

Untersuchung zur endogenen Bildung von oxidativen DNA Schäden *in vivo* und *in vitro*

Dissertation zur Erlangung des Grades

- Doktor der Naturwissenschaften -

im Promotionsfach Pharmazie
am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der
Johannes Gutenberg - Universität
in Mainz

von Kathrin Gallé
geboren in Ludwigshafen am Rhein

Mainz, 2015

Erster Gutachter:

Zweiter Gutachter:

Tag der Prüfung: 13.07.2015

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES UND OXIDATIVER STRESS	3
1.1.1	Quellen von Reaktiven Sauerstoffspezies	4
1.1.2	Antioxidantien.....	5
1.1.3	Nicht-enzymatische Antioxidantien	5
1.1.4	Enzymatische Antioxidantien.....	7
1.1.4.1	Thioredoxin (TRX) und Thioredoxin-Reduktase (TR)	7
1.1.4.2	Hämoxygenase 1 (HO1)	7
1.1.4.3	Katalase	7
1.1.4.4	GSH-Peroxidase (GPX) und GSH-Reduktase (GR)	8
1.1.4.5	Superoxiddismutasen	8
1.1.5	Reaktive Sauerstoffspezies - Signaltransduktion	10
1.1.6	Dopamin: Metabolismus, ROS und DNA-Schäden	12
1.2	OXIDATIVE DNA - SCHÄDEN BEDEUTUNG UND KONSEQUENZEN - DNA-REPARATURMECHANISMEN	17
1.2.1	Schadensreversion.....	20
1.2.2	Basenexzisionsreparatur (BER)	21
1.2.2.1	OGG1	24
1.2.3	Einzelstrangbruchreparatur (SSBR)	25
1.2.4	Doppelstrangbruchreparatur (DSBR).....	26
1.2.5	postreplikative Mismatch-Reparatur (MMR)	26
1.2.6	Nukleotidexzisionsreparatur (NER).....	26
2	FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	28
3	MATERIAL UND METHODEN	29
3.1	MATERIAL.....	29
3.1.1	Geräte und Software	29
3.1.2	Verbrauchs- und Hilfsmaterialien	30
3.1.3	Chemikalien	31
3.1.4	Enzyme	33
3.1.5	DNA.....	33
3.1.6	Primer.....	34
3.1.7	Zelllinien.....	35
3.1.8	Mäuse	35
3.1.9	Puffer und Lösungen	36
3.1.9.1	Zellkultur.....	36

3.1.9.2	Isolierung von Hepatozyten mittels Leberperfusion	36
3.1.9.3	Isolierung von Zellen aus der Milz	38
3.1.9.4	Isolierung von Zellen aus der Niere	39
3.1.9.5	Alkalische Elution	39
3.1.9.6	Genexpressionsbestimmung mittels qRT-PCR.....	40
3.2	METHODEN	41
3.2.1	<i>Zellkultivierung und Zellexperimente</i>	41
3.2.1.1	Auftauen von Zellen	41
3.2.1.2	Passagieren der Zellen	41
3.2.1.3	Zellzahlbestimmung	41
3.2.1.4	Behandlung der SH-SY5Y Zellen	41
3.2.1.5	Proliferationsassay	42
3.2.2	<i>Arbeiten mit Tieren</i>	43
3.2.2.1	Zucht und Haltung transgener Mäuse mit hSOD1 Überexpression	43
3.2.2.2	Genotypisierung	44
3.2.2.3	Agarosegelelektrophorese	46
3.2.2.4	Isolierung von Hepatozyten mittels Leberperfusion	47
3.2.2.5	Isolierung von Zellen aus der Niere	48
3.2.2.6	Vitalitäts- und Zellzahlbestimmung	48
3.2.2.7	Isolierung von Zellen aus der Milz	49
3.2.2.8	Organentnahmen	49
3.2.3	<i>Alkalische Elution</i>	49
3.2.3.1	Prinzip	49
3.2.3.2	Aufbau und Vorbereitung	50
3.2.3.3	Lyse der Zellen, Enzyminkubation und Elution	51
3.2.3.4	Auswertung und Quantifizierung des DNA -Schadens	52
3.2.3.5	Alkalische Schnell-Elution zur Detektion höherer Schäden.....	53
3.2.4	<i>Mikrokernbestimmung</i>	54
3.2.5	<i>Genexpressionsbestimmung mittels quantitativer RT-PCR</i>	54
3.2.5.1	Prinzip	54
3.2.5.2	Isolierung der RNA	54
3.2.5.3	Reverse Transkription	56
3.2.5.4	Quantitative Polymerase Kettenreaktion	56
3.2.5.5	Auswertung	57
3.2.6	<i>Western Blot</i>	58
3.2.7	<i>Aktivitätsbestimmung von SOD1</i>	58
3.2.8	<i>Statistik</i>	59
4	ERGEBNISSE	60
4.1	EINFLUSS VON hSOD1 AUF DIE BILDUNG ENDOGENER OXIDATIV GEBILDETER BASENSCHÄDEN <i>IN VIVO</i>	60

4.1.1	Generierung der Mausstämme	60
4.1.2	Einfluss von hSOD1 auf die DNA-Schäden in der Leber	61
4.1.2.1	Charakterisierung der hSOD1 überexprimierenden Mäuse - Leber	61
4.1.2.2	Einfluss der hSOD1 auf das Lebergewicht	62
4.1.2.3	Nachweis der Protein-Überexpression der hSOD1 in der Leber	63
4.1.2.4	Nachweis der Genexpression der SOD1 in der Leber	64
4.1.2.5	Aktivitätsbestimmung der hSOD1 in der Leber	64
4.1.2.6	Vitalitätsbestimmung von primär isolierten Hepatozyten	65
4.1.2.7	Untersuchung der endogenen DNA-Schäden in primär isolierten Hepatozyten	66
4.1.2.8	Vergleich zwischen der Vitalität und den gemessenen DNA-Schäden bei den Hepatozyten	72
4.1.2.9	Vergleich der Vitalität und dem Alter der Tiere	74
4.1.3	Einfluss von hSOD1 auf die DNA-Schäden in der Niere	75
4.1.3.1	Einfluss der hSOD1 auf das Nierengewicht	75
4.1.3.2	Nachweis der Protein-Überexpression der hSOD1 in der Niere	76
4.1.3.3	Aktivitätsbestimmung der hSOD1 in der Niere	77
4.1.3.4	Vitalitätsbestimmung von isolierten Nierenzellen	78
4.1.3.5	Untersuchung der endogenen DNA-Schäden in primär isolierten Nierenzellen	79
4.1.4	Einfluss von hSOD1 auf die endogenen DNA-Schäden in der Milz	81
4.1.5	Einfluss von hSOD1 auf die Genexpression der Redoxhomöostase	83
4.1.6	Einfluss von hSOD1 auf die Ausbildung von Mikrokernen	84
4.2	EINFLUSS DES DOPAMINSTOFFWECHSELS AUF DIE OXIDATIVE DNA-SCHÄDIGUNG	87
4.2.1	Untersuchung der Basalspiegel in Neuroblastoma - Zellen (SH-SY5Y)	87
4.2.2	Einfluss von Dopamin auf Neuroblastoma - Zellen (SH-SY5Y)	88
5	DISKUSSION	94
5.1	WELCHE ROLLE SPIELT SOD1 BEI DEM SCHUTZ VOR OXIDATIVEN DNA-SCHÄDEN <i>IN VIVO</i> ?	94
5.2	SIND AUßER DER SOD1 ANDERE ANTIOXIDATIVE SCHUTZSYSTEME HIERBEI BEEINFLUSST ?	98
5.3	INDUZIERT DIE BILDUNG VON ENDOGENEN ROS WÄHREND DES DOPAMINSTOFFWECHSELS ENDOGEN OXIDATIVE DNA-SCHÄDEN UND KANN EINE ÜBEREXPRESSION VON MAO-A, MAO-B UND DAT4 DIES BEEINFLUSSEN ?	99
6	ZUSAMMENFASSUNG	103
7	LITERATURVERZEICHNIS	105
8	ANHANG	122

Abkürzungsverzeichnis

18S	18s ribosomale RNA
36B4	Ribosomales Phosphoprotein Po
3-MT	3-Methoxytyramin
5´dRP	5´Desoxyribosephosphatgruppe
8-oxoG	7,8-Dihydro-8-oxoguanin
ABH2/3	Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homolog 2/3
ACTb	beta Aktin
AP-1	activator protein 1
APE1	AP-Endonuklease 1
ARE	Antioxidant response element
BER	Basenexzisionsreparatur
BSA	Bovines Serum Albumin
CAT	Katalase
Cen2	Centrin 2
COMT	Catechol-o-methyltransferase
COX	Cyclooxygenase
CPDs	Cyclobutanpyrimidindimere
CS-A,B	Cockayne syndrome A/B protein (ERCC8/ERCC6)
CYP	Cytochrom P 450 Monooxygenase
DAT (4)	Dopamintransporter (4)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DOPAC	3,4Dihydroxyphenylethylsäure
DOPAL	3,4Dihydroxyphenylacetaldehyd
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK	Extracellular signal related kinase
FEN1	Flap endonuclease 1
For	forward
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase aus <i>E. coli</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GGR	Global genome repair
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPX1	Glutathionperoxidase 1
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Glutathion

GSSG	Glutathiondisulphid
h+m SOD1	Humane und murine Superoxiddismutase
HEPES	[N-2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
HIF1	Hypoxia inducible factor 1
HO1	Hämoxygenase 1
HR	Homologe Rekombination
HR23B	Human homolog of yeast Rad 23
hSOD1	humane Superoxiddismutase 1
HVA	Homovanilinsäure
Keap 1	Kelch-like ECH associating protein 1
LOX	Lipoxygenase
MAO A/B	Monoaminoxidase A/B
MEFs	Mausembryofibroblasten
MMR	Mismatch Reparatur
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mtSSBP-1	mitochondrial single-stranded binding protein-1
murine SOD1	murine Superoxiddismutase 1
Mut-S,L	Mutator S, -L
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NFkB	Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells
NHEJ	Nonhomologes Endjoining
NOX	NADPH-Oxidase
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2 related factor 2
OGG1	8-oxo-G DNA Glykosylase 1
P/S	Penicilin/Streptomycin
p53	Tumor suppressor p53
PARG	Poly (ADP-ribose) glycohydrolase
PARP1	Poly (ADP-ribose) polymerase 1
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PD	Parkinsons Disease
PERK	PRKR-like endoplasmatic reticulum kinase
PI3K	Phosphatidyl-inositol 4,5 bisphosphate 3-kinase
PKC	Proteinkinase C
rev	reverse
RFC	Replicator factor C
RPA	Replication protein A
RT	Raumtemperatur

SDS	Natriumdodecylsulfat
SN	Substantia nigra
SOD ₂	Superoxiddismutase 2
SOD ₃	Superoxiddismutase 3
SSB	Single strand break (Einzelstrangbruch)
TCR	Transcription coupled repair
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid
TFIIH	Transcription factor II human
TR	Thioredoxin-Reduktase
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TRX	Thioredoxin
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜN	Über Nacht
VMAT 2	vesicular monoamine transporter 2
XO	Xanthinoxidase
XP-A,C,E,F,G	Xeroderma pigmentosum protein A,C,E,F,G
XRCC1	X-ray repair cross complementing protein 1
ZVTE	Zentrale Versuchstiereinrichtung

1 Einleitung

Die Krebserkrankung ist in Deutschland nach den Herz - Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Etwa ein Viertel der im Jahr 2011 verstorbenen Personen erlagen einem Krebsleiden (statistisches Bundesamt, Stand Februar 2013). Die Erforschung der Ursache, sowie die Entstehungsmechanismen, Manifestation und schließlich die Therapie dieser Erkrankung sind von großer Bedeutung.

Obwohl die molekularen Mechanismen der Kanzerogenese nicht ausreichend aufgedeckt sind, geht man zellbiologisch von einem mehrstufigen Prozess aus. Hierbei wird eine Initiierungsphase vorausgesetzt, in der eine Zelle eine oder mehrere irreversible genetische Veränderungen (d.h. Mutationen) erfährt; ausgelöst durch exogene sowie endogene Karzinogene. Sind Tumorsuppressorgene oder Proto-Onkogene betroffen, so kann es in der Promotionsphase zum unkontrollierten Wachstum der initiierten Zelle kommen, präneoplastische Zellen entstehen. Durch erhöhte genetische Instabilität kommt es zu weiteren Mutationen, was in der dritten Phase, der Progression, zur Umwandlung des noch gutartigen Tumors zum malignen, bösartigen Tumor führt.

Zwillingsstudien haben gezeigt, dass genetische Prädisposition sowie Lifestyle einen großen Einfluss auf das individuelle Krebsrisiko haben. Die Vielfalt an exogenen Karzinogenen in unserer Umwelt ist breit und vielfältig. Hierbei ist der Beitrag zur Entstehung von Krebs entweder direkt initiiierend über eine DNA-Schädigung und - als Folge - Auslöser von Mutationen oder promovierend, indem die Tumorentwicklung beschleunigt wird. Es wurden Industriechemikalien und - stoffe (z.B. polyaromatische Kohlenwasserstoffe, Asbest, Arsen), Strahlung (radioaktive, sowie UV-Strahlung), Mykotoxine (Aflatoxin B1) sowie Zigarettenrauch, als eindeutig kanzerogen eingestuft. Abgesehen von diesen stehen den exogenen Noxen nicht vermeidbare endogene Noxen gegenüber. In der Zelle jedes aerob lebenden Organismus entstehen Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), z.B. als Nebenprodukte während der mitochondrialen Atmungskette oder auch als zelluläre Antwort auf Xenobiotika, Cytokine oder bakterielle Infektion. Diese endogen gebildeten ROS können wiederum oxidativ die DNA schädigen: Es entstehen oxidativ gebildete DNA Modifikationen in allen Geweben bzw. Zellen. Sie bilden eine Quelle spontaner Mutationen und tragen somit zur Krebsentstehung bei.

Diese oxidativ gebildeten DNA Schäden entstehen stetig und sind deshalb in der Zelle als sogenannte Gleichgewichtsspiegel oder auch Basalspiegel messbar. Hierbei unterliegt die Zelle einer ständigen Balance zwischen Bildung von (oxidativen)

Schäden (durch ROS) und der Fähigkeit der Zelle, diese Schäden mittels komplexer DNA-Reparaturmechanismen zu beseitigen (Epe 2002), siehe hierzu auch Abbildung 1-1.

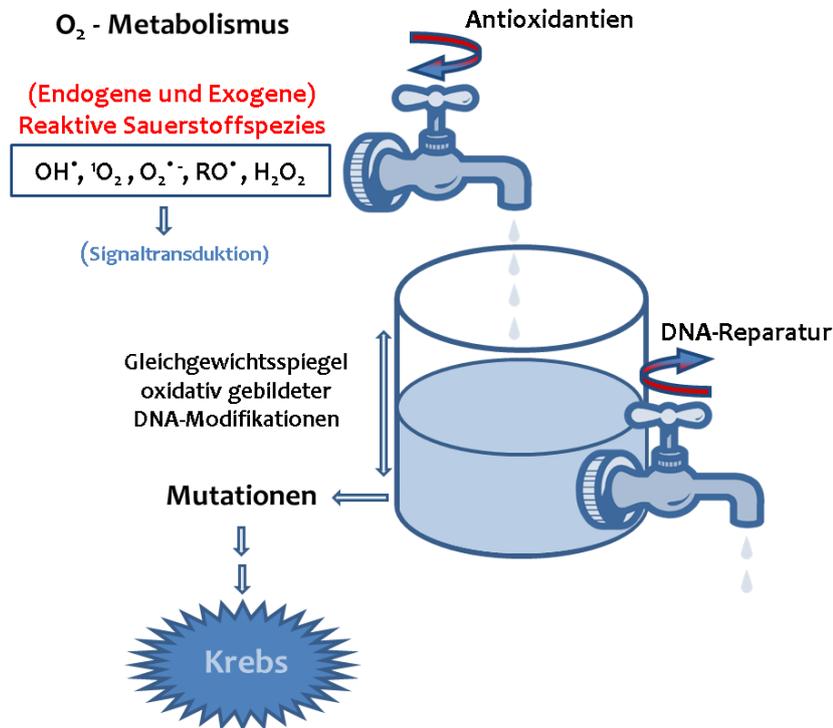


Abbildung 1-1: Basale Gleichgewichtsspiegel oxidativ gebildeter DNA Modifikationen in der Zelle werden beeinflusst durch Antioxidantien und DNA-Reparatur, modifiziert nach (Epe 2002)

Um der Entstehung von DNA-Schäden und sonstigen Folgen durch ROS vorzubeugen, haben Organismen während der Evolution neben komplexen Reparaturwegen (siehe Abschnitt 1.2) andere Abwehrmechanismen entwickelt. Es existieren außer nicht-enzymatischen Antioxidantien, auch antioxidative Enzyme, die einzelne Vertreter der ROS detoxifizieren können: u.a. Katalase, welches Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff umsetzt, sowie die Superoxiddismutase: sie dismutiert das Superoxidradikal zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff (siehe Abschnitt 1.1.4.5). Ist das Gleichgewicht zugunsten der Bildung von ROS und als Folge auch die Entstehung oxidativ gebildeter DNA-Schäden aufgrund von bestimmten Bedingungen (z.B. fehlende oder unzureichende anti-oxidative Antwort) verschoben, so spricht man von oxidativem Stress (Sies 1985).

Inwiefern das basale Gleichgewicht der DNA-Schäden in der Zelle durch ROS bzw. oxidativen Stress beeinflusst werden kann, ist Gegenstand dieser Arbeit.

1.1 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress

Liegt in der Zelle eine Dysbalance zwischen der Generierung und dem Abbau der ROS vor, so spricht man von oxidativem Stress (Sies 1985). ROS sind entweder Radikale (z.B. Hydroxyl-, Peroxyl-, Superoxidradikale) oder reaktive nicht-radikalische Stoffe (wie z.B. Singulett-Sauerstoff, Peroxynitrit, Wasserstoffperoxid). Die Lebenszeit dieser oben genannten ROS ist sehr unterschiedlich. Sie beträgt nur 10^{-9} s für die Hydroxylradikale ($\cdot\text{OH}$); die weitere Reaktion ist hier limitiert durch Diffusion, d.h. sie sind sehr reaktiv und reagieren sofort am Entstehungsort weiter. Daraus entstehendes Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ist sehr stabil und wird durch z.B. Katalase abgebaut. Peroxylradikale wiederum sind für Sekunden stabil, sie können vom Produktionsort wegdiffundieren und weiter entfernt abreagieren (Sies 1993).

Tabelle 1-1: Übersicht über die wichtigsten Reaktiven Sauerstoffspezies

$\cdot\text{OH}$	Hydroxylradikal
$^1\text{O}_2$	Singulett-Sauerstoff
$\text{O}_2^{\cdot-}$	Superoxidanion-Radikal
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
$\text{RO}\cdot$	Alkoxyradikal
$\text{ROO}\cdot$	Peroxyradikal
$\text{NO}\cdot$	Stickstoffmonoxid

ROS können exogen aber auch endogen in der Zelle gebildet werden. Oxidativer Stress führt zu Seneszenz, der Entstehung von Entzündungen, zu Kanzerogenese und trägt zu degenerativen Erkrankungen (z.B. Amyotrophe Lateralsklerose, Alzheimer, Parkinson) bei.

Das Vermeiden von oxidativem Stress und dadurch entstehenden oxidativen Schäden ist die Aufgabe eines komplexen Verteidigungssystems der Zelle; dies geschieht durch enzymatische sowie nicht enzymatische Prozesse.

Reaktive Sauerstoffspezies haben jedoch neben ihren negativen Eigenschaften auch eine wichtige Redox-Signalfunktion in der Zelle. Sie interagieren direkt mit Signalmolekülen oder triggern indirekt die Genexpression der adaptiven Zellantwort.

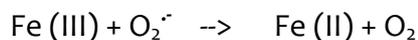
1.1.1 Quellen von Reaktiven Sauerstoffspezies

Die Quellen von ROS lassen sich in drei Hauptkategorien einteilen: exogene, endogene Quellen und Metall-katalysierte Reaktionen (siehe Tabelle 1-2). Es gibt zahlreiche exogene Quellen die innerhalb der Zelle zur Bildung von ROS und somit zu oxidativem Stress führen können. Hierzu gehören Tabakgenuss, Arzneimittel (z.B. Anthrazykline (Kovacic und Jacintho 2001)), Sonnenlicht bzw. UV-Strahlung (Eiberger, et al. 2008) sowie ionisierende Strahlung, sonstige Xenobiotika wie z.B. Kaliumbromat (Ballmaier und Epe 1995) oder Photosensibilisatoren + sichtbares Licht (Acridinorange (Epe, et al. 1993), Ro 19-8022 (Will, et al. 1999)).

Endogen können ROS durch den Zellmetabolismus generiert werden. Hierzu gehören: die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien, die peroxisomale beta-Oxidation von Fettsäuren, der Katabolismus von a) Xenobiotika durch Cytochrom P450 Monooxygenasen (CYP), b) Purine durch Xanthinoxidase (XO) und c) Lipide/Fettsäuren durch Cyclooxygenasen (COX) oder Lipoxygenase (LOX). Auch bei dem sogenannten „oxidative burst“ werden ROS generiert, ausgelöst durch die NADPH-Oxidasen (NOX) und Myeloperoxidasen in neutrophilen Granulozyten und Makrophagen. Dies ermöglicht den intrazellulären Verdau von phagozytierten Krankheitserregern.

Den meisten Schätzungen zufolge ist die Hauptquelle der zellulären ROS der Atmungskette in den Mitochondrien zuzuschreiben. Bis zu 0,2% des Sauerstoffs werden dort zu Superoxid umgewandelt (St-Pierre, et al. 2002). In der Elektronentransportkette im Komplex I (NADPH-Dehydrogenase) und im Komplex III (Cytochrom-c-Reduktase) werden Superoxidradikalanionen ($O_2^{\cdot-}$) gebildet (Loschen, et al. 1971).

Sind in der Zelle Übergangsmetalle (z.B. Eisen, Kupfer, Chrom) vorhanden, so kann es zur Fenton-Reaktion kommen:



Hierbei werden mithilfe von Übergangsmetallen (hier Eisen) aus Wasserstoffperoxid die reaktiven Hydroxylradikale gebildet (Stoys und Bagchi 1995, Lee, et al. 2012).

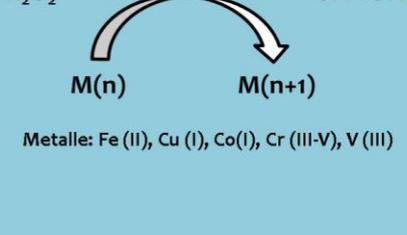
Exogene Quellen von ROS	Endogene Quellen von ROS	Reaktion durch Übergangsmetalle
<ul style="list-style-type: none"> • Tabakgenuss • Ionisierende Strahlung • Sonnenlicht • Xenobiotika • Photosensibilisatoren 	<ul style="list-style-type: none"> • mitochondriale Atmungskette • NADPH-Oxygenasen (NOX) • Cytochrom P450 (CYP) • Lipoxygenase (LOX) • Xanthinoxidase (XO) • Peroxisomale beta-Oxidation • Entzündung/oxidative burst 	$\text{H}_2\text{O}_2 \xrightarrow{\text{M(n)}} \text{OH} + \text{OH}^-$  <p>Metalle: Fe (II), Cu (I), Co(I), Cr (III-V), V (III)</p>

Tabelle 1-2: Übersicht über die drei Hauptquellen für endogene ROS in der Zelle, modifiziert nach Lee, et al. 2013

Eine andere endogene Quelle von ROS sind Peroxisomen. Diese von einer Membran umschlossenen, subzellulären Organellen haben eine vielfältige metabolische Funktion. Hauptsächlich wird hier Wasserstoffperoxid während der beta-Oxidation von Fettsäuren generiert. Es wurde geschätzt, dass etwa 35% der Wasserstoffperoxidproduktion in der Rattenleber von peroxisomalen Oxidasen kommt (Boveris, et al. 1972). Hierunter gehört auch das Metalloenzym Xanthinoxidase (XO), welches die Oxidation von Hypoxanthin zu Xanthin und schließlich zur Harnsäure katalysiert. Es entstehen Superoxidradikale und auch Wasserstoffperoxid (Valko, et al. 2004).

1.1.2 Antioxidantien

Zur Verteidigung gegen ROS und um somit oxidativen Stress und in der Folge oxidativen Schaden zu verhindern, haben sich in der Evolution mehrere Mechanismen entwickelt. Zum einen ist es möglich, nicht-enzymatisch einzugreifen, indem Radikale abgefangen oder Metalle durch Proteine chelatiert werden. Außerdem gibt es Enzyme, die spezifisch ROS detoxifizieren können.

1.1.3 Nicht-enzymatische Antioxidantien

Es gibt mehrere niedrig-molekulare Antioxidantien. Die eher fettlöslichen Stoffe sind in zellulären Membranen und an Lipoproteinen lokalisiert, wobei die wasserlöslichen Stoffe im wässrigen Extrazellularraum und im Blut vorliegen. Die wichtigsten nicht-enzymatischen Antioxidantien Vitamin C, Vitamin E (alpha-Tocopherol), Glutathion (GSH), Thioredoxin (Trx), sowie Carotinoide und Polyphenole (Sies 1993).

Alpha-Tocopherol ist die chemisch aktive Form von insgesamt acht Formen von Vitamin E, es ist lipophil und das am häufigsten vorkommende lipophile Antioxidant in zellulären Membranen (Burton und Ingold 1989). Die Hauptaufgabe liegt im Schutz vor

der Lipidperoxidation (Pryor 2000). Außerdem fungiert es zusammen mit Vitamin C in einem zyklusähnlichen Prozess. Hierbei wird das alpha-Tocopherolradikal (nach seiner antioxidativen Reaktion) durch Vitamin C zu seiner aktiven Form reduziert (Kojo 2004).

Ein anderes lipidlösliches Antioxidant ist beta-Carotin. Es kann Singulett-Sauerstoff quenchen und es reagiert mit Peroxyl-, Hydroxyl- und Superoxidradikalen. Außerdem werden Lipide von beta-Carotin (wenn in ausreichender Menge vorhanden) vor peroxidativem Schaden geschützt (Mortensen, et al. 2001, El-Agamey, et al. 2004).

Ein wasserlösliches Antioxidant ist das Vitamin C (Retsky, et al. 1999). Es wirkt vorwiegend im wässrigen Milieu und schützt außerdem Membranen vor Oxidation, indem es ROS und freie Radikale abfängt.

Glutathion, ein Tripeptid, ist ein multifunktionelles, intrazelluläres Antioxidant. Es wird aus den drei Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin gebildet, ist das wichtigste lösliche Antioxidant und kommt in millimolaren Konzentrationen in der Zelle vor (Akerboom, et al. 1982, Masella, et al. 2005). Die reduzierte Form ist das Glutathion (GSH), die oxidierte Form das Glutathiondisulphid (GSSG). GSH kann direkt Hydroxylradikale und Singulett-Sauerstoff abfangen, sowie im Zusammenspiel mit Glutathionperoxidase Wasserstoffperoxid und Lipidperoxide detoxifizieren. Außerdem dient es im Phase II Metabolismus zur Konjugation an Xenobiotika. Bei erhöhtem oxidativem Stress akkumuliert das GSSG, somit kann die GSH/GSSG Ratio als Indikator des oxidativen Status einer Zelle dienen (Hwang, et al. 1992). Das Enzym Glutathionreduktase kann das GSSG NADPH-abhängig wieder in die reduzierte Form (GSH) überführen.

Polyphenole, Flavonoide im Speziellen, gehören zu den sekundären Pflanzeninhaltsstoffen und gehören als wichtiger Bestandteil zu unserer pflanzlichen Ernährung. Sie können als Metallchelatoren wirken und terminieren freie radikalische Kettenreaktionen. Für das Polyphenol Resveratrol konnte gezeigt werden, dass es die Spiegel an endogenen oxidativ gebildeten DNA-Schäden, sowie daraus resultierende spontane Mutationen senken kann. Wahrscheinlich geschieht dies durch die Stimulation von antioxidativen Schutzmechanismen (Fusser, et al. 2011).

Eine weitere Möglichkeit der Zelle sich vor der Produktion von ROS zu schützen, ist das Verhindern der Fenton-Reaktion (siehe Abschnitt 1.1.1). Diese Aufgabe erfüllen metallchelatierende und metallspeichernde Proteine, die die Konzentration an freien Metallen in der Zelle regulieren. Hierzu gehören Ferritin (Arosio und Levi 2002, Wu, et al. 2013), Transferrin (Luck und Mason 2012), Coeruloplasmin (Johannesson, et al. 2012) und Metallothionein (Qu, et al. 2013).

1.1.4 Enzymatische Antioxidantien

In diesem folgenden Abschnitt werden die wichtigsten enzymatischen Antioxidantien näher beschrieben. Hierbei sind die Superoxiddismutasen im Folgenden besonders ausführlich dargestellt, da diese einen Hauptpunkt dieser Arbeit darstellen, siehe auch Abbildung 1-2.

1.1.4.1 Thioredoxin (TRX) und Thioredoxin-Reduktase (TR)

Thioredoxin (TRX) ist ein kleines 12-kDa großes Protein, (eine Oxidoreduktase) welches in seinem aktiven Zentrum zwei Cysteine besitzt. Es wird dadurch als sogenannter Oxysensor in der Zelle angesehen, vor allem aufgrund seiner Redox-chemischen Eigenschaften der Cysteinreste und seiner Fähigkeit mit einer weiten Reihe von Proteinen zu interagieren (Yamawaki und Berk 2005). Es kann oxidierte Proteine „reparieren“, indem es Elektronen der oxidierten Disulfidreste der Proteine auf seine eigenen Cysteinreste überträgt. Das Thioredoxin wird somit oxidiert und das reparierte Protein reduziert. Das nun oxidierte Thioredoxin kann mithilfe der Reduktionsäquivalente $FADH_2$ und $NADPH$ durch die Thioredoxin-Reduktase (TR) wieder in seine aktive Form reduziert werden (Mustacich und Powis 2000).

1.1.4.2 Hämoxigenase 1 (HO1)

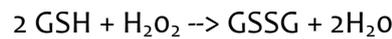
Da beobachtet wurde, dass Hämoxigenase 1 (HO1) durch oxidativen Stress induziert werden kann, folgte die Hypothese, dass das Enzym in der antioxidativen Antwort eine Rolle spielt (Applegate, et al. 1991). Hämoxigenasen katalysieren den Abbau von Häm zu Billiverdin. Hierbei wird Häm unter dem Verbrauch von $NADPH$ und unter Freisetzung von Fe^{2+} und CO_2 abgebaut. Bisher ist nicht genau bekannt, wie die Hämoxigenase die verschiedenen Gewebe vor oxidativem Stress schützt. Sehr wahrscheinlich sind die Stoffwechselprodukte die durch HO1 gebildet werden (Biliverdin und Bilirubin) dafür verantwortlich, diese wirken u.a. antiapoptotisch und antioxidativ (Ryter, et al. 2006).

1.1.4.3 Katalase

Katalase ist in Pflanzen, Tieren und aeroben Bakterien zu finden (Mates, et al. 1999). Es ist ein tetrameres, 240 kDa großes Enzym, jede Untereinheit hat eine Größe von 60 kDa, besitzt eine Häm-Gruppe und eine $NADPH$ -Bindestelle. Katalase befindet sich in Peroxisomen und steht mit der Glutathionperoxidase in Konkurrenz bei der Umwandlung von Wasserstoffperoxid (Valko, et al. 2006). Katalase hat eine der höchsten bekannten Umsatzraten, es ist in der Lage 6 Millionen Moleküle H_2O_2 pro Minute umzusetzen (Kirkman und Gaetani 2007).

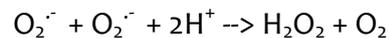
1.1.4.4 GSH-Peroxidase (GPX) und GSH-Reduktase (GR)

Im Menschen sind fünf verschiedene Glutathionperoxidasen (GPX) bekannt. Sie sind Selen abhängige Peroxidasen, die ein Selenocystein in ihrem aktiven Zentrum besitzen. Wasserstoffperoxid wird wie bei der Reaktion mit Katalase (siehe Abschnitt 1.1.4.3) in Wasser umgewandelt. Die reduzierte Form GSH wird in die oxidierte Form GSSG überführt und kann durch das Enzym GSH-Reduktase (GR) in GSH regeneriert werden.



1.1.4.5 Superoxiddismutasen

Superoxiddismutasen (SOD) sind eines der effektivsten antioxidativen Enzymsysteme in der Zelle. Sie sind eine Familie von Enzymen, die die Dismutation des Superoxidradikalanions ($\text{O}_2^{\cdot-}$) katalysieren (Fridovich 1995):



Der Vorteil hierbei liegt darin, dass nach der Katalyse durch SOD Wasserstoffperoxid durch andere Enzyme (z.B. Katalase) in Wasser und Sauerstoff umgewandelt werden kann. Wasserstoffperoxid ist für die Zelle weitaus weniger toxisch als die sehr reaktiven Superoxidradikale. SODs beschleunigen die Detoxifizierungsreaktion von $\text{O}_2^{\cdot-}$ auf das bis zu 10.000 fache im Vergleich zur nicht-enzymatischen Reaktion. Wie in Tabelle 1-3 zu sehen ist, existieren mehrere Superoxiddismutasen, alle sind metallenthaltende Enzyme: Kupfer/Zink, Mangan, Eisen als auch Nickel können sich jeweils in ihrem aktiven Zentrum befinden.

Tabelle 1-3: Familie der Superoxiddismutasen

Typ	Organismus	Lokalisation
Fe-SOD	Prokaryoten, einige Pflanzen	Cytosol, Mitochondrien
Ni-SOD	Prokaryoten	Streptomyces
Cu/Zn-SOD (SOD1)	Eukaryoten, einige Bakterien	Intermembranraum von Mitochondrien, Cytosol, Nukleus
Mn-SOD (SOD2)	Eukaryoten, Prokaryoten	Mitochondrien
Cu/Zn-SOD (SOD3)	Eukaryoten	Extrazellularraum

Fe-SOD und Mn-SOD sind hauptsächlich bei Prokaryoten oder in eukaryotischen Mitochondrien zu finden. Mn-SOD in Eukaryoten, auch oft als SOD2 bezeichnet, spielt eine große Rolle bei der Detoxifizierung von Superoxid, welches im Zuge der

oxidativen Phosphorylierung in der mitochondrialen Atmungskette entsteht. Das Enzym stammt hier ursprünglich sehr wahrscheinlich von der Endosymbiose eines aeroben Bakteriums in eukaryotische Zellen ab. Es agiert im Mitochondrium, wird aber durch nukleäre DNA codiert und ist aktiv als 23 kDa großes Homotetramer. SOD2 defiziente Mäuse zeigen eine hohe Lethalität, Neurodegeneration und Kardiomyopathie (Li, et al. 1995, Lebovitz, et al. 1996). Das Resultat einer lebenslangen Reduktion von SOD2 in heterozygoten SOD2^{+/-} - Tieren sind erhöhte Spiegel an 8-oxoG in nukleärer und mitochondrialer DNA sowie eine erhöhte Krebsinzidenz (Van Remmen, et al. 2003).

SOD3 ist wie die SOD1 ein Cu/Zn - enthaltendes Enzym, wurde als letztes entdeckt und oft als EC-SOD bezeichnet. Das SOD3 Gen besitzt zur SOD1 eine 40 - 60% Sequenzhomologie. Das SOD3 - Enzym hat eine Größe von 135 kDa, übt seine katalytische Reaktion als Homotetramer aus und wurde in Extrazellulärflüssigkeiten wie Plasma, in der Lymphe, in der Cerebrospinalflüssigkeit und in der Extrazellulärmatrix gebunden an Heparin nachgewiesen. Es ist überwiegend im Herz, dem Pankreas und in der Lunge zu finden (Marklund 1982, Marklund, et al. 1982).

SOD1 konnte im Nervensystem, der Leber und Niere von Säugetieren als 32 kDa großes Homodimer nachgewiesen werden (Banci, et al. 1998). Es ist im Intermembranraum der Mitochondrien, im Cytoplasma und im Zellkern lokalisiert (McCord und Fridovich 1969, Weisiger und Fridovich 1973, Chang, et al. 1988). In Zellkulturexperimenten konnte gezeigt werden, dass eine SOD1-Defizienz zu erhöhten Spiegeln von AP - Stellen (Apurinic/ Apyrimidinic sites) und zu höheren Spiegeln von Schwesterchromatidaustauschen (SCE) (Inoue, et al. 2010) führt. SOD1 ko-Mäuse haben eine reduzierte Lebensspanne, zeigen eine erhöhte Inzidenz von Leberkrebs und signifikant erhöhte Level an 8-oxoG (Elchuri, et al. 2005, Siomek, et al. 2010). Als Resultat dieser erhöhten oxidativ gebildeten DNA-Basenschäden konnten (Busuttill, et al. 2005) einen 3-fachen Anstieg der Mutationsfrequenz im Lac-Z Gen der SOD1 defizienten Tiere nachweisen. Das Spektrum der Mutationen zeigte vorwiegend GC-TA Transversionen und GC-AT Transitionen. Diese Mutationen treten typisch nach Exposition von oxidativem Stress auf.

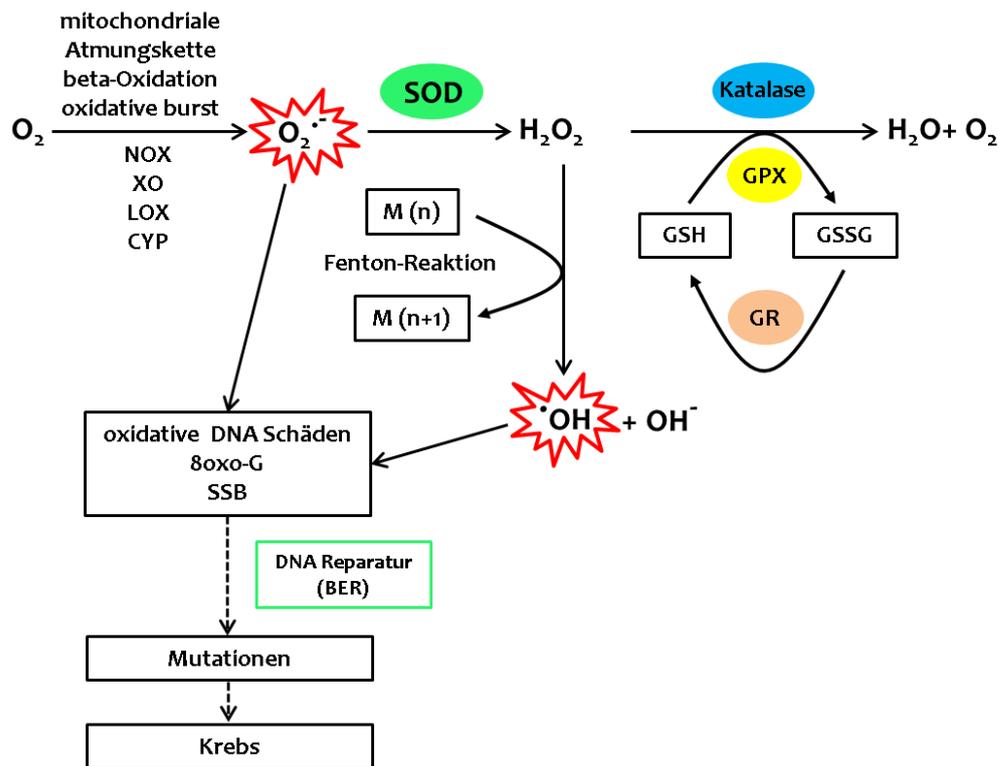


Abbildung 1-2: Einfluss des antioxidativen Schutzsystems auf die Bildung von DNA-Schäden, Mutationen und die Krebsentstehung. Nähere Beschreibung zur Abbildung siehe Abschnitte 1.1.1, 1.1.2, 1.1.3 und 1.1.4.

1.1.5 Reaktive Sauerstoffspezies - Signaltransduktion

ROS sind, wie schon im vorherigen Text angedeutet, nicht nur schädlich für die Zelle, da sie Schäden an Makromolekülen wie Proteinen, Lipiden, RNA oder DNA verursachen. Sie nehmen in der Zelle zudem eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion ein. Durch die Oxidation von Sulfhydrylgruppen an Cysteinen zu Disulfidbindungen, können ROS wichtige Spieler von Signaltransduktionskaskaden beeinflussen (Sun und Oberley 1996), wie z.B. Protein-Tyrosinphosphatasen, Rezeptortyrosinkinasen und Serin-Threonin-Kinasen. Durch die Konformationsänderung der Proteine kann es zu einer Upregulation von redox-regulierten Transkriptionsfaktoren kommen, beispielsweise AP-1 (activator protein 1), NF κ B (Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B-cells), p53 (Tumor suppressor p53), HIF1 (Hypoxia inducible factor 1) und NFAT (Nuclear factor of activated T-cells). Diese üben große Effekte auf Zellproliferation, Entzündungsreaktionen und Apoptose aus.

Die zellulär antioxidativ wirkenden Schutzsysteme können von der Zelle bei hohem oxidativen Stress über den sogenannten Nrf2 (nuclear factor erythroid 2 related factor

2) Transkriptionsfaktor induziert werden. Nrf2 ist im normal physiologischen Zustand durch seinen Inhibitor Keap 1 (Kelch like ECH associating protein 1) im Komplex im Cytosol gebunden (Itoh, et al. 1999, Zhang 2006, Sykiotis und Bohmann 2008), somit wird die Translokation von Nrf2 in den Zellkern unterbunden. Neben der Komplexbildung bewirkt Keap1 außerdem den proteasomalen Abbau von Nrf2 (Cullinan, et al. 2004, Furukawa und Xiong 2005, Kobayashi, et al. 2006).

Bei erhöhtem oxidativen Stress erfolgt eine Konformationsänderung des Keap1 Proteins durch Oxidation bestimmter Cysteinreste (Wakabayashi, et al. 2004), Nrf2 wird freigesetzt (Dinkova-Kostova, et al. 2002) und transloziert in den Zellkern. Im Zellkern kann Nrf2 an die ARE-Sequenz (antioxidative response Element) antioxidativer Gene (wie z.B.: SOD, HO1, GR, GPX, Katalase, TRX) binden und deren Expressionsrate steigern (Nguyen, et al. 2009). Nrf2 kann neben der Oxidation der Keap1-Cysteinreste auch durch posttranslationale Modifizierung, genauer über Phosphorylierung, direkt über Kinasen aktiviert werden. Hierbei bewirkt die Phosphorylierung die Dissoziation des Nrf2-Keap1 Komplexes. Dies konnte unter anderem für die PKC (Proteinkinase C), ERK (extracellular signal-related kinase), PI3K (Phosphatidyl-inositol 4,5 bisphosphate 3-kinase) und PERK (protein kinase like endoplasmic reticulum kinase) gezeigt werden (Yu, et al. 1999, Lee, et al. 2001, Huang, et al. 2002, Cullinan, et al. 2003, Xu, et al. 2006).

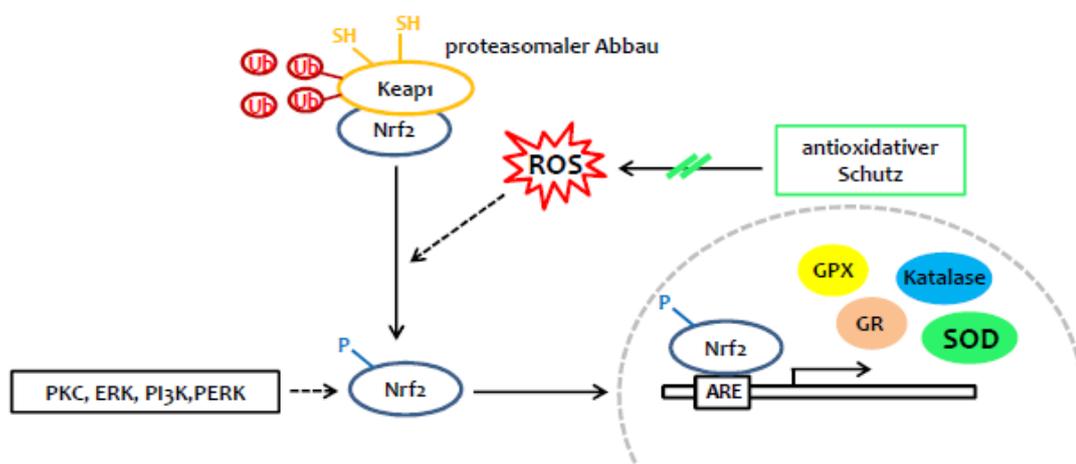


Abbildung 1-3: Induzierbarer antioxidativer Schutz, reguliert durch Nrf2. Durch ROS wird der Nrf2-Transkriptionsfaktor aktiv und transloziert in den Zellkern. Dort induziert er über die ARE-Sequenz die Expression antioxidativer Proteine wie z.B. SOD, GPX, GR und Katalase, welche dann die Reaktiven Sauerstoffspezies detoxifizieren können. Nähere Beschreibung siehe Abschnitt 1.1.5.

1.1.6 Dopamin: Metabolismus, ROS und DNA-Schäden

Die Parkinson Erkrankung ist klinisch charakterisiert durch Bradykinesie, Rigor, Tremor und ist eine der häufigsten neurodegenerativen Erkrankungen des fortgeschrittenen Lebensalters. Etwa 2% der Bevölkerung über 65 Jahre sind davon betroffen (de Rijk, et al. 1997). Pathophysiologisch steht die Degeneration der dopaminergen Neurone in der Zona compacta in der Substantia nigra (SN) im Vordergrund (Lowe J 1997). Die Ursache der Zelldegeneration bei Parkinson ist nicht vollständig geklärt, nur 10% der Parkinsonerkrankungen sind genetisch bedingt. Es konnten mehrere Gene identifiziert werden, die für die familiäre Form der Erkrankung verantwortlich sind. Besonders zu nennen ist hierbei das Parkin-Gen (PARK2). Hier führen Genmutationen zu einer autosomal rezessiven Form von Parkinson mit sehr früher Manifestation (Kitada, et al. 1998). Parkin ist eine E3-Ubiquitin-Ligase und übt seine neuroprotektive Wirkung über mindestens drei mögliche Mechanismen aus (Winklhofer 2014):

- geschädigte Mitochondrien werden über den Prozess der Mitophagie aus der Zelle entfernt.
- der proteasomale Abbau von toxischen Parkin-Substraten verhindert deren Akkumulation und somit die nachfolgende Zelltoxizität.
- Parkin beeinflusst den prosurvival Signalweg NFκB und die proapoptotischen Signalwege JNK und BAX, zugunsten des Zellüberlebens.

