

Einfluss von Uracil in der DNA auf die Genexpression: die Rolle der Basen-Exzisions- Reparatur

Dissertation zum Erlangen des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Bork Lühnsdorf

geboren am 20.11.1982 in Heidelberg

Mainz, 2015

D77 - Mainzer Dissertation

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 01.06.2015

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
ZUSAMMENFASSUNG.....	1
1. EINLEITUNG	3
1.1 MECHANISMUS UND BIOLOGISCHE SIGNIFIKANZ DER BASEN-EXZISIONS-REPARATUR	3
1.1.1 <i>Substrate und Mechanismus der Basen-Exzisions-Reparatur</i>	3
1.1.2 <i>Bedeutung der Basen-Exzisions-Reparatur beim Schutz vor Mutationen</i>	6
1.1.3 <i>Einfluss der Basen-Exzisions-Reparatur auf die Genexpression</i>	7
1.2 URACIL IN DER DNA: EINE QUELLE VON MUTATIONEN	9
1.3 URACIL-DNA-GLYKOSYLASEN UND DIE BASEN-EXZISIONS-REPARATUR VON URACIL	11
1.3.1 <i>Uracil-DNA-Glykosylase 1/2 (UNG1/2)</i>	12
1.3.2 <i>Single-strand selective monofunctional Uracil-DNA-Glykosylase (SMUG1)</i>	13
1.3.3 <i>Thymin-DNA-Glykosylase (TDG)</i>	14
1.3.4 <i>Methyl-CpG-bindende Domäne 4 Protein (MBD4)</i>	14
1.4 WEITERE REPARATURWEGE VON URACIL IN DER DNA.....	15
1.5 EINFLUSS VON URACIL AUF DIE TRANSKRIPTION: STAND DES WISSENS UND UNBEANTWORTETE FRAGEN ..	16
2. MATERIAL UND METHODEN.....	18
2.1 MATERIAL.....	18
2.1.1 <i>Geräte und Software</i>	18
2.1.2 <i>Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel</i>	19
2.1.3 <i>Chemikalien</i>	20
2.1.4 <i>Enzyme, Inhibitoren und Marker</i>	22
2.1.5 <i>Kits</i>	22
2.1.6 <i>Antibiotika, Puffer und Medien für die Zellkultur</i>	23
2.1.7 <i>Säugerzelllinien</i>	23
2.1.8 <i>Vektoren und Vektorgerüste</i>	24
2.1.9 <i>Vektoren mit definierten Modifikationen der Basen oder des Zuckerphosphat-Rückgrats</i>	24
2.1.10 <i>Oligonukleotide</i>	25
2.1.11 <i>Puffer und Arbeitslösungen</i>	25
2.1.12 <i>Antikörper</i>	28
2.2 METHODEN	29
2.2.1 <i>Grundlegende Techniken zum Arbeiten mit Zellen</i>	29
2.2.1.1 <i>Kultivierung von Zellen</i>	29
2.2.1.2 <i>Einfrieren und Auftauen von Zellen</i>	29
2.2.1.3 <i>Erstellung einer Wachstumskurve</i>	30

2.2.1.4	Kolonien-Bildungsfähigkeit nach UV-C Bestrahlung.....	30
2.2.1.5	Analyse der Proliferation und/oder des Überlebens von Zellen in Gegenwart eines APE-1-Inhibitors.....	30
2.2.1.6	Transfektion von Plasmid-DNA in Säugetierzellen	31
2.2.1.6.1	Transfektion von Plasmid-DNA in menschliche Zellen	31
2.2.1.6.2	Transfektion von Plasmid-DNA in Maus-Embryo-Fibroblasten.....	31
2.2.2	<i>Grundlegende Methoden zum Arbeiten mit Bakterien</i>	32
2.2.2.1	Herstellung ultra-kompetenter Bakterien.....	32
2.2.2.2	Transformation.....	32
2.2.2.3	Mini- und Mega-Präparation von Plasmid-DNA.....	32
2.2.3	<i>Grundlegende Methoden zum Arbeiten mit DNA</i>	33
2.2.3.1	Phenolextraktion der DNA.....	33
2.2.3.2	Präzipitation der DNA mit Isopropanol	33
2.2.3.3	Spektrophotometrische Quantifizierung der DNA	34
2.2.3.4	Isolierung der DNA aus Zellen	34
2.2.3.5	Agarose-Gelelektrophorese der DNA.....	34
2.2.3.6	Behandlung von DNA-Lösungen mit RNase A	35
2.2.4	<i>Grundlegende Methoden zum Arbeiten mit RNA</i>	35
2.2.4.1	Isolierung der RNA aus Zellen.....	35
2.2.4.2	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese der RNA.....	36
2.2.4.3	Reverse Transkription der RNA	37
2.2.5	<i>Realtime quantitative PCR (RT-qPCR)</i>	37
2.2.6	<i>Western Blot</i>	39
2.2.6.1	Extraktion der Proteine aus den Zellen	39
2.2.6.2	Bradford-Assay	40
2.2.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.2.6.4	Übertragung der Proteine auf eine Trägermembran (Blotting).....	41
2.2.6.5	Immundetektion.....	41
2.2.7	<i>Stabiler Knockdown des UNG-, SMUG1-, TDG und CSB-Gens in HeLa-Zellen mittels short hairpin RNA</i>	42
2.2.7.1	Klonierung der spezifischen shRNA-Sequenzen in den shRNA-Expressions-Vektor pENTR/pSUPER+	44
2.2.7.1.1	Zusammenlagern synthetischer Oligonukleotide zum shRNA-Insert.....	44
2.2.7.1.2	Doppelverdau des shRNA-Expressions-Vektors	45
2.2.7.1.3	Einbau des shRNA-Inserts in den doppelt-verdauten shRNA-Expressions-Vektor	46
2.2.7.1.4	PCR-Screening und Sequenzierung der klonierten shRNA-Expressions-Vektoren	47
2.2.7.2	Generierung von monoklonalen Zelllinien mit einem spezifischen Gen-Knockdown via stabiler Transfektion des shRNA-Expressions-Vektors pENTR/pSUPER+	49
2.2.8	<i>Insertion synthetischer Oligonukleotide mit einer spezifischen DNA-Modifikation in den Reporter-Vektor pEGFP-mODC-ZA</i>	50
2.2.8.1	Doppelter Einschnitt des Reporter-Vektors mittels Nicking-Endonukleasen	51
2.2.8.2	Präparation des Reporter-Vektors mit einer einzelsträngigen Lücke im EGFP-Gen	52
2.2.8.3	Einbau von synthetischen Oligonukleotiden in das EGFP-Gen des Reporter-Vektors..	53
2.2.8.4	Nachweis des in den Reporter-Vektoren eingebauten Uracils und Thyminglykols ..	54
2.2.9	<i>Schädigung des Reporter-Vektors pEGFP-mODC-ZA durch UV-B-Bestrahlung</i>	54

2.2.9.1	Generierung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren in Plasmid-DNA mittels UV-B-Bestrahlung	54
2.2.9.2	Quantifizierung der UV-B-generierten Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere	55
2.2.10	<i>Host cell reactivation</i>	55
2.2.10.1	Fixierung der Zellen mit Formaldehyd.....	56
2.2.10.2	Messung der EGFP-Expression der Zellen mittels Durchflusszytometrie.....	56
2.2.11	<i>Untersuchung der DNA-Glykosylase-/Endonuklease-Aktivität in Zellextrakten (Cleavage Assay)</i>	57
3.	ERGEBNISSE	58
3.1	KONSTRUKTION UND VERIFIZIERUNG VON REPORTER-VEKTOREN, DIE EIN SPEZIFISCH POSITIONIERTES URACIL INNERHALB DES EGFP-GENS BESITZEN	58
3.1.1	<i>Konstruktion von pEGFP-mODC-ZA-Vektoren mit einem spezifisch positionierten U:A-Basenpaar innerhalb des EGFP-Gens</i>	58
3.1.2	<i>Konstruktion von pEGFP-mODC-ZA-Vektoren mit einer spezifisch positionierten U:G-Fehlpaarung innerhalb des EGFP-Gens</i>	59
3.1.3	<i>Nachweis des eingebauten Uracils in den konstruierten pEGFP-mODC-ZA-Vektoren...</i>	62
3.2	EINFLUSS VON URACIL IN DER DNA AUF DIE GENEXPRESSION IN MENSCHLICHEN ZELLEN	63
3.2.1	<i>Einfluss eines einzelnen Uracils auf die Expression des Reporter-Vektors pEGFP-mODC-ZA in menschlichen Zellen</i>	63
3.2.2	<i>Einfluss eines einzelnen fehlgepaarten T:G-Basenpaares auf die Expression des Reporter-Vektors pEGFP-mODC-ZA in HeLa-Zellen</i>	67
3.2.3	<i>Einfluss eines einzelnen Uracils auf die mRNA-Expressions- und die Plasmid-DNA-Level des pEGFP-mODC-ZA-Vektors in HeLa-Zellen</i>	68
3.3	ROLLE DER URACIL-DNA-GLYKOSYLASEN BEI DER INHIBIERUNG DER GENEXPRESSION DURCH URACIL IN DER DNA.....	70
3.3.1	<i>Knockdown der Uracil-DNA-Glykosylasen in HeLa-Zellen</i>	71
3.3.2	<i>Einfluss der UDGs auf die Einschnitts-Aktivität von menschlichen Zellextrakten gegenüber Uracil-enthaltenden Vektoren und auf die Genexpression dieser Vektoren in HeLa-Zellen</i>	72
3.3.2.1	Ermittlung der Einschnitts-Aktivität von menschlichen Zellextrakten gegenüber den Uracil-enthaltenden Reporter-Vektoren.....	72
3.3.2.2	Einfluss des Knockdowns einzelner UDGs auf die Einschnitts-Aktivität von HeLa-Zellextrakten gegenüber den Uracil-enthaltenden Reporter-Vektoren.....	77
3.3.2.3	Einfluss des Knockdowns einzelner UDGs auf die Genexpression der U:A-Basenpaar-enthaltenden Reporter-Vektoren in HeLa-Zellen.....	79
3.3.2.4	Expression eines 5-hmU-enthaltenden Reporter-Vektors in HeLa-Zellen und der Einfluss des SMUG1-Knockdowns	82
3.3.2.5	Genexpression der U:G-Fehlpaarung-enthaltenden Reporter-Vektoren in den UDG-Knockdown-Zellen	84
3.3.3	<i>Einfluss der UDGs auf die Einschnitts-Aktivität von LN428-Zellextrakten gegenüber Uracil-enthaltenden Vektoren und auf die Genexpression dieser Vektoren in LN428 - Zellen</i>	87

3.3.3.1	Nachweis des Knockdowns der einzelnen Uracil-DNA-Glykosylasen in LN428-Zellen .	87
3.3.3.2	Genexpression eines 5-hmU-enhaltenen Reporter-Vektors in LN428-Zellen und der Einfluss des SMUG1-Knockdowns	88
3.3.3.3	Einschnitts-Aktivität von LN428-Zellextrakten gegenüber den Uracil-enhaltenen Reporter-Vektoren: Einfluss des Knockdowns einzelner UDGs	89
3.3.3.4	Genexpression der Uracil-enhaltenen Reporter-Vektoren in LN428-Zellen: Einfluss des Knockdowns einzelner UDGs	90
3.4	EINFLUSS DER AP-ENDONUKLEASE 1 AUF DIE GENEXPRESSION DER URACIL-ENTHALTENEN REPORTER-VEKTOREN IN HELA-ZELLEN	92
3.4.1	<i>Einfluss des APE1-Inhibitors 7-Nitroindol-2-carboxylsäure auf das Wachstum und Überleben der HeLa-Zellen</i>	93
3.4.2	<i>Einfluss des APE1-Inhibitors auf die Genexpression der Uracil-enhaltenen Reporter-Vektoren in HeLa-Zellen</i>	94
3.4.3	<i>Kontrolle der Aktivität des APE1-Inhibitors</i>	96
3.5	EINFLUSS EINES EINZELNEN THYMINGLYKOLS AUF DIE GENEXPRESSION IN HELA-ZELLEN	97
3.5.1	<i>Konstruktion und Verifizierung von pEGFP-mODC-ZA-Reporter-Vektoren mit einem spezifisch positioniertem Thyminglykol innerhalb des EGFP-Gens</i>	97
3.5.2	<i>Einfluss eines einzelnen Thyminglykols auf die Expression des Reporter-Vektors pEGFP-mODC-ZA in HeLa-Zellen</i>	99
3.5.3	<i>Einfluss eines einzelnen Thyminglykols auf die mRNA-Expressions- und die Plasmid-DNA-Level des pEGFP-mODC-ZA-Vektors in HeLa-Zellen</i>	100
3.6	EINFLUSS DES CSB-PROTEINS AUF DIE EXPRESSION VON REPORTER-VEKTOREN IN ANWESENHEIT VERSCHIEDENER DNA-MODIFIKATIONEN	101
3.6.1	<i>Einfluss des CSB-Knockdowns auf die Genexpression der Thyminglykol-enhaltenen Reporter-Vektoren in Maus-Embryo-Fibroblasten</i>	103
3.6.2	<i>Einfluss des CSB-Knockdowns auf die Genexpression von modifizierten Reporter-Vektoren in HeLa-Zellen</i>	104
3.6.2.1	Knockdown des CSB-Proteins in HeLa-Zellen	104
3.6.2.2	Genexpression der UV-B geschädigten pEGFP-mODC-ZA-Reporter-Vektoren in CSB-Knockdown-Zellen	107
3.6.2.3	Einfluss des CSB-Knockdowns auf die Genexpression von Thymin-Thymin-Dimer-enhaltenen Reporter-Vektoren	110
3.6.2.4	Einfluss des CSB-Knockdowns auf die Genexpression von 3-(Deoxyguanosin-N ² -yl)-2-acetylaminofluoren-enhaltenen Reporter-Vektoren	111
3.6.2.5	Genexpression von Reporter-Vektoren mit verschiedenen DNA-Modifikationen (Uracil, Thyminglykol, 8-oxoG und SSB) in CSB-Knockdown-Zellen	113
4.	DISKUSSION	115
4.1	VERRINGERTE GENEXPRESSION DURCH EIN EINZELNES URACIL IN DER DNA	115
4.2	DIE ROLLE EINZELNER UDGs BEI DER INHIBIERUNG DER GENEXPRESSION DURCH EIN U:A- UND 5-HMU:A-BASENPAAR UND EINER U:G-FEHLPAARUNG	116
4.3	GENEXPRESSION VON REPORTER-VEKTOREN MIT VERSCHIEDENEN DNA-MODIFIKATIONEN IN CSB-KNOCKDOWN-ZELLEN	118

4.4	MECHANISMUS UND BIOLOGISCHE BEDEUTUNG DER INHIBIERUNG DER GENEXPRESSION DURCH DNA-GLYKOSYLASEN: EIN AUSBLICK.....	119
5.	LITERATURVERZEICHNIS.....	123
APPENDIX I	133
APPENDIX II	134
CURRICULUM VITAE FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.	

Abkürzungsverzeichnis

3-meA	3-Methyladenin
3-meG	3-Methylguanin
5-caC	5-Carboxycytosin
5-fC	5-Formylcytosin
5-FU	5-Fluorouracil
5-hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5-hmU	5-Hydroxymethyluracil
5-hU	5-Hydroxyuracil
5-mC	5-Methylcytosin
5'-UTR	5'-untranslatierte Region
6-4-PP	6-4-Photoprodukt
7-meG	7-Methylguanin
8-oxoG	8-Oxo-7,8-dihydroguanin
A	Adenin
AAF	Acetylaminofluoren
AID	Activation-induced cytidine deaminase
amiRNA	artifizielle mikro-RNA
AP	aprimidinisch/apurinisch
APE1	AP-Endonuklease 1
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like
APS	Ammoniumpersulfat
B	bifunktionell
BER	Basen-Exzisions-Reparatur
bp	Basenpaar(e)
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
cc	kovalent-geschlossen (covalently closed)
cDNA	komplementäre DNA
CPD	Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
CpG	Deoxycytidin-Phosphat-Deoxyguanosin
CSB	Cockayne Syndrom B
CSR	Class switch recombination
C _T	Zyklus-Grenzwert (cycle threshold)

DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHU	Dihydrouracil
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNMT	DNA-Methyltransferase
dRP	Desoxyribosephosphat
dTMP	2'-Deoxythymidin-5'-monophosphat
dTTP	2'-Deoxythymidin-5'-triphosphat
dUMP	2'-Deoxyuridin-5'-monophosphat
dUTP	2'-Deoxyuridin-5'-triphosphat
dUTPase	2'-Deoxyuridin-5'-triphosphatase
εC	3,N4-Ethenocytosin
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
Endo IV	Endonuklease IV
Endo V	Endonuklease V
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FapyA	4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin
FapyG	2,6-Diamino-4-oxo-5-formamidopyrimidin
FBS	Fötales Rinder Serum (fetal bovine serum)
FEN1	Flap-Endonuklease 1
G	Guanin
G418	Geneticin
G(N ²)AAF	3-(Deoxyguanosin-N ² -yl)-2-acetylaminofluoren
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GG-NER	globale genomische Nukleotid-Exzisions-Reparatur
HCR	Host cell reactivation
Hepes	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
kDa	Kilodalton
LIG1	Ligase I
LIG3	Ligase III
M	monofunktionell
MBD4	Methyl-CpG-bindende Domäne 4 Protein
MED1	Methyl-CpG-bindende Endonuklease 1
MEF	Maus-Embryo-Fibroblasten

MLH1	MutL-Homolog 1
MMR	Mismatch-Reparatur
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
MSH2/6	MutS-Homolog 2/6
MUTYH	MutY-Homolog
NCA	7-Nitroindol-2-carboxylsäure (7-nitroindole-2-carboxylic acid)
NEIL1	Nei-Endonuklease VIII-like 1
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NIR	Nukleotid-Inzisions-Reparatur
nt	Nukleotid(e)
NTH	Endonuklease III
NTHL1	Nth-Endonuklease III-like 1
NTS	nicht-transkribierter DNA-Strang
oc	offen-zirkulär (open circular)
OGG1	8-Oxo-7,8-dihydroguanin-Glykosylase
PBSCMF	Phosphat-gepufferte Salzlösung Mg ²⁺ - und Ca ²⁺ -frei (phosphate-buffered saline calcium and magnesium free)
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
RIPA	Radioimmuno precipitation assay
PMSF	Phenylmethyl-Sulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
PNKP	Polynukleotidkinase/-phosphatase
rpm	Umdrehungen pro Minuten (revolutions per minute)
RT-qPCR	Realtime quantitative PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHM	somatische Hypermutation
shRNA	short hairpin RNA
SMUG1	Single-strand selective monofunctional Uracil-DNA-Glykosylase 1
SOB	Super optimal broth
SSB	Einzelstrangbruch (single-strand break)
ssDNA	einzesträngige DNA (single-stranded DNA)
SWI/SNF-ATPase	Switch/Sucrose non-fermenting-2'-Deoxyadenosin-5'-triphosphatase
T	Thymin

T _{acq}	Temperatur zur Fluoreszenz-Messung (temperature for acquisition)
T _{ann}	Temperatur zum Anlagern der Primer (temperature for annealing)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (tris-buffered saline)
TBST	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20 (tris-buffered saline with tween 20)
TCR	transkriptionsgekoppelte Nukleotid-Exzisions-Reparatur
TDG	Thymin-DNA-Glykosylase
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TET	Ten eleven translocation Methylcytosin-Deoxygenasen
Tg	Thyminglykol (5,6-Dihydroxy-5,6-dihydrothymin)
TFIIS	Transkriptionsfaktor IIS
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TS	transkribierter DNA-Strang
TT-CPD	Thymin-Thymin-Cyclobutan-Pyrimidin-Dimer
U	Uracil
u	Einheiten (units)
UDG	Uracil-DNA-Glykosylase
UNG1/2	Uracil-DNA-Glykosylase 1/2
UV	Ultraviolett
XPA	Xeroderma pigmentosum, complementation group A

Zusammenfassung

Uracil ist eine der am häufigsten vorkommenden DNA-Basenmodifikationen, die über den Mechanismus der Basen-Exzisions-Reparatur (BER) aus dem Genom entfernt wird. Im Verlauf der Reparatur dieser Läsion durch monofunktionelle Uracil-DNA-Glykosylasen entstehen apyrimidinische/apurinische Stellen (AP-Läsionen) und Einzelstrangbrüche als sukzessive Intermediate. Diese stehen nicht nur im Verdacht die Replikation der DNA zu beeinträchtigen, sondern können vermutlich auch eine Blockade der Transkription verursachen und damit eine veränderte Expression des geschädigten Gens bedingen.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss von Uracil und dessen Exzision auf die Expression eines Gens zu untersuchen. Hierfür wurden Reporter-Vektoren konstruiert, bei denen ein einzelnes Uracil im transkribierten oder nicht-transkribierten DNA-Strang innerhalb des EGFP-Gens (Enhanced green fluorescent protein) positioniert wurde. Dabei bildete Uracil entweder ein Basenpaar mit Adenin (U:A) oder eine Fehlpaarung mit Guanin (U:G) aus. Nach Transfektion der modifizierten Vektoren in humane Wirtszellen wurde die Expression des Reportergens mittels Durchflusszytometrie gemessen. Um die Rolle einzelner Uracil-DNA-Glykosylasen, UNG1/2, SMUG1 oder TDG, zu untersuchen, wurde des Weiteren deren Expression permanent mittels short hairpin RNA in HeLa-Zellen herunterreguliert.

Die Ergebnisse zeigen, dass Uracil unabhängig davon, ob es mit Adenin gepaart oder mit Guanin eine Fehlpaarung bildet, keine direkte Blockade der Transkriptions-Maschinerie auszulösen vermag. Dies kann daraus geschlossen werden, dass die Expression des Reportergens der Uracil-enthaltenen Vektoren im Vergleich zu den unmodifizierten Referenz-Vektoren kurze Zeit nach der Transfektion unverändert ist. Erst mit zunehmender Inkubationszeit in den Wirtszellen konnte eine progressive Abnahme der Transkription beobachtet werden, was die Vermutung nahelegt, dass die intrazelluläre Prozessierung der Läsion für die verringerte Genexpression verantwortlich ist und dies womöglich durch das Auftreten von Intermediaten der Basen-Exzisions-Reparatur erklärt werden kann. In der Tat bewirkte der Knockdown der BER-initiiierenden UNG1/2 eine Verringerung des negativen Effektes eines U:A-Basenpaares auf die Genexpression. Dass der Knockdown von SMUG1 oder TDG hingegen keine Auswirkungen zeigte, beweist, dass UNG1/2 die Hauptglykosylase für die Exzision dieser Läsion und der Auslöser der inhibierten Transkription in den HeLa-Zellen darstellt. Der Zusammenhang zwischen dem Maß des Ausschnitts einer DNA-Basenmodifikation im Verlauf der BER und einer verringerten Expression des Reportergens konnte zudem am Beispiel von 5-Hydroxymethyluracil und der Reparatur-einleitenden SMUG1-Glykosylase nachgewiesen werden. Im Falle einer U:G-Fehlpaarung besaß keine der untersuchten Uracil-DNA-Glykosylasen einen Einfluss auf die Rate oder

das Ausmaß der mit der Zeit abnehmenden Genexpression. Dies lässt die Beteiligung einer anderen Glykosylase oder eines anderen DNA-Reparatur-Mechanismus an der verringerten Genexpression vermuten. Die Tatsache, dass die Stärke der Gen-Suppression unabhängig davon war, ob Uracil im transkribierten oder nicht-transkribierten DNA-Strang positioniert wurde, lässt die Mutmaßung zu, dass keine Blockade der elongierenden RNA-Polymerase, sondern vielmehr ein indirekter Mechanismus der Auslöser für die verringerte Transkription ist. Dieser Mechanismus muss unabhängig von der gut untersuchten transkriptionsgekoppelten Nukleotid-Exzisions-Reparatur (TCR) erfolgen, da der Knockdown des CSB-Gens, das für diesen Reparaturweg benötigt wird, keine Auswirkungen auf die Inhibition der Genexpression der Uracil-enthaltenen Vektoren bewirkte. Insgesamt liefert diese Arbeit neue Erkenntnisse über den Beitrag der einzelnen Uracil-DNA-Glykosylasen zur Reparatur der DNA-Basenmodifikation Uracil in humanen Zellen. Des Weiteren kann anhand der Daten ein indirekter Mechanismus bei der Hemmung der Genexpression und somit ein Einfluss von Komponenten der Basen-Exzisions-Reparatur auf die Promotor-Aktivität des transkribierten Gens vermutet werden.

1. Einleitung

1.1 Mechanismus und biologische Signifikanz der Basen-Exzisions-Reparatur

Die DNA ist fortwährend chemischen Veränderungen ausgesetzt, welche ihre grundlegende Funktion als Speicher der genetischen Information gefährden. Ein Teil dieser Schäden beruht auf dem Einfluss von Noxen aus der Umwelt, zu denen unter anderem Strahlung, Industriechemikalien sowie Naturstoffe zählen. Neben diesen exogenen Quellen stellen jedoch vor allem endogene Stoffe eine Bedrohung für die Integrität der DNA dar. Diese reagieren mit der DNA und ein Großteil der Schäden resultiert aus Hydrolyse, Oxidation und Methylierung der DNA (Lindahl, 1993). Ein Beispiel für eine solche Reaktion stellt die hydrolytische Desaminierung von Cytosin dar, die zur Generierung von Uracil in der DNA führt. Dieser Prozess findet schätzungsweise 70 – 200-mal pro Tag in jeder menschlichen Zelle statt und hat somit einen großen Anteil an der Schädigung des Genoms (Lindahl, 1993), (Kavli et al., 2007). Ebenso wie der spontane Zerfall der DNA, können auch Enzyme Veränderungen der normalen DNA-Struktur bedingen. Zum Beispiel haben DNA-Polymerasen dank ihrer Korrekturfunktion zwar eine hohe Genauigkeit bei der Synthese des neugebildeten DNA-Stranges, jedoch arbeiten auch sie nicht fehlerfrei. So wird von der Haupt-Polymerase der menschlichen Replikation (Polymerase δ) berichtet, dass sie bis zu einem Fehler pro 2×10^6 Nukleotiden macht (Schmitt, Matsumoto & Loeb, 2009). Neben dem Fehleinbau der vier DNA-Basen können auch den DNA-Nukleobasen strukturell ähnliche Substanzen fälschlicherweise in den naszierenden DNA-Strang inkorporiert werden. Physiologisch relevant ist hier besonders der Einbau von dUMP (2'-Deoxy-uridin-5'-monophosphat), welcher zusammen mit der Desaminierung von Cytosin die Hauptursache für das Vorkommen von Uracil in der DNA darstellt (Krokan, Drablos & Slupphaug, 2002). Uracil und andere DNA-Läsionen können nicht nur zum Verlust von genetischen Information führen, sondern auch deren korrekte Weitergabe durch die DNA-Polymerasen beeinträchtigen und potentiell das Ablesen der Information der RNA-Polymerasen stören. In sich teilenden Zellen können die DNA-Schäden zu Mutationen führen und damit die maligne Entartung einer Zelle initiieren. Die Zelle besitzt jedoch zahlreiche hocheffektive und sehr spezifische DNA-Reparatursysteme, die in der Lage sind, DNA-Schäden zu erkennen und zu beseitigen. Die Basen-Exzisions-Reparatur (BER) stellt dabei einen essentiellen Reparaturweg dar, der zahlreiche DNA-Basenmodifikationen korrigiert.

1.1.1 Substrate und Mechanismus der Basen-Exzisions-Reparatur

Auf der Suche nach einem Enzym, das die DNA-Modifikation Uracil aus der DNA entfernt, entdeckte Lindahl 1974 die Uracil-DNA-Glykosylase (UDG) von *E. coli* und damit die BER (Lindahl, 1974). Dieser Reparaturmechanismus erkennt vornehmlich kleine DNA-Basenmodifikationen, die nur eine

schwache Distorsion der DNA-Helix verursachen und typischerweise aus der Desaminierung, Oxidation oder Methylierung der Basen hervorgehen. Aber auch die Produkte, die aus der Depurinierung und Depyrimidierung entstehen, werden über die BER prozessiert. Dieser Reparaturmechanismus ist evolutionär stark konserviert und sowohl in Prokaryoten als auch Eukaryoten zu finden. In Säugetieren wird die BER durch eine von bisher 11 bekannten DNA-Glykosylasen, welche eine Vielzahl an DNA-Basenmodifikationen spezifisch erkennen, initiiert (Jacobs & Schar, 2012) (**Tabelle 1-1**). Diese Enzyme spalten die N-Glykosidische Bindung zwischen der DNA-Basenmodifikation und dem C1-Atom der Deoxyribose hydrolytisch und entfernen so die Base aus der DNA (**Abbildung 1-1**). Monofunktionelle Glykosylasen hinterlassen nach der Hydrolyse eine apyrimidinische/apurinische Stelle (AP-Läsion) in der DNA. Das 5'-Ende dieser wird von der AP-Endonuklease 1 (APE1) eingeschnitten, so dass ein Einzelstrangbruch (SSB) mit einer Hydroxyl-Gruppe am 3'-Ende und einer Desoxy-Ribosephosphat (dRP)-Gruppe am 5'-Ende entsteht. Die letztgenannte wird von der Polymerase β mit ihrer dRP-Lyase-Aktivität entfernt, bevor die Polymerase die entstandene Lücke in der DNA durch den Einbau eines Nukleosids am 3'-Ende wieder schließt, wobei der unbeschädigte Strang als Matrize dient (Svilar et al., 2011). Vollendet wird die Reparatur durch die Ligasen I und III (LIG1, LIG3), welche die beiden Enden miteinander ligieren.

Tabelle 1-1 DNA-Glykosylasen und ihre Substrate. 3-meA , 3-Methyladenin; 3-meG, 3-Methylguanin; 5-FU , 5-Fluorouracil; 5-hmU , 5-Hydroxymethyluracil; 5-hU , 5-Hydroxyuracil; 7-meG , 7-Methylguanin; 8-oxoG/C/A , 8-Oxo-7,8-dihydroguanin/-cytosin/-adenin; ϵ C , 3,N4-Ethenocytosin; A , Adenin; B , Bifunktionell; C , Cytosin; CpG , Deoxycytidin-Phosphat-Deoxyguanosin; DHU , Dihydrouracil; FapyA , 4,6-Diamino-5-formamidopyrimidin; FapyG , 2,6-Diamino-4-oxo-5-formamidopyrimidin; G , Guanin; M , Monofunktionell; MBD4, Methyl-CpG-bindende Domäne 4 Protein; MPG, N-Methylpurin-DNA-Glykosylase; MUTYH, MutY-Homolog; OGG1, 8-Oxo-7,8-dihydroguanin-Glykosylase; NEIL1/2/3, Nei-Endonuklease VIII-like 1/2/3; NTHL1, Nth-Endonuklease III-like 1; SMUG1, Single-strand selective monofunctional Uracil-DNA-Glykosylase; T , Thymin; TDG, Thymin-DNA-Glykosylase; Tg , Thyminglykol; U , Uracil; UNG1/2, Uracil-DNA-Glykosylase 1/2. Adaptiert aus (Krokan & Bjoras, 2013).

Enzym	<u>Mono-/Bi-</u> funktionell	Substrate
UNG1/2	M	U, 5-FU, Alloxan, 5-hU
SMUG1	M	5-hmU, U, 5-FU, ϵ C
TDG	M	U und T gegenüber G, 5-hmU, 5-FU
MBD4	M	U und 5-hmU in CpG-Kontext
MPG	M	3-meA, 7-meG, 3-meG
OGG1	B	8-oxoG, FapyG
MUTYH	M	A gegenüber 8-oxoG/C/A
NTHL1	B	Tg, FapyG, 5-hC, 5-hU
NEIL1, NEIL2	B	Tg, FapyG, FapyA, 8-oxoG, 5-hU, DHU
NEIL3	B	FapyG, FapyA

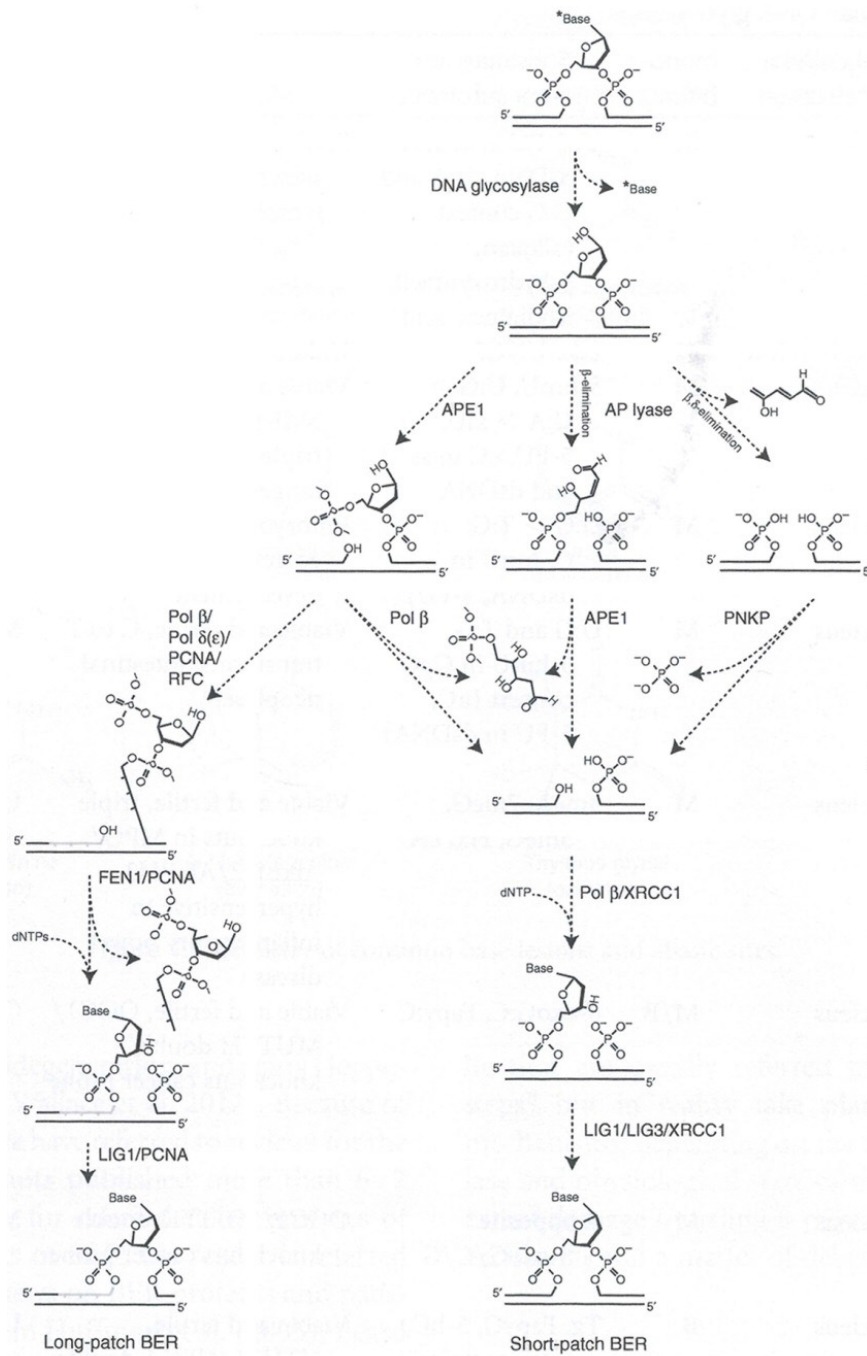


Abbildung 1-1 Mechanismus der Basen-Exzisions-Reparatur. Adaptiert aus (Krokan & Bjoras, 2013).

Neben den monofunktionellen Glykosylasen gibt es bifunktionelle Glykosylasen, wie die 8-Oxo-7,8-dihydroguanin-Glykosylase 1 (OGG1) und die Nei-Endonuklease VIII-like 1 (NEIL1), die vornehmlich oxidierte Basen erkennen. Neben der Abspaltung der lädierten Base katalysieren sie zudem durch eine β -Eliminierung (OGG1) oder eine β , δ -Eliminierung (NEIL1) die Inzision des betroffenen DNA-Stranges an der AP-Läsion. Bei der β -Eliminierung bleiben ein ungesättigter Hydroxyl-Aldehyd (3-trans-4-Hydroxy-2-pentenal-5-phosphat) am 3'-Ende und eine Phosphat-Gruppe am 5'-Ende zurück

(Svilar et al., 2011). Erst die APE1-katalysierte Bildung einer OH-Gruppe am 3'-Ende ermöglicht hier die weitere Prozessierung durch die DNA-Polymerase. Eine Glykosylase, die eine β,δ -Lyase-Aktivität besitzt, schneidet dagegen an beiden Seiten der AP-Läsion das Zucker-Phosphatrückgrat ein, so dass die ungesättigte Desoxyribose direkt frei gesetzt wird. Die einzelsträngige DNA neben der so generierte Lücke im DNA-Strang enthält an beiden Enden eine Phosphat-Gruppe (Svilar et al., 2011). Die Polynukleotidkinase/-phosphatase (PNKP) übernimmt die Hydrolyse der Phosphat-Gruppe am 3'-Ende und stellt so das Substrat für die DNA Synthese her (**Abbildung 1-1**).

Da auf dem bisher beschriebenen Reparaturweg lediglich ein Nukleotid in die Lücke des DNA-Stranges eingebaut wird, spricht man von „short-patch“ BER. In einer weiteren Variante der BER, der so genannten „long-patch“ BER, werden dagegen mehrere Nukleoside eingefügt. Diesen findet man hauptsächlich in proliferierenden Zellen und benötigt Proteine der Replikation wie die DNA-Polymerasen δ und ϵ , Proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Flap-Endonuklease 1 (FEN1) und Ligase I. Bei dieser Variante der BER werden 2 – 10 Nukleotide von der Polymerase β , δ oder ϵ unter Verdrängung des vorherigen Stranges in die Lücke eingebaut. Der vertriebene DNA-Strang wird von FEN1 abgeschnitten, so dass Ligase I die Lücke verschließen kann (**Abbildung 1-1**). Welche der beiden Varianten der BER zur Korrektur von DNA-Basenmodifikationen letztlich in der Zelle Anwendung findet, ist von zahlreichen Faktoren abhängig, die nicht vollständig geklärt sind. Allgemein geht man davon aus, dass neben dem vorliegenden Schaden, die Reparatur-initiiierende Glykosylase (Fortini et al., 1999), der Zelltyp und der Zellzyklus sowie die Verfügbarkeit von BER-Faktoren eine wichtige Rolle spielen (Fortini & Dogliotti, 2007).

1.1.2 Bedeutung der Basen-Exzisions-Reparatur beim Schutz vor Mutationen

Hauptfunktion der BER ist der Schutz der Zelle vor der Akkumulation von DNA-Basenmodifikationen, die durch Fehlpaarungen während der DNA-Replikation zu Punktmutationen führen können. Sofern solche Mutationen in Tumorsuppressor- oder Protoonkogenen auftreten, können sie eine Entartung der Zelle und somit die Krebsentstehung begünstigen. Die essentielle Bedeutung der BER für die Stabilität des Genoms lässt sich daran erkennen, dass der Verlust der Glykosylase-Aktivität in der Zelle oft mit einem erhöhten Level an DNA-Läsionen und einer gesteigerten Mutationsrate einhergeht. Ein prominentes Beispiel für eine mutagene DNA-Läsion stellt Uracil dar. So konnte man durch den Knockout der Uracil-DNA-Glykosylase (UDG) UNG1/2 (Uracil-DNA-Glykosylase 1/2) in Mäusen und aus ihnen entsprungenen Maus-Embryo-Fibroblasten (MEFs) stark erhöhte Level an Uracil in deren Genom feststellen (Nilsen et al., 2000), (Andersen et al., 2005), (Galashevskaya et al., 2013). Auch in humanen Zellen konnte man eine Zunahme der Mutationen beobachten, sofern diese mit einem UNG1/2-Inhibitor behandelt wurden (Radany et al., 2000). Durch die teilweise überlappende Substrat-Spezifität der Glykosylasen (**Tabelle 1-1**) kann oftmals erst durch den

Knockdown mehrerer Enzyme eine verstärkte Anhäufung von Mutationen beobachtet werden. So konnte in den *Ung*^{-/-}-MEFs eine erhöhte Rate an Mutationen entdeckt werden, dessen Ausmaß durch den Knockdown einer weiteren UDG, der SMUG1-Glykosylase (Single-strand selective monofunctional Uracil-DNA-Glykosylase), gesteigert werden konnte (An et al., 2005). Die BER schützt jedoch nicht nur vor der mutagenen Wirkung des Uracils sondern auch vor solchen, die durch andere Basenmodifikationen verursacht werden. Untersuchungen in Mäusen, denen die OGG1-Glykosylase fehlte, ergaben eine Akkumulation der oxidativen Läsion 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxoG) sowie eine erhöhte spontane Mutationsfrequenz in der Leber (Osterod et al., 2001), (Klungland et al., 1999). Letztere ergibt sich aus dem fehlerhaften Einbau von Adenin gegenüber der Basenmodifikation während der DNA-Replikation. Beim gleichzeitigen Funktionsverlust von OGG1 und der MUTYH-Glykosylase (MutY-Homolog), welche das fehlerhaft gegenüber 8-oxoG eingebaute Adenin entfernt, konnte zudem eine erhöhte Tumorzinzidenz in Mäusen beobachtet werden (Xie et al., 2004), (Chan et al., 2009). Auf die große Bedeutung von BER-Defekten bei der Krebsentstehung weisen ebenso Untersuchungen im Menschen hin, bei denen in bestimmten Tumoren Mutationen von Genen, die für Proteine der BER codieren, nachgewiesen werden konnten. So besitzen 30 % aller untersuchter menschlicher Tumore eine Mutation der Polymerase β , während Mutationen der MUTYH-Glykosylase mit Dickdarmkrebs in Verbindung gebracht werden (David, O'Shea & Kundu, 2007; Starcevic, Dalal & Sweasy, 2004).

1.1.3 Einfluss der Basen-Exzisions-Reparatur auf die Genexpression

Neben seiner enormen Bedeutung als Schutz vor Mutationen, spielt die BER auch bei der Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle. In Säugetieren ist die spezifische Methylierung von Cytosin zu 5-Methylcytosin (5-mC) in CpG-Dinukleotiden (Deoxycytidin-Phosphat-Deoxyguanosin) der Promotor-Region eines Gens eine wichtige epigenetische Markierung, um die Expression dieses Gens stillzulegen. Die Entstehung und Aufrechterhaltung eines korrekten DNA-Methylierungs-Musters sind besonders (aber nicht nur) während der Embryogenese wichtig (Li, 2002). Während die Methylierung der DNA in diesem dynamischen Prozess von Methyltransferasen katalysiert wird, gibt es Hinweise darauf, dass die BER an der aktiven Demethylierung der DNA beteiligt ist. Zwar besitzt keine DNA-Glykosylase in Säugetieren eine starke Aktivität direkt gegenüber 5-mC, jedoch sehr wohl gegenüber Produkten, die aus der Oxidation und/oder Desaminierung dieser Basenmodifikation hervorgehen. Die Oxidation von 5-mC kann von TET (Ten eleven translocation Methylcytosin-Dioxygenasen) katalysiert werden und führt zu den Produkten 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC), 5-Formylcytosin (5-fC) und 5-Carboxycytosin (5-caC) (**Abbildung 1-2**). Von den beiden Letzteren ist bekannt, dass die TDG-Glykosylase diese aus der DNA entfernen kann (Maiti & Drohat, 2011), (He et al., 2011). Eine kritische Bedeutung dieses Mechanismus ist in Versuchen mit transgenen Mäusen nachgewiesen, die zeigten, dass die TDG-Glykosylase bei der Entwicklung des Embryos unverzichtbar ist (Cortazar et al.,

2011), (Cortellino et al., 2011). Alternativ zu diesem Prozess kann 5-mC und auch dessen Oxidationsprodukt 5-hmC von Mitgliedern der Familie der AID/APOBEC (Activation-induced cytidine deaminase/Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like) aktiv zu Thymin und 5-hmU desaminiert werden. Das mit Guanin fehlgepaarte Thymin wird in dem vorliegenden Sequenzkontext (CpG) vornehmlich von den Glykosylasen TDG und MBD4 erkannt, während 5-hmU größtenteils über die TDG- und SMUG1-Glykosylase prozessiert wird (siehe Kapitel 1.3). Über die eingeleitete BER kann auf diesem Wege eine aktive Demethylierung der DNA erfolgen (**Abbildung 1-2**). Der Einfluss der BER an der epigenetischen Reprogrammierung während der Embryogenese könnte auch die Tatsache erklären, dass der Knockdown einiger wichtiger Komponenten dieses Reparaturweges, wie AP-Endonuklease 1 oder Polymerase β , in Mäusen embryonisch letal ist (Friedberg & Meira, 2006), (Gu et al., 1994).

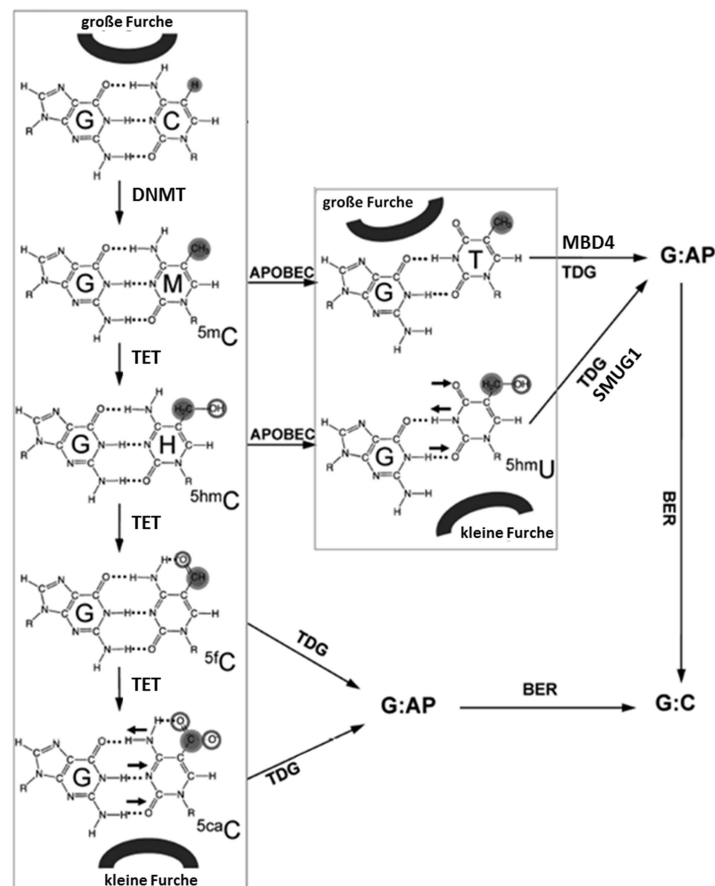


Abbildung 1-2 Vermuteter Mechanismus der aktiven DNA-Demethylierung durch die BER. TDG kann oxidierte Derivate von 5-Methylcytosin (5-mC) wie 5-Formylcytosin (5-fC) und 5-Carboxycytosin (5-caC), welche durch TET-Enzyme (Ten eleven translocation Methylcytosin-Dioxygenasen) synthetisiert werden, prozessieren. Ebenso werden die APOBEC-Enzym-katalysierten Desaminierungs-Produkte von 5-mC und 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC), welche Thymin und 5-hmU darstellen, von TDG und anderen Glykosylasen (SMUG1, MBD4) aus der DNA herausgeschnitten. Über die BER kann auf diesen Wegen eine aktive Demethylierung der DNA erfolgen. DNMT, DNA-Methyltransferase. Adaptiert aus (Hashimoto et al., 2012).

Die Beteiligung der BER an der Entfernung von epigenetischen Markierungen in Promotor-Regionen ist ein sehr wichtiger Befund, jedoch nicht der einzige Mechanismus durch den die BER die Expression von Genen beeinflussen kann. So haben Khobta und Mitarbeiter nachgewiesen, dass die Reparatur von DNA-Basenmodifikationen innerhalb eines aktiv transkribierten Gens eine Inhibierung der Expression auszulösen vermag. In diesen Studien führte die Exzision der Basenmodifikation 8-oxoG durch die DNA-Glykosylase OGG1 zu einer verringerten Transkription eines Reportergens (Kitsera et al., 2011), (Allgayer et al., 2013). Da es sich bei OGG1 um eine bifunktionelle Glykosylase mit einer β -Lyase-Aktivität handelt, katalysiert sie neben der Abspaltung der geschädigten Base auch gleich den Einschnitt des DNA-Stranges. Als möglicher Mechanismus wurde demnach eine Kollision der transkribierenden RNA-Polymerase II mit dem generierten Einzelstrangbruch vermutet. Die Auswirkungen, die eine Prozessierung durch monofunktionelle Glykosylasen nach sich ziehen, bleiben hingegen unbeantwortet. Eine der am häufigsten vorkommenden DNA-Läsion, die zudem über monofunktionelle Glykosylasen repariert wird, stellt Uracil dar. Diese Modifikation nimmt in vielerlei Hinsicht eine Sonderstellung gegenüber anderen Schäden der DNA ein.

1.2 Uracil in der DNA: Eine Quelle von Mutationen

Das Vorkommen von Uracil in der DNA beruht größtenteils auf zwei Hauptmechanismen: dem fehlerhaften Einbau von dUMP an Stelle von dTMP während der DNA-Replikation und der spontanen Desaminierung von Cytosin. Der Fehleinbau von Uracil geht von dUTP aus, von dem schließlich dUMP in die DNA eingebaut wird, und beruht auf der hohen strukturellen Ähnlichkeit der Basen Thymin und Uracil. Aufgrund dieser bedienen sich die DNA-Polymerasen beider Nukleotide als Bausteine zur Synthese des neuen DNA-Stranges. Der Fehleinbau von Uracil statt des Thymins in die DNA führt zur Generierung von U:A-Basenpaarungen, bei der Uracil genau wie die reguläre Base ein Watson-Crick-Basenpaar mit Adenin des Nachbarstranges ausbildet (**Abbildung 1-3**). Um den Einbau der ungewünschten Base zu reduzieren, besitzt die Zelle jedoch dUTPasen, die dUTP hydrolysieren und somit den Spiegel des Nukleotids niedrig halten. So findet man in den meisten Zellen zwischen 30 – 300-mal mehr dTTP als dUTP (Traut, 1994). Interessanterweise ist dUMP sowohl eine wichtige Vorstufe zur Bildung von dUTP als auch bei der Thymidilat-Synthase katalysierten Synthese von dTTP. Dies erklärt die zytotoxische Wirkung von Uracil-Derivaten wie 5-Fluorouracil, welches eine irreversible Hemmung der Synthase bedingt und bei der Krebstherapie Anwendung findet.

Der fehlerhafte Einbau von dUMP scheint in proliferierenden Zellen der Hauptprozess zu sein, durch den Uracil ins Genom gelangt (Andersen et al., 2005). Da bei der Replikation die DNA-Polymerase Adenin gegenüber Uracil in den naszierenden DNA-Strang einfügt, ist Uracil im U:A-Kontext nicht direkt mutagen. Allerdings treten im Verlauf der Reparatur der Läsion Intermediate wie apyrimidinische Stellen und Einzelstrangbrüche auf, die potentiell mutagene und zytotoxische

Auswirkungen auf die Zelle haben können (Loeb, 1985), (Loeb & Preston, 1986), (Boiteux & Guillet, 2004), (Yamtich et al., 2010).

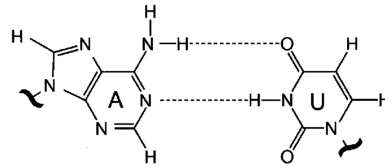


Abbildung 1-3 Adenin (A) und Uracil (U) bilden ein reguläres Watson-Crick-Basenpaar aus. Adaptiert aus (Varani & McClain, 2000).

Der zweite Hauptweg, auf dem Uracil in das Genom gelangen kann, ist die spontane Desaminierung von Cytosin. Diese lässt sich durch die Instabilität der Amino-Gruppe des C4-Atoms des Cytosins erklären, welche unter physiologischen Bedingungen langsam hydrolysiert wird. Der Hauptmechanismus dieser Reaktion liegt vermutlich in der Protonierung der Amino-Gruppe gefolgt vom nukleophilen Angriff eines Hydroxyl-Ions begründet (**Abbildung 1-4**). Das entstandene Uracil geht eine Fehlpaarung mit Guanin des Nachbarstranges ein, bei der lediglich zwei Wasserstoff-Brücken-Bindungen zwischen beiden Basen ausgebildet werden (**Abbildung 1-5**). Da die DNA-Polymerasen effizient Adenin gegenüber Uracil bei der Replikation in den DNA-Strang einbauen, kommt es ohne Reparatur der Läsion vornehmlich zu C:G zu T:A-Transitions-Mutationen (An et al., 2005). Die große physiologische Bedeutung dieser Mutation lässt sich daran erkennen, dass es die häufigste Mutation in menschlichen Krebszellen darstellt (Greenman et al., 2007).

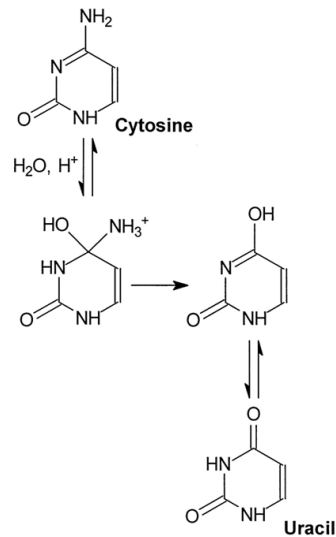


Abbildung 1-4 Hydrolytische Desaminierung von Cytosin unter Bildung von Uracil. Adaptiert aus (Caulfield, Wishnok & Tannenbaum, 1998).

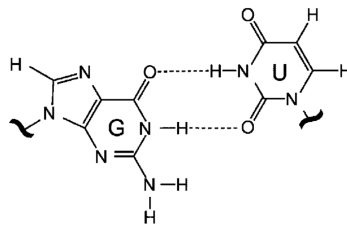


Abbildung 1-5 Guanin (G) und Uracil (U) bilden eine Fehlpaarung mit nur zwei Wasserstoff-Brücken-Bindungen aus. Adaptiert aus (Varani & McClain, 2000).

1.3 Uracil-DNA-Glykosylasen und die Basen-Exzisions-Reparatur von Uracil

Da Uracil größtenteils ungewollt in der DNA auftaucht und besonders U:G-Fehlpaarungen eine direkte Bedrohung für die Integrität des Erbgutes darstellen, wird Uracil durch die sehr effiziente BER entfernt. In Säugetieren sind vier verschiedene Uracil-DNA-Glykosylasen (UDGs), welche die Exzision von Uracil aus der DNA katalysieren und damit die BER initiieren, bekannt: Uracil-DNA-Glykosylase 1/2 (UNG1/2), Single-strand selective monofunctional Uracil-DNA-Glykosylase (SMUG1), Thymin-DNA-Glykosylase (TDG) und Methyl-CpG-bindende Domäne 4 Protein (MBD4) (**Tabelle 1-1**). Diese Enzyme besitzen verschiedene Substratspezifität, katalytische Aktivität, Lokalisationen in der Zelle und Expressionsmuster während des Zellzyklus, welche auf unterschiedliche Funktionen in der Zelle schließen lassen.

1.3.1 Uracil-DNA-Glykosylase 1/2 (UNG1/2)

Das UNG-Gen codiert sowohl für das mitochondriale UNG1- als auch das nukleäre UNG2-Protein, welche durch unterschiedliches Spleißen und einen veränderten Transkriptionsstart entstehen (Nilsen et al., 1997). Beide besitzen die gleiche katalytische Domäne, aber verschiedene N-terminale Enden, welche für die Interaktion mit Proteinen und damit auch für die zelluläre Lokalisation der Enzyme verantwortlich sind. So gelangt UNG2 durch Interaktion mit PCNA und RPA an Stellen der DNA-Replikation (Otterlei et al., 1999). Diese Beobachtung, sowie die erhöhte Expression der Glykosylase in der S-Phase (Haug et al., 1998) lassen vermuten, dass UNG2 für die Entfernung des während der Replikation fehleringebauten Uracils verantwortlich ist. Dahingegen ist UNG1 die einzige UDG, die in den Mitochondrien vorkommt (Akbari et al., 2008). Beide Enzyme entfernen Uracil aus einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA, sowohl wenn Uracil mit Adenin des Nachbarstranges gepaart ist als auch wenn Uracil in einer Fehlpaarung mit Guanin vorliegt, und besitzen im Vergleich zu den anderen UDGs eine sehr hohe Turnover-Rate. Durch Inaktivierung verschiedener UDGs mittels Inhibitoren und spezifischer Antikörper konnte in Zellextrakten gezeigt werden, dass UNG2 die hauptverantwortliche Glykosylase für die Prozessierung von Uracil aus U:A-Basenpaaren, als auch U:G-Fehlpaarungen im Menschen ist (Kavli et al., 2002), (Kavli et al., 2005), (Visnes et al., 2008), (Doseth et al., 2011), (Akbari et al., 2004). Erwähnenswert ist zudem, dass auch andere Basenmodifikationen, wie 5-Fluorouracil, von UNG2 erkannt und aus der DNA entfernt werden (Kavli et al., 2002).

Neben seiner Rolle bei der Protektion des menschlichen Genoms ist UNG2 auch für die Antikörper-Diversität des adaptiven Immunsystems von großer Bedeutung. So konnte gezeigt werden, dass UNG-Knockdown-Mäuse nicht nur B-Zell-Lymphome entwickeln, sondern auch über eine gestörte Antikörper-Bildung verfügen (Rada et al., 2002), (Nilsen et al., 2003). Die Antigen-aktivierten B-Zellen exprimieren AID, ein Enzym aus der Familie der APOBEC-Proteine. Dieses katalysiert die Hydrolyse von Cytosin und erzeugt damit gezielt Uracil in Immunglobulin-Regionen der DNA, welches von der UNG2-Glykosylase prozessiert wird. Die Entfernung des generierten Uracils durch UNG2 spielt eine wesentliche Rolle bei der Class switch recombination (CSR) und der somatischen Hypermutation (SHM) von Antikörpern (Di Noia & Neuberger, 2007), (Jacobs & Schar, 2012). Die entstehenden apyrimidinischen Stellen führen indirekt über eine BER, bei der eine fehlerbehaftete Polymerase rekrutiert wird, oder direkt durch Replikation der DNA zu Mutationen. Auch die Prozessierung der U:G-Fehlpaarung über die Mismatch-Reparatur (MMR), welche einen nahe gelegenen UNG2- und APE1-generierten Einzelstrangbruch als Angriffspunkt benötigt, ist mittels fehlerhafter DNA-Synthese an der SHM beteiligt. Zudem führen die Einzelstrangbrüche, sofern sie nahe genug beieinander liegen, zu Doppelstrangbrüchen, die wiederum die CSR einleiten. Auch in Menschen mit mutiertem UNG-Gen konnte eine Beeinträchtigung der CSR nachgewiesen werden (Imai et al., 2003).

Eine weitere wichtige Funktion übernimmt UNG2 in Zellen des Immunsystems als Waffe zur Bekämpfung von viralen Infektionen (Sousa, Krokan & Slupphaug, 2007) (**Abbildung 1-6**). Nach extensiver Desaminierung des Cytosins der viralen DNA durch APOBEC-Proteine in Immunzellen entfernt die Glykosylase das generierte Uracil und leitet somit die APE1-katalysierte Degradierung der viralen DNA-Replika ein (Yang et al., 2007), (Stenglein et al., 2010). Ebenso kann UNG2 auch den Abbau der Uracil-enthaltenen viralen DNA, welche aus dem Fehleinbau von dUMP während der Replikation des Virus hervorgeht, initiieren (Weil et al., 2013).

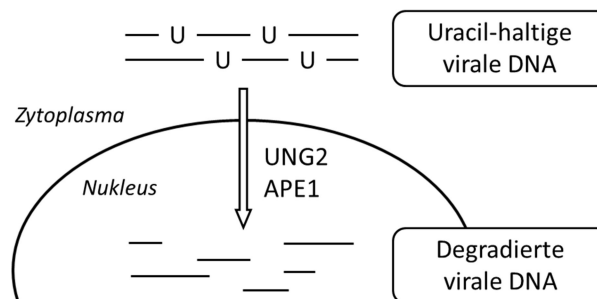


Abbildung 1-6 Rolle der UNG2-Glykosylase bei der Bekämpfung von viralen Infektionen. Durch den Fehleinbau von dUMP während der Replikation und der APOBEC-Enzym-katalysierten Desaminierung entsteht Uracil in der viralen DNA. Dieses wird von UNG2 entfernt und damit die APE1-katalysierte Degradierung der fremden DNA in den Immunzellen eingeleitet.

1.3.2 Single-strand selective monofunctional Uracil-DNA-Glykosylase (SMUG1)

SMUG1 wurde ursprünglich als UDG identifiziert, die Uracil selektiv aus einzelsträngiger DNA entfernt (Haushalter et al., 1999). Später bemerkte man jedoch, dass das Enzym in Säugetieren auch an doppelsträngiger DNA aktiv ist und Uracil sowohl aus U:A-Basenpaaren als auch U:G-Fehlpaarungen entfernen kann (Kavli et al., 2002). Die Abspaltung von Uracil wird in Anwesenheit der AP-Endonuklease 1 stimuliert, so dass sich die Turnover-Rate in vivo möglicherweise nicht so stark von UNG2 unterscheidet (Kavli et al., 2005). Versuche mit UNG-Knockout-Mäusen lassen vermuten, dass SMUG1 ein Backup für UNG1/2 bei der Prozessierung von Uracil darstellt (Nilsen et al., 2001), (Kemmerich et al., 2012). Ebenso konnte in MEFs gezeigt werden, dass beide Enzyme zur Prävention von Mutationen benötigt werden und ihre Funktionen diesbezüglich nicht redundant sind (An et al., 2005). Trotz aller Vermutungen aus dem Maus-Modell scheint SMUG1 nur geringfügig an der Reparatur von U:G-Fehlpaarungen im Menschen beteiligt zu sein und wird hierbei womöglich von TDG übertroffen (Visnes et al., 2008), (Doseth et al., 2012). Da ihre Expression jedoch im Gegensatz zu UNG1/2 keiner zellzyklisch-abhängigen Regulation unterworfen ist, könnte ihr Beitrag bei der Reparatur von Uracil in nicht-proliferierenden Zellen zum Tragen kommen. Die Anreicherung von

SMUG1 in den Nucleoli lässt eine wichtige Funktion in diesem Zellkompartiment vermuten (Kavli et al., 2002). Darüber hinaus besitzt SMUG1 im Vergleich zu den Produkten des UNG-Gens eine breitere Substratspezifität und entfernt neben Uracil und 5-Fluorouracil auch noch 5-Hydroxymethyluracil (5-hmU), welches ein Oxidationsprodukt des Thymins darstellt (Boorstein et al., 2001), (Kavli et al., 2002). In Mäusen scheint SMUG1 sogar die einzige Glykosylase zu sein, die 5-hmU aus der DNA entfernt (Kemmerich et al., 2012). Auch in menschlichen Zellextrakten werden 5-hmU und andere oxidierte Pyrimidine, wie 5-Formyluracil und 5-Hydroxyuracil, wohl hauptsächlich von SMUG1 erkannt und prozessiert, selbst wenn diese Läsionen ebenso zu den Substraten von TDG und MBD4 gehören (Masaoka et al., 2003), (Morera et al., 2012); (Rusmintratip & Sowers, 2000). Demnach scheint die Hauptfunktion von SMUG1 in der Exzision von oxidativen DNA-Basenmodifikationen zu liegen, während ihre Aktivität gegenüber Uracil im Menschen eher als Backup zu verstehen ist.

1.3.3 Thymin-DNA-Glykosylase (TDG)

TDG entfernt vornehmlich Thymin aus Fehlpaarungen mit Guanin und in abgeschwächter Form auch aus Fehlpaarungen mit Cytosin und Thymin (Neddermann & Jiricny, 1993). Ebenso wie UNG2 wird TDG durch den Zellzyklus reguliert, zeigt aber einen inversen Verlauf mit dem höchsten Proteinlevel in der G1-Phase, wohingegen in der S-Phase kaum TDG vorhanden ist (Hardeland et al., 2007). Trotz ihres Namens besitzt TDG jedoch eine höhere Aktivität zu fehlgepaartem Uracil (U:G > U:C > U:T) als zu Thymin und ist auch minimal bei U:A-Basenpaaren aktiv (Neddermann & Jiricny, 1994), (Waters & Swann, 1998). Eine besondere Rolle bei der Exzision kommt der benachbarten Base zu. So hydrolysiert das Enzym besonders gut fehlgepaarte Basen, die im CpG-Kontext vorliegen (Waters & Swann, 1998). Auch 5-hmU sowie Oxidationsprodukte von 5-Methylcytosin (5-mC), wie 5-Formylcytosin (5-fC) und 5-Carboxycytosin (5-caC) kann TDG aus der DNA entfernen (Rusmintratip & Sowers, 2000), (Maiti & Drohat, 2011), (He et al., 2011). Diese Tatsachen lassen eine bedeutende Rolle von TDG in der aktiven Demethylierung von CpG-Inseln vermuten, bei der die Desaminierungsprodukte von 5-mC oder dessen oxidierten Derivate via BER entfernt werden (Dalton & Bellacosa, 2012), (Kohli & Zhang, 2013) (siehe Kapitel 1.1.3). Neben seiner wichtigen Funktion in der Epigenetik konnte gezeigt werden, dass TDG durch Interaktion mit Transkriptionsfaktoren die Transkription beeinflussen kann (Um et al., 1998), (Missero et al., 2001).

1.3.4 Methyl-CpG-bindende Domäne 4 Protein (MBD4)

MBD4, welche auch als Methyl-CpG-bindende Endonuklease 1 (MED1) bekannt ist, bindet wie TDG an T:G- und U:G-Fehlpaarungen aus denen es Thymin und Uracil aus der DNA heraus schneidet. Wie ihr Name schon verrät, besitzt MBD4 neben der Glykosylase-Domäne noch eine Methyl-bindende Domäne, weshalb es vornehmlich im CpG-Kontext aktiv ist (Hendrich et al., 1999), (Petronzelli et al., 2000a). Da neben der T:G-Fehlpaarung auch 5-hmU:G von MBD4 erkannt wird, könnte es ebenso wie

TDG bei aktiver Demethylierung von 5-mC beteiligt sein. Während es ebenso wie UNG2, SMUG1 und TDG 5-Fluorouracil ausschneidet, zeigt es keine Aktivität gegenüber U:A-Basenpaaren und Uracil in einzelsträngiger DNA (Petronzelli et al., 2000b). Darüber hinaus interagiert das Enzym mit MutL-Homolog 1 (MLH1), einem Protein der Mismatch-Reparatur, was eine zusätzliche Funktion in diesem Reparatur-Prozess vermuten lässt (Bellacosa et al., 1999). Durch seine niedrige enzymatische Aktivität gegenüber Uracil scheint MBD4 jedoch, wenn überhaupt, nur bei der BER dieser Läsion von Bedeutung zu sein, wenn die DNA-Modifikation im CpG-Kontext auftritt (Krokan, Drablos & Slupphaug, 2002) (siehe Kapitel 1.1.3).

1.4 Weitere Reparaturwege von Uracil in der DNA

Anders als bei der BER, die den Haupt-Reparaturweg von Uracil darstellt, kann diese Läsion auch ohne den Einsatz einer DNA-Glykosylase aus der DNA entfernt werden, wenn sie eine Fehlpaarung mit Guanin des Nachbarstranges ausbildet (Prorok et al., 2013). Es handelt sich dabei um die sogenannten Nukleotid-Inzisions-Reparatur (NIR), einem konservierten Reparaturweg, der schon in Archaeen und Bakterien zu finden ist. Bei diesem wird das Zuckerphosphat-Rückgrat am 5'-Ende des geschädigten Nukleosids direkt von der AP-Endonuklease 1 gespalten (Ischenko & Saporbaev, 2002). Das freie 3'-Hydroxyl-Ende erlaubt die fehlerfreie DNA-Synthese durch die Polymerasen während der Strang des verbleibenden 5'-terminalen Deoxy-Uridin-Monophosphates ein Substrat für die FEN1-Endonuklease darstellt. Über diesen Reparaturmechanismus können neben Uracil auch zahlreiche oxidative DNA-Schäden prozessiert werden (Ischenko & Saporbaev, 2002), (Gros et al., 2004).

Als Alternative zur BER könnte auch die Mismatch-Reparatur (MMR) als Backup bei der Entfernung von Uracil aus der DNA einspringen. In Studien konnte gezeigt werden, dass bei Mäusen, bei denen sowohl die BER von Uracil durch Knockout von UNG1/2 und SMUG1 als auch die MMR durch Knockout von MSH2 gestört wurde, eine höhere Krebsinzidenz auftrat, als in Mäusen, bei denen nur ein Reparaturweg betroffen war (Kemmerich et al., 2012). Aufgabe der MMR ist es, Basen-Fehlpaarungen, die während der Replikation entstehen, zu erkennen und daraufhin die Entfernung eines Teiles des DNA-Stranges inklusive der falschen Base als auch die fehlerfreie Resynthese der DNA zu katalysieren. Zwar erkennen und binden die MMR-Proteine in zellfreien Versuchen die bei der Replikation entstehenden U:G-Fehlpaarungen (Larson et al., 2005), (Wilson et al., 2005), jedoch wird zur weiteren Prozessierung der Läsionen über diesen Reparaturweg ein Einzelstrangbruch oder ein zweites Uracil in der Nähe benötigt (Schanz et al., 2009), (Larson, Bednarski & Maizels, 2008). So scheint die Beteiligung der MMR an der Reparatur von U:G-Fehlpaarungen im Menschen vor allem in den Immunglobulin-Regionen eine Rolle zu spielen, in denen massiv Uracil generiert wird (Jacobs & Schar, 2012).

1.5 Einfluss von Uracil auf die Transkription: Stand des Wissens und unbeantwortete Fragen

DNA-Basenmodifikationen können nicht nur die Integrität der DNA als Trägermaterial des Erbgutes gefährden und so Mutationen in den Tochterzellen hervorrufen, sondern auch das Ablesen der auf der DNA gespeicherten Informationen direkt beeinträchtigen (Khobta & Epe, 2012). Bei Lokalisation der Läsion in Promotor-Regionen kann die Bindung von Transkriptionsfaktoren moduliert werden, was in einer veränderten Expression des Gens resultiert. Dies konnte auch im Falle von Uracil bereits nachgewiesen werden (Verri et al., 1990). Neben der Initiation kann auch die Elongation der Transkription durch DNA-Modifikationen beeinflusst werden. Dabei handelt es sich vornehmlich um sperrige, Helix-distorsierende Läsionen, die der RNA-Polymerase eine Überwindung erschweren oder ganz verhindern. Eine solche Blockade konnte bei den durch UV-Bestrahlung entstehenden Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs) und 6-4-Photoprodukte (6-4-PP) nachgewiesen werden (Donahue et al., 1994), (Selby et al., 1997), (Kathe, Shen & Wallace, 2004), (Mei Kwei et al., 2004), (Tornaletti et al., 1997). Aus in vitro-Versuchen ist zwar bekannt, dass Uracil selbst keine Blockade der RNA-Polymerase II bewirken kann (Kuraoka et al., 2003), jedoch entstehen bei der BER dieser Läsion Reparatur-Intermediate, wie AP-Läsionen und Einzelstrangbrüche (**Abbildung 1-1**), die durchaus eine Elongation der Polymerase verhindern können (Tornaletti, Maeda & Hanawalt, 2006). Übereinstimmend damit konnte in Zellextrakten gezeigt werden, dass erst die Prozessierung von Uracil eine Blockade der Transkription verursacht und hierfür wohl die generierten Einzelstrangbrüche verantwortlich sind, welche einen klaren Block der RNA-Polymerase II bewirken (Kathe et al., 2004).

Es ist wichtig zu erwähnen, dass die bisher aufgezählten Ergebnisse zu den Auswirkungen von Uracil und der auftretenden Reparatur-Intermediate auf die Transkription aus zellfreien Studien hervorgehen, welche das komplexe Zusammenspiel der unterschiedlichen Reparatur- und Transkriptionsfaktoren nur unzureichend wiedergeben können. Eine effektive Methode, den Einfluss von DNA-Schäden auf die Genexpression in den Zellen zu untersuchen, stellt der Host cell reactivation Assay (HCR) dar. Bei diesem werden Reporter-Vektoren zunächst in vitro geschädigt, um dann in die Zellen transfiziert zu werden. Bei blockierenden (z.B. UV-generierten) DNA-Läsionen kann so nach anfänglich verringerter Genexpression mit zunehmender Zeit durch die Reparatur dieses Schadens eine Reaktivierung der Transkription beobachtet werden (Johnson & Latimer, 2005). Auf dieser Methode beruhend konnte mit Vektoren, die Uracil enthalten, je nach Positionierung der Läsion ein unterschiedlich starker Effekt auf die Expression eines Reportergens beobachtet werden, der zwischen keinen Auswirkungen und einer deutlichen Inhibierung schwankte (Malyarchuk & Harrison, 2005). Die Autoren vermuten, dass eine unterschiedlich schnelle Exzision oder Reparatur

des Uracils hierfür verantwortlich ist, welche je nach Sequenzkontext der Läsion variieren kann. Dabei könnte eine langsame Reparatur durch die längere Verweildauer von Reparatur-Intermediaten (und an der DNA gebundener Proteine) problematisch für die Transkription sein. Ob die Exzision von Uracil aus der DNA durch die monofunktionellen UDGs jedoch tatsächlich Einfluss auf die Expression eines Gens besitzt, bleibt bislang unbeantwortet.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welche Auswirkungen ein einzelnes Uracil und dessen Exzision durch monofunktionelle DNA-Glykosylasen auf die Genexpression besitzen. Hierfür wurden mit Hilfe einer neuen und sehr effizienten Methode Reporter-Vektoren konstruiert, bei denen ein einzelnes Uracil, gepaart mit Adenin oder fehlgepaart mit Guanin, im transkribierten oder nicht-transkribierten DNA-Strang innerhalb des EGFP-Gens positioniert wurde. Des Weiteren wurde die Expression der Uracil-DNA-Glykosylasen UNG1/2, SMUG1 oder TDG permanent mittels short hairpin RNA (shRNA) in HeLa-Zellen herunterreguliert. Nach Transfektion der konstruierten Vektoren in die Zellen wurde die Expression des Reportergens mittels Durchflusszytometrie gemessen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Software

Gerät inklusive Software	Firma	Ort
Autoklav Technoclav 50 6.0 bzw. 2.0	Fedegari Autoclav SPA	Albuzzo, Italien
Brutschrank CO2-Inkubator BB16, BB6060 O2 und Hera-Cell	Heraeus Instruments	Hanau
Coulter Counter Z2 Coulter® Particle Count and Size Analyzer	Beckman Coulter Inc.	Fullerton, U.S.A.
Destillationsapparatur Destamat®	Heraeus Instruments	Hanau
Durchflusszytometer BD FACScalibur™ FACS System mit CellQuest™ Pro Software	Becton Dickinson GmbH	Heidelberg
Geldokumentationssystem Gel Doc 1000 mit Molecular Analyst® Software	Bio-Rad	Hercules, U.S.A.
Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ mit Image Lab™ Software Version 3	Bio-Rad	Hercules, U.S.A.
Gelelektrophorese-Kammer Agarose-Gele SDS-PAGE: MGV 202	Bio-Rad C.B.S. Scientific	Hercules, U.S.A. Del Mar, U.S.A.
Inkubator 25D Incubator Shaker	New Brunswick Scientific	New Jersey, U.S.A.
Lichtmikroskop Telaval 31	Zeiss	Oberkochen
pH-Meter PHM 62	Radiometer	Kopenhagen, Dänemark
Power Supply Power Pac 300/Power Pac Basic™	Bio-Rad	Hercules, U.S.A.
Realtime PCR Cyclus Lightcycler® 1.5 Real Time PCR System mit Software Version 3.5.3	Roche Diagnostics	Mannheim
Schüttler Schüttler Labnet Orbit™ LS Vortex Genie 2™ Vortex-Schüttler	Labnet International Inc. Bender & Hohbein AG	Edison, U.S.A. Zürich, Schweiz
Sonifizierer Bachofer GM 70 HD ultrasonic processor	Bachofer GmbH	Reutlingen
Spektrophotometer Biowave S2100 Spectrophotometer Nanodrop 2000 Spectrophotometer	WPA Thermo Scientific	Cambridge, U.K. Waltham, U.S.A.

Thermocycler/-block		
Progene Thermocycler	Techne	Cambridge, U.K.
Biometra® T Gradient Thermocycler	Biometra®	Göttingen
MJMini Personal Thermal Cycler	Bio-Rad	Hercules, U.S.A
Thermoblock – Thermostat	Gebr. Liebisch	Karlsruhe
Transferkammer		
Mini Trans®-Blot Cell	Bio-Rad	Hercules, U.S.A
UV-Lampe		
UV-B Lampe TL20W/12RS	Philips Licht	Hamburg
UV-C Hg-Niederdruck-Lampe (254nm) Original Haman F1,15W,50Hz und Photoverschluss Ibsar (DRP)		
UV-Sensor		
UV-B-Sensor	Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH	Ettlingen
UV-Vis-Dosimeter, Luxmeter 110 mit geeichtem GaP-Photoelement	PRC Krochmann GmbH	Berlin
Waagen		
PB 3002, Delta Range, max. 3100 g	Mettler Toledo	Greifensee, Schweiz
AG 245, max. 210 g	Mettler Toledo	Greifensee, Schweiz
Wasserbad		
Köttermann Typ 3042	Köttermann	Uetze-Hänigsen
Zentrifuge		
Eppendorf Centrifuge 5415D	Eppendorf	Hamburg
Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR™ International	Darmstadt
Universal 320R Zentrifuge	Hettich Zentrifugen	Tuttlingen
Preparative Ultrazentrifuge OptimaLE-80K	Beckmann Instruments Inc	Palo Alto, CA, U.S.A.
Heraeus® Labofuge® 400R Zentrifuge	Heraeus Instruments	Hanau
Software	Firma	Ort
OligoAnalyzer 3.1	Integrated DNA Technologies	Leuven, Belgien
Oligoengine 2.0 Software	Oligoengine	Seattle, U.S.A.
ClustalW2 Software	EBI	Cambridge, U.K.
Primer Designer 4 V4.1	Scientific & Educational Software	Cary NC, U.S.A.
siRNA Wizard 3.1	Invivogen	Toulouse, Frankreich

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Hilfsmittel

Material	Firma	Ort
Baysilone-Paste	Bayer AG	Leverkusen
Coulter Counter Döschen	Beckman Coulter Inc	Fullerton, U.S.A.
Faltenfilter (Rotilabo®, Typ 601P)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Glasgeräte	Schott Spezialglas GmbH	Mainz
Gewebekulturschalen mit Noppen (21, 58 und 143 cm ²)	Greiner Bio-ONE	Frickenhausen

Greiner-Röhrchen (15 und 50 ml)	Greiner Bio-ONE	Frickenhausen
Kryoröhrchen Nalgene®	Nalge Nunc International	Rochester, NY
Magnetische Platte	IBA GmbH	Göttingen
Nitro-Cellulose-Membran		
Amersham Hybond-C Extra	GE Healthcare	Freiburg
Photofilm		
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare	Freiburg
LucentBlue X-ray Film	Biozym Scientific GmbH	Hessisch Oldendorf
Pipetten		
Glas (Zellkultur)	Hartenstein	Würzburg
Plastikpipetten BioPette A (10, 20, 200 und 1.000 µl)	Labnet International	Edison, U.S.A.
Pasteurpipetten	Hartenstein	Würzburg
Pipettenspitzen		
ohne Filter 10, 200, und 1.000 µl	Sarstedt	Nümbrecht
ohne Filter 5 und 10 ml	Hartenstein	Würzburg
mit Filter ART® 10, 200 und 1.000 µl	Thermo Scientific	Dreieich
Pipettierhilfe		
Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte	Eberstadt
Platten		
6-, 24- und 96-Well Bakterienplatten	Nunc GmbH & Co. KG Greiner Bio-ONE	Wiesbaden Frickenhausen
Reaktionsgefäße		
0,5, 1,5 und 2 ml	Sarstedt	Nümbrecht
0,2 ml	Greiner Bio-ONE	Frickenhausen
Zellkulturflaschen (25, 75 und 125 cm ²)	Greiner Bio-ONE	Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt	Nümbrecht

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Firma	Ort
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Hepes)	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze
3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze
7-Nitroindol-2-carboxylsäure	Alfa Aesar	Karlsruhe
Acrylamid-/Bisacrylamid Lsg. (30 %) Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Agarose	Invitrogen GmbH	Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA) (Protease-frei)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Bacto-Agar	Hartenstein	Würzburg
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent	Bio-Rad	Hercules, USA
Bovines Serumalbumin (BSA) (Nuklease-frei)	New England Biolabs GmbH	Frankfurt
Brilliant Blue	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze
Chloroform	Carl Roth GmbH	Karlsruhe

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Eisessig	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Ethanol absolut	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Formaldehyd (37 %)	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze
Giemsa-Stain-Lösung	Sigma Aldrich	Seelze
Glycerol	VWR TM International	Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze
Hefeextrakt	Life Technologies GmbH	Darmstadt
Ilford Multigrad Developer	HARMAN technology Limited	Mobberley, U.K.
Ilford Rapid Fixer	HARMAN technology Limited	Mobberley, U.K.
Isopropanol	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck Millipore	Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Life Technologies GmbH	Darmstadt
Manganchlorid (MnCl ₂)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Natriumacetat	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck Millipore	Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Orange G	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze
Phenol	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze
Phenol:Chloroform:Isoamyl (25:24:1)	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze
Phenylmethyl-Sulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze
Ponceau-Rot	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze
Sulfosalicylsäure	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze
Tetracyclin	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Trichloressigsäure	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Triton-X100	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze
Trypton	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze
Tween 20	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Western Lightning®-ECL	Perkin Elmer	Waltham, U.S.A.

2.1.4 Enzyme, Inhibitoren und Marker

Enzym, Inhibitor und Marker	Firma/Person	Ort
Antarctic Phosphatase mit Puffer (10 ×)	New England Biolabs GmbH	Frankfurt
BglII (10 u/μl)	New England Biolabs GmbH	Frankfurt
cOmplete mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics	Mannheim
DNase I (1 u/μl)	Fermentas (Thermo Scientific)	St. Leon-Rot (Dreieich)
Endonuklease III (Nth) (10 u/μl) mit Reaktionspuffer (10×)	New England Biolabs GmbH	Frankfurt
Endonuklease IV	M. Pflaum bzw. C. Flohr und I. Schulz	Mainz
Endonuklease IV (10 u/μl)	New England Biolabs GmbH	Frankfurt
HindIII (15 u/μl)	GE Healthcare	Freiburg
Marker		
DNA-Marker		
GeneRuler 100 bp (Plus)	Fermentas (Thermo Scientific)	St. Leon-Rot (Dreieich)
GeneRuler 1 kb	Fermentas (Thermo Scientific)	St. Leon-Rot (Dreieich)
Lambda DNA/HindIII	Fermentas (Thermo Scientific)	St. Leon-Rot (Dreieich)
QuickLoad® 1 kb	New England Biolabs GmbH	Frankfurt
Protein-Marker		
PageRuler Prestained	Fermentas (Thermo Scientific)	St. Leon-Rot (Dreieich)
Nb.Bpu10I mit Puffer R (10×) mit Tango-Puffer (10×)	Fermentas (Thermo Scientific)	St. Leon-Rot (Dreieich)
Nt.Bpu10I mit Puffer R (10×) mit Tango-Puffer (10×)	Fermentas (Thermo Scientific)	St. Leon-Rot (Dreieich)
Proteinase K	Carl Roth GmbH	Karlsruhe
Ribolock™ RNase-Inhibitor (40 u/μl)	Fermentas (Thermo Scientific)	St. Leon-Rot (Dreieich)
RNA-Ladepuffer (2×)	Fermentas (Thermo Scientific)	St. Leon-Rot (Dreieich)
RNase A	Serva Electrophoresis GmbH	Heidelberg
T4 DNA Ligase (30 u/μl) mit T4 DNA Ligase Puffer (10×)	Fermentas (Thermo Scientific)	St. Leon-Rot (Dreieich)
T4 Polynukleotidkinase (10 u/μl)	Fermentas (Thermo Scientific)	St. Leon-Rot (Dreieich)
<i>Tfi</i> DNA-Polymerase (5 u/μl) mit <i>Tfi</i> PCR Reaktionspuffer (5×) und MgCl ₂ dNTP-Mix	Life Technologies GmbH	Darmstadt
Uracil-DNA Glykosylase (5 u/μl)	Fermentas (Thermo Scientific)	St. Leon-Rot (Dreieich)
	New England Biolabs GmbH	Frankfurt

2.1.5 Kits

Kit	Firma	Ort
Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices 30k	Merck Millipore	Darmstadt
Direct-zol™ RNA MiniPrep-Kit	Zymo Research	Freiburg

Effectene® Transfection Reagent mit EC-Puffer und Enhancer	Qiagen GmbH	Hilden
illustra GFX PCR and Gel Band Purification Kit	GE Healthcare	Freiburg
LightCycler® FastStart DNA Master ^{PLUS} SYBR Green I Kit	Roche Diagnostics	Mannheim
Matra-A Reagent	PromoCell GmbH	Heidelberg
Qiagen Plasmid Mega Kit	Qiagen GmbH	Hilden
RevertAid™ First Strand cDNA Synthese Kit	Fermentas (Thermo Scientific)	St. Leon-Rot (Dreieich)
RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthese Kit	Fermentas (Thermo Scientific)	St. Leon-Rot (Dreieich)
RNA Clean & Concentrator™-5	Zymo Research	Freiburg
Zymo ZR RNA MiniPrep™-Kit	Zymo Research	Freiburg
ZR RNA MiniPrep™-Kit	Zymo Research	Freiburg

2.1.6 Antibiotika, Puffer und Medien für die Zellkultur

Enzym	Firma/Person	Ort
DMEM High Glucose Medium	PAA Laboratories GmbH (GE Healthcare)	Cölbe (Freiburg)
DMEM ohne Phenolrot, ohne L-Glutamin	PAA Laboratories GmbH (GE Healthcare)	Cölbe (Freiburg)
Fötales Rinder Serum Gold (FBS)	PAA Laboratories GmbH (GE Healthcare)	Cölbe (Freiburg)
Geneticin (G418)	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze
L-Glutamin 200 mM	PAA Laboratories GmbH (GE Healthcare)	Cölbe (Freiburg)
Penicillin	PAA Laboratories GmbH (GE Healthcare)	Cölbe (Freiburg)
Puromycin	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze
Sodium Pyruvat 100 mM	PAA Laboratories GmbH (GE Healthcare)	Cölbe (Freiburg)
Streptomycin	PAA Laboratories GmbH (GE Healthcare)	Cölbe (Freiburg)
Trypsin-EDTA in PBS	PAA Laboratories GmbH (GE Healthcare)	Cölbe (Freiburg)

2.1.7 Säugerzelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Verdop- plungszeit	Herkunft
<i>Csb</i> ^{mut/mut} -MEF	Spontan immortalisierte Maus-Embryo-Fibroblasten aus <i>Csb</i> ^{mut/mut} -Mäusen	18 Stunden	A. Klungland (Department of Molecular Biology, The National Hospital, University of Oslo, Norwegen)

<i>Csb</i> ^{mut/mut} <i>Ogg1</i> ^{-/-} MEF	Spontan immortalisierte Maus-Embryo-Fibroblasten aus <i>Csb</i> ^{mut/mut} <i>Ogg1</i> ^{-/-} -Mäusen	22 Stunden	D. Barnes (Imperial Cancer Research Fund, Clare Hall Laboratories, South Mimms, Hertfordshire, U.K.)
FB2-299	Primäre humane Hautfibroblasten	24 Stunden	T. Runger (Boston, U.S.A.)
HeLa	Humane Cervix-Karzinom-Zellen	17 Stunden	R. J. Wiesner (Institut für Vegetative Physiologie, Universität Köln)
LN428	shRNA lentiviral transduzierte Glioblastoma-Zellen mit Knockdown des UNG-, SMUG1- oder TDG-Gens	-	Trevigen Inc. (Gaithersburg, U.S.A.) AMS Biotechnology (Frankfurt)
MRC-5 VA1	Menschliche SV40-transformierte Lungenfibroblasten	-	NIGMS Human Genetic Cell Repository, Coriell Institute for Medical Research (Camden, New Jersey, USA)
Wildtyp- MEF (F11.1)	Spontan immortalisierte Maus-Embryo-Fibroblasten aus <i>Wildtyp</i> -Mäusen	17 Stunden	D. Barnes (Imperial Cancer Research Fund, Clare Hall Laboratories, South Mimms, Hertfordshire, U.K.)

2.1.8 Vektoren und Vektorgerüste

Plasmid-bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
pcDNA3	Vermittelt Geneticin-Resistenz zur Selektion von Klonen nach stabiler Transfektion der shRNA-Expressions-Vektoren	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
pDsRed-Monomer N1 (pDsRed)	Codierend für DsRed-Monomer N1 als Transfektionsmarker	Clontech Laboratories Inc. (Saint Germain en Laye, Frankreich)
pEGFP-mODC-ZA (pZA)	Modifiziertes pEGFP-C3 mit zusätzlicher invertierter ODC-Sequenz, codierend für stabiles EGFP	Dr. A. Khobta (Mainz) (Khobta et al., 2009)
pEGFP-mODC-ZAJ (pZAJ)	Modifiziertes pEGFP-mODC-ZA mit stiller Mutation innerhalb des Kanamycin-Resistenz-Gens zur Beseitigung einer Restriktions-Schnittstelle	J. Allgayer (Mainz) (Allgayer et al., 2013)
pENTR/pSUPER+ (575-1)	shRNA-Expressions-Vektor	Addgene (Cambridge, U.S.A.)

2.1.9 Vektoren mit definierten Modifikationen der Basen oder des Zuckerphosphat-Rückgrats

Plasmid-bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
3× 5hmU:A	pEGFP-mODC-ZAJ mit drei 5-hmU:A-Basenpaaren in der 5'-UTR des EGFP-Gens	J. Allgayer (Mainz)
8-oxoG:C	pEGFP-mODC-ZA mit einem 8-oxoG:C-Basenpaar innerhalb des EGFP-Gens	Dr. N. Kitsera (Mainz) (Kitsera et al., 2011)

G(N ²)AAF	pEGFP-mODC-ZAJ mit einem G(N ²)AAF – Addukt in der 5'-UTR des EGFP-Gens	Dr. N. Kitsera (Mainz) (Kitsera et al., 2014)
G:C	pEGFP-mODC-ZA mit einem G:C-Basenpaar innerhalb des EGFP-Gens oder pEGFP-mODC-ZAJ mit einem G:C-Basenpaar in der 5'-UTR des EGFP-Gens	Dr. N. Kitsera (Mainz) (Kitsera et al., 2011), (Kitsera et al., 2014)
SSB	pTL-ZA mit einem Einzelstrangbruch (mit 3'-OH und 5'-Phosphat-Ende) innerhalb des EGFP-Gens	Dr. T. Lingg und Dr. D. Krimm (Khobta et al., 2010b)
TT-CPD	pEGFP-mODC-ZAJ mit einem TT-Dimer in der 5'-UTR des EGFP-Gens	Dr. N. Kitsera (Mainz) (Kitsera et al., 2014)

2.1.10 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon aus Ebersberg bezogen. Die Oligonukleotide zur Konstruktion der pEGFP-mODC-ZA-Vektoren mit einer spezifisch positionierten Basenmodifikation oder fehlgepaarten Base im transkribierten oder nicht-transkribierten DNA-Strang des EGFP-Reportergens sind in den **Tabellen 2-19, 2-21 und 2-23** zu finden. Die Reinigung der Oligonukleotide erfolgte mittels HPLC (High performance liquid chromatography). Oligonukleotide, die bei PCR-Reaktionen (darunter auch quantitative Realtime-PCR) angewandt wurden, sind aus **Tabelle 2-2** und **Tabelle 2-17** zu entnehmen. Die Oligonukleotide zur Konstruktion des UNG1/2-, SMUG1-, TDG- und CSB-Knockdown-Expressions-Vektors sind in **Tabelle 2-7** wiedergegeben. Die Reinigung erfolgte mittels Reverse-Phase-Chromatographie und entsprach dem HPSF-Grad (High purity salt free).

2.1.11 Puffer und Arbeitslösungen

Puffer und Arbeitslösung	Zusammensetzung
BE ₁₅ -KCl	20 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 15 mM EDTA
BEH-Puffer	10 mM Hepes pH 7,5 200 mM NaCl 1 mM EDTA
Blocking-Lösung	1 g Albumin Fraktion V 20 ml 0,1 % TBST
Coomassie Brilliant Blue-Lösung	0,25 g Brilliant Blue 45 ml H ₂ O dest. 45 ml Ethanol 10 ml Eisessig
DEPC behandeltes Wasser (autoklaviert)	1 ml DEPC ad 1 l H ₂ O dest über Nacht bei RT inkubieren

DNA-Ladepuffer (6×)	6 ml Glycerol 1,2 ml 50× TAE-Puffer 15 mg Orange G Pulver 2,8 ml H ₂ O dest.
Entfärbelösung	450 ml H ₂ O dest. 450 ml Ethanol 100 ml Eisessig
Geneticin-Lsg. (Filter sterilisiert, Aliquote, -20°C)	100 mg/ml in 100 mM Hepes
Hepes 1M, pH 7,5 (Filter sterilisiert)	11,9 g Hepes 40 ml H ₂ O dest. pH auf 7,5 einstellen mit NaOH ad 50 ml H ₂ O dest.
Kanamycin-Lsg. (Filter sterilisiert, Aliquote, -20°C)	30 mg/ml in H ₂ O dest.
Ladepuffer (6×) (für SDS-PAGE)	8 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8 2 g SDS 10 ml Glycerol Spatelspitze Bromphenolblau 1,4 ml β-Mercaptoethanol
Laufpuffer (5×)	15,1 g Tris-HCl 94 g Glycin 25 ml 20 % SDS ad 1 l H ₂ O dest.
LB-Medium 1× (2×) (autoklaviert)	5 (10) g Trypton 2,5 (5) g Hefeextrakt 5 g NaCl pH 7,5 – 8 einstellen ad 500 ml H ₂ O dest.
Lyse-Puffer (kurz vor Verwendung ansetzen)	100 µl 1 M Tris-HCl (20 mM) 10 µl 0,5 M EDTA, pH 8 (1 mM) 250 µl 5 M NaCl (250 mM) 500 µl Protease-Inhibitor Cocktail 10× (1×) 4.140 µl H ₂ O dest.
PBSCMF pH 7,4 (1×) (Phosphat-gepufferte Salzlösung Mg ²⁺ - und Ca ²⁺ - frei; autoklaviert)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,3 mM NaH ₂ PO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
Phosphatpuffer; pH 7,5	5 mM KH ₂ PO ₄ 50 mM NaCl pH-Einstellung mit NaOH

Ponceau-Rot-Lösung (10×)	0,2 g Ponceau-Rot 3 g Trichloressigsäure 3 g Sulfosalicylsäure ad 100 ml H ₂ O dest.
Protease-Inhibitor Cocktail (10×)	1 Tablette cOmplete mini Protease Inhibitor 1 ml H ₂ O dest.
RIPA-Puffer (radioimmuno precipitation assay; lichtgeschützt, 4°C)	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl-Lösung 1 % v/v Triton-X100 0,5 % w/v Natriumdeoxycholat 0,1 % w/v SDS 5 mM EDTA
RNase A-Lösung	1 mg/ml in H ₂ O dest.
Sammelgel	6,85 ml H ₂ O dest. 1,7 ml Acrylamid-/Bisacrylamid Lsg. (30 %) 1,3 ml 1 M Tris-HCl, pH 6,8 50 µl 20 % SDS 100 µl 10 % APS 10 µl TEMED
SOB-Medium (Super optimal broth-Medium)	0,5 % Hefe-Extrakt 2 % Trypton 10 mM NaCl 2,5 mM KCl ad H ₂ O dest. autoklavieren 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄
Stop-Puffer	6× DNA-Ladepuffer 1 % w/v SDS
TAE-Puffer (50×) (Tris-Acetat- EDTA-Lösung)	2 M Tris 3,4 M Eisessig 0,05 M EDTA (freie Säure)
TB-Puffer (Filter sterilisiert, Lagerung bei 4°C)	10 mM MOPS 15 mM CaCl ₂ 250 mM KCl 55 mM MnCl ₂
TBS (10×) (Tris-gepufferte Salzlösung; autoklaviert)	24,2 g Tris (200 mM) 87,8 g NaCl (1.500 mM) pH 7,4 mit HCl (konz) ad 1 l H ₂ O dest.
TBST 0,5 % (0,1 %) (Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20)	100 ml TBS (10×) 5 (1) ml Tween 20 ad 1 l H ₂ O dest.
TE-Puffer, pH 8 (Tris-EDTA- Lösung)	10 mM Tris-HCl, pH 8 1 mM EDTA, pH 8

Tetracyclin-Lsg. (Aliquote, licht- geschützt, -20°C)	20 mg/ml in Methanol
Topagar-Platten (mit Kanamycin)	4,5 g Bacto-Agar 300 ml LB-Medium (1×) autoklavieren, leicht abkühlen lassen 30 µg/ml Kanamycin (Zugabe unter Flow)
Towbin-Puffer	3,03 g Tris 14,4 g Glycin 1 g SDS 200 ml Ethanol ad 1 l H ₂ O dest.
Transferpuffer	5,8 g Tris 2,9 g Glycin 200 ml Ethanol ad 1 l H ₂ O dest.
Trenngel 10 % (12 %)	3,85 (3,25) ml H ₂ O dest. 3,4 (4) ml Acrylamid-/Bisacrylamid Lsg. (30 %) 2,6 (2,6) ml 1 M Tris-HCl, pH 8,8 50 (50) µl 20 % SDS 100 (100) µl 10 % APS 4 (4) µl TEMED

2.1.12 Antikörper

Ziel	Bezeichnung	Hersteller/Distributor	Ort
UNG1/2	Mouse monoclonal UNG antibody: clone 2C12	OriGene Technologies/ AMS Biotechnologie GmbH	Rockville, U.S.A./Frankfurt
CSB	Rabbit polyclonal CSB/ERCC6 antibody: A301-354A	Bethyl Laboratories/ Biomol	Montgomery, U.S.A./Hamburg
TDG	Rabbit polyclonal TDG antibody: PA5-29140	Thermo Scientific	Dreieich
SMUG1*	Rabbit polyclonal SMUG1 antibody: 312730	OriGene Technologies/ AMS Biotechnologie GmbH	Rockville, U.S.A./Frankfurt
SMUG1*	Goat polyclonal SMUG1 antibody: TA302931	OriGene Technologies/ AMS Biotechnologie GmbH	Rockville, U.S.A./Frankfurt
SMUG1*	Rabbit polyclonal SMUG1 antibody: (H-55): sc-98849	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg
Lamin	Mouse monoclonal Lamin B1 antibody (119D5-F1): sc-56143	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg
β-Aktin	Mouse monoclonal β-Aktin antibody (C4): sc-47778	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg
Maus	Goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg
Ziege	Donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2020	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg

Hase	Goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004	Santa Cruz Biotechnology	Heidelberg
------	--------------------------------------	--------------------------	------------

*Keiner der verwendeten SMUG1-Antikörper konnte das Protein spezifisch detektieren.

2.2 Methoden

2.2.1 Grundlegende Techniken zum Arbeiten mit Zellen

2.2.1.1 Kultivierung von Zellen

Das Arbeiten mit Zellkulturen erfolgte stets an einer Sterilbank und unter Verwendung steriler Lösungen. Kultiviert wurden die Zellen in Brutschränken bei 37°C, einem CO₂-Anteil von 5 % und bei einer Luftfeuchtigkeit von 99 %.

Das Medium zur Kultivierung der Zellen bestand aus DMEM-Medium, welches zusätzlich 2 mM Pyruvat, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 mg/l Streptomycin enthielt. Im Falle der Zellen, die aus menschlichem Gewebe stammen, wurde dem Medium noch 10 % v/v FBS hinzugefügt, während das Medium für die Maus-Embryo-Fibroblasten mit 15 % v/v FBS versetzt wurde. Dem Medium zur Kultivierung von HeLa-Zellen, die stabil mit dem pENTR/pSUPER+-Vektor transfiziert worden waren, wurde Geneticin (1.100 µg/ml) zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks hinzugegeben, während für die lentiviral transduzierten LN428-Glioblastoma-Zellen Puromycin (1 µg/ml) verwendet wurde.

Bei Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen umgesetzt. Hierfür wurden die adhärenenten Zellen zweimal mit PBSCMF gewaschen und mit Trypsin im Brutschrank bei 37°C bis zum Ablösen inkubiert. Anschließend wurde das Trypsin durch Zugabe von Medium inaktiviert, die Zellen vereinzelt und verdünnt in eine neue Zellkulturflasche ausgestreut.

Gezählt wurden die Zellen in einem Z2 Coulter® Particle Count and Size Analyzer (Beckmann Coulter Inc., Fullerton, U.S.A.), wobei sie zuvor nach Ablösung vom Flaschenboden ordentlich in Medium resuspendiert worden waren.

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese nach der Ablösung mit Trypsin in frischem Medium aufgenommen. Nach Zentrifugation (1.000 × g, 5 min, 4°C) wurde das Zellpellet in DMSO-haltigem (10 % v/v) Medium aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und zu mehreren Aliquoten auf Kryoröhrchen verteilt. Das Einfrieren der Zellen erfolgte zunächst für 2 Stunden bei -20°C, bevor sie über Nacht bei -80°C gelagert und schließlich in flüssigem Stickstoff deponiert wurden.

Zur Reaktivierung der tiefgefrorenen Zelllinien wurden diese bei 37°C im Wasserbad aufgetaut, in kaltem Medium aufgenommen und zentrifugiert (1.000 × g, 5 min, 4°C). Das Zellpellet wurde in Medium resuspendiert und in eine 25 cm²-Zellkulturflasche übertragen. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium gewechselt oder die Zellen bei Erreichen von Konfluenz passagiert.

2.2.1.3 Erstellung einer Wachstumskurve

Zur Erstellung einer Wachstumskurve wurden je Zelllinie und Zeitpunkt 5×10^4 Zellen in Triplikaten pro Vertiefung in 6-Well-Platten ausgestreut und bis zum entsprechenden Zeitpunkt (24, 48, 72 und 96 Stunden) kultiviert, wobei nach 48 Stunden das Medium gewechselt wurde. Zum jeweiligen Zeitpunkt wurden die Zellen abgelöst und ihre Anzahl mittels Z2 Coulter® Particle Count and Size Analyzer bestimmt.

2.2.1.4 Kolonien-Bildungsfähigkeit nach UV-C Bestrahlung

Der Clonogenic Survival Assay untersucht die Fähigkeit der Zellen nach UV-C Bestrahlung Kolonien zu bilden. Die Versuche wurden je Zelllinie und Bestrahlungsdauer in Triplikaten und in Geneticin-freiem Zellkulturmedium durchgeführt. Es wurden 100 oder 120 Zellen pro Vertiefung in 6-Well-Platten ausgestreut und für 4 Stunden weiter im Brutschrank kultiviert. Nach sorgfältiger Abnahme des Mediums erfolgte die Bestrahlung der Zellen mit einer UV-C-Lampe (Wellenlänge 254 nm), deren Intensität durch ein Metallgitter abgeschwächt wurde, für 15, 30, 60, 120 und 240 Sekunden. Die Strahlendosis wurde mittels UV Dosimeter (Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH) als Energiedosis bestimmt und betrug 50 nA. Die bestrahlten Zellen wurden mit frischem Medium versetzt und für 10 – 14 Tage kultiviert, wobei alle 2 Tage das Medium ausgetauscht wurde. Bei den nicht-bestrahlten Kontrollen wurde statt einer Bestrahlung lediglich das Kulturmedium gewechselt.

Zum Nachweis der Kolonien wurden die Zellen mit 0,9 % w/v NaCl-Lösung gewaschen, für 10 Minuten in Methanol fixiert und mit 1:10 verdünnter Giemsa-Stain-Lösung (Sigma Aldrich) 10 Minuten lang gefärbt. Nach Waschen mit Wasser und Trocknung an der Luft bei Raumtemperatur konnten die Kolonien gezählt werden.

2.2.1.5 Analyse der Proliferation und/oder des Überlebens von Zellen in Gegenwart eines APE-1-Inhibitors

Der Test, ob der APE1-Inhibitor 7-Nitroindol-2-carboxylsäure (Alfa Aesar, Karlsruhe) die Proliferation und/oder das Überleben der HeLa-Zellen beeinflusst, erfolgte analog der Transfektion in Gegenwart des Inhibitors, nur dass statt des Transfektionsmixes 700 µl Medium zu den Zellen hinzupipettiert wurde (siehe Kapitel 2.2.1.6.1). Nach 24-stündiger Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und im Z2 Coulter® Particle Count and Size Analyzer gezählt.

2.2.1.6 Transfektion von Plasmid-DNA in Säugetierzellen

2.2.1.6.1 Transfektion von Plasmid-DNA in menschliche Zellen

Zur Transfektion der Expressions-Vektoren wurde das Transfektions-Reagent Effectene® (Qiagen) verwendet. Dazu wurden $5 - 7 \times 10^5$ HeLa-Zellen, $5,5 \times 10^5$ MRC5-Zellen, 2×10^5 FB2-299-Zellen oder 4×10^5 LN428-Zellen in eine Vertiefung der 6-Well-Platte ausgestreut und deren Medium 16 Stunden später gegen 1,6 ml frisches, auf 37°C vorgewärmtes Zellkulturmedium ausgetauscht, wobei die Zellen 70 – 80 % Konfluenz aufwiesen. Bei der Zubereitung des Transfektions-Mixes wurden 800 ng Plasmid-DNA (in 5 – 8 µl Lösung) mit 92 µl EC-Puffer und 3,2 µl Enhancer vermischt, kurz gevortext und für 2 – 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 4,5 µl Effectene®-Reagent wurde die Probe erneut gevortext (10 Sekunden) und bei Raumtemperatur inkubiert (5 – 10 Minuten). Der Transfektions-Mix wurde nun mit 600 µl warmen Zellkulturmedium gemischt, tropfenweise auf die Zellen gegeben und durch leichtes Schwenken verteilt. Die Zellen wurden bis zum Ablösen im Brutschrank bei 37°C kultiviert.

Zur Transfektion in Gegenwart des APE1-Inhibitors 7-Nitroindol-2-carboxysäure (NCA) wurden $7 - 8 \times 10^5$ HeLa-Zellen ausgestreut. Das vor der Transfektion der Zellen ausgetauschte Medium enthielt in diesem Falle NCA (gelöst in Methanol, Stammkonzentration 50 mM), so dass nach Zugabe des Transfektions-Mixes die entsprechende Endkonzentration (0 – 1.000 µM) in den 6-Well-Platten erreicht wurde. Als Lösungsmittelkontrolle wurde reines Methanol verwendet.

2.2.1.6.2 Transfektion von Plasmid-DNA in Maus-Embryo-Fibroblasten

Die Transfektion von Maus-Embryo-Fibroblasten (MEF) erfolgte mit dem Matra-A Reagent (PromoCell GmbH, Heidelberg). Hierzu wurden $2 - 2,2 \times 10^5$ MEF in eine Vertiefung der 6-Well-Platten ausgestreut. Nach 16 Stunden wurde ein Plasmid-Mix, der 800 ng des konstruierten pEGFP-mODC-ZA-Vektors und 1.500 ng des pDsRed-Plasmids in 30 µl BEH-Puffer enthielt, mit 170 µl reinem DMEM-Medium (ohne Phenolrot) und 3 µl Matra-A Reagent versetzt und für 15 Sekunden lang gevortext. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde dem Mix noch 2 ml warmes Kulturmedium hinzugegeben und das bisherige Kulturmedium der Zellen gegen diesen Transfektions-Mix ausgetauscht. Die 6-Well-Platten wurden daraufhin auf (bereits vorgewärmte) magnetische Platten im Brutschrank platziert und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert, wobei nach 10 Minuten die 6-Well-Platte um 180° gedreht wurde, um eine homogene Transfektion zu erzielen. Nach Ablauf der Zeit wurden die Magnetplatten entfernt und die Zellen, bis zur Fixierung mit Formaldehyd, 24 Stunden nach der Transfektion kultiviert.

2.2.2 Grundlegende Methoden zum Arbeiten mit Bakterien

2.2.2.1 Herstellung ultra-kompetenter Bakterien

Der in 15 %-igem Glycerol tiefgefrorene Bakterienstamm *E. coli scs-8* wurde mit einer Pipettenspitze angekratzt und mit dieser in ein Greiner-Röhrchen mit 2 ml 2× LB-Medium inklusive Tetracyclin (20 µg/ml) überführt. Die Bakterien wurden unter ständigem Schütteln (200 rpm, 25D Incubator Shaker) bei 37°C über den Tag kultiviert und die gesamte Bakteriensuspension benutzt, um 125 ml Tetracyclin-haltiges (20 µg/ml) SOB-Medium in einem Schikane-Kolben anzuimpfen. Die Bakterien wurden bei Raumtemperatur unter Schütteln (200 rpm, 25D Incubator Shaker) weiter kultiviert, bis die Suspension einen OD₆₀₀ von 0,6 erreichte (nach ca. 16 Stunden). Nun wurde die Kultur unter leichtem Schütteln für 10 Minuten auf Eis gestellt, bevor sie in 50 ml Greiner-Röhrchen zentrifugiert wurde (1.800 × g, 10 min, 4°C). Nach Lösung des Bakterienpellets in 40 ml eiskaltem TB-Puffer wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (1.800 × g, 10 min, 4°C). Die Bakterien wurden in 10 ml eiskaltem TB-Puffer aufgenommen, die Suspension mit DMSO versetzt (7 % v/v) und für 10 Minuten auf dem Eis inkubiert. Aliquote (0,5 – 1 ml) wurden auf Kryoröhrchen verteilt, in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und bei -80°C gelagert. Diese Prozedur zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde von Inoue beschrieben (Inoue, Nojima & Okayama, 1990).

2.2.2.2 Transformation

Zur Transformation kompetenter Bakterien wurden 5 µl Plasmid-DNA (50 pg – 5 ng), codierend für ein Antibiotikum-Resistenz-vermittelndes Protein, zu 95 µl kompetenter Bakterien gegeben und nach 30-minütiger Inkubation auf Eis für exakt 90 Sekunden in ein 42°C warmes Wasserbad platziert. Nach sofortigem Transfer der Reaktionsgefäße auf Eis wurden die Bakteriensuspensionen nach 1 – 2-minütigem Abkühlen zu 600 µl 2× LB-Medium gegeben und für 45 – 60 Minuten bei 37°C geschüttelt (200 rpm, 25D Incubator Shaker). Das Ausplattieren erfolgte mit 50 – 100 µl der transformierten Bakteriensuspension auf Agarplatten (mit 30 µg/ml Kanamycin für die Plasmide pDsRed-Monomer N1, pEGFP-mODC-ZA und pENTR/pSUPER+), wobei die Bakterien mit Glas-Kugeln auf der Platte verteilt wurden. Die invertierten Platten wurden bei 37°C inkubiert und die Kolonien am nächsten Tag gezählt.

2.2.2.3 Mini- und Mega-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Mini-Präparation wurde die in 15 % (v/v) Glycerol eingefrorene Bakterienkultur mit einer Pipettenspitze angekratzt, die Spitze in ein 50 ml Greiner-Röhrchen mit 5 ml 1× LB-Medium (mit 30 µg/ml Kanamycin für die Plasmide pDsRed-Monomer N1, pEGFP-mODC-ZA und pENTR/pSUPER+) geworfen und die Bakterien für 16 Stunden (über Nacht) bei 37°C geschüttelt (200 rpm, 25D Incubator Shaker). Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem ZR Plasmid MiniprepTM-Classic

(Zymo Research) nach dem Protokoll des Herstellers, wobei 10 mM Tris-HCl (pH 8) zur Elution der DNA verwendet wurde.

Zur Mega-Präparation wurde nach Transformation eines Nanogramms der Plasmid-DNA eine Bakterien-Kolonie mit einer Pipettenspitze gepickt und diese samt Spitze in ein 50 ml Greiner-Röhrchen mit 3 – 5 ml 1× LB-Medium (mit 30 µg/ml Kanamycin) überführt. Nach 8-stündiger Inkubation bei 37°C unter ständigem Schütteln (200 rpm, 25D Incubator Shaker) wurde 1 – 2 ml dieser Kultur in einen Schikane-Kolben mit 500 ml 1× LB-Medium (mit 30 µg/ml Kanamycin) gegeben und für 16 Stunden (über Nacht) bei 37°C weiter geschüttelt (200 rpm, 25D Incubator Shaker). Zur Aufarbeitung der Plasmid-DNA wurde das Qiagen Plasmid Mega Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Nach Zugabe des Neutralisierungspuffers wurde aber lediglich für 5 – 10 Minuten auf Eis inkubiert und das Lysat anschließend filtriert (Rotilabo®-Faltenfilter), bevor es auf die Säule aufgetragen wurde. Zur Elution wurden nur 16 ml des Puffers QF benutzt und dementsprechend wurde auch das Volumen an Isopropanol zur Fällung auf 14 ml angepasst. Nach Zentrifugation wurde mit 15 ml eiskaltem Ethanol gewaschen und die Luft-getrockneten Pellets in 2 – 3 ml 10 mM Tris-HCl (pH 8) oder TE-Puffer gelöst.

2.2.3 Grundlegende Methoden zum Arbeiten mit DNA

2.2.3.1 Phenolextraktion der DNA

Zur Extraktion der DNA wurde die Lösung mit einer 10 % w/v SDS-Lösung versetzt, so dass die Endkonzentration in den Proben 0,1 % w/v SDS betrug. Es wurde ein dem Probenvolumen entsprechendes Volumen an Phenol hinzugegeben und die Probe auf dem Vortexer 30 Sekunden lang gut durchmischt. Nach Zentrifugation (5.000 × g, 2,5 min, Raumtemperatur) wurde die wässrige Phase vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Extraktion ein weiteres Mal mit Phenol:Chloroform:Isoamyl (25:24:1) und nochmal mit Chloroform wiederholt, bevor die DNA präzipitiert wurde.

2.2.3.2 Präzipitation der DNA mit Isopropanol

Zur Präzipitation der DNA wurde der DNA-haltigen Lösung ein Zehntel des Eigenvolumens an Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und gleiches Volumen an Isopropanol oder 2,5-faches Volumen an Ethanol hinzugefügt. Nach 6 – 8-maligem Invertieren der Proben wurde zentrifugiert (14.000 × g, 30 min, 4°C), das erhaltene Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (14.000 × g, 20 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet nach Verdunsten des Alkohols an der Luft (5 – 15 min) in BEH- oder TE-Puffer gelöst.

2.2.3.3 Spektrophotometrische Quantifizierung der DNA

Die dsDNA wurde spektrophotometrisch (Biowave S2100 oder Nanodrop 2000) anhand der Absorption bei 260 nm quantifiziert (1 u (unit) A₂₆₀ entspricht 50 ng/μl dsDNA) und mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Das Verhältnis von A₂₆₀/A₂₈₀ diente zur Bestimmung der Reinheit der Proben und lag zwischen 1,8 und 2,0. DNA-Proben wurden bei -20°C oder -80°C gelagert und nach dem Auftauen stets auf Eis verwahrt.

2.2.3.4 Isolierung der DNA aus Zellen

Um DNA aus den transfizierten Zellen zu isolieren, wurde das Medium der in den 6-Well-Platten befindlichen HeLa-Zellen abgenommen, zweimal mit PBSCMF gewaschen und 350 μl des RNase enthaltenen Qiagen Resuspensions-Puffers (aus dem Qiagen Plasmid Mega Kit) hinzugegeben. Nach einminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 350 μl einer 1 % w/v SDS-Lösung in TE-Puffer hinzu pipettiert und die Zellen durch auf- und abpipettieren lysiert. Die viskose Lösung wurde mit Proteinase K (100 μg/ml) versetzt und für 2 – 3 Stunden bei 50°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Phenolextraktion der DNA wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 2.2.3.1), jedoch ohne dass erneut SDS zu den Proben gegeben wurde. Zur Präzipitation der DNA wurde das 2,5-fache Volumen an absolutem Ethanol verwendet, bevor nach der Zentrifugation und dem 70 % Ethanol-Waschschritt (siehe Kapitel 2.2.3.2) das luftgetrocknete Pellet in 250 μl Wasser aufgenommen und die Konzentration der Proben nach Verdünnung in Wasser (1:5) spektrophotometrisch bestimmt. Vor Quantifizierung der DNA mittels Realtime quantitativer PCR (siehe Kapitel 2.2.5) wurden die Proben auf 50 ng/μl mit Wasser verdünnt.

2.2.3.5 Agarose-Gelelektrophorese der DNA

Zur Analyse der DNA wurden 0,8 – 1,8 % w/v Agarose-Gele in 1× TAE-Puffer, der auch als Laufpuffer diente, verwendet. Bei der elektrophoretischen Trennung von Plasmid-DNA, die durch die T4 DNA Ligase ligiert worden war, wurde das Agarose-Gel sowie der 1× TAE-Puffer mit 0,5 μg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Anwesenheit von Ethidiumbromid im Gel ermöglicht es eingeschnittenen Plasmiden nach erfolgreicher Ligation die kovalent-geschlossene DNA-Form anzunehmen. Diese Prozedur wurde bei allen Gelelektrophoresen angewandt, bei denen die konstruierten pEGFP-mODC-ZA-Vektoren, in die synthetische Oligonukleotide eingebaut worden waren, eingesetzt wurden (siehe Kapitel 2.2.8). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 6× DNA-Ladepuffer (mit oder ohne 0,1 % w/v SDS) versetzt, wobei die DNA-Marker von Thermo Scientific (GeneRuler 100 bp (Plus) DNA ladder; GeneRuler 1 kb DNA ladder; Lambda DNA/HindIII Marker) oder NEB (QuickLoad® 1 kb DNA ladder) als Längenstandard dienten. Die Gele liefen 45 – 60 Minuten bei 80 – 100 Volt, bevor sie in Ethidiumbromid-haltigem TAE-Puffer (0,5 μg/ml) für 30 Minuten gefärbt wurden, sofern sie nicht selbst Ethidiumbromid enthielten. Nach kurzem Waschen in entionisiertem

Wasser wurde ein Bild aufgenommen (Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR+ oder Gel Doc 1000) und mit der Software (Image Lab[™] oder Molecular Analyst[®]) analysiert. Bei der quantitativen Auswertung wurde darauf geachtet, dass das Fluoreszenz-Signal der Banden nicht gesättigt war. Extraktion der DNA aus einem Agarose-Gel

Zur Isolierung der DNA aus einem 0,8 %-igen Agarose-Gel, wurde ein kleines Aliquot der DNA in eine einzelne Tasche gefüllt, während der restliche Ansatz in zwei bis drei vereinte Taschen pipettiert wurde. Nach einstündiger Elektrophorese bei 80 – 100 Volt wurde der Teil des Gels, der den präparativen Ansatz enthielt separat in 1× TAE-Puffer gelegt, während das restliche Gel nach 30-minütiger Färbung mit Ethidiumbromid analysiert wurde. Anhand der Laufweite der zu isolierenden DNA-Bande in dem Aliquot konnte die entsprechende Bande aus dem präparativen, ungefärbten Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA extrahiert werden.

Die Extraktion des doppelt-verdauten pENTR/pSUPER+-Plasmids erfolgte mit dem illustra GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Freiburg). Es wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren, wobei die Zentrifugationsdauer jeweils erhöht und mit geringerer Geschwindigkeit durchgeführt wurde (1 min, 6.000 × g). Nach Elution der DNA in 10 mM Tris-HCl (pH 8) erfolgte die Konzentrationsbestimmung der extrahierten Plasmid-DNA mittels Gelelektrophorese unter Zuhilfenahme von DNA-Markern bekannter Konzentration.

2.2.3.6 *Behandlung von DNA-Lösungen mit RNase A*

Sofern die per Mini- oder Mega-Präparation gewonnene DNA-Lösung nach elektrophoretischer Analyse noch RNA-Kontaminationen aufwies, wurde eine RNase-Behandlung durchgeführt. Hierfür wurde die DNA-Lösung mit RNase A (Serva Electrophoresis GmbH) versetzt (100 µg/ml) und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.4 Grundlegende Methoden zum Arbeiten mit RNA

2.2.4.1 *Isolierung der RNA aus Zellen*

Zur Isolierung der RNA aus den Zellen, wurde entweder das Zymo ZR RNA MiniPrep[™]-Kit (Zymo Research) oder Direct-zol[™] RNA MiniPrep-Kit (Zymo Research) verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

Das Zymo ZR RNA MiniPrep[™]-Kit wurde eingesetzt, wenn die mRNA-Expression eines Transgens quantifiziert werden sollte. Dieses Kit eignet sich gut zur enzymatischen Eliminierung von DNA-Kontaminationen, wobei die DNase I-Behandlung der Proben entweder auf der Säule für 2 – 3 Stunden bei Raumtemperatur oder in einem Reaktionsgefäß für 5 Minuten bei 37°C erfolgte. Die in 20 µl Nuklease-freiem Wasser eluierte RNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese auf ihre

Integrität überprüft und bei Unversehrtheit in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben (siehe Kapitel 2.2.4.2 und 2.2.4.3). Bei unvollständigem DNase I-Verdau wurde dieser ein weiteres Mal nach dem Pipettierschema in **Tabelle 2-1** durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 5 Minuten bei 37°C und die Aufarbeitung der RNA erfolgte mit dem RNA Clean & Concentrator™-5 (Zymo Research), wodurch das Elutionsvolumen minimiert werden konnte. Dabei wurde nach der generellen Prozedur des beiliegenden Protokolls gearbeitet, wobei an Stelle der Zymo-Spin™ IC Kolonne die Zymo-Spin™ IIC Kolonne verwendet und die RNA mit 20 µl Nuklease-freiem Wasser eluiert wurde. Erneut wurde zunächst die Unversehrtheit der RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese untersucht, bevor die RNA in cDNA umgeschrieben wurde.

Beim Direct-zol™ RNA MiniPrep-Kit wurde kein DNase-Verdau durchgeführt, da in diesem Falle die isolierte RNA ausschließlich dafür verwendet wurde, die mRNA-Expression des SMUG1-Gens zu bestimmen. Die geringfügige Menge an DNA-Kontamination war hierfür vernachlässigbar. Die isolierte RNA wurde mit 50 µl DNase/RNase-freiem Wasser von der Säule eluiert, die Konzentration mittels Nanodrop 2000 bestimmt und die Integrität der RNA in einem Agarose-Gel überprüft. Anschließend erfolgte die reverse Transkription der RNA.

Tabelle 2-1 Pipettierschema zum DNase I-Verdau der aus Zellen isolierten RNA.

Reagent	Volumen
RNA-Lösung	18 µl
Nuklease-freies H ₂ O	2 µl
10× Reaktionspuffer + MgCl ₂	2,5 µl
DNase I (1 u/µl)	2 µl
Ribolock™ RNase-Inhibitor (40 u/µl)	1 µl
Gesamt	25 µl

2.2.4.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese der RNA

Die Integrität der aus den Zellen isolierten RNA wurde anhand einer Agarose-Gelelektrophorese untersucht. Hierfür wurde analog zu der Agarose-Gelelektrophorese der DNA verfahren (siehe Kapitel 2.2.3.5). Zum Ansetzen des 1 % w/v Agarose-Gels und des einfachen TAE-Puffers wurde jedoch DEPC-behandeltes Wasser verwendet und 3 µl der RNA-Proben wurden mit gleichem Volumen an 2× RNA-Ladepuffer versetzt und für 5 – 10 Minuten bei 70°C denaturiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden. Der Marker wurde ohne Erhitzen mit dem 2× RNA-Ladepuffer vermischt. Da der Ladepuffer bereits Ethidiumbromid enthielt, konnte auf eine Färbung des gesamten Gels verzichtet werden.

2.2.4.3 Reverse Transkription der RNA

Die reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte mit dem RevertAid™ First Strand cDNA Synthese Kit (Thermo Scientific) oder dem RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthese Kit (Thermo Scientific). Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren, wobei 2 – 5 µl (ca. 1 µg) der aus den Zellen isolierten RNA-Lösung als Template dienten und der Random-Hexamer-Primer zur Amplifizierung verwendet wurde.

2.2.5 Realtime quantitative PCR (RT-qPCR)

Die Realtime quantitative PCR wurde einerseits verwendet, um die DNA-Level der transfizierten Vektoren und die mRNA-Expression des Reporter-Gens (EGFP und DsRed-Monomer) zu erfassen, und andererseits, um die Expression des SMUG1-Gens zu ermitteln. Die Analyse der aus den Zellen isolierten DNA und der in cDNA umgeschriebene RNA erfolgte mit dem LightCycler 1.5 unter Verwendung des LightCycler FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I Kit (beide Roche Diagnostics, Mannheim) und der in **Tabelle 2-2** angegebenen Primern. Zur Amplifizierung wurde pro Reaktion 11 µl eines für alle Reaktionen angesetzten LightCycler-Mixes (**Tabelle 2-3**) in die Kapillaren vorgelegt und mit 1 µl Probenlösung versetzt. Nach Zentrifugation (600 × g, 2 min, Raumtemperatur) wurden die Kapillaren in das Karussell des LightCyclers gesetzt und nach dem Programm in **Tabelle 2-4** mit den zu den Primern gehörigen Anlagerungs- und Messungs-Temperaturen (T_{ann} und T_{acq}) inkubiert.

Tabelle 2-2 Primer zur Quantifizierung der mRNA-Expressions- und DNA-Level des pEGFP-mODC-ZA- und pDsRed-Monomer N1-Plasmids mittels Realtime quantitativer PCR.

Primer-Paar	Templat/ Zieltranskript	Position und Strang	Sequenz (5' → 3')	T_{ann}^1 (°C)	T_{acq}^2 (°C)	Produkt- länge
pEGFP 1	pEGFP-mODC-ZA	739 (+) 938 (-)	CTGACCCTGAAGTTCATCTG GTCTTGTAGTTGCCGTCGTC	65	88	200 bp
pEGFP 2	pEGFP-mODC-ZA	1153 (+) 1368 (-)	GACCACTACCAGCAGAACAC GCCTGTGCTTCTGCTAGGAT	65	88	216 bp
pDsRed	pDsRed-Monomer N1	701 (+) 939 (-)	TCAAGGAGTTCATGCAGTTC GAAGGACAGCTTCATGTAGT	65	88	239 bp
SMUG1	SMUG1	348* (+) 565* (-)	CAACTACGTGACTCGCTACT CACCACTCACTTCTGACTGT	60	84	218 bp
GAPDH	GAPDH	1221* (+) 1378* (-)	AAGAGCACAAAGAGGAAGAGA TTATTGATGGTACATGACAAG	60	86	158 bp

¹ T_{ann} = Temperatur zum Anlagern der Primer an das DNA-Template

² T_{acq} = Temperatur zur Messung der Fluoreszenz

* = Position ausgehend vom ersten Exon der mRNA

Tabelle 2-3 Pipettierschema des LightCycler-Mixes für die Amplifizierung.

Reagent	Volumen für n Reaktionen
Master Mix	1,2 $\mu\text{l} \times n \times 1,1$
Nuklease-freies H ₂ O	3,44 $\mu\text{l} \times n \times 1,1$
MgCl ₂ (25 mM)	0,36 $\mu\text{l} \times n \times 1,1$
Primer + (2 μM)	3 $\mu\text{l} \times n \times 1,1$
Primer – (2 μM)	3 $\mu\text{l} \times n \times 1,1$
Gesamt	11 $\mu\text{l} \times n \times 1,1$

Tabelle 2-4 Programm der Realtime quantitativen PCR (T_{ann} und T_{acq} sind in **Tabelle 2-2** zu finden).

Schritt	Temperatur	Zeit	Option	Funktion
1	95°C	10 min		Initielle Denaturierung
2	95°C	10 s		Denaturierung
3	T_{ann}	10 s		Anlagern der Primer
4	72°C	15 s		Extension
5	T_{acq}	5 s	zu 2, 28-32x	Fluoreszenz-Messung am Ende des Cyclus
6	65°C → 95°C	10 min		Erstellung der Schmelzkurve
7	40°C	30 s	20°C/s	Abkühlung

Nach einer anfänglichen 10-minütigen Aktivierung des Enzyms bei 95°C bestand ein PCR-Zyklus aus der Denaturierung, dem Anlagern der Primer an das Templat, der Extension der DNA-Stränge bei 72°C und der Fluoreszenzmessung. Um die Spezifität der Primer zu untersuchen, wurde zum Abschluss jeder RT-qPCR eine Schmelzkurve erstellt, bei der die Temperatur langsam von 65 auf 95°C unter ständiger Messung der Fluoreszenz erhöht wird. Anhand der einbrechenden Fluoreszenz bei steigender Temperatur konnte die Dissoziation der gebildeten dsDNA-Produkte verfolgt werden. Das Auftreten von nur einem PCR-Produkt bei einer für die Größe des Produktes erwarteten Schmelztemperatur bewies die Spezifität der verwendeten Primer. Zur Quantifizierung der amplifizierten Produkte wurde für jede PCR manuell Fluoreszenz-Grenzwerte festgelegt, bei denen das Amplifizierungssignal gerade aus dem Hintergrund hervortritt. Die Zyklus-Nummer, bei der die Fluoreszenz der jeweiligen Probe diesen Grenzwert überschreitet, bezeichnet man als Zyklus-Grenzwert (C_T). Zur Erstellung einer Standardkurve wurden die Konzentration einer Verdünnungsreihe (5 ng/ μl – 50 pg/ μl , in Duplikaten) der aus den transfizierten Zellen isolierten DNA logarithmisch gegen die C_T -Werte aufgetragen. Anhand dieser lässt sich die Anzahl der Kopien der Proben (DNA wie mRNA) relativ zu dem Standard berechnen. Ein RNA-Aliquot, welches vor der cDNA-

Synthese entnommen wurde, diente in den PCR-Reaktionen zur Kontrolle der Abwesenheit von DNA-Kontaminierungen der Proben.

Zur Bestimmung des Einflusses der DNA-Modifikation auf die DNA-Level des konstruierten pEGFP-mODC-ZA-Plasmids in den Host-Zellen, wurde die DNA-Menge relativ zu der DNA, die aus den mit unmodifizierten Vektoren transfizierten Zellen isoliert worden war, bestimmt. Um die Expression der mRNA des EGFP-Gens in Bezug zur vorhandenen Plasmid-DNA zu setzen, wurde die cDNA (um den Faktor 10 – 200 mit Wasser verdünnt) relativ zu DNA-Standards, die aus dem selben Aliquot der transfizierten Zellen stammte, quantifiziert. Die erhaltenen DNA- und cDNA-Werte wurden in Relation zu den Werten gesetzt, die aus der Quantifizierung der DNA und cDNA des pDsRed-Monomer N1-Vektors (interne Referenz) der selben Probe resultierten. Dadurch konnten Ungenauigkeiten, die sich aus unausgewogener Transfektionseffizienz, DNA- und RNA-Isolierung und Reverser Transkription ergeben, korrigiert werden.

Zur Bestimmung der Expression des SMUG1-Gens und des House-Keeping GAPDH-Gens wurden die cDNA-Proben aus den jeweiligen Zelllinien und Klonen (verdünnt um den Faktor 100 – 1.000 mit Wasser) relativ zu cDNA-Standards, die aus der Kontroll-Zelllinie stammte, quantifiziert. Anschließend erfolgte die Berechnung der Anzahl an Kopien der SMUG1 mRNA in Relation zur Expression des House-Keeping Gens (GAPDH) der jeweiligen Probe.

2.2.6 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blot wurde der Knockdown des UNG-, TDG- und des CSB-Gens in HeLa-Zellen überprüft. Zur Extraktion der Proteine aus den Zellen wurde RIPA-Puffer verwendet und die Proteinkonzentration spektrophotometrisch mittels Bradford-Assay bestimmt. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine anhand ihrer Größe wurden diese auf eine Membran übertragen und mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen.

2.2.6.1 Extraktion der Proteine aus den Zellen

Zur Isolierung der Proteine aus den Zellen, wurden diese auf Platten ausgestreut und für weitere 16 bis 48 Stunden kultiviert. Vor Erreichen von Konfluenz wurde das Nährmedium abgenommen und nach 2-maligem Waschen mit PBSCMF wurden die Zellen mit RIPA-Puffer (kurz zuvor mit 1 mM PMSF versetzt, gelöst in Isopropanol) benetzt und geschwenkt, so dass die gesamte Oberfläche in Kontakt mit dem Puffer kam (ca. 0,2 ml RIPA-Puffer pro 50 cm² Oberfläche). Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis unter leichtem Schwenken wurden die adhärenen Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgekratzt, das Lysat in ein Reaktionsgefäß überführt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde für kurze Zeit zentrifugiert (10.000 × g, 10 min, 4°C) und vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Ein kleines Aliquot wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe Kapitel 2.2.6.2)

1:100 und 1:1.000 mit Wasser verdünnt und bis zur Verwendung wenig später auf Eis gehalten. Der Rest der Probe wurde mit dem cOmplete mini Protease Inhibitor Cocktail (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers versetzt und bei -80°C gelagert.

2.2.6.2 Bradford-Assay

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 800 µl der Proben (1:100 bis 1:1.000 in Wasser verdünnt) sowie einer Blindprobe, die aus Wasser bestand, mit 200 µl des Bio-Rad Protein Assay Dye Reagents (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) vermischt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm gemessen (Biowave S2100 Spectrophotometer). Eine BSA-Verdünnungsreihe in Wasser (0,78 – 25 ng/µl) diente als Kalibriergerade.

2.2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe erfolgte in einer denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli, 1970). Elektrophorese-Kammern, Glasplatten zum Gießen der Gele und sonstiges Zubehör wurden von C.B.S. Scientific (Del Mar, U.S.A.) bezogen. Für das große CSB-Protein (168 kDa) wurde ein Trenngel mit 10 % Acrylamid verwendet, während für das UNG1/2- und TDG-Protein ein 12 %-iges Gel Anwendung fand. Die Pipettierschemata zum Gießen der Trenn- und Sammelgele sind aus **Tabelle 2-5** zu entnehmen. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit 6× Ladepuffer versetzt und für 10 Minuten im Wasserbad gekocht. Zur Detektion der Proteine wurde jeweils 3 µg (UNG1/2) oder 20 µg (TDG und CSB) Proteinextrakt aufgetragen und der PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) als Marker verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in 1x Laufpuffer zunächst bei 80 Volt und wurde beim Übergang der Proteine in das Trenngel auf 200 Volt erhöht. Nach 1,5 – 2,5 Stunden konnte die Auftrennung gestoppt, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel auf eine Nitro-Cellulose-Membran übertragen werden (siehe Kapitel 2.2.6.4).

Tabelle 2-5 Pipettierschema zum Ansetzen der Polyacrylamid-Gele für die SDS-PAGE.

Reagent	10 % Trenngel	12 % Trenngel	Sammel- gel
H ₂ O	3,85 ml	3,25 ml	6,85 ml
30 % Acrylamid-Mix	3,4 ml	4 ml	1,7 ml
1 M Tris-HCl pH 8,8	2,6 ml	2,6 ml	-
1 M Tris-HCl pH 6,8	-	-	1,3 ml
20 % SDS	50 µl	50 µl	50 µl
10 % Ammoniumpersulfat	100 µl	100 µl	100 µl
Tetramethylethyldiamin	4 µl	4 µl	10 µl
Gesamt (ca.)	10 ml	10 ml	10 ml

2.2.6.4 Übertragung der Proteine auf eine Trägermembran (Blotting)

Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Polyacrylamid-Trenngel auf eine Nitro-Cellulose-Membran (Amersham Hybond-C Extra, GE Healthcare, Freiburg) erfolgte in der Mini Trans®-Blot Cell (Bio-Rad, Hercules, U.S.A.) nach dem Protokoll des Herstellers. Dabei wurde das Blotting-Papier GB003 von GE Healthcare und der Transferpuffer (für die UNG1/2- und TDG-Glykosylase) oder der SDS-haltige Towbin-Puffer (zum Transfer des CSB-Proteins) verwendet. Nach einstündiger Elektrophorese bei 100 Volt wurde die Membran kurz mehrmals mit entionisiertem Wasser gewaschen und zur Kontrolle eines erfolgreichen Transfers wurden die Proteine für 5 – 10 Minuten mit Ponceau-Rot angefärbt, bis deutliche Banden sichtbar wurden. Nach vorsichtigem Waschen mit Wasser wurde ein Bild aufgenommen woraufhin die Membran gründlich mit Wasser gewaschen wurde und für die nachfolgende Immundetektion (siehe Kapitel 2.2.6.5) zur Verfügung stand. Das Gel wurde zur Überprüfung des vollständigen Transfers der Proteine in einer Coomassie Brilliant Blue-Lösung gefärbt und nach einstündigem Schütteln (Labnet Orbit™ LS, Labnet International Inc., Edison, U.S.A.) bei Raumtemperatur mit Wasser gewaschen. Zur Entfernung der unspezifischen Blaufärbung des Gels wurde dieses mit Entfärbelösung versetzt und erneut geschüttelt. Die Entfärbelösung wurde nach einer Stunde erneuert und das Gel für weitere 16 Stunden bis zur vollständigen Entfärbung inkubiert. Nach kurzem Waschen in Wasser konnte ein Bild aufgenommen werden.

2.2.6.5 Immundetektion

Vor dem spezifischen Nachweis der Proteine wurde die Membran zur Absättigung freier Bindungsstellen mit einer Blocking-Lösung (5 % w/v BSA in 0,1 % v/v TBST) versetzt und für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach dem Waschvorgang mit 0,5 % v/v TBST, der aus zwei kurzen Waschschritten und drei längeren Inkubationen (15, 10 und 5 Minuten) unter Schütteln bestand, wurde der primäre Antikörper in 0,1 % v/v TBST (mit 1 % w/v BSA) auf die Membran gegeben (**Tabelle 2-6**) und für 16 Stunden (über Nacht) bei 4°C geschüttelt. Nach erneutem Waschgang, analog zum vorherigen Schema, wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper in 0,1 % v/v TBST (mit 1 % w/v BSA) für 1 Stunde bei Raumtemperatur geschwenkt. Die Waschschriffe wurden wiederholt, bevor die Membran ein letztes Mal kurz mit 0,1 % TBST gewaschen wurde. Als Kontrolle, dass in jeder Spur gleiche Proteinmengen aufgetragen worden waren, wurden Antikörper gegen β -Aktin und Lamin eingesetzt (**Tabelle 2-6**). Der β -Aktin-Antikörper wurde zusammen mit dem primären UNG1/2-Antikörper in einer Inkubationslösung verwendet oder fand beim Nachweis des TDG- bzw. CSB-Proteins erst nach Teilung der Membran auf Höhe von ca. 50 bzw. 70 kDa ausschließlich für die Hälfte Anwendung, welche die Proteine mit niedriger Masse enthält. Im Falle von Lamin wurde zuerst TDG detektiert, bevor die Membran der Immunodetektion des Lamins unterworfen wurde.

Zur Detektion des sekundären Antikörpers wurde in einer Dunkelkammer gearbeitet. Es wurden 0,5 ml des Luminol-Reagenz mit 0,5 ml des Oxidations-Reagenz (Western Lightning®-ECL, Perkin Elmer, Waltham, U.S.A.) vermischt und gleichmäßig auf der Membran verteilt. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Membran nach Abtropfen der überschüssigen Flüssigkeit in Frischhaltefolie eingewickelt und mit der Proteinseite Richtung Photofilmpapier (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare, Freiburg) in eine Entwicklerkassette für 1 – 12 Minuten gelegt. Der Photofilm wurde entwickelt (Ilford Multigrad Developer, HARMAN technology Limited, Mobberley, England), fixiert (Ilford Rapid Fixer, HARMAN technology Limited, Mobberley, England), in entionisiertem Wasser gewaschen und letzten Endes ein Bild aufgenommen (Molecular Imager® Gel Doc™ XR+). Die Auswertung der Bandenintensitäten erfolgte mit der Image Lab™-Software.

Tabelle 2-6 Primäre und sekundäre Antikörper zum Nachweis des UNG1/2-, SMUG1, TDG- und CSB-Proteins sowie des β -Actins und Lamins als Lade-Kontrolle.

Ziel	Primärer Antikörper	Optimale Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Optimale Verdünnung
UNG1/2	Mouse monoclonal UNG antibody: clone 2C12	1:2.000	Goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005	1:5.000
CSB	Rabbit polyclonal CSB/ERCC6 antibody: A301-354A	1:2.000	Goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004	1:1.000
TDG	Rabbit polyclonal TDG antibody: PA5-29140	1:100.000	Goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004	1:2.000
SMUG1*	Rabbit polyclonal SMUG1 antibody: 312730	-	Goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004	-
SMUG1*	Goat polyclonal SMUG1 antibody: TA302931	-	Donkey anti-goat IgG-HRP: sc-2020	-
SMUG1*	Rabbit polyclonal SMUG1 antibody: (H-55): sc-98849	-	Goat anti-rabbit IgG-HRP: sc-2004	-
Lamin	Mouse monoclonal Lamin B1 antibody (119D5-F1): sc-56143	1:200	Goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005	1:1.000
β -Aktin	Mouse monoclonal β -Aktin antibody (C4): sc-47778	1:1.000	Goat anti-mouse IgG-HRP: sc-2005	1:5.000

*Keiner der verwendeten SMUG1-Antikörper konnte das Protein spezifisch detektieren.

2.2.7 Stabiler Knockdown des UNG-, SMUG1-, TDG und CSB-Gens in HeLa-Zellen mittels short hairpin RNA

Zur Stilllegung der Expression des gewünschten Gens in HeLa-Zellen wurde ein Vektor-basiertes short hairpin RNA (shRNA)-Expressions-System, welches im Stande ist RNA-Interferenz in lebenden Zellen zu induzieren, verwendet. Der gewählte pENTR/pSUPER+-Vektor (pEpS+) basiert auf dem pSUPER-

Plasmid (Brummelkamp, Bernards & Agami, 2002), der zur Expression der shRNA unter der Kontrolle des H1-Promotors entwickelt wurde. Potente shRNA-Sequenzen für beide Gene wurden über verschiedene Algorithmen und Datenbanken (siRNA-Wizard 3.1 (Invivogen), Eurofins MWG Operon, MISSION® shRNA (Sigma-Aldrich), Oligoengine) und bereits in der Literatur beschriebenen Sequenzen erhalten. Es wurden zwei (UNG1/2 und CSB) bis drei (SMUG1 und TDG) spezifische shRNA-Sequenzen zur Herunterregulation eines Gens eingesetzt, von denen jedoch im Folgenden nur diejenigen aufgelistet sind, die den effizientesten Knockdown in den Zellen bedingten. Eine Übersicht über alle verwendeten shRNA-Sequenzen mit Quellenangaben ist im Anhang zu finden (siehe Appendix I). Durch Zusammenlagern und Phosphorylierung zweier synthetischer 64-mer Oligonukleotide wurden die spezifischen shRNA-Inserts konstruiert, die in den Expressions-Vektor pENTR/pSUPER+ kloniert wurden und für die UNG1/2-, SMUG1-, TDG- oder CSB-spezifische shRNA codieren (**Abbildung 2-1**). Die Klonierung erfolgte zwischen der BglIII- und HindIII-Schnittstelle und die Dephosphorylierung des linearisierten Vektors durch die Antarctic Phosphatase sollte eine Religation des doppelt-verdauten Plasmids, in die kein shRNA-Insert eingebaut wurde, in den transformierten Bakterien erschweren.

Die erhaltenen pENTR/pSUPER+-Vektoren mit den eingebauten shRNA-Inserts wurden zusammen mit pcDNA3, der eine Geneticin (G418)-Resistenz enthält, in HeLa-Zellen transfiziert. Nach einigen Wochen unter Selektionsdruck wurden Zellextrakte aus den Klonen gewonnen und auf die Expression des Ziel-Gens mittels Western Blot oder RTq-PCR untersucht.

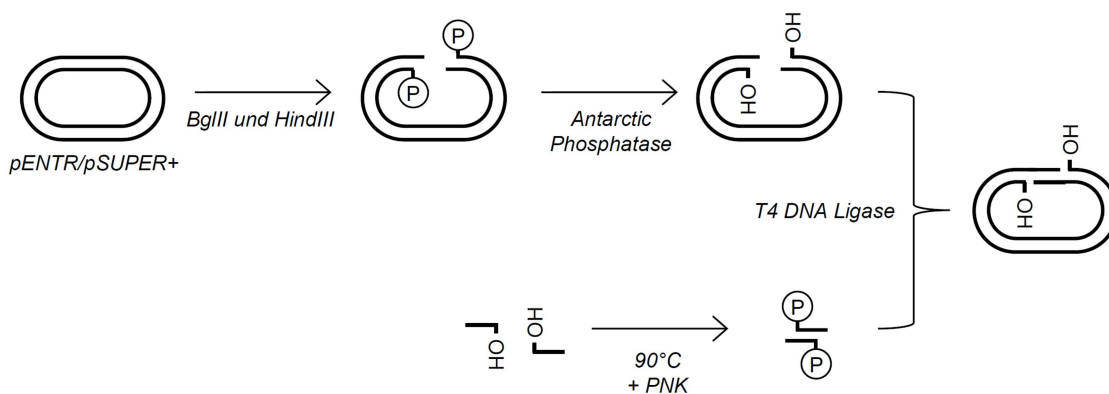


Abbildung 2-1 Einbau des shRNA-Inserts in den pENTR/pSUPER+-Vektor. Nach dem doppelten Verdau des pENTR/pSUPER+-Plasmids mit den Endonukleasen BglIII und HindIII und anschließender Dephosphorylierung durch die Antarctic Phosphatase wurden die zusammengelagerten und durch die Polynukleotidkinase (PNK) phosphorylierten shRNA-codierenden DNA-Oligonukleotide in den Vektor ligiert (T4 DNA Ligase).

2.2.7.1 Klonierung der spezifischen shRNA-Sequenzen in den shRNA-Expressions-Vektor pENTR/pSUPER+

2.2.7.1.1 Zusammenlagern synthetischer Oligonukleotide zum shRNA-Insert

Zur Konstruktion der shRNA-Inserts, die in den shRNA-Expressions-Vektor pENTR/pSUPER+ hineinkloniert werden sollten und für die UNG1/2-, SMUG1-, TDG- oder CSB-spezifische shRNA codieren, wurden zwei 64-nt oder 65-nt große, komplementäre DNA-Oligonukleotide (**Tabelle 2-7**) zusammengelagert und phosphoryliert. Dazu wurden die Oligonukleotide in TE-Puffer gelöst (200 µM) und in einem zweiten Schritt mit Wasser verdünnt (20 µM). Zur Zusammenlagerung und Phosphorylierung der beiden Oligonukleotide (Forward und Reverse) wurden je 150 pmol DNA in Reaktionsansätzen zu je 50 µl (1× T4 DNA Ligase-Puffer) mit 5 u der T4 Polynukleotidkinase versetzt (**Tabelle 2-8**) und nach dem Programm in **Tabelle 2-9** inkubiert.

Tabelle 2-7 Oligonukleotide zur Konstruktion der UNG1/2-, SMUG1-, TDG- und CSB-Knockdown spezifischen shRNA-Inserts. Aufgelistet sind nur die shRNA-Sequenzen mit denen der effizienteste Knockdown in den Zellen erzielt wurde.

shRNA-Insert	Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
UNGsh	Forward	GATCCCCGGGACAGGATCCATATCATTTC AAGAGAATG ATATGGATCCTGTCCCTTTTTGGAAA
	Reverse	AGCTTTTCCAAAAAGGGACAGGATCCATATCATTCTCT TGAAATGATATGGATCCTGTCCCGGG
CSBsh	Forward	GATCCCCGGAAGAAGCAAGGTTGTAATTCAAGAGATTA CAACCTTGCTTCTTCCTTTTTGGAAA
	Reverse	AGCTTTTCCAAAAAGGAAGAAGCAAGGTTGTAATCTCT TGAATTACAACCTTGCTTCTTCCGGG
TDGsh	Forward	GATCCGGGAACGAAATATGGACGTTCAACTCGAGTTGA ACGTCCATATTTTCGTTCTTTTTGGAAA
	Reverse	AGCTTTTCCAAAAAGAACGAAATATGGACGTTCAACTC GAGTTGAACGTCCATATTTTCGTTCCCG
SMUG1sh	Forward	GATCCGGCCAAGACAAAGCATGGGACATCTCGAGATGT CCCATGCTTTGTCTTGGTTTTGGAAA
	Reverse	AGCTTTTCCAAAAACCAAGACAAAGCATGGGACATCTC GAGATGTCCCATGCTTTGTCTTGGCCG

Tabelle 2-8 Pipettierschema zur Konstruktion der shRNA-Inserts.

Substanz	Volumen	Endkonzentration
H ₂ O	30,0 µl	
Oligonukleotid Forward (20 µM)	7,5 µl	3 µM
Oligonukleotid Reverse (20 µM)	7,5 µl	3 µM
10× T4 DNA Ligase-Puffer	5,0 µl	1×
T4 Polynukleotidkinase (10 u/µl)	0,5 µl	0,1 u/µl
Gesamt	50,0 µl	

Tabelle 2-9 Programm zur Konstruktion der shRNA-Inserts.

Schritt	Temperatur	Zeit	Option
1	4°C	∞	
2	37°C	30 min	
3	80°C	10 min	
4	90°C	4 min	
5	70°C	10 min	
6	37°C	1 min	Rate 0,1°C/s
7	4°C	∞	

2.2.7.1.2 Doppelverdau des shRNA-Expressions-Vektors

Zur Vorbereitung auf den Einbau der shRNA-Inserts in den pENTR/pSUPER+-Vektor, wurde dieser mit Hilfe der Restriktions-Endonukleasen HindIII und BglII linearisiert und durch Zugabe der Antarctic Phosphatase dephosphoryliert. Zunächst wurden drei Reaktionsansätze (ohne Enzym, HindIII und BglII) zusammenpipettiert (**Tabelle 2-10**), welche dann weiter aufgeteilt wurden (**Tabelle 2-11**), bevor das Programm des Verdaus gestartet werden konnte (**Tabelle 2-12**). Die Reaktion erfolgte in 2× Tango-Puffer und einer Konzentration an pENTR/pSUPER+ von 24 ng/μl. Pro einem μg Plasmid-DNA wurden 20 u HindIII und 50 u BglII verwendet. Ein Ansatz, bei dem pENTR/pSUPER+ nur mit einem der beiden Enzyme (HindIII oder BglII) inkubiert wurde, diente zur Kontrolle des jeweiligen Verdaus. Nach Inaktivierung von HindIII (20 Minuten bei 65°C) wurde der Doppelverdau noch mit Antarctic Phosphatase (10 u/μg Plasmid-DNA) und entsprechendem Puffer versetzt (**Tabelle 2-13**) und weiter nach **Tabelle 2-12** inkubiert.

Zur Analyse des Verdaus und zur Isolierung des doppelt-verdauten Vektors wurden die Proben elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurden die Proben nach erfolgter Reaktion mit 6× DNA-Ladepuffer, der 1 % w/v SDS zum Inaktivieren des hitzestabilen BglII enthielt, versetzt und auf ein 0,8 %-iges Agarose-Gel aufgetragen. Die Extraktion der DNA aus dem Gel erfolgte mit dem illustra GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Freiburg) wie in Kapitel 2.2.3.5 beschrieben.

Tabelle 2-10 Pipettierschema zum Doppelverdau des pENTR/pSUPER+-Vektors durch die Restriktions-Endonukleasen BglII und HindIII.

Substanz	Ohne Enzym	HindIII	BglII
H ₂ O	24,6 μl	55,1 μl	37,5 μl
pENTR/pSUPER+ (130 ng/μl)	7,4 μl	18,5 μl	18,5 μl
10× Tango-Puffer	8,0 μl	20,0 μl	20,0 μl
HindIII (15 u/μl)	-	6,4 μl	-
BglII (10 u/μl)	-	-	24,0 μl
Gesamt	40 μl	100 μl	100 μl

Tabelle 2-11 Aufteilung der BglII- und HindIII-Ansätze.

Ansatz	HindIII/BglII	HindIII	BglII	Ohne Enzym
Ohne Enzym	-	10 µl	10 µl	20 µl
HindIII	90 µl	10 µl	-	-
BglII	90 µl	-	10 µl	-
Gesamt	180 µl	20 µl	20 µl	20 µl

Tabelle 2-12 Programm zum Doppelverdau des pENTR/pSUPER+-Vektors durch die Endonukleasen BglII und HindIII.

Schritt	Temperatur	Zeit	Option
1	4°C	∞	
2	37°C	2 h	
3	65°C	20 min	
4	4°C	∞	Zugabe Antarctic Phosphatase
5	37°C	30 min	
6	65°C	5 min	
7	4°C	∞	

Tabelle 2-13 Pipettierschema zur Dephosphorylierung des doppelt-verdauten pENTR/pSUPER+-Vektors durch die Antarctic Phosphatase.

Substanz	Volumen (µl)	Endkonzentration
BglII/HindIII-verdauter pENTR/pSUPER+	180,0	
H ₂ O	0,4	
Antarctic Phosphatase Puffer 10×	21,0	1×
Antarctic Phosphatase (5 u/µl)	8,6	10 u/µg
Gesamt	210,0	

2.2.7.1.3 Einbau des shRNA-Inserts in den doppelt-verdauten shRNA-Expressions-Vektor

Die Ligation des doppelsträngigen shRNA-Inserts in den linearisierten Vektor erfolgte nach dem Pipettierschema in **Tabelle 2-14**, wobei das Insert im molaren Verhältnis von 1:1 und 3:1 zum Plasmid eingesetzt wurde. Pro Reaktion, die jeweils in 10 µl 1× Ligase-Puffer durchgeführt wurde, wurden 20 oder 25 ng Plasmid-DNA und 2,5 u T4 DNA Ligase zusammen mit dem Insert nach dem Programm in **Tabelle 2-15** inkubiert. Zusätzlich beinhaltet das Schema einen Reaktionsansatz ohne Insert sowie einen Ansatz des ausschließlich HindIII-verdauten Plasmids mit und ohne Ligase. Nach erfolgter Ligation wurden 5 ng des shRNA-Expressions-Vektors, der eine Kanamycin-Resistenz enthält, in ultra-kompetente Bakterien (*E. coli scs-8*) transformiert (siehe Kapitel 2.2.2.2).

Tabelle 2-14 Pipettierschema zur Ligation des shRNA-Inserts in den doppelt-verdauten pENTR/pSUPER+-Vektor.

	No Insert	Insert:Vektor 1:1	Insert:Vektor 3:1	Ligation +	Ligation -
pENTR/pSUPER+ (4 ng/μl) doppelt-verdaut	5,0 μl	5,0 μl	5,0 μl	-	-
pENTR/pSUPER+ (24 ng/μl) HindIII-verdaut	-	-	-	0,8 μl	0,8 μl
shRNA-Insert (0,6 ng/μl)	-	0,8 μl	2,5 μl	-	-
H ₂ O	3,5 μl	2,7 μl	1,0 μl	7,2 μl	8,2 μl
10× Ligase-Puffer	1,0 μl	1,0 μl	1,0 μl	1,0 μl	1,0 μl
T4 DNA Ligase (5 u/μl)	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	0,5 μl	-
Gesamt	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl	10 μl

Tabelle 2-15 Programm zur Ligation des shRNA-Inserts in den doppelt-verdauten pENTR/pSUPER+-Vektor.

Schritt	Temperatur	Zeit
1	4°C	∞
2	16°C	1 h
3	22°C	1 h
4	65°C	15 min
7	4°C	∞

2.2.7.1.4 PCR-Screening und Sequenzierung der klonierten shRNA-Expressions-Vektoren

Die Kanamycin-resistenten, transformierten Bakterien-Kolonien wurden mit einer Pipettenspitze gepickt und mit dieser in 600 μl 1× LB-Medium (mit 30 μg/ml Kanamycin) überführt. Nach 6-stündigem Wachstum bei 37°C unter ständigem Schütteln (200 rpm, 25D Incubator Shaker) wurden 300 μl der Bakteriensuspension nach Zugabe von Glycerol (15 % v/v) bei -80°C eingefroren. Die restlichen 300 μl Suspension wurden zentrifugiert (1.800 × g, 5 min, 4°C), das Bakterienpellet in 200 μl Wasser gelöst und die Bakterien durch 10-minütiges Kochen in Wasser lysiert. Die Proben wurden bis zur Durchführung der PCR bei -20°C gelagert.

Zum Screening der klonierten pENTR/pSUPER+-Vektoren in den transformierten Bakterien-Kolonien mittels PCR wurde die *Tfi* DNA-Polymerase (Invitrogen) verwendet. Nach Ansetzen des Reaktions-Mixes, der auf die entsprechende Probenanzahl hochgerechnet worden war, wurde dieser auf mehrere Reaktionsgefäße verteilt und jeweils 2 μl der lysierten Bakterien hinzugegeben (**Tabelle 2-16**). Die verwendeten Primer zur Amplifizierung der shRNA-Expressions-Vektoren (pENTR/pSUPER+) sind aus **Tabelle 2-17** zu entnehmen. Die Amplifizierung der DNA erfolgte nach dem Programm in **Tabelle 2-18**, wobei die Anlagerung der Primer an das pENTR/pSUPER+-Plasmid bei 55°C durchgeführt wurde. Da das 757 bp große DNA-Stück des pENTR/pSUPER+-Vektors, welches durch den Verdau mit BglIII und HindIII vor dem Einbau der shRNA-Sequenz herausgeschnitten wurde, einen

sehr hohen GC-Anteil besitzt (67 %) und damit anfällig für Sekundär-Strukturen ist, war eine Amplifizierung des Vektors ohne shRNA-Insert nicht möglich. Aus diesem Grunde dienten 10 pg pDsRed mit entsprechenden Primern als Positivkontrolle für die PCR-Reaktion (**Tabelle 2-17**).

Die PCR-Produkte wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert, Klone mit eingebautem shRNA-Insert im Expressions-Vektor vermehrt und die Plasmid-DNA mittels Mini- oder Mega-Präparation aufgearbeitet (siehe Kapitel 2.2.2.3). Die Sequenzierungen des eingebauten shRNA-Inserts des pENTR/pSUPER+-Vektors erfolgten bei GENTERprise Genomics mit den beiden pEpS+-Primern (**Tabelle 2-17**). Hierfür wurde das Sequenzierungsverfahren Home Run™ gewählt, wobei 250 – 400 ng DNA-Templat und 10 pmol des Primers in 7 µl Gesamtvolumen (H₂O) abgegeben wurde.

Tabelle 2-16 Pipettierschema zum PCR-Screening der Plasmid-DNA transformierter Bakterien.

Substanz	Volumen	Endkonzentration
5× <i>Tfi</i> PCR Reaktionspuffer	5,00 µl	1×
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl	1,5 mM
dNTP Mix (10 mM jedes)	0,50 µl	0,2 mM
H ₂ O	11,25 µl	
Forward Primer (2 µM)	2,50 µl	0,2 µM
Reverse Primer (2 µM)	2,50 µl	0,2 µM
<i>Tfi</i> DNA-Polymerase (5 u/µl)	0,50 µl	0,1 u/µl
Reaktions-Mix	23,00 µl	
Probe	2,00 µl	
Gesamt	25,00 µl	

Tabelle 2-17 Primer zum PCR-Screening und zur Sequenzierung der klonierten pENTR/pSUPER+-Vektoren.

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

Tabelle 2-18 Programm zum PCR-Screening der Plasmid-DNA transformierter Bakterien.

Schritt	Temperatur	Zeit	Option	Funktion
1	4°C	∞		
2	94°C	2 min		Initielle Denaturierung
3	94°C	30 s		Denaturierung
4	55°C	60 s		Anlagern der Primer
5	70°C	60 s	zu 3, 29×	Extension
6	70°C	10 min		Finale Extension
7	4°C	∞		

2.2.7.2 Generierung von monoklonalen Zelllinien mit einem spezifischen Gen-Knockdown via stabiler Transfektion des shRNA-Expressions-Vektors pENTR/pSUPER+

Zur stabilen Integration der shRNA-Expressions-Vektoren in die genomische DNA von HeLa-Zellen wurden diese zusammen mit pcDNA3-Vektor (Invitrogen), der für eine Geneticin (G418)-Resistenz codiert, transfiziert. Dabei wurde analog dem Protokoll zur Transfektion (siehe Kapitel 2.2.1.6.1) verfahren und 150 ng pcDNA3 mit 650 ng des pENTR/pSUPER+-Vektors (molares Verhältnis von 1:9) pro Transfektion verwendet. Ausnahme war die stabile Transfektion des SMUG1-shRNA-Expressions-Vektors, bei dem das molare Verhältnis 1:15 zu Gunsten des shRNA-Plasmids betrug. Das Medium wurde 4 Stunden nach der Transfektion erneuert und nach weiteren 20 Stunden wurden die Zellen abgelöst und in Geneticin-haltigem Medium (1100 µg/ml) 1:20, 1:60 und 1:250 verdünnt in 143 cm²-Gewebe Kulturschalen ausgestreut. Unter Erhalt des Selektionsdruckes wurden die Zellen für ca. 2 Wochen kultiviert, wobei alle 2 – 3 Tage das Medium gegen frisches (mit G418) ausgetauscht wurde, bevor 32 Kolonien pro shRNA-Expressions-Vektor gepickt wurden. Dabei wurden die Platten mit optimaler Dichte der gewachsenen Kolonien gewählt.

Zum Picken der Kolonien wurde das Medium abgenommen, einmal mit kaltem PBSCMF gewaschen und ein Plastikzylinder über die Zell-Kolonien gestülpt. Dieser entstammte einem 0,5 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt), bei dem der Deckel und der kegelförmige Boden abgeschnitten wurden. Zum besseren Anheften der ehemals deckelzugewandten Seite des Zylinders an die Platte wurde diese mit Silikonfett (Baysilone-Paste, Bayer AG) bestrichen. Nach Zugabe von 50 – 100 µl Trypsin in die Zylinder wurde bis zum Ablösen der Zellen im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden in 100 µl Medium (mit G418) resuspendiert, in die Vertiefung einer 48-Well-Platte überführt und mit zusätzlichem 0,4 ml Medium (mit G418) weiter kultiviert. Bei Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen in eine 25 cm²- und später in eine 75 cm²-Zellkulturflaschen übertragen, aus denen sie einerseits eingefroren (siehe Kapitel 2.2.1.2) und andererseits zur Herstellung von Zellextrakten für den Western Blot nach Überführung in eine 58 cm²-Gewebe Kulturschale verwendet wurden (siehe Kapitel 2.2.6.1). Die stabilen Zelllinien wurden ausschließlich in Geneticin-haltigem Medium kultiviert.

Ausnahmen waren die ersten 16 – 24 Stunden nach dem Auftauen der Zellen sowie das Einfrieren der Zellen in DMSO-haltigem Medium. Ebenso wurde ab dem Ausplattieren der Zellen bei Transfektionen, vor der Gewinnung von Zellextrakten sowie beim Assay zur Kolonien-Bildungsfähigkeit nach UV-C Bestrahlung und beim Erstellen von Wachstumskurven, auf G418 verzichtet.

2.2.8 Insertion synthetischer Oligonukleotide mit einer spezifischen DNA-Modifikation in den Reporter-Vektor pEGFP-mODC-ZA

Um eine DNA-Basenmodifikationen in eine spezifische Stelle innerhalb des transkribierten oder nicht-transkribierten Strangs eines Reportergens zu positionieren, wurde ein Verfahren entwickelt, bei dem synthetische Oligonukleotide in einen Expressions-Vektor eingebaut werden (Kitsera et al., 2011), (Lühnsdorf et al., 2012). Hierfür werden die Nicking-Endonukleasen Nt.Bpu10I und Nb.Bpu10I verwendet, welche durch Inaktivierung eines der katalytischen Zentren des Restriktionsenzym Bpu10I generiert wurden, so dass sie sequenzspezifisch nur einen der beiden DNA-Stränge einschneiden. Der Vektor pEGFP-mODC-ZA (pZA) enthält zwei Bpu10I-Schnittstellen innerhalb des EGFP-Reportergens, die 18 Nukleotide voneinander entfernt liegen. Durch Inkubation des Vektors mit einer der beiden Nicking-Endonukleasen lässt sich so gezielt ein 18-nt großes, einzelsträngiges DNA (ssDNA)-Fragment innerhalb des transkribierten (bei Verwendung von Nb.Bpu10I) oder des nicht-transkribierten DNA-Stranges (durch den Einsatz von Nt.Bpu10I) erzeugen. Dieses kann nun durch Erwärmen aus dem DNA-Templat herausgeschmolzen und gegen ein synthetisches Kompetitor-Oligonukleotid, das eine Basen-Modifikation enthält, ausgetauscht werden (**Abbildung 2-2, oben**). Ein effizienter Austausch des nativen Oligonukleotids gegen ein synthetisches ist jedoch nur gegeben, solange die eingeführte Basen-Modifikation mit der Base des Nachbarstranges ein reguläres Watson-Crick-Basenpaar ausbildet und keine stärkeren Distorsionen der DNA-Struktur bewirkt, da sonst die Bindung des nativen ssDNA-Fragments zurück in das Plasmid begünstigt ist (Lühnsdorf et al., 2012). In diesem Falle wird in einem zusätzlichem Schritt durch Zugabe eines synthetischen Oligonukleotids, welches komplementär zu dem nativen 18-mer ist, das ausgeschnittene Fragment gebunden und durch Filtration aus dem Reaktionsansatz entfernt. In Abwesenheit des ursprünglichen DNA-Fragments lässt sich die 18 Nukleotid große Lücke (gap) in einem der beiden DNA-Stränge des pZA-Vektors durch ein synthetisches Oligonukleotid verschließen, selbst wenn dadurch eine Fehlpaarung entsteht. (**Abbildung 2-2, unten**). Nach Phosphorylierung des synthetischen Oligonukleotids durch die Polynukleotidkinase (PNK) werden die Schnittstellen des Vektors durch Inkubation mit der T4 DNA Ligase geschlossen.

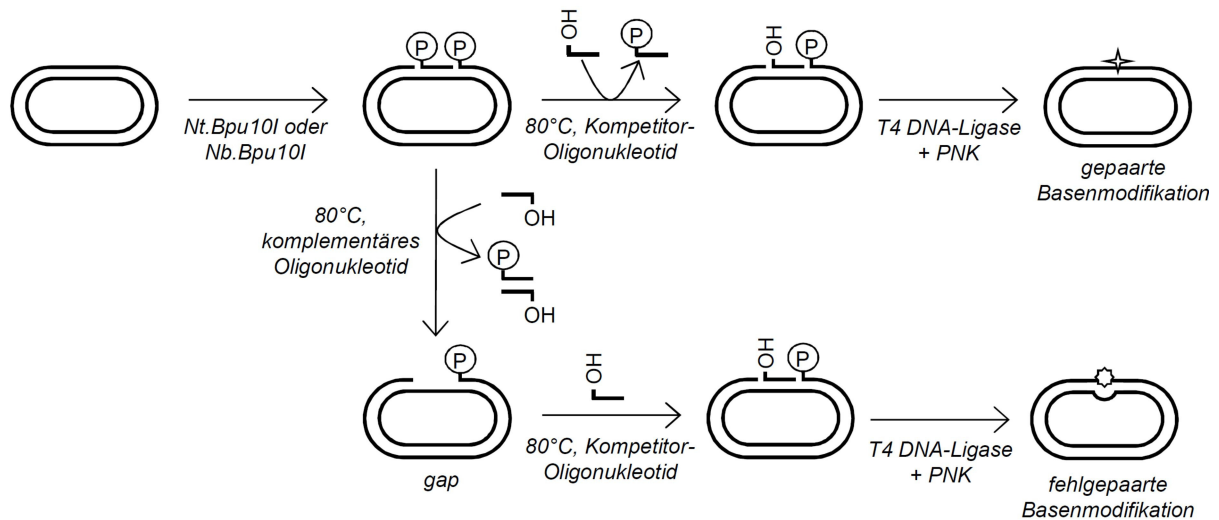


Abbildung 2-2 Konstruktion von Reporter-Vektoren mit einer spezifisch positionierten Basenmodifikation durch den Einbau eines synthetischen Oligonukleotides nach (Lühnsdorf et al., 2012). Zur Erklärung siehe Text.

2.2.8.1 Doppelter Einschnitt des Reporter-Vektors mittels Nicking-Endonukleasen

Zum doppelten Einschnitt des transkribierten oder des nicht-transkribierten DNA-Stranges des pZA-Plasmids wurde dieses mit einen der beiden Nicking-Endonukleasen Nb.Bpu10I oder Nt.Bpu10I inkubiert. Bei der Reaktion wurden 50 µg DNA mit 50 u (units) von Nb.Bpu10I oder Nt.Bpu10I (Thermo Scientific) in 250 µl 1× Puffer R für 2 Stunden auf 37°C erwärmt und anschließend das Enzym bei 80°C für 20 Minuten inaktiviert.

Zur Kontrolle ob beide Stellen im Plasmid geschnitten worden waren, wurde der mit Nicking-Endonukleasen-behandelte Vektor in Gegenwart von im Überschuss eingesetzten, nicht-phosphorylierten, unmodifizierten Oligonukleotiden erhitzt und wieder abgekühlt. Dazu wurden 400 ng der geschnittenen pZA-Vektoren mit 23 pmol (184-facher molarer Überschuss) der unmodifizierten Oligonukleotide (Eurofins MWG Operon) (**Tabelle 2-19**) in 15 µl des 1× T4 DNA Ligase Puffers nach **Tabelle 2-20** inkubiert. Hierbei konnte der zweite Schritt des Programms übersprungen werden, da keine Phosphorylierung der Oligonukleotide erfolgte. Nach Zugabe von 2 u T4 DNA Ligase (in 5 µl 1× T4 DNA Ligase Puffer) wurde 1 Stunde bei 22°C ligiert, bevor die 15-minütige Inaktivierung des Enzyms bei 65°C erfolgte. Zur Analyse der Austauschreaktion wurden die Proben auf einem EtBr-haltigen und 0,8 %-igen (w/v) Agarose-Gel aufgetragen (siehe Kapitel 2.2.3.5). Sofern der Vektor doppelt eingeschnitten wurde, kann das synthetische Kompetitor-Oligonukleotid das native DNA-Fragment aus der Bindung mit dem Templat verdrängen. Eine vollständige Ligation des Plasmids und damit der Übergang in die kovalent-geschlossenen DNA-Form ist nun nicht mehr möglich, da die hierfür benötigte Phosphatgruppe am 5'-Ende des synthetischen Oligonukleotids fehlt.

Tabelle 2-19 *Kompetitor-Oligonukleotide zur Konstruktion von unmodifizierten pZA-Plasmiden.*

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
Unmodifiziertes Oligonukleotid für den transkribierten DNA-Strang (T:A, C:G)	TCAGGGCGGACTGGGTGC
Unmodifiziertes Oligonukleotid für den nicht-transkribierten DNA-Strang (T:A, C:G)	TGAGCACCCAGTCCGCCC

Tabelle 2-20 *Programm zum Einbau eines synthetischen Oligonukleotids in den pZA-Vektor.*

Schritt	Temperatur	Zeit	Option
1	4°C	∞	
2	37°C	30 min	
3	80°C	10 min	
4	50°C	1 min	Rate: 0,1°C/s
5	4°C	∞	Zugabe T4 DNA Ligase
6	22°C	1 h	
7	65°C	15 min	
8	4°C	∞	

2.2.8.2 Präparation des Reporter-Vektors mit einer einzelsträngigen Lücke im EGFP-Gen

Um eine 18-nt große ssDNA-Lücke (gap) im transkribierten oder nicht-transkribierten DNA-Strang des EGFP-Gens zu konstruieren, wurden 30 µg der doppelt-ingeschnittenen pZA-Vektoren mit 8,625 nmol komplementären Oligonukleotiden (900-facher molarer Überschuss) (**Tabelle 2-21**) versetzt und für 10 Minuten auf 80°C erhitzt (**Tabelle 2-22**). Die Reaktion erfolgte in insgesamt 1.500 µl 1× T4 DNA Ligase Puffer, wobei die Ansätze in Aliquoten zu je 250 µl im Thermocycler inkubiert wurden. Nach Beendigung der Reaktion wurde der Überschuss an einzelsträngigen Oligonukleotiden und der zusammengelagerten Produkte mittels Amicon® Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices 30k (Merck Millipore, Darmstadt) entfernt. Dabei wurde nach dem Protokoll des Herstellers verfahren. Vor Benutzung wurden die Filter mit 500 µl autoklaviertem Wasser gewaschen (14.000 × g, 10 min). Die Proben wurden nach Zentrifugation (14.000 × g, 10 min) mit 470 µl BEH-Puffer vermischt und erneut zentrifugiert (14.000 × g, 10 min). Die zurückbleibenden Plasmide wurden durch Umstülpen des Filters in einem Reaktionsgefäß aufgefangen (1.000 × g, 2 min) und mit BEH-Puffer verdünnt.

Tabelle 2-21 Oligonukleotide zur Konstruktion des pZA-Plasmids mit einer einzelsträngigen Lücke innerhalb des EGFP-Gens.

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
Komplementär zu dem Fragment aus dem transkribierten DNA-Strang	GCACCCAGTCCGCCCTGA
Komplementär zu dem Fragment aus dem nicht-transkribierten DNA-Strang	GGGCGGACTGGGTGCTCA

Tabelle 2-22 Programm zum Erhitzen und Abkühlen des eingeschnittenen pZA-Plasmids in Gegenwart von komplementären Oligonukleotiden.

Schritt	Temperatur	Zeit	Option
1	4°C	∞	
2	80°C	10 min	
3	50°C	1 min	Rate: 0,1°C/s
4	4°C	∞	

2.2.8.3 Einbau von synthetischen Oligonukleotiden in das EGFP-Gen des Reporter-Vektors

Zum Austausch des 18-nt Fragments aus dem doppelt-eingeschnittenen pZA-Plasmid durch ein synthetisches Kompetitor-Oligonukleotid, welches ausschließlich korrekte Watson-Crick-Basenpaare mit dem Nachbarstrang ausbilden kann und keine DNA-Distorsionen hervorruft (U:A, T:A bzw. C:G), wurden 20 µg des mit Nb.Bpu10I oder Nt.Bpu10I verdauten Vektors mit 1,15 nmol (184-facher molarer Überschuss) des entsprechenden Oligonukleotids versetzt (**Tabellen 2-19 und 2-23**). Nach Zugabe von 250 u Polynukleotidkinase wurden die 750 µl Reaktionslösung (in 1× T4 DNA Ligase Puffer) zu je 75 µl in 200 µl Reaktionsgefäße aliquotiert und nach dem Programm in **Tabelle 2-20** inkubiert, wobei während der Pause bei 4°C in Schritt 5 10 u T4 DNA Ligase in 25 µl 1× T4 Ligase Puffer zu jedem Aliquot hinzugegeben wurde (entspricht 100 u Ligase für die gesamten 20 µg Vektor-DNA), bevor die weitere Inkubation nach **Tabelle 2-20** erfolgte.

Zum Einbau von Oligonukleotiden, die eine inkorrekte Basenpaarