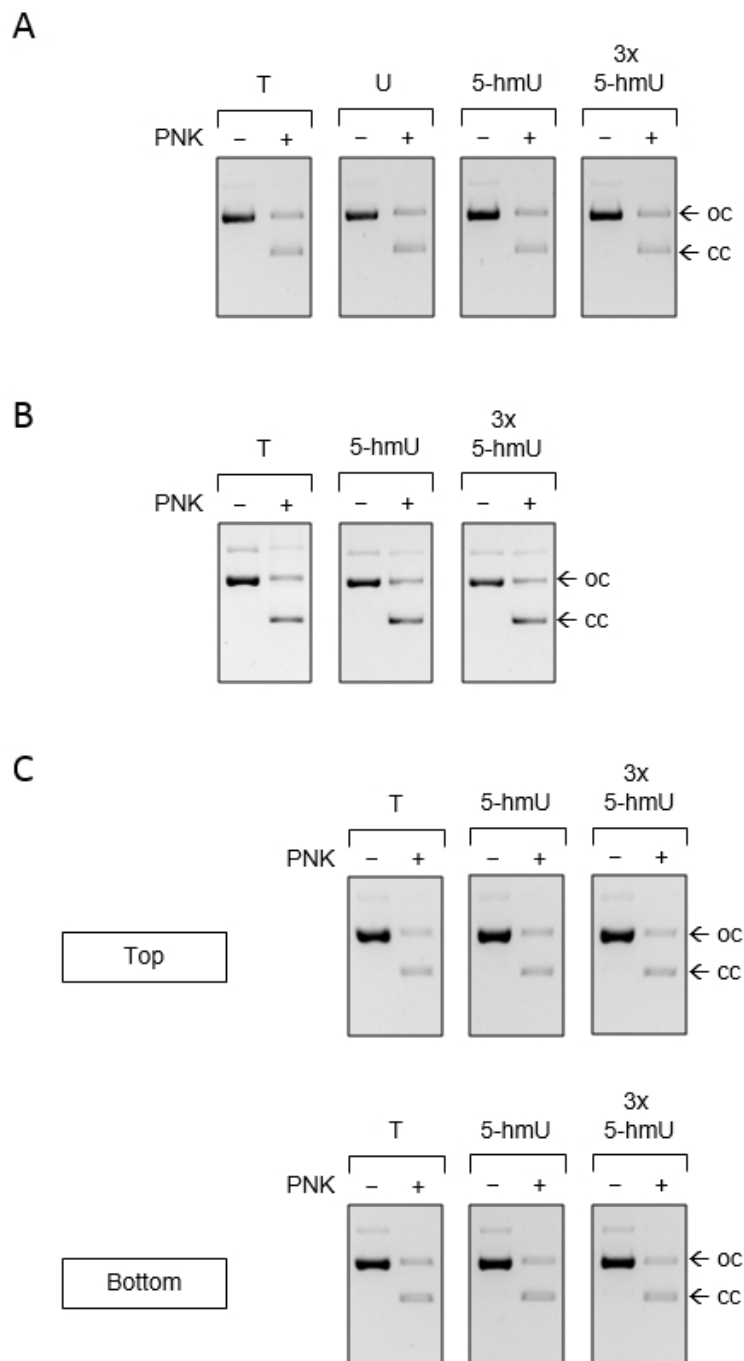
Anhang III-10 Konstruktion von Vektoren mit drei 5-mC innerhalb des einzelnen CRE des CRE-UNO-Promotors. Repräsentative Agarosegele von Plasmiden mit keinem (C), einem oder drei 5-mC innerhalb des top-Strangs oder des bottom-Strangs des CRE-UNO-Promotors nach Inkubation mit der methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease AatII, deren Erkennungssequenz der CRE-Sequenz entspricht. Verdau dieses Vektors ohne DNA-Basenmodifikation innerhalb CRE liefert ein lineares Fragment von 4408 bp. Eine Probe, in der die Strangaustausreaktion in Abwesenheit von Polynukleotidkinase (PNK) durchgeführt wurde, diente als zusätzliche Kontrolle für einen vollständigen Oligonukleotidaustausch.



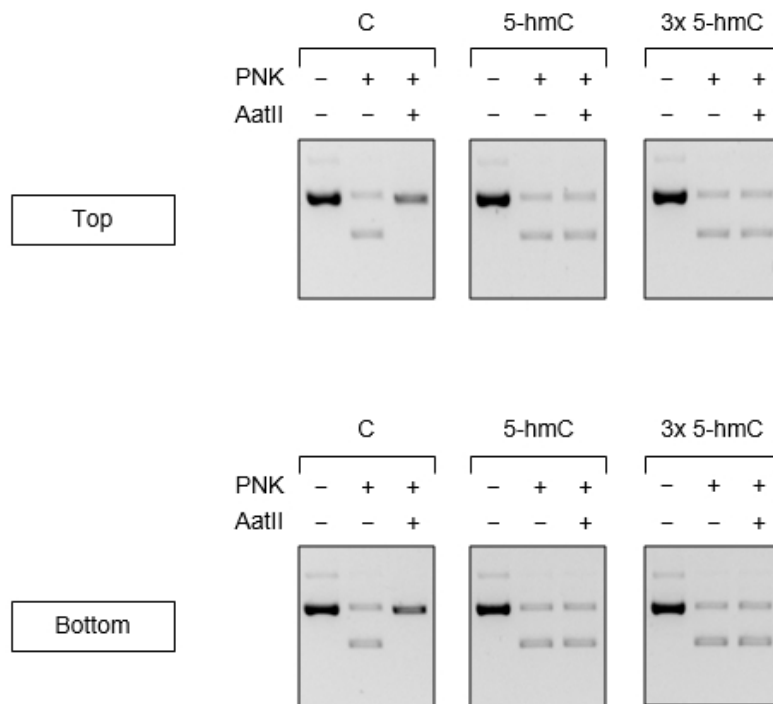
Anhang III-11 Konstruktion von Vektoren mit drei Hemimethylierungen innerhalb des einzelnen CRE des *in vitro* methylierten pCRE-UNO-Vektors. Repräsentatives Agarosegel nach der Strangaustausch-Reaktion der durch Nb.BsrDI doppelt-ingeschnittenen Vektor-DNA. Der Strangaustausch erfolgte mit einem synthetischen, der 5-mC enthaltenden bzw. einem Cytosin-enthaltenden (C) Kompetitor-Oligonukleotid. Die Positionen der offen zirkulären (oc) und der kovalent geschlossenen Plasmidform (cc) sind jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet.



Anhang III-12 Konstruktion von Vektoren mit einem einzelnen 8-oxoG innerhalb von CRE. Repräsentative Agarosegele von Plasmiden mit 8-oxoG innerhalb des top-Strangs eines CRE des minimalen (pCRE-UNO) Promotors oder des vollen CMV-IE-Promotors (pCMV-1111) nach Inkubation mit Fpg. Die Pfeile kennzeichnen jeweils die Position der offen zirkulären (oc) und der kovalent geschlossenen (cc) Plasmidform.

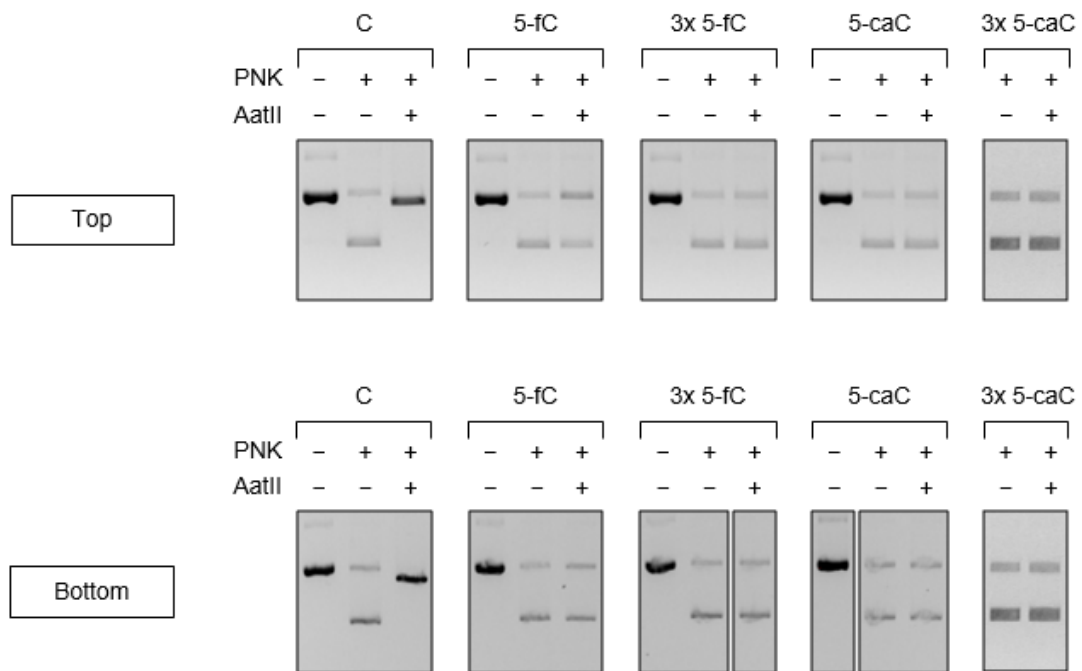


Anhang III-13 Konstruktion von Vektoren mit einem oder drei 5-hmU. Repräsentative Agarosegele der Vektoren mit keinem (T), einem oder drei 5-hmU nach der Strangaustauschreaktion in Ab- oder Anwesenheit von Polynukleotidkinase (PNK). Die Pfeile kennzeichnen jeweils die Position der offenen zirkulären (oc) und der kovalent geschlossenen (cc) Plasmidform. (A) Modifikation befindet sich im NTS des 5'-UTRs des EGFP-Gens (pZAJ-5W). Ein Vektor mit Uracil an derselben Position wurde als zusätzliche Kontrolle hergestellt. (B) Modifikation befindet sich im top-Strang innerhalb eines CRE des CMV-IE-Promotors (pCMV-1111). (C) Modifikation befindet sich im top-Strang oder im bottom-Strang im einzelnen CRE des CRE-UNO-Promotors (pCRE-UNO).



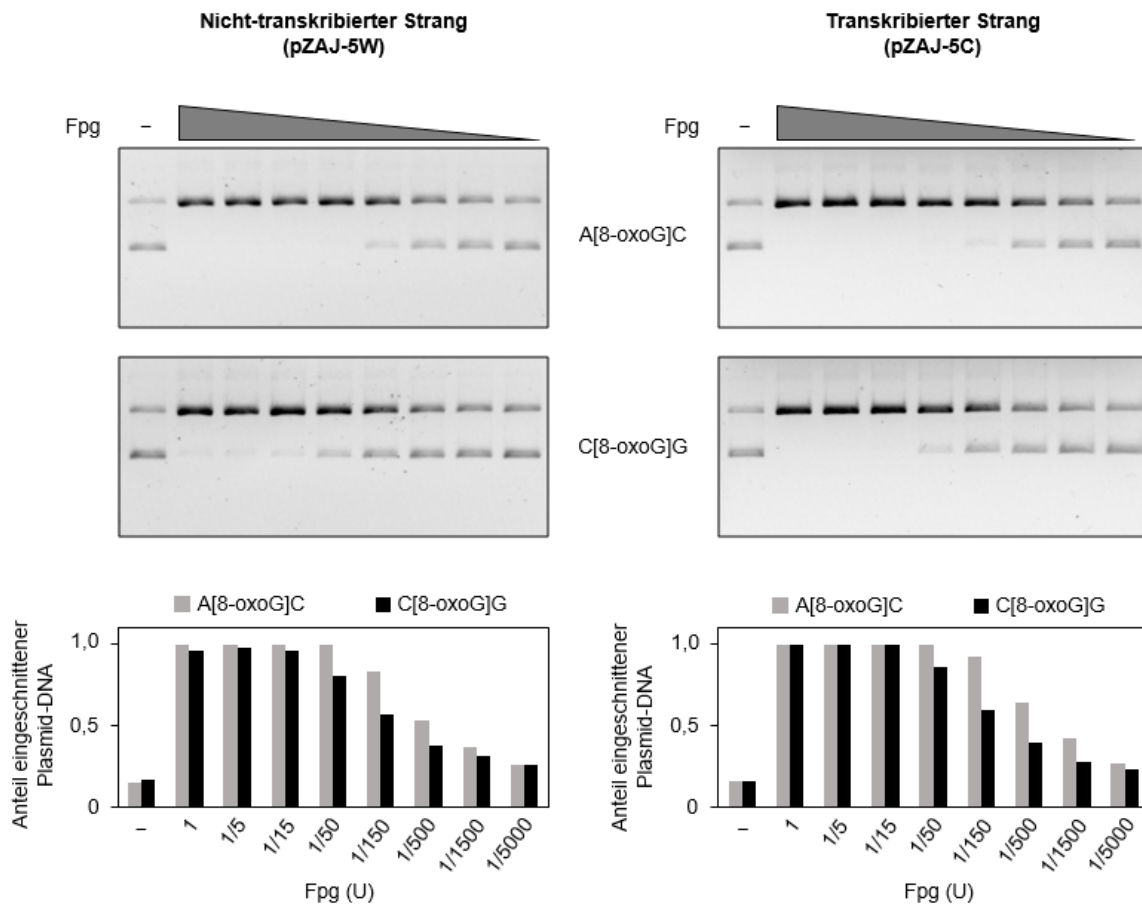
Anhang III-14 Konstruktion von Vektoren mit einem oder drei 5-hmC innerhalb von CRE. Repräsentative Agarosegele der Vektoren mit keinem (T), einem oder drei 5-hmC im top- oder bottom-Strang des CRE des CRE-UNO-Promotors nach Inkubation mit der Restriktionsendonuklease AatII. Eine Probe, in der die Strangaustauschreaktion in Abwesenheit von Polynukleotidkinase (PNK) durchgeführt wurde, diente als zusätzliche Kontrolle für einen vollständigen Oligonukleotidaustausch.