Es konnte zudem gezeigt werden, dass Parkin neuroprotektiv wirkt: Zellkulturexperimente mit einer Parkin-Überexpression zeigten den Schutz vor Zelltod, induziert u.a. durch Dopamin (Jiang, et al. 2004), Kainat und Rotenon (Staropoli, et al. 2003, Henn, et al. 2007). Zudem ergab eine Studie, dass die Synthese von Parkin nach oxidativem Stress induziert wird (Yang, et al. 2006). Es gibt zusätzlich viele Hinweise darauf, dass oxidativer Stress in der Pathogenese von Parkinson eine große Rolle spielt:

- i) bei Parkinsonpatienten wurden post mortem erhöhte Eisenspiegel in der SN gefunden (Sofic, et al. 1988, Dexter, et al. 1989, Riederer, et al. 1989). Auch kommt Neuromelanin, das schwarze Pigment welches eine hohe Bindungsaffinität zu Eisen besitzt und dieses chelatiert, gehäuft in der SN vor (Zecca, et al. 2001, Faucheux, et al. 2003). Eisen ist bekannt als Katalysator der Fentonreaktion, bei der die sehr reaktiven Hydroxylradikale gebildet werden (siehe auch Abschnitt 1.1.1). *In vitro* Experimente zeigten, dass Dopamin und L-Dopa zusammen mit Übergangsmetallen Hydroxylradikale bildeten (Spencer, et al. 1994, Spencer, et al. 1995).
- ii) es wurden verminderte Glutathion-, Katalase- und Glutathionperoxidasespiegel in Gehirnen von Parkinsonpatienten post

mortem nachgewiesen (Ambani, et al. 1975, Perry, et al. 1982, Kish, et al. 1985). Glutathion als Beispiel gehört zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien, ist das wichtigste lösliche Antioxidant und kommt in millimolaren Konzentrationen in der Zelle vor (siehe Abschnitt 1.1.3).

- iii) erhöhte Raten von Lipidperoxidation (Dexter, et al. 1989) und Proteinoxidation (Yoritaka, et al. 1996, Alam, et al. 1997) wurden im Mesencephalon von Parkinsonpatienten post mortem gemessen.
- iv) die Autoxidation von Katecholaminen sensibilisiert im Speziellen dopaminerge Neuronen für oxidativen Stress, da im Dopaminmetabolismus als Beispiel, elektrophile Semichinone und Chinone zusammen mit Reaktiven Sauerstoffspezies entstehen ($\cdot\text{OH}$, O_2^- , H_2O_2) (Graham 1978, Cohen 1983).

Dopamin gehört zur Katecholaminfamilie und ist ein wichtiger Neurotransmitter im peripheren und zentralen Nervensystem. Nach der Exzitation dopaminerger Neurone wird Dopamin aus den synaptischen Vesikeln ausgeschüttet. Diese binden an präsynaptische Autorezeptoren oder es werden membranständige Rezeptoren (D_1 - D_5) in der Postsynapse aktiviert. Letztere können entweder exzitatorisch (D_1 und D_5 , G_s -gekoppelt, Öffnung von Natriumkanälen) oder inhibitorisch (D_2 - D_4 , G_i -gekoppelt, Öffnung von Kalium-Kanälen) wirken. Um die Signalweiterleitung zu stoppen, muss Dopamin inaktiviert werden. Hierzu tragen zwei Vorgänge bei: extrazelluläres Dopamin muss durch einen Reuptake aus dem synaptischen Spalt entfernt und in die Zelle aufgenommen werden. Außerdem kann nachgeschaltet der Abbau des Dopamins erfolgen.

Dopamin wird durch einen Dopamin-Kotransporter (DAT) in die Zelle transportiert und recycelt durch den Transporter VMAT 2 (vesicular monoamine transporter 2), indem es in synaptische Speichervesikel sequestriert wird (Eriksen, et al. 2010) und somit bis zur nächsten Vesikelausschüttung zur Verfügung steht. Dopamin, welches durch das Lecken der Vesikel in der Zelle akkumuliert, oxidiert spontan zu Aminochrom, kann jedoch auch durch Enzyme degradiert werden. Hier stehen die MAOs (Monoaminoxidasen) und COMT (Catechol-o-methyltransferase) zur Verfügung.

Die Monoaminoxidasen nutzen FAD als Kofaktor und können Dopamin zum entsprechenden Aldehyd (3,4-Dihydroxyphenylacetaldehyd, DOPAL) oxidativ deaminieren; bei dieser Reaktion entsteht außerdem als Nebenprodukt H_2O_2 und NH_3 . Danach kann die Aldehyddehydrogenase DOPAL zu 3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure (DOPAC) umsetzen, welches weiter von COMT zu Homovanillinsäure (HVA) methyliert wird. Dopamin kann auch direkt von COMT zu 3-Methoxytyramin (3-MT) methyliert werden. Dieses wird dann von MAO zu 3-Methoxy-4-phenylacetaldehyd, H_2O_2 und NH_3

umgesetzt. Im letzten Schritt wird dann HVA durch die Aldehydehydrogenase gebildet (siehe Abbildung 1-4).

Es sind zwei Isoformen der MAO bekannt: MAO-A und MAO-B. Sie werden durch zwei verschiedene Gene kodiert (Bach, et al. 1988), sind an der äußeren Membran der Mitochondrien lokalisiert und befinden sich im ZNS sowie im peripheren Nervensystem. Im ZNS sind sie in Neuronen, Mikrogliazellen und Astrocyten zu finden. Grundsätzlich konnte *in vitro* gezeigt werden, dass beide Isoformen Dopamin verstoffwechseln, aber es gibt große Speziesunterschiede: beispielsweise ist in Ratten die MAO-A größtenteils für den Abbau von Dopamin zuständig, während jedoch im Menschen Dopamin hauptsächlich durch MAO-B umgesetzt wird (Napolitano, et al. 1995).

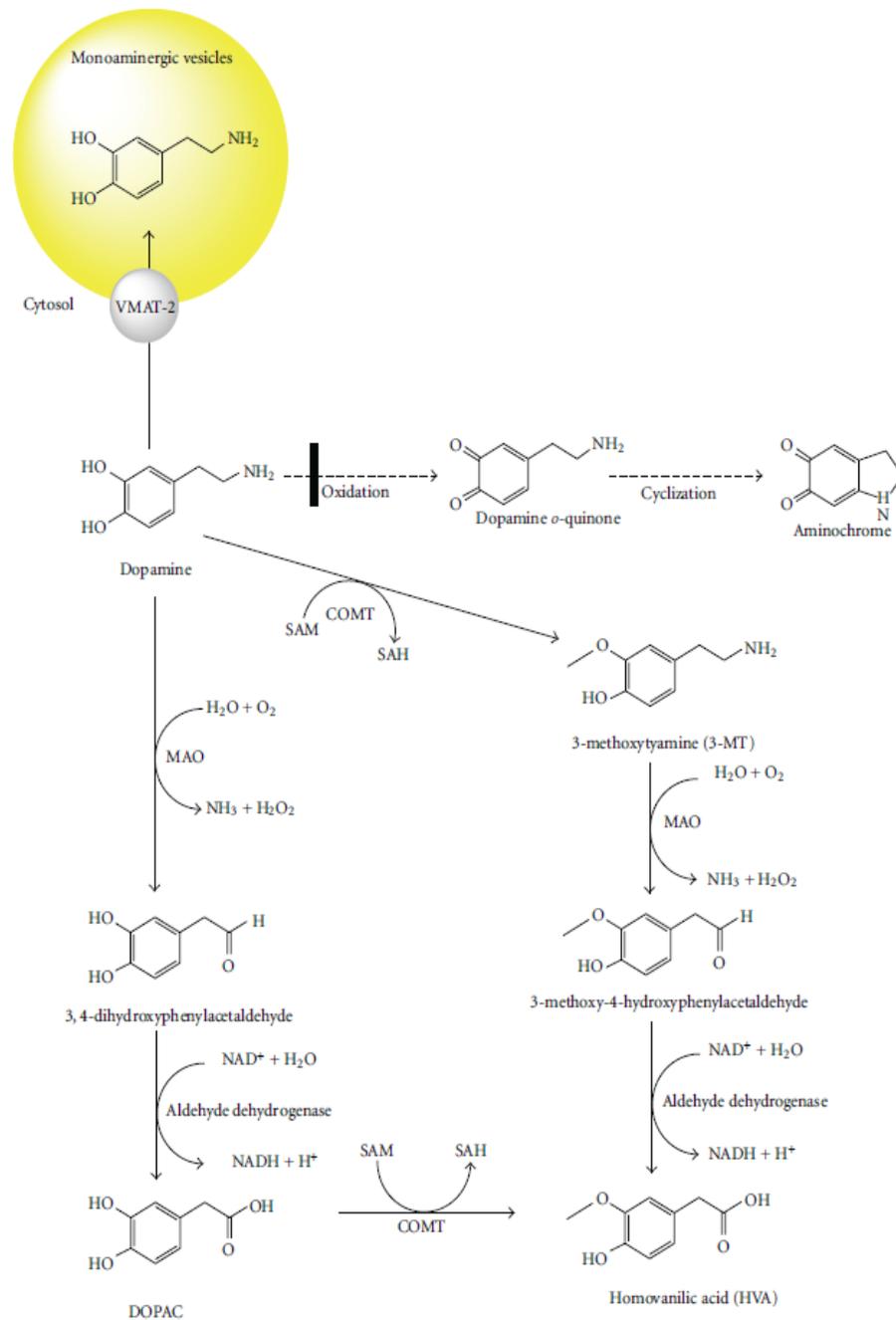


Abbildung 1-4: Enzymatischer Abbau von Dopamin durch MAO und COMT, nach Munoz, et al. 2012

Dopamin kann neben dem enzymatischen Abbau auch autoxidieren, und es können hochreaktive Chinone und $O_2^{\cdot-}$ entstehen (siehe Abbildung 1-5). Dopamin oxidiert zu Dopamin-o-chinon, welches jedoch bei physiologischem pH-Wert nicht stabil ist und deshalb zu Aminochrome weiterreagiert, dem Vorläufer des Neuromelanins. Neuromelanin ist dem Hautpigment Melanin ähnlich und akkumuliert in dopaminergen Neuronen in der SN. Es wurde postuliert, dass Neuromelanin neuroprotektiv wirkt: Es wird bei Überschuss von Dopamin irreversibel gebildet, zudem kann es Übergangsmetalle binden, wodurch die Fenton-Reaktion und somit oxidativer Stress vermieden wird (Sulzer, et al. 2000, Zecca, et al. 2006).

Eine Vielzahl an Untersuchungen deuten darauf hin, dass der durch den Dopaminstoffwechsel auftretende oxidative Stress zu erhöhten Spiegel an oxidativen DNA-Schäden führt: Bei Parkinsonpatienten wurden post mortem erhöhte Raten an oxidativen DNA-Schäden (8-oxoG) gemessen (Sanchez-Ramos JR 1994, Alam, et al. 1997, Zhang, et al. 1999). (Petrozzi, et al. 2002) zeigten in humanen Lymphozyten von Alzheimer- und Parkinsonpatienten erhöhte spontane Mikrokernraten. Außerdem konnten (Fazeli, et al. 2011) zeigen, dass Dopamin Mikrokerne und 8-oxoG in einer Phäochromozytom-Zelllinie (PC12, aus der Ratte) induziert und dies durch eine Inhibition der MAO-Enzyme (durch *trans*-2-phenylcyclopropylamine, PCPA; und Ro-16-6491: ein MAO-B spezifischer Inhibitor) revertiert werden kann. Außerdem zeigte die Arbeitsgruppe in MDCK-Zellen (Madin-Darby Canine kidney cells) mit einer Überexpression des Dopamintransporters (DAT), erhöhte Spiegel an Mikrokernen im Vergleich zu der Kontrollzelllinie. (Moldeus, et al. 1983) sowie (Li und Cao 2002) konnten in *in vitro* Experimenten zeigen, dass Dopamin Einzelstrangbrüche verursacht. Astrozyten von MAO-B überexprimierenden Mäusen zeigen erhöhte Spiegel an Wasserstoffperoxid (Mallajosyula, et al. 2008) und (Neuhaus, et al. 2014) konnte in diesen Mäusen in Astrozyten Deletionen in mitochondrialer DNA nachweisen.

In dieser Arbeit sollte gezeigt werden, inwiefern ein gesteigerter Dopaminmetabolismus und dadurch gesteigerte ROS-Spiegel DNA-Schäden in nukleärer DNA generieren können. Hierzu wurden Neuroblastoma-Zellen (SH-SY5Y) eingesetzt (siehe Abschnitt 3.1.7 und (Neuhaus, et al. 2014)), welche folgende Protein-Überexpression tragen:

- i) Dopamintransporter (SH-SY5Y DAT4)
- ii) Monoaminoxidase A (SH-SY5Y MAO-A)
- iii) Monoaminoxidase B (SH-SY5Y MAO-B)

Untersuchungen von (Neuhaus, et al. 2014) konnten in diesen Zellkulturen nach Dopaminbehandlung DNA-Deletionen in mitochondrialer DNA nachweisen. Dies deutet daraufhin, dass ein erhöhter Dopaminstoffwechsel, und damit verbunden erhöhte Spiegel an ROS, mitochondriale DNA schädigen.

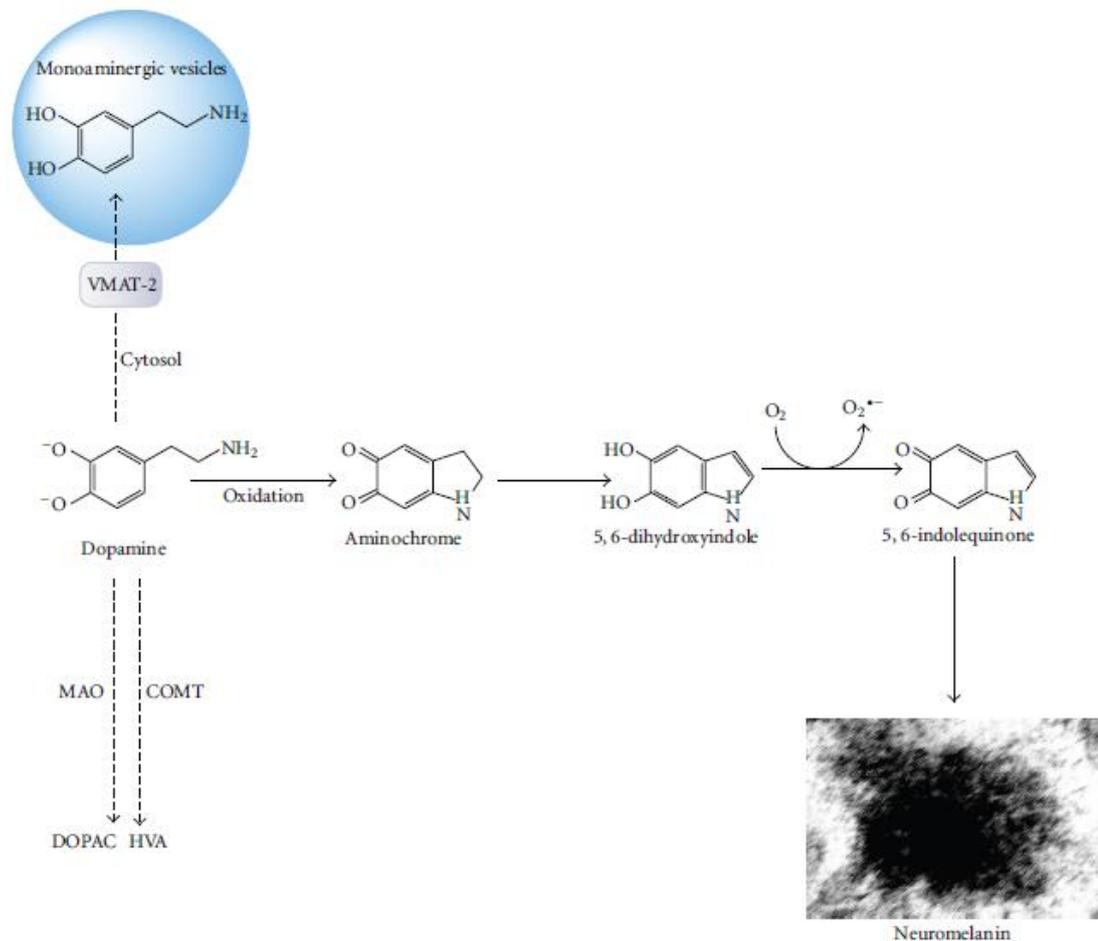


Abbildung 1-5: Dopamin - Autoxidation zu Aminochrom und Neuromelanin (Munoz, et al. 2012)

1.2 Oxidative DNA - Schäden Bedeutung und Konsequenzen - DNA-Reparaturmechanismen

Oxidative DNA-Schäden die durch ROS aus endogenen oder exogene Quellen (siehe Abschnitt 1.1.1) entstehen, können sehr vielfältig sein (Dizdaroglu 1992, Caldecott 2001).

Abbildung 1-6 zeigt einige wichtige oxidative DNA-Modifikationen, diese entstehen durch Schädigung der Base oder des Zucker-Phosphat-Rückgrats der DNA-Helix. Die typischen durch ROS induzierten DNA-Schäden sind AP-Läsionen (basenfreie Stellen), oxidierte Purine oder Pyrimidine, sowie Einzelstrang- und Doppelstrangbrüche.

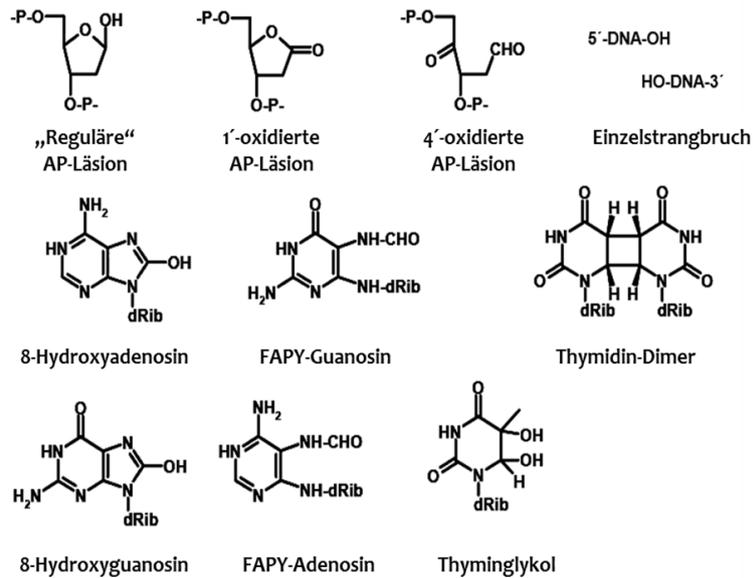


Abbildung 1-6: chemische Struktur einiger wichtiger oxidativer DNA-Modifikationen

Nach heutigem Wissensstand ist die Häufigkeit von DNA-Schäden sehr hoch: Es werden in einer Zelle pro Tag zwischen 75.000 und 100.000 DNA-Schäden generiert (siehe Tabelle 1-4). Diese können, wenn sie nicht repariert werden, bei Manifestierung nach der Replikation zu Mutationen und somit zu Krebs aber auch direkt zur Apoptose führen.

Tabelle 1-4: abgeschätzte Bildungsrate von endogenen oxidativ gebildeten DNA-Schäden in Säugerzellen (Rao 2009)

DNA-Schaden	Ereignis / Zelle / Tag
Depurinierung	10.000
Depyrimidierung	600
Deaminierung	100 bis 300
Einzelstrangbrüche	20.000 bis 40.000
Doppelstrangbrüche	9
Interstrand-Crosslinks	8

Im folgenden Abschnitt werden einzelne DNA-Schäden etwas genauer im Hinblick auf ihre Struktur und ihre Auswirkung auf die Zelle veranschaulicht:

Einzelstrangbrüche (SSB)

Eine Hauptquelle für SSB und DSB (Doppelstrangbrüche) ist der Angriff durch ROS, wie z.B. H_2O_2 . Es entstehen hierbei sehr wahrscheinlich hochreaktive Hydroxylradikale über eine metallvermittelte Fenton-Reaktion (Jezowska-Bojczuk, et al. 2002) wobei um etwa 3 Größenordnungen mehr SSBs als DSBs entstehen (Kohn, et al. 1976).

Einzelstrangbrüche können direkt durch den Angriff auf das Zucker-Phosphat-Rückgrat entstehen oder indirekt als Intermediat bei der Basenexzisionsreparatur oder bei fehlerhafter Topoisomeraseaktivität (Wang 2002). Die Konsequenz von nicht reparierten Einzelstrangbrüchen in der Zelle ist:

- i) der Kollaps der DNA-Replikationsgabel. Hierdurch entstehen Doppelstrangbrüche welche über NHEJ (Non Homologes Endjoining) und HR (Homologe Rekombination) repariert werden können. Eine zu hohe Anzahl führt hier jedoch zu genetischer Instabilität und Zelltod (Kuzminov 2001, Kouzminova und Kuzminov 2006).
- ii) Transkriptionshinhibition (Khobta, et al. 2010)
- iii) Überaktivierung des SSB-Sensor Proteins PARP1 (Heeres und Hergenrother 2007, Moroni 2008).

7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG)

8-oxoG zählt zu den am häufigsten vorkommenden oxidativen DNA Modifikationen in der Zelle, es sind etwa 5 % aller oxidativ gebildeten DNA-Basen Schäden (Dizdaroglu 1992). Es wird von ROS gebildet: Es kann durch Singulett-Sauerstoff (Halliwell und Aruoma 1991) entstehen oder durch die Addition eines Hydroxidradikals an der C8-Position der Guaninbase (Epe 1996). Guanin hat von allen Basen das niedrigste Redox-Potential, was es zum potentiellen Zielobjekt der ein-Elektronen-Übertragung macht (Steenken S. 1997). 8-oxoG ist stark mutagen, da es ausser mit Cytosin auch mit Adenin paart (Wood, et al. 1992, Tchou und Grollman 1993) (siehe Abbildung 1-7). Hierbei geht 8-oxoG in die energetisch günstigere *syn*-Konformation über und paart nun bevorzugt mit Adenin anstatt mit Cytosin (Cooke, et al. 2003). Moriya 1993 konnten ein mutagenes Potential von 2-5% pro 1 8-oxoG in einem einzelsträngigen Vektor nachweisen. Die Fehlpaarung von 8-oxoG mit Adenin kann durch spezifische Glykosylasen während der Basenexzisionsreparatur (BER) und der Mismatchreparatur (MMR) rückgängig gemacht werden (McGoldrick, et al. 1995).

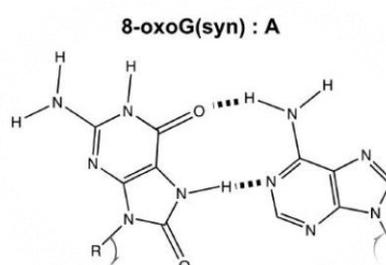


Abbildung 1-7: Oxidation von Guanin zu 8-oxoG bewirkt die Fehlpaarung mit Adenin (Kunz, et al. 2009).

basenfreie Stellen (AP-Läsionen)

Es werden reguläre AP-Läsionen (einfache Hydrolyse der N- glykosidischen Bindung entstanden durch spontane oder enzymatische Depurinierung/Depyrimierung) von oxidierten AP-Läsionen (durch radikalischen Angriff an der 1'-, 2'-oder 4'- Position der Desoxyribose) unterschieden (Epe 1996). Diese abasischen Stellen sind mutagen durch das Entstehen von Basenfehlpaarungen während der Replikation und ausserdem sind sie die Quelle für SSBs mit 3'- oder 5'- blockierten Enden, die nicht als Substrat für DNA-Ligasen oder DNA-Polymerasen dienen können. Diese können in für die Zelle sehr toxische Doppelstrangbrüche überführt werden (Boiteux und Guillet 2004).

DNA-Reparaturmechanismen

Organismen haben neben den antioxidativen Schutzsystemen (siehe Abschnitte 1.1.2, 1.1.3, 1.1.4) viele Mechanismen entwickelt um DNA-Schäden zu detektieren und zu reparieren. Wie wichtig diese Reparaturmechanismen sind, sieht man an den Auswirkungen von Mutationen im menschlichen Genom verschiedener DNA-Reparaturproteine. Dies kann zu neurologischem Defekten (Cockayne Syndrom, Ataxia Oculomotor Apraxie) (Rass, et al. 2007), vorzeitigem Altern (Cockayne Syndrom, Werners Disease) (Brosh und Bohr 2007) und zu einer erhöhten Krebsinzidenz (Xeroderma Pigmentosum, Ataxia Telangiectasia, Nijmegen Breakage Syndrom) (Hoeijmakers 2001) führen.

DNA-Reparatur ist auch ein wichtiges Target im Zuge der Krebstherapie (Helleday, et al. 2008). So können Inhibitoren der DNA-Reparatur eingesetzt werden:

- i) in der Monotherapie: Hier sollen selektiv Krebszellen, die einen Defekt in der Reparatur oder der DNA Schadensantwort haben, abgetötet werden.
- ii) in Kombination mit einem DNA schädigenden Agenz. Hierbei wird die Effizienz der Therapie erhöht, da sich die toxischen DNA-Schäden durch fehlende Reparatur akkumulieren und die Krebszellen in die Apoptose übergehen.

Im Folgenden sind die wichtigsten Reparaturwege oxidativer Modifikationen aufgeführt und beschrieben.

1.2.1 Schadensreversion

Die direkte Schadensreversion ist ein sehr einfacher DNA-Reparaturweg. Ein Enzym ist für die Reparatur zuständig, ohne die DNA oder das Zuckerphosphatrückgrat

einzuschneiden. Der Vorteil hierbei ist, dass die Reparatur einfach ist und somit fehlerfrei abläuft. Es sind drei Systeme bekannt:

- i) die Reparatur von alkylierten Schäden durch die Alkyltransferasen und Dioxygenasen. Im Menschen ist hier die Alkyltransferase MGMT zu nennen. Sie agiert als ein sogenanntes Suizid-Reparaturprotein, da sie wenn sie als Methyl-MGMT vorliegt, nicht mehr recycelt wird, sondern nach Ubiquitinierung dem Proteasom zum Abbau zugeführt wird (Daniels, et al. 2004). Sie repariert die mutagene und karzinogene Läsion O⁶-Methylguanin.
- ii) Dioxygenasen wie ABH₂ und ABH₃ (Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase alkB homolog 2 und 3) reparieren über die oxidative Dealkylierung die Läsionen 1-Methylcytosin und 3-Methyladenin (Aas, et al. 2003).
- iii) die Reparatur von UV-induzierten Läsionen durch Photolyasen. Diese sind ubiquitär verbreitet, jedoch nicht bei Plazenta-Tieren. Sie binden spezifisch an UV-induzierte CPDs (Cyclobutanpyrimidindimere) und 6,4 Photoprodukte und können mithilfe Ihrer chromophoren Cofaktoren FAD die Schäden durch die Energie von sichtbarem Licht reparieren (Essen und Klar 2006).

1.2.2 Basenexzisionsreparatur (BER)

Die Basenexzisionsreparatur ist der wichtigste Reparaturweg für Basenschäden, die durch Alkylierung, Desaminierung, Depurinierung/ Depyrimidierung und Oxidation entstehen. BER ermöglicht die Reparatur über 2 Wege: Den „short-patch“ und den „long-patch“ Weg (siehe Abbildung 1-8) (Frosina, et al. 1996, Fortini und Dogliotti 2007, Zharkov 2008, Robertson, et al. 2009). Hierbei wird unterschieden, ob nur ein Nukleotid ausgetauscht wird (short-patch) oder mehrere (bis zu 12) Nukleotide (long-patch). Wann eine Basenmodifikation eher über den short-patch oder den long-patch Weg prozessiert wird, ist bislang nicht ausreichend bekannt. Arbeiten von Petermann, et al. 2003 und Frosina, et al. 1996 zeigen, dass die ATP-Konzentration in der Zelle eine Rolle spielen, sowie das 5' dRP-Intermediat welches durch die AP-Endonuklease Aktivität produziert wird. Bei niedrigen ATP Konzentrationen in der Zelle findet bevorzugt der long-patch Weg statt, bei ausreichend ATP der short-patch Weg. Wird das 5' dRP-Intermediat erfolgreich durch die dRP-Lyase Aktivität der Polymerase- β entfernt, läuft die BER über den short-patch Weg. Auch die Art des Schadens und der Zellzyklus haben Einfluss welcher BER-Weg eingeschlagen wird (Fortini und Dogliotti 2007).

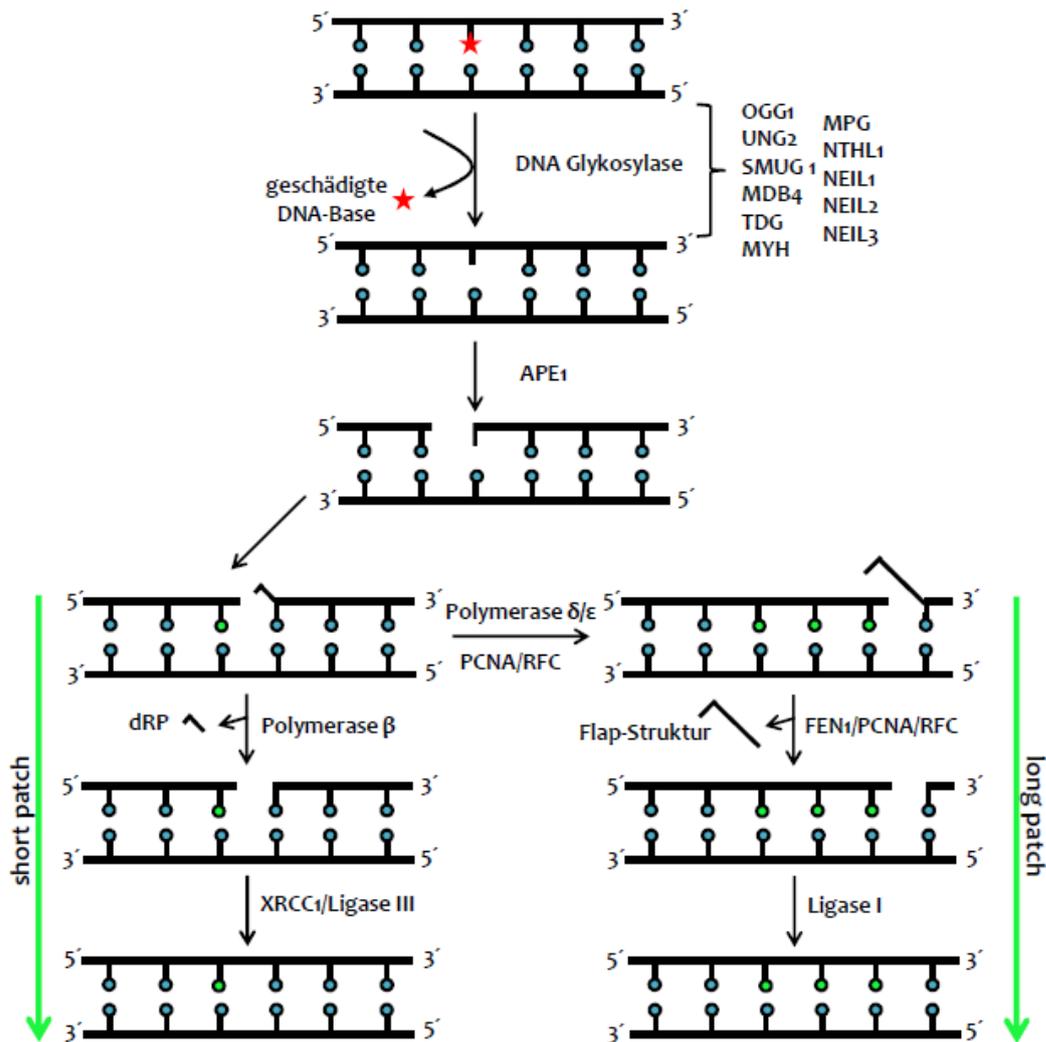


Abbildung 1-8: Schematische Darstellung der einzelnen Schritte der Basenexzisionsreparatur (BER), modifiziert nach Parsons und Dianov 2013.

Der erste Schritt der BER ist das Erkennen des Basenschadens durch für den jeweiligen Schaden spezifische DNA-Glykosylasen (siehe Tabelle 1-9). Diese Enzyme spalten die N-glykosidische Bindung zwischen der 2' Desoxyribose und der geschädigten Base, entfernen diese und hinterlassen eine abasische Stelle (AP-Läsion). Diese AP-Läsion wird im nächsten Schritt entweder von einer AP-Endonuklease oder von der AP-Lyase Aktivität der bifunktionellen Glykosylasen eingeschnitten (Robertson, et al. 2009). AP-Endonukleasen hinterlassen einen Einzelstrangbruch 5' zur AP-Stelle (mit einem 3' OH Ende und einer 5' Desoxyribosephosphatgruppe), während die AP-Lyase einen Nick 3' zur AP-Stelle produziert (McCullough, et al. 1999). Dieser am 3' Ende zurückbleibende Zuckerrest wird im Folgenden durch die AP-Endonuklease entfernt und es entsteht auch hier ein Einzelstrangbruch mit einem 3' OH Ende und eine 5' Desoxyribosephosphatgruppe (dRP). Im Anschluss wird beim short-patch Weg durch die Polymerase β der dRP-Rest entfernt und die Lücke durch Polymerase- β aufgefüllt.

Der verbleibende SSB wird mithilfe des Gerüstproteins XRCC1 (X-ray cross complementing group protein-1) und Ligase III religiert. Der Hauptteil, etwa 80% der geschädigten Basen werden über den short-patch Weg repariert. Kann das 5' dRP-Intermediat nicht erfolgreich durch die dRP-Lyase Aktivität der Polymerase- β entfernt werden, erfolgt ein Polymerase switch zu den replikativen Polymerasen- δ/ϵ . Es erfolgt die Verdrängung des alten Stranges und die Polymerasen fügen 2-12 Nukleotide in die Lücke ein, wobei eine überhängende 5'-Flap Struktur entsteht. Diese Struktur wird von FEN1 (Flap-endonuclease 1) erkannt und zusammen mit PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) und RFC (Replication factor C) entfernt. Abschließend erfolgt die Religation des DNA-Stranges durch Ligase I (Klungland und Lindahl 1997).

Tabelle 1-9: Übersicht über die DNA-Glykosylasen (aus Säugern), ihre Substrate und ihre funktionelle Aktivität modifiziert nach Jacobs und Schar 2012.

Enzym	Name	Substrate	Monofunktionell (M) Bifunktionell (B)
OGG1	8-oxoG-DNA glycosylase 1	8-oxoG, FaPy, 8-oxoA, dsDNA	B
MYH	MutY homolog DNA glycosylase	A gegenüber 8-oxoG, C oder G 2-hA gegenüber G, ds DNA	M
UNG	Uracil-N glycosylase	U, 5-FU, ssDNA, dsDNA	M
SMUG1	Single-strand-specific monofunctional uracil DNA glycosylase 1	U, 5-hm, 5-FU, ssDNA, dsDNA	M
MDB4	Methyl-binding domain glycosylase 4	T, U, 5-FU, ϵ C gegenüber G, dsDNA	M
TDG	Thymine DNA glycosylase	T, U, 5-FU, ϵ C, 5hmU, 5-fC, 5-caC gegenüber G, dsDNA	M
MPG	Methylpurine glycosylase	3-meA, 7meG, 3-meG, Hypoxanthin, ϵ A, ssDNA, dsDNA	M
NTHL1	Endonuclease III-like	Tg, FaPy-G, 5-hC, 5-hU, dsDNA	B
NEIL1	Endonuclease VIII-like glycosylase 1	8-oxoG, Tg, FaPy-G, FaPy-A, 5-hU, 5-hC, ssDNA, dsDNA	B
NEIL2	Endonuclease VIII-like glycosylase 1	wie NTHL1 und NEIL 1	B
NEIL3	Endonuclease VIII-like glycosylase 1	FaPy-G, FaPy-A, bevorzugt ssDNA	B

Abkürzungen: U: Uracil, A: Adenin, T: Thymin, C: Cytosin, G: Guanin, ss: single stranded, ds: double stranded, 5-hm: 5-hydroxymethyl, 5-FU: 5-Fluorouracil, ϵ : etheno, 5-fC: 5-Formylcytosin, 5-caC: 5-Carboxylcytosin, 8-oxoG: 8-oxo-7,8-Dihydroguanin, Tg: Thyminglycol, FaPy: 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidin, me: methyl, h: hydroxyl

1.2.2.1 OGG1

Die 8-oxoG-DNA Glykosylase OGG1 ist evolutionär hoch konserviert geblieben von Hefe bis zum Säuger und Mensch (Aburatani, et al. 1997, Bjoras, et al. 1997, Lu, et al. 1997, Radicella, et al. 1997, Roldan-Arjona, et al. 1997, Rosenquist, et al. 1997). Das humane Gen ist in vier Splicevarianten vorhanden (Nishioka, et al. 1999). Die zwei am häufigsten vorkommenden sind Typ 1: OGG1- α und Typ2: Ogg1- β . Die α -Form wird in den Zellkern und die β -Form in die Mitochondrien transportiert (Takao, et al. 1998). Die Glykosylaseaktivität konnte nicht für die β -Form, sondern nur für die α -Form festgestellt werden (Hashiguchi, et al. 2004). OGG1 ist ubiquitär in allen Geweben exprimiert, hat einen typischen Promotor eines Housekeeping Gens und wird in Zellkultur gleichbleibend exprimiert (Dhenaut, et al. 2000). OGG1 ist eine bifunktionelle Glykosylase (siehe Tabelle 1-9), welche die oxidierten Basen 8-oxoG, FaPy-Guanin und 8oxoA erkennt und einschneidet. OGG1 spaltet hydrolytisch die N-glykosidische Bindung und kann anschließend durch die AP-Lyase Aktivität den Phosphatrest an der AP-Stelle entfernen (Nash, et al. 1997). Reparaturintermediate die nach dem Einschneiden durch OGG1 entstehen konnte eine Verringerung der Genexpression in einem Reporter gen bewirken (Kitsera, et al. 2011), auch hat die DNA-Sequenz, in der sich der Schaden befindet, einen Einfluss auf die DNA-Bindungsaffinität von OGG1 (Allgayer, et al. 2013). In Prokaryoten ist kein dem OGG1 strukturell verwandtes Enzym vorhanden, jedoch erfüllt die Formamido-Pyrimidin-Glykosylase (Fpg) die gleiche Funktion (Boiteux, et al. 1987). Dies macht man sich bei der Messung von DNA-Schäden mittels der Alkalischen Elution zunutze (Epe und Hegler 1994) und wurde im Zuge dieser Arbeit eingesetzt.

Im Mensch konnte ein Polymorphismus von OGG1 nachgewiesen werden (homozygot bei ca. 4 – 17% der Kaukasier), hierbei erfolgt ein Aminosäureaustausch an Position 326 von Serin nach Cystein. Epidemiologische Studien zeigen für diesen Polymorphismus ein erhöhtes Risiko für einige Tumorarten wie Lungen-, Prostata-, Magen- und Speiseröhrenkrebs (Elahi, et al. 2002, Chen, et al. 2003, Kohno, et al. 2006, Farinati, et al. 2008), eine Metaanalyse mehrere Studien zeigte hierzu jedoch eine teilweise inkonsistente Datenlage (Karahalil, et al. 2012). Immortalisierte Lymphozyten mit der homozygoten OGG1-326Cys Variante zeigen eine verringerte Reparaturkapazität nach Zugabe von oxidativem Stress. Auch ist in diesen Zellen die Bildungsrate von spontanen Mikrokernen deutlich erhöht (Bravard, et al. 2009).

Eine Defizienz von OGG1 in Mäusen zeigt eine Akkumulation der 8-oxoG-Spiegel in der DNA der Tiere die mit dem Lebensalter stark zunimmt (Klungland, et al. 1999, Osterod, et al. 2001, Epe 2002). Auch konnte ein stark mutagenes Potential von 8-oxoG in diesen Mäusen nachgewiesen werden. Eine Erhöhung von weniger als 5 8-oxoG/10⁶ Basenpaaren in der Leber zeigte eine zwei bis dreifache Erhöhung der spontanen

Mutationsfrequenz (Epe 2002), jedoch konnte keine erhöhte Tumorzinzidenz nachgewiesen werden (Klungland, et al. 1999). Erst nach der Anregung der Zellproliferation in der Leber durch einen Peroxisomen-Proliferator konnten Vorstufen von Krebs (präneoplastische Foci) in $Ogg1^{-/-} Csb^{-/-}$ Mäusen detektiert werden (Trapp, et al. 2007).

Im Menschen konnte nachgewiesen werden, dass die OGG1-Reparaturkapazität in Lymphozyten von Tumorpazienten niedriger war als bei Kontrollprobanden (Paz-Elizur, et al. 2003, Paz-Elizur, et al. 2006).

OGG1 ist nicht das einzige Enzym zum Schutze der Zellen vor 8-oxoG. Es existiert ein anderes Enzym, das monofunktionelle MYH-Protein, welches Adenin bei einer Fehlpaarung von 8-oxoG mit Adenin entfernt (David, et al. 2007). Dieses gibt OGG1 eine neue Möglichkeit das 8-oxoG zu entfernen, bevor es nach der Replikation zur Manifestierung einer Mutation kommt. Pazienten mit einer Mutation im MYH-Gen zeigen eine erhöhte Rate von G:C zu T:A Transversionen (Al-Tassan, et al. 2002). Eine gleichzeitige Defizienz von MYH und OGG1 in Mäusen zeigte eine deutlich erhöhte Krebsinzidenz (Russo, et al. 2004), etwa 65 % der Tiere zeigten eine Prädisposition für eine Tumorbildung und somit auch eine verringerte Lebenserwartung (Xie, et al. 2004).

1.2.3 Einzelstrangbruchreparatur (SSBR)

Einzelstrangbrüche können direkt durch den Angriff auf das Zucker-Phosphat-Rückgrat entstehen oder indirekt als Intermediat bei der Basenexzisionsreparatur oder bei fehlerhafter Topoisomeraseaktivität (Kuzminov 2001, Wang 2002, Kouzminova und Kuzminov 2006). Die Poly (ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP1) ist das erste Protein am Schadensort und wird durch die Bindung aktiviert. Es bildet polyADP-Ribose-Ketten, wobei es sich selbst modifiziert und außerdem den XRCC1/Ligase III Komplex zum Einzelstrangbruch rekrutiert. Die Automodifizierung von PARP1 mit ADP-Ribose bewirkt deren Abdissoziation von der DNA (D'Amours, et al. 1999). Die polyADP-Ribose Ketten werden von der Poly-(ADP-Ribose)-Glycohydrolase (PARG) wieder abgebaut, und PARP1 ist wieder zurück in ihrem Ausgangszustand (Davidovic, et al. 2001). Die nachgeschaltete Prozessierung der DNA-Enden hängt von der Natur der 3' und 5' Enden ab. Bei diesem Schritt gibt es diverse Enzyme und Möglichkeiten weiterzuverfahren, da es eine große Anzahl an geschädigten 3' oder 5' Termini gibt. Vor der Ligation muss ein 3' OH sowie ein 5' Phosphatrest vorliegen. Ist dies nicht der Fall schalten sich die notwendigen Enzyme ein: Polymerase- β , PNK (Polynukleotid-Kinase, hat neben der 5' Kinase Aktivität auch eine 3' Phosphatase-Aktivität (Whitehouse, et al. 2001)), Aprataxin (Ahel, et al. 2006). Die letzten Schritte verlaufen

wie bei der BER (siehe Abbildung 1-8). Es wird entweder der short- oder der long-patch Weg eingeschlagen, ligiert wird dann mit Ligase III oder I (Caldecott 2003).

1.2.4 Doppelstrangbruchreparatur (DSBR)

Doppelstrangbruchreparatur ist essentiell für die genomische Stabilität einer Zelle. Schon ein nicht reparierter Doppelstrangbruch (DSB) kann den Zelltod induzieren (Rich, et al. 2000). Die Reparatur von gebrochenen Chromosomen ist eine Herausforderung für sich teilende Zellen, da diese die genetische Information gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilen müssen. Eine Veränderung oder der Verlust von Chromosomenfragmenten hat schwerwiegende Folgen, wie z.B. Apoptose, Karzinogenese durch Aktivierung von Onkogenen oder das Abschalten von Tumorsuppressorgenen. Doppelstrangbrüche werden überwiegend über das Nonhomologe Endjoining (NHEJ) und die Homologe Rekombination (HR) repariert. Die NHEJ ist sehr leistungsfähig, da sie jede Art von DNA-Enden verknüpft, ohne eine homologe Sequenz als Matrize zu benötigen. Sie ist daher nicht ganz fehlerfrei, es werden oft kleinere Insertionen oder Deletionen generiert (Moore und Haber 1996, Ahnesorg und Jackson 2007). Bei der HR ist eine homologe Sequenz für die Reparatur notwendig.

1.2.5 postreplikative Mismatch-Reparatur (MMR)

Die postreplikative Mismatch Reparatur ist ein wichtiges Reparatursystem um Basenfehlpaarungen zu reparieren. Dieses System ist in der Lage, den neureplizierten DNA-Strang zu erkennen und dort spezifisch missgepaarte Basen zu reparieren, die nach der Replikation meist durch fehlerhaft arbeitende Polymerasen entstanden sind (Martí, et al. 2002, Kunz, et al. 2009). In der MMR sind Komplexe aus den Homologen des bakteriellen MutS (human: MSH2, MSH3 und MSH6) und MutL (human: MLH1 und PMS2) für die Reparatur verantwortlich (Li 2008). Allgemein gehen Defekte in der MMR mit erhöhter Mutationsfrequenz einher, im Menschen wurde ein erhöhtes Krebsrisiko nachgewiesen (Galiatsatos und Foulkes 2006, Rustgi 2007). Neben der postreplikativen MMR gibt es auch noch mismatch-spezifische Glykosylasen der BER: dies sind beispielsweise TDG, MBD4 und MYH (siehe Tabelle 1-9).

1.2.6 Nukleotidexzisionsreparatur (NER)

Die Entfernung von großen voluminösen Schäden (sogenannte „bulky lesions“) werden über den Reparaturmechanismus der NER repariert. Die bulky lesions können entweder über UV-Licht oder durch Chemikalien wie z.B. polyaromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs) entstehen. UV Licht generiert überwiegend

Cyclobutanpyrimidin-Dimere (CPDs) und 6-4 Photoprodukte (6-4 PP), während die PAKs nach Metabolisierung Epoxide und als Konsequenz DNA-Addukte bilden (Wogan, et al. 2004). Diese Läsionen bewirken eine Distorsion der Doppelhelix und initiieren die NER. Es sind zwei Wege der NER bekannt: Die Globale Genom Reparatur (GGR), welche im gesamten Genom stattfindet und die Transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR), die nur im transkribierten Bereich agiert (Tornaletti 2009).

Die Helix-Distorsion wird von drei Komponenten der NER erkannt: XPC, HR23B und Cen2 (Xeroderma pigmentosum Protein C, human homolog of yeast Rad 23 und Centrin 2) (Araki, et al. 2001). CPDs bewirken im Vergleich zu den 6-4 PP nur eine geringe räumliche Veränderung der DNA-Helix, so dass ein zusätzlicher Komplex als Verstärker nötig ist um die NER einzuleiten: der DDB-Komplex, bestehend aus DDB1 und DDB2 (auch XPE genannt) (Payne und Chu 1994). Der nächste Schritt ist die Rekrutierung des Multiproteinkomplexes TFIIH (Transcription factor II human), der aus bis zu 10 Untereinheiten besteht, u.a. aus XPD, XPB, XPG und XPF/ERCC1. XPD und XPB sind Helikasen, die die Doppelhelix entwinden (Winkler, et al. 2001), damit XPG und XPF/ERCC1 mit ihrer Endonuklease-Aktivität ein DNA-Fragment von etwa 25 bis 30 Nukleotiden ausschneiden (Mu, et al. 1996). Die so entstandene Lücke wird von der replizierenden Polymerase δ oder ϵ zusammen mit der DNA-Klammer PCNA (Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen) (Nichols und Sancar 1992, Popanda und Thielmann 1992, Shivji, et al. 1992) aufgefüllt und mit LigaseIII/XRCC1 oder Ligase I geschlossen (Nocentini 1999). Die transkriptionsgekoppelte Reparatur läuft ähnlich der GGR ab und unterscheidet sich nur anfänglich bei der Schadenserkenkung. Hier ist der Schadenssensor der Block der RNA Polymerase II (Tornaletti 2009). Diese rekrutiert eine Vielzahl weiterer Proteine wie TFIIH, XPA, RPA, XPG und XPF zum Schadensort (Laine und Egly 2006). Durch CSA und CSB (Cockayne Syndrome A/B protein) wird die RNA-Polymerase II von der DNA entfernt und die Reparatur kann nun analog zur GGR erfolgen (van den Boom, et al. 2002).

2 Fragestellung der Arbeit

In dieser Arbeit soll der Einfluss einer Überproduktion von SOD1 (siehe Abschnitt 1.1.4.5) auf die Spiegel oxidativer DNA-Schäden in verschiedenen Geweben von transgenen Mäusen untersucht werden. Reparaturdefiziente $Csb^{-/-}Ogg1^{-/-}$ Mäuse wurden hier für die Experimente verwendet, da diese Tiere oxidative DNA-Schäden während ihres gesamten Lebens akkumulieren (Osterod, et al. 2001). Dieses Tiermodell ist somit hervorragend geeignet um mögliche protektive Effekte nachzuweisen. So sollte Aufschluss über folgende Fragen erhalten werden:

- + Welche Rolle spielt SOD1 bei dem Schutz vor endogenen oxidativ gebildeten DNA-Schäden *in vivo*?
- + Sind außer SOD1 womöglich andere antioxidative Schutzsysteme an dieser Protektion beteiligt?

Um diese Fragen zu beantworten, wurden 4 Mausgenotypen [$Csb^{-/-}Ogg1^{-/-}$ und $Csb^{-/-}Ogg1^{+/+}$ Mäuse, jeweils mit und ohne hSOD1 Überexpression] generiert und in verschiedenen Altersstufen auf die Basalspiegel an oxidativen Schäden (Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Läsionen) in der Leber, der Niere und der Milz untersucht. Außerdem wurden in diesen Tieren die Mikrokernrate und eine Geneexpressionsanalyse der redoxhomöostatischen Gene durchgeführt.

Um die für die DNA-Schädigung relevanten endogenen Quellen von Superoxid in Zellen zu identifizieren, sollte in einer weiteren Untersuchung *in vitro* die Generierung von oxidativen Schäden in nukleärer DNA durch die Bildung endogener ROS während des Dopaminmetabolismus analysiert werden. Es wurde das „Parkinsonzellkultur“- Modell SH-SY5Y für die Untersuchungen eingesetzt: die humane Neuroblastoma SH-SY5Y-Zelllinie ging ursprünglich aus einer Knochenmarkbiopsie hervor (Biedler, et al. 1973) und wird seit langem in der Parkinsonforschung eingesetzt wegen ihrer neuronalen biochemischen und funktionellen Eigenschaften (Xie, et al. 2010). Insbesondere folgende Fragen sollten in diesem Modell beantwortet werden:

- + Induziert die Bildung von endogenen ROS während des Dopaminstoffwechsels oxidative Schäden in nukleärer DNA?
- + Kann eine Überexpression von MAO-A, MAO-B und DAT4 dies beeinflussen?

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Software

Agarosegelapparatur	PerfectBlue™ Gelsystem Mini M (Peqlab, Erlangen)
Autoklav	Technoclav 50 6.0 bzw. 2.0 (Fedegari Autoclav SPA, Albuzzo, Italien)
Brutschrank (Zellkultur)	CO ₂ -Inkubator BB16, BB6060 O2 und Hera-Cell (Heraeus Instruments, Hanau)
Coulter-Counter Z2™	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Destillationsapparatur	Destamat (Heraeus, Hanau)
Fluoreszenz - Mikroskop	(Zeiss, Oberkochen) Filter 46 63 01-9901 (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
Fluorimeter	TKO 100, DNA Fluorimeter (Hoefer Scientific, Instruments, San Francisco, USA) SFM 25 Fluorimeter (Kontron Instruments, Zürich, Schweiz)
Flüssigstickstoff-Tank	Tec-lab, Königstein/Taunus
Fraktionssammler	Ultrorac 2070 II (Pharmacia/ LKB, Uppsala, Schweden) und MM 10, Neolab 4 mit Zeitnehmer SM 999 (Neolab, Heidelberg)
Geldokumentationssystem	Gel Doc 1000 mit der Gel-Analysesoftware Image Lab™, Version 3.0, Bio-Rad, Hercules, USA
Gewebehomogenisator	Wheaton Dounce Tissue Grinder (VWR, Darmstadt) Pellet Pestle (SIGMA, Steinheim)
Lichtmikroskop	Telaval 31 (Zeiss, Oberkochen)
Magnetrührer	Ikamag RET-G (Ika-Werk, Janke & Kunkel, Staufen i. Br.)
Mikrowelle	Micromat 175 Z (AEG) und Dimension 4 (Panasonic Service, Wiesbaden)
Multipette	Pipette DISCOVERY Comfort DV12 (Abimed, Langenfeld) und Eppendorf Multipette® Plus (Eppendorf AG, Hamburg)
Neubauer-Zählkammer	Hartenstein, Würzburg
PCR-Cycler	TGradient Thermocycler Biometra®; (Biometra, Göttingen)
pH - Meter	PHM 62 (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark)
Pipetten	Pipetman P 20, P 100, P 200, P 1000, P 5000 P 10000 (Gilson, Frankreich)

Pipettierhilfe	Pipetus-akku (Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt)
Pumpe (Alkalische Elution)	Thermostat für Haake W19 Haake D8 (Haake, Karlsruhe)
Pumpe (Leberperfusion)	ISM 759 (20 Kanäle), (Ismatec Laboratoriumstechnik, Schweiz)
Realtime-PCR-Cycler	Lightcycler® 1.5 Real Time PCR System mit Software Version 3.5.3, (Roche Diagnostics; Mannheim)
Schulz Ina, Pauly Karin	Super TAs®, JGU Mainz
Schüttler (37°C)	Orbit LS (Labnet, Ried im Innkreis, Österreich)
Spannungsquelle	Power PAC- 3000 (BioRad, Hercules, USA)
Spectrophotometer	Biochrom WPA S2100 Diode Array (Whatman Biometra, Göttingen)
Sterile Werkbank	Lamin Air® HB 2472 und HB 2448 (Heraeus Instruments, Hanau)
Tiefkühlschrank (-70°C)	Thermo Fischer, Waltham, MA, USA
Tischzentrifuge	Galaxy Mini (VWR International, Darmstadt)
Trockenschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Vortexer	Vortex Genie 2, Model G-560E (Scientific Industries, Bohemia, N.Y., USA)
Waagen	PB 3002, Delta Range, max. 3100g (Mettler Toledo, Schweiz); AG 245, max. 210g (Mettler Toledo, Schweiz)
Wasserbäder	Haake K, Haake LH mit Kältethermostat Haake F3 (Haake, Karlsruhe)
Zentrifugen	Hettich Micro Rapid/K und Hettich Universal/K2S (Hettich, Tuttlingen), Biofuge 28RS und Sigma 3K-2 (Heraeus Instruments, Osterode am Harz), Eppendorf 5415D (Eppendorf, Hamburg)

3.1.2 Verbrauchs- und Hilfsmaterialien

Dialyseschläuche	Spectra Por (Spectrum Medical Ind., Los Angeles, CA, USA)
Dispensertips	Hartenstein, Würzburg
Einmalkanülen (NEOJECT®)	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen
Einmalspritzen (1ml)	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen
Filter für die Alkalische Elution (2,0 µm) TTPo2500	Merck Millipore, Darmstadt
Filterhalter für die Alkalische Elution	Swinnex SX 2500 (Millipore, Schwalbach)

Fritten für Alkalische Elution	Merck Millipore, Darmstadt
Gewebehomogenisator	Pellet Pestle, SIGMA, Steinheim
Glaspipetten (für die Zellkultur)	Hartenstein, Würzburg
Infusionsset mit Flügelkanülen (0,8 x 20 mm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Klebeband (Leukosilk)	BSN medical GmbH, Hamburg
Neubauer	Marienfeld, Deutschland
Objektträger (Super Frost)	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Pasteurpipetten	Hartenstein, Würzburg
PCR-Tubes	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pinzetten/Scheren für die Arbeiten mit Mäusen	Hartenstein, Würzburg
Pipettenspitzen (Einweg)	Sarstedt, Nürmbrecht
Plastik-Zentrifugenröhrchen (Einweg 15 und 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
SafeLock Caps (0,5; 1,5; 2,0 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht
Schläuche für die Alkalische Elution	ISMATEC, Wertheim; Hartenstein, Würzburg; SIMS Portex Ltd., London
Skalpell	Ratiomed megro GmbH & CoKG, Wesel
Spritzen (für Alkalische Elution)	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter Filtroporus S (0,2 µm)	Sarstedt, Nürmbrecht
Sterilfilter FILTERTOP PES (0,22 µm)	Biochrom AG, Berlin
Zellsieb (100 µm)	BD Biosciences, Bedford, USA

3.1.3 Chemikalien

1x non essential amino acids	Sigma Aldrich, Steinheim
ACK Lysepuffer	LONZA, Basel
Agarose Ultra Pure	Invitrogen, Carlsbad, USA
Bisbenzimid: Hoechstfarbstoff 33258	Sigma Aldrich, Steinheim
BSA	Roth, Karlsruhe
CaCl ₂ * 2H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Carbogen (95% O ₂ , 5% CO ₂)	Linde, Höllriegelskreuth
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DEPC	Roth, Karlsruhe
DirectPCR® Lysis: Schwanzbiopsien	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
DMEM- Medium	PAA, Cölbe

EGTA	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung (1% in Aqua dest.)	Roth, Karlsruhe
FCS Gold Art.Nr.: A15-151	PAA, Cölbe
Fötale Kälberserum	PAA, Cölbe
Giemsa Lösung	Sigma Aldrich, Steinheim
Glutaminlösung	PAA, Cölbe
Glycerol	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycin (G7126)	Sigma Aldrich, Steinheim
H ₄ EDTA	Roth, Karlsruhe
Hams F12 Medium	PAA, Cölbe
HEPES	Sigma Aldrich, Steinheim
Insulinlösung	Sigma Aldrich, Steinheim
Isofluran	Abbott, Green Oaks, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
ISOTON-II Lösung	Beckman Coulter, Fullerton, USA
KCl	Roth, Karlsruhe
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
KHCO ₃	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Alanin (A7627)	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Asparagin (A9256)	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Asparaginsäure (A0884)	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Citrullin (C7629)	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Cystein (C6852)	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Glutaminsäure (H8125)	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Histidin (G1251)	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Isoleucin (I2752)	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Leucin (L8000)	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Lysin (L5626)	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Methionin (M9625)	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Ornithin (O2375)	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Phenylalanin (Art.Nr.:4491)	Roth, Karlsruhe
L-Prolin (Art.Nr.:T205)	Roth, Karlsruhe
L-Serin (S4500)	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Threonin (T8625)	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Tryptophan (T0254)	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Tyrosin (T3754)	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Valin (V0500)	Sigma Aldrich, Steinheim

May-Grünwald Lösung	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ *6H ₂ O	Roth, Karlsruhe
MgSO ₄ *7H ₂ O	Roth, Karlsruhe
MOPS	Sigma Aldrich, Steinheim
Na ₂ H ₂ EDTA	Roth, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Roth, Karlsruhe
NaCl	Roth, Karlsruhe
NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O	Roth, Karlsruhe
NH ₄ Cl	Merck, Darmstadt
Orange G	Sigma Aldrich, Steinheim
PCR Kit: Taq all inclusive	Peqlab Biotechnologie GmbH , Erlangen
Penicilin/Streptomycin 100x Art. Nr. P11-010	PAA, Cölbe
RevertAid 1st strand synthesis Kit	Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
RPMI 1640Medium Art.Nr.E15-480	PAA, Cölbe
SDS	Roth, Karlsruhe
TEAH	Merck, Darmstadt
Tris	Roth, Karlsruhe
Trizol	Life technologies, Carlsbad, USA
TRIzol®	Life technologies, Carlsbad, USA
Trypanblaulösung 0,4%	Sigma Aldrich, Steinheim
Uridin	Sigma Aldrich, Steinheim
α – D (+)-Glucose-Monohydrat	Roth, Karlsruhe

3.1.4 Enzyme

Fpg (Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase)	hergestellt von D. Warzen (Rohextrakt) nach (Boiteux, et al. 1990) eingesetzt: 3 µg/ml (Rohextrakt) in BE1- Puffer(0,5 mg/ml BSA)
Kollagenase, C-5138	Sigma Aldrich, Steinheim
Proteinase K (lyophilisiert) Art.Nr.: 7528	Roth, Karlsruhe

3.1.5 DNA

DNA Marker (Gene Ruler™ ₁₀₀ bp Plus)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Kalbsthymus-DNA	Sigma Aldrich, Steinheim

3.1.6 Primer

Alle eingesetzten Primer wurden bei Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bestellt.

Genotypisierung

Vor der ersten Anwendung der Primer werden diese auf 25 µm mit TE Puffer verdünnt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

Primer	Sequenz (5'-)
Ogg1 for	ATGAGGACCAAGCTAGGTGAC
Ogg1 rev (wildtyp)	GCCTCACAATCAACTTATCCC
Ogg1 rev (knockout)	ATCTGCGTGTTCGAATTCGCCAAT
Csb for (wildtyp)	GCTGCTTATAATAATGCTCATCTCC
Csb for (knockout)	ATCTGCGTGTTCGAATTCGCCAATG
Csb rev	GTCTTCTGATGACGTTAGCTATGAG

qRT PCR

Primer	Sequenz (5'-)
β-actin for	GACAGGATGCAGAAGGAGAT
β-actin rev	CTGCTTGCTGATCCACATCT
GAPDH for	TGCACCACCAACTGCTTAGC
GAPDH rev	ATGGCATGGACTGTGGTCAT
18S for	TAAGTCCCTGCCCTTTGTACACA
18S rev	GATCCGAGGGCCTCACTAAAC
36B4 for	GCCACCTGGAGAACAACCC
36B4 rev	GCCAACAGCATATCCCGAATC
h+m SOD1 for	CCAGTGCAGGACCTCATTTTAAT
h+m SOD1 rev	TCTCCAACATGCCTCTCTTCATC
murine SOD1 for	CCAGTTGTGTTGTCAGGACAA
murine SOD1 rev	TGTCCCCATACTGATGGACG
SOD2 for	GCTCTGGCCAAGGGAGATG
SOD2 rev	TGTCCCCACCATTGAACTT
SOD3 for	TTCTTGTTCTACGGCTTGCTACTG
SOD3 rev	AGCTGGACTCCCCTGGATTT
GPX1 for	CCTTGCCAACACCCAGTGA
GPX1 rev	CCGGAGACCAAATGATGTACTTG
HO1 for	GGTGATGCTGACAGAGGAACAC
HO1 rev	TAGCAGGCCTCTGACGAAGTG
CAT for	ATTGCGTTCTTAGGCTTCTC
CAT rev	ACGCTTCAACAGTGCTAATG
NRF2 for	CTACAGTCCCAGCAGGACAT
NRF2 rev	GGGAGGAATTCTCCTGTTTC

Vor der ersten Anwendung der Primer werden diese auf 200 µm mit TE Puffer verdünnt. Diese Stammlösung wird zur weiteren Anwendung mit sterilem Aqua dest. auf 2 µm gebracht und dann bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.1.7 Zelllinien

Die Zelllinien SH-SY5Y (mock), SH-SY5Y DAT 4, SH-SY5Y MAO-A und SH-SY5Y MAO-B wurden vom AK Prof. Dr. R. Wiesner, Institut für vegetative Physiologie, Zentrum für Physiologie und Pathophysiologie, Universität zu Köln, zur Verfügung gestellt. Humane SH-SY5Y Neuroblastoma Zellen wurden entweder mit dem Leervektor pcDNA4 (SH-SY5Y (mock)), dem Dopamintransporter 4 (SH-SY5Y DAT4), der Monoaminoxidase A (SH-SY5Y MAO-A) oder der Monoaminoxidase B (SH-SY5Y MAO-B) stabil transfiziert, siehe weitere Durchführung: Neuhaus, et al. 2014.

3.1.8 Mäuse

Die Tiere wurden in dem Mausstall der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) im Institut für Pathobiochemie der Universitätsmedizin gehalten; die Pflege der Tiere erfolgte durch die Tierpfleger der Einrichtung. Die Tiere wurden in einem artgerechten Käfig in einem temperaturgeregelten Raum im 12h Hell- und Dunkel-Zyklus sowie einer gleichbleibenden Luftfeuchtigkeit von 50-70% gehalten. Die Zucht, Haltung sowie alle durchgeführten Versuche erfolgten unter ethischen Richtlinien nach den Bestimmungen des Deutschen Tierschutzgesetzes.

Csb^{-/-} Ogg1^{-/-} Mausstamm

Der Csb^{-/-} Ogg1^{-/-} Mausstamm wurde durch die Kreuzung des Csb^{-/-} Mausstamms (van der Horst, et al. 1997) mit dem Ogg1^{-/-} Mausstamm (Klungland, et al. 1999) generiert von A. Klungland (Centre for Molecular Biology and Neuroscience, Department of Microbiology, Oslo University Hospital Rikshospitalet). Das Csb-Gen im Csb^{-/-} Mausstamm trägt eine Nonsense - Mutation, so dass das Protein trunkiert gebildet wird und nicht funktionell ist.

hSOD1 - WT Mausstamm:

Der hSOD1 - WT Mausstamm wurde primär von Herrn Dr. Albrecht Clement, Institut für Pathobiochemie, Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt. Der Stamm (B6SJL-Tg(SOD1)₂Gur/J) wurde ursprünglich von der Firma Jackson Laboratory (Bar Harbor) bezogen. Es handelt sich hierbei um hemizygote, hSOD1 transgene Mäuse mit C57BL/6J Hintergrund mit einer Überexpression der humanen Superoxiddismutase 1 (hSOD1); in dieser Arbeit zur Vereinfachung mit hSOD1-Mausstamm bezeichnet.

Csb^{-/-} Ogg1^{-/-} und Csb^{+/-} Ogg1^{+/-} Mäuse ± hSOD1 Überexpression

Diese Mäuse wurden im Zuge dieser Arbeit generiert durch die Kreuzung des Csb^{-/-} Ogg1^{-/-} Mausstamms mit dem hSOD1 überexprimierenden Mausstamm. Die jeweiligen Schritte werden in Abschnitt 3.2.2.1 näher erläutert.

3.1.9 Puffer und Lösungen

3.1.9.1 Zellkultur

Medium zur Zellkultivierung von SH-SY5Y Zelllinien:

Ham's F12 Medium : DMEM Medium	Mischung der beiden Medien 1:1 1x non essential amino acids Streptomycin 100 µg/ ml Penicilin 100 U/ml Uridin 200 µm 15 % fötales Kälberserum
--------------------------------	--

PBSCMF, pH 7,5 (autoklavieren)	137 mM NaCl
	2,68 mM KCl
	6,5 mM NaH ₂ PO ₄
	1,47 mM KH ₂ PO ₄

3.1.9.2 Isolierung von Hepatozyten mittels Leberperfusion

Aminosäurelösung, pH 7,6 (sterilfiltrieren)	3 mM L-Alanin
	1 mM L-Asparaginsäure
	3 mM L-Asparagin
	1,5 mM L-Citrullin
	0,8 mM L-Cystein
	6,8 mM L-Histidin
	4,8 mM L-Glutaminsäure
	13,3 mM Glycin
	3 mM L-Isoleucin
	6,1 mM L-Leucin
	7,1 mM L-Lysin
	3,7 mM L-Methionin
	3,8 mM L-Ornithin
	3,3 mM L-Phenylalanin
	4,8 mM L-Prolin
	6,2 mM L-Serin
	11,3 mM L-Threonin
	3,2 mM L-Tryptophan

3 mM	L-Tyrosin
6,8 mM	L-Valin

Aminosäuren in ca.950 ml H₂O aufnehmen und nach längerem Rühren die schlecht löslichen Aminosäuren durch Zugabe von NaOH konz. (pH 10-11) lösen. Danach mit HCl den pH auf 7,6 einstellen. Sterilfiltrieren und im Kühlschrank lagern.

Glucoselösung (autoklavieren)	45 mM	Glucose
Krebs - Henseleit-Puffer pH 7,6 (autoklavieren)	1 M	NaCl
	23 mM	KCl
	12 mM	KH ₂ PO ₄
HEPES, pH 8,5 (autoklavieren)	250 mM	HEPES
HEPES, pH 7,6 (autoklavieren)	250 mM	HEPES

Insulinlösung

Insulinstammlösung (Sigma Aldrich, Steinheim, Art. Nr.: I9278; 10 mg/ml in HEPES pH 8,2) verdünnen mit sterilem Aqua dest. 1:5 auf 2mg/ml Endkonzentration. Aliquotieren und einfrieren bei -20°C.

Glutaminlösung

Glutaminstammlösung (PAA, 200mM) verdünnen mit sterilem Aqua dest. 1:4,2 auf 48mM Endkonzentration. Aliquotieren und einfrieren bei -20°C.

MgSO ₄ -Lösung (autoklavieren)	100 mM	MgCl ₂
CaCl ₂ -Lösung (autoklavieren)	129 mM	CaCl ₂
EGTA-Lösung, pH 7,6 (autoklavieren)	125 mM	EGTA

mit NaOH lösen und danach mit HCl den pH einstellen. Die Lösung wird aliquotiert und bei -20°C eingefroren.

Die obigen Stammlösungen werden verwendet um die für den Versuch benötigten Pufferlösungen herzustellen. Diese werden einen Tag vor dem Versuch unter sterilen Bedingungen angesetzt und bei 4°C gelagert.

EGTA-Puffer (Puffermenge pro Maus)	62,5 ml	Glucoselösung
	10 ml	Krebs-Henseleit-Puffer
	10 ml	HEPES-Puffer (pH 8,5)
	15 ml	Aminosäurelösung
	1 ml	Glutaminlösung
	0,5 ml	Insulinlösung

0,4 ml EGTA-Lösung
 Der Puffer wird zusätzlich vor der Verwendung 30 min mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast.

Kollagenasepuffer (Puffermenge pro Maus)

30 ml	Glucoselösung
4,8 ml	Krebs-Henseleit-Puffer
4,8 ml	HEPES-Puffer (pH 8,5)
7,2 ml	Aminosäurelösung
0,5 ml	Glutaminlösung
0,25 ml	Insulinlösung
1,9 ml	CaCl ₂ -Lösung
14,5 mg	Kollagenase

Die Kollagenase wird bei -20°C gelagert und erst unmittelbar vor der Verwendung zu dem Puffer hinzugefügt. Die CaCl₂-Lösung wird erst zu dem Puffer zugegeben, wenn dieser im Wasserbad eine Temperatur von 37°C erreicht hat. Der Puffer wird zusätzlich vor der Verwendung 30 min mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) begast.

Suspensionspuffer (Puffermenge pro Maus)

74,4 ml	Glucoselösung
12 ml	Krebs-Henseleit-Puffer
12 ml	HEPES-Puffer (pH 7,6)
18,2 ml	Aminosäurelösung
1,2 ml	Glutaminlösung
0,6 ml	Insulinlösung
1 ml	CaCl ₂ -Lösung
0,48 ml	MgSO ₄ -Lösung
0,24 mg	BSA

BSA wird bei 4°C gelagert und erst unmittelbar vor dem Versuch im Suspensionspuffer gelöst.

3.1.9.3 Isolierung von Zellen aus der Milz

PBS, pH 7,5 (autoklavieren)

Lösung I	2,96 mM	KH ₂ PO ₄
	5,4 mM	KCl
	274 mM	NaCl
	13 mM	Na ₂ HPO ₄
Lösung II	1,8 mM	CaCl ₂
	1 mM	MgCl ₂

Die Lösungen I+II werden getrennt autoklaviert und vor Gebrauch zu gleichen Teilen gemischt.

Erythrozyten-Lysepuffer ACK Lysepuffer von LONZA, Cat. No.: 10-548E

RPMI-Medium RPMI Medium mit 10% FCS und 1% P/S

3.1.9.4 Isolierung von Zellen aus der Niere

Erythrozyten-Lysepuffer, pH 7,4 (autoklavieren)	155 mM	NH ₄ Cl
	10 mM	KHCO ₃
	1 mM	EDTA

Suspensionspuffer (siehe Abschnitt 3.1.9.2: Isolierung von Hepatozyten)

Kollagenase-Puffer (siehe Abschnitt 3.1.9.2: Isolierung von Hepatozyten)

3.1.9.5 Alkalische Elution

BE1 Puffer, pH 7,5 (autoklavieren)	20 mM	Tris
	100 mM	NaCl
	1mM	Na ₂ H ₂ EDTA

Lysepuffer, pH 10	2%	SDS
	100 mM	Glycin
	20 mM	Na ₂ H ₂ EDTA

Elutionspuffer, pH 12,1-12,2 Einstellen des pH Wertes mit TEAH.	20mM	H ₄ EDTA
--	------	---------------------

Waschpuffer, pH 10 (autoklavieren)	20mM	Na ₂ H ₂ EDTA
------------------------------------	------	-------------------------------------

Bisbenzimid-Stammlösung (Hoechst 33258) Aliquotieren und einfrieren bei -20°C.	0,15 mM	Bisbenzimid
---	---------	-------------

DNA-Standard 200 µg/ml Kalbsthymus-DNA gelöst in BE1 Puffer

Phosphatpuffer, pH 6,0 (autoklavieren)	87,8 mM	NaH ₂ PO ₄
	12,2 mM	Na ₂ HPO ₄

Phosphatpuffer, pH 7,2 (autoklavieren)	28mM	NaH ₂ PO ₄
	72 mM	Na ₂ HPO ₄

mit Bisbenzimid (1 % (v/v) Bisbenzimid-Stammlösung)

Die Bisbenzimidlösung wird erst nach dem Autoklavieren des Phosphatpuffers pH 7,2 und unmittelbar vor der Messung zugesetzt und lichtgeschützt gelagert.

3.1.9.6 Genexpressionsbestimmung mittels qRT-PCR

DEPC-H₂O (autoklavieren) DEPC 0,01% (v/v)
lösen in sterilem Aqua dest. Die Lösung nach Schütteln ÜN (Über Nacht) bei RT (Raumtemperatur) stehenlassen und dann autoklavieren. DEPC zerstört RNAsen und zerfällt beim Autoklaviervorgang.

MOPS –Puffer 10x, pH 7,0 (autoklavieren)	200 mM	MOPS
	30 mM	Natriumacetat
	12,7 mM	EDTA
	Puffer ansetzen mit DEPC-H ₂ O	

MOPS Puffer 1x	Mischverhältnis 10:1 > DEPC-H ₂ O: MOPS Puffer 10x	
----------------	---	--

Ethanol 75% (v/v)	25 ml	EtOH
	75 ml	DEPC-H ₂ O

TAE-Puffer 50x, pH 8,3	2 M	Tris
	3,4 M	Eisessig
	0,05 M	EDTA

pH- Wert einstellen mit H₂SO₄, Puffer ansetzen mit Aqua dest.

TAE-Puffer 1x	Mischverhältnis 50:1 > Aqua dest. : TAE-Puffer 50x	
---------------	--	--

Puffer zur Färbung von Agarosegelen	500 ml	TAE-Puffer (1x)
	25 µl	Ethidiumbromidlösung

TE-Puffer (autoklavieren)	10 mM	Tris-Puffer pH 8,0
	1 mM	EDTA-Puffer pH 8,0

2x RNA loading dye	Thermo Scientific, St.Leon Rot	
--------------------	--------------------------------	--

Orange G Lösung (5%)	5 mg	Orange-G
	0,3 ml	Aqua dest.

Ladepuffer (6x)	0,3 ml	Orange G Lösung (5%)
	1,2 ml	TAE 50x Puffer
	2,5 ml	Aqua dest.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultivierung und Zellexperimente

Anmerkungen zu den Zellkulturarbeiten

Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle zellbiologischen Arbeiten unter einer Sterilbank und unter Verwendung steriler oder autoklavierter Materialien durchgeführt. Verwendete Medien wurden vor Gebrauch in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, 99% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert.

3.2.1.1 Auftauen von Zellen

Die aufzutauenden Zellen (in einem Kryogefäß) wurden aus dem Stickstofftank entnommen und bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Nach Versetzen der Zellen mit etwa 10 ml Kompletmedium wurden diese in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1200 rpm für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand kann verworfen und die Zellen in Kompletmedium resuspendiert werden. Anschließend wurden die Zellen in Zellkulturflaschen überführt und in den Brutschrank gestellt.

3.2.1.2 Passagieren der Zellen

Die Zellen wurden bei sub-Konfluenz (ca. 75% der Kulturoberfläche ist mit Zellen bedeckt) mit 1x PBSCMF gewaschen, mit 0,5 - 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und für maximal 5 min in den Brutschrank gestellt. Anschließend erfolgte die Resuspension in Kompletmedium im Verhältnis von ca. 1:5, bevor die Zellen in eine neue mit Kompletmedium versetzte Zellkulturflasche überführt und im Brutschrank bei 37°C weiterkultiviert wurden. Die Zellen wurden alle 3 Tage passagiert.

3.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Nachdem die Zellen nach dem Ablösen mit Trypsin/EDTA-Lösung im Kompletmedium resuspendiert sind, wird ein definiertes Volumen dieser Zellsuspension (200µl) in ISOTON II-Lösung (9,8 ml) überführt und die Anzahl der Zellen mit Hilfe eines CoulterCounter™ Gerätes (mit der Einstellung 7 - 20 µm Zellgröße) bestimmt. Das Coulter-Counter-Verfahren (Electrical Zone Sensing), beruht auf einer Änderung des elektrischen Widerstandes proportional zum Teilchenvolumen.

3.2.1.4 Behandlung der SH-SY5Y Zellen

SH-SY5Y Zellen wurden vor der Behandlung mit Dopamin oder den enzymatischen Antioxidantien Katalase und SOD einmal mit im Wasserbad vorgewärmten 1x PBSCMF

gewaschen. Dopamin wurde in allen Versuchen kurz vor dem Versuch eingewogen, in Aqua dest. gelöst, anschließend steriltfiltriert, dann in der jeweiligen Konzentration und im Falle zusammen mit SOD und/ oder Katalase in Komplettmedium gelöst. Dieser Ansatz wurde für alle Zellproben als Mastermix angesetzt, auf alle Ansätze verteilt und anschließend im Brutschrank für 24h oder 3h inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellen mit 1x PBSCMF gewaschen, abtrypsiniert und die Zellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 3.2.1.3). Für die Bestimmung der Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitiven Modifikationen mittels Alkalischer Elution wurden jeweils 1 Mio. Zellen pro Spur verwendet (siehe hierzu Abschnitt 3.2.3).

3.2.1.5 Proliferationsassay

Prinzip

Die Bestimmung des Proliferationsfaktors ist eine recht einfache und auch schnelle Methode die zur Abschätzung der Toxizität einer Substanz/Schädigung dient. Es werden Zellen mit einer Substanz behandelt und durch die Bestimmung der Zellzahl wird die Proliferation der Zellen bestimmt. Unbehandelte Zellen dienen hierbei als Vergleich zur Bestimmung der Toxizität dieser Substanz.

Durchführung

Nach dem Abtrypsinieren und Zählen von Zellen werden $0,75 \times 10^6$ Zellen pro 25 cm²-Zellkulturflasche ausgestreut (siehe Abschnitte 3.2.1.2 und 3.2.1.3). Nach der Anwachszeit (24h) wird das Medium gewechselt und die Zellen mit den unterschiedlichen Konzentrationen an Dopamin ± Katalase und SOD für 24h (oder in manchen Experimenten auch 3h) behandelt. Hierbei ist darauf zu achten, dass immer 2 Ansätze pro Behandlung, sowie unbehandelte Zellen (Inkubation von Zellen mit Komplettmedium) angesetzt werden. Nach der Behandlungszeit wird eine Probe der Doppelbestimmung abgelöst und gezählt, dies ist die Zellzahl zum Zeitpunkt $t=0$. Die zweite Probe wird nicht abgelöst, sondern zweifach mit 1x PBSCMF gespült um die Substanzen wegzuwaschen. Anschließend wird für 48h mit Komplettmedium unter normalen Kulturbedingungen weiter inkubiert. Danach wird abgelöst und gezählt, um die Zellzahl zum Zeitpunkt $t=1$ zu erhalten (siehe Abbildung 3-1). Im Abschluss wird der jeweilige Proliferationsfaktor pro Behandlung berechnet. Dazu dient der Quotient aus der Zellzahl $t=1$ zur mittleren Zellzahl $t=0$.

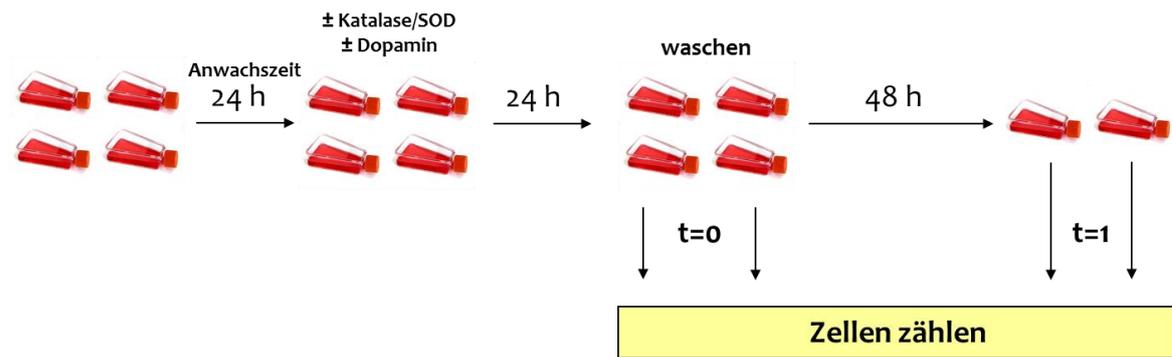


Abbildung 3-1: Schema des Proliferationsassays

3.2.2 Arbeiten mit Tieren

3.2.2.1 Zucht und Haltung transgener Mäuse mit hSOD1 Überexpression

Prinzip

Bei der Verpaarung von Mäusen bei welchen ein oder mehrere Gene ausgeschaltet sind (dies bezeichnet man als *knockout*) mit transgenen Mäusen (dies bezeichnet Tiere in dessen Genom ein Gen einer anderen Spezies integriert wurde) erhält man transgene *knockout* Mäuse.

Durchführung

In dieser Arbeit wurden im ersten Zuchtschritt die transgenen hSOD1 überexprimierenden Mäuse (diese sind $Csb^{+/+} Ogg1^{+/+}$) mit dem doppel - knockout $Csb^{-/-} Ogg1^{-/-}$ Mausstamm gekreuzt (siehe Abschnitt 3.1.8). Die Verpaarung erfolgte in allen Zuchtschritten polygam, d.h. ein Männchen wird mit zwei weiblichen Tieren verpaart. Im zweiten Zuchtschritt erfolgte die Kreuzung der F1-Generation von hSOD1 überexprimierenden heterozygoten $Csb^{+/-} Ogg1^{+/-}$ Mäusen mit doppel - knockout $Csb^{-/-} Ogg1^{-/-}$ Tieren. Nun erhält man in der F2 Generation acht Genotypen, wovon folgende vier Genotypen für die Experimente genutzt wurden: $Csb^{+/-} Ogg1^{+/-}$ und $Csb^{-/-} Ogg1^{-/-}$ Mäuse jeweils mit und ohne hSOD1 Überexpression, siehe Abbildung 3-2. Die jeweiligen Genotypen wurden mittels PCR Analyse (siehe Abschnitt 3.2.2.2) ermittelt.

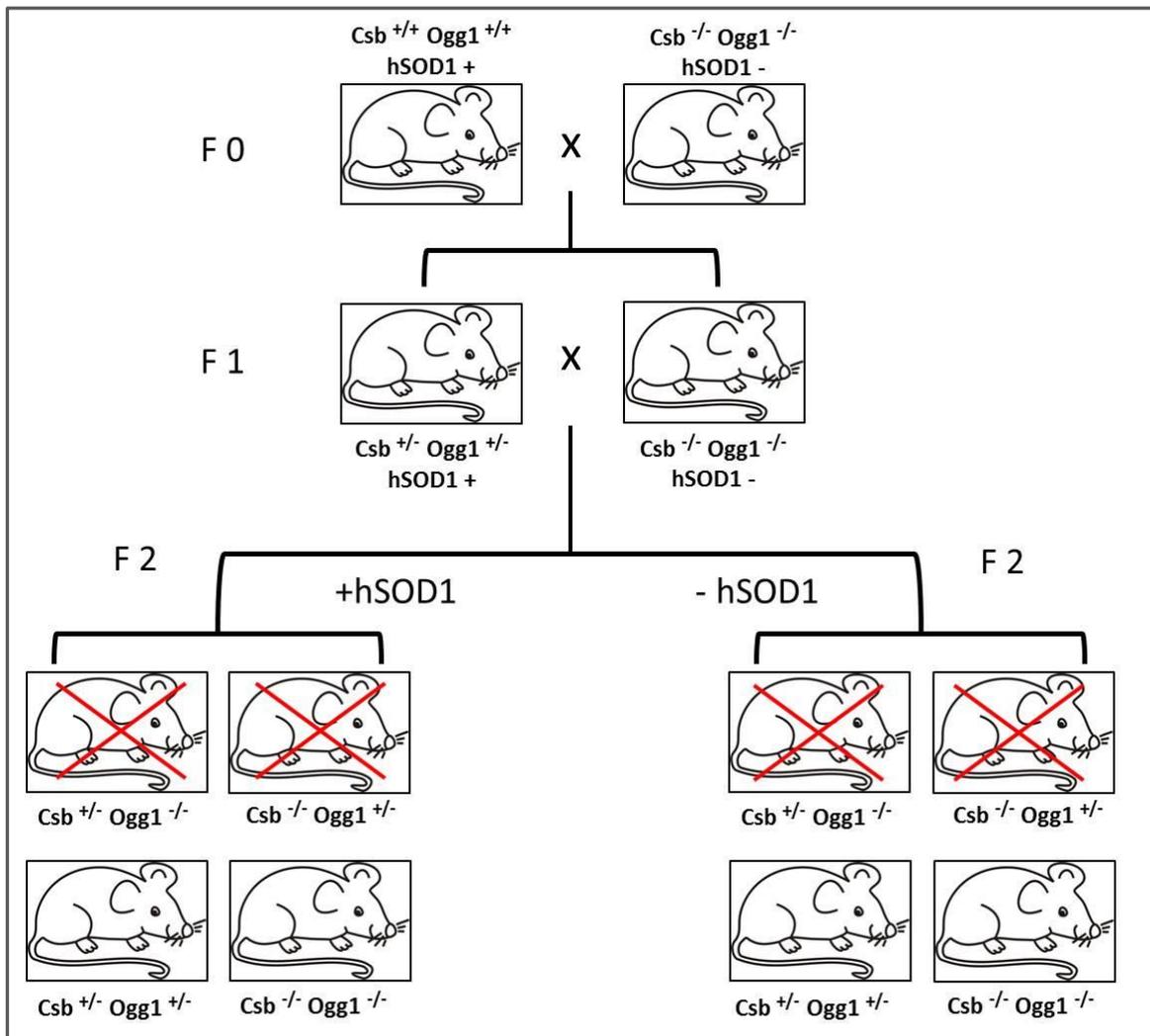


Abbildung 3-2: Schema der Zuchtschritte zur Generierung von *Csb*^{+/-} *Ogg1*^{+/-} und *Csb*^{-/-} *Ogg1*^{-/-} Mäusen jeweils mit und ohne *hSOD1* Überexpression. Die Genotypen der F2 Generation, die mit einem roten Kreuz versehen sind, wurden nicht für die Experimente genutzt.

3.2.2.2 Genotypisierung

Die Genotypisierung der Mäuse erfolgt mittels Polymerase Ketten Reaktion (PCR) und spezifischen Primern. Als DNA Template dient isolierte DNA aus Schwanzbiopsien. Die spezifische Größe der PCR Produkte je nach Genotyp kann nachfolgend in einem Agarosegel differenziert werden. Die Vorgehensweise soll im Folgenden beschrieben werden.

Markierung der Tiere

Jedes Tier wird im Tierstall mit Hilfe einer Ohrlochzange markiert. Die Anzahl und Kombination der Ohrlöcher bei jeder Maus werden genutzt um die Tiere nach der Genotypisierung zu unterscheiden.

Den Tieren wird zur Gewinnung der Schwanzbiopsien mithilfe einer Schere (zuvor mit 70% Ethanol und Wasser gereinigt) etwa 0,5 cm des Schwanzes abgetrennt. Aufgrund der Bestimmungen des Deutschen Tierschutzgesetzes geschieht dies bis höchstens 4 Wochen postnatal. Das Schwanzgewebe wird nun mit einer Lyselösung (DirectPCR® Lysis-Lösung von peqlab mit 0,3-0,5 mg/ml Proteinase K) versetzt und ÜN bei 55°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Am darauffolgenden Tag werden die Proben 1h bei 90°C im Wasserbad geschüttelt um die Proteinase K zu inaktivieren. Die Proben können nun sofort für die PCR verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die Polymerase Ketten Reaktion erlaubt es spezifisch DNA Fragmente zu vervielfältigen. Hierzu benötigt werden Primer, ein Polymerase Enzym, Nuklotidtriphosphate sowie die DNA Matrize an die sich die Primer anlagern und welche dann von der Polymerase abgelesen wird. Die Länge und Position des zu amplifizierenden Fragmentes wird durch die Wahl der Primer bestimmt. Als DNA Matrize (Template) dient hier die isolierte DNA aus den Maus Schwanzbiopsien. Durch eine Kombination von forward und reverse Primern spezifisch für das *knockout* und Wildtyp Allel lassen sich homozygote *knockout* und Wildtyp Tiere nachweisen sowie heterozygote Mäuse bestimmen. Die PCR zur Bestimmung des *Ogg1* und *Csb* Genotyps wurde mithilfe des Kits „Taq all inclusive“ von peqlab nach Angaben des Herstellers ausgeführt.

Die Genotypisierung zur Bestimmung der Überexpression der humanen *SOD1* wurde in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Albrecht Clement, im Institut für Pathobiochemie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Tabelle 3-1: Zusammensetzung des PCR-Ansatzes zur Maus - Genotypisierung von Csb und Ogg1. Die Volumenangaben sind in μl .

	Csb	Ogg1
Aqua dest. (steril)	26,75	26,75
Reaktionspuffer Y	5	5
Enhancer Lösung P	10	10
dNTP-Mix (10mM)	1	1
Upstream Primer (Wildtyp) (25 μm)	2	2
Downstream Primer (knockout) (25 μm)	2	2
Downstream Primer (knockout) (25 μm)	2	2
Taq-Polymerase	0,25	0,25
Mastermix	49	49
+ DNA Template	1	1
Summe	50	50

Nachdem die Ansätze aus Tabelle 3-1 gemischt werden, kann die PCR mit folgendem Programm gestartet werden:

Für Csb/Ogg1:

Schritt	Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Zeit
1	0	∞
2	94	3 min
3	94	45 s
4	55	45 s
5	72	30 s, zurück zu Schritt 3, 34 Zyklen
6	72	10 min
7	10	∞

Die PCR-Proben werden im Anschluss mit 10 μl Ladepuffer versetzt. Die Länge der amplifizierten PCR - Produktfragmente kann anschließend mithilfe einer Agarosegelelektrophorese und eines DNA Markers ermittelt werden.

3.2.2.3 Agarosegelelektrophorese

Die PCR-Produkte werden nach der PCR in einem 2% igen Agarosegel der Länge nach aufgetrennt. Es wird 2g Agarose in einem Glaskolben eingewogen und mit 1x TAE-Puffer auf 100g aufgefüllt. Die Agarose - Pufferlösung wird anschließend in der Mikrowelle erhitzt bis die Agarose vollständig gelöst ist und keine Schlieren mehr erkennbar sind. Nach dem Einfüllen in eine Gelkammer wird ein Kamm eingesetzt und das Gel härtet aus. Etwa 1,2 Liter 1x TAE Puffer wird überschichtet und nach dem

Herausziehen des Kammes werden die entstandenen Geltaschen mit bis zu 30 μl Probe beladen. Zusätzlich hierzu wird eine Tasche mit einem DNA Marker beladen. Die Gelkammer wird über eine Stromquelle bei 100V angeschlossen. Nach 90 min wird das Gel in ein Ethidiumfärbebad (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ethidium in Aqua dest.) gelegt und nach 30 min unter UV-Licht mit dem Geldoc-System und der Gel-Analysesoftware Image LabTM, Version 3.0 (Bio-Rad) ausgewertet.

3.2.2.4 Isolierung von Hepatozyten mittels Leberperfusion

Die Isolation von primären Hepatozyten aus der Maus folgten einem abgeänderten EGTA-Kollagenase Verfahren nach Seglen und Hengstler (Seglen 1976, Hengstler, et al. 2000). Diese Technik ist in Abbildung 3-3 dargestellt.

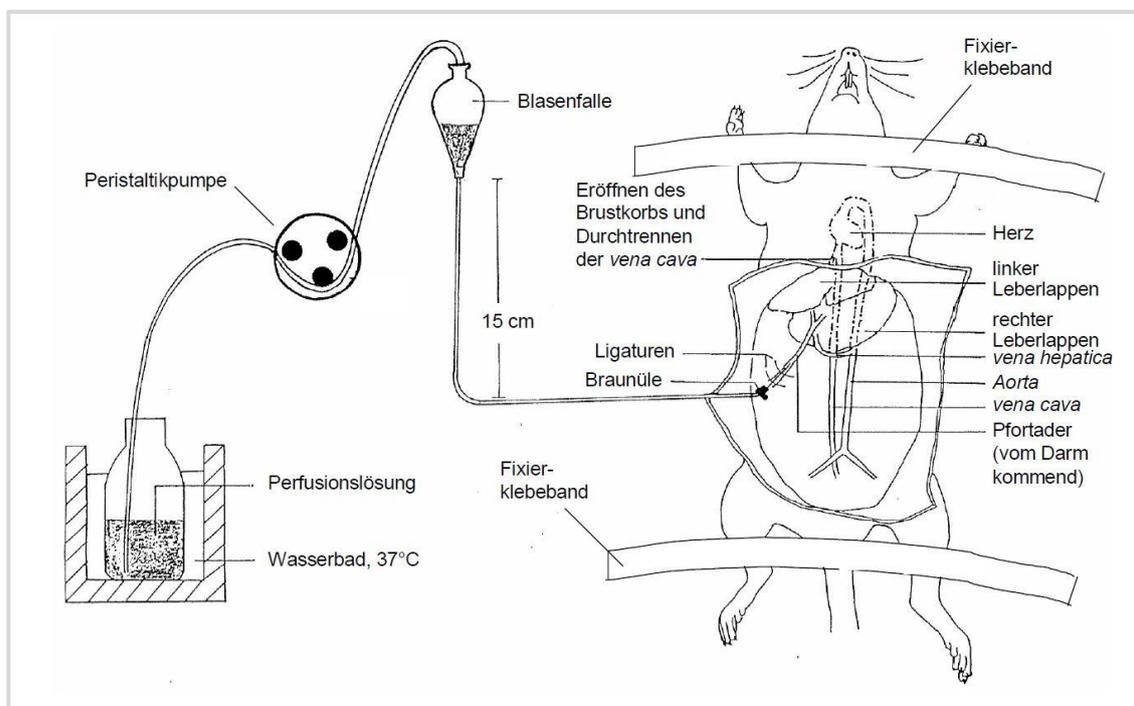


Abbildung 3-3: Darstellung der *in vivo* Leberperfusion

Die Mäuse wurden in einem mit Isofluran gesättigten Exsikkator betäubt, mit Genickbruch getötet und auf dem Rücken liegend mit Klebeband fixiert. Der Bauchraum wird mit einem Y-Schnitt geöffnet und die Pfortader (*venae portae*) wird freigelegt. Durch einen Schnitt in die Pfortader mit einer Gefäßschere ist es möglich eine Flügelkanüle in die Pfortader einzuführen. Diese Flügelkanüle eines Infusionssets ist mit einem Pumpenschlauch (1,5 mm Durchmesser) und somit mit den jeweiligen Perfusionslösungen verbunden. Die Kanüle wird nun mit einem Nähfaden zugeknötet und wiederum mit Klebeband fixiert. Anschließend wird die Halsschlagader geöffnet und die Leber wird luftblasenfrei für 15 min mit EGTA-Puffer perfundiert. Danach erfolgt eine 30 minütige Perfusion mit dem Kollagenase-Puffer. Die

Pumpgeschwindigkeit beträgt jeweils immer 1 ml/min und die Puffer sind auf 37°C temperiert.

Nach der Perfusion wird die Leber vorsichtig aus dem Tier herauspräpariert, gewogen und in eine Petrischale überführt, von der Gallenblase getrennt und mit 30 ml kaltem Suspensionspuffer überschichtet. Die Leberkapsel wird geöffnet und die Hepatozyten der schon weichen Leber werden mit einer Pinzette unter Schütteln vorsichtig herausgelöst. Die Hepatozyten-Suspensionspufferlösung wird nun durch ein Zellsieb (100 µm Porengröße) in ein 50ml Zentrifugenröhrchen filtriert um größere Gewebestücke abzutrennen. Es folgt ein 10 minütiger Zentrifugationsschritt bei 15 x g bei 4°C. Der Überstand wird vorsichtig verworfen und das Zellpellet mit 20 ml kaltem Suspensionspuffer versetzt und vereinzelt durch leichtes Schütteln des Zentrifugenröhrchens. Es folgt erneut ein 10 minütiger Zentrifugationsschritt bei 15 x g bei 4°C. Das Pellet wird in 20ml kaltem Suspensionspuffer gelöst und auf Eis gelagert bis zur weiteren Verwendung.

3.2.2.5 Isolierung von Zellen aus der Niere

Die Mäuse wurden in einem mit Isofluran gesättigten Exsikkator betäubt, mit Genickbruch getötet und auf dem Rücken liegend mit Klebeband fixiert. Der Bauchraum wird mit einem Y-Schnitt geöffnet und die Niere wird herausgenommen, gewogen und in eine Petrischale gelegt. Es wird 10 ml Kollagenasepuffer (auf 37°C temperiert) hinzugefügt und die Niere mit einem Skalpell zerkleinert, in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 90 min bei 120 U/min bei 37°C geschüttelt. Die nun erhaltene Zellsuspension wird durch ein Zellsieb (100 µm Porengröße) in ein 50ml Zentrifugenröhrchen filtriert und zentrifugiert bei 100 x g für 10 min bei 4°C. Anschließend wird das Pellet mit 5 ml Erythrozytenlysepuffer versetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach dem Auffüllen auf 20 ml mit kaltem Suspensionspuffer wird erneut zentrifugiert bei 15 x g für 10 min bei 4°C. Das Pellet wird in 10 ml Suspensionspuffer aufgenommen, vorsichtig vereinzelt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

3.2.2.6 Vitalitäts- und Zellzahlbestimmung

Die isolierten primären Hepatozyten sowie die Nierenzellen werden gezählt und mittels Trypanblau-Ausschluß auf ihre Vitalität hin untersucht. Dazu wird die Zellsuspension mit einer Trypanblaulösung zu gleichen Teilen (100µl + 100µl) versetzt und in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Hepatozyten werden mit abgeschnittenen Pipettenspitzen (etwa 5 mm) pipettiert, da die Zellen recht groß und sehr empfindlich sind. Es werden die blau angefärbten (toten) Zellen und die nicht gefärbten (noch vitalen) Zellen gezählt. Hieraus kann der Anteil toter und vitaler Zellen, die Gesamtzellzahl und somit die Vitalität der Zellen ermittelt werden.

3.2.2.7 Isolierung von Zellen aus der Milz

Die Mäuse wurden in einem mit Isofluran gesättigten Exsikkator betäubt, mit Genickbruch getötet und auf dem Rücken liegend mit Klebeband fixiert. Der Bauchraum wird mit einem Y-Schnitt geöffnet und die Milz wird herausgenommen, gewogen und in eine Petrischale gelegt. Mit einer Spritze wird 1 ml kaltes PBS aufgezogen und an mehreren Stellen in die Milz eingespritzt. Die Zellsuspension wird dann wieder in die Spritze eingezogen und durch ein Zellsieb (100 µm Porengröße) in ein 50ml Zentrifugenröhrchen filtriert. Die Zellsuspension im Zentrifugenröhrchen wird auf 30 ml mit PBS aufgefüllt und 10 min zentrifugiert bei 1500 rpm und 4°C. Das Pellet wird in 1 ml Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wird diese Lösung auf 30 ml mit RPMI Medium (10% FCS, 1% P/S) aufgefüllt und 10 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird in RPMI Medium (10% FCS, 1% P/S) aufgenommen und die Zellzahl wird mit dem Coulter Counter Gerät (mit der Einstellung 5-15 µm Zellgröße) bestimmt.

3.2.2.8 Organentnahmen

Den Mäusen wurden Organe entnommen um Genexpressionsanalysen und Western Blots durchzuführen sowie die Aktivität der hSOD1 in der Leber und der Niere zu analysieren. Zur Organentnahme werden die Mäuse in einem mit Isofluran gesättigten Exsikkator betäubt, mit Genickbruch getötet und auf dem Rücken liegend mit Klebeband fixiert. Der Bauchraum wird mit einem Y-Schnitt geöffnet und die jeweiligen Organe werden entnommen, gewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, anschließend bei -70°C und für längere Lagerung in einem Flüssigstickstoff-Tank gelagert.

3.2.3 Alkalische Elution

3.2.3.1 Prinzip

Die Alkalische Elution ist eine *in vitro* Methode um hochempfindlich intrazelluläre DNA-Schäden zu messen. Die modifizierte Variante des von (Kohn, et al. 1976) entwickelten Verfahrens, ermöglicht es nicht nur DNA-Einzelstrangbrüche nachzuweisen, sondern durch den Einsatz von Reparaturenendonukleasen können zusätzlich DNA-Basenmodifikationen gemessen werden (Epe und Hegler 1994). Die Reparaturenzyme erkennen entsprechende DNA Modifikationen, schneiden an der Schadensstelle ein und werden als Einzelstrangbrüche detektiert. Die Nachweisgrenze der Alkalischen Elution liegt bei 0,05 Läsionen pro 10^6 Basenpaaren und ist deutlich empfindlicher (etwa 200x) im Vergleich zu anderen *in vitro* Methoden wie zum Beispiel der PM2-Relaxationsassay (Hollenbach, et al. 1999). Das Prinzip der Alkalischen Elution ist in Abbildung 3-4 A dargestellt. Es werden zu untersuchende Zellen (primäre Zellen oder

Zelllinien) in einer Zellsuspension auf einen Polycarbonatfilter mit einem Porendurchmesser von 2 μm aufgetragen. Die Zellen werden dann mit einem Lysepuffer (SDS + Proteinase K) lysiert. Es bleibt die DNA auf dem Filter zurück, wobei andere Zellbestandteile wie Proteine, RNA und Membranen durch Waschschriffe entfernt werden. Es kann nun im folgenden Schritt zusätzlich mit Reparaturenukleasen inkubiert werden. Die Elution findet statt durch Zugabe eines alkalischen Elutionspuffers (pH 12, 12 -12,15); die DNA wird denaturiert. Stark geschädigte DNA liegt nun in Form kürzerer Fragmente vor als intakte DNA, erstere kann schneller durch den Porenfilter eluieren. Die DNA wird während der Elution in verschiedenen Fraktionen gesammelt und anschließend mit einem neutralisierenden Phosphatpuffer (pH 6,0) versetzt. Mithilfe einer Bisbenzimid enthaltenden Phosphatpufferlösung ist es möglich, eine fluorimetrische Quantifizierung vorzunehmen. Dadurch kann die Elutionsrate berechnet werden. Die Kalibrierung der Apparatur mit γ -Strahlung (6 Gy entsprechen 1 Läsion pro 10^6 Basenpaare) ermöglicht es, das Ausmaß der DNA –Schäden zu errechnen.

3.2.3.2 Aufbau und Vorbereitung

Bevor Zellen auf die Alkalische Elutionsapparatur aufgetragen werden können, müssen für jede Spur Polycarbonatfilter eingebaut werden, eine Apparatur besitzt bis zu 20 Spuren. Die Filter werden auf einen Frittenboden gelegt und in die Filterhalterung eingebaut. Der Aufbau der Alkalischen Elution ist in Abbildung 3-4 B schematisch dargestellt.

Auf der Filterhalterung befindet sich der Vorratsbehälter der aus einer 25ml Einmalspritze besteht. Dieser dient als Vorratsgefäß für das Auftragen der Zellsuspension, sowie aller Lösungen und Puffer die durch die Filterhalterung gepumpt werden. Der Ausgang der Filterhalterung ist mit einem Dialyseschlauch verbunden, welcher mit dem Fraktionssammler verbunden ist. Um die Durchflussrate der Puffer während der Versuche immer konstant zu halten, ist zwischen dem Fraktionssammler und der Filterhalterung eine peristaltische Mehrkanalpumpe zwischengeschaltet. Die Filter und der Vorratsbehälter hängen in einem temperierbaren Wasserbad um die jeweiligen Temperaturen je nach Versuchsabschnitt konstant zu halten. Während des Versuches ist darauf zu achten, dass keine Luft zwischen das Filterhalterungssystem gelangt.

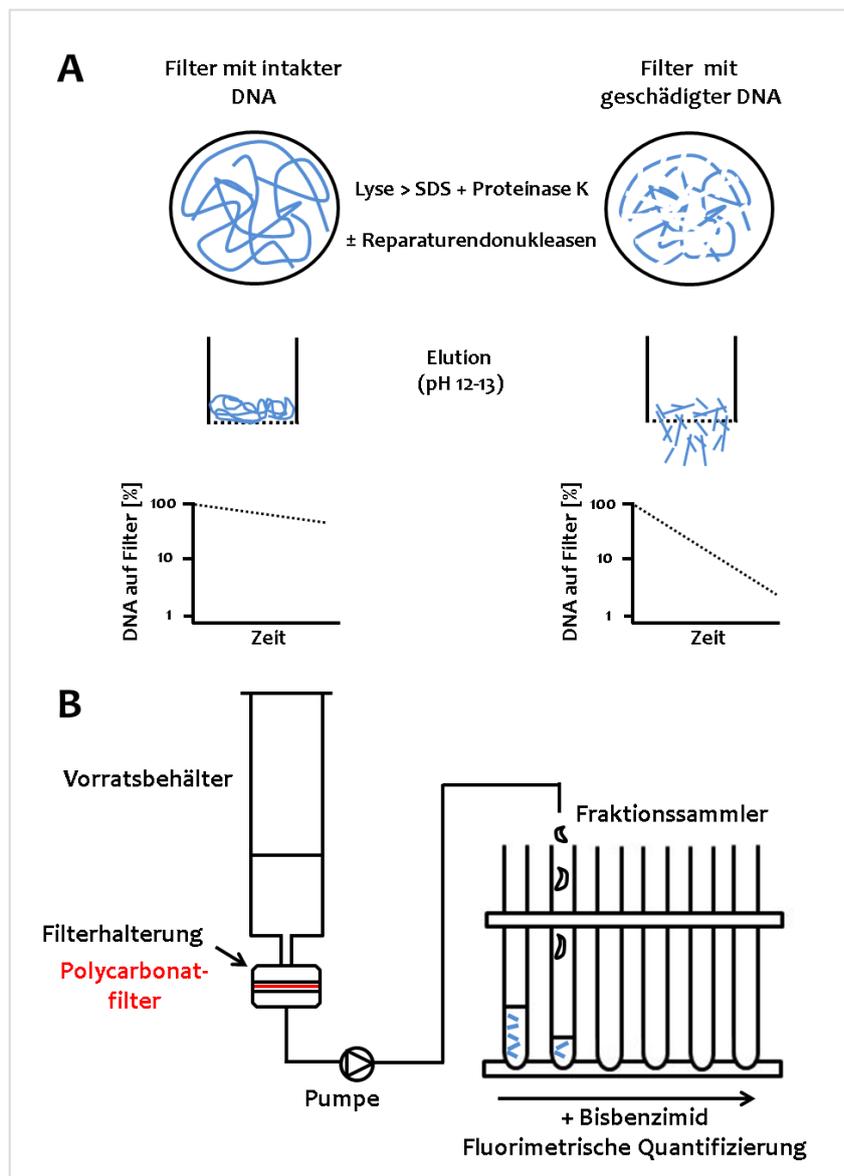


Abbildung 3-4: Schematische Darstellung der Alkalischen Elution: (A) Prinzip und (B) Aufbau

3.2.3.3 Lyse der Zellen, Enzyminkubation und Elution

Nachdem der Filter in die Filterhalterung eingebaut wurde, wird dieser mit sterilem Aqua dest. gefüllt (blasenfrei), danach zweimal mit sterilem eiskaltem PBSCMF gespült und das Wasserbad vor dem Auftragen der Zellen auf 4°C eingestellt. Nun werden die Zellen auf die Vorratsbehälter aufgetragen. Bei primären Hepatozyten trägt man pro Filter aufgrund der Polyploidie $0,5 \times 10^6$ Zellen, bei isolierten Milzzellen $1,5 \times 10^6$ Zellen und bei isolierten Nierenzellen sowie bei den Versuchen mit den SH-SY5Y Zellen trägt man 1×10^6 Zellen pro Filter auf. Es wird ebenfalls immer eine Probe durchgeführt die keine Zellen enthält. Diese dient später als zellfreie Kontrolle um jegliche Kontamination auszuschließen. Es wird erneut zweimal mit 3 ml kaltem PBSCMF

gespült und das Wasserbad wird während des zweiten Spülganges auf 25°C temperiert. Es erfolgt nun ein Waschschriff mit 2 ml Lysepuffer und danach werden 5 ml Lysepuffer mit Proteinase K (0,4 mg/ml) in 90 min durchgepumpt. Nach der Zelllyse wird 7x mit 5ml BE1-Puffer gewaschen (Pumpe läuft bei Maximalgeschwindigkeit). Zwischen den Waschschriffen werden Reste des Lysepuffers-BE1-Gemisches mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Dies ist notwendig, da das im Lysepuffer enthaltene SDS bei der Enzyminkubation stören kann. Das Wasserbad wird auf 37 °C eingestellt und es werden 2 ml BE1- Enzymlösung (BE1 mit 1 µg/ml Fpg-Rohextrakt und 0,5 mg/ml BSA) aufgetragen. Es wird 1 ml der BE1-Enzymlösung bei Maximalgeschwindigkeit, der restliche ml wird innerhalb von 50 min durchgepumpt. Nach der Enzyminkubation wird das Wasserbad auf 25°C herabgekühlt und es wird zweimal mit 5 ml BE1-Puffer und einmal mit 4 ml Waschpuffer gewaschen. Der Fraktionssammler wird nun mit Reagenzgläsern bestückt und der Vorratsbehälter mit 25 ml Elutionspuffer befüllt. Die Elution erfolgt über 11h, es werden 23 ml durchgepumpt, wobei der Fraktionssammler alle 2 h um eine Fraktion weiterrückt. Es werden insgesamt 6 Fraktionen gesammelt. Der restliche Elutionspuffer, der im Vorratsbehälter verblieben ist, wird in die sechste also letzte Fraktion gepumpt. Das Fraktionsvolumen der letzten Fraktion (Filterwert) wird bestimmt, aufgeschrieben und zusammen mit dem ausgebauten Filter und mit dem Frittenboden 2h bei 60°C im Wasserbad geschüttelt. Dadurch wird die gesamte DNA, die sich noch auf dem Filter befindet in Lösung gebracht. Das Volumen der restlichen fünf Fraktionen (Fraktionsvolumen) wird ebenfalls bestimmt und notiert (es beträgt etwa 3,2 - 3,6ml). Nach dem Schütteln der sechsten Fraktion wird dieser ein dem Fraktionsvolumen entsprechendes Volumen entnommen und zusammen mit den anderen fünf Fraktionen weiterverarbeitet.

3.2.3.4 Auswertung und Quantifizierung des DNA -Schadens

Die Fraktionen werden mit dem gleichen Volumen Phosphatpuffer pH 6,0 versetzt und somit neutralisiert. Die DNA Einzelstränge renaturieren, es bildet sich ein DNA-Doppelstrang-Konglomerat aus. Nach einer Inkubation für ca. 15 min bei RT wird das dem Fraktionsvolumen entsprechende Volumen Bisbenzimid-Phosphatpufferlösung (pH 7,2) hinzugesetzt und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Das Bisbenzimid muss vollständig mit der restlichen Lösung durchmischen sein, damit der Fluoreszenzfarbstoff in die DNA interkaliert. Es wird zusätzlich eine Blindprobe mit Elutionspuffer angesetzt, sowie eine Probe mit einer DNA - Standardlösung (Elutionspuffer mit 20µl DNA Standardlösung; dies entspricht 4µg Kalbsthymus - DNA). Diese beiden Proben werden analog der Versuchsproben parallel auch mit Phosphatpuffer pH 6,0 und der Bisbenzimid-Phosphatpufferlösung (pH 7,2) angesetzt. Der DNA Gehalt jeder Fraktion wird nun fluorimetrisch bestimmt (Wellenlänge Exzitation: 360 nm; Wellenlänge Emission: 450nm). Mithilfe der Blindprobe wird der Fluorimeter auf einen Nullwert

eingestellt. Die Probe mit dem DNA-Standard wird ebenfalls vermessen und dient später der Berechnung der absoluten DNA-Menge in μg . Die absolute DNA Menge die mit den Zellen aufgetragen wurde, sollte im Optimum von $10 \mu\text{g}$ liegen. Liegt die Menge deutlich darunter oder darüber, muss die aufzutragende Zellzahl optimiert werden. Die Fraktionen der zellfreien Probe (in Abschnitt 3.2.3.3 beschrieben) wird von den dazugehörigen Fraktionen abgezogen. Die DNA Gesamtmenge einer Probe ist proportional zu der Summe der gemessenen Fluoreszenzintensität der einzelnen Fraktionen. Aufgrund dieses Sachverhaltes ist es möglich den prozentualen Anteil zu den bestimmten Zeitpunkten (die Fraktionen spiegeln die eluierte DNA-Menge pro Zeit wider) zu berechnen. Trägt man nun den prozentualen Anteil der verbleibenden DNA auf dem Filter gegen die Zeit in halblogarithmischem Maßstab auf, so erhält man eine Gerade und eine Steigung. Diese Steigung ist proportional zu der Anzahl an Einzelstrangbrüchen, eine komplett zufällige Verteilung des Schadens in der DNA vorausgesetzt. Die Anzahl (absolut) an Einzelstrangbrüchen sowie Reparaturenendonuklease - sensitiven Modifikationen (hier immer Fpg) kann berechnet werden mit der hier dargestellten Formel 1:

$$\text{ESS+ SSB} = m \times (-2,24 \times 10^{-6})$$

SSB: Anzahl der Einzelstrangbrüche

ESS: Anzahl der Reparaturenendonuklease - sensitiven Modifikationen

m: mittlere Geradensteigung

Formel 1: Berechnung der DNA-Schäden mittels Alkalischer Elution

Der Faktor -2,24 wurde von (Epe, et al. 1993, Pflaum 1996) durch die Kalibrierung von γ -Strahlung (6 Gy entsprechen 1 Läsion pro 10^6 Basenpaaren) bestimmt. Um die Anzahl der Einzelstrangbrüche zu errechnen die nur durch Reparaturenendonuklease - sensitive Modifikationen entstanden sind, muss von der gleichen Probe eine Spur ohne Reparaturenendonuklease gemessen werden (M. Pflaum 1996). Die Anzahl dieser „direkten“ Einzelstrangbrüche kann nun von dem jeweiligen Wert abgezogen werden.

3.2.3.5 Alkalische Schnell-Elution zur Detektion höherer Schäden

Die Alkalische Elution kann zur Bestimmung höherer Schäden abgewandelt werden. Die Sensitivität wird herabgesetzt, jedoch ist es möglich Schäden über 1 Läsion pro 10^6 Basenpaare bis zu 3 Läsionen pro 10^6 Basenpaare nachzuweisen. Die Elution läuft nicht über 11h, sondern über 54 min. Alle neun Minuten rückt der Fraktionssammler weiter. Die Pumpgeschwindigkeit beträgt 30 ml/h . Auch bei der schnellen Elution ist die Kalibrierung der Apparatur mit γ -Strahlung (6 Gy entsprechen 1 Läsion pro 10^6 Basenpaare) erfolgt. Hier beträgt zur Berechnung der Schäden der Berechnungsfaktor

-8,6 (Ballmaier, 1997). Die schnelle Alkalische Elution wurde in dieser Arbeit verwendet zur Messung der Einzelstrangbrüche und der Fpg-sensitiven Modifikationen von Csb^{-/-} Ogg1^{-/-} Mäusen.

3.2.4 Mikrokernbestimmung

Die Mikrokernbestimmung von peripheren Erythrozyten an luftgetrockneten Blutausstrichen erfolgte unter Verwendung der panoptischen Färbung nach Pappenheim (Rick 1977). Die Mäuse wurden in einem mit Isofluran gesättigten Exsikkator betäubt, mit Genickbruch getötet und die Halsschlagader (Arteria carotis) wurde durchtrennt. Pro Maus werden mit je einem Tropfen Blut zwei Blutausstriche auf einem Glas-Objektträger angefertigt. Dieser wird dann luftgetrocknet und danach mit May-Grünwald Lösung für 5 min bei RT fixiert. Nach einem Waschschriff mit Aqua dest. werden die Ausstriche mit Giemsa-Lösung gefärbt für 20 Minuten bei RT. Nach dem Waschen mit Aqua dest. werden die Mikrokern verblindet an einem Lichtmikroskop (NIKON eclipse E400) gezählt. Dabei werden pro Objektträger 2000 Erythrozyten ausgezählt.

3.2.5 Genexpressionsbestimmung mittels quantitativer RT-PCR

3.2.5.1 Prinzip

Die quantitative reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) dient der Analyse der Genexpression in Zellen oder Geweben zum Zeitpunkt der RNA Isolation. Es wird zuerst RNA isoliert, welche mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in copy DNA (cDNA) umgeschrieben wird. Anschließend dient diese cDNA als Matrize in einer quantitativen PCR. Hier kann die PCR mit spezifischen Primern (für unterschiedlich zu untersuchende Gene) und dem Einsatz von SYBR-Green®, einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, in Echtzeit erfolgen. In den folgenden Abschnitten werden die nötigen Arbeitsschritte erläutert.

3.2.5.2 Isolierung der RNA

In dieser Arbeit erfolgte die Isolierung der RNA aus schockgefrorenem Lebergewebe von Mäusen (siehe Abschnitt 3.2.2.8) mittels der Guanidinium Thiocyanat Phenol Chloroform Extraktion nach (Chomczynski und Sacchi 1987). Die Methode eignet sich für die RNA Isolation von Gewebeproben von einem Gewicht von 50-100mg und die parallele Verarbeitung mehrerer Proben. Beim Umgang mit RNA muss auf eine Vermeidung von RNase-Kontamination geachtet werden. Hierzu ist es wichtig, ständig Einmalhandschuhe zu tragen, die Arbeitsflächen sowie alle benötigten Materialien mit Ethanol und DEPC-H₂O zu reinigen. Die gefrorenen Gewebeproben wurden schnell

aufgetaut und jeweils mit einem Skalpell zu einem 50-100mg großen Stück zugeschnitten und in ein 1,5 ml Gefäß gegeben. Es wird 500µl TRIzol® hinzupipettiert und mit einem Gewebehomogenisator homogenisiert. Anschließend folgt ein Zentrifugationsschritt bei 14 000 U/min, 4°C, 4 min. Der Überstand wird in ein 2,0 ml Gefäß überführt, es wird 200µl Chloroform hinzugegeben und gut gemischt. Nach einer kurzen zweiminütigen Inkubation bei RT wird erneut zentrifugiert bei 14 000 U/min, 4°C, 4 min. Die obere wässrige Phase, die die RNA enthält, wird vorsichtig abpipettiert und in ein neues 2,0 ml Gefäß überführt. Es werden etwa 500µl Isopropanol hinzugefügt und gemischt bis die Lösung milchig ist. Nach einer kurzen zweiminütigen Inkubation bei RT wird erneut zentrifugiert bei 14 000 U/min, 4°C, 4 min. Der Überstand wird verworfen und das Pellet an der Luft für einige Minuten getrocknet und abschließend in 75 % Ethanol gelöst und bei -20°C gelagert. Die Kontrolle der RNA (Reinheit und Integrität) erfolgt mittels einer Agarosegelelektrophorese-Analyse und der Bestimmung über die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Der Quotient aus A_{260} und A_{280} sollte bei 1,8 liegen. Ist der Wert geringer, liegen Kontaminationen mit genomischer DNA, Proteinen oder Phenol vor. Die Konzentration der RNA kann über eine Formel (siehe Formel 2) bestimmt werden:

$$\text{RNA Konzentration in ng/}\mu\text{l: } A_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40$$

Formel 2: Bestimmung der RNA-Konzentration

Die denaturierende Agarosegelelektrophorese der RNA-Proben erfolgt auch hier unter RNase freien Bedingungen. Für ein Gel wird 1g Agarose abgewogen und mit 10 ml MOPS-Puffer 1x und 82 ml DEPC-H₂O in der Mikrowelle erhitzt und vollständig gelöst. Unter dem Abzug wird 18 g Formaldehyd (36%) hinzugefügt. Die Agaroselösung wird in eine Gelkammer gegossen und mit einem Kamm versehen. Nach dem Aushärten des Gels wird es mit MOPS-Puffer 1x überschichtet. Die RNA wird mit einem Zentrifugationsschritt (14 000 U/min, 4°C, 4 min) pelletiert und in 100µl DEPC-H₂O resuspendiert. 8µl der RNA-Lösung wird zu gleichen Teilen mit einem RNA-loading dye versetzt und im Wasserbad bei 65-70°C für 15 min erhitzt. Die restliche RNA-Lösung wird wieder mit Ethanol absolut auf Ethanol 75 % gebracht und eingefroren bei -20°C. Nach dem Herausziehen des Kammes werden die Proben dann in die Geltaschen einpipettiert. Zusätzlich hierzu wird eine Tasche mit einem RNA Marker beladen. Die Gelkammer wird über eine Stromquelle bei 120V angeschlossen. Nach 35 min wird das Gel in ein Ethidiumfärbebad (0,5 µg/ml Ethidium in Aqua dest.) gelegt und nach 30 min

unter UV-Licht mit dem Geldoc-System und der Gel-Analysesoftware Image Lab™, Version 3.0 (Bio-Rad) ausgewertet.

3.2.5.3 Reverse Transkription

Das Umschreiben der isolierten RNA in cDNA erfolgte mit dem Revert Aid 1st strand synthesis Kit von Fermentas. Als Matrize werden 2 µg RNA eingesetzt, parallel erfolgt immer eine Kontrollprobe ohne Zugabe des ReverseTranskriptase Enzyms (no RT-Probe). Es wurde folgender Reaktionsmix hergestellt:

Tabelle 3-2: Reaktionsmix der Reversen Transkription

Komponenten	RT-Probe (µl)	No RT-Probe (µl)
RNA (1 µg/µl)	2	2
Random Hexamer Primer (100 µM)	1	1
DEPC-H ₂ O	9	9
70°C für 5 Minuten, danach auf Eis stellen		
Reaktionspuffer (5x)	4	4
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)	1	1
dNTP (10 mM)	2	2
Vorsichtiges Durchmischen, 25°C für 5 Minuten		
RevertAid M-MuLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)	1	0
Gesamtvolumen	20	19

Die Reaktion läuft nun 1 h bei 42°C, anschließend wird das Enzym durch eine Inkubation bei 70°C für 10 Minuten inaktiviert. Die erhaltene cDNA wird mit Aqua dest. verdünnt und gelagert bei -20°C.

3.2.5.4 Quantitative Polymerase Kettenreaktion

Um die quantitative Real-time PCR durchzuführen, muss folgender Reaktionsmix unter sterilen Bedingungen (unter einer Sterilbank) hergestellt werden:

Tabelle 3-3: Reaktionsmix der quantitativen PCR

Komponenten	Pro Probe (µl)
Aqua dest.	2,44
MgCl ₂ (25 mM)	0,36
Primer Forward (2 µM)	3
Primer Reverse (2 µM)	3
SYBR-Green®PLUS Mix 10x	1,2
Dieser Mix wird auf Kapillaren verteilt und die cDNA bzw. noRT-Probe zugegeben.	
cDNA/no RT-Probe hinzufügen	2
Gesamtvolumen	12

Dieser Mix wird abzentrifugiert (30 s bei maximal 100 x g) und der LightCycler wird mit den Kapillaren beladen. Die qPCR wird auf folgendes Programm eingestellt:

Tabelle 3-4: PCR Programm der quantitativen PCR

Temperatur (°C)	Zeit (s)	Zyklenanzahl
95	600 s	1
95	10 s	28 - 32
65	10 s	
72	Elongation	
T _{acq}	5 s	
95 bis 65	in 60 s	1
40	∞	

Die T_{acq} ist die optimale Temperatur bei der die Fluoreszenz gemessen wird. Diese ist für jedes Primerpaar unterschiedlich und muss individuell ermittelt werden. In der nachfolgenden Tabelle sind die verwendeten Primerpaare sowie die T_{acq} und die Elongationszeiten aufgelistet.

Tabelle 3-5: Primer-Bedingungen der qRT-PCR

Primer	T _{acq} (°C)	Elongationszeit (s)
β-actin	85	20
GAPDH	83	20
18S	82	20
36B4	84	20
h+m SOD1	82	20
murine SOD1	80	20
SOD2	80	20
SOD3	82	20
GPX1	82	20
HO1	81	20
CAT	84	22
NRF2	81	20

3.2.5.5 Auswertung

Die Quantifizierung genspezifischer cDNA kann mithilfe einer Standardkurve ermittelt werden. Diese wird generiert durch eine Amplifikation eines Referenzgens (*Gapdh*) aus Verdünnungen einer Referenz cDNA Probe. Die Menge der vervielfältigten *Gapdh*-Genfragmente wird genutzt um die Proben auf den jeweiligen Wert des Referenzgens zu normieren. Die Spezifität der Genprodukte wurde mittels Agarosegelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.2.2.3) kontrolliert. Die mittlere Expression der untersuchten Gene jedes Maus-Genotyps und jedes Tieres wurde relativ zu β-aktin auf den Wert 1 normiert.

3.2.6 Western Blot

Die Western Blot Analyse wurde von Dr. Martina Liebl in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Albrecht Clement, im Institut für Pathobiochemie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt und soll hier in Kürze beschrieben werden.

Schockgefrorenes Leber- und Nierengewebe (drei Mäuse je Genotyp) wurde jeweils für 30 s in einem hypotonischen Puffer (10 mM HEPES, 10 mM NaCl, 5 mM NaHCO₃, 5 mM EDTA, 1 mM CaCl₂, 1 mM KH₂CO₃, 0,2 mM MgCl₂; pH 7,4) homogenisiert und anschließend sonifiziert für 10s. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt bei 100.000 x g für 30 min bei 4°C um eine zytosolische Fraktion zu erhalten. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde über die BCA-Methode ermittelt. 5µg Gesamtprotein wurde in einem vorgefertigten SDS-PAGE Gel (NuPage, Bis-Tris Gel, Life Technologies) aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran geblottet. Die Membran wurde dann inkubiert mit einem Blocking-Puffer (4% non-fat Milchpulver in PBS-T) um unspezifische Bindungsstellen abzublocken. Danach erfolgte die Inkubation mit spezifischen Antikörpern gegen humane und murine SOD1 sowie Tubulin (SOD1 Epitomics, 2018-1, Verdünnung 1:5000 und Tubulin, Sigma-Aldrich, T9026, Verdünnung 1:2000) und mit dem LAS300 System (Fuji) ausgewertet. Bandenintensitäten wurden quantifiziert mit der Image J 1.460 Software.

3.2.7 Aktivitätsbestimmung von SOD1

Die Aktivitätsbestimmung von SOD1 wurde von Dr. Martina Liebl in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Albrecht Clement, im Institut für Pathobiochemie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt und soll hier in Kürze beschrieben werden.

Die SOD1 Enzym-Aktivität wurde bestimmt aus zytosolischen Fraktionen aus schockgefrorenem murinem Leber- und Nierengewebe (siehe Abschnitt 3.2.6) von je drei Mäusen je Genotyp. Die Aktivität wurde mithilfe des Dojindo SOD Assay Kits (Dojindo Molecular Technologies, S311) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Der Assay basiert auf der Konkurrenz von SOD1 und Xanthinoxidase (siehe Abbildung 3-5). Es wurden 2 µg des Gesamtproteinextraktes in einem Volumen von 20 µl verwendet. Als SOD1 Aktivitätsstandard diente SOD1 aus humanen Erythrozyten (Sigma Aldrich, S9636) in Konzentrationen von 0.1 - 200 U/mg. Inhibitionsraten wurden erstellt und die SOD1-Aktivität (in U/mg) wurde bestimmt, mithilfe der logarithmisch erstellten Standardkurve. Eine Einheit (U) ist hier definiert als die Enzymmenge in 20 µl welche die Reduktion von WST-1 mittels Superoxid um 50% reduziert. Die Messungen finden statt bei einer Absorption von 450 nm mit einem Mikroplate Reader.

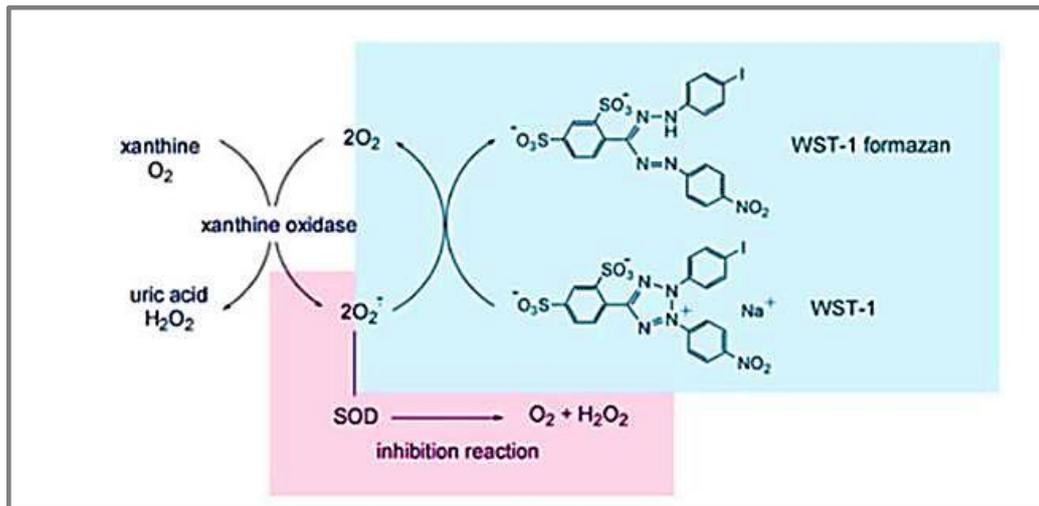


Abbildung 3-5: Prinzip der SOD₁ Aktivitätsmessung mithilfe des WST-1 Kits (Abbildung aus dem Technical Manual des Dojindo Molecular Technologies, S311)

3.2.8 Statistik

Statistische Auswertungen wurden sofern nicht anders angegeben mit Excel und Graph Pad Prism berechnet. Signifikanzberechnungen erfolgten unter Verwendung des ungepaarten, zweiseitigen Student's t-Tests mit Welch-Korrektur. Hierbei sind p-Werte ≤ 0.05 (*) als statistisch signifikant, p-Werte ≤ 0.01 (**) als sehr signifikant und p-Werte ≤ 0.001 (***) als hoch signifikant anzusehen. Die Fehlerbalken entsprechen Standardabweichungen.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von hSOD1 auf die Bildung endogener oxidativ gebildeter Basenschäden *in vivo*

4.1.1 Generierung der Mausstämme

Die nachfolgend beschriebenen Experimente sollen den Einfluss einer Überproduktion von humaner SOD1 (hSOD1) auf die Spiegel von endogen gebildeten oxidativen DNA-Schäden *in vivo* beleuchten. Hierbei wurden 4 Mausgenotypen in unterschiedlichen Altersstufen untersucht, nämlich **Csb^{-/-} Ogg1^{-/-} und Csb^{+/-} Ogg1^{+/-} Mäuse jeweils mit und ohne hSOD1 Überexpression**. Die Ogg1^{-/-} - Tiere sind OGG1-defizient und können somit 8-oxoG nicht ausreichend reparieren. Durch die zusätzliche Defizienz des CSB-Proteins ist die Reparatur der DNA-Schäden sogar noch weiter eingeschränkt (Abbildung 4-10).

Durch vorhergehende Arbeiten des Arbeitskreises ist mehrfach nachgewiesen worden, dass Csb^{-/-} Ogg1^{-/-} - Mäuse mit zunehmendem Alter endogene oxidativ gebildete DNA-Schäden akkumulieren (Osterod, et al. 2001, Fusser, et al. 2011). Deshalb stellen diese Tiere ein hervorragendes Modell dar, um mögliche protektive Effekte der SOD1 nachzuweisen. Außer protektiven Effekten ist es auch einfacher, mögliche durch SOD1 beeinflusste erhöhte Spiegel an DNA-Schäden zu messen, da diese aufgrund der Reparaturdefizienz nicht hinreichend repariert werden können. Die transgenen SOD-Mäuse mit C57BL/6J Hintergrund wurden im Zuge dieser Arbeit generiert, durch die Kreuzung des Csb^{-/-} Ogg1^{-/-} Mausstamms mit hSOD1 überexprimierenden Wildtyp-Tieren. Die jeweiligen Zuchtschritte werden in Abschnitt 3.1.8 näher erläutert. Csb^{+/-} Ogg1^{+/-} Mäuse dienen hierbei als Kontrolle für den möglichen Effekt von einem Doppelknock out von Csb^{-/-} Ogg1^{-/-}. Mäuse ohne hSOD1 Überexpression dienen als Kontrolle für den möglichen Effekt von hSOD1 in überproduzierenden Mäusen.

Das Körpergewicht als Parameter ist ein sehr sensibler Marker für schlechte Haltungsbedingungen und das allgemeine Befinden der Mäuse. Das Körpergewicht kann sich bei Tieren unter Stress innerhalb von Stunden reduzieren, wenn keine oder wenig Futteraufnahme stattfindet (ALAAS 2006) und sollte deshalb immer parallel zu den Versuchen gemessen werden. In Abbildung 4-1 ist das Körpergewicht der in den Experimenten verwendeten Tiere dargestellt. Es wird hier zwischen drei Altersstufen unterschieden: junge (6-7 Monate), mittelalte (12-15 Monate) und alte (17-21 Monate) Csb^{+/-} Ogg1^{+/-} und Csb^{-/-} Ogg1^{-/-} Tiere mit und ohne hSOD1 Überexpression. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Altersstufen oder dem Genotyp der 51

Tiere feststellen. Die Körpergewichte der $Csb^{-/-} Ogg1^{-/-}$ Tiere liegen analog der Dissertation von M. Fusser (2010) zwischen 25 und 40 g pro Tier. Die Gewichte von Weibchen liegen unwesentlich unter den Männchen (Daten nicht gezeigt). In allen Versuchen wurden beide Geschlechter verwendet. Diese Ergebnisse lassen sich durch eine Studie von Huang, et al. 2000 bestätigen, auch hier zeigte eine ubiquitäre Überexpression von humaner SOD1 in Mäusen keine Änderung des Körpergewichtes im Alter von 3 bis 23 Monaten.

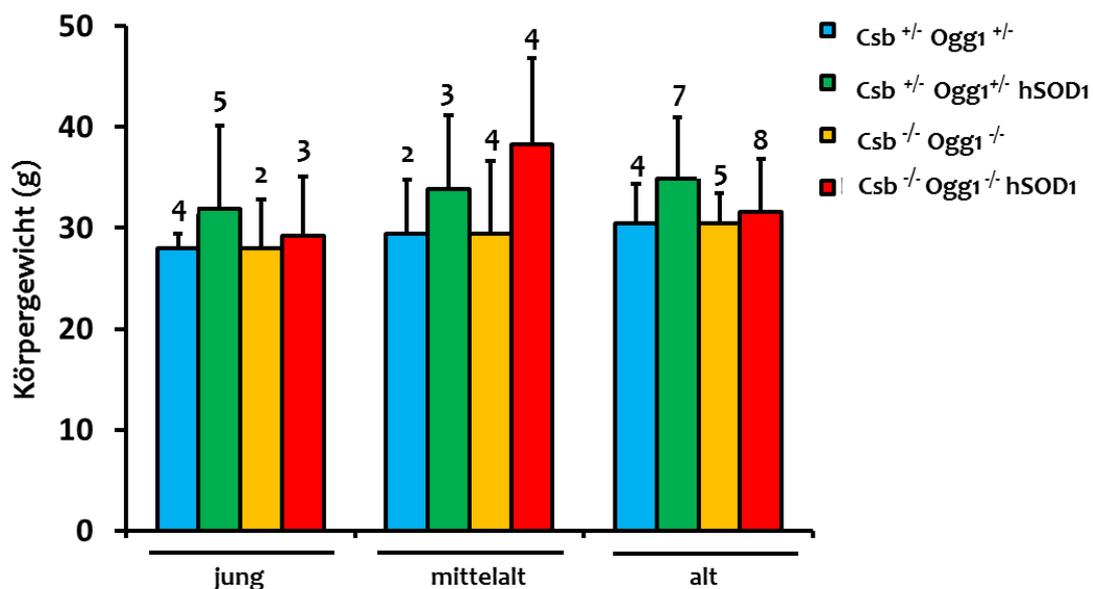


Abbildung 4-1: Körpergewicht von jungen (6-7 Monate), mittelalten (12-15 Monate) und alten (17-21 Monate) $Csb^{+/-} Ogg1^{+/-}$ und $Csb^{-/-} Ogg1^{+/-}$ Mäusen mit und ohne hSOD1 Überexpression. Anzahl der Tiere in jeder Gruppe sind als Zahlen über den Balken dargestellt. Mittelwerte \pm SD.

4.1.2 Einfluss von hSOD1 auf die DNA-Schäden in der Leber

4.1.2.1 Charakterisierung der hSOD1 überexprimierenden Mäuse - Leber

Im folgenden Abschnitt werden die in dieser Arbeit verwendeten Tiere charakterisiert. Hierbei wurden Organengewichte der Leber der drei Altersstufen unterschieden: junge (6-7 Monate), mittelalte (12-15 Monate) und alte (17-21 Monate) $Csb^{+/-} Ogg1^{+/-}$ und $Csb^{-/-} Ogg1^{+/-}$ Tiere mit und ohne hSOD1 Überexpression. Außerdem wurde das Ausmaß der hSOD1-Überproduktion auf Proteinebene und die Enzymaktivität der hSOD1 vermessen. Abschließend wurde die Vitalität der isolierten primären Hepatozyten nach der Leberperfusion (siehe Abschnitt 3.1.9.2) überprüft.

4.1.2.2 Einfluss der hSOD1 auf das Lebergewicht

Die Leber wurde in allen untersuchten Tieren vor der Isolierung der Hepatozyten hinsichtlich des Organgewichts untersucht, um mögliche Einflüsse der hSOD1 Überexpression auf das Lebergewicht zu erfassen. Trapp et al. konnten 2007 nachweisen, dass eine Leberzellproliferation durch Gabe eines Peroxisomenproliferators akkumulierte basale Spiegel an oxidativ gebildeten DNA Basenmodifikationen in *Csb*^{-/-} *Ogg1*^{-/-} Tieren senkt (Trapp, et al. 2007). Auch konnten Peters, et al. 2005 zeigen, dass das Lebergewicht ein sensibler Marker für eine erhöhte Zellproliferation ist.

In Abbildung 4-2 ist das Lebergewicht im Verhältnis zum Körpergewicht von den Tieren der verschiedenen Altersstufen und Genotypen dargestellt. Die Leber wurde nach der Leberperfusion direkt aus dem Tier entfernt und vor dem Resuspendieren und Vereinzeln der Zellen gewogen.

Es kann aus den Ergebnissen geschlussfolgert werden, dass das Lebergewicht weder durch das Alter der Tiere noch durch den Genotyp signifikant beeinflusst wird. Die Werte der 51 gemessenen Lebergewichte im Verhältnis zum Körpergewicht liegen hier bei $6,1\% \pm 0,8$. Diese Daten decken sich mit Daten aus der Dissertation von M. Fußer (Fußer 2010). Es kann zudem geschlossen werden, dass hSOD1 keinen Einfluss auf die Proliferation des Lebergewebes hat (siehe Abschnitt 4.1.2.7).

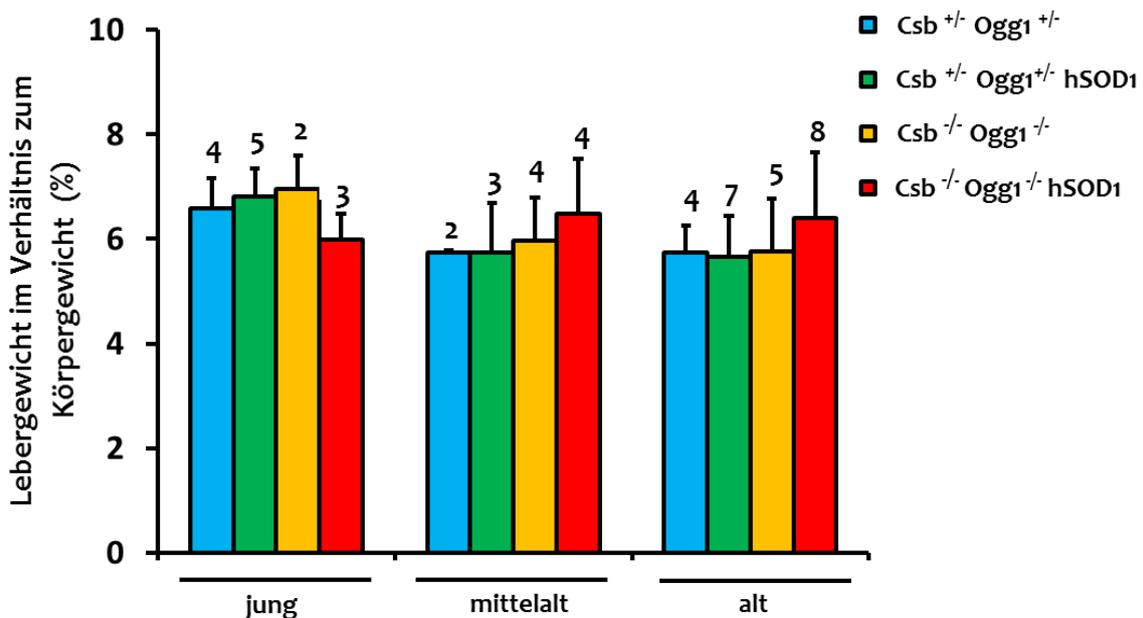


Abbildung 4-2: Lebergewicht im Verhältnis zum Körpergewicht von jungen (6-7 Monate), mittelalten (12-15 Monate) und alten (17-21 Monate) *Csb*^{+/-} *Ogg1*^{+/-} und *Csb*^{-/-} *Ogg1*^{-/-} Mäusen mit und ohne hSOD1 Überexpression. Anzahl der Tiere in jeder Gruppe sind als Zahlen über den Balken dargestellt. Mittelwerte \pm SD.

4.1.2.3 Nachweis der Protein-Überexpression der hSOD1 in der Leber

In einer nachfolgenden Untersuchung wurde das Ausmaß der Überexpression von SOD auf Proteinebene im Lebergewebe ermittelt. Hierzu wurden cytosolische Proteinlysate aus schockgefrorenem Lebergewebe hergestellt und ein Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen SOD1 durchgeführt (von Dr. Martina Liebl, Institut für Pathobiochemie der Universitätsmedizin Mainz). Der eingesetzte Antikörper ist nicht spezifisch gegen humanes SOD1 gerichtet, sondern erkennt auch die murine SOD1, sodass in Mäusen ohne eine Überexpression der endogene Spiegel an muriner SOD1 erkennbar ist (Abbildung 4-3 A). Die Überproduktion durch das hSOD1-Transgen ist hier deutlich sichtbar. Als Ladekontrolle diente hier Tubulin. In der quantitativen Auswertung (Abbildung 4-3 B) ergibt sich eine etwa 4fache Überproduktion von hSOD1 in *Csb*^{+/-} *Ogg1*^{+/-} und *Csb*^{-/-} *Ogg1*^{-/-} Tieren. Dieser Wert ist konsistent mit der hSOD1 - Enzym-Aktivitätsbestimmung (siehe Abschnitt 4.1.2.5) und den gemessenen mRNA - Spiegeln von hSOD1 (siehe Abschnitt 4.1.2.4) im Lebergewebe der entsprechenden Tiere.

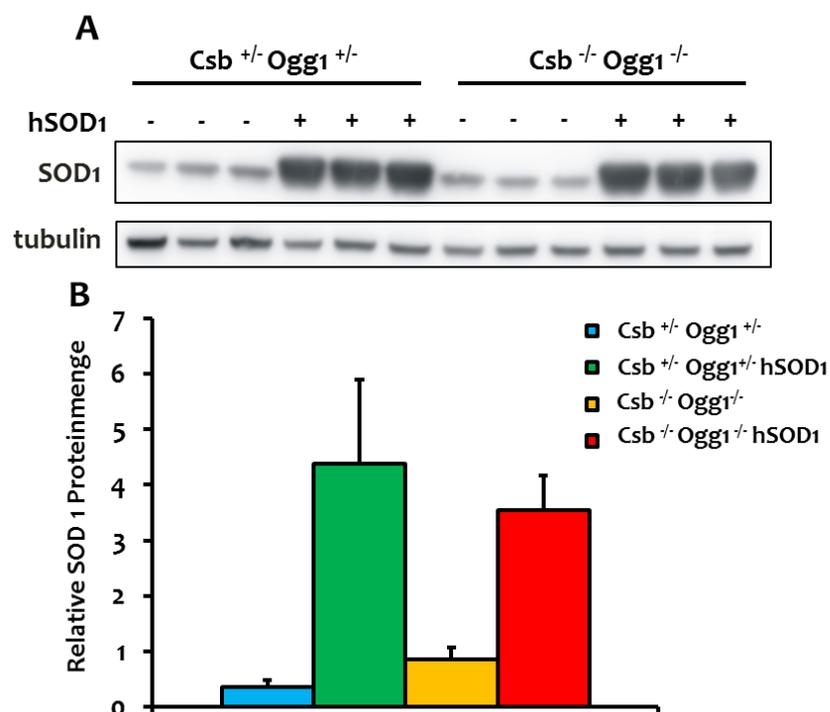


Abbildung 4-3: Proteinexpression von SOD1 aus Lysaten des Lebergewebes von *Csb*^{+/-} *Ogg1*^{+/-} und *Csb*^{-/-} *Ogg1*^{-/-} Mäusen mit und ohne hSOD1 Überexpression. n=3. A: SOD1-Proteinmengen wurden mittels Western Blot detektiert. Es wurden jeweils 5µg Gesamtprotein aufgetragen. Als Ladekontrolle diente Tubulin. B: Quantitative Auswertung der SOD1 - Proteinexpression. Es erfolgte eine quantitative Bandenanalyse mit der Software Image J 1.460. Es wurde relativ zu Tubulin normiert. Mittelwerte ± SD. (Durchgeführt von Dr. Martina Liebl, AK Behl, Institut für Pathobiochemie der Universitätsmedizin Mainz)

4.1.2.4 Nachweis der Genexpression der SOD1 in der Leber

Als zusätzliche Charakterisierung der Mausgenotypen wurde die Genexpression der SOD1 auf mRNA Ebene untersucht. Hierzu wurde eine qRT-PCR mit spezifischen Primern gegen SOD1 durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.5). Die eingesetzten Primer sind so konzipiert, dass sie die murine sowie die humane Form von SOD1 detektieren können. In Abbildung 4-4 ist zu sehen, dass die SOD1-mRNA Level ähnlich der Proteinexpression (siehe Abschnitt 4.1.2.3) und der SOD1 Aktivitätsbestimmung (siehe Abschnitt 4.1.2.5) bei Mäusen mit dem $Csb^{+/-} Ogg1^{+/-}$ hSOD1 und $Csb^{-/-} Ogg1^{-/-}$ hSOD1 Genotyp im Gegensatz zu den Kontrolltieren erhöht sind. Es ist in beiden Fällen eine etwa 3fache Überexpression zu erkennen, die erhöhten SOD1-Proteinmengen aus Abbildung 4-3 lassen sich also durch die Erhöhung der mRNA-Level erklären.

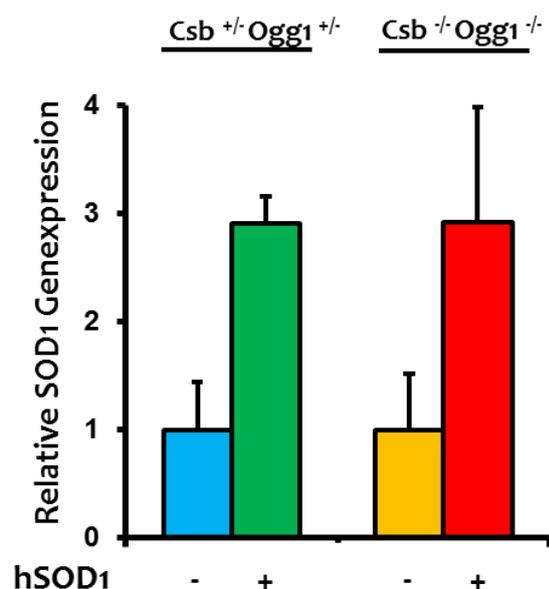


Abbildung 4-4: Genexpression von SOD1 im Lebergewebe von $Csb^{+/-} Ogg1^{+/-}$ und $Csb^{-/-} Ogg1^{-/-}$ Mäusen jeweils mit und ohne hSOD1 Überexpression. n=3. Alter der Tiere: 25-27 Monate. Für jeden Genotyp wurden jeweils 3 Mäuselebern verwendet. Pro Tier wurde die mittlere Expression jedes Gens relativ zu ACTb (beta Aktin) bestimmt und auf den Mittelwert der Kontrollmäuse normiert. Die Primer für SOD1 detektieren humane sowie murine SOD1 (siehe Abschnitt 3.2.5). Mittelwert \pm SD.

4.1.2.5 Aktivitätsbestimmung der hSOD1 in der Leber

Neben der Bestimmung der Proteinüberexpression wurde eine Aktivitätsbestimmung des SOD1-Enzyms durchgeführt, um sicherzugehen, dass das überproduzierende Enzym im Tier aktiv ist und die Dismutation von Superoxidradikalen zu

Wasserstoffperoxid katalysieren kann. Hierzu wurden cytosolische Proteinlysate aus schockgefrorenem Lebergewebe hergestellt und die Aktivität von SOD1 im Proteinlysate vermessen. Die Bestimmung der Enzymaktivität beruht auf der Konkurrenz von SOD1 und Xanthinoxidase (siehe Abschnitt 3.2.7). Auch hier ist wie in den vorhergehenden Abschnitten 4.1.2.3 und 4.1.2.4 eine etwa 4fache Erhöhung der Aktivität der *Csb*^{+/-} *Ogg1*^{+/-} hSOD1 und *Csb*^{-/-} *Ogg1*^{+/-} hSOD1 Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren zu erkennen (Abbildung 4-5).

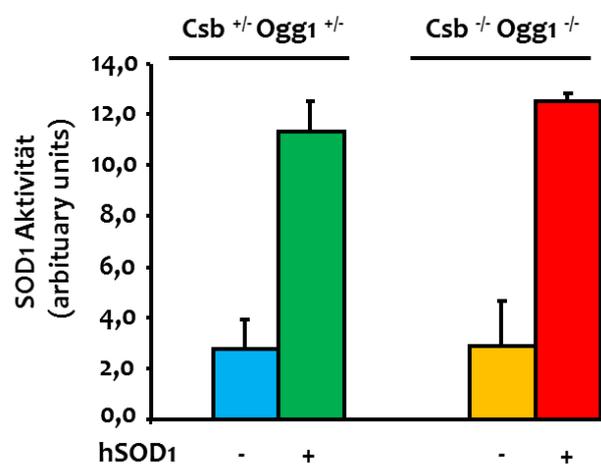


Abbildung 4-5: Enzym-Aktivitätsbestimmungen von SOD1 aus Lebergewebe von *Csb*^{+/-} *Ogg1*^{+/-} und *Csb*^{-/-} *Ogg1*^{+/-} Mäusen mit und ohne hSOD1 Überexpression. Die SOD1 Enzym-Aktivität wurde bestimmt aus zytosolischen Fraktionen aus schockgefrorenem murinem Lebergewebe (siehe Abschnitt 3.2.5) mithilfe des Dojindo SOD Assay Kits. Als SOD1 Aktivitätsstandard diente SOD1 aus humanen Erythrozyten. n=3. MW + SD. (Durchgeführt von Dr. Martina Liebl, AK Behl, Institut für Pathobiochemie der Universitätsmedizin Mainz)

4.1.2.6 Vitalitätsbestimmung von primär isolierten Hepatozyten

Es wurde beobachtet, dass die Anzahl an Einzelstrangbrüchen in isolierten Hepatozyten direkt mit der Vitalität dieser Zellen korreliert (Fußer 2010). Auch konnte durch den Einsatz von exogenem zugeführtem oxidativem Stress (Induktion von Einzelstrangbrüchen durch H₂O₂) gezeigt werden, dass die Vitalität der Zellen dosisabhängig mit steigender Anzahl an SSB sinkt (Fusser, et al. 2011). Daher ist es vor der Messung der DNA-Schäden in primär isolierten Hepatozyten nach der durchgeführten Leberperfusion notwendig, die Vitalität der Zellen zu bestimmen, da frisch isolierte Hepatozyten eine sehr empfindliche Zellpopulation darstellen. Die Zellvitalitätsbestimmung erfolgte vor dem Auftragen auf die Alkalische Elution mittels Trypanblauausschluss (siehe Abschnitt 3.2.2.6). Die durchschnittliche Vitalität der isolierten Hepatozyten aller 51 Tiere betrug 68 ± 9 % und ist nicht durch das Alter oder den Genotyp beeinflusst (siehe Abbildung 4-6 und Abschnitt 4.1.2.9).

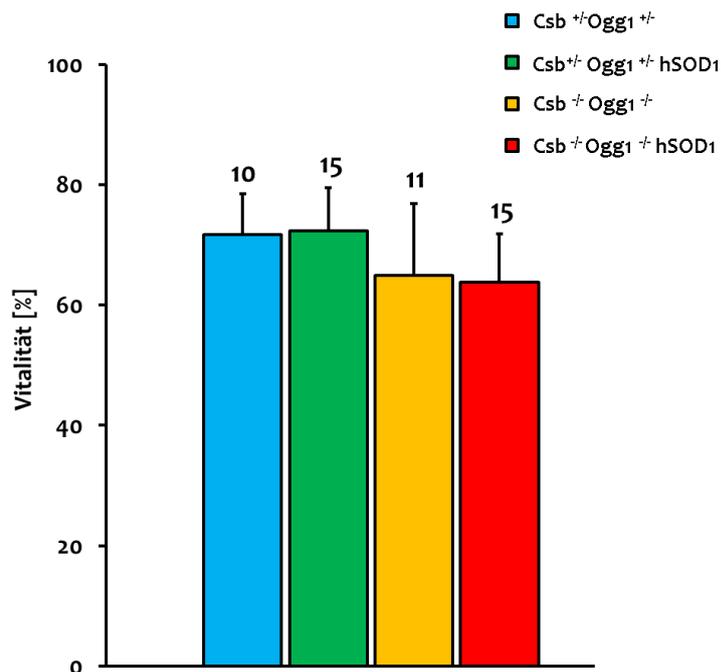


Abbildung 4-6: Vitalität der isolierten primären Hepatozyten von Csb^{+/+} Ogg1^{+/+} und Csb^{+/-} Ogg1^{+/-} Mäusen mit und ohne hSOD1 Überexpression. Die Vitalität wurde mittels der Trypan-Ausschluss Methode getestet unter der Annahme dass 100% Vitalität einer Zellsuspension ohne Trypanblau-Einschluss entspricht (siehe Abschnitt 3.2.2.6). Anzahl der Tiere in jeder Gruppe sind als Zahlen über den Balken dargestellt. Mittelwerte \pm SD.

4.1.2.7 Untersuchung der endogenen DNA-Schäden in primär isolierten Hepatozyten

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Experimente sollen den Einfluss einer Überproduktion von hSOD1 auf die basalen Spiegel von endogenen oxidativ gebildeten DNA-Schäden *in vivo* beleuchten. Endogen gebildete, basale Spiegel von DNA-Schäden werden stetig in der Zelle erzeugt und geben Aufschluss über die Bildung von Schäden, der Reparaturkapazität sowie der antioxidativen Abwehrmechanismen.

Da Csb^{+/-} Ogg1^{+/-} Tiere, da sie reparaturdefizient sind, oxidativ gebildete DNA-Schäden im Alter akkumulieren wurden diese für die Untersuchungen zur Rolle von hSOD1 in Bezug auf die Bildung oxidativer DNA-Schäden *in vivo* verwendet. Es wurden DNA-Schäden, genauer Einzelstrangbrüche (SSB) und Fpg-sensitive Modifikationen in frisch isolierten Hepatozyten in Csb^{+/+} Ogg1^{+/+} und Csb^{+/-} Ogg1^{+/-} Tieren mit und ohne hSOD1 Überexpression in verschiedenen Altersgruppen gemessen.

Einzelstrangbrüche (SSB)

Neben dem oft beschriebenen antioxidativen Effekt der Superoxiddismutase (SOD), gibt es viele Hinweise darauf, dass eine Überproduktion schwere Konsequenzen zur Folge haben kann. Es wurde gezeigt, dass erhöhte Spiegel an SOD toxische Effekte *in*

vivo auslösen kann (Midorikawa und Kawanishi 2001, Cabreiro, et al. 2011). Dies wird unter anderem mit der vermehrten Produktion von H_2O_2 erklärt. Durch die erhöhten Spiegel an hSOD1 in überexprimierenden Tieren, und die dadurch erhöhte Dismutation von Superoxidradikalen zu H_2O_2 , sind erhöhte Spiegel an SSB in den Lebern der entsprechenden Tiere möglich. Wasserstoffperoxid induziert SSBs und wird oft exogen zur Induktion von SSBs herangezogen.

Der Einfluss einer Überproduktion von hSOD1 auf die Basalspiegel von Einzelstrangbrüchen wurde in der Leber von $Csb^{+/-} Ogg1^{+/-}$ und $Csb^{-/-} Ogg1^{-/-}$ Mäusen untersucht. Die isolierten Hepatozyten wurden auf die Alkalische Elution aufgetragen und es wurden die endogenen Spiegel von SSB gemessen (Abbildung 4-7). Aufgetragen sind die SSB gegen die 3 verschiedenen Altersgruppen der Mäuse: jung, mittelalt und alt. Die Spiegel an Einzelstrangbrüchen sind in allen Tieren niedrig, sie liegen unter $0,50 \text{ SSB} / 10^6 \text{ bp}$. Der Wert entspricht historischen Daten unseres Arbeitskreises. Hepatozyten der $Csb^{+/-} Ogg1^{+/-}$ Mäuse mit und ohne hSOD1 zeigen etwas niedrigere Werte als die $Csb^{-/-} Ogg1^{-/-}$ Mäuse mit und ohne hSOD1, dies ist jedoch nicht signifikant. Auch scheinen die älteren Doppel-knock-out Tiere mit und ohne hSOD1 leicht erhöhte SSBs in den primären Hepatozyten zu besitzen, im Vergleich mit den mittelalten oder alten Tieren. Auch hier ist die Abweichung statistisch nicht signifikant. Die Ergebnisse zeigen keine signifikant erhöhten Spiegel an SSB in hSOD1 überexprimierenden Tieren.

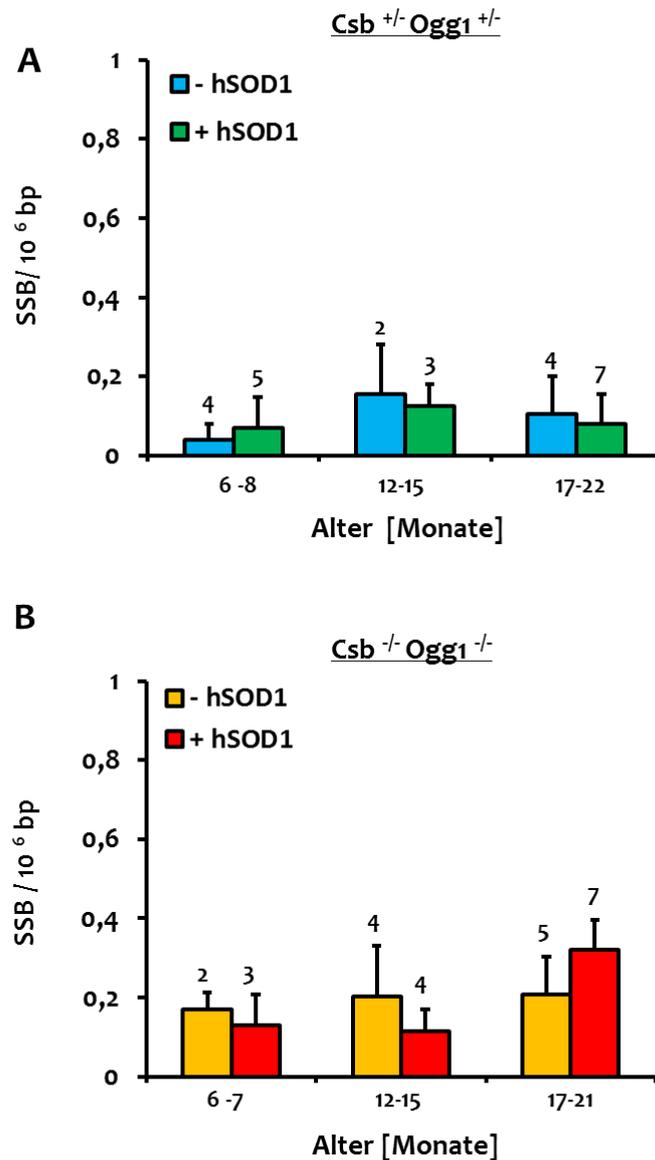


Abbildung 4-7: Einzelstrangbrüche (SSB) in isolierten primären Hepatozyten von jungen (6-8 Monate), mittelalten (12-15 Monate) und alten (17-22 Monate) *Csb*^{+/-} *Ogg1*^{+/-} (A) und *Csb*^{-/-} *Ogg1*^{-/-} (B) Mäusen mit und ohne hSOD1 Überexpression. Die Einzelstrangbrüche der jungen Tiere wurden mit Hilfe der langsamen Alkalischen Elution und die mittelalten bis alten Tiere wurden mit der schnellen Alkalischen Elution quantifiziert. Die Anzahl der Tiere in jeder Gruppe sind als Zahlen über den Balken dargestellt. Mittelwerte \pm SD.

Fpg-sensitive Modifikationen

Die Ergebnisse der Messungen der Einzelstrangbrüche zeigten, dass die Erhöhung der hSOD1 Expression in den Mäusen nicht zu einer signifikanten, durch vermehrte Bildung von H₂O₂ verursachten DNA-Schädigung führt. Wegen ihrer schnellen und effektiven Reparatur sind Einzelstrangbrüche als Indikatoren von chronischem oxidativen Stress an der DNA vermutlich wenig sensitiv. Geeigneter sind womöglich Basenmodifikationen wie 8-oxoG. Es ist bereits bekannt, dass *Csb*^{-/-} *Ogg1*^{-/-} defiziente Tiere im Alter messbar 8-oxoG akkumulieren (Osterod 2002). Neben der Messung der

Einzelstrangbrüche wurden deshalb als weitere Art oxidativ gebildeter DNA Schäden Fpg-sensitive Modifikationen untersucht. Das bakterielle Enzym Fpg (Formamido-Pyrimidin-Glykosylase) ist ein funktionelles Homolog des Ogg1 Enzyms und übt die gleiche Funktion wie Ogg1 aus (Boiteux, et al. 1987). Fpg wurde hier für die Messung von 8-oxoG mittels der Alkalischen Elution eingesetzt (zur Methode: siehe Abschnitt 3.2.3). Die Ergebnisse der Untersuchung sind in Abbildung 4-8 zunächst für reparaturkompetente Tiere dargestellt. Aus den Messungen ergibt sich ein deutlicher Einfluss der hSOD1 auf die Basalspiegel in den primären Hepatozyten der Tiere. Zunächst ist in Abbildung 4-8 A zu erkennen, dass die heterozygoten $Csb^{+/-} Ogg1^{+/-}$ - Mäuse alle relativ niedrige Spiegel an Fpg-sensitiven Modifikationen haben, diese liegen nicht höher als 0,40 Läsionen/ 10^6 bp. Auch diese Spiegel sind im Einklang mit historischen Daten des Arbeitskreises, hier sind in Abbildung 4-8 B homozygote $Csb^{+/+} Ogg1^{+/+}$ Tiere mit aufgetragen. Bei den alten (17-22 Monate) $Csb^{+/-} Ogg1^{+/-}$ - Mäusen mit hSOD1 Überexpression ist ein signifikant niedrigerer Spiegel an Läsionen im Vergleich zu den Tieren ohne hSOD1 festzustellen. Bei den jungen Tieren ist kein Einfluss zu erkennen.

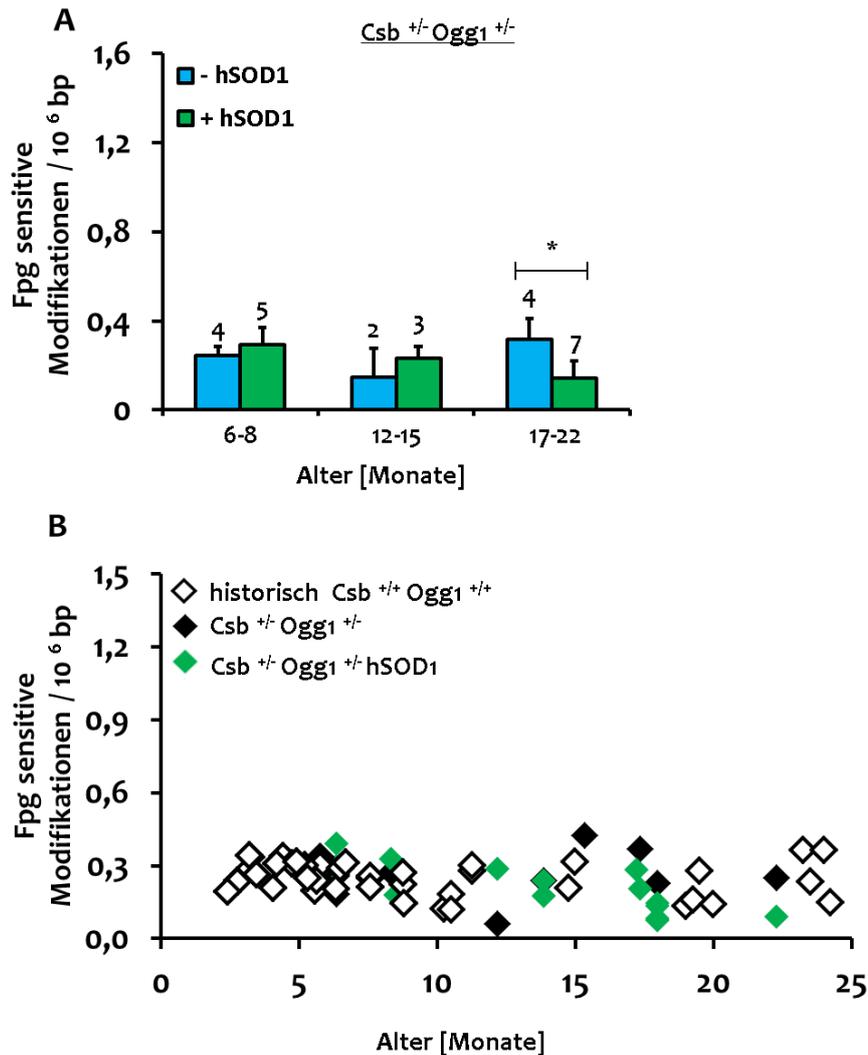


Abbildung 4-8: Fpg-sensitive Modifikationen in reparatur-kompetenten primären Hepatozyten

A: Fpg-sensitive Modifikationen der jungen (6-8 Monate), mittelalten (12-15 Monate) und alten (17-22 Monate) *Cs b*^{+/-} *Ogg1*^{+/-} Mäuse mit und ohne hSOD1 Überexpression. Die Tiere wurden mit Hilfe der langsamen Alkalischen Elution und die mittelalten bis alten Tiere mit der schnellen Alkalischen Elution quantifiziert. Die Anzahl der Tiere in jeder Gruppe sind als Zahlen über den Balken dargestellt. Die Signifikanz (* $p < 0,05$) wurde mit einem zweiseitigen T-Test mit Welchkorrektur berechnet. Mittelwerte \pm SD. **B:** Zusammenstellung der Fpg-sensitiven Modifikationen in Abhängigkeit des Alters der *Cs b*^{+/-} *Ogg1*^{+/-} Mäuse mit und ohne hSOD1 Überexpression sowie von *Cs b*^{+/+} *Ogg1*^{+/+} Tieren. Hierbei stellt jeder Punkt das Ergebnis eines Tieres dar. Die Daten „historisch *Cs b*^{+/+} *Ogg1*^{+/+}“ stammen aus den Versuchen ehemaliger Mitarbeiter des Arbeitskreises (M.Osterod, C.Trapp und M. Fusser).

Unter Vergleich zu den historischen Daten des Arbeitskreises ist deutlich, dass ein funktionierendes Allel (für *Cs b* und *Ogg1*) ausreicht, damit die Spiegel an Fpg-sensitiven Modifikationen mit dem Alter der Tiere gleichbleibend niedrig bleiben und nicht akkumulieren (Abbildung 4-8 B). Eine Erhöhung der Schäden mit zunehmendem Lebensalter ist hier in den Wildtyp-Tieren nicht zu beobachten.

Abbildung 4-9 zeigt die Ergebnisse der Messung der Fpg-sensitiven Läsionen in den Hepatozyten der reparaturdefizienten Doppelknock-out Tiere. Zunächst ist klar zu erkennen, dass alle Tiere mit zunehmendem Alter höhere Basalspiegel an Schäden entwickeln als die *Csb*^{-/-} *Ogg1*^{-/-} Tiere.

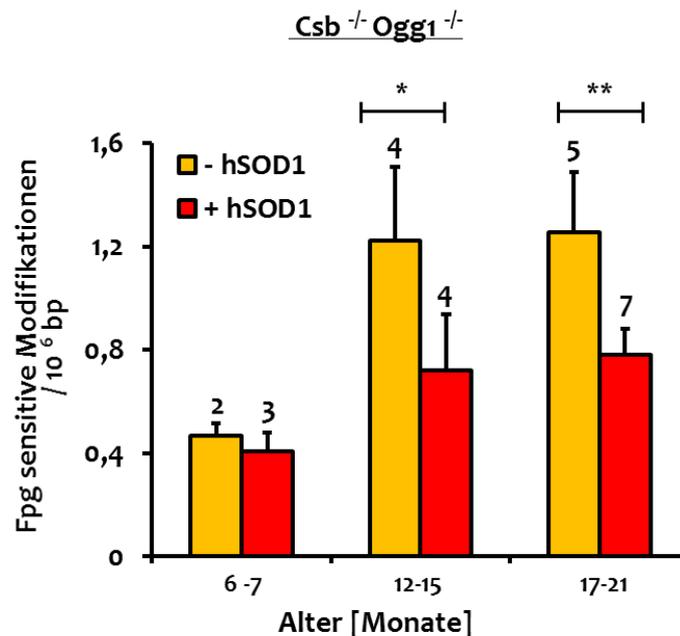


Abbildung 4-9: Fpg-sensitive Modifikationen in reparatur-defizienten primären Hepatozyten von jungen (6-7 Monate), mittelalten (12-15 Monate) und alten (17-21 Monate) *Csb*^{-/-} *Ogg1*^{-/-} Mäusen mit und ohne hSOD1 Überexpression. Die Fpg-sensitiven Modifikationen der jungen Tiere wurden mit Hilfe der langsamen Alkalischen Elution und die mittelalten bis alten Tiere wurden mit der schnellen Alkalischen Elution quantifiziert. Die Anzahl der Tiere in jeder Gruppe sind als Zahlen über den Balken dargestellt. Die Signifikanz (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,001$) wurde mit einem zweiseitigen T-Test mit Welchkorrektur berechnet. Mittelwerte \pm SD.

Vergleicht man nun die reparaturdefizienten Tiere mit und ohne hSOD1 Überexpression, so ist eindeutig ein signifikanter Unterschied der Basalspiegel zu erkennen in mittelalten und alten Tieren (Abbildung 4-9). Die Überproduktion der hSOD1 in den *Csb*^{-/-} *Ogg1*^{-/-} Mäusen verhindert also klar die Akkumulation der oxidativen Schäden in der Leber mit fortschreitendem Alter der Tiere. Die Spiegel sind um ein Drittel reduziert.

Es ist außerdem zu erkennen, dass die Akkumulation im Zeitraum von 12 Monaten und 21 Monaten zwischen 1,20 und 1,50 Fpg-sensitiven Modifikationen pro Million Basenpaare liegt und sich diese Spiegel bei älteren Tieren nicht noch weiter erhöhen. Auch dies deckt sich mit historischen Daten des Arbeitskreises, die in Abbildung 4-10 mit dargestellt sind. Hier stellen die Einzelpunkte jeweils das Ergebnis einer Messung

von Fpg-sensitiven Modifikationen aus Hepatozyten verschiedener Genotypen dar. Mit dieser Darstellung ist der Effekt der hSOD1 klar sichtbar.

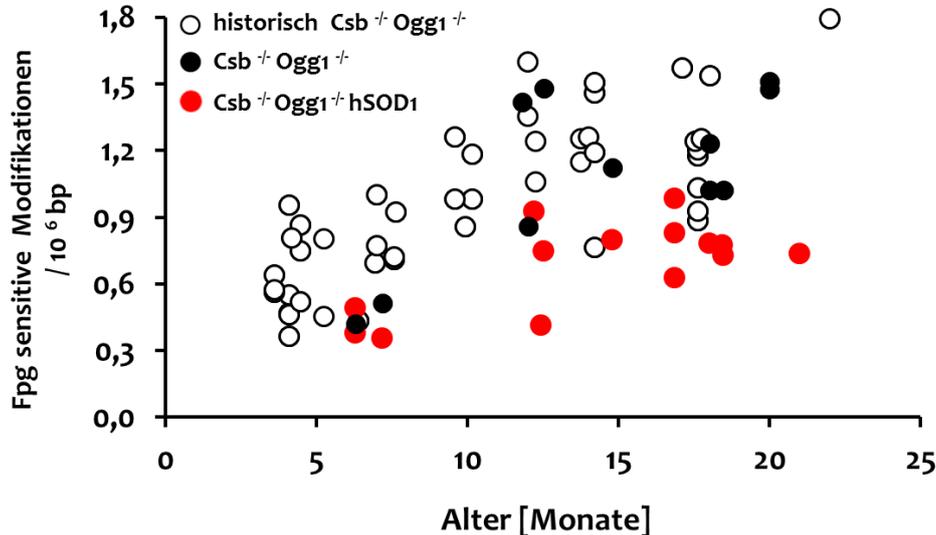


Abbildung 4-10: Zusammenstellung der Fpg-sensitiven Modifikationen in isolierten primären Hepatozyten von $Csb^{-/-} Ogg1^{-/-}$ Mäusen mit und ohne hSOD1 Überexpression in Abhängigkeit des Alters der Tiere. Die Fpg-sensitiven Modifikationen wurden mit Hilfe der Alkalischen Elution gemessen. Hierbei stellt jeder Punkt das Ergebnis eines Tieres dar. Die Daten „historisch $Csb^{-/-} Ogg1^{-/-}$ “ wurden aus den Versuchen eigener und ehemaliger Mitarbeiter des Arbeitskreises zusammengestellt (Dissertationen von Osterod (2002), Trapp (2006) und Fußer (2010)).

4.1.2.8 Vergleich zwischen der Vitalität und den gemessenen DNA-Schäden bei den Hepatozyten

Es ist bekannt, dass die Apoptose von Zellen mit einer Bildung von DNA-Strangbrüchen verbunden ist. So ist eine niedrige Vitalität der Hepatozyten nach der Isolation signifikant korreliert mit der Anzahl an DNA-Einzelstrangbrüchen (Fußer 2010). Um bei der Messung der DNA-Schäden Artefakte aufgrund niedriger Zellvitalität zu vermeiden, wurde diese bei jedem Versuch parallel bestimmt. In Abbildung 4-11 und Abbildung 4-12 ist die Vitalität der primär isolierten Hepatozyten gegen die Werte der gemessenen DNA-Schäden jedes einzelnen Tieres aufgetragen. Die Daten lassen keine Korrelation zwischen der Vitalität und den gemessenen Schäden erkennen. Insbesondere wird in Abbildung 4-12 B sehr deutlich, dass sich die SOD-Überproduktion in den $Csb^{-/-} Ogg1^{-/-} hSOD1$ Mäusen nur auf die basalen Spiegel der oxidativ gebildeten Basenmodifikationen, nicht aber auf die Vitalität der Zellen auswirkt.

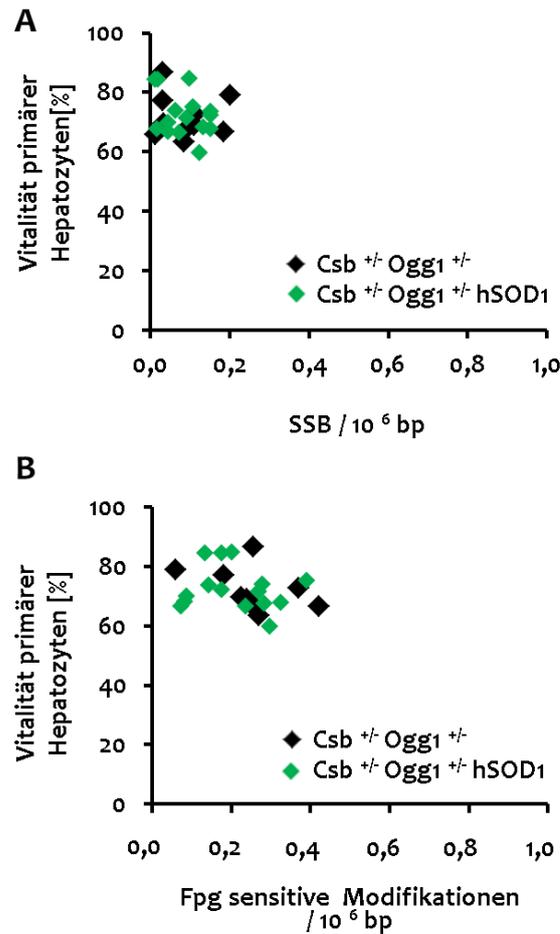


Abbildung 4-11: Vitalität der isolierten primären Hepatozyten von $Csb^{+/-} Ogg1^{+/-}$ Mäusen mit und ohne hSOD1 Überexpression in Abhängigkeit mit den gemessenen A: Einzelstrangbrüchen und B: Fpg-sensitiven Modifikationen. Die Vitalität wurde mittels der Trypan- Ausschluss Methode getestet unter der Annahme, dass 100% Vitalität einer Zellsuspension ohne Trypanblau-Einschluss entspricht (siehe Abschnitt 3.2.2.6). Die Fpg-sensitiven Modifikationen wurden mit der Alkalischen Elution gemessen.

Somit zeigen diese Ergebnisse, dass die erhöhten Werte der oxidativen Schäden in Abbildung 4-9 nicht durch verringerte Vitalität der Zellen erklärt werden kann. Es ist deutlich, dass die Vitalität der Zellen unabhängig von der Höhe der DNA-Schäden und des Genotyps ist.

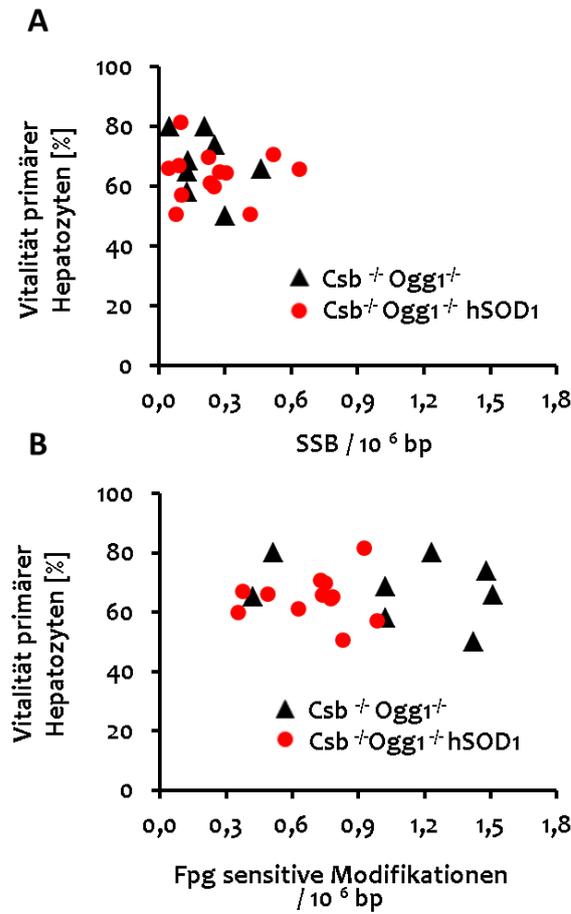


Abbildung 4-12: Vitalität der isolierten primären Hepatozyten von Csb^{-/-} Ogg1^{-/-} Mäusen mit und ohne hSOD1 Überexpression in Abhängigkeit mit den gemessenen A: Einzelstrangbrüchen und B: Fpg-sensitiven Modifikationen. Die Vitalität wurde mittels der Trypan- Ausschluss Methode getestet unter der Annahme dass 100% Vitalität einer Zellsuspension ohne Trypanblau-Einschluss entspricht (siehe Abschnitt 3.2.2.6). Die Fpg-sensitiven Modifikationen wurden mit der Alkalischen Elution gemessen.

4.1.2.9 Vergleich der Vitalität und dem Alter der Tiere

Die Abbildung 4-13 zeigt die Vitalität der untersuchten primär isolierten Hepatozyten im Zusammenhang mit dem Alter jedes einzelnen Tieres. Es ist klar zu erkennen, dass die Vitalität der Zellen weder durch das Alter der Tiere noch durch den Genotyp beeinflusst wird. Auch bei alten Tieren liegen die Vitalitäten der Hepatozyten wie bei jungen Tieren im gleichen Bereich, zwischen 50-80 %.

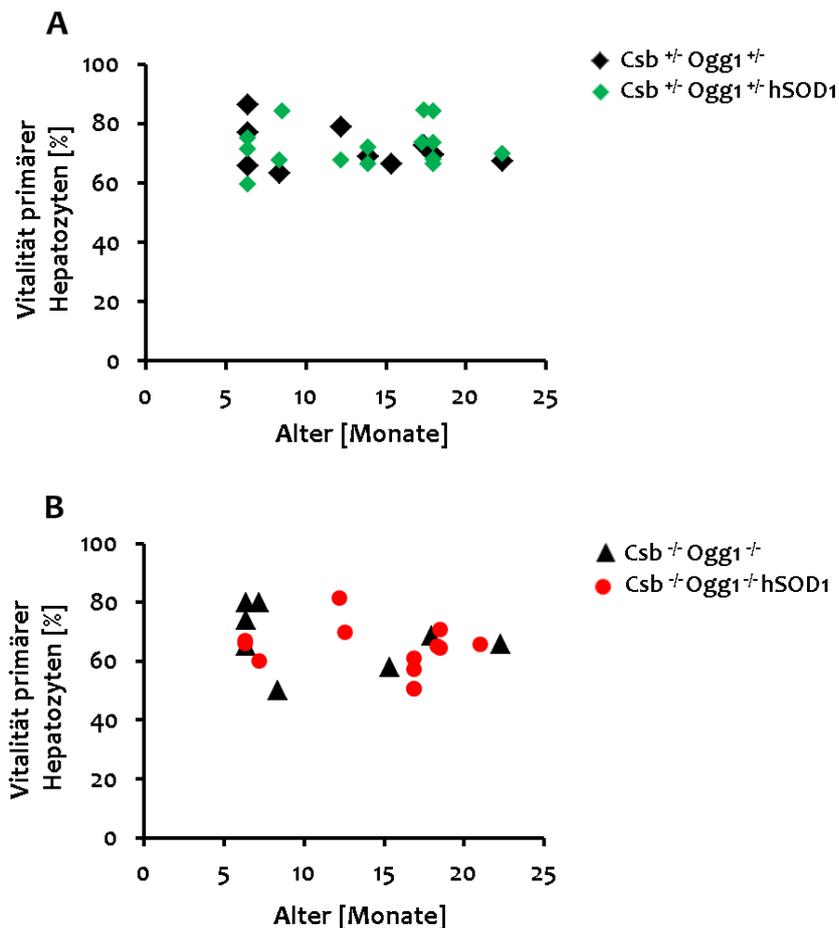


Abbildung 4-13: Vitalität der isolierten primären Hepatozyten von $Csb^{+/-} Ogg1^{+/-}$ und $Csb^{+/-} Ogg1^{+/-}$ Mäusen mit und ohne hSOD1 Überexpression in Abhängigkeit mit dem Alter der Tiere. Die Vitalität wurde mittels der Trypan- Ausschluss Methode getestet unter der Annahme, dass 100% Vitalität einer Zellsuspension ohne Trypanblau-Einschluss entspricht (siehe Abschnitt 3.2.2.6).

4.1.3 Einfluss von hSOD1 auf die DNA-Schäden in der Niere

Neben der Leber sollten noch weitere Organe hinsichtlich des Effektes einer hSOD1 Überexpression auf die Basalspiegel an DNA-Schäden untersucht werden. In frisch isolierten Hepatozyten von mittelalten $Csb^{+/-} Ogg1^{+/-}$ Tieren wurde ein klarer Effekt von hSOD1 auf die Basalspiegel von Fpg-sensitiven Modifikationen in Hepatozyten ermittelt (siehe Abschnitt 4.1.2.7). Aus diesem Grund wurden Fpg-sensitive Modifikationen in Nierenzellen von $Csb^{+/-} Ogg1^{+/-}$ junger (6 - 7 Monate) und mittelalter (11 - 17 Monate) Tiere mithilfe der Alkalischen Elution gemessen.

4.1.3.1 Einfluss der hSOD1 auf das Nierengewicht

Auch hier wurde analog zur Leber (siehe Abschnitt 4.1.2.2) vor der Isolation der Nierenzellen das Organgewicht untersucht, um mögliche Einflüsse der hSOD1

Überexpression auf das Nierengewicht zu erfassen. In Abbildung 4-14 wurde das Nierengewicht im Verhältnis zum Körpergewicht gemessen. Die Tiere wurden in zwei Altersgruppen eingeteilt: junge Tiere (6-7 Monate) und mittelalte Tiere (11-17 Monate). Die Ergebnisse zeigen, dass das Nierengewicht nicht durch das Alter der Tiere oder durch den Genotyp beeinflusst wird. Die Werte der 14 gemessenen Nierengewichte im Verhältnis zum Körpergewicht liegen im Mittel bei $1,42\% \pm 0,33$. Diese Daten decken sich mit Daten aus unserem Arbeitskreis (Krimm 2014). Es kann zudem geschlossen werden, dass der Einfluss der hSOD1 auf die gemessenen endogenen oxidativen Basalspiegel von 8-oxoG (siehe Abschnitt 4.1.3.5) nicht durch einen einfachen Proliferationseffekt des Nierengewebes zu erklären ist.

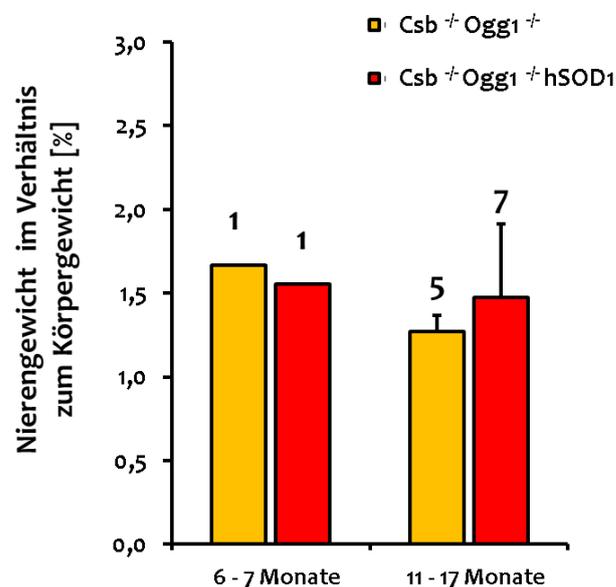


Abbildung 4-14: Nierengewicht im Verhältnis zum Körpergewicht von Csb^{+/-} Ogg1^{+/-} und Csb^{+/-} Ogg1^{+/-} Mäusen mit und ohne hSOD1 Überexpression. Anzahl der Tiere in jeder Gruppe sind als Zahlen über den Balken dargestellt. Mittelwerte \pm SD.

4.1.3.2 Nachweis der Protein-Überexpression der hSOD1 in der Niere

Es sollte vor der Messung der DNA-Schäden mittels Alkalischer Elution auch hier das Ausmaß der Überproduktion der hSOD1 in der Niere gemessen werden. Hierzu wurden cytosolische Proteinlysate aus schockgefrorenem Nierengewebe hergestellt und ein Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen SOD1 durchgeführt (von Dr. Martina Liebl, Institut für Pathobiochemie der Universitätsmedizin Mainz). Wie bei der Analyse des Lebergewebes (siehe Abschnitt 4.1.2.3) ist der eingesetzte Antikörper nicht spezifisch gegen humanes SOD1 gerichtet. Es ist auch die murine SOD1 zu erkennen, so dass in Mäusen ohne eine Überexpression der endogene Spiegel an murinem SOD1 detektiert wird (siehe Abbildung 4-15 A). Auch hier ist die Überproduktion durch das

hSOD1-Transgen deutlich sichtbar. Als Ladekontrolle diente hier Tubulin. In der quantitativen Auswertung (siehe Abbildung 4-15 B) ergibt sich eine etwa 3fache Überproduktion von hSOD1 in *Csb*^{+/-} *Ogg1*^{+/-} und *Csb*^{-/-} *Ogg1*^{-/-} Tieren. Dieser Wert ist konsistent mit der hSOD1 - Enzym-Aktivitätsbestimmung (siehe Abschnitt 4.1.3.3) in der Niere.

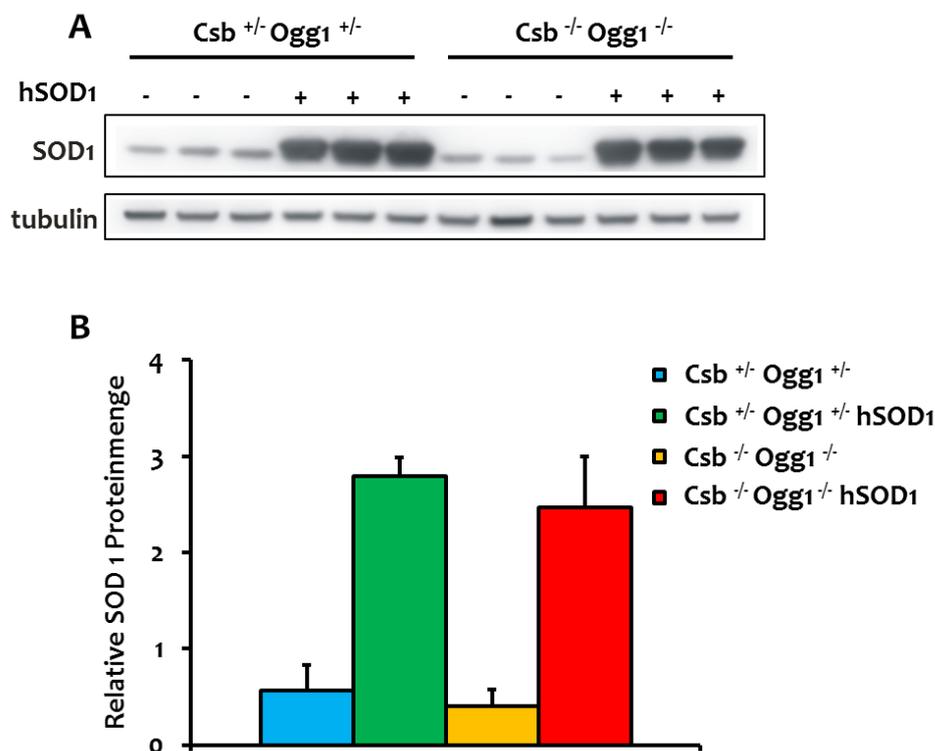


Abbildung 4-15: Proteinexpression von SOD1 aus Lysaten des Nierengewebes von *Csb*^{+/-} *Ogg1*^{+/-} und *Csb*^{-/-} *Ogg1*^{-/-} Mäusen mit und ohne hSOD1 Überexpression. n=3. A: SOD1-Proteinmengen wurden mittels Western Blot detektiert. Es wurden jeweils 5µg Gesamtprotein aufgetragen. Als Ladekontrolle diente Tubulin. B: Quantitative Auswertung der SOD1- Proteinexpression. Es erfolgte eine quantitative Bandenanalyse mit der Software Image J 1.46o. Es wurde relativ zu Tubulin normiert. MW + SD.

4.1.3.3 Aktivitätsbestimmung der hSOD1 in der Niere

Nach der Bestimmung der Proteinüberexpression im Nierengewebe wurde im Folgenden die Aktivität des SOD1-Enzyms bestimmt um sicherzustellen, dass das überproduzierende Enzym im Tier aktiv ist und die Dismutation von Superoxidradikalen zu Wasserstoffperoxid katalysieren kann. Hierzu wurden cytosolische Proteinlysate aus schockgefrorenem Nierengewebe hergestellt und die Aktivität von SOD1 im Proteinlysat vermessen. Die Bestimmung der Enzymaktivität beruht auf der Konkurrenz von SOD1 und Xanthinoxidase (siehe Abschnitt 3.2.7). Es wurde eine 4-5 fach erhöhte Aktivität an SOD1 in *Csb*^{+/-} *Ogg1*^{+/-} hSOD1 und *Csb*^{-/-} *Ogg1*^{-/-} hSOD1 Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren detektiert (siehe

Abbildung 4-16).

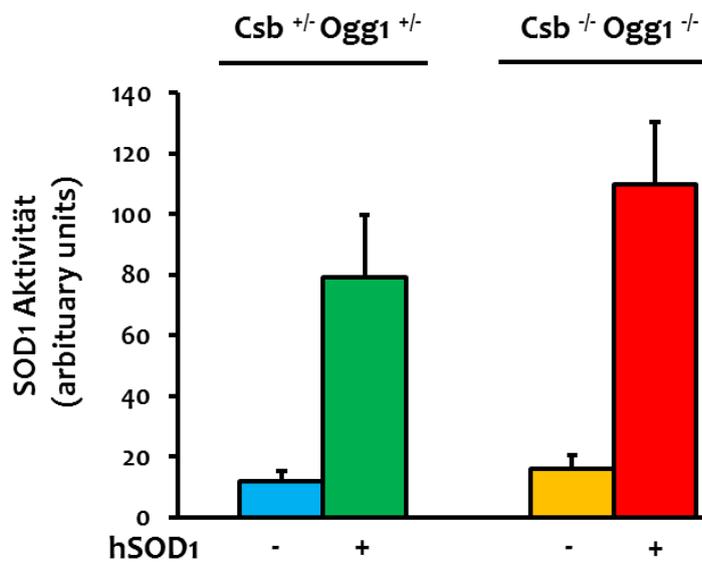


Abbildung 4-16: Enzym-Aktivitätsbestimmungen von SOD1 aus Nierengewebe von $Csb^{+/-} Ogg1^{+/-}$ und $Csb^{-/-} Ogg1^{-/-}$ Mäusen mit und ohne hSOD1 Überexpression. Die SOD1 Enzym-Aktivität wurde bestimmt aus zytosolischen Fraktionen aus schockgefrorenem murinem Nierengewebe (siehe Abschnitt 3.2.7) mithilfe des Dojindo SOD Assay Kits. Als SOD1 Aktivitätsstandard diente SOD1 aus humanen Erythrozyten. $n=3$. MW + SD.

4.1.3.4 Vitalitätsbestimmung von isolierten Nierenzellen

Wie schon in Abschnitt 4.1.2.6 dargestellt, ist die Messung der Vitalität der Zellen vor der Analyse der DNA-Schäden mit der Alkalischen Elution sehr wichtig. Die Zellvitalitätsbestimmung erfolgte vor dem Auftragen auf die Alkalische Elution mittels Trypanblauausschluss (siehe Abschnitt 3.2.2.6). Die durchschnittliche Vitalität der isolierten Nierenzellen aller 14 Tiere beträgt $68 \pm 9 \%$ (siehe Abbildung 4-17) und ist nicht durch das Alter oder den Genotyp beeinflusst.

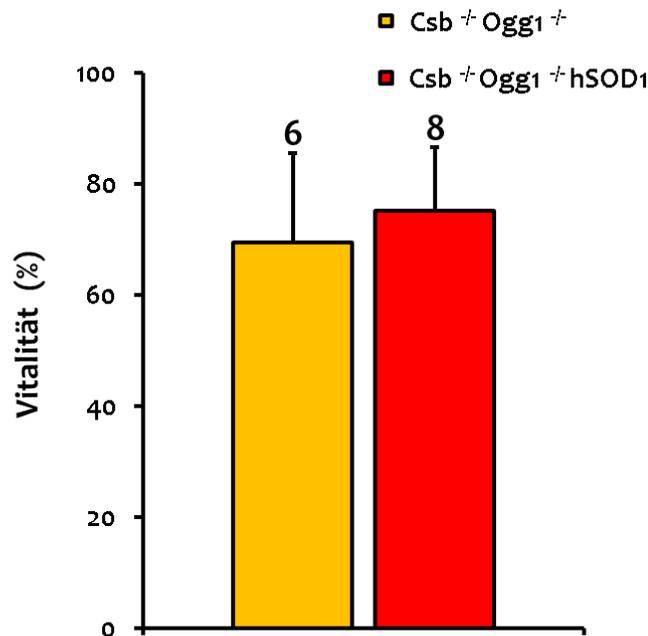


Abbildung 4-17: Vitalität der isolierten primären Nierenzellen von Csb^{+/-} Ogg1^{+/-} und Csb^{+/-} Ogg1^{+/-} Mäusen mit und ohne hSOD1 Überexpression. Die Vitalität wurde mittels der Trypan - Ausschluss Methode getestet unter der Annahme, dass 100% Vitalität einer Zellsuspension ohne Trypanblau-Einschluss entspricht (siehe Abschnitt 3.2.2.6). Anzahl der Tiere in jeder Gruppe sind als Zahlen über den Balken dargestellt. Mittelwerte ± SD.

4.1.3.5 Untersuchung der endogenen DNA-Schäden in primär isolierten Nierenzellen

Der Einfluss einer Überproduktion von hSOD1 auf die Basalspiegel von DNA-Schäden wurde in der Niere von Csb^{+/-} Ogg1^{+/-} und Csb^{+/-} Ogg1^{+/-} Mäusen untersucht. Die isolierten Nierenzellen wurden auf die Alkalische Elution aufgetragen und es wurden die endogenen Spiegel von Einzelstrangbrüchen (SSB) (Abbildung 4-18) und Fpg-sensitiven Läsionen (Abbildung 4-19) gemessen. Aufgetragen sind jeweils die DNA-Schäden (SSB oder Fpg-sensitive Modifikationen) gegen die beiden Altersgruppen der Mäuse: jung (6-7 Monate) und mittelalt (11-17 Monate).

Einzelstrangbrüche (SSB)

Durch die erhöhten Spiegel an hSOD1 in überexprimierenden Tieren, und die dadurch erhöhte Dismutation von Superoxidradikalen zu H₂O₂ wären möglicherweise erhöhte Spiegel an SSB der entsprechenden Tiere zu erwarten.

Die Spiegel an Einzelstrangbrüchen sind in den jungen Tieren niedrig. Die Werte liegen bei 0,13 - 0,24 SSB/ 10⁶bp. Die Werte der älteren Tiere liegen deutlich höher: bei durchschnittlich 0,75 SSB/ 10⁶bp in den Csb^{+/-} Ogg1^{+/-} Mäusen und im Mittel bei 0,58 SSB/ 10⁶bp in Csb^{+/-} Ogg1^{+/-} Mäusen mit einer hSOD1 Überexpression. Daten aus der Dissertation von (Krimm 2014), zeigen 0,4 SSB/ 10⁶bp in Wildtyp und Ogg1^{+/-} Tieren.

Hier ist keine Signifikanz zwischen den Genotypen der mittelalten Tiere sichtbar. Erhöhte Spiegel an SSB in hSOD1 überexprimierenden Tieren ist wie beschrieben, hier nicht zu erkennen.

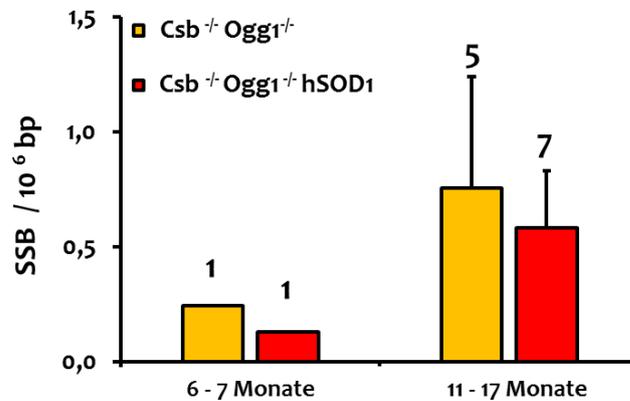


Abbildung 4-18: Einzelstrangbrüche (SSB) in isolierten primären Nierenzellen von jungen (6-7 Monate) und mittelalten (11-17 Monate) Csb^{-/-} Ogg1^{-/-} Mäusen mit und ohne hSOD1 Überexpression. Die Einzelstrangbrüche wurden mit Hilfe der schnellen Alkalischen Elution quantifiziert. Die Anzahl der Tiere in jeder Gruppe sind als Zahlen über den Balken dargestellt. Mittelwerte \pm SD

Fpg-sensitive Modifikationen

In den primären isolierten Hepatozyten war ein signifikanter Unterschied zwischen den endogenen Fpg-sensitiven Modifikationen in Csb^{-/-} Ogg1^{-/-} hSOD1 Mäusen und Csb^{-/-} Ogg1^{-/-} Tieren zu erkennen (Abbildung 4-9). hSOD1 verhindert hier klar die Anhäufung der oxidativen Schäden in der Leber mit fortschreitendem Alter der Tiere. Da der Effekt schon bei mittelalten Tieren deutlich wurde, wurden für die Messungen in der Niere mittelalte und junge Csb^{-/-} Ogg1^{-/-} Tiere mit und ohne hSOD1 gemessen.

Vergleicht man nun die reparaturdefizienten Tiere untereinander mit und ohne hSOD1 Überexpression, so ist ein signifikanter Unterschied der Basalspiegel in den Nierenzellen mittelalter Tieren zu erkennen (siehe Abbildung 4-19). Junge Tiere haben einen niedrigen Spiegel an Fpg-sensitiven Läsionen: Die Werte liegen bei 0,32 und 0,39 Läsionen/ 10⁶bp. Die 11-17 Monate alten Tiere zeigen Werte von 1,53 Läsionen/ 10⁶bp in Csb^{-/-} Ogg1^{-/-} Mäusen und 0,52 Läsionen/ 10⁶bp in Csb^{-/-} Ogg1^{-/-} Mäusen mit hSOD1. Auch hier, wie in der Leber unterscheiden sich die Werte um das 3fache.

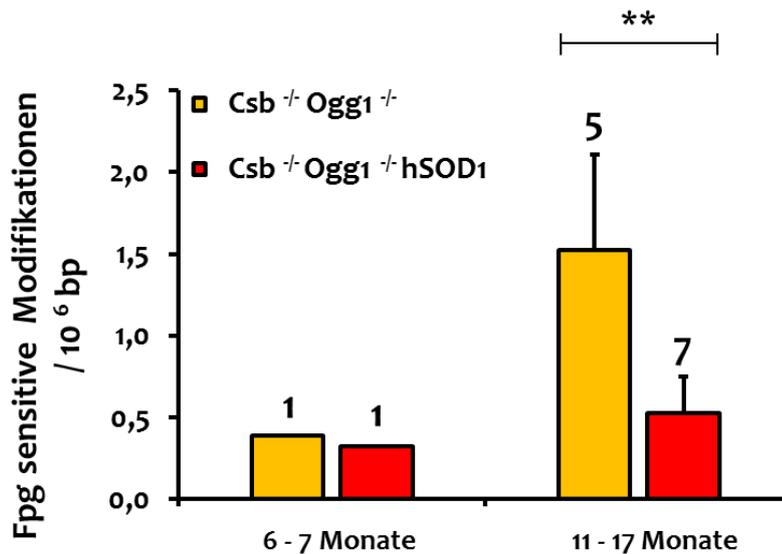


Abbildung 4-19: Fpg-sensitive Modifikationen in isolierten primären Nierenzellen von jungen (6-7 Monate) und mittelalten (11-17 Monate) *Csb^{-/-} Ogg1^{-/-}* Mäusen mit und ohne hSOD1 Überexpression. Die Fpg-sensitiven Modifikationen wurden mit Hilfe der schnellen Alkalischen Elution quantifiziert. Die Anzahl der Tiere in jeder Gruppe sind als Zahlen über den Balken dargestellt. Die Signifikanz (** $p \leq 0,01$) wurde mit einem zweiseitigen T-Test mit Welchkorrektur berechnet. Mittelwerte \pm SD.

4.1.4 Einfluss von hSOD1 auf die endogenen DNA-Schäden in der Milz

Als drittes Organ wurden die DNA-Schäden in der Milz gemessen. Es wurden Lymphozyten aus der Milz isoliert (siehe Abschnitt 3.2.2.7) und die Zellen auf die Alkalische Elution aufgetragen. Da die Methode zu Beginn der Messungen noch nicht etabliert war, sind die Tierzahlen hier sehr gering; es wurde teilweise nur ein Tier vermessen.

Es wurden nur alte Tiere für die Versuche verwendet, hier jedoch im Vergleich zu den Experimenten in der Niere wurden alle 4 Genotypen untersucht. Bei allen Tieren ist zu sehen, dass in den Milzzellen die Menge an Einzelstrangbrüchen sehr niedrig ist, sie liegt in allen Genotypen bei etwa $0,10$ SSB/ 10^6 bp (siehe Abbildung 4-20 und Abbildung 4-21). In den heterozygoten Tieren ist kein signifikanter Unterschied bei den Werten der Fpg-sensitiven Modifikationen zwischen den Tieren mit und ohne hSOD1 detektierbar (siehe Abbildung 4-20). Diese liegen bei $0,18$ und $0,30$ Fpg-sensitiven Modifikationen/ 10^6 bp.

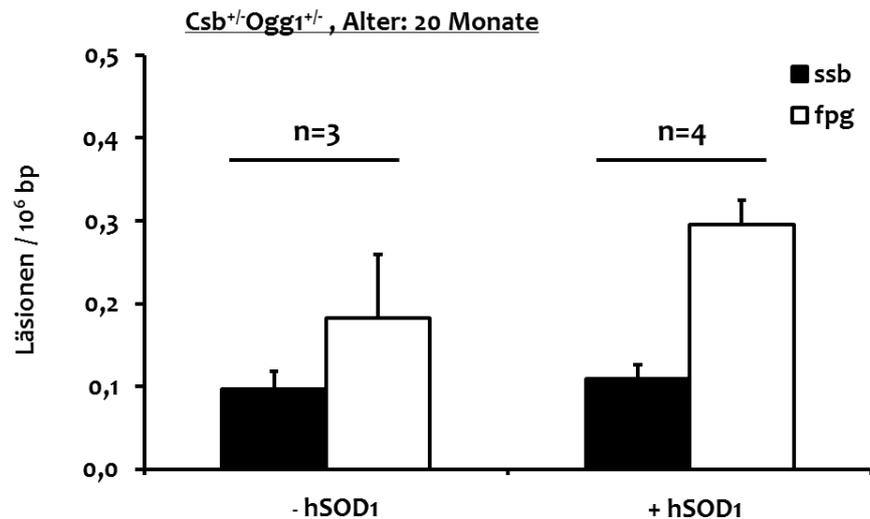


Abbildung 4-20: DNA-Schäden (Fpg-sensitive Modifikationen und Einzelstrangbrüche) in isolierten Milzzellen von 20 Monate alten Csb^{+/-} Ogg1^{+/-} Mäusen mit und ohne hSOD1 Überexpression. Die Fpg-sensitive Modifikationen (fpg) und Einzelstrangbrüche (ssb) wurden mit Hilfe der schnellen Alkalischen Elution quantifiziert. Die Anzahl der Tiere in jeder Gruppe sind als Zahlen über den Balken dargestellt. Mittelwerte \pm SD.

In Csb^{+/-} Ogg1^{+/-} Mäusen wurde mit einem Wert von 0,36 ein doppelt so hoher Spiegel an Fpg-sensitive Modifikationen / 10⁶bp gefunden wie in den Csb^{+/-} Ogg1^{+/-} Mäusen mit hSOD1 Überexpression. Hier liegt der Wert der gemessenen Tiere im Mittel bei 0,184 Fpg-sensitive Modifikationen/ 10⁶bp. Eine Signifikanz kann hier jedoch aufgrund zu geringer Tieranzahl nicht berechnet werden (siehe Abbildung 4-21).

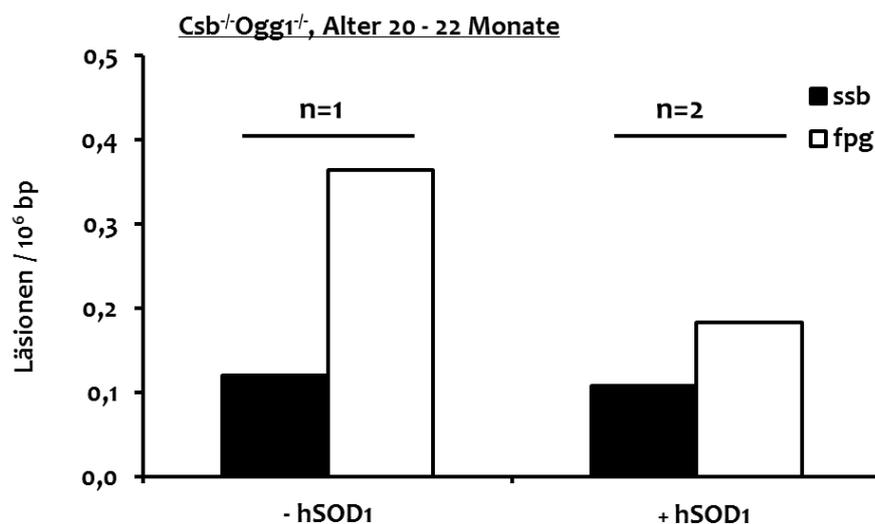


Abbildung 4-21: DNA - Schäden (Fpg-sensitive Modifikationen und Einzelstrangbrüche) in isolierten Milzzellen von 20 - 22 Monate alten Csb^{+/-} Ogg1^{+/-} Mäusen mit und ohne hSOD1 Überexpression. Die Fpg-sensitive Modifikationen (fpg) und Einzelstrangbrüche (ssb) wurden mit Hilfe der schnellen Alkalischen Elution quantifiziert. Die Anzahl der Tiere in jeder Gruppe sind als Zahlen über den Balken dargestellt.

4.1.5 Einfluss von hSOD1 auf die Genexpression der Redoxhomöostase

Die Ergebnisse der Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen, die in primären Hepatozyten und in Nierenzellen in mittelalten und alten *Csb^{-/-} Ogg1^{-/-}* Mäusen mit hSOD1 Überexpression gemessen wurden zeigen, dass eine Überexpression von hSOD1 vor der Akkumulation von DNA-Schäden schützt. Die Regulation der enzymatischen sowie der nicht-enzymatischen Schutzsysteme kann durch Regulationsmechanismen herauf- oder herunterreguliert werden. Nrf2 (nuclear factor erythroid 2 related factor 2) ist ein Transkriptionsfaktor, der bei erhöhtem oxidativen Stress in den Zellkern transloziert, an die ARE-Sequenz antioxidativer Gene wie z.B. SOD1-3, HO1, GR, GPX und Katalase bindet und deren Expressionsrate beeinflussen kann (Nguyen, et al. 2009), (siehe auch Abschnitt 1.1.5). Im Folgenden sollte untersucht werden, ob neben hSOD1 möglicherweise auch andere antioxidative Systeme beteiligt sind und inwiefern eine Überproduktion von hSOD1 andere antioxidative Mechanismen beeinflussen kann. Somit wurden als Zielgene SOD1-3, Katalase, HO1 und Nrf2 ausgewählt.

Es wurde Lebergewebe von 25-27 Monate alten Tieren entnommen, die RNA isoliert (siehe Abschnitt 3.2.5) und in cDNA umgeschrieben mit dem Enzym Reverse Transkriptase. Daraufhin erfolgte eine Messung der Expression verschiedener zu untersuchender Gene mittels Realtime-PCR. Durch das Normalisieren auf das Housekeeping-Referenzgen *β-aktin* können Veränderungen der zu untersuchenden Zielgene erkannt werden. In Abbildung 4-22 sind die Ergebnisse der Messung der Genexpression dargestellt. Es wurden noch zwei andere Referenzgene vermessen: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und ribosomales Phosphoprotein Po (36B4). Es ist deutlich zu erkennen, dass die murine Form von SOD1, SOD2, SOD3, Katalase, Hämoxygenase 1, Glutathionperoxidase und der Transkriptionsfaktor Nrf2 nicht beeinflusst sind, weder spielt die *Csb/Ogg1* – Defizienz hier eine Rolle, noch die hSOD1 Überexpression. Wie in Abbildung 4-4 ist hier zu erkennen, dass nur die humane SOD1 erhöhte mRNA Spiegel im entsprechenden Genotyp vorweist.

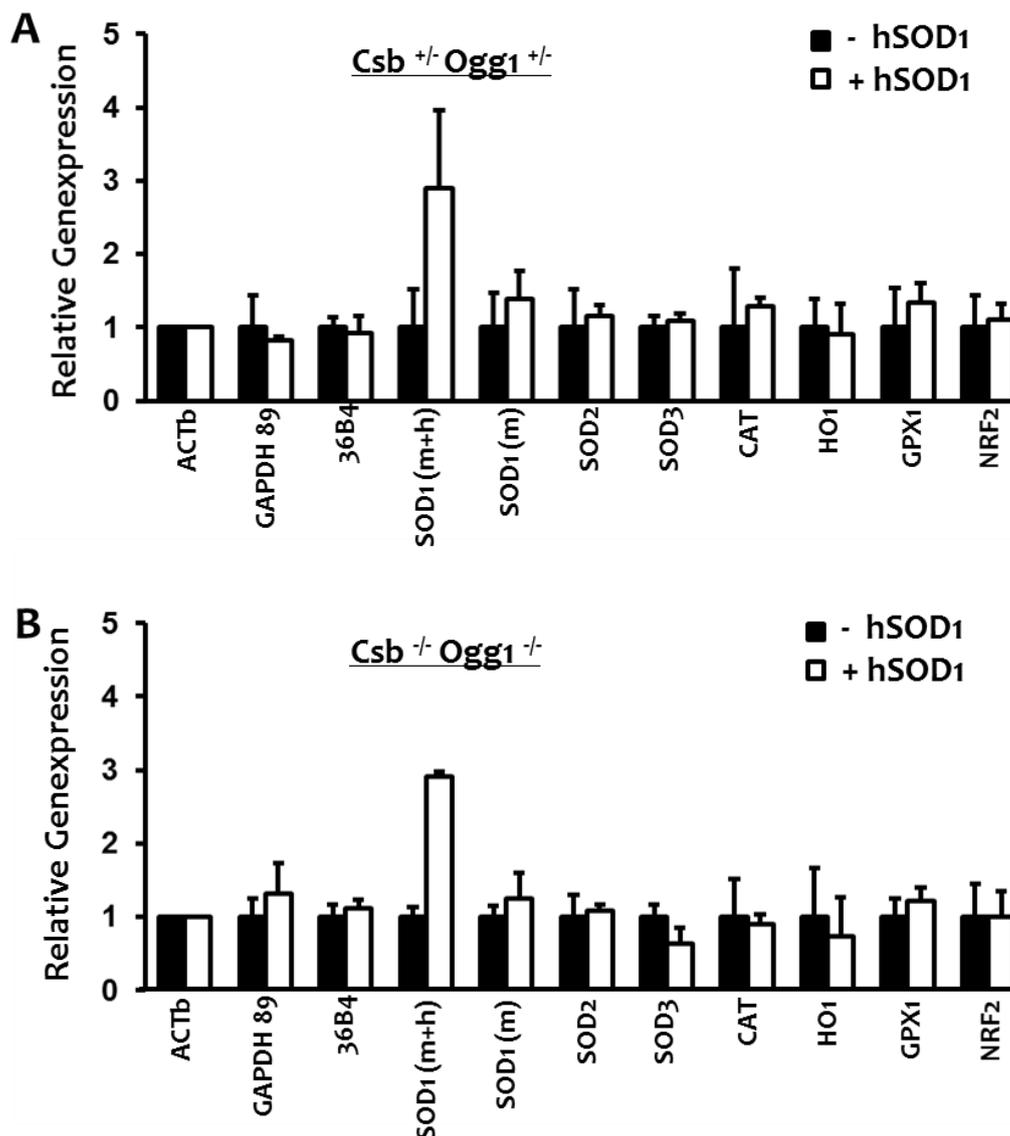


Abbildung 4-22: Genexpression von antioxidativen Genen im Lebergewebe von A: *Csb*^{+/-} *Ogg1*^{+/-} und B: *Csb*^{-/-} *Ogg1*^{-/-} Mäusen jeweils mit und ohne hSOD1 Überexpression. n=3. Alter der Tiere: 25-27 Monate. Für jeden Genotyp wurden jeweils 3 Mäuselebern verwendet. Pro Tier wurde die mittlere Expression jedes Genes relativ zu ACTb bestimmt und auf den Mittelwert der Kontrollmäuse normiert. ACTb = beta Aktin; GAPDH = Glyceraldehyde-3-phosphat Dehydrogenase; 36B4 = ribosomales Protein, Po; SOD1-3 = Superoxiddismutase 1-3; CAT = Katalase; HO1 = Hämoxxygenase 1; GPX1 = Glutathionperoxidase 1; NRF2 = nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2. SOD1 (m+h): Primer detektieren humane sowie murine SOD1; SOD1(m): Primer spezifisch für die murine Form von SOD1. Mittelwerte ± SD.

4.1.6 Einfluss von hSOD1 auf die Ausbildung von Mikrokernen

Mikrokerne gelten als sensitive Marker für Genotoxizität und entstehen durch Schädigung des Spindelapparates oder durch Chromosomenschäden. Sie sind die Produkte aus Fragmenten der Chromosomen, die im Zuge der Zellteilung nicht in den Tochterzellkern eingefügt werden können.

Der Mikrokerntest gilt als Standardverfahren bei der Testung von möglichen genotoxischen Prüfsubstanzen (OECD_TG_474 1997). Mikrokerne können *in vivo* im Knochenmark und in Erythrozyten von Nagern sowie *in vitro* in Zellkulturlinien nachgewiesen werden.

Da die in dieser Arbeit untersuchten reparaturdefizienten Tiere erhöhte Spiegel an oxidativen Schäden besitzen und hSOD1 hierbei einen protektiven Effekt zeigt (siehe Abschnitt 4.1.2.7), sollte im Folgenden die Auswirkung einer hSOD1 Überproduktion auf die Ausbildung von Mikrokerneln untersucht werden.

Es wurden Mikrokerne aus peripherem Blut der zu untersuchenden Mäuse gemessen. In den Erythrozyten werden die Mikrokerne nicht wie der Zellkern ausgestoßen, sondern bleiben in den Zellen zurück und können leicht gezählt werden. Hierzu wurde Blut aus der Aorta der Tiere entnommen und ein Blutausrich angefertigt. Nach der Trocknung und der Färbung nach Pappenheim (siehe Abschnitt 3.2.4) wurden die basalen Spiegel an Mikrokerneln im Mikroskop verblindet ausgezählt. In Abbildung 4-23 ist die Anzahl an Mikrokerneln pro 1000 Erythrozyten gegen das Alter der Tiere (mit den verschiedenen Genotypen) dargestellt. Jeder Einzelpunkt steht für ein gemessenes Tier. Es wurde je eine Doppelbestimmung durchgeführt)

Die Ergebnisse zeigen keine signifikante Erhöhung der Mikrokerne mit zunehmendem Alter der Tiere, keinen Einfluss der hSOD1 Überproduktion und auch keine Auswirkung der Csb/Ogg1-Defizienz.

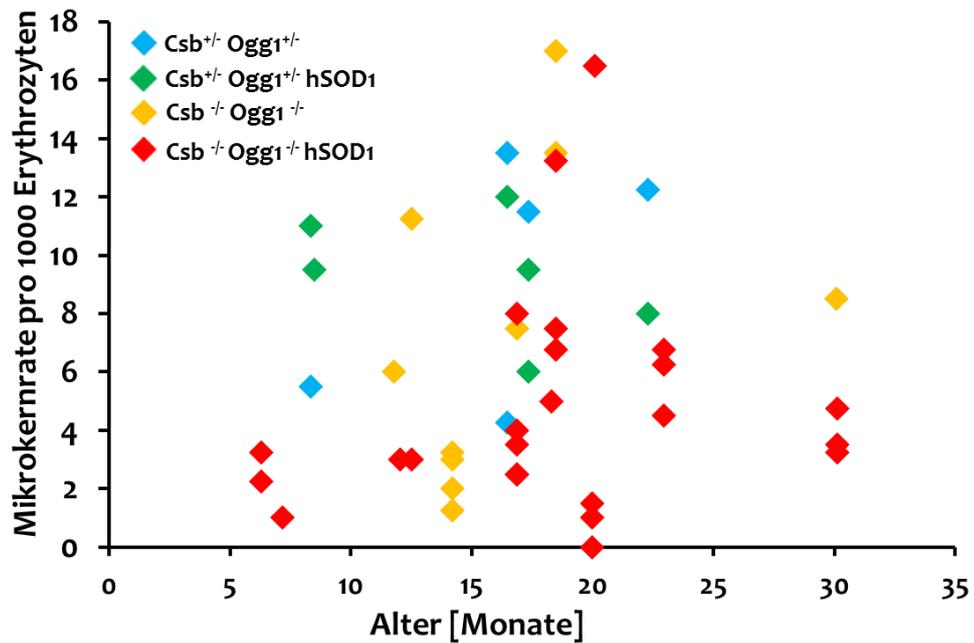


Abbildung 4-23: Mikrokernrate in peripherem Blut von $Csb^{+/-} Ogg1^{+/-}$ und $Csb^{-/-} Ogg1^{-/-}$ Mäusen mit und ohne hSOD1 Überexpression in Abhängigkeit des Alters der Tiere. Es wurden pro Tier 2 Objektträger mit je insgesamt 2000 Erythrozyten ausgezählt und pro 1000 angegeben.

4.2 Einfluss des Dopaminstoffwechsels auf die oxidative DNA-Schädigung

Die Ergebnisse der Untersuchung in Kapitel 4.1 zeigen, dass eine Überexpression von hSOD1 vor der Akkumulation von DNA - Schäden schützt. Um die endogenen Quellen von Superoxid, die für die DNA-Schädigung in Zellen verantwortlich sind, zu identifizieren, wurde die Generierung von oxidativ gebildeten Schäden in nukleärer DNA durch die Bildung endogener ROS während des Dopaminmetabolismus *in vitro* untersucht. Hierbei sollte analysiert werden, inwiefern die Bildung endogener ROS während des Dopaminmetabolismus die DNA in Zellen schädigen kann.

In den folgenden Kapiteln wurden SH-SY5Y Zellen eingesetzt, welche entweder mit dem Leervektor pcDNA4 (SH-SY5Y (mock)), dem Dopamintransporter 4 (SH-SY5Y DAT4), der Monoaminoxidase A (SH-SY5Y MAO-A) oder der Monoaminoxidase B (SH-SY5Y MAO-B) stabil transfiziert wurden. SH-SY5Y (mock) Zellen dienen als Kontrollzelllinie, wobei die restlichen drei Zelllinien eine Überexpression tragen:

- i) des DAT4 (SH-SY5Y DAT4)
- ii) der Monoaminoxidase A (SH-SY5Y MAO-A)
- iii) der Monoaminoxidase B (SH-SY5Y MAO-B)

Die Überexpression wurde von Neuhaus, et al. 2014 durch Reverse Transkriptase PCR und die Bestimmung der MAO Enzymaktivität gezeigt.

Es sollte analysiert werden, inwiefern ein gesteigerter Dopaminmetabolismus in den überexprimierenden Zellen und dadurch gesteigerte ROS-Spiegel, DNA-Schäden in nukleärer DNA generieren können. Letztere wurden mithilfe der Alkalischen Elution vermessen.

4.2.1 Untersuchung der Basalspiegel in Neuroblastoma - Zellen (SH-SY5Y)

Abbildung 4-24 zeigt die gemessenen Basalspiegel an Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Läsionen der im vorigen Abschnitt erläuterten Zelllinien: SH-SY5Y (mock), SH-SY5Y DAT4, SH-SY5Y MAO-A und SH-SY5Y MAO-B. Hierbei ist zu erkennen, dass die Spiegel niedrig sind und nicht über 0,4 Läsionen/ 10^6 Basenpaare hinausgehen. Dies deckt sich mit früheren Daten unserer Arbeitsgruppe. Unbehandelte Zellen zeigen dabei je nach Zelllinie Spiegel zwischen 0,1 - 0,5 Läsionen/ 10^6 bp. Es ist jedoch deutlich sichtbar, dass in allen überexprimierenden Zelllinien sowohl die SSB als auch die Fpg-sensitiven Läsionen erhöhte Spiegel im Vergleich zur Kontrollzelllinie zeigen. Dies ist jedoch statistisch nicht signifikant (für DAT4: $p = 0,07$; für MAO-A und MAO-B: $p = 0,12$).

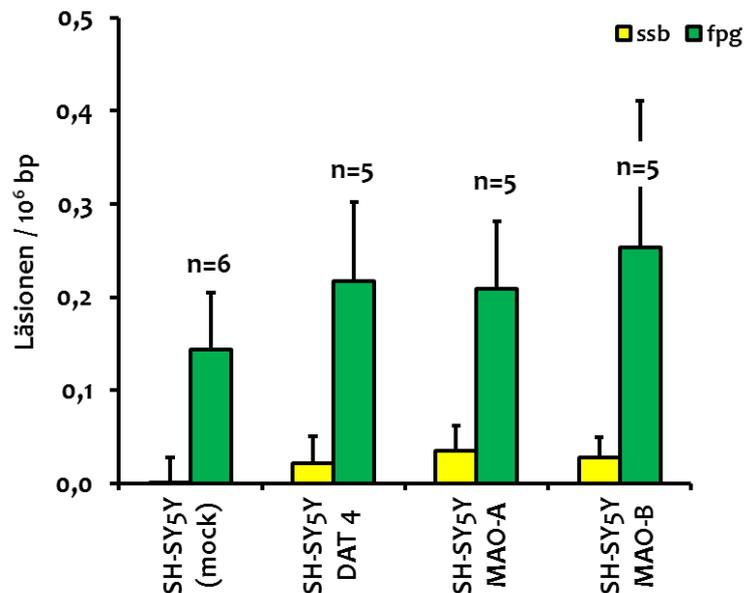


Abbildung 4-24: Basalspiegel der Einzelstrangbrüche (ssb) und Fpg-sensitiven Modifikationen (fpg) von unbehandelten SH-SY5Y Zellen. Die Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitiven Modifikationen wurden mit der Alkalischen Elution gemessen. Die Anzahl der Experimente sind als Zahlen über den Balken dargestellt. Mittelwerte \pm SD.

4.2.2 Einfluss von Dopamin auf Neuroblastoma - Zellen (SH-SY5Y)

Um den Einfluss einer Dopaminbehandlung auf die DNA Schäden in Neuroblastoma-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen zunächst mit niedrigen Dosen von Dopamin (20 μ m und 40 μ m) für 24h bei 37°C im Brutschrank behandelt. Um einen Einfluss von entstehenden ROS während der möglichen Autoxidation des Dopamins extrazellulär zu vermeiden, wurde den Zellen (zusätzlich zu Dopamin) Katalase (700U/ml) zugesetzt. Abbildung 4-25 zeigt die Ergebnisse der Alkalischen Elution. Es ist bei der Dosis 40 μ m Dopamin eine leichte Erhöhung der Fpg-sensitiven Läsionen in MAO-A und MAO-B überexprimierenden Zellen zu erkennen, wobei dies jedoch statistisch nicht signifikant ist (die p-Werte liegen alle über 0,05).

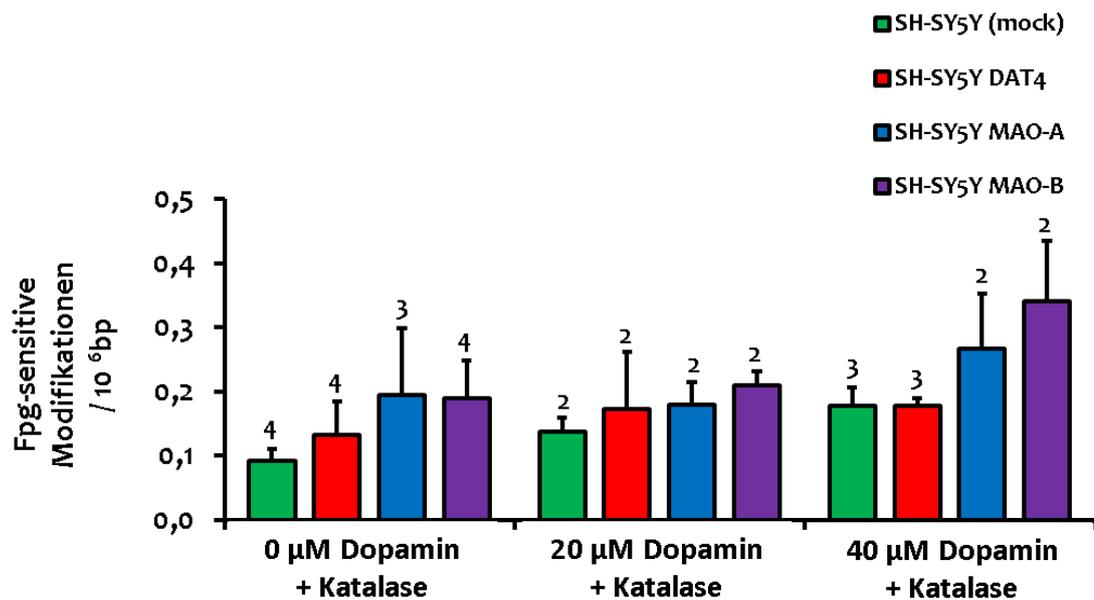


Abbildung 4-25: Fpg-sensitive Modifikationen von SH-SY5Y Zellen nach Dopaminbehandlung für 24h. Die Zellen wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen Dopamin behandelt. Die Konzentration der Katalase betrug 700 U/ml, hier wurde 24h im Brutschrank koinkubiert. Die Fpg-sensitiven Modifikationen wurden mit der Alkalischen Elution gemessen. Die Anzahl der Experimente sind als Zahlen über den Balken dargestellt. Mittelwerte \pm SD. Bei n=2 gilt: MW + Diff. vom MW.

Durch eine lange Inkubationsdauer und niedrige Dosierung von Dopamin war also keine signifikante Erhöhung der DNA-Schäden zu erkennen (siehe Abbildung 4-25). Die Zellen wurden im Anschluss mit deutlich höheren Dosen und mit einer kürzeren Inkubationsdauer (3h) behandelt. Es wurden 250 μ m und 500 μ m Dopamin gewählt. Auch hier wurde wieder mit Katalase (700U/ml) koinkubiert, Abbildung 4-26 zeigt die Ergebnisse der Alkalischen Elution. Es ist wie bei der Behandlung über 24h mit 40 μ m Dopamin eine leichte Erhöhung der Fpg-sensitiven Läsionen in MAO-A und MAO-B überexprimierenden Zellen zu erkennen, wobei dies jedoch statistisch nicht signifikant ist, wie schon in den in Abbildung 4-24 dargestellten Versuchen beobachtet.

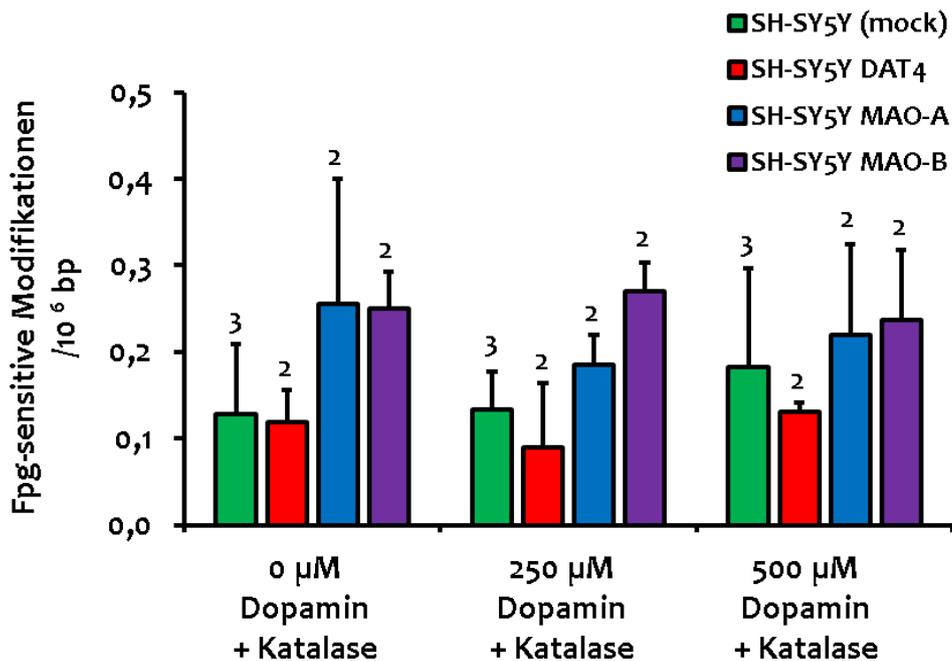


Abbildung 4-26: Fpg-sensitive Modifikationen von SH-SY5Y Zellen nach Dopaminbehandlung für 3h. Die Zellen wurden für 3h mit den angegebenen Konzentrationen Dopamin behandelt. Die Konzentration der Katalase betrug 700 U/ml, hier wurde 3h im Brutschrank inkubiert. Die Fpg-sensitiven Modifikationen wurden mit der Alkalischen Elution gemessen. Die Anzahl der Experimente sind als Zahlen über den Balken dargestellt. Mittelwerte \pm SD. Bei $n=2$ gilt: MW + Diff. vom MW.

Da durch eine lange Inkubationsdauer und niedriger Dosierung mit Dopamin (Abbildung 4-25), sowie einer kurzen Inkubationsdauer mit hohen Dosen von Dopamin (Abbildung 4-26) keine signifikante Erhöhung der DNA-Schäden zu erkennen war, wurden die Zellen im Anschluss mit höheren Dosen und mit einer langen Inkubationsdauer von 24h behandelt. Es wurden 100 µM bis 1 mM Dopamin gewählt. Auch hier wurde wieder mit Katalase, diesmal in einer höheren Konzentration von 2000U/ml inkubiert.

Nach 24h war eine deutliche Toxizität und Verfärbung der Zellen mit steigender Dopaminkonzentration zu erkennen (Abbildung 4-27), die adhärent wachsenden Zellen lösten sich von der Zellkulturflasche ab. Diese Verfärbung war in den vorherigen Versuchen (Abbildung 4-25 und Abbildung 4-26) nicht erkennbar. Dies deutet auf eine Autoxidation von Dopamin und die Bildung des bräunlichen Neuromelanins hin (siehe hierzu ausführlich Abschnitt 1.1.6).

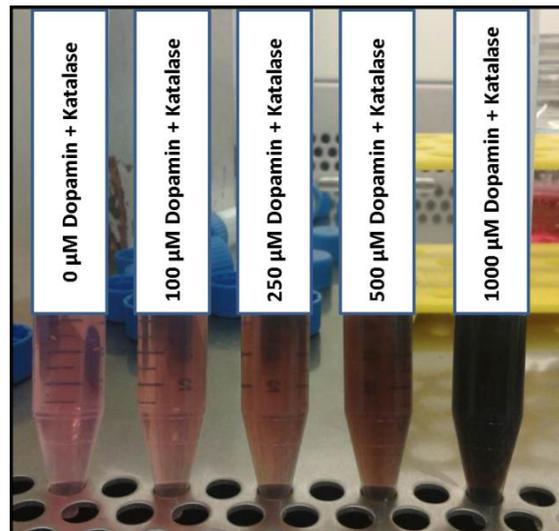


Abbildung 4-27: SH-SY5Y (mock) Zellen nach 24h Behandlung mit verschiedenen Dopaminkonzentrationen (0 µM – 1000 µM) und Katalase (2000U/ml). Es ist eine deutliche Verfärbung der Zellen und des Zellkulturmediums zu erkennen. Die bräunliche Verfärbung wird intensiver mit steigender Dopaminkonzentration.

Da während der Bildung von Neuromelanin hochreaktive Chinone und $O_2^{\cdot -}$ entstehen, wurde im nächsten Experiment zusätzlich zu 100 µM Dopamin, 2000U/ml Katalase auch 200 U/ml SOD zugesetzt. Es erfolgte eine lange Inkubationszeit von 24h.

Abbildung 4-28 zeigt die Ergebnisse der Alkalischen Elution. Es ist eine Erhöhung der Fpg-sensitiven Läsionen von unbehandelten sowie behandelten MAO-A und MAO-B überexprimierenden Zellen zu erkennen, wobei dies jedoch statistisch nicht signifikant ist. Auch hier ist zu erkennen, dass eine Konzentration von 100 µM Dopamin toxisch ist, einige Zellen hatten sich von der Zellkulturflasche abgelöst, wurden jedoch nicht verworfen, sondern auch mitgezählt und mithilfe der Alkalischen Elution auf DNA-Schäden untersucht.

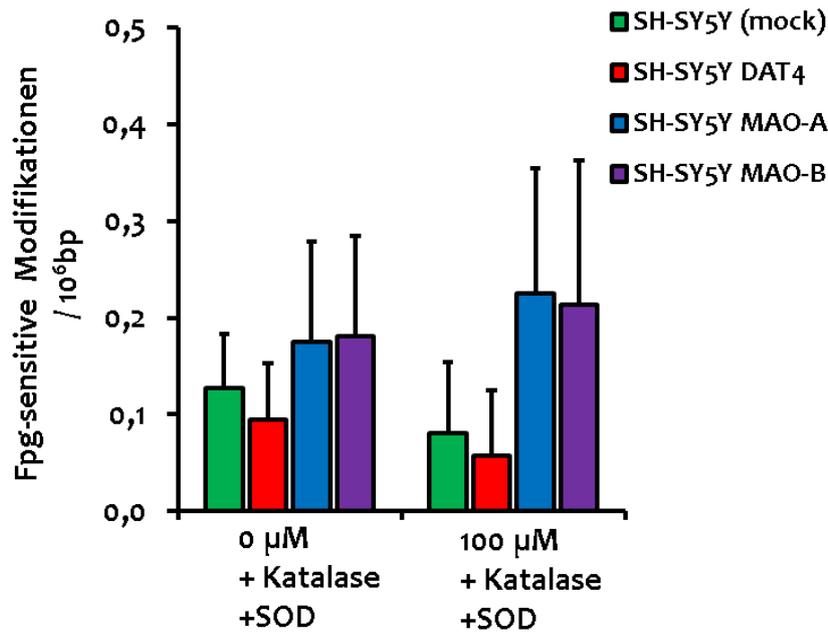


Abbildung 4-28: Fpg-sensitive Modifikationen von SH-SY5Y Zellen nach Dopaminbehandlung für 24h. Die Zellen wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen Dopamin behandelt. Die Konzentration der Katalase betrug 2000 U/ml, die der SOD1 betrug 200U/ml; hier wurde 24h im Brutschrank kokubiert. Die Fpg-sensitiven Modifikationen wurden mit der Alkalischen Elution gemessen. Die Anzahl der Experimente sind als Zahlen über den Balken dargestellt. Mittelwerte \pm SD. Bei n=2 gilt: MW + Diff. vom MW.

Zusätzlich zu den Messungen der DNA-Schäden wurde der Einfluss einer Dopaminbehandlung auf die Proliferation der Zellen (3.2.1.5) untersucht. Eine Änderung der Proliferation von sich in Kultur befindlichen Zellen nach oder während einer Substanzinkubation kann als ein Maß für die Toxizität dieser Substanz gewertet werden.

Die vier SH-SY5Y - Zelllinien wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Dopamin \pm Katalase/SOD für 24h behandelt. Hierbei wurden immer 2 Ansätze angesetzt. Nach der Behandlungszeit wurden die Zellen der Doppelbestimmung abgelöst und gezählt, der zweite Zellansatz wurde nicht abgelöst, sondern zweifach mit 1x PBSCMF gespült und anschließend für 48h mit Komplettmedium weiterinkubiert und dann gezählt. Im Abschluss wurde der jeweilige Proliferationsfaktor (48h) berechnet. In Abbildung 4-29 sind die Ergebnisse aufgetragen. Bei den nicht mit Dopamin behandelten Zellen hat SOD/Katalase keinen Einfluss, die Werte sind hier gleich. Es ist jedoch deutlich zu sehen, dass die Proliferation der Zellen mit zunehmender Dopaminkonzentration abnimmt. Auch ist zu erkennen, dass die SY5Y DAT4 und SH-SY5Y MAO-B Zelllinie schneller wachsen als die SH-SY5Y (mock) und SH-SY5Y MAO-A Zelllinie und dadurch die Toxizität des Dopamins nicht so stark ist.

Vergleicht man die dopaminbehandelten Zellen, so ist zu erkennen, dass SOD/Katalase teilweise die Toxizität etwas mildern, aber nicht verhindern kann.

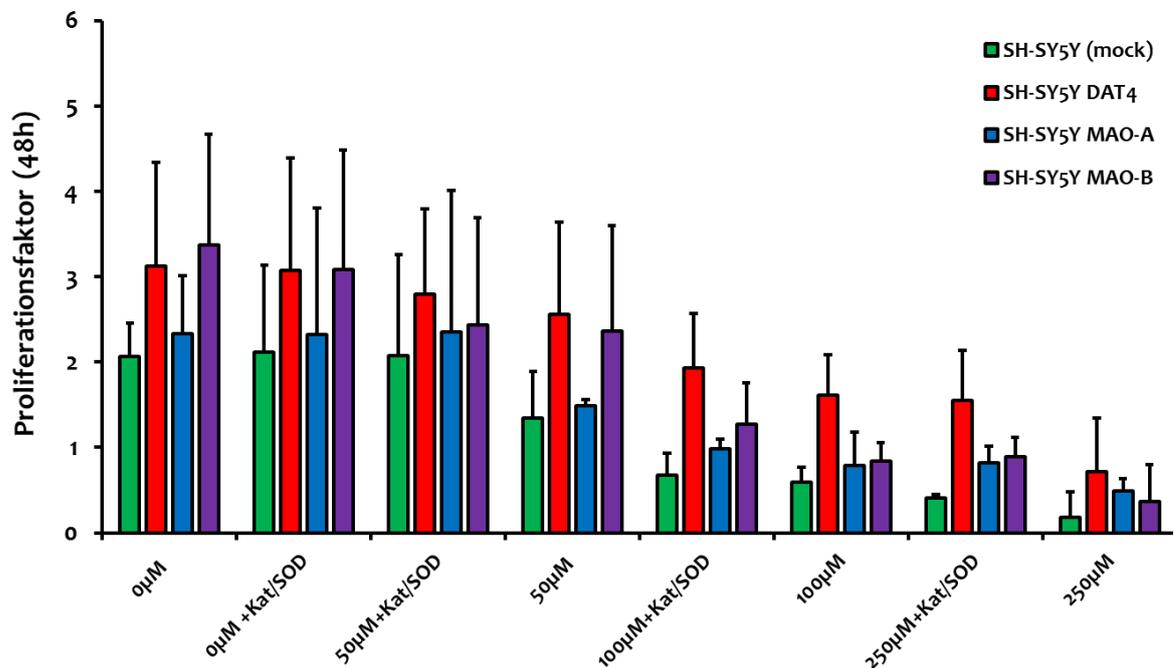


Abbildung 4-29: Proliferation von SH-SY5Y Zellen nach Dopaminbehandlung. Die Zellen wurden für 24h mit den angegebenen Konzentrationen Dopamin behandelt. Die Konzentration der Katalase betrug 2000 U/ml, die Konzentration von SOD 200U/ml; hier wurde 24h im Brutschrank inkubiert. Nach der Behandlung wurden die Zellen sofort gezählt. Ein weiterer Ansatz wurde nach weiteren 48h gezählt und der Proliferationsfaktor als Verhältnis der beiden Zählungen berechnet. mock und DAT4: n=3; MAO-A: n=2, MAO-B: n=4. Mittelwerte \pm SD. Bei n=2 gilt: MW + Diff. vom MW.

5 Diskussion

5.1 Welche Rolle spielt SOD1 bei dem Schutz vor oxidativen DNA-Schäden *in vivo* ?

Nach unserer heutigen Vorstellung werden die basalen Gleichgewichtsspiegel oxidativ gebildeter DNA Modifikationen in der Zelle beeinflusst durch die (von der jeweiligen oxidativen Stress abhängigen) Bildungsgeschwindigkeit der Schäden einerseits und der Effektivität der zellulären Antioxidantien sowie der DNA-Reparatur andererseits (siehe Abbildung 1-1). Dass Defekte in der DNA-Reparatur zu erhöhten Spiegeln an oxidativ gebildeten DNA-Schäden führt, wurde bereits nachgewiesen (Osterod, et al. 2001, Trapp, et al. 2007, Fusser, et al. 2011). So konnte Osterod, et al. 2001 zeigen, dass eine Defizienz der Reparaturoendonuklease Ogg1 in Mäusen altersabhängig zu einer deutlichen Erhöhung von Fpg-sensitiven Schäden in der Leber führt. Der Anstieg erfolgte mit einer konstanten Akkumulationsrate, während die steady-state Level der Wildtyp-Tiere konstant niedrig blieb. Eine zusätzliche Defizienz von CSB (Cockayne syndrome B protein), ein Reparaturprotein der Nukleotidexzisionsreparatur (siehe Abschnitt 1.2.6), steigerte die Akkumulationsrate in frisch isolierten Hepatozyten noch einmal um das 3,4 fache (Osterod 2002). Die Tiere zeigen keine erhöhte Krebsinzidenz, jedoch lässt sich eine erhöhte Mutationsrate nachweisen (Trapp, et al. 2007, Fusser, et al. 2011) und nach Behandlung mit dem Peroxisomenproliferator WY-14,643 konnten vermehrt präneoplastische Foci in der Leber der Tiere gezeigt werden (Trapp, et al. 2007).

Auch in dieser Arbeit konnte der Anstieg der Fpg-sensitiven Läsionen in *Csb^{-/-} Ogg1^{-/-}* Mäusen gezeigt werden (Abbildung 4-9 und Abbildung 4-8). Es ist zu erkennen, dass die Spiegel an oxidativ gebildeten Schäden in jungen, 6 Monate alten Tieren um etwa ein Drittel niedriger sind als bei Tieren im Alter von 12 Monaten bis 21 Monaten. Dies ist auf den Mangel an Reparaturkapazität durch die CSB - und Ogg1 - Defizienz und gleichzeitig auf eine erhöhte Bildung von ROS im Alter zurückzuführen (Hamilton, et al. 2001). Auch konnte gezeigt werden, dass im Vergleich zu den historischen Daten des Arbeitskreises ein funktionierendes Allel für *Csb* und *Ogg1* ausreicht, damit die Spiegel an Fpg-sensitiven Modifikationen mit dem Alter der Tiere niedrig bleiben und nicht akkumulieren (siehe Abbildung 4-8).

Die Rolle von CSB bei der Reparatur von oxidativ gebildeten DNA-Schäden ist bis heute weitgehend ungeklärt. Es gibt Untersuchungen die zeigen, dass CSB und Ogg1 in Zellextrakten kopräzipitieren, was auf eine Interaktion der beiden Proteine hindeutet (Tuo, et al. 2002, Klungland und Bjelland 2007). Außerdem konnte gezeigt werden,

dass sich CSB in den Mitochondrien zusammen mit Ogg1, CSA (Cockayne syndrome A protein) und mtSSBP-1 (mitochondrial single-stranded binding protein-1) nach der Induktion von oxidativem Stress mittels H₂O₂ in einem Komplex befindet (Kamenisch, et al. 2010). Neben Ogg1 interagiert CSB auch mit Neil1 (Muftuoglu, et al. 2009) und APE1 (Wong, et al. 2007), zwei weiteren prominenten Proteinen in der Basenexzisionsreparatur: Neil1 erkennt und entfernt Fapy-G, Fapy-A und 5-Hydroxycytosin aus der DNA, während APE1 das Entfernen aller Arten von AP-Läsionen initiiert. Es gibt auch Hinweise, dass die charakteristischen degenerativen Symptome des Cockayne Syndroms aus der Akkumulation unreparierter endogener oxidativ gebildeter Schäden in mitochondrialer sowie nukleärer DNA resultieren. Die als Konsequenz entstehenden erhöhten Mutationsfrequenzen und die genomische Instabilität tragen möglicherweise zur frühen Degenerierung des Gewebes bei (Balaban, et al. 2005, Fukui und Moraes 2008, Gredilla 2010).

Das *Csb*^{-/-} *Ogg1*^{-/-} Tiermodell wurde für die Untersuchungen der Rolle von SOD1 bei dem Schutz vor oxidativ gebildeten DNA-Schäden *in vivo* verwendet, da diese Tiere wie im oberen Abschnitt erläutert, oxidativ gebildete DNA-Schäden akkumulieren. Außerdem lässt sich gleichzeitig die Rolle von Superoxid bei der Entstehung von oxidativen Schäden ermitteln. Dieses Tiermodell ist hervorragend geeignet, um mögliche protektive Effekte nachzuweisen. Die Tiere zeigen neben der Akkumulation der Schäden keinen Phänotyp. Ein weiterer Vorteil ist, dass die Tiere nicht zusätzlich einem Stressor ausgesetzt werden müssen, um die Schäden zu induzieren.

Obwohl der antioxidative Effekt der Superoxiddismutase sehr gut dokumentiert ist, zeigt eine Vielzahl an Untersuchungen, dass eine Überproduktion von SOD schwere Konsequenzen zur Folge haben kann. Es wurde gezeigt, dass erhöhte Spiegel an SOD toxische Effekte *in vivo* auslösen können. Dies wurde nachgewiesen für *E.coli* (Bloch und Ausubel 1986, Scott, et al. 1989), *S.cerevisiae* (Costa, et al. 1993) und in zahlreichen Säugerzellen (Elroy-Stein, et al. 1986, Omar, et al. 1990, Omar und McCord 1990, Amstad, et al. 1991). Die Überproduktion der Cu/Zn SOD1 wurde sogar mit der Alzheimerschen Erkrankung (Lohr 1991) sowie dem Down-Syndrom (Elroy-Stein und Groner 1988, Kedziora und Bartosz 1988) in Verbindung gebracht. Der toxische Effekt wird dort überwiegend mit der vermehrten Produktion von H₂O₂ erklärt. Die Hypothese, dass durch die Überproduktion von SOD1 mehr Superoxidradikalanionen umgesetzt werden, somit mehr H₂O₂ und damit höhere Spiegel an Einzelstrangbrüchen gebildet werden, kann durch die Ergebnisse dieser Arbeit nicht bestätigt werden. In *Csb*^{-/-} *Ogg1*^{-/-} und *Csb*^{+/-} *Ogg1*^{+/-} Mäusen mit hSOD1 Überexpression konnte keine Erhöhung der endogenen Spiegel an Einzelstrangbrüchen oder Fpg-sensitiven Läsionen in Leber, Niere und Milz im Vergleich mit *Csb*^{-/-} *Ogg1*^{-/-} und *Csb*^{+/-} *Ogg1*^{+/-} Mäusen ohne hSOD1 Überexpression gezeigt werden (Abschnitte 4.1.2.7, 4.1.3.5 und

4.1.4). Auch ist die Vitalität der Zellen, welches ein Marker für Toxizität darstellt, durch die SOD-Überproduktion nicht beeinflusst. Sehr wahrscheinlich sind es hier die anderen antioxidativen Schutzsysteme, die das möglicherweise anfallende Wasserstoffperoxid abfangen, so wie z.B. die Katalase, die in millimolaren Konzentrationen in der Zelle vorhanden ist. Einzelstrangbrüche werden zudem sehr schnell repariert, nach Untersuchungen der Arbeitsgruppe in zahlreichen Zelllinien liegt die Halbwertszeit von Strangbrüchen bei maximal 30 Minuten.

Auch wurden in SOD überexprimierenden Mäusen die Mikrokerne in peripherem Blut als sensitiver Marker für Genotoxizität gemessen (Abbildung 4-23). Es konnte gezeigt werden, dass eine Induktion von 8-oxoG (mittels Kaliumbromat) die Mikrokernrate erhöhen kann (Ballmaier und Epe 1995). Auch konnte Fußer 2010 in seiner Dissertation eine Senkung der Spiegel von Fpg-sensitiven Läsionen sowie an Mikrokernen durch Fütterung von Mäusen mit Resveratrol nachweisen. Eine Veränderung der Mikrokernrate in den Doppelknock-out Tieren im Vergleich zum Wildtyp konnte nicht nachgewiesen werden (Trapp 2006).

Die Annahme, dass die Überproduktion von SOD womöglich genotoxisch sein könnte, kann auch durch die Untersuchung dieses Parameters nicht bestätigt werden. Es ist keine Erhöhung der Mikrokerne der SOD-überproduzierenden Genotypen zu sehen. Weder der Genotyp noch das Alter der Tiere hat hier einen Einfluss.

Ein klarer protektiver Effekt der SOD auf die Bildung von endogenen Fpg-sensitiven Läsionen und somit hauptsächlich 8-oxoG, konnte in primären Hepatozyten von mittelalten und alten $Csb^{-/-}$ $Ogg1^{-/-}$ Mäusen und alten Wildtyp-Tieren gezeigt werden (Abbildung 4-9). Auch der Schutz durch SOD in Nierenzellen in alten $CsbOgg1$ -defizienten Mäusen ist deutlich signifikant (Abbildung 4-19). Hier korreliert die Menge und das Ausmaß der Aktivität des hSOD1 Proteins klar mit dem Ausmaß der gesenkten Spiegel an Fpg-sensitiven Läsionen: eine 3fache Erhöhung des hSOD1 Proteins (Abbildung 4-3 und Abbildung 4-15) führt zur Senkung der oxidativ gebildeten DNA-Schäden um etwa ein Drittel (Abbildung 4-9 und Abbildung 4-19). Die Ergebnisse der Untersuchungen in den Milzzellen sind aufgrund der geringen Tieranzahl nicht signifikant, jedoch ist auch hier ein Effekt als wahrscheinlich anzunehmen. Es kann damit geschlossen werden, dass humane SOD1 vor der Bildung von Fpg-sensitiven DNA-Schäden und somit vor mutagenen oxidativen DNA-Schäden schützt.

Primäre Hepatozyten sowie primäre Nierenzellen sind zum Zeitpunkt der Isolation aus der Leber und Niere im ausdifferenzierten Zustand und besitzen keine nennenswerte Teilung, so dass das Gewebe ständig endogener oxidativer Schädigung ausgesetzt ist. Jede Zellteilung kann das Schadensausmaß um die Hälfte senken, eine Überexpression der SOD1 könnte die Zellteilung der primären Zellen anregen, so dass die DNA-Schäden

reduziert werden. Ein Einfluss der Überproduktion von SOD auf die Proliferation durch die Überproduktion von SOD kann jedoch ausgeschlossen werden. Dass die Zellteilung durch eine Überexpression von SOD1 nicht angeregt wird, konnte über die Untersuchung des Lebergewichtes (Abbildung 4-2) und des Nierengewichtes (Abbildung 4-14) gezeigt werden. Es ist in den Genotypen mit einer SOD-Überproduktion keine Änderung der genannten Organgewichte erkennbar. Somit ist ein Verdünnungseffekt durch Anregung der Zellteilung ausgeschlossen.

Die Ergebnisse belegen klar, dass SOD1 protektive Eigenschaften besitzt. Es kann erstmalig gezeigt werden, dass SOD1 die Entstehung von endogenen oxidativ gebildeten Schäden in chromosomaler DNA *in vivo* altersabhängig senken kann und dass aus diesem Grund Superoxid eine der reaktiven Sauerstoffspezies ist, die unter physiologischen Bedingungen für die Generierung der DNA-Schäden verantwortlich ist. Dies wird durch Untersuchungen an SOD knock-out Mäusen oder SOD defizienten Zelllinien von anderen Arbeitsgruppen unterstützt:

Ein knock-out von SOD1 in Mäusen resultiert in einer reduzierten Lebensspanne der Tiere, erhöhter Inzidenz an Leberkrebs (Elchuri, et al. 2005) und signifikant erhöhten Level an 8-oxoG (Elchuri, et al. 2005, Siomek, et al. 2010). Außerdem zeigten diese Mäuse einen 3-fachen Anstieg der Mutationsfrequenz im Lac-Z Gen und dort vorwiegend GC-TA Transversionen und GC-AT Transitionen (Busutil, et al. 2005). Experimente in SOD-defizienten Zelllinien zeigten erhöhte Spiegel von AP-Stellen (Apurinic/ Apyrimidinic sites) und höhere Spiegel von Schwesterchromatidaustauschen (SCE) (Inoue, et al. 2010).

Ausblick: In den *Csb^{-/-}Ogg1^{-/-}*-Mäusen mit und ohne hSOD1 Überexpression wurde im Zuge dieser Arbeit außerdem versucht, basale Spiegel an Mutationen mit dem pig-A Assay nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Die Methode wird bereits seit langem angewendet als Standardmethode bei der Diagnose der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH) im Mensch. Neben einem Blutbild wird das Fehlen eines GPI (Glycosylphosphatidylinositol)-verankerten Proteins auf Blutzellen nachgewiesen. Dieser durchflusszytometrische Assay steht seit längerem auch zur Verfügung um *in vivo* in Blutzellen von Ratten und Mäusen induzierte Mutationen nach der Gabe von mutagenen Chemikalien wie z.B. Benz(a)pyren zu messen (Lemieux, et al. 2011). In einem multi-laboratory trial wird getestet, ob der Assay möglicherweise in die Standardmethoden zur genotoxischen Testung von Chemikalien aufgenommen wird. In dieser Arbeit wurde peripheres Blut von *CsbOgg1*-defizienten Mäusen \pm SOD1 mit dieser Methode untersucht. Es war jedoch weder möglich, den Unterschied von alten *Csb^{-/-}Ogg1^{-/-}* und Wildtyp Tieren zu detektieren, noch den Einfluss der SOD1-Überexpression zu zeigen. Um die Unterschiede der wenigen spontanen Mutationen

(ausgelöst durch die erhöhten Spiegel an oxidativ gebildeten Schäden) zu sehen, sind womöglich sehr hohe Tierzahlen nötig, um eine statistische Signifikanz zu erhalten. Der Vorteil bei diesem Test ist es jedoch, dass Blut verwendet werden kann und es somit sehr leicht ist an Probenmaterial zu gelangen. Außerdem können viele Proben gleichzeitig gemessen und ein Tier kann über einen Zeitverlauf verfolgt werden, ohne es opfern zu müssen. Eine zweite Möglichkeit um zu untersuchen, ob SOD1 nicht nur die Spiegel an oxidativ gebildeter Schäden, sondern als Konsequenz auch die Mutationsfrequenz senkt, wäre eine Kreuzung der in dieser Arbeit generierten Maus-Genotypen mit BigBlue®-Mäusen. Diese Tiere tragen homozygot das bakterielle *lacI*-Gen auf dem Chromosom 7 als Transgen. Mit diesem Verfahren konnte Trapp, et al. 2007 eine erhöhte Mutationsfrequenz in der Leber von *CsbOgg1* defizienten Tieren zeigen.

5.2 Sind außer der SOD1 andere antioxidative Schutzsysteme hierbei beeinflusst ?

Ein weiterer Hinweis darauf, dass eine erhöhte Expression von SOD zum Schutz vor oxidativen Schäden beiträgt ist eine Resveratrolstudie von Fusser, et al. 2011. Hier wurde den Tieren das Polyphenol Resveratrol über eine sechsmonatige Fütterung oder für 7 Tage über Schlundsondierung verabreicht: In beiden Ansätzen konnte eine erhöhte Genexpression von SOD1 festgestellt werden. Außer SOD1 waren auch die mRNA Spiegel von SOD2, SOD3, HO1 und GPX erhöht. Dies sind Gene die über den Nrf2 Signalweg induziert werden können.

Die Studie zeigte außerdem als Resultat der erhöhten antioxidativen Antwort eine Senkung der DNA-Schäden in Wildtyp- und *Csb^{-/-} Ogg1^{-/-}* - Tieren sowie eine erniedrigte Mutationsfrequenz in der Leber. Außerdem war der Glutathiongehalt in der Leber der Mäuse sowie in immortalisierten Wildtyp-MEFs (Mausembryofibroblasten) nach Resveratrolgabe stark erhöht. Erhöhter oxidativer Stress bewirkt eine Konformationsänderung des Keap1 Proteins durch Oxidation bestimmter Cysteinreste (D'Amours, et al. 1999, Dinkova-Kostova, et al. 2002), der Transkriptionsfaktor Nrf2 wird freigesetzt und transloziert in den Zellkern. Dort kann Nrf2 an die ARE-Sequenz (antioxidative response Element) antioxidativer Gene binden und deren Expressionsrate steigern. Die Überproduktion von SOD zeigte in der Genexpressionsstudie dieser Arbeit (siehe Abbildung 4-22) keinen Einfluss auf die Genexpression anderer antioxidativer Gene. Endogene murine SOD1, SOD2, SOD3, Glutathionperoxidase, HO1, Katalase und Nrf2 sind in alten *Csb^{-/-}Ogg1^{-/-}* Tieren nicht erhöht. Auch diese Ergebnisse sprechen gegen einen erhöhten Spiegel an Wasserstoffperoxid, welches den Nrf2-Signalweg induzieren könnte (Purdom-

Dickinson, et al. 2007). Es kann geschlussfolgert werden, dass hier die humane Form der SOD1 allein für die Senkung der oxidativ gebildeten DNA-Schäden verantwortlich ist. Eine Erhöhung der Antwort anderer Antioxidantien, die nicht auf der Ebene der Genexpression zu finden ist, kann jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Ausblick: In dieser Studie wurde die Genexpression der Redoxhomöostase-Gene nur in alten Tieren untersucht, da dort ein Schutz der SOD vor der Akkumulation der DNA-Schäden gezeigt wurde (siehe Abschnitte 4.1.2.7. und 4.1.3.5). Es könnte ein Unterschied der Genexpression der Redoxhomöostase zwischen jungen und alten Mäusen bestehen unter der Annahme, daß ROS-Spiegel im Alter zunehmen (Bokov, et al. 2004). Als mögliche weitere Untersuchung könnte eine Erhöhung der genannten Antioxidantien auch mittels Western Blot auf Proteinebene geprüft werden, da oxidativer Stress auch durch posttranslationale Veränderungen an Proteinen eine antioxidative Antwort auslösen kann (Yamakura und Kawasaki 2010, Leitch, et al. 2012). Außerdem könnten wie bei der Studie von Fußer 2010, die Glutathionspiegel in den Zellen gemessen werden, die einen protektiven Effekt durch SOD1 Überexpression gegenüber oxidativ gebildeter DNA-Schäden im Zuge dieser Dissertationsarbeit zeigten: Hepatozyten und Nierenzellen alter $Csb^{-/-} Ogg1^{-/-}$ Tiere \pm hSOD1.

5.3 Induziert die Bildung von endogenen ROS während des Dopaminstoffwechsels endogen oxidative DNA-Schäden und kann eine Überexpression von MAO-A, MAO-B und DAT4 dies beeinflussen ?

Viele Untersuchungen deuten daraufhin, dass oxidativer Stress, ROS und oxidativ gebildete Schäden bei dem Alterungsprozess und speziell bei neurodegenerativen Erkrankungen wie etwa Parkinson eine große Rolle spielen. So wurden in den Gehirnen bei Parkinsonpatienten post mortem erhöhte Spiegel an oxidativ gebildeter DNA-Schäden (8-oxoG) gemessen (Sanchez-Ramos JR 1994, Alam, et al. 1997, Zhang, et al. 1999). Der Metabolismus von Dopamin setzt dopaminerge Neurone ständig unter oxidativen Stress, aus diesem Grund sind vermutlich die Dopamin-Homöostase und die ROS-Detoxifizierung von hoher Relevanz für die Parkinsonsche Erkrankung. Ob Dopaminspiegel über ROS-Bildung zu oxidativen Schäden, Genotoxizität in nukleärer DNA, zu Zelldegeneration und im Schluss zu Parkinson führt, ist umstritten. Jedoch sind oxidativer Stress und oxidativ gebildete DNA-Schäden bei dem Alterungsprozess und speziell bei neurodegenerativen Erkrankungen wie etwa Parkinson relevant (Jeppesen, et al. 2011, Hegde, et al. 2012, Dasuri, et al. 2013).

In dieser Arbeit sollte der Einfluss des Dopaminmetabolismus auf DNA-Schäden in chromosomaler, nukleärer DNA untersucht werden. Hierzu wurden Neuroblastoma-Zellen (SH-SY5Y) eingesetzt (siehe Abschnitt 3.1.74.2 und Neuhaus, et al. 2014), welche folgende Überexpression tragen:

- i) Dopamintransporter (SH-SY5Y DAT4)
- ii) Monoaminoxidase A (SH-SY5Y MAO-A)
- iii) Monoaminoxidase B (SH-SY5Y MAO-B)

Neuhaus, et al. 2014 zeigten in MAO-B überexprimierenden Mäusen die Generierung von mitochondrialen Deletionen und konnten in den überexprimierenden SH-SY5Y-Zellen nach Behandlung mit nur 20 μM Dopamin Deletionen in mitochondrialer DNA nachweisen. Diese Zellen wurden in der vorliegenden Arbeit mit verschiedenen hohen Dosen an Dopamin, mit Katalase und SOD versetzt und auf Fpg-sensitive Modifikationen untersucht. Die Hypothese hierbei ist, dass intrazellulär die Überexpression der beiden MAO-Enzyme eine höhere Umsetzung von Dopamin und somit eine höhere ROS-Konzentration bewirkt. Als Folge wurden oxidativ gebildete DNA-Schäden erwartet, die mithilfe der Alkalischen Elution messbar sein sollten.

Es konnte gezeigt werden, dass alle überexprimierenden Zellen höhere Basalspiegel an Fpg-sensitiven Läsionen vorweisen (Abbildung 4-24). Es wurde bei einer Inkubationszeit von 24h und einer Dopaminkonzentration von 40 μM eine Induktion von Fpg-sensitiven Läsionen in MAO-A und MAO-B überexprimierenden Zellen gemessen, die Überexpression des Dopamintransporters (DAT4) zeigte keinen Einfluss (Abbildung 4-25)

Fazeli, et al. 2011 konnten zeigen, dass 100 μM Dopamin Mikrokerne und 8-oxoG in einer Phäochromozytom-Zelllinie (PC12, aus der Ratte) induziert und dies durch eine Inhibition der MAO-Enzyme (durch *trans*-2-Phenylcyclopropylamin (PCPA) und Ro-16-6491 (ein MAO-B spezifischer Inhibitor)) revertiert werden kann. Außerdem zeigte die Arbeitsgruppe in MDCK-Zellen (Madin-Darby Canine kidney cells), die eine Überexpression des Dopamintransporters (DAT) aufweisen, erhöhte Spiegel an Mikrokernen im Vergleich zu der Kontrollzelllinie.

In den hier beschriebenen Untersuchungen konnten bei einer höheren Dopaminkonzentration (100 μM) und Inkubationsdauer (24 h) die DNA-Schäden nicht mehr analysiert werden, da die Zellen in die Apoptose gehen (Abbildung 4-29). Das Medium färbte sich in allen Proben bräunlich durch die Bildung von Neuromelanin (Abbildung 4-27, siehe auch Abschnitt 1.1.6). Die Toxizität wird hier extrazellulär durch die Autoxidation hervorgerufen und kann selbst durch eine Inkubation mit hohen Dosen an Katalase und SOD nicht verhindert werden. Es bilden sich sehr reaktive

Chinone und ROS (Graham 1978, Cohen 1983). Junn und Mouradian 2001 wiesen die Induktion von Apoptose in SH-SY5Y Zellen nach einer 12h Behandlung mit 100 μm und 200 μm Dopamin nach. Die Spaltung von Caspase und PARP sowie eine p38 Aktivierung konnte durch die Inkubation von NAC (N-Acetylcystein) verhindert werden. Auch die Zugabe von Nomifensine, einem DAT Inhibitor steigerte das Zellüberleben. Ein weiterer Hinweis auf die Genotoxizität von Dopamin beschrieben Levay und Bodell 1993 in HL-60 Zellen (*Human promyelocytic leukemia cells*), sowie in mehreren menschlichen Glioblastoma Zelllinien: nach einer 24stündigen Dopaminbehandlung mit 250 μm konnten sie die Bildung von DNA-Addukten nachweisen. Alle diese Daten deuten auf eine genotoxische Wirkung von Dopamin hin. Moldeus, et al. 1983 konnten mit 263 μm Dopamin Einzelstrangbrüche in humanen Fibroblasten induzieren und sogar nach einer Dopaminpause eine Reparatur feststellen. Keinen Einfluss einer Dopaminbehandlung beobachtete jedoch dieselbe Arbeitsgruppe im AMES Test und hinsichtlich Schwesterchromatidaustausch. Auch konnte eine i.v. Applikation von Dopamin in Mäusen und Ratten keine Mikrokerne im Knochenmark induzieren. Die Mutagenität von Dopamin konnte nur in cytotoxisch hohen Dosen von 100 μm im Maus Lymphoma Test gezeigt werden. Die Toxizität von hohen Dosen Dopamin wurde in dieser Arbeit durch den Proliferationsversuch bestätigt, der Proliferationsfaktor nahm dosisabhängig ab, die Inkubation mit Antioxidantien zeigte nur wenig Schutz (Abbildung 4-29). Es kann geschlossen werden, dass durch erhöhte MAO-A und MAO-B endogen ROS gebildet werden, die die Bildung Fpg-sensitiver Läsionen hervorrufen. In hohen Dosen jedoch stehen die Autoxidation von Dopamin und die Neuromelaninbildung im Vordergrund, die eine Apoptose induzieren.

Die unterschiedlichen Studienergebnisse bzgl. der Toxizität durch Dopamin lassen sich durch die unterschiedlich verwendeten Modelle und die noch unvollständige Aufklärung des Dopaminmetabolismus erklären (Merits 1976, Kopin 1985, Mannisto, et al. 1992, Eisenhofer, et al. 2004). Es gibt hohe Unterschiede in der Enzymausstattung der Zelllinien, und auch die Spezieswahl spielt eine große Rolle. Zum Beispiel ist die Expression der MAOs in den Spezies unterschiedlich: Im Mensch wird Dopamin hauptsächlich durch die MAO-B und nur zu einem geringen Teil von MAO-A metabolisiert, in Ratten ist überwiegend MAO-A für die Umsetzung von Dopamin zuständig (Napolitano, et al. 1995). In Zelllinien kann auch die Rezeptor-, Transporter-, und die Enzymausstattung der MAOs sowie die des antioxidativen Systems variieren.

Ausblick: SH-SY5Y Zellen sind ein weit verbreitetes Parkinson-Zellkulturmodell, die Ergebnisse sollten jedoch in anderen Zellen überprüft werden. Zum Beispiel könnten zusätzlich LUHMES-Zellen (Lund Human MESencephalic) auf die genotoxische Wirkung von Dopamin untersucht werden: Sie wurden generiert aus 8-Wochen altem fötalem,

menschlichem, ventralem, mesencephalem Gewebe. Der Vorteil dieser Zelllinie ist: Sie ist menschlichen Ursprungs, stellt keine Krebszelllinie dar und kann in postmitotische Zellen ausdifferenzieren. Sie hat dopaminerge Eigenschaften in Morphologie, exprimiert neuronale und dopaminerge Marker und zeigt elektrophysiologische Eigenschaften (Scholz, et al. 2011). Ein Nachteil dieser Zelllinie ist jedoch, dass Sie durch das Einbringen von *v-myc* immortalisiert wurde und dadurch keine primäre Zelllinie mehr darstellt.

6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte der Einfluss einer Überproduktion von humaner Superoxiddismutase 1 (hSOD1) auf die Spiegel der DNA-Schäden in verschiedenen Geweben von transgenen Mäusen untersucht werden. Tiere die eine Defizienz des Ogg1- und Csb- Proteins aufweisen und deshalb oxidative Purinmodifikationen nicht oder nur schwer reparieren können, akkumulieren 8-oxoG im Laufe ihres Lebens (Osterod, et al. 2001). Aus diesem Grund sind diese ein gutes Modell, um protektive Eigenschaften von Antioxidantien wie z.B. Substanzen oder Enzymen zu untersuchen. Fusser, et al. 2011 konnten beispielsweise zeigen, dass das pflanzliche Polyphenol Resveratrol die endogenen Spiegel an 8-oxoG sowie die spontanen Mutationsraten im *Lac I*-Gen senken kann.

Um den Einfluss von hSOD1 *in vivo* zu untersuchen, wurden in zwei Zuchtschritten 4 Mausgenotypen generiert, nämlich *Csb*^{-/-} *Ogg1*^{-/-} und *Csb*^{+/-} *Ogg1*^{+/-} Mäuse jeweils mit und ohne hSOD1 Überexpression. Diese wurden in verschiedenen Altersstufen auf die Basalspiegel oxidativ gebildeter Schäden (Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Modifikationen) in der Leber, der Niere und der Milz untersucht. Die Genotypen wurden zunächst charakterisiert und die hSOD1-Überexpression mittels qRT-PCR, Western Blot und Enzymaktivitätsbestimmung verifiziert.

Es konnte an diesen Tieren erstmalig gezeigt werden, dass SOD die Generierung von DNA-Schäden *in vivo* mit zunehmendem Alter der Tiere senkt und dass deshalb Superoxid eine der reaktiven Sauerstoffspezies ist, die unter physiologischen Bedingungen für die DNA-Schäden verantwortlich ist. Außerdem kann ein möglicher toxischer Effekt der Überproduktion von SOD ausgeschlossen werden. Erhöhte Spiegel an oxidativen DNA-Schäden durch womöglich erhöhte Spiegel an H₂O₂ konnten in dieser Studie nicht beobachtet werden. Eine Messung der Genexpression anderer antioxidativer Enzyme wie Katalase, SOD2 und SOD3, GPX oder HO1 sind an diesem Effekt nicht beteiligt. Auch konnte kein Einfluss des redoxsensitiven Transkriptionsfaktors Nrf2 gezeigt werden.

Um mögliche Quellen der für die oxidativ gebildeten DNA-Schäden verantwortlichen ROS zu identifizieren, wurde der Einfluss des Dopaminstoffwechsels untersucht. Während des Dopaminmetabolismus werden intrazellulär Reaktive Sauerstoffspezies (H₂O₂ und O₂⁻) gebildet und tragen sehr wahrscheinlich zur Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson bei. In dem gängigen Parkinson-

Zellkulturmodell SH-SY5Y konnte keine Erhöhung von oxidativ gebildeten Schäden in nukleärer DNA nach Dopaminbehandlung nachgewiesen werden. Eine Überexpression der dopaminmetabolisierenden Enzyme MAO-A und MAO-B zeigt bei niedrigen Dosen Dopamin eine leichte jedoch nicht signifikante Erhöhung der Fpg-sensitiven Modifikationen. Die Überproduktion des Dopamintransporters zeigte keinen Effekt nach Dopaminzugabe. Es kann geschlossen werden, dass durch erhöhte MAO-A und MAO-B endogen ROS gebildet werden, die die Bildung Fpg-sensitiver Läsionen hervorrufen. Bei hohen Dosen und langer Inkubationszeit steht die Dopaminautoxidation, anschließende Neuromelaninbildung und als Konsequenz Apoptose im Vordergrund.

7 Literaturverzeichnis

Aas, P. A., M. Otterlei, P. O. Falnes, C. B. Vagbo, F. Skorpen, M. Akbari, O. Sundheim, M. Bjoras, G. Slupphaug, E. Seeberg, H. E. Krokan, Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA, *Nature*, 421 (2003) 859-863.

Aburatani, H., Y. Hippo, T. Ishida, R. Takashima, C. Matsuba, T. Kodama, M. Takao, A. Yasui, K. Yamamoto, M. Asano, Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue, *Cancer research*, 57 (1997) 2151-2156.

Ahel, I., U. Rass, S. F. El-Khamisy, S. Katyal, P. M. Clements, P. J. McKinnon, K. W. Caldecott, S. C. West, The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates, *Nature*, 443 (2006) 713-716.

Ahnesorg, P., S. P. Jackson, The non-homologous end-joining protein Nej1p is a target of the DNA damage checkpoint, *DNA repair*, 6 (2007) 190-201.

Akerboom, T. P., M. Bilzer, H. Sies, The relationship of biliary glutathione disulfide efflux and intracellular glutathione disulfide content in perfused rat liver, *The Journal of biological chemistry*, 257 (1982) 4248-4252.

Al-Tassan, N., N. H. Chmiel, J. Maynard, N. Fleming, A. L. Livingston, G. T. Williams, A. K. Hodges, D. R. Davies, S. S. David, J. R. Sampson, J. P. Cheadle, Inherited variants of MYH associated with somatic G:C->T:A mutations in colorectal tumors, *Nature genetics*, 30 (2002) 227-232.

ALAAS, Laboratory Mouse Handbook, Memphis TN, USA, (American Association of Laboratory Animal Science), (2006).

Alam, Z. I., S. E. Daniel, A. J. Lees, D. C. Marsden, P. Jenner, B. Halliwell, A generalised increase in protein carbonyls in the brain in Parkinson's but not incidental Lewy body disease, *Journal of neurochemistry*, 69 (1997) 1326-1329.

Alam, Z. I., A. Jenner, S. E. Daniel, A. J. Lees, N. Cairns, C. D. Marsden, P. Jenner, B. Halliwell, Oxidative DNA damage in the parkinsonian brain: an apparent selective increase in 8-hydroxyguanine levels in substantia nigra, *Journal of neurochemistry*, 69 (1997) 1196-1203.

Allgayer, J., N. Kitsera, C. von der Lippen, B. Epe, A. Khobta, Modulation of base excision repair of 8-oxoguanine by the nucleotide sequence, *Nucleic acids research*, 41 (2013) 8559-8571.

Ambani, L. M., M. H. Van Woert, S. Murphy, Brain peroxidase and catalase in Parkinson disease, *Archives of neurology*, 32 (1975) 114-118.

Amstad, P., A. Peskin, G. Shah, M. E. Mirault, R. Moret, I. Zbinden, P. Cerutti, The balance between Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress, *Biochemistry*, 30 (1991) 9305-9313.

Applegate, L. A., P. Luscher, R. M. Tyrrell, Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells, *Cancer research*, 51 (1991) 974-978.

- Araki, M., C. Masutani, M. Takemura, A. Uchida, K. Sugasawa, J. Kondoh, Y. Ohkuma, F. Hanaoka, Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair, *The Journal of biological chemistry*, 276 (2001) 18665-18672.
- Arosio, P., S. Levi, Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage, *Free radical biology & medicine*, 33 (2002) 457-463.
- Bach, A. W., N. C. Lan, D. L. Johnson, C. W. Abell, M. E. Bembenek, S. W. Kwan, P. H. Seeburg, J. C. Shih, cDNA cloning of human liver monoamine oxidase A and B: molecular basis of differences in enzymatic properties, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85 (1988) 4934-4938.
- Balaban, R. S., S. Nemoto, T. Finkel, Mitochondria, oxidants, and aging, *Cell*, 120 (2005) 483-495.
- Ballmaier, D., B. Epe, Oxidative DNA damage induced by potassium bromate under cell-free conditions and in mammalian cells, *Carcinogenesis*, 16 (1995) 335-342.
- Banci, L., M. Benedetto, I. Bertini, R. Del Conte, M. Piccioli, M. S. Viezzoli, Solution structure of reduced monomeric Q133M2 copper, zinc superoxide dismutase (SOD). Why is SOD a dimeric enzyme?, *Biochemistry*, 37 (1998) 11780-11791.
- Biedler, J. L., L. Helson, B. A. Spengler, Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture, *Cancer research*, 33 (1973) 2643-2652.
- Bjoras, M., L. Luna, B. Johnsen, E. Hoff, T. Haug, T. Rognes, E. Seeberg, Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites, *The EMBO journal*, 16 (1997) 6314-6322.
- Bloch, C. A., F. M. Ausubel, Paraquat-mediated selection for mutations in the manganese-superoxide dismutase gene *sodA*, *Journal of bacteriology*, 168 (1986) 795-798.
- Boiteux, S., M. Guillet, Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*, *DNA repair*, 3 (2004) 1-12.
- Boiteux, S., T. R. O'Connor, J. Laval, Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli*: cloning and sequencing of the *fpg* structural gene and overproduction of the protein, *The EMBO journal*, 6 (1987) 3177-3183.
- Boiteux, S., T. R. O'Connor, F. Lederer, A. Gouyette, J. Laval, Homogeneous *Escherichia coli* FPG protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/aprimidinic sites, *The Journal of biological chemistry*, 265 (1990) 3916-3922.
- Bokov, A., A. Chaudhuri, A. Richardson, The role of oxidative damage and stress in aging, *Mechanisms of ageing and development*, 125 (2004) 811-826.
- Boveris, A., N. Oshino, B. Chance, The cellular production of hydrogen peroxide, *The Biochemical journal*, 128 (1972) 617-630.
- Bravard, A., M. Vacher, E. Moritz, L. Vaslin, J. Hall, B. Epe, J. P. Radicella, Oxidation status of human OGG1-S326C polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity, *Cancer research*, 69 (2009) 3642-3649.
- Brosh, R. M., Jr., V. A. Bohr, Human premature aging, DNA repair and RecQ helicases, *Nucleic acids research*, 35 (2007) 7527-7544.

- Burton, G. W., K. U. Ingold, Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 570 (1989) 7-22.
- Busuttil, R. A., A. M. Garcia, C. Cabrera, A. Rodriguez, Y. Suh, W. H. Kim, T. T. Huang, J. Vijg, Organ-specific increase in mutation accumulation and apoptosis rate in CuZn-superoxide dismutase-deficient mice, *Cancer research*, 65 (2005) 11271-11275.
- Cabreiro, F., D. Ackerman, R. Doonan, C. Araiz, P. Back, D. Papp, B. P. Braeckman, D. Gems, Increased life span from overexpression of superoxide dismutase in *Caenorhabditis elegans* is not caused by decreased oxidative damage, *Free radical biology & medicine*, 51 (2011) 1575-1582.
- Caldecott, K. W., Protein-protein interactions during mammalian DNA single-strand break repair, *Biochemical Society transactions*, 31 (2003) 247-251.
- Caldecott, K. W., Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair, *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 23 (2001) 447-455.
- Chang, L. Y., J. W. Slot, H. J. Geuze, J. D. Crapo, Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes, *The Journal of cell biology*, 107 (1988) 2169-2179.
- Chen, L., A. Elahi, J. Pow-Sang, P. Lazarus, J. Park, Association between polymorphism of human oxoguanine glycosylase 1 and risk of prostate cancer, *The Journal of urology*, 170 (2003) 2471-2474.
- Chomczynski, P., N. Sacchi, Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, *Analytical biochemistry*, 162 (1987) 156-159.
- Cohen, G., The pathobiology of Parkinson's disease: biochemical aspects of dopamine neuron senescence, *Journal of neural transmission. Supplementum*, 19 (1983) 89-103.
- Cooke, M. S., M. D. Evans, M. Dizdaroglu, J. Lunec, Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17 (2003) 1195-1214.
- Costa, V., E. Reis, A. Quintanilha, P. Moradas-Ferreira, Acquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the key role of the mitochondrial superoxide dismutase, *Archives of biochemistry and biophysics*, 300 (1993) 608-614.
- Cullinan, S. B., J. D. Gordan, J. Jin, J. W. Harper, J. A. Diehl, The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase, *Molecular and cellular biology*, 24 (2004) 8477-8486.
- Cullinan, S. B., D. Zhang, M. Hannink, E. Arvais, R. J. Kaufman, J. A. Diehl, Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival, *Molecular and cellular biology*, 23 (2003) 7198-7209.
- D'Amours, D., S. Desnoyers, I. D'Silva, G. G. Poirier, Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions, *The Biochemical journal*, 342 (Pt 2) (1999) 249-268.
- Daniels, D. S., T. T. Woo, K. X. Luu, D. M. Noll, N. D. Clarke, A. E. Pegg, J. A. Tainer, DNA binding and nucleotide flipping by the human DNA repair protein AGT, *Nature structural & molecular biology*, 11 (2004) 714-720.
- Dasuri, K., L. Zhang, J. N. Keller, Oxidative stress, neurodegeneration, and the balance of protein degradation and protein synthesis, *Free radical biology & medicine*, 62 (2013) 170-185.

David, S. S., V. L. O'Shea, S. Kundu, Base-excision repair of oxidative DNA damage, *Nature*, 447 (2007) 941-950.

Davidovic, L., M. Vodenicharov, E. B. Affar, G. G. Poirier, Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism, *Experimental cell research*, 268 (2001) 7-13.

de Rijk, M. C., W. A. Rocca, D. W. Anderson, M. O. Melcon, M. M. Breteler, D. M. Maraganore, A population perspective on diagnostic criteria for Parkinson's disease, *Neurology*, 48 (1997) 1277-1281.

Dexter, D. T., F. R. Wells, A. J. Lees, F. Agid, Y. Agid, P. Jenner, C. D. Marsden, Increased nigral iron content and alterations in other metal ions occurring in brain in Parkinson's disease, *Journal of neurochemistry*, 52 (1989) 1830-1836.

Dhenaut, A., S. Boiteux, J. P. Radicella, Characterization of the hOGG1 promoter and its expression during the cell cycle, *Mutation research*, 461 (2000) 109-118.

Dinkova-Kostova, A. T., W. D. Holtzclaw, R. N. Cole, K. Itoh, N. Wakabayashi, Y. Katoh, M. Yamamoto, P. Talalay, Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 (2002) 11908-11913.

Dizdaroglu, M., Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin, *Mutation research*, 275 (1992) 331-342.

Eiberger, W., B. Volkmer, R. Amouroux, C. Dherin, J. P. Radicella, B. Epe, Oxidative stress impairs the repair of oxidative DNA base modifications in human skin fibroblasts and melanoma cells, *DNA repair*, 7 (2008) 912-921.

Eisenhofer, G., I. J. Kopin, D. S. Goldstein, Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine, *Pharmacological reviews*, 56 (2004) 331-349.

El-Agamey, A., G. M. Lowe, D. J. McGarvey, A. Mortensen, D. M. Phillip, T. G. Truscott, A. J. Young, Carotenoid radical chemistry and antioxidant/pro-oxidant properties, *Archives of biochemistry and biophysics*, 430 (2004) 37-48.

Elahi, A., Z. Zheng, J. Park, K. Eyring, T. McCaffrey, P. Lazarus, The human OGG1 DNA repair enzyme and its association with orolaryngeal cancer risk, *Carcinogenesis*, 23 (2002) 1229-1234.

Elchuri, S., T. D. Oberley, W. Qi, R. S. Eisenstein, L. Jackson Roberts, H. Van Remmen, C. J. Epstein, T. T. Huang, CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life, *Oncogene*, 24 (2005) 367-380.

Elroy-Stein, O., Y. Bernstein, Y. Groner, Overproduction of human Cu/Zn-superoxide dismutase in transfected cells: extenuation of paraquat-mediated cytotoxicity and enhancement of lipid peroxidation, *The EMBO journal*, 5 (1986) 615-622.

Elroy-Stein, O., Y. Groner, Impaired neurotransmitter uptake in PC12 cells overexpressing human Cu/Zn-superoxide dismutase—implication for gene dosage effects in Down syndrome, *Cell*, 52 (1988) 259-267.

Epe, B., DNA damage profiles induced by oxidizing agents, *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, 127 (1996) 223-249.

- Epe, B., Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice?, *Biological chemistry*, 383 (2002) 467-475.
- Epe, B., J. Hegler, Oxidative DNA damage: endonuclease fingerprinting, *Methods in enzymology*, 234 (1994) 122-131.
- Epe, B., M. Pflaum, S. Boiteux, DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems, *Mutation research*, 299 (1993) 135-145.
- Eriksen, J., T. N. Jorgensen, U. Gether, Regulation of dopamine transporter function by protein-protein interactions: new discoveries and methodological challenges, *Journal of neurochemistry*, 113 (2010) 27-41.
- Essen, L. O., T. Klar, Light-driven DNA repair by photolyases, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 63 (2006) 1266-1277.
- Farinati, F., R. Cardin, M. Bortolami, D. Nitti, D. Basso, M. de Bernard, M. Cassaro, A. Sergio, M. Ruggie, Oxidative DNA damage in gastric cancer: CagA status and OGG1 gene polymorphism, *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 123 (2008) 51-55.
- Faucheux, B. A., M. E. Martin, C. Beaumont, J. J. Hauw, Y. Agid, E. C. Hirsch, Neuromelanin associated redox-active iron is increased in the substantia nigra of patients with Parkinson's disease, *Journal of neurochemistry*, 86 (2003) 1142-1148.
- Fazeli, G., R. G. Oli, N. Schupp, H. Stopper, The role of the dopamine transporter in dopamine-induced DNA damage, *Brain pathology*, 21 (2011) 237-248.
- Fortini, P., E. Dogliotti, Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways, *DNA repair*, 6 (2007) 398-409.
- Fridovich, I., Superoxide radical and superoxide dismutases, *Annual review of biochemistry*, 64 (1995) 97-112.
- Frosina, G., P. Fortini, O. Rossi, F. Carrozzino, G. Raspaglio, L. S. Cox, D. P. Lane, A. Abbondandolo, E. Dogliotti, Two pathways for base excision repair in mammalian cells, *The Journal of biological chemistry*, 271 (1996) 9573-9578.
- Fukui, H., C. T. Moraes, The mitochondrial impairment, oxidative stress and neurodegeneration connection: reality or just an attractive hypothesis?, *Trends in neurosciences*, 31 (2008) 251-256.
- Furukawa, M., Y. Xiong, BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 ligase, *Molecular and cellular biology*, 25 (2005) 162-171.
- Fußler, Einfluss von Resveratrol auf oxidative DNA-Schäden und Mutagenese *in vivo*, Dissertation, Mainz, (2010).
- Fusser, M., G. J. Nesse, A. Khobta, N. Xia, H. Li, A. Klungland, B. Epe, Spontaneous mutagenesis in *Csb(m/m)Ogg1(-/)(/)(-)* mice is attenuated by dietary resveratrol, *Carcinogenesis*, 32 (2011) 80-85.
- Galiatsatos, P., W. D. Foulkes, Familial adenomatous polyposis, *The American journal of gastroenterology*, 101 (2006) 385-398.
- Graham, D. G., Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones, *Molecular pharmacology*, 14 (1978) 633-643.

- Gredilla, R., DNA damage and base excision repair in mitochondria and their role in aging, *Journal of aging research*, 2011 (2010) 257093.
- Halliwell, B., O. I. Aruoma, DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems, *FEBS letters*, 281 (1991) 9-19.
- Hamilton, M. L., H. Van Remmen, J. A. Drake, H. Yang, Z. M. Guo, K. Kewitt, C. A. Walter, A. Richardson, Does oxidative damage to DNA increase with age?, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98 (2001) 10469-10474.
- Hashiguchi, K., J. A. Stuart, N. C. de Souza-Pinto, V. A. Bohr, 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 research*, 32 (2004) 5596-5608.
- Heeres, J. T., P. J. Hergenrother, Poly(ADP-ribose) makes a date with death, *Current opinion in chemical biology*, 11 (2007) 644-653.
- Hegde, M. L., A. K. Mantha, T. K. Hazra, K. K. Bhakat, S. Mitra, B. Szczesny, Oxidative genome damage and its repair: implications in aging and neurodegenerative diseases, *Mechanisms of ageing and development*, 133 (2012) 157-168.
- Helleday, T., E. Petermann, C. Lundin, B. Hodgson, R. A. Sharma, DNA repair pathways as targets for cancer therapy, *Nature reviews. Cancer*, 8 (2008) 193-204.
- Hengstler, J. G., D. Utesch, P. Steinberg, K. L. Platt, B. Diener, M. Ringel, N. Swales, T. Fischer, K. Biefang, M. Gerl, T. Bottger, F. Oesch, Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction, *Drug metabolism reviews*, 32 (2000) 81-118.
- Henn, I. H., L. Bouman, J. S. Schlehe, A. Schlierf, J. E. Schramm, E. Wegener, K. Nakaso, C. Culmsee, B. Berninger, D. Krappmann, J. Tatzelt, K. F. Winklhofer, Parkin mediates neuroprotection through activation of I κ B kinase/nuclear factor-kappaB signaling, *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27 (2007) 1868-1878.
- Hoeijmakers, J. H., Genome maintenance mechanisms for preventing cancer, *Nature*, 411 (2001) 366-374.
- Hollenbach, S., A. Dhenaut, I. Eckert, J. P. Radicella, B. Epe, Overexpression of Ogg1 in mammalian cells: effects on induced and spontaneous oxidative DNA damage and mutagenesis, *Carcinogenesis*, 20 (1999) 1863-1868.
- Huang, H. C., T. Nguyen, C. B. Pickett, Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription, *The Journal of biological chemistry*, 277 (2002) 42769-42774.
- Huang, T. T., E. J. Carlson, A. M. Gillespie, Y. Shi, C. J. Epstein, Ubiquitous overexpression of CuZn superoxide dismutase does not extend life span in mice, *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 55 (2000) B5-9.
- Hwang, C., A. J. Sinskey, H. F. Lodish, Oxidized redox state of glutathione in the endoplasmic reticulum, *Science*, 257 (1992) 1496-1502.
- Inoue, E., K. Tano, H. Yoshii, J. Nakamura, S. Tada, M. Watanabe, M. Seki, T. Enomoto, SOD1 Is Essential for the Viability of DT40 Cells and Nuclear SOD1 Functions as a Guardian of Genomic DNA, *Journal of nucleic acids*, 2010 (2010).

Itoh, K., N. Wakabayashi, Y. Katoh, T. Ishii, K. Igarashi, J. D. Engel, M. Yamamoto, Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain, *Genes & development*, 13 (1999) 76-86.

Jacobs, A. L., P. Schar, DNA glycosylases: in DNA repair and beyond, *Chromosoma*, 121 (2012) 1-20.

Jeppesen, D. K., V. A. Bohr, T. Stevnsner, DNA repair deficiency in neurodegeneration, *Progress in neurobiology*, 94 (2011) 166-200.

Jezowska-Bojczuk, M., W. Szczepanik, W. Lesniak, J. Ciesiolka, J. Wrzesinski, W. Bal, DNA and RNA damage by Cu(II)-amikacin complex, *European journal of biochemistry / FEBS*, 269 (2002) 5547-5556.

Jiang, H., Y. Ren, J. Zhao, J. Feng, Parkin protects human dopaminergic neuroblastoma cells against dopamine-induced apoptosis, *Human molecular genetics*, 13 (2004) 1745-1754.

Johannesson, T., J. Kristinsson, G. Torsdottir, J. Snaedal, [Ceruloplasmin (Cp) and iron in connection with Parkinson's disease (PD) and Alzheimer's disease (AD)], *Laeknabladid*, 98 (2012) 531-537.

Junn, E., M. M. Mouradian, Apoptotic signaling in dopamine-induced cell death: the role of oxidative stress, p38 mitogen-activated protein kinase, cytochrome c and caspases, *Journal of neurochemistry*, 78 (2001) 374-383.

Kamenisch, Y., M. Foustieri, J. Knoch, A. K. von Thaler, B. Fehrenbacher, H. Kato, T. Becker, M. E. Dolle, R. Kuiper, M. Majora, M. Schaller, G. T. van der Horst, H. van Steeg, M. Rocken, D. Rapaport, J. Krutmann, L. H. Mullenders, M. Berneburg, Proteins of nucleotide and base excision repair pathways interact in mitochondria to protect from loss of subcutaneous fat, a hallmark of aging, *The Journal of experimental medicine*, 207 (2010) 379-390.

Karahalil, B., A. B. Engin, E. Coskun, Could 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 Ser326Cys polymorphism be a biomarker of susceptibility in cancer?, *Toxicology and industrial health*, (2012).

Kedziora, J., G. Bartosz, Down's syndrome: a pathology involving the lack of balance of reactive oxygen species, *Free radical biology & medicine*, 4 (1988) 317-330.

Khobta, A., T. Lingg, I. Schulz, D. Warzen, N. Kitsera, B. Epe, Mouse CSB protein is important for gene expression in the presence of a single-strand break in the non-transcribed DNA strand, *DNA repair*, 9 (2010) 985-993.

Kirkman, H. N., G. F. Gaetani, Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries, *Trends in biochemical sciences*, 32 (2007) 44-50.

Kish, S. J., C. Morito, O. Hornykiewicz, Glutathione peroxidase activity in Parkinson's disease brain, *Neuroscience letters*, 58 (1985) 343-346.

Kitada, T., S. Asakawa, N. Hattori, H. Matsumine, Y. Yamamura, S. Minoshima, M. Yokochi, Y. Mizuno, N. Shimizu, Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism, *Nature*, 392 (1998) 605-608.

Kitsera, N., D. Stathis, B. Luhnsdorf, H. Muller, T. Carell, B. Epe, A. Khobta, 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 research*, 39 (2011) 5926-5934.

- Klungland, A., S. Bjelland, Oxidative damage to purines in DNA: role of mammalian Ogg1, DNA repair, 6 (2007) 481-488.
- Klungland, A., T. Lindahl, Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1), The EMBO journal, 16 (1997) 3341-3348.
- Klungland, A., I. Rosewell, S. Hollenbach, E. Larsen, G. Daly, B. Epe, E. Seeberg, T. Lindahl, D. E. Barnes, Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96 (1999) 13300-13305.
- Kobayashi, A., M. I. Kang, Y. Watai, K. I. Tong, T. Shibata, K. Uchida, M. Yamamoto, Oxidative and electrophilic stresses activate Nrf2 through inhibition of ubiquitination activity of Keap1, Molecular and cellular biology, 26 (2006) 221-229.
- Kohn, K. W., L. C. Erickson, R. A. Ewig, C. A. Friedman, Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution, Biochemistry, 15 (1976) 4629-4637.
- Kohno, T., H. Kunitoh, K. Toyama, S. Yamamoto, A. Kuchiba, D. Saito, N. Yanagitani, S. Ishihara, R. Saito, J. Yokota, Association of the OGG1-Ser326Cys polymorphism with lung adenocarcinoma risk, Cancer science, 97 (2006) 724-728.
- Kojo, S., Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress, Current medicinal chemistry, 11 (2004) 1041-1064.
- Kopin, I. J., Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance, Pharmacological reviews, 37 (1985) 333-364.
- Kouzminova, E. A., A. Kuzminov, Fragmentation of replicating chromosomes triggered by uracil in DNA, Journal of molecular biology, 355 (2006) 20-33.
- Kovacic, P., J. D. Jacintho, Mechanisms of carcinogenesis: focus on oxidative stress and electron transfer, Current medicinal chemistry, 8 (2001) 773-796.
- Krimm, Untersuchung der Rolle reaktiver Sauerstoffspezies und DNA-Schäden bei Hypertonie und Arteriosklerose, Dissertation, Mainz, (2014).
- Kunz, C., Y. Saito, P. Schar, DNA Repair in mammalian cells: Mismatched repair: variations on a theme, Cellular and molecular life sciences : CMLS, 66 (2009) 1021-1038.
- Kuzminov, A., Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98 (2001) 8241-8246.
- Laine, J. P., J. M. Egly, Initiation of DNA repair mediated by a stalled RNA polymerase II, The EMBO journal, 25 (2006) 387-397.
- Lebovitz, R. M., H. Zhang, H. Vogel, J. Cartwright, Jr., L. Dionne, N. Lu, S. Huang, M. M. Matzuk, Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 93 (1996) 9782-9787.
- Lee, J. C., Y. O. Son, P. Pratheeshkumar, X. Shi, Oxidative stress and metal carcinogenesis, Free radical biology & medicine, 53 (2012) 742-757.
- Lee, J. M., J. M. Hanson, W. A. Chu, J. A. Johnson, Phosphatidylinositol 3-kinase, not extracellular signal-regulated kinase, regulates activation of the antioxidant-responsive

element in IMR-32 human neuroblastoma cells, *The Journal of biological chemistry*, 276 (2001) 20011-20016.

Lee, W. L., J. Y. Huang, L. F. Shyur, Phytoagents for cancer management: regulation of nucleic acid oxidation, ROS, and related mechanisms, *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2013 (2013) 925804.

Leitch, J. M., C. X. Li, J. A. Baron, L. M. Matthews, X. Cao, P. J. Hart, V. C. Culotta, Post-translational modification of Cu/Zn superoxide dismutase under anaerobic conditions, *Biochemistry*, 51 (2012) 677-685.

Lemieux, C. L., G. R. Douglas, J. Gingerich, S. Phonethepswath, D. K. Torous, S. D. Dertinger, D. H. Phillips, V. M. Arlt, P. A. White, Simultaneous measurement of benzo[a]pyrene-induced Pig-a and lacZ mutations, micronuclei and DNA adducts in Muta Mouse, *Environmental and molecular mutagenesis*, 52 (2011) 756-765.

Levay, G., W. J. Bodell, Detection of dopamine-DNA adducts: potential role in Parkinson's disease, *Carcinogenesis*, 14 (1993) 1241-1245.

Li, G. M., Mechanisms and functions of DNA mismatch repair, *Cell research*, 18 (2008) 85-98.

Li, Y., Z. Cao, The neuroprotectant ebselen inhibits oxidative DNA damage induced by dopamine in the presence of copper ions, *Neuroscience letters*, 330 (2002) 69-73.

Li, Y., T. T. Huang, E. J. Carlson, S. Melov, P. C. Ursell, J. L. Olson, L. J. Noble, M. P. Yoshimura, C. Berger, P. H. Chan, D. C. Wallace, C. J. Epstein, Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase, *Nature genetics*, 11 (1995) 376-381.

Lohr, J. B., Oxygen radicals and neuropsychiatric illness. Some speculations, *Archives of general psychiatry*, 48 (1991) 1097-1106.

Loschen, G., L. Flohe, B. Chance, Respiratory chain linked H₂O₂ production in pigeon heart mitochondria, *FEBS letters*, 18 (1971) 261-264.

Lowe J, G. L., Leigh PN, Disorders of movement and system degeneration., Graham DI Lantos PL eds. *Greenfield's Neuropathology*, (1997) pp 281-366 Arnold, London.

Lu, R., H. M. Nash, G. L. Verdine, A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer, *Current biology : CB*, 7 (1997) 397-407.

Luck, A. N., A. B. Mason, Transferrin-mediated cellular iron delivery, *Current topics in membranes*, 69 (2012) 3-35.

Mallajosyula, J. K., D. Kaur, S. J. Chinta, S. Rajagopalan, A. Rane, D. G. Nicholls, D. A. Di Monte, H. Macarthur, J. K. Andersen, MAO-B elevation in mouse brain astrocytes results in Parkinson's pathology, *PloS one*, 3 (2008) e1616.

Mannisto, P. T., I. Ulmanen, K. Lundstrom, J. Taskinen, J. Tenhunen, C. Tilgmann, S. Kaakkola, Characteristics of catechol O-methyl-transferase (COMT) and properties of selective COMT inhibitors, *Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques*, 39 (1992) 291-350.

Marklund, S. L., Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79 (1982) 7634-7638.

Marklund, S. L., E. Holme, L. Hellner, Superoxide dismutase in extracellular fluids, *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 126 (1982) 41-51.

Marti, T. M., C. Kunz, O. Fleck, DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways, *Journal of cellular physiology*, 191 (2002) 28-41.

Masella, R., R. Di Benedetto, R. Vari, C. Filesi, C. Giovannini, Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes, *The Journal of nutritional biochemistry*, 16 (2005) 577-586.

Mates, J. M., C. Perez-Gomez, I. Nunez de Castro, Antioxidant enzymes and human diseases, *Clinical biochemistry*, 32 (1999) 595-603.

McCord, J. M., I. Fridovich, Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein), *The Journal of biological chemistry*, 244 (1969) 6049-6055.

McCullough, A. K., M. L. Dodson, R. S. Lloyd, Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures, *Annual review of biochemistry*, 68 (1999) 255-285.

McGoldrick, J. P., Y. C. Yeh, M. Solomon, J. M. Essigmann, A. L. Lu, Characterization of a mammalian homolog of the *Escherichia coli* MutY mismatch repair protein, *Molecular and cellular biology*, 15 (1995) 989-996.

Merits, I., Formation and metabolism of [¹⁴C] dopamine 3-O-sulfate in dog, rat and guinea pig, *Biochemical pharmacology*, 25 (1976) 829-833.

Midorikawa, K., S. Kawanishi, Superoxide dismutases enhance H₂O₂-induced DNA damage and alter its site specificity, *FEBS letters*, 495 (2001) 187-190.

Moldeus, P., M. Nordenskjold, G. Bolcsfoldi, A. Eiche, U. Haglund, B. Lambert, Genetic toxicity of dopamine, *Mutation research*, 124 (1983) 9-24.

Moore, J. K., J. E. Haber, Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*, *Molecular and cellular biology*, 16 (1996) 2164-2173.

Moriya, M., Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C→T.A transversions in simian kidney cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 (1993) 1122-1126.

Moroni, F., Poly(ADP-ribose)polymerase 1 (PARP-1) and postischemic brain damage, *Current opinion in pharmacology*, 8 (2008) 96-103.

Mortensen, A., L. H. Skibsted, T. G. Truscott, The interaction of dietary carotenoids with radical species, *Archives of biochemistry and biophysics*, 385 (2001) 13-19.

Mu, D., D. S. Hsu, A. Sancar, Reaction mechanism of human DNA repair excision nuclease, *The Journal of biological chemistry*, 271 (1996) 8285-8294.

Muftuoglu, M., N. C. de Souza-Pinto, A. Dogan, M. Aamann, T. Stevnsner, I. Rybanska, G. Kirkali, M. Dizdaroglu, V. A. Bohr, Cockayne syndrome group B protein stimulates repair of formamidopyrimidines by NEIL1 DNA glycosylase, *The Journal of biological chemistry*, 284 (2009) 9270-9279.

- Munoz, P., S. Huenchuguala, I. Paris, J. Segura-Aguilar, Dopamine oxidation and autophagy, Parkinson's disease, 2012 (2012) 920953.
- Mustacich, D., G. Powis, Thioredoxin reductase, *The Biochemical journal*, 346 Pt 1 (2000) 1-8.
- Napolitano, A., A. M. Cesura, M. Da Prada, The role of monoamine oxidase and catechol O-methyltransferase in dopaminergic neurotransmission, *Journal of neural transmission. Supplementum*, 45 (1995) 35-45.
- Nash, H. M., R. Lu, W. S. Lane, G. L. Verdine, The critical active-site amine of the human 8-oxoguanine DNA glycosylase, hOgg1: direct identification, ablation and chemical reconstitution, *Chemistry & biology*, 4 (1997) 693-702.
- Neuhaus, J. F., O. R. Baris, S. Hess, N. Moser, H. Schroder, S. J. Chinta, J. K. Andersen, P. Kloppenburg, R. J. Wiesner, Catecholamine metabolism drives generation of mitochondrial DNA deletions in dopaminergic neurons, *Brain : a journal of neurology*, 137 (2014) 354-365.
- Nguyen, T., P. Nioi, C. B. Pickett, The Nrf2-antioxidant response element signaling pathway and its activation by oxidative stress, *The Journal of biological chemistry*, 284 (2009) 13291-13295.
- Nichols, A. F., A. Sancar, Purification of PCNA as a nucleotide excision repair protein, *Nucleic acids research*, 20 (1992) 2441-2446.
- Nishioka, K., T. Ohtsubo, H. Oda, T. Fujiwara, D. Kang, K. Sugimachi, Y. Nakabeppu, Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs, *Molecular biology of the cell*, 10 (1999) 1637-1652.
- Nocentini, S., Rejoining kinetics of DNA single- and double-strand breaks in normal and DNA ligase-deficient cells after exposure to ultraviolet C and gamma radiation: an evaluation of ligating activities involved in different DNA repair processes, *Radiation research*, 151 (1999) 423-432.
- OECD_TG_474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, (1997).
- Omar, B. A., N. M. Gad, M. C. Jordan, S. P. Striplin, W. J. Russell, J. M. Downey, J. M. McCord, Cardioprotection by Cu,Zn-superoxide dismutase is lost at high doses in the reoxygenated heart, *Free radical biology & medicine*, 9 (1990) 465-471.
- Omar, B. A., J. M. McCord, The cardioprotective effect of Mn-superoxide dismutase is lost at high doses in the postischemic isolated rabbit heart, *Free radical biology & medicine*, 9 (1990) 473-478.
- Osterod, Einfluss genetischer Defekte auf die Reparatur oxidativer DNA-Schäden in Säugerzellen, Dissertation, Mainz, (2002).
- Osterod, M., S. Hollenbach, J. G. Hengstler, D. E. Barnes, T. Lindahl, B. Epe, Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1) deficient mice, *Carcinogenesis*, 22 (2001) 1459-1463.
- Parsons, J. L., G. L. Dianov, Co-ordination of base excision repair and genome stability, *DNA repair*, 12 (2013) 326-333.
- Payne, A., G. Chu, Xeroderma pigmentosum group E binding factor recognizes a broad spectrum of DNA damage, *Mutation research*, 310 (1994) 89-102.

- Paz-Elizur, T., R. Ben-Yosef, D. Elinger, A. Vexler, M. Krupsky, A. Berrebi, A. Shani, E. Schechtman, L. Freedman, Z. Livneh, Reduced repair of the oxidative 8-oxoguanine DNA damage and risk of head and neck cancer, *Cancer research*, 66 (2006) 11683-11689.
- Paz-Elizur, T., M. Krupsky, S. Blumenstein, D. Elinger, E. Schechtman, Z. Livneh, DNA repair activity for oxidative damage and risk of lung cancer, *Journal of the National Cancer Institute*, 95 (2003) 1312-1319.
- Perry, T. L., D. V. Godin, S. Hansen, Parkinson's disease: a disorder due to nigral glutathione deficiency?, *Neuroscience letters*, 33 (1982) 305-310.
- Petermann, E., M. Ziegler, S. L. Oei, ATP-dependent selection between single nucleotide and long patch base excision repair, *DNA repair*, 2 (2003) 1101-1114.
- Peters, J. M., C. Cheung, F. J. Gonzalez, Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and liver cancer: where do we stand?, *Journal of molecular medicine*, 83 (2005) 774-785.
- Petrozzi, L., C. Lucetti, R. Scarpato, G. Gambaccini, F. Trippi, S. Bernardini, P. Del Dotto, L. Migliore, U. Bonuccelli, Cytogenetic alterations in lymphocytes of Alzheimer's disease and Parkinson's disease patients, *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 23 Suppl 2 (2002) S97-98.
- Pflaum, Oxidative DNA-modifikationen durch langwelliges UV-Licht und sichtbares Licht, Dissertation, Würzburg, (1996).
- Pflaum, M., Oxidative DNA-Modifikationen durch langwelliges UV-Licht und sichtbares Licht, Dissertation Pharmakologie & Toxikologie, Universität Würzburg (1996).
- Popanda, O., H. W. Thielmann, The function of DNA polymerases in DNA repair synthesis of ultraviolet-irradiated human fibroblasts, *Biochimica et biophysica acta*, 1129 (1992) 155-160.
- Pryor, W. A., Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials, *Free radical biology & medicine*, 28 (2000) 141-164.
- Purdom-Dickinson, S. E., E. V. Sheveleva, H. Sun, Q. M. Chen, Translational control of nrf2 protein in activation of antioxidant response by oxidants, *Molecular pharmacology*, 72 (2007) 1074-1081.
- Qu, W., J. Pi, M. P. Waalkes, Metallothionein blocks oxidative DNA damage in vitro, *Archives of toxicology*, 87 (2013) 311-321.
- Radicella, J. P., C. Dherin, C. Desmaze, M. S. Fox, S. Boiteux, Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (1997) 8010-8015.
- Rao, K. S., Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders, *Indian journal of biochemistry & biophysics*, 46 (2009) 9-15.
- Rass, U., I. Ahel, S. C. West, Defective DNA repair and neurodegenerative disease, *Cell*, 130 (2007) 991-1004.
- Retsky, K. L., K. Chen, J. Zeind, B. Frei, Inhibition of copper-induced LDL oxidation by vitamin C is associated with decreased copper-binding to LDL and 2-oxo-histidine formation, *Free radical biology & medicine*, 26 (1999) 90-98.

- Rich, T., R. L. Allen, A. H. Wyllie, Defying death after DNA damage, *Nature*, 407 (2000) 777-783.
- Rick, W., *Klinische Chemie und Mikroskopie*, New York, Heidelberg, Springer Verlag, (1977).
- Riederer, P., E. Sofic, W. D. Rausch, B. Schmidt, G. P. Reynolds, K. Jellinger, M. B. Youdim, Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains, *Journal of neurochemistry*, 52 (1989) 515-520.
- Robertson, A. B., A. Klungland, T. Rognes, I. Leiros, DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66 (2009) 981-993.
- Roldan-Arjona, T., Y. F. Wei, K. C. Carter, A. Klungland, C. Anselmino, R. P. Wang, M. Augustus, T. Lindahl, Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (1997) 8016-8020.
- Rosenquist, T. A., D. O. Zharkov, A. P. Grollman, Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (1997) 7429-7434.
- Russo, M. T., G. De Luca, P. Degan, E. Parlanti, E. Dogliotti, D. E. Barnes, T. Lindahl, H. Yang, J. H. Miller, M. Bignami, Accumulation of the oxidative base lesion 8-hydroxyguanine in DNA of tumor-prone mice defective in both the Myh and Ogg1 DNA glycosylases, *Cancer research*, 64 (2004) 4411-4414.
- Rustgi, A. K., The genetics of hereditary colon cancer, *Genes & development*, 21 (2007) 2525-2538.
- Ryter, S. W., J. Alam, A. M. Choi, Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications, *Physiological reviews*, 86 (2006) 583-650.
- Sanchez-Ramos JR, O. E. a. A. B., A marker of oxyradical-mediated DNA-damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) is increased in nigro-striatum of Parkinson's disease brain, *Neurodegeneration*, 3 (1994) 197-204.
- Scholz, D., D. Poltl, A. Genewsky, M. Weng, T. Waldmann, S. Schildknecht, M. Leist, Rapid, complete and large-scale generation of post-mitotic neurons from the human LUHMES cell line, *Journal of neurochemistry*, 119 (2011) 957-971.
- Scott, M. D., S. R. Meshnick, J. W. Eaton, Superoxide dismutase amplifies organismal sensitivity to ionizing radiation, *The Journal of biological chemistry*, 264 (1989) 2498-2501.
- Seglen, P. O., Preparation of isolated rat liver cells, *Methods in cell biology*, 13 (1976) 29-83.
- Shivji, K. K., M. K. Kenny, R. D. Wood, Proliferating cell nuclear antigen is required for DNA excision repair, *Cell*, 69 (1992) 367-374.
- Sies, H., Oxidative stress, Introductory remarks, *Oxidative Stress* (H. Sies, ed.) Academic Press, London, (1985).
- Sies, H., Strategies of antioxidant defense, *European journal of biochemistry / FEBS*, 215 (1993) 213-219.

Siomek, A., K. Brzoska, B. Sochanowicz, D. Gackowski, R. Rozalski, M. Foksinski, E. Zarakowska, A. Szpila, J. Guz, T. Bartłomiejczyk, B. Kalinowski, M. Kruszewski, R. Olinski, Cu,Zn-superoxide dismutase deficiency in mice leads to organ-specific increase in oxidatively damaged DNA and NF-kappaB1 protein activity, *Acta biochimica Polonica*, 57 (2010) 577-583.

Sofic, E., P. Riederer, H. Heinsen, H. Beckmann, G. P. Reynolds, G. Hebenstreit, M. B. Youdim, Increased iron (III) and total iron content in post mortem substantia nigra of parkinsonian brain, *Journal of neural transmission*, 74 (1988) 199-205.

Spencer, J. P., A. Jenner, O. I. Aruoma, P. J. Evans, H. Kaur, D. T. Dexter, P. Jenner, A. J. Lees, D. C. Marsden, B. Halliwell, Intense oxidative DNA damage promoted by L-dopa and its metabolites. Implications for neurodegenerative disease, *FEBS letters*, 353 (1994) 246-250.

Spencer, J. P., P. Jenner, B. Halliwell, Superoxide-dependent depletion of reduced glutathione by L-DOPA and dopamine. Relevance to Parkinson's disease, *Neuroreport*, 6 (1995) 1480-1484.

St-Pierre, J., J. A. Buckingham, S. J. Roebuck, M. D. Brand, Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain, *The Journal of biological chemistry*, 277 (2002) 44784-44790.

Staropoli, J. F., C. McDermott, C. Martinat, B. Schulman, E. Demireva, A. Abeliovich, Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity, *Neuron*, 37 (2003) 735-749.

Steenken S., J. S., How easily oxidizable is DNA? One-electron potentials of adenosine and guanosine radicals in aqueous solution, *J. Am Chem. Soc.*, 119 (1997) 617-618.

Stohs, S. J., D. Bagchi, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free radical biology & medicine*, 18 (1995) 321-336.

Sulzer, D., J. Bogulavsky, K. E. Larsen, G. Behr, E. Karatekin, M. H. Kleinman, N. Turro, D. Krantz, R. H. Edwards, L. A. Greene, L. Zecca, Neuromelanin biosynthesis is driven by excess cytosolic catecholamines not accumulated by synaptic vesicles, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (2000) 11869-11874.

Sun, Y., L. W. Oberley, Redox regulation of transcriptional activators, *Free radical biology & medicine*, 21 (1996) 335-348.

Sykiotis, G. P., D. Bohmann, Keap1/Nrf2 signaling regulates oxidative stress tolerance and lifespan in *Drosophila*, *Developmental cell*, 14 (2008) 76-85.

Takao, M., H. Aburatani, K. Kobayashi, A. Yasui, Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage, *Nucleic acids research*, 26 (1998) 2917-2922.

Tchou, J., A. P. Grollman, Repair of DNA containing the oxidatively-damaged base, 8-oxoguanine, *Mutation research*, 299 (1993) 277-287.

Tornaletti, S., DNA repair in mammalian cells: Transcription-coupled DNA repair: directing your effort where it's most needed, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 66 (2009) 1010-1020.

Trapp, Untersuchungen zur Reparatur und Mutagenität oxidativer DNA-Schäden in vivo und deren Bedeutung für die Kanzerogenese, *Dissertation, Mainz*, (2006).

- Trapp, C., M. Schwarz, B. Epe, The peroxisome proliferator WY-14,643 promotes hepatocarcinogenesis caused by endogenously generated oxidative DNA base modifications in repair-deficient *Csbm/m/Ogg1*^{-/-} mice, *Cancer research*, 67 (2007) 5156-5161.
- Tuo, J., C. Chen, X. Zeng, M. Christiansen, V. A. Bohr, Functional crosstalk between hOgg1 and the helicase domain of Cockayne syndrome group B protein, *DNA repair*, 1 (2002) 913-927.
- Valko, M., M. Izakovic, M. Mazur, C. J. Rhodes, J. Telser, Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence, *Molecular and cellular biochemistry*, 266 (2004) 37-56.
- Valko, M., C. J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, *Chemico-biological interactions*, 160 (2006) 1-40.
- van den Boom, V., N. G. Jaspers, W. Vermeulen, When machines get stuck--obstructed RNA polymerase II: displacement, degradation or suicide, *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 24 (2002) 780-784.
- van der Horst, G. T., H. van Steeg, R. J. Berg, A. J. van Gool, J. de Wit, G. Weeda, H. Morreau, R. B. Beems, C. F. van Kreijl, F. R. de Gruijl, D. Bootsma, J. H. Hoeijmakers, Defective transcription-coupled repair in Cockayne syndrome B mice is associated with skin cancer predisposition, *Cell*, 89 (1997) 425-435.
- Van Remmen, H., Y. Ikeno, M. Hamilton, M. Pahlavani, N. Wolf, S. R. Thorpe, N. L. Alderson, J. W. Baynes, C. J. Epstein, T. T. Huang, J. Nelson, R. Strong, A. Richardson, Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging, *Physiological genomics*, 16 (2003) 29-37.
- Wakabayashi, N., A. T. Dinkova-Kostova, W. D. Holtzclaw, M. I. Kang, A. Kobayashi, M. Yamamoto, T. W. Kensler, P. Talalay, Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (2004) 2040-2045.
- Wang, J. C., Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 3 (2002) 430-440.
- Weisiger, R. A., I. Fridovich, Mitochondrial superoxide simutase. Site of synthesis and intramitochondrial localization, *The Journal of biological chemistry*, 248 (1973) 4793-4796.
- Whitehouse, C. J., R. M. Taylor, A. Thistlethwaite, H. Zhang, F. Karimi-Busheri, D. D. Lasko, M. Weinfeld, K. W. Caldecott, XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair, *Cell*, 104 (2001) 107-117.
- Will, O., E. Gocke, I. Eckert, I. Schulz, M. Pflaum, H. C. Mahler, B. Epe, Oxidative DNA damage and mutations induced by a polar photosensitizer, Ro19-8022, *Mutation research*, 435 (1999) 89-101.
- Winkler, G. S., K. Sugawara, A. P. Eker, W. L. de Laat, J. H. Hoeijmakers, Novel functional interactions between nucleotide excision DNA repair proteins influencing the enzymatic activities of TFIIH, XPG, and ERCC1-XPF, *Biochemistry*, 40 (2001) 160-165.
- Winklhofer, K. F., Parkin and mitochondrial quality control: toward assembling the puzzle, *Trends in cell biology*, 24 (2014) 332-341.

- Wogan, G. N., S. S. Hecht, J. S. Felton, A. H. Conney, L. A. Loeb, Environmental and chemical carcinogenesis, *Seminars in cancer biology*, 14 (2004) 473-486.
- Wong, H. K., M. Muftuoglu, G. Beck, S. Z. Imam, V. A. Bohr, D. M. Wilson, 3rd, Cockayne syndrome B protein stimulates apurinic endonuclease 1 activity and protects against agents that introduce base excision repair intermediates, *Nucleic acids research*, 35 (2007) 4103-4113.
- Wood, M. L., A. Esteve, M. L. Morningstar, G. M. Kuziemko, J. M. Essigmann, Genetic effects of oxidative DNA damage: comparative mutagenesis of 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 7,8-dihydro-8-oxoadenine in *Escherichia coli*, *Nucleic acids research*, 20 (1992) 6023-6032.
- Wu, W. S., Y. S. Zhao, Z. H. Shi, S. Y. Chang, G. J. Nie, X. L. Duan, S. M. Zhao, Q. Wu, Z. L. Yang, B. L. Zhao, Y. Z. Chang, Mitochondrial ferritin attenuates beta-amyloid-induced neurotoxicity: reduction in oxidative damage through the Erk/P38 mitogen-activated protein kinase pathways, *Antioxidants & redox signaling*, 18 (2013) 158-169.
- Xie, H. R., L. S. Hu, G. Y. Li, SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease, *Chinese medical journal*, 123 (2010) 1086-1092.
- Xie, Y., H. Yang, C. Cunanan, K. Okamoto, D. Shibata, J. Pan, D. E. Barnes, T. Lindahl, M. McIlhatton, R. Fishel, J. H. Miller, 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 research*, 64 (2004) 3096-3102.
- Xu, C., X. Yuan, Z. Pan, G. Shen, J. H. Kim, S. Yu, T. O. Khor, W. Li, J. Ma, A. N. Kong, Mechanism of action of isothiocyanates: the induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2, *Molecular cancer therapeutics*, 5 (2006) 1918-1926.
- Yamakura, F., H. Kawasaki, Post-translational modifications of superoxide dismutase, *Biochimica et biophysica acta*, 1804 (2010) 318-325.
- Yamawaki, H., B. C. Berk, Thioredoxin: a multifunctional antioxidant enzyme in kidney, heart and vessels, *Current opinion in nephrology and hypertension*, 14 (2005) 149-153.
- Yang, Y. X., M. M. Muqit, D. S. Latchman, Induction of parkin expression in the presence of oxidative stress, *The European journal of neuroscience*, 24 (2006) 1366-1372.
- Yoritaka, A., N. Hattori, K. Uchida, M. Tanaka, E. R. Stadtman, Y. Mizuno, Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson disease, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93 (1996) 2696-2701.
- Yu, R., W. Lei, S. Mandlekar, M. J. Weber, C. J. Der, J. Wu, A. N. Kong, Role of a mitogen-activated protein kinase pathway in the induction of phase II detoxifying enzymes by chemicals, *The Journal of biological chemistry*, 274 (1999) 27545-27552.
- Zecca, L., M. Gallorini, V. Schunemann, A. X. Trautwein, M. Gerlach, P. Riederer, P. Vezzoni, D. Tampellini, Iron, neuromelanin and ferritin content in the substantia nigra of normal subjects at different ages: consequences for iron storage and neurodegenerative processes, *Journal of neurochemistry*, 76 (2001) 1766-1773.
- Zecca, L., F. A. Zucca, A. Albertini, E. Rizzio, R. G. Fariello, A proposed dual role of neuromelanin in the pathogenesis of Parkinson's disease, *Neurology*, 67 (2006) S8-11.

Zhang, D. D., Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway, *Drug metabolism reviews*, 38 (2006) 769-789.

Zhang, J., G. Perry, M. A. Smith, D. Robertson, S. J. Olson, D. G. Graham, T. J. Montine, Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons, *The American journal of pathology*, 154 (1999) 1423-1429.

Zharkov, D. O., Base excision DNA repair, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65 (2008) 1544-1565.

8 Anhang

Posterpräsentationen bei Fachtagungen

UKEMS/Dutch EMS-sponsored Workshop on Biomarkers of Exposure and Oxidative Damage and 7th GUM ³²P-Postlabeling Workshop, Münster, 28. - 29. März 2011
Posterpreis: Mutagenesis / Oxford University Press Poster Award

Gallé K., Fusser M., Liebl M., Behl C., Clement A.M., Epe B.

Overexpression of human superoxide dismutase 1 prevents the accumulation of oxidative DNA base damage in Ogg1^{-/-}Csb^{-/-} double knockout mice

40th EEMS Meeting, Oslo, Norwegen, 15. - 18. 2010

Overexpression of human superoxide dismutase 1 reduces oxidative DNA damage in Ogg1^{-/-}Csb^{-/-} double knockout mice

Gallé K., Fusser M., Liebl M., Behl C., Clement A.M., Epe B.

Publikationen (nicht in der Arbeit enthalten)

Keuser B, Khobta A, **Gallé K.**, Anderhub S, Schulz I, Pauly K, Epe B. Influences of histone deacetylase inhibitors and resveratrol on DNA repair and chromatin compaction. Mutagenesis.2013 Sep;28(5):569-76