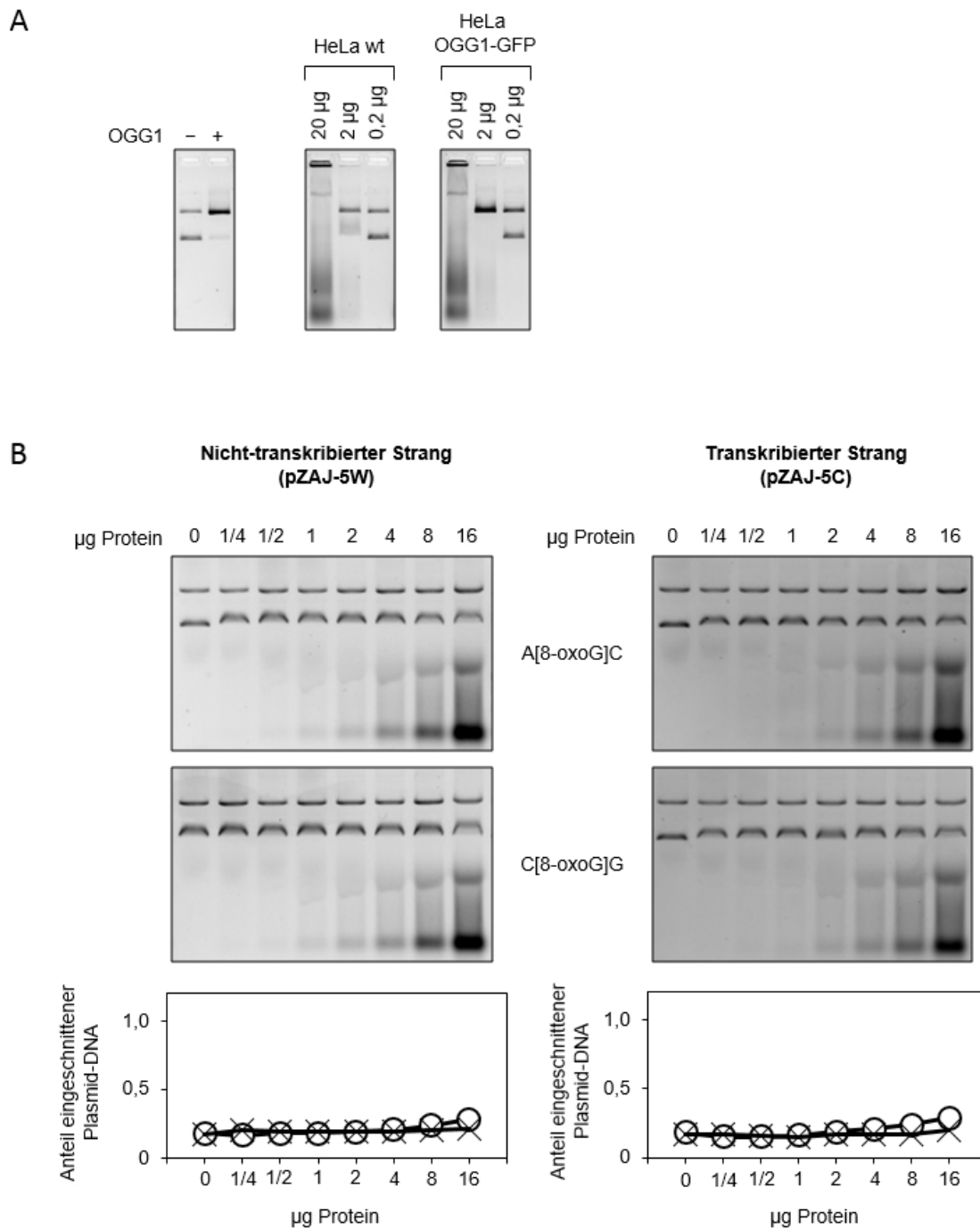


Anhang III-15 Konstruktion von Vektoren mit einem oder drei 5-fC oder 5-caC innerhalb von CRE. Repräsentative Agarosegele der Vektoren mit keinem (T), einem oder drei 5-fC oder 5-caC im top- oder bottom-Strang des CRE des CRE-UNO-Promotors nach Inkubation mit der Restriktionsendonuklease AatII. Eine Probe, in der die Strangaustauschreaktion in Abwesenheit von Polynukleotidkinase (PNK) durchgeführt wurde, diente als zusätzliche Kontrolle für einen vollständigen Oligonukleotidaustausch.

## Anhang IV



Anhang IV-1 Einfluss des lokalen DNA-Sequenzkontexts von 8-oxoG auf die Einschnittsaktivität von rekombinantem Fpg. Repräsentative Agarosegele (oben) und quantitative Analyse des Anteils an eingeschnittener Plasmid-DNA (unten) von Vektoren, die ein einzelnes 8-oxoG in verschiedenen DNA-Sequenzkontexten im nicht-transkribierten (NTS, links) oder transkribierten DNA Strang (TS, rechts) des 5'-UTRs des EGFP-Gens enthalten, nach deren Inkubation mit rekombinanten Fpg.



Anhang IV-2 Einfluss des lokalen DNA-Sequenzkontexts eines einzelnen 8-oxoGs auf dessen Exzision in HeLa-Wildtyp-Zellen. (A) Repräsentative Agarosegele von Vektoren die mit Extrakten von HeLa-Wildtyp oder OGG1-GFP-überexprimierenden HeLa-Zellen. Rekombinantes OGG1 wurde als Positivkontrolle verwendet. (B) Repräsentative Agarosegele (oben) und quantitative Analyse des Anteils an eingeschnittener Plasmid-DNA (unten) von Vektoren die ein einzelnes 8-oxoG in verschiedenen DNA-Sequenzkontexten im nicht-transkribierten (NTS, links) oder transkribierten DNA-Strang (TS, rechts) des 5'-UTRs des EGFP-Gens enthalten, nach deren Inkubation mit Zellextrakten aus HeLa-Wildtyp-Zellen.



GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGCTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGCCATCAAGGTGA
ACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTCTGCT
CCCGGACAACCCTACTCGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAAGACCCCAACGAGAAGCGCATACATGGTCTCGTGGAGTTCTGTGACCGCC
GCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTACTAGCATCTACACATTGATCCTAGCAGAAGCACAGGCTGCAGGGTGACGGTCCATC
CCGCTCTCTGGGCACAAGGCATGGGCAGCGTGCATCATCTGCTCTCCACCTCCGCGGGGAAGCCATGGCTCTGGATCTGCTTCATGAGTG
AGTACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCGAGTGCAGCTCCGCGGGCCGGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGC
CATACCACATTTGTAGGGTTTTACTTTGCTTTAAAAAACCTCCACACACTCCCCCTGAACTGAAACATAAAATGAATGCAATTTGTGTTA
ACTTGTATTATGCAGCTTATAATGGTTACAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAAATAAAGCATTTTTTTTACTGCATTTAGTTGTGG
TTTGTCCAAACTCATCAATGATCTTAAACGCGTAAATTTGAAGCGTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAAATCAGCTCATT
TTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGT
CCACTATTAAAGCAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGCTCTATCAGGAGCGATGGCCACTACGTTGAAACCATCACCTAATCAAGTT
TTTTGGGGTGCAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGAAACCCATAAGGGAGCCCGGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCAACGTGGCGAG
AAAGGAAGGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACAGCTGCGCGTAACCACACACCCGCGCGCTTAAT
CGCCTGATGAGACATAAACCTGATAAAATGCTTCAATAATATTGAAAGAAAGAAAGCTCCTGAGCGGAAAGAAACAGCTGGAATTTGTGTCAG
TTAGGGTGTGGAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAGTCCCAG
GCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCGCCCCTAACTCC
GCCAGTTCCGCCCATTTCTCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGACAGGGCCGAGGCCCTCGGCCCTGAGCTATTCCAGAAG
TAGTGAAGAGCTTTTGTGATAAACCGGGTTCGGTCAAGACTCAGCATGAGGATGAGGATCGTTTCGCATACCCACCGAGCCCATTTGGGCAAGATTG
CACGCAGGTCTCCGCGCGCTGGGTGGAGAGGCTATTCCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCGGTGTTCCGGC
TGTGAGCGCAGGGGCGCCGGTCTTTTTGTCAAGACCACCTGTCGGTGCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGCTATCGTGGCT
GGCCACGACGGGCGTCTTGGCGAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCAGGGGCAGGAT
CTCTGTGCATCTGCTGCTGCCGAGAAAGTATCCATGCTGAGTGGCTGATGCTATGGCGCGGTCATACGCTTGATGCTGCTTACCCCAT
TCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCAGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGG
GCTCGCGCCAGCCGAACGTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGAGCGAGGATCTCGTGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGGCGAAT
ATCATGTTGGAANAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCAGCTGTCGCTGGTGGTGGCGGACCCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTTCCCGTG
ATATTGCTGAAGAGCTTTGCGCGGCAATGGCTGACCGCTTCTCTGCTGTTTACGTTATCGGCTATCGCGCTCCCATTCCGAGCGCTTCTTATCG
CCTTCTTGACGAGTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGTTTCAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTTGATTCCACC
CGCCTTCTATGAAAGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGAGCGCGGCTGGATGATCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGC
CCACCCTAGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATCCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCAC
GGTGTGGGTGGCTTTTGTGATAAACCGGGTTCGGTCCAGGCTCAGCATCTGTCGATACCCACCGAGCCCATTTGGGCGCAATGAGCC
GCGTTTCTTCTTTCCCAACCCACCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCCGGGCGGCAGGCCCTGCCATAGCCTC
AGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAA
ATCCCTTAAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTGCAGCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTCTTGAGATCTTTTTTTCTGCGCTAATCT
GCTGCTTGCACAACAAAACACCCGCTACCAGCGGTGTTTGTTCGCGAGTCAAGAGCTCAACACTTTTTTCCGAAGTAACTGGCTTCAG
CAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAATCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTG
CTAATCCTGTTACCAGTGGCTGTGCGAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGCGCAGCGGT
CGGGCTGAACGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGGGAACAGCTTACCCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGC
CAGCTTTCCGAAGGGGATAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAAGCGGCTCGAAGCAGGAGCGCAGGAGGCTTTCCAGGGGAAACGCC
TGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGGAGCTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAAGGGGCGGAGCCTATGAAAAACG
CCAGCAACGCGGCTTTTTACGTTTCTGGCCTTTTGTCTGCTTGTCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATCTGTGGATAACCG
TATTACGCCATGCAT / /

>pZAJ-UPS-W | len 4911 bp

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCAATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGC
TGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCAATAATGACGATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG
AGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGC
CTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCACTGCTATTACCATGGTATGCGGTTT
TGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGAATCAGCGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTGTTTGGCACC
AAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCTAACAACCTGCCCCATTTGACGCAAAATGGGCGGTGAGGCGTGTACGTTGGGAGGTTGATAAGCAG
AGCTGGTTTGTGAAACCGTCAAGTCCGCTAGCGCTACCGGTCGCCACCATGGTGAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGTGGTGCCCATCC
TGGTGCAGCTGGACGGCAGCTAAACGGCCACAAGTTAGCGTGTCCGGCAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAATTT
CATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTCCCTGGCCACCCCTGTCGACCCCTGACCTACCGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCC
ATGAAGCAGCACGACTTTCTCAAGTCCGCCATGCCCCAAGGAGGCTACGTCGCGAGTCAAGGCGCACCACTTCTTCAAGGACGGCAACTCAAGACCC
GCGCCGAGGTGAAGTTCCGAGGGCGACACCCGTTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCAAA
GCTGGAGTACAATAACAAGCCACAACGCTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATC
GAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGAGGGCCCGTGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCA
CCCAGTCCGCGCTGAGAAAAGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTGAACCTTCTGAGTTCGTTGACCGCCGCGGATCACTCTGGCATGGA
CGAGCTGTACAAGTACTAGCATCTACACATTGATCCTAGCAGAAGCACAGGCTGCAGGGTGCAGGTTCCATCCCGCTCTCTGGGCACAAGGCAT
GGCAGCGTGCCATCATCTGCTCTCCACCTCCGCGGGGAAGCCATGGCTCTGGATCTGCTTATGAGTGAAGTACTCAGATCTCGAGCTCAAG
CTTCGAATTTGAGTGCAGCTACCGGTTACCGCGGGCCGGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTT
ACTTGTCTTAAAAAACCTCCACACCTCCCGCTGAACTCCCAACATAAAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAATGAAAT
GGTTACAAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCAAAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACTCATCAATGTAT
CTTAACCGGTAATTTGTAAGCGTTAATATTTTTGTTAAAATTCGGGTTAAATTTTTGTTAAAATCAGCTCATTTTTTAAACCAATAGGCCGAAATCG
GCAAAATCCCTTATAAATAAAGAAATAGACGGAGATAGGGTGTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAAACGTGGACTC
CAACGTCAAAGGGCGAAAACCTCTATCAGGCGATGGCCACTACGTGAACCTCACCCATAACCAAGTTTTTTTGGGGTGTGAAAGTCCCGGATG
GCATAAATCGGAACCCTAAGGGAGCCCGGATTTAGAGCTTGAAGGGAAAGCCGGCAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAG
GAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGTCAACGCTGCGCGTAACCCACACCCCGCGCTTAATGCGCGCTACAGGGCGCGCTAGG
TGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTTCAAAATACATTTCAAATATGTAATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGA
TAAATGCTTCAATAAATTTGAAAAGGAAGAGTCTGAGGCGGAAAGAACACTGTGGAATGTGTGAGTTAGGTTGGGTTGAAAGTCCCGG
CTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAGTCCCAGGCTCCCGCAGGCAGAAGTATG
CAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCCATTTCTCCG
CCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGACAGGGCCGAGGCCCTCGGCTCTGAGCTATTTCCAGAAGTGTGAGGAGGCTTTTTGGAGG
CTTAGGCTTTTGCAAAAGATCGATAAGAGACAGGATGAGGACTGCTTTCCGATGATGAAACAAGATGGATGTCACGCAGGTTCTCCGCGCGCTT
GGTGGAGAGGCTATTCCGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTGATGCCCGGTTTCCGCTGTGAGCGCAGGGGCGCCCGGTT
CTTTTTGTCAAGACCACCTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCTTCTTGGC

CAGCTGTGCTCGACGTTGCTACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTCATCTCACCTTGCTCC  
TGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCTATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGC  
ATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACCTGTTCC  
CCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCGACGCGGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGCTGCTTCCGCAATATCATGGTGGAAAAATGGCCGCTT  
TTCTGGATTATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATGCTGAAGAGCTTGCGCGC  
GAATGGGCTGACCGCTTCTCTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTCTTTCGACGAGTTCTTCTGAG  
CGGGACTCTGGGTTTCAAAATGACCGCAAGCGCAACCTGACGATCAGGATTTTCGATTCACCCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCT  
TTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCGGCTGGATGATCCTCCAGCGGGGATCTCATGTGGAGTTCTTCGCCACCCTAGGGGGAGGCTAACTG  
AAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAAACGACCGGTGTTGGGTGCTTTGTTTATAA  
ACGCGGGGTTTCGGTCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCCATTTGGGGCAATAACGCCCGCTTCTTCTTTTCCCCACCC  
CACCCCCAAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACTCGAGGGGCGGAGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTAGA  
TTGATTTAAAACCTCATTTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACTGAGTTTTTCGTT  
CCACTGAGCGTACAGCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACA  
CCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTG  
TCCTTCTAGTGTAGCTAGTTAGGACCCACCTTCAAAGGATCTGTGACCGCTACATACCTGCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG  
TGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGTTCTGTG  
ACACAGCCAGCTTGGAGCGAAGCAGCTACACCGAAGTACAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGGAAGGGGAGAAAG  
CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCGAGGTCGGAACAGGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTCTGTGCG  
GTTTCGCCACCTCTGACTGTAGCGTCTGATTTTTGTGATCTGCTCGAGGGGCGGAGCCCTATGAAAAACGCGCAACCGCCCTTTTTACG  
TTCTGCGCTTTTTGTGCGCTTTTTGCTCACATGACATGTCTTCGCTAGCACGATGTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGG  
ATAACCGTATTACCGCCATGCAT //

>pZAJ-UPS-C |len 4911 bp

TAGTTATAATAGTAACTCAATTACGGGGTTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGC  
TGACCGCCCAACGACCCCGCCACTTACGCTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG  
AGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGC  
CTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTTCATCGCTATTACCATGGTATGCGGTTT  
TGGCAGTACATCAATGGCGGTGATAGCGGTTTGTACTCAGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCAGC  
AAAATCAAACGGGACTTTCCAAAATGTCTGAACAACTCCGCCCATTTAGCGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGTATATAAGCAG  
AGCTGGTTTTAGTGAACCCGTAGCTAGCTACCGGTCGCGCCACTTGGTGGAGCAAGGGCGAGGAGTGTTCACCGGGGTGTATGCCATCC  
TGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACCGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTT  
CATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCCGCTCCCTGGCCACCCCTCGTGACCCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCC  
ATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCC  
GCGCCGAGGTGAAGTTTCCAGGGCGACACCCCTGGTGAACCCGATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGACAA  
GCTGGAGTACAATAACAAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATC  
GAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACAGCAGAACACCCCATCGCGCAGCGCCCGTGTCTGCTGCCGCAACCACTTACCTGAGCA  
CCCAGTCCGCGCTGAGCAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCAGTGTCTGAGTTCGTGAGCTTGTGAGCTTGTGAGCTTGTGAGCTTGTGAGCT  
CGAGCTGTACAAGTACTAGCATCTACACATTTGATCCTAGCAGAAGCAAGGCTCGAGGTTGACGCTTCCACCGCTTCTCCTGGGCAAGGCAT  
GGGCGCGTCCATCATCTGCTCCTCCACCTCCGGCGGGAAGCCATGGCTCTGGATCTGCTTTCATGAGTGTGAGTACTCAGATCTCGAGCTCAAG  
CTTCGAATTTGCGAGTCCAGGTTACCGGGGCGGGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATATAACAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTT  
ACTTGCCTTTAAAAACCTCCACACCTCCCTGAACTGAAACATAAAATGAATGAATGTAATGTTGTTAACTGTTTATTCAGCTTATAAT  
GGTGAAGAGCAAAATAGCAATAGCAATAACAATTTCAAAAATAAAGCATTTTTTTCTAGCTTCTAGTTGTGGTTTTGTCAAAGTCAATCAATG  
CTTAAACGCGTAAATTTGAAGCGTAAATTTTTGTTAAAATTCGCGTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTTAAACAAATAGGCCGAAATCG  
GCAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAAGACGTGGACT  
CAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTA  
GGTGAAGAGCAAACTTCCGCTATGACTGGCACAACAGCAATCGACTTCAATAGCTAGCAAGCAGGTTGGAAAGTCCCGAGGCTCCGCAAGCAAGTATG  
CAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACCTCCGCCATCCCGCCCTAACCTCCGCCAGTTCCGCCCATTTCTCCGC  
CCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGTCAGAGGCGAGGCGCCCTCGGCTCTGAGCTATCCAGAGTGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGG  
CCTAGGCTTTTGAAGAATGCATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCGAGTTCTCCGGCCGCTTG  
GGTGAAGAGCTAATCGCTATGACTGGCACAACAGCAATCGGCTGCTGCTGATGCGCCGCTGTTCCGGCTTGTCCGCGCTTCCGCAAGGCTTGGC  
CTTTTTGTCAAGACCGACTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCGAGCGGCTATCGTGGTGGCCACGACGGGCTTCTTGGC  
CAGCTGTGCTCGACGTTGCTACTGAAGCGGGAAGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTCATCTCACCTTGTCTC  
TGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCTATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGC  
ATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACCTTTCG  
CCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCGACGCGGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGCTGCTTCCGCAATATCATGGTGGAAAAATGGCCGCTT  
TTCTGGATTATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATGCTGAAGAGCTTGCGCGC  
GAATGGGCTGACCGCTTCTCTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTCTTTCGACGAGTTCTTCTGAG  
CGGGACTCTGGGTTTCAAAATGACCGCAAGCGCAACCCAACTGCCATCAGGATTTTCGATTCACCCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCT  
TTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCGGCTGGATGATCCTCCAGCGGGGATCTCATGTGGAGTTCTTCGCCACCCTAGGGGGAGGCTAACTG  
AAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAAACGACCGGTGTTGGGTGCTTTGTTTATAA  
ACGCGGGGTTTCGGTCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGGACCCCATTTGGGGCAATAACGCCCGCTTCTTCTTTTCCCCACCC  
CACCCCCAAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACTCGAGGGGCGGAGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTAGA  
TTGATTTAAAACCTCATTTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACTGAGTTTTTCGTT  
CCACTGAGCGTACAGCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACA  
CCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTG  
TCCTTCTAGTGTAGCTAGTTAGGCCACCACTTCAAAGGATCTGTAGCACCGCTACATACCTGCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG  
TGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGTTCTGTG  
ACACAGCCAGCTTGGAGCGAAGCAGCTACACCGAAGTACAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCGGAAGGGGAGAAAG  
CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCGAGGTCGGAACAGGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTCTGTGCG  
GTTTCGCCACCTCTGACTGTAGCGTCTGATTTTTGTGATCTGCTCGTCCAGGGGCGGAGCCCTATGAAAAACGCGCAACCGCCCTTTTTACG  
TTCTGCGCTTTTTGTGCGCTTTTTGCTCACATGTGCAATGCGTGTAGCGAAGCAATGTCTGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGG  
ATAACCGTATTACCGCCATGCAT //

>pCMV-1111-ZA-W | len 4872 bp

```
TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGC
TGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG
AGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCAATGCGGTGACGTACGCGCATGGCCCTGGCATT
TGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTAC
ATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTGACTCACGGGGATTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAAC
GGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTT
AGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGTACCCTGCGCCACCATGGTGTAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTGGAGC
TGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCGAAAGTTCATCTGCAC
CACCGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAG
CACGACTTCTTCAAGTCCGCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCCGCCGAGG
TGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTA
CAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGC
AGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGCGACGGCCCGTGTGCTGCCGACAACTACCTGAGCACCAGTCCG
CCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTCTGTCTGGAGTTCGTGACCCGCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTA
CAAGTACTAGCATCTACACATTTGATCTTAGCAGAAGCAGGCTGAGGGTGCAGGTCATCCGCTCTCTGGGGCACAAGCTGGCAGTGGCGCT
GCCATCATCTGCTCCTCCACCTCCGGCGGGAAGCCATGGCTCTGGATCTGCTTCATGAGTGAGTACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATT
CTGCAGTCGACGTTACCGCGGGCCCGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGTCTT
AAAAAACCCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTATTATGAGCTTATAATGGTTACAAA
TAAAGCAATAGACTCCGCTAGCAAAATTAAGCATTTTTCTACTGGTGTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTTGTT
TAAATTTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTTGCGGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCC
CTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTGTAGTGTGTTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAAGCTGGACTCCAACGTCAA
AGGGCGAAAACCGTCTATACGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAGACCACTAAAT
CGGAAGCAATAAGGGACCCCGGATTTAGAGCTTGGAGGCTTGGAGGCGAGCCGCGCTGCGGAGAAAGAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGAAAGGCGG
CTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACCGTGCAGTAAACCACACCCCGCGCTTAAATGCGCCGCTACAGGGCGGCTCAGGTGGCAGCTTT
TCGGGGAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTT
CAATAATATGAAAAAGGAGAGTCTGAGGCGGAAAGAACACAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAGTCCCAGGCTCCCAGC
AGGCAAGATGCAAAAGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAAGGTGTGGAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGAGAAGTATGCAAAAGCATG
CATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCCAATTCCGCCCAATGGCT
GACTAATTTTTTTTATTTATGACAGAGGCGAGGCGCCTCGGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTTAGGCTT
TTGCAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAG
GCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGTGATGCGCCTGTTGTTCCGGCTGTACGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTGTGTC
AAGACCGACTGTCCGGTGCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCGAGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCTTGGCAGCTGTGTC
TCGACGTTGTCACTGAAGCGGAAGGGACTGGCTGCTATTTGGCGAAGTCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTCATCTCACCTTGCTCTGCCGAGAA
AGTATCCATCATGGCTGATGCTATGCGGCGGCTGCATACGCTTGTATCCGGCTACCTGCCATTCCGACCAACAAGCGAAACATCGCATCGAGCGA
GCACGTACTCGATGGAAGCCGTTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACAGAGCATCAGGGGCTCGCCGACGCGCAACTGTTCCGCAAGCTCA
AGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGTGACCATGGCGATGCTGTGTTGCCGAATATCATGGTGGAAATGGCCGCTTTTCTGGATT
CATCGACTGTGGCCGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCAATGGGCT
GACCGCTTCTCGTGTCTTACGCTATCGCCGCTCCCGATTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTACGAGTTCTTGTAGCGGGACTCT
GGGTTTCGAAATGACGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCAGGATTCGATTCCACCCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATC
GTTTTCCGGGACCCGGCTGGATCCTCCAGCGCGGGATCTCATGCTGGAGTTCATGACCAAAATCCCTTAAAGTGAAGTTTTTCCACTGGAGC
AGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGACCGGTGTGGGTGCTTGTTCATAAACCGGGGT
TCGGTCCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCATTTGGGGCCAATACGCCCGGTTTTCTTCTTTCCCCACCCCAACCCCA
AGTTCCGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCCGGGCGGCGAGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAA
AACTTCATTTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCTCTTTTTTCTGCGGTAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAAGTGAAGTTTTTCCACTGGAGC
GTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGTAGATCTTTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCCGCTACCA
GCGGTGTTGTTTCCCGGATCAAGAGTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGCTCTTAG
TGTAGCCGTAGTTAGGCCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG
CGATAAGTCTGTTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCCGTAAGGGCAAGGGCGAGGGCTGACCCACTACGGCAACCAACATCTGAC
AGCTTGGAGCGAACGACCTACCCGAAGTGTAGATACCTACAGCGTGTAGTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGT
ATCCGGTAAGCGCGAGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAACCGCTGGTATCTTTATAGTCTGTCCGGTTTTCCGCA
CCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGTGCTCGTCCAGGGGCGGAGCTATGGAAAAACCGCAGCAACCGGGCTTTTTACGGTCTCTGGCC
TTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT //
```

>pCMV-1111-ZA-C | len 4872 bp

```
TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGC
TGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG
AGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCAATGCGGTGACGTACGCGCATGGCCCTGGCATT
TGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTAC
ATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTGACTCACGGGGATTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAAC
GGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTT
AGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGTACCCTGCGCCACCATGGTGTAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGGTGGAGC
TGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCGAAAGTTCATCTGCAC
CACCGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAG
CACGACTTCTTCAAGTCCGCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCCGCCGAGG
TGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTA
CAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGC
AGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGCGACGGCCCGTGTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCAGTCCG
CCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTCTGTCTGGAGTTCGTGACCGCCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTA
CAAGTACTAGCATCTACACATTTGATCCTAGCAGAAGCACAGGCTGCAGGGTGCAGGGTCCATCCCGCTCTCTGGGCGACAGGCAATGGGCGGCT
GCCATCATCTGCTCTCCACCTCCGCGGGGAAGCCATGGCTCTGATCTGCTTTCATGAGTGTAGTACTCAGATCTCAGCTCAAGCTTCGAATT
CTGCAGTCGACGTTACCGCGGGCCCGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGTCTT
AAAAAACCCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTGTATTATGAGCTTATAATGGTTACAAA
```





AGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAAGCAGAAATAAACGCACCGGTGTTGGGTCGTTTGTTCATAAACCGGGGGT
TCGGTCCCAGGGTGGCACTCTGTTCGATACCCACCCAGACCCCATTTGGGGCCAATACGCCCGCGTTCCTTCCCTTTCCCCACCCACCCCCCA
AGTTCCGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACTCGGGGGCGGAGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAA
AACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTCCACTGAGC
GTCAGACCCCGTAGAAAAAGATCAAGAGTCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAAACAAAAAACCCCGCTACCA
CGGGTGGTTTTGTTCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATAACCAATACTGTCTTCTAG
TGTAGCCGTAGTTAGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG
CGATAAGTCGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCC
AGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTGAAGATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGT
ATCCGGTAAGCGGCGAGGTGCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTCCGGTTTTCCGCA
CCTCTGACTTGAAGCGTATTTTTGTGATGCTCGTACGGGGGGCGGAGCTATGGA AAAACGCCAGCAACCGGCCCTTTTACGTTCCCTGGCC
TTTTGCTGGCCTTTTGTCTACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT//

>pCMV-1011-ZA-w | len 4790 bp

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGCTGGC
TGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGGACTCATTGCGTGACGTCAGCGCATT
GCCCTGGCTAGTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTTCCAGTTCAGCGTACATCTACGTATTAGTTCATGATATACCTTTAGATTGATTTAA
TTTTGGCAGTACATCAATGGCGGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGATTTCCAAAGTCTCCACCCCATGACGTCATAGGGAGTTTGTTTTGGC
ACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTAGCGTGGGAGGTTCTATATAAG
CAGAGCTGGTTTGTGTAACCGTCAAGTCCGCTAGCGTACCGGTCGCCACCATGGTGAAGGCGGAGGAGCTGTTCCACCGGGTGGTGGCCCA
TCCTGGTCGAGTTAGCCAGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTTCAGCGTCCGCGGAGGGCGAGGGCGATGCCACTTCCAGCTCAAGCTGAA
GTTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTTACGCGCTACCCCGAC
CACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGA
CCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTCCGGGCA
CAAGCTGGAGTACAACACTACAACGCCACAACGTTATATCATGGCCGACAAGCAGAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAAC
ATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGCGCAGCGCCCGTGTCTGTCGCCGACAACCACTACCTGA
GCACCCAGTCCGCGCTGAGCAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCCGCAT
GGACGAGCTGTACAAGTACTAGCATCTACACATTTGATCCTAGCAGAAGCACAGGCTGCAGGGTGCAGGTTCCATCCCGCTCTCTGGGCAACAAG
CATGGGCGAGCTGCCATCATCTCTGCTCCACTCCGCGGGGAAAGCCATGGCTGGATCTGGATCTGCTTTCATGAGTGAATCTCAGATCTCAGACTC
AAGCTTCGAATTCGAGTTCGACGTTACCGCGGCCCCGGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATAACCAATTTGTGAGAGT
TTTACTTGTCTTTAAAAACCTCCACACCTCCCGCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTGTTAACTTGTATTGTCAGCTTAT
AATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCAAAATTTCAAAATAAAGCATTTTTTTTCACTGCAATCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATG
TATCTTAAACGCTAAATGTAAGCGTTAATATTTTTGTTAAAATTCGCGTTAAAATTTTTGTTAAAATCAGCTCATTTTTTAAATGATGAGGAGG
TCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAAGATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACAAGTGA
CTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGT
AAAGCACTAAATCGGAACCCATAAGGGAGCCCGGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAAGCTGGCGGAGAAGGAAGGGAAGAAAGCGA
AAGGACGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCTAACACCACACCCCGCTTAATGCGCCGCTACAGGCGCGCTC
AAGTGGCACTTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTTTCTAAATAACATTAATAATGATGATCCGCTCATGAGCAATAACCC
TGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAGTCCCC
AGGCTCCCCAGCAGGCAAGATATGCAAGCATGCAATCTCAATTAAGTCAAGCAACAGGTTGGAAAGTCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAAGAT
ATGCAAAAGCATGCATCAATTAAGTCAAGCAACATAGTCCCGCCCTAACCTCCGCCCCTAACCTCCGCCCAGTTCGGCCCTTTCTC
CGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGACAGAGGCGGAGCCGCTCCGCGCTGAGGCTATTCCAGAAGTAGTAGGAGGCTTTTTTGG
AGGCTTAGGCTTTTGCAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTTCGATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGCGCCG
TTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCCGGTGTCTGATGCCCGCTGTTCCGGCTGTACAGCGCAGGGGCGCCCG
GTTCTTTTTGTCAAGACCGACTGTCCGGTGCCTGAATGAAGTCAAGTACGAGCAGGCGAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGCTCCTT
CGCCAGTGTGCTCGAGCTTGTCACTGAAGCGGGAAGGACTGGCTGCTATTGGCCGAAGTGCAGGGGAGGATCTCCTGTCACTCACCTTGC
TCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCTATGCGGGCGGTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTCGACCACCAAGCGAAACAT
CGCATCGAGCGAGCAGTACTCCGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGGCCAGCCGAATGT
TCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCCATGGCCATGGCCATGATCTGACGAGATTTGATTCCACCGCCGCTT
CTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCGGCTGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGCTGATATTGCTGAGAGGTTGGC
GGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGTCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCT
GAGCGGACTCTGGGTTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCAGGATTTGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTG
GGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACCGCGGCTGGATGATCTCCAGCGCGGGATCTCATGTGGAGTTCTTCCGCCACCTAGGGGAGGCTAA
CGCTAACCGGTGCGCCACATGGTGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTTACCGGGGTTGGTGCCACTCTGGTCGAGCTTCCGGAAGGAGGAA
TAAACGCGGGGTTCCGGTCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCCATTTGGGGCAATAACGCCCGGTTTTCTTCTTTCCCA
CCCCACCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCAACGTCGGGGCGGAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTT
AGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGTACCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACTGAGTTTTT
GTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAAGATCAAAAGGATCTTCTTGAGACTCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGTGCAAAAACAAAAA
CCACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATA
CTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGC
TGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCG
TGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTACAGGATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAA
AGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGAGGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGT
CGGGTTTCCGCACTCTGACTTGAAGCGTCAATTTTTGTGATGCTGTCAGGGGGGGCGGAGCCTATGGA AAAACGCCAGCAACCGGCCCTTTT
CGGTTCTGGCCTTTTGTCTGACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT//

>pCMV-0011-ZA-w | len 4664 bp

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATCATATGCGTGACGTCAGCGCATTGCCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTAT
GGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTTCATCGCTATTACCATGGTGTAGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGCGGTGGATAGCG
GTTTACTCACGGGATTTCCAAAGTCTCCACCCATTGACGTCATAAGGGAGTTTGTTTTTGGCACC AAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGT
AACAACCTCCGCCCATGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTGTGTAACCGTCAAGTCCGCT
AGCGCTACCGGTGCGCCACATGGTGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTTACCGGGGTTGGTGCCACTCTGGTCGAGCTGGACGGCGAGCTAAACGGC
CACAAGTTACGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGC
CCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTTACGGCTACCCCGACCCATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCCG

CATGCCCGAAGGCTACGTCACGAGGACGACCATCTTCTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAAGTTCGAGGGCGACACC  
CTGGTGAACCCGATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACG  
TCTATATCATGGCCGACAAAGCAGAAGAACGGCCATCAAGGTGAACTTCAAGACTCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCTGACAGTCCGCCACCA  
CTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTCTGCCGACAACCCTACCTGAGCACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAAC  
GAGAAGCGCGATCACATGGTCTGTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACCTCGGCATGACGAGCTGTACAAGTACTAGCATCTACACA  
TTGATCCTAGCAGAAGCACAGGCTGCAGGGTGACGGTCCATCCCGCTCTCTGGGCACAAGGCATGGGCAGCGTGCCATCATCTGTCTCTCCA  
CCTCCGCGGGGAAGCCATGGCTCTGGATCTGCTTCATGAGTGAAGTACTGAGCTCAGAGCTCAAGCTTCGAATTCGCGAGCTGACGGTACCCGG  
GGCCCGGGATCCACCCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGTCTTTAAAAAACCTCCACACCTCC  
CCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTTGTTGTTAACTTGTATTATGACAGCTTATAATGGTTACAAAATAAAGCAATAGCATCACAAA  
TTTCACAAAATAAGCATTTTTTCACTGCATTTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAAACGCGTAAATGTAAAGCGTTAAATAT  
TTGTTAAAAATTCCGCTTAAATTTTTGTTAAAAACAGCTCATTTTTTAAACCAATAGGCCGAAATCCGCTTATAAATCAAAGAAATAG  
ACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAAGCTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATC  
AGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTTAATCAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTTAAAGGGAGCCC  
CCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAAGCAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTGA  
CGGGTACCGCTGCGCTAACCCACACCCCGCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTCGCGGAA  
CCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTTCAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAA  
GAGTCTTGAGGCGGAAAGAACCCAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCGAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCA  
TGATCTCAATTAGTCAACAACCCAGGTGTGGAAGTCCCAGGCTCCCGAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAACAAC  
CATAGTCCCGCCCTAACCTCCGCCCCCTAACCTCCGCCCTTTCGCGCCATTCGCGCCATTCCTCCGCCCTTTCGCGCCCTTTTAAATTTTAT  
GCAGAGGCGGAGGCCCTCGGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTGCAAAGATCGATCAAGAG  
ACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGG  
CACAACAGACAATCGGCTGTCTGATGCCGCGCTGTTCCGGCTGTGACGCGAGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCCGACCTGTCCGGTGC  
CCTGAATGAACGACGAGCAGCGCGCTATCGTGGCAGCGCGCTATCGTGGCAGCTGCTTCCGCGAATCATGCTGGAAATGGCCGCTTTTCTGGATTGTCACTGATGTCAGTGTG  
GGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGCGAGGATCTCTGTCTCATCTCACCTTGTCTCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATG  
CTATGCCGCGGCTGCATACGCTTGTATCCGGCTACCTGCCATTCCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCAGCAGCTACTCGGATGGAAGC  
CGGTCTTGTCTGATCAGGATGATCTGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGGCCAGCCGAAGTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGCGGC  
GAGGATCTCGTCTGACCCATCGGATGCTGCTTGCCTGCTTCCGCGAATCATGCTGGAAATGGCCGCTTTTCTGGATTGTCACTGATGTCAGTGTG  
GTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGCGAATGGGCTGACCGCTCTCTGTGCTTTA  
CGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGTTTCGAAATGACCGACC  
AAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTTTCGATTCCACCCCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTG  
GATGATCTCCCGCCGCGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCTAGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATAAGGAAAGGA  
ACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAAGCAGAATAAAACGCACGGTGTGGGTCGTTTGTTCATAAAACGCGGGGTTCCGGTCCAGGGCTGGCACT  
CTGTGCATACCCACCGAGACCCATTGGGGCCAAATACGCCGCGTTTCTTCCCTTTCCCCACCACCACCCCAAGTTCCGGTGAAGGCCAGG  
GCTCGCAGCCACCTCGGGCGGCGAGGCCCTGCCATAGCCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTAAATTTAA  
AGGATCTAGGTAAAGATCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTACATGAGTGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAAAGAA  
TCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCAGCTACCCAGCGTGGTTTTGTTGCGCGGA  
TCAAGAGTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGCTTCTTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCAC  
CACTTCAAAGACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTGTGTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGGATAGTCTGTCTTACC  
GGTTGGACTCAAAGACGATAGTTTACCGGATAAGGCGCAGCGCTGGGCTGAACCGGGGGTTCGTGACACACAGCCAGCTGGAGCGAACAGCACTA  
CACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGCCAGCTTCCCGAAGGGGAGAAAGCGGACAGGATCCGGTAAGCGGCGAGGGTC  
GGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAAGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCCGCACTCTGACTTGAAGCGTGCAT  
TTTTGTGATGCTCGTCAAGGGGGCGGAGCCTATGGAATAACCGCAACCGCGCCTTTTACGGTCTCTGGCCTTTTGTGCTGCTTTTGTCTCA  
CATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT / /

>pCMV-1101-ZA-W | len 4758 bp

TAGTTATAATAGTAATCAATTAACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCGCTGGC  
TGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG  
AGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCATTGCGTGAAGTCAAGCGCATTCGCTGGATAGCG  
GTTTACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCTG  
AACACTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGGTGACGTTACCGTGGAGGCTATATAAGCAGAGCTGGTTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCT  
AGCCTACCGGTGCCACCATGGTGTAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACACGGGTTGGTGCCCATCTGGTTCGAGCTGACCGCGCATGAAACCGG  
CACAAGTTACGCTGTCCGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCGTAAGTTTCACTGACACCACCGCAAGCTGCCCGTGC  
CCTGGCCACCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGAAGTCTTACGGCTACCCCGACCATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGC  
CATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGACCATCTTCTCAAGGACGAGCGCAACTACAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTTCAGGGCGACACC  
CTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACG  
TCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCA  
CTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTCTGCCGACAACCCTACCTGAGCACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAAC  
GAGAAGCGGATCACATGGTCTGTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGATCACCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTACTAGCATCTACACA  
TTGATCCTAGCAGAAGCACAGGCTGCAGGGTGACGGTCCATCCGCTCTCTGGGCACAAGGCATGGGCAGCGTGCCATCATCTGTCTCTCCA  
CCTCCGGCGGGAAGCCATGGCTCTGGATCTGCTTCATGAGTGAAGTACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCGAGTGCAGCGTACCCGG  
GGCCCGGGATCCACCGGATAGATAACTAGCATATAACAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGTCTTTAAAAAACCTCCACACCTCC  
CCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTTGTTGTTAACTTGTATTATGACAGCTTATAATGGTTACAAAATAAAGCAATAGCATCACAAA  
TTTCACAAAATAAGCATTTTTTCACTGCATTTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAAACGCGTAAATGTAAAGCGTTAAATAT  
TTGTTAAAAATTCCGCTTAAATTTTTGTTAAAAACAGCTCATTTTTTAAACCAATAGGCCGAAATCCGCTTATAAATCAAAGAAATAG  
ACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAAGCTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATC  
AGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTTAATCAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCGGTAAGCACTAAATCGGAACCTTAAAGGGAGCCC  
CCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAGCCGGCAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAAGGAGCGGGCGCTAGGCGCTAGGCGCAAGTGTGA  
GCGGTACGCTGCGGTAACCCACACCCCGCGCTTAATGCGCGCTACAGGGCGGCTCAGGTGGCACTTTTCCGGGAAATGTGCGCGGAA  
CCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTTCAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAA  
GAGTCTTGAGGCGGAAAGAACCCAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCGAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCA  
TGATCTCAATTAGTCAACAACCCAGGTGTGGAAGTCCCAGGCTCCCGAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAACAAC  
CATAGTCCCGCCCTAACCTCCGCCCCCTAACCTCCGCCCTTTCGCGCCATTCGCGCCATTCCTCCGCCCTTTCGCGCCCTTTTAAATTTTAT  
GCAGAGGCGGAGGCCCTCGGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTGCAAAGATCGATCAAGAG  
ACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGG

CACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTGACGCGAGGGGCGCCCGGTTCTTTTGTCAAGACCACCTGTCCGGTGC  
CCTGAATGAACGCAAGACGAGGCGAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGAGCGGCTTCTTGGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCG  
GGAAGGACTGGTGTCTATTGGCGAAGTGCCGGGGGAGATCTCTGTCTACCTTGGCTCTCGGAGAAAATGATCCATCATGGCTGATG  
CTATGCGCGGCTGCATACGCTTGTATCCGGCTACCTGCCATTGACACCAAGCGAAAACATCGCATCGAGCGACACGTAAGCTCGGATGGAAGC  
CGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCCGACGCAACTGTTCCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGC  
GAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGCTGCTTGGCAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTATCGACTGTGGCCGGCTGG  
GTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCTGTGCTTTA  
CGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCTTCTTACGAGTTCCTTCTGAGCGGACTCTGGGTTGCAAAATGACCCGAC  
AAGCGACGCCAACCTGCCATCACGAGATTTCCGATTCACCGCCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACCCGGCTG  
GATGATCTCCAGCGCGGGATCTCATGCTGGAGTCTTCCGCCACCCTAGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGA  
ACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGTGGGTCGTTTGTTCATAAACCGGGGTTCCGGTCCAGGGCTGGCACT  
CTGTGATACCCACCGAGACCCATTGGGGCAATAGCCCGGTTTTCTTCTTTCCACCACCACCCCAAGTTCCGGTGAAGGCCAGG  
GCTCGCAGCCAACGTCCGGGGCGGACGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAA  
AGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACTGAGTTCCTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGA  
TCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTCAAACAAAAAACCCCGCTACCCAGCGTGGTTTGTGTTGCCGGA  
TCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTACGAGAGCGCAGATACCAAAATCTGCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCAC  
CACTTCAAGAATCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCG  
GTTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGTCCGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTA  
CACCGAATGAGATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGCACGCTCCCGAAGGGGAGAAAGCGGACAGGATCCCGTAAAGCGAGGCT  
GGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTTGGTATCTTTATAGTCTGTCCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAAGCGTGTGAT  
TTTTGTGATGCTGTCAGGGGGCGGAGCTATGGA AAAACGCCAGCAACCGGCTTTTTACGGTTCCTGGCTTTTTGTGCTTTTTGTCTCA  
CATGTTCTTCTGCGTTATCCCTGATCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT / /

>pCMV-1100-ZA-w | len 4616 bp

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGC  
TGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG  
AGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCATTGCGTGACGTCAGCGCATTGCTGTACGGTGG  
GAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTACGCTACCCGTCGCCACCATGTTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTAC  
CGGGTGGTGCCCATCTGTCGAGCTGGACGGCGACGTAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGC  
AAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGGCCCTGGCCACCCTCGTGACACCCTGACCTACCGCGTGCAGTGTCTCA  
GCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCACAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGA  
CGGCAACTACAAGACCCGCGCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGC  
AACATCTCGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACAACGCCACAACGCTTATATCATGGCCGACAAAGCAGAAGAAGCGGCATCAAGGTGAACCTCA  
AGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTGCTGCCCGA  
CAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCATATGTTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCGGG  
ATCACTCTCGGCATGAGCAGAGCTGTACAGTACTAGCATCTACACATTGATCCTAGCAGAAGCAGGGTGCAGGGTGCAGGTCATCCCGCTC  
TCCTGGGCACAAGGCATGGCAGCGTGCATCATCTGCTCTCCACCTCCGGCGGGAAGCCATGGCTCTGGATCTGCTTCAATGAGTGAAGTACT  
CAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATCTGCAATCTGCACTGACGCTCGCGGGCCGGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCAAGTCAACATACC  
ACATTTGTAGAGGTTTTACTTGTCTTAAAAAACCCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAAATGAATGAATGCAATTTGTTGTTAACTTGT  
TTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCAAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCATAGTTGTGGTTTGTGTC  
CAAATCATCAATGTATCTTAAAGCGTAAATTTAAGCGTAAATTTTGTAAATTTGTTAAATTTGTTAAATTTGTTAAATTTGTTAAATTTTAA  
CCAATAGGCCGAAATCGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGGATAGGGTGTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTA  
TTAAAGAACGTTGACTCAACGTCAAAGGGCGAAAACCGCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTCGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGG  
GGTCCAGGTGCCGTAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGACCCCGATTTAGAGCTTGACGGGGAAGCCGCGCAAGCTGGCGGAAAGGA  
AGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACACCCCGCCGCGCTTAATGCGCCG  
CTACAGGGCGCGTCAAGTGGCACTTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCA  
TGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTCTTGAAGCGGAAAGAACAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGG  
TGTGGAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAAGTATGCAAGCATGCATCAATAGTCAAGCAGGAGTGGAAAGTCCCAGGCTCCC  
CAGCAGCGCAGAAGTATGCAAGCATGCTCAATAGTCAAGCAACCATAGTCCGCCCTAACCTCCGCCATCCGCCATCCGCCATCCGCCAG  
TTCCGCCCATTTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAAGGGCCGAGGCCGCTCGGCTCTGAGTATTCCAGAAGTGTGA  
GGAGGCTTTTTGGAGGCTTAGGCTTTTCAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCA  
GGTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCCGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCCGGCTTCCGGCTGTGAG  
CGCAGGGGCGCCCGTCTTTTTGTCAAGACCGACTGTCCGGTGGCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCGAGCGGCTATCGTGGCTGGCCAC  
GACGGGCTTCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGACTGGCTGCTATTGGCGAAGTCCGGGGCAGGATCTCCTG  
TCATCTCACCTTGTCTGCGGAGAAAGTATCCATCATGCGTGTATGCGCGGCTGCATACGCTTGTGATCCGGCTACCTGCCATTCCGACC  
ACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCAGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGC  
GCCAGCGAAGTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGCTGCTGCGCAATATCATG  
GTGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTG  
CTGAAGAGCTTGGCGGCAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGTCTTACGTTATCGGCTTCCCGGATTCGCGAGCGCATCGCTTCTATCGCTTCT  
TGACGAGTCTTTCGAGCGGACTCTGGGTTGAAAATCGACGCAACAGCGACCCCAACCTGCCATCAGAGATTTGATTTCCAGCCGCTCT  
TCTATGAAAGGTTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACCGCGCTGGATGATCTTCCAGCGGGGATCTCATGCTGGAGTCTTCCGCCACCC  
TAGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGT  
GGTCTGTTTGTTCATAAACCGGGGTTCCGGTCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCATTGGGGCAATACGCCCGGTTT  
CTTCTTTTCCCACCCCAAGTTCCGGTGAAGGCCAGGCTCGAGCCAACGTCGGGGCGGACGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTA  
CTCATATATACCTTAGATTGATTTAAACTTCAATTTTAAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGAAACCAAACTCTT  
TAACGTGAGTTTTGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGGATCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGTGCT  
TGCAACAAAAAACCCGCTACCAGCGGTGGTTGTTTGGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTACGACAGC  
GCAGATACAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCAGCTACATACCTCGCTCTGCTAATC  
CTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTGTGCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGAGCGGCTGGGCT  
GAACGGGGGTTCTGTCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACTACCCGACTGAGATACCTACAGCGTGTGATGAGGAAAGCCGACCCGCT  
TCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGATCCGGTAAAGCGGCGAGGTCGGAACAGGAGCGCACAGGAGGACTTCCAGGGGAAACGCTGGTAT

CTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCA  
ACGCGGCTTTTTACGGTTCTGGCCTTTTGTGTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAC  
GCCATGCAT//

>pCRE-UNO-ZA-W | len 4408 bp

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATCATTCGCTGACGTCAGCGCATTGCTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGC  
TGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGG  
TCGAGCTGGACGGCGACTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCAT  
CTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTGACTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATG  
AAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCG  
CCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAACT  
GGAGTACAACATAACGCCACAACGCTTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACCGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAG  
GACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTGCTGCTGCCGACAACCCTACCTGAGCACC  
AGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGGATCACTCTCGGCATGGACGA  
GCTGTACAAGTACTAGCATCTACACATTTGATCCTAGCAGAAGCACAGGCTGCAGGGTGCAGGTCCATCCCGCTCTCTGGGCACAAGGCATGGG  
CAGCGTGCCATCATCTGCTCTCCACTCCGGCGGGAAGCCATGGCTCTGGATCTGCTTTCATGAGTGAAGTACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTT  
CGAATTCGACGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTACT  
TGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCTGAACTGAAACATAAAATGAATGCAATTTGTTGTTAACTGTTTATTGACGCTTATAATGGT  
TACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTT  
AACCGCTAAATTTAAGCGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCA  
AAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAA  
CGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCA  
CTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCGGATTTAGAGCTTGACGGGGAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAG  
CGGGCGTAGGGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGGTAACCACACCCCGCCGCTTAATGCGCCGTACAGGGCGCGTCAGGTGG  
CACTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTCTAAATACATTAATATGATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAA  
ATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTCTGAGGCGGAAAGAACAGCTGTGGAATGTGTGCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCACAGGCTC  
CCCAGCGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTTAGTCAGCAACCGAGTGTGAAAGTCCCGAGGCTCCCGAGGCGAGAAGTATGTC  
AGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAATCCGCGCCCTAATCCCGCCCTAATCCGCGCCAGTTCGCGCCATTTCCGCCCC  
ATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGTCAGAGGCGGAGGCGCTCGGCTCTGAGCTATTCAGAAAGTGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCT  
AGGCTTTTGCAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGT  
GGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCGCCGCTGTTCCGGCTGTGACGCGAGGGCGCCCGTCTT  
TTTGTCAAGACCGACTGTCCGCTGCCCTGAATGAACGCAAGACGAGGCGAGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCAGCAG  
CTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTCCCGGGCGAGGATCTCCTGTATCTCACCTTGCTCTG  
CGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCTATGCGGGCGTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATC  
GAGCGAGCAGTACTCGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCA  
GGCTCAAGGGCAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTGTGACCCATGGCGATGCTGCTGCGGAATATCATGTTGGAATAAGCCCGCTTTTC  
TGGATTATCGACTGTGGCCGGTGGTGTGGCGGACCCGATCAGGACATAGCGTGGCTACCCGCTGATAATGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAA  
TGGGCTGACCGCTTCTCGTGTCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTGACAGTTCCTGAGCGG  
GACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCCAACCCTGCCATCAGCAGATTTGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTC  
GGAATCGTTTTCCGGGACCGCGCTGGATGATCCTCCAGCGGGGATCTCATGCTGGAGTCTTCCGCCACCCTAGGGGAGGCTAAGTAAA  
CACGGAAGGAGACAATAACCGGAAGGAACCCCGCTATGACGGCAATAAAGACAGAATAAAGCGCACCGTGTGGGTCGTTGTTTCATAAACG  
CGGGTTCGGTCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCATTTGGGGCAATACGCCCGCGTTCCTTCTTTTCCCCACCCCA  
CCCCAAGTTCGGGTGAAGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGCGGAGGCGCTCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTG  
ATTTAAAACCTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAACGTTGAGTTTCGTTCCA  
CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTGCAAAACAAAAAACCCG  
CTACCAGCGGTGTTTGTGTTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCC  
TTCTAGTGTAGCCGATTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCCCTACATACTCGCTCTGTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGC  
CAGTGGCGATAAGTCTGTTTACCGGTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACA  
CAGCCCGCTTGAGCGCAACGACTACCCGACTGAGTATCAGCGTGAAGTATGAGAAAAGCGCCACCGTTCCTCCGAGGGGGAAGGCGG  
ACAGGTATCCGGTAAAGCGGAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGGGTT  
TCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACCGGCTTTTTTACGGTT  
CTGGCCTTTTGTGTCGCTTTTGTCTACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACGCCATGCAT//

>pCRE-UNO-ZA-C | len 4408 bp

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATGCAATGCGCTGACGTCACGCAATGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGC  
TGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCCTGG  
TCGAGCTGGACCGCGACGTAACCGGCCACAAGTTCAGCGGTGTCGCGCAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCAT  
CTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTGACTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCACATG  
AAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCG  
CCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAACT  
GGAGTACAACATAACAGCCACAACGCTTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACCGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCCGCACAACTCGAG  
GACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGAGGGCCCGTGTGCTGCGCCGACAACCCTACCTGAGCACC  
AGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGGGGATCACTCTCGGCATGGACGA  
GCTGTACAAGTACTAGCATCTACACATTTGATCCTAGCAGAAGCACAGGCTGCAGGGTGCAGGTCCATCCCGCTCTCTGGGCACAAGGCATGGG  
CAGCGTGCATCATCTCTCTCCACTCCCGCGGGAAGCCATGGCTCTGGATCTGCTTTCATGAGTGAAGTACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTT  
CGAATTCGACGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTACT  
TGCTTTAAAAAACCTCCACACCTCCCTGAACTGAAACATAAAATGAATGCAATTTGTTGTTAACTGTTTATTGACGCTTATAATGGT  
TACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTTAGTTGTGGTTTGTGTTAACTGTTTATTGACGCTTATAATGGT  
AACCGCTAAATTTAAGCGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCA

AAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACCTGGACTCCAA  
 CGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACCTGGAACCCACTACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAGCA  
 CTAATTCGGAACCTAAAGGGAGCCCGGATTTAGAGCTTTGACGGGAAAGCCCGCGAACCTGGCGAGAAAGGAAGGAAAGCGAAAGGAG  
 CGGGCGTAGGGCGTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACACACCCCGCGCTTAATGCGCCGTACAGGGCGCGTCAGGTGG  
 CACTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAA  
 ATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTCTGAGGCGGAAAGAACAGCTGTGGAATGTGTGTAGTTAGGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTC  
 CCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAA  
 AGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAATCCGCCCCTAATCCGCCCAGTCCGCCCCTTCCGCCCCT  
 ATGGCTGACTAATTTTTTTTATTATGACAGAGCCGAGGCCCTCGGCCCTGAGCTATCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCC  
 AGGCTTTTGCAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGT  
 GGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCCGCTGTTCGGCTGTCCAGCGCAGGGGCGCCCGTCTT  
 TTTGTCAAGACCGACCTGTCGGTGCCTGAAAGAACGCAAGACGAGGCAGCGCGGTATCGTGGCTGGCCACGACGGCGCTTCTTGCAG  
 CTGTGCTCGACGTTGTACTGAAGCGGGAAGGACTGGCTGCTATGGGCGAAGTCCCGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGC  
 CGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCTATGCGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTCCGCTTCAAAACAAAACATCCGATC  
 GAGCGAGCAGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGGCCAGCCGAACGTTCGCCA  
 GGCTCAAGGCGAGCATGCCGACGGCGAGGATCTCGTGTGACCCATGGCGATGCTGCTTGGCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTC  
 TGGATTATCGACTGTGGCCGGTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGCTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGCGCAA  
 TGGGCTGACCGCTTCTCGTGTTCACGGTATCGCGCTCCCGATTCCGAGCGCATCGCTTCTATCGCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGG  
 GACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCAGAGATTTTCGATTCCACCGCCCTTCTATGAAAGTTGGGCTTC  
 GGAATCGTTTTCCGGACGCGCGCTGGATGATCCTCCAGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCTAGGGGGAGGCTAACTGAAA  
 CACGGAAGGAGACAATACCGGAAGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGTGGGTCGTTTGTTCATAAACG  
 CGGGTTCGGTCCAGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCATTGGGGCAATACGCCCGGTTTTCTTCCTTTTCCCACCCAC  
 CCCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCACAAGTCCGGGGCGCAGGCCCTGCCATAGCCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTG  
 ATTTAAAATCTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGTCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCTGTCCA  
 CTGAGCGTCAGACCCCTGCAAAAGATCAAAGGATCTTTGATGACTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTCAAAACAAAACATCCGAC  
 CTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCCGATCAAGAGCTACCAACTTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTTCAGCAGAGCGCAGATAACAAATACTGTCC  
 TTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGTGTC  
 CAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTGGGGTGAACGGGGGGTTCTGTGACA  
 CAGCCAGCTTGGAGCGAACGACTACACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGCGG  
 ACAGGTATCCGGTAAGCGCGAGGTCGGAAACAGGAGAGCGCACGAGGAGCTTCCAGGGGGAACCGCTTGGTATCTTTATAGCTCTGTCGGGTT  
 TCGCCACCTCTGACTTGAAGCTGATTTTTGTGATGCTCGTACAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTTT  
 CTGGCTTTTTGCTGGCTTTTGTCTCACATGTTCTTCTCGGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT / /

>pCRE-NULL-ZA-W | len 4408 bp

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGTCATTAGTTCATATTGCGACTGACTGGCGCATTGCTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGC  
 TGGTTTAGTGAACCGTACAGTCCGCTAGCGCTACCGGTCGCCACCATGGTGTAGCAAGGGCGAGGAGCTTACCAGGGGTGGTGGCCATCCTGG  
 TCGAGCTGGACGGCGACGTAACCGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCGTAAGTTTAT  
 CTGCACCAACCGGCAAGCTGCCCCGCTGGCCACCCTCGTGCACACCTGACTACCGCGTGCAGTGTCTTACCGCGTGCAGTGTCTTACCCGACCATG  
 AAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCG  
 CCGAGGTGAAGTTCGAGGGGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAAGCT  
 GGAGTACAACACAGCCACACAGTCTATATCATGGCCGACAGCAGAAGAACCGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATTCGAG  
 GACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGCTGCTGTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACC  
 AGTCCGCCCTGAGCAAGACCCCAACGAGAAGCGGATACATGCTCTGCTGGAGTTCTGTGACCCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGA  
 GCTGTACAAGTACTAGCATCTACACATTGATCTTAGCAGAAGCACAGGCTGACGGGTGACCGTCCATCCCGCTCTCCTGGGACAAAGCATGGG  
 CAGCGTGCATCATCTGCTCCTCCACCTCCGGCGGGAAGCCATGGCTCTGGATCTGCTTTCATGAGTGAAGTACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTT  
 CGAATTCGACGTCGACGGTACCGCGGGCCCGGATCCACCGATCTAGATAACTGATATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACT  
 TGCTTTAAAAAACCCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAAACATAAAATGAATGAATGTAATGTTGTTTAACTGTTTATTTCGAGCTTATAATGTT  
 TACAATAAAGCAATAGCATCAAAATTTCAAAATAAAGCAATTTTTTCTGATGATCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTT  
 AACCGTAAATTTGTAAGCTTAAATTTTTGTTAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGTTCATTTTTTAAACAAATGAGCCGAAATCGGCA  
 AAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACCTGGACTCCAA  
 CGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACCTGGAACCATACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAGCA  
 CTAATTCGGAACCTAAAGGGAGCCCGGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCCGCGAACCTGGCGAGAAAGGAAGGAAAGAAAGCGAAAGGAG  
 CGGGCGTAGGGCGTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACACACCCCGCGCTTAATGCGCCGTACAGGGCGCGTCAGGTGG  
 CACTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAA  
 ATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTCTGAGGCGGAAAGAACAGCTGTGGAATGTGTGTAGTTAGGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTC  
 CCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGGAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAA  
 AGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAATCCGCCCCTAATCCGCCCAGTCCGCCCATTCTCCGCCCC  
 ATGGCTGACTAATTTTTTTTATTATGACAGAGCCGAGGCCCTCGGCCCTGAGCTATCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCC  
 AGGCTTTTGCAAAAGCATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCTGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGT  
 GGAGAGGCTATTCCGCTATGACTGGGCAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCCGCTGTTCCGGCTGTCCAGCGCAGGGCGCCCGGTTCTT  
 TTTGTCAAGACCGACCTGTCGGTGCCTGAAAGTGAAGTGAAGACGAGGCAGCGCGGTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCTTGCAG  
 CTGTGCTCGACGTTGTACTGAAGCGGGAAGGACTGGTGTCTATGGGCGAAGTCCCGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGC  
 CGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCTATGCGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTCCAGCCACCAAGCGAAACATCGCAT  
 GAGCGAGCAGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGGCCAGCCGAACGTGTTCCGCA  
 GGCTCAAGGCGAGCATGCCGAGGATCTCGTGTGACCCATCGGCTGCTGCTTGGCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTC  
 TGGATTATCGACTGTGGCCGGTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGCTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGCGAA  
 TGGGCTGACCGCTTCTCGTGTTCACGGTATCGCCGCTCCCGATTCCGAGCGCATCGCTTCTATCGCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGG  
 GACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCAGAGATTTTCGATTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGTTGGGCTTC  
 GGAATCGTTTTCCGGACGCGCGCTGGATGATCCTCCAGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCGCCACCCTAGGGGGAGGCTAACTGAAA  
 CACGGAAGGACAATAACCGGAAGGAACCCCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGTGGGCTTTTGTTCATAAACG  
 CGGGTTCGGTCCAGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCATTGGGGCAATACGCCCGGTTTTCTTCCTTTTCCCACCCAC

CCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGCAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTG  
 ATTTAAAACTTCATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTC  
 CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTTTGTAGATCCTTTTTCGTGGCGTAATCTGTGTCTGCAAAACAAAAAACCCCG  
 CTACCAGCGGTGTTTGTGTCGGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCC  
 TTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGC  
 CAGTGGCGATAAAGTCGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACA  
 CAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGG  
 ACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGCTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTCCGGTT  
 TCGCCACCTCTGACTTGAGCGTGCATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGCCCTTTTACGGTTT  
 CTGGCCTTTTGTGCGCTTTTGTCTACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT //

>pCMV-1111-AZ-W | len 4872 bp

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGC  
 TGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG  
 AGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCATTGCGTACGTGACGCGATTGCCCTGGCATT  
 TGCCCACTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTAGTATTAGTCACTCGCTATTACCATGGTGTATGGGTTTGGCAGTAC  
 ATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCACCACAAATCAAC  
 GGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCATGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTTATATAAGCAGAGCTGGTTT  
 AGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGTGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCAGGGGTGGTGGCCATCTGGTTCGAGC  
 TGGACCGCGACGTAACCGCCACAAGTTTCAAGCTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAGTTTCATCTGCAC  
 CACCGCAAGCTGCCCGTGGCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGTTCAGCCGCTACCCCGACCATGAAGCAG  
 CACGACTTCTCAAGTCCGCGTATGCCGGAAGGCTACGTCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGG  
 TGAAGTTCGAGGGCGACACCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAAGCTGGAGTA  
 CAACTACAACAGCCACAACGCTCATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGC  
 AGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGCGCAGCGCCCGTGTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCG  
 CCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCCGCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTA  
 CAAGTACTCACTCATGAAGCAGATCCAGAGCCTGGCTTCCCGCGGAGGTGGAGGAGCAGGATGATGGCAGCTGCCCATGTCTGTTGGCCAG  
 GAGAGCGGGATGGACCGTCAACCTGCAGCCTGTGCTTCTGCTAGGATCAATGTGTAGATGCTAGTACTCAGATCTCGAGTCAAGCTTCAAGT  
 CTGCAGTCGACGGTACCGCGGGCCGGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATAACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGTCTT  
 AAAAACTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCATTTGTTGTTAACTTGTATTGAGCTTATAATGGTTACAAA  
 TAAAGCAATAGCATCACAAATTTCAAAAATAAAGCATTTTTTCTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAAACGCG  
 TAAATTTGAAGCGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTAACCAATAGGCGAAATCGGCAAAATCC  
 CTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTTCCGATTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTTCCAGTCAACCTCAA  
 AGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAGCACTAAAT  
 CGGAACCTTAAAGGGAGCCCGGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAAGCTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCG  
 CTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACACACCCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCAAGTGGCCTTT  
 TCGGGGAAATGTGCGCGAAACCCCTATTTGTTTATTTTCAAAATACATTTCAAAATGTATCAGCTCATGAGACAATAACCCGATAAATGCTT  
 CAATAATATTGAAAAAGGAAGATCTGAGCGGAAAGAACACGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGAAAGTCCCGAGGATCCCGCAGC  
 AGGCAGAAGTATGCAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCGAGAAGTATGCAAGCATG  
 CATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAATCCGCCATCCCGCCCTAATCCGCCAGTTCCGCCCATTTCTCCGCCCATGGCT  
 GACTAATTTTTTTTATTTATGACAGAGGCGAGGCGCCTCGGCCCTGAGCTATTCAGAAAGTGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTTAGGCTT  
 TTGCAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAG  
 GCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAACCGCTGCTCTGATGCCCGGCTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTC  
 AAGACCGACCTGTCCGGTGCCTGAAATGAACCTGCAAGACGAGGCGCGGCTATCTGTGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTGGCCAGCTGTGC  
 TCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTCCGGGGCAGGATCTCCTGTCACTCACCTGTCTCTGCCGAGAA  
 AGTATCCATCATGGCTGTATGCTATGCGCGGCTGCATACGCTTGTATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGA  
 GCACGTAATCGGATGGAAGCGGCTTGTGTCATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACGTTTCGCCAGGCTCA  
 AGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATGCTGCTTGGCGAATATCATGGTGGAAAAATGGCCGCTTTCTGATTT  
 CATCGACTGTGGCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATAGGACATAGGCTTGGCTACCCGTGATATTGCGAAGAGCTTCCGCGCGAATGGGCT  
 GACCGCTTCTCGTGTCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTACGAGTCTTCTGAGCGGGACTCT  
 GGGGTTGCAAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCAGGATTTGATTTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGTTGGGCTTCGGAATC  
 GTTTCCGGGACCCCGGTTGATGATCTCCAGCGCGGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCCGCCACCTTAGGGGAGGCTAACTGAAACACGGA  
 AGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGTGGGTGCTTTGTTTATAAACCGGGGT  
 TCGGTCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCATTGGGGCCAATACGCCCGGCTTCTTCTTTCCCGCCACCCACCCCCCA  
 AGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCGGGGCGGAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAA  
 AACTTCATTTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTGTATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACTGAGTTTTCGTTCCACTGAGC  
 GTCAGACCCCGTAGAAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGTAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGTGCTTGCAAAACAAAAAACCCCGCTACCA  
 GCGGTGGTTGTTTCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTGTCTCTTCTAG  
 TGTAGCCGTAGTTAGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCCCTACATACCTCGCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGG  
 CGATAAGTCTGTGTTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTTACCAGGATAAGGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCC  
 AGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAGTGTAGATACTACAGCGTGTGATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGT  
 ATCCGGTAAGCGCGAGGCTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTCCGGTTTCGCCA  
 CCTCTGACTTGTAGCGTGCATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACCGCGGCTTTTACGGTTCCTGGCC  
 TTTTGTGCGCCTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT //

>pCMV-1111-AZ-C | len 4872 bp

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGC  
 TGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGG

AGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAAGTACGCGCAATGCGCTGACGCTACGCAATGCCTGGCATT  
TGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCACTCGCTATTACCATTGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTAC  
ATCAATGGGCGTGGATGACGGTTTACTCAGCGGATTTCAAGTCTCCACCCATTGACGCTCAATGGGAGTTTTGTTGGCACAAAATCAAC  
GGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGGTACCGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTT  
AGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGTCCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTCCCATCTCTGGTCGAGC  
TGGACGCGCAGCTAAACGGCCACAAGTTTACGCTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTTCATCTGCAC  
CACCGGCAAGCTGCCCGTGGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAG  
CACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGG  
TGAAGTTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTA  
CAACTACAACAGCCACAACGCTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGCCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGC  
AGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCAGTCCG  
CCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGCGGGATCACTCTCGGATGGACGAGTGT  
CAAGTACTCACTCATGAAGCAGATCCAGAGCCATGGCTTCCCGCGGAGGTGGAGGAGCAGGATGATGGCAGCTGCCATGTCTTGTGCCAG  
GAGAGCGGGATGGACCGTCAACCCTGACGCTTCTGCTAGGATCAATGTGTAGATGCTAGTACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCAAGCTTCA  
CTGCGTGCAGCGTACCGCGGGCCCGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATAACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGTCTT  
AAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTTAACTTGTATTATGCGCTTATAATGGTTACAAA  
TAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTAAACGCG  
TAAATTTGAAGCGTAAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAAATCAGCTCATTTTTTTAAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATC  
CTTATAAATCAAAGAATAGACGAGATAGGGTTGAGTGTTCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATAAAGAACGTCGAGCTCCAAGCTCAA  
AGGGCGAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCAACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCCGTAAGCACTAAAT  
CGGAACCTTAAAGGGAGCCCGGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCAAGCTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCG  
CTAGGGGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACACACCCCGCCGCTTAATGCGCCGTACAGGGCGCGTCAAGTGGCAGCTTT  
TCGGGAAATGTGCGCGAACCCCTATTTGTTTTATTTTTCTAAATACATTTCAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTATAAATGCTT  
CAATAATATGAAAAGGAAGAGTCTTGGCGGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAGTCCCGAGCTCCCGAGCTCC  
AGCAGAAAGTAAAGCAAGCATGATCTCAATTAGTCCAGCATCAGGATCGGCTCCCGAGCTCCCGAGCAGGCAAGTAAAGCAAGCATG  
CATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAATCCGCCCATCCCGCCCTAATCCGCCAGTTCGCCCATTTCTCGCCCATGGCT  
GACTAATTTTTTTTATTTATGACAGAGCGAGGCGCCTCGGCCCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTTAGGCTT  
TTGCAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCGGGCGCTTGGGTGAGAG  
GCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCCGCTGTTCGGGCTGTGAGCGAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTC  
AAGACCGACTGTCCCGTCCCTGAATGAAGTGAAGTGAAGAGGAGGAGGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGCGTTCCTTGGCAGCTGTG  
TCGACGTTGTCAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTTGGCGAAGTCCGGGGCAGGATCTCCTGTATCTCACCTGTCTCTGCCGAGAA  
AGTATCCATCATGGCTGATGCTATGCGGCGGCTGCATACGCTTGTATCCGGCTACCTGCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGA  
GCACGTAATCGGATGGAAGCCGCTTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACGTTTCGCCAGGCTCA  
AGGCGAGCATGCCCGCGGAGGATCTCGTCTGACCCATGGCGATCGCTGTTCGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATT  
CATCGACTGTGGCCGCTGGGTGTGGCGGACCCGATCAGGACATAGCGTTGGTACCCGCTGATTTGCTGAAGAGCTTGGCGGCAAGGCTT  
GACCGCTTCTCGTCTTACGCTATCGCCGCTCCCGATTCGACGCGCATCGCTTCTATCGCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCT  
GGGTTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCAGGATTTGATTTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGTTGGGCTTCGGAATC  
GTTTTCCGGGACCCGGTGGATGATCTTCCAGCGCGGGATCTCATGCTGGAGTTCTTCCGCCACCCTAGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGA  
AGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAAACGACCGGTTGGGTCGTTTGTTCATAAACCGGGGT  
TCGGTCCAGGGTGGCACTCTGTGATACCCACCGGAGCCCATTTGGGGCAATACGCCCGCTTCTTCTTTTCCCAACCCACCCCA  
AGTTCGGGTGAAGCCAGGCTCGCAGCCAAAGTCCGGGCGGAGCCATAGCCGATAGCCTCAGGTTACTACATATACTTAGTTGATTTAA  
AACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAAGTGTGTTTTGTTCCACTGAGC  
GTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGTAGATCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCCGCTACCA  
GCGGTGTTTTGTTTCCGGATCAAGAGTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCCAGCAGAGCGCAGATACCAATACTGTCTCTAG  
TGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGTAATCTGTTACCAGTGGCTGTGCCAGTGG  
CGATAAGTCTGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACATAGTTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCTGAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCC  
AGCTTGGAGCGAACGACTACACCGAAGTGTAGATACCTACAGCGTGTGATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGG  
ATCCGGTAAGCGGAGGTCGGAACAGGAGAGCGCAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGATCTTTATAGTCTGTCCGGTTTTCCGCA  
CCTCTGACTTGTAGCGTCAATTTTTGTGTGCTCGTCAAGGGGGCGGAGCTATGAAAAACGCCAGCAACCGCGCTTTTACGGTCTCTGGCC  
TTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTACCGCATGCAT//

>pCMV-11x11-AZ-w | len 4872 bp

TAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGTCATTAGTTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGC  
TGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTTGACGTCATAATGACGATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCATGGGTGG  
AGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAAGTACGCCATTGGCTGATGTACGCGCATGCCCTGGCATT  
TGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCACTCGCTATTACCATTGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTAC  
ATCAATGGGCGTGGATGACGGTTTACTCAGCGGATTTCAAGTCTCCACCCATTGACGTCATATGGGAGTTTTGTTTGGCACAAAATCAAC  
GGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGGTACCGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTT  
AGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGTCCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTCCCATCTCTGGTCGAGC  
TGGACGCGCAGCTAAACGGCCACAAGTTTACGCTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTTCATCTGCAC  
CACCGGCAAGCTGCCCGTGGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCTGCAGTGTCTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAG  
CAGCACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTCAGGCACTCCCGCCGAGG  
TGAAGTTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTA  
CAACTACAACAGCCACAACGCTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGCCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGC  
AGCGTGCAGCTCGCCGACCCTACCAGCAGAACACCCCATCGGGCAGCGCCCGTGTCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACCAGTCCG  
CCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCCGCGGGATCACTCTCGCATGGCAGCTGTA  
CAAGTACTCATGATTAAGCAGATCCAGAGCCATGGCTTCCCGCGGAGGTTGGAGGAGCAGGATGATGGCAGCTGCTGTTGTGCCAG  
GAGAGCGGGATGGACCGTCAACCTGCAGCCTGTGCTTCTGCTAGGATCAATGTGTAGATGCTAGTACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCAAAAT  
CTGCGTGCAGGTAACCGGGCCCGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATAACCACATTTGTAGAGGTTTTACTTGTCTTT  
AAAAACCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTGTTGTTTAACTTGTATTATGCGCTTATAATGGTTACAAA





```
GGAATCGTTTTCCGGGACGCCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGATCTCATGCTGGAGTTCCTCGCCACCCTAGGGGGAGGCTAACTGAAA  
CACGGGAAGGAGACAATACCCGGAAGAACCCCGCCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGTGGGTGTTGTTCATAAACG  
CGGGTTTCGGTCCCGAGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCAGACCCCATGGGGCCAATACGCCCGGTTTTCTTCCCTTTCCCCACCACCCAC  
CCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAAGCTCGGGGCGCAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTG  
ATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCA  
CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCACCG  
CTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTCC  
TTCTAGTGTAGCCGAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGC  
CAGTGGCGGATAAGTCTGTTTACCCTGGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCTGTCACA  
CAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGGAGAAAGGGCG  
ACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGGGTT  
TCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCAATTTTTGTGATGCTCGTCAAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTTT  
CTGGCCTTTTGTGGCTTTTGTCTACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT //
```

>pCRE-UNO-AZ-C | len 4408 bp

```
TAGTTATAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATGCAATGCGCTGACGTCACGCAATGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGC  
TGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGTGCGCCACCATGGTGTAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCTGG  
TCGAGCTGGACGGCGACCTTCAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGCAAGTTCAT  
CTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTCAGCCGCTACCCCGACCACATG  
AAGCAGCAGACTTCTTCAAGTTCGCGCATGCCCAGAGGTACGTCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGAGCGCAACTACAAGACCCGCG  
CCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCCACAAGCT  
GGATACAACACTACAACAGCCACCAAGCTCTATATCATGGCCGCAAGCAAGGCAATCAAGGTGAACCTCCGCAACACATCGAG  
GACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACC  
AGTCCGCCCTGAGCAAGACCCCAACGAGAAGCGGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACCGCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGA  
GCTGTACAAGTACTCACTCATGAAGCAGATCCAGAGCCATGGCTTCCCGCCGAGGTGGAGGAGCAGGATGATGGCAGCTGCCATGTCTGT  
GCCAGGTAGAGGGGATGGACCGTCAACCTGACGCTGTGCTTCTGCTAGGATCAATGTGTAGATGCTAGTACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTT  
CGAATTCTGCAGTCGACGGTACCAGCGGGCCCGGATCCACCGGATCTAGATAACTGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACT  
TGTTTAAAAAACCCTCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAAATGAATGCAATTTGTTGTTAACTTGTATTGACGCTTATAATGGT  
TACAAATAAAGCAATAGCATCAAAAATTCACAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTT  
AACCGTAAATTTGAAGCTTAATATTTTGTAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTAAATCAGCTATTTTTTAAACCAATAGCCGAAATCGGCA  
AAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAGAACCTGGAACTCCAA  
CGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTAGTGAACCATACCCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCGGTAAGCA  
CTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCGGATTTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCCGGCAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAAGCAAGGAAAGGAG  
CGGGCGTAGAGCGGTGGCAAGGTGAGCGCTCAGCTGCGGTAACCAACCCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGGCTCAAGCTG  
CACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAA  
ATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTCTGAGGCGGAAAGAACAGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAGTCCCAGGCTC  
CCAGCAGGCAGAAAGTATGCAAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACAGGTTGTGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAATGATGCAA  
AGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAAGTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCTTCCGCT  
ATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGTCAGAGGCGGAGCCGCTCGGCTCAGGCTATTCAGAAAGTGTAGGAGGCTTTTTTGGAGGCTT  
AGGCTTTTGAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGT  
GGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCGCCGCTGTTCCGGCTGTGAGCGCAGGGGCGCCCGTTCTT  
TTTGTCAAGACCGACTGTCCGCTGCCCTGAATGAACGCAAGCAGGCGAGCGCGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGGCGAG  
CTGTGCTGACAGTGTCTACTGAAAGCGGAAAGGACTGGCTGCTATTGGGCGAGCTATGGGCGAGGATCCTCTGTCATCTCACCTTGCCTGC  
CGAAGATATCCATCATGGCTGATGCTATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATC  
GAGCGAGCAGTACTCGATGGAAGCCGCTTGTGTCATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACCTGTTCCGCA  
GGCTCAAGGCGAGCATCCCCAGCGGAGGATCTGCTGTCAGCCATGGCGGATGCTGCTTGCCTGTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTT  
TGGATTGACTGACTGTGCGCGCTGGGTGTGGCGGAGCCGCTCAGGACATAGGACATAGGTTGGCTACCCGTGATATTGTTGGCTTGGCGGAA  
TGGGCTGACCGCTTCTCTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCGATTCGCAGCGCATCGCTTCTATCGCTTCTTGCAGGTTCTTCTGAGCGG  
GACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCAGCGCCCAACCTGCCATCAGAGATTTGATTCCACCGCGCCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTC  
GGAATCGTTTTCCGGGACCGCGGCTGGATGATCCTCAGCGCGGGATCTCATGCTGGAGTTCCTCGCCACCCCTAGGGGGAGGCTAACTGAAA  
CACGGAAGGAGACAATCTTCAAGTCCGCCATGCCCAGGCTACGCGCAATAAAAAGACAGAATAAAAACGCACCGTGTGGGTGTTGTTCATAAACG  
CGGGTTCCGTTCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCCATGGGGCCAATACGCCCGGTTTTCTTCTTTTCCCCACCACCCAC  
CCCCAAGTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAAGCTCGGGGCGCAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTG  
ATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCA  
CTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACCCACCG  
CTACCAGCGGTGGTTTTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAACTACTGTCC  
TTCTAGTGTAGCCGAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGC  
CAGTGGCGATAAGTCTGTTTACCCTGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACA  
CAGCCAGCTTGGAGCGAACCACTACACCGAACTGAGATACCTACAGGCTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGG  
ACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCAGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGGGTT  
TCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCAATTTTTGTGATGCTCGTCAAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCTTTTTACGGTTT  
CTGGCCTTTTGTGGCTTTTGTCTACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT //
```

>pCRE-NULL-AZ-W | len 4408 bp

```
TAGTTATAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATGCAATGCGCTGACGTCACGCAATGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGC  
TGGTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGTGCGCCACCATGGTGTAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGGCCATCTGG  
TCGAGCTGGACGGCGACCTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCGAAAGTTCAT  
CTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCCCTGACCTACGGCGTGCAGTGTCTCAGCCGCTACCCAGCCACATG  
AAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCAGGCTACGTCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGAGCGCAACTACAAGACCCGCG  
CCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCCTGGTGAACCGCATCGAGTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCTGGGGCACAGCT  
GGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGCTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAAGCGCATCAAGGTGAACCTCAAGATCCGCCACAACATCGAG  
GACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTGAGCACC
```

AGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCTGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGA  
GCTGTACAAGTACTCACTGTAAGCAGATCCAGAGCCATGGCTTCCCGCGGAGGTGGAGGAGCAGGATGATGGCACGCTGCCCATGCTTGT  
GCCAGGAGAGCGGGATGACGCTCACCTGCGAGCTGTCTTCTGCTAGGATAAATGTTAGATGCTAGTACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTT  
CGAATTTGCACTGACGGTACCGCGGGCCCGGATCCACCGATCTAGATAAATGATCATAATCAGCCATACCAATTTGTAGAGGTTTTACT  
TGCTTTAAAAAACCCTCCACACCTCCCTGAACTGAAACATAAAATGAATGCAATTTGTTGTTAACTTGTTTATTGACGCTTATAATGGT  
TACAAATAAAGCAATAGATCACAATTTACAAAATAAAGCATTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTGCCAAACTCATCAATGTATCTT  
AACCGTAAATTTAAGCGTTAATATTTTTGTTAAAAATTCGCGTTAAATTTTTGTTAAATCAGCTCATTTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCA  
AAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAGATAGGTTGAGTGTTCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATAAAGAAGCTGGACTCCAA  
CGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTTCGAGGTGCGGTAAGCA  
CTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAAGCAAGGAG  
CGGGCGTAGGGCGTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGGTAACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGTACAGGGCGCGTCAAGTGG  
CACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCGTATA  
ATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGTGGAATGTGTGTGAGTTAGGTTGTGAAAGTCCCAGGCTC  
CCCAGCGGCAGAAATGCAAAAGCATGCATCTCAATTTAGTCAGCAACAGGTGTGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCGGCTTCCGAGGCGAGTATGCAA  
AGCATGCATCTCAATTTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTTCTCGCCCC  
ATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGTCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGAGGCGCT  
AGGCTTTTGCAAAGATCGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGT  
GGAGAGGCTATTCCGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGTCTGATGCCCGGCTGTTCCGGCTGTGACGCGAGGGGCGCCGGTTCTT  
TTGTCAAAGACCGACTGTCGCGTGCCTGAACTGAACGACGAGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACAGCGGCTTCCGAGGCTTCCGCGAG  
CTGTGCTCGACGTGTACTGAAAGCGGAAAGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTCCCGGGCAGGATCTCCTGTCTATCTCACCTTGTCTCTGC  
CGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCTATGCGGGCGTGCATACGCTTGTATCCGGCTACCTGCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATC  
GAGCGAGCACGTAAGTCCGATGGAAGCCGCTTGTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCCGCA  
GGCTCAAGGCGAGTCCCGACCGCGAGGATCTCGTGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCAGAAATATCATGGTGGAAATGGCCGCTTTCT  
TGGATTCACTGACTGTGGCCGCTGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACTAGCGTTGGCTACCCGTAATTTGCTGAAGAGCTTGGCGCGCA  
TGGGCTGACCCCTTCTCGTCTTTACGGTATCCCGCTCCCGATTCGACGATCGCCTTCTATCGCCTTCTGACGCGGTTCTTCTGAGCTTCTGAGCGG  
GACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCAACCTGCCATCAGGAGATTTGATTTCCACCGCCGCTTCTATGAAAGGTTGGGCTTC  
GGAATCGTTTTCCGGGACGCGGCTGGATGATCCTCCAGCGCGGGATCTCATGTGGAGTCTTCGCCACCCTAGGGGGAGGTAAGTAAA  
CAGCGAAGGAGACAATACCGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGTGGGTCTGTTTTCATAAACG  
CGGGTTCGGTCCCAGGCTGGCACTCTGTGATAACCCACCGAGACCCATTTGGGGCAATACGCCCGGCTTCTTCTTTTCCCACCCAC  
CCCCAAGTTTCGGGTGAAGGCCAGGGCTCGCAGCCAACGTCCGGGCGGCGAGGCCCTGCCATAGCCTCAGGTTACTCATATATACTTTAGATTG  
ATTTAAAACCTTCAATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCA  
CTGAGCGTCAGACCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGAACAACAAAAACCACCG  
CTACCAGCGGTGTTTGTGTTGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCCGAGATACCAATACTGTCC  
TTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAATCTGTAGCACCCGCTACATACTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTG  
CAGTGGCGATAAGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGCTGGCTGAACCGGGGCTTCTGTCACA  
CAGCCGACTTGGAGCGAACGACTACACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGGAGAAAGCGG  
ACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTT  
TCGCCACCTCTGACTTGAAGCGTCAATTTTGTGATGCTCGTCAAGGGGCGGAGCCTATGGAAAACGCAGCAACGCGGCTTTTACGGTTT  
CTGGCCTTTGCTGGCCTTTGCTCACATGTTCTTCTCGCTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCAT //

>pSH-OGG1-K1 |len 2590 bp

CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATCTGTGGATAACCGTATTACCGCTAGCATGGATCTCGGGGACGCTAACTACTAAGCGAGAGTAGGAACTG  
CAAGGCATCAAAATAAAAGCAAAGGCTCAGTCGGAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTGTTTGTGCGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAA  
TCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGTGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCCCATAAACTGCCAGGCATCAAACTAAGCAG  
AAGGCCATCTGACGGATGGCCCTTTTTCGTTTTCTACAACTCTTCTGTTAGTTAGTTACTTAAGCTCGGGCCCAAAATAATGATTTTTATTT  
GACTGATAGTGAAGTGTTCGTTGCAACAAATGATAAGCAATGCTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCACCATGGGAAC  
CAATTCAGTGCATGATGATGATCCCGGGTTCAGGAACTCGAACGCTGACGCTATCAACCCGCTCAAGGAATCGCGGGCCAGTGTCTACATGAGCG  
GGAAACACCCAGCGCGCTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGATGTCGCTATGTGTTCTG  
GGAAATCACATAAAGCTGAAATGTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTCTGTATGAGACCACAGATCCCCCAACAACAATCGCCCGTT  
CAAGAGACGGGGATGTTGTTGTTGTTTTAAGCTTATCGATACCGTTCGACCTCGAGATATCTAGACCAGCTTTCTTGTACAAAGTTGGCAT  
TATAAGAAAGCATTTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACTATCAGTCAAAATAAAATCATTATTTGCCATCCAGCTGCAGCTTGGCC  
CGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTTGCACAAGATAAAAAATATATCATCATGAACAATAAAACTGTCTGCTTACATAAAACAGTAATAACAAGG  
GGTGTATGAGCCATATTCAACGGGAAACGTCGAGGCCGCGATTAATTTCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATA  
ATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGTGTGATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTGTCTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAA  
TGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTAATCTCTGATGATGCA  
TGGTTACTCACCCTGCGATCCCGGAAAAACAGCATTCAGGATATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAG  
GTCCTCGCGCGGTTGATTCGATTCCTGTTGTAATTTGCTCTTTAACAGCGATCGGATTTCTGCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAA  
TAACGGTTTGGTTGATGCGAGTATTTGATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATT  
TCACCGGATTCAGTCTACTCATGTTGATTTCTCACTGATAAATTTTTCAGTCAAGGAAATTAATAGGTTGATTTGATGTTGGACGAG  
TCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACCTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCAATACAGAAACGGCTTTTTCAAAAAATA  
TGGTATTGATAAATCTGATATGAATAAATGCAAGTTTCAATTTGATGCTCGATGAGTTTTCTAATCAGAAATGGTTAATTTGGTTGTAACATTAT  
TCAGATTGGGCCCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGATGAGAAAGATCAAAGGATCTTCTTGGATCCTTTTTTCTGCGGTAATCTGTGCT  
TGCAACAACAAAAACCCAGCTACCCAGCGGTGTTGTTGCGGATCAAGAGTACCAACTCTTTTTCCGAAGTGAATACCTGCTTACAGCGAGC  
GCAGATACCAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGATGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTCACTACCTCGCTGCTGCTAATC  
CTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCTGTCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCT  
GAACGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACTACACCGAAGTGAATACCTACAGCGTGAAGTATGAGAAAGCGCCACGCT  
TCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCGAGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTAT  
CTTTATAGTCTGTGCGGTTTCGCCACTCTGACTTGGCTGACTTTGTTGATGCTCGTCAAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACCGCCAGCA  
ACGCGGCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTCACATGTT //

>pSH-OGG1-K2 |len 2590 bp

```
CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTAGCATGGATCTCGGGGACGTCTAACTACTAAGCGAGAGTAGGGAACTG
CCAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGGAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTTGTGCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAA
TCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGTGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCCGCCATAAACTGCCAGGCATCAAATAAGCAG
AAGGCCATCCTGACGGATGGCCTTTTTGCGTTTTCTACAAACTCTTCCGTAGTTAGTTACTTAAAGCTCGGGCCCCAAAATAATGATTTTTATTTT
GACTGATAGTGACCTGTTGTTGCAACAAATTGATAAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAAGCAGGCTCCACCATGGGAAC
CAATTCAGTCGACTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCAGTGTCACTAGGCG
GGAACACCCAGCGCGCTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGTCATGTCGCTATGTGTTCTG
GGAAATACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACAGATCCCCGGATCAAGTATGGACACTGTT
CAAGAGACAGTGTCCATACTTGATCCTTTTAAGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGATATCTAGACCAGCTTCTTGTACAAAGTTGGCAT
TATAAGAAAGCATTGCTTATCAATTTGTTGCAACGAACAGGTCACATCAGTCAAATAAAAATCATTATTTGCCATCCAGCTGCAGCTCTGGCC
CGTGTCTCAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAAGATAAAAAATATATCATCATGAACAATAAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGG
GGTGTATAGCCATATTC AACGGGAAACGTCGAGGCCGCGATTAATAATCCAACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATA
ATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGTATGGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAA
TGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCA
TGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGAAAAACAGCATTCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAG
TGTCCCTGCGCCGGTTGCATTGATTCCTGTTTGTAAATGTCCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTCTGCTCGCTCAGGCGCAATCACGAATGAA
TAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGTATGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAGAAATGCATAAACTTTTGCATTTC
TCACCGGATTCAGTCGTCACATGTTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTTGACGAGGGGAAATTAATAGGTTGATTGATGTTGGACGAG
TCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAACGCTCGGTGAGTTTTCTCCTTCATTACAGAAACGGCTTTTTCAAAAAATA
TGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATGTCAGTTTCATTTGATGTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATGGTTGTAACATTAT
TCAGATTGGGCCCCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCT
TGCAAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGTTGTTTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACGGCTTCAGCAGAGC
GCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTTCAAGAACTCTGTAGCACCCCTACATACTCGCTCTGCTAATC
CTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTGTGTTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCCGGCT
GAACGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCT
TCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGTCGGAAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTAT
CTTTATAGTCTGCTGGGTTTCCGCCACTCTGACTTGAGCGTGCATTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCA
ACGCGGCCTTTTTACGGTTCTTGGCCTTTTGTGTCACATGTT //
```

## Anhang VI

Eigene Publikationen, die mit der Dissertation verbunden sind:

ALLGAYER, J., KITSERA, N., VON DER LIPPEN, C., EPE, B. & KHOBTA, A. (2013). Modulation of base excision repair of 8-oxoguanine by the nucleotide sequence. *Nucleic Acids Res* 41, 8559-8571.

KITSERA, N., GASTEIGER, K., LÜHNSDORF, B., ALLGAYER, J., EPE, B., CARELL, T. & KHOBTA, A. (2014). Cockayne syndrome: varied requirement of transcription-coupled nucleotide excision repair for the removal of three structurally different adducts from transcribed DNA. *Plos One* 9, e94405.

ALLGAYER, J., KITSERA, N., BARTELT, S., EPE, B. & KHOBTA, A. (2016). Widespread transcriptional gene inactivation initiated by a repair intermediate of 8-oxoguanine. *Nucleic Acids Res*, doi: 10.1093/nar/gkw473.

## Curriculum vitae

### PERSÖNLICHE DATEN

---

Name: Julia Allgayer  
Geburtsdatum und -ort: 20. Juli 1987  
in Idar-Oberstein  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### BERUFSERFAHRUNG

---

05/2012 – 01/2016  
Wissenschaftlicher Mitarbeiter  
Institut für Pharmazie und Biochemie  
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz  
Pharmakologie/Toxikologie (Prof. Dr. B. Epe)

### AKADEMISCHE AUSBILDUNG

---

seit 05/2012  
Doktorarbeit (rer. nat.)  
Institut für Pharmazie und Biochemie  
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz  
Pharmakologie/Toxikologie (Prof. Dr. B. Epe)  
*Thema:* Verschiedene Modi der Transkriptionshemmung durch  
8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxoG) in der DNA

04/2007 – 03/2012  
Studium der Biomedizinischen Chemie (Diplom-Chemiker)  
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz  
Diplomarbeit in Pharmakologie/Toxikologie (Prof. Dr. B. Epe)  
*Thema:* Untersuchung des Einflusses der Position einer  
DNA-Basenmodifikation (8-Oxo-7,8-dihydroguanin) auf die  
Expression eines Reportergens

### SCHULISCHE AUSBILDUNG

---

08/1998 – 03/2007  
Abitur  
Göttenbach-Gymnasium, Idar-Oberstein

### TAGUNGSBEITRÄGE

---

2014 13. DGDR Tagung in Mainz (Poster)  
2013 3. German-French DNA Repair Meeting (2013) in Strasbourg-Ilkirch (Poster)  
2013 1. GUM PhD Workshop „Nachwuchsförderung“ in Mainz (Vortrag)  
2012 78. Jahrestagung der DGPT in Dresden (Poster)  
2012 26. GUM Tagung in Mainz (Poster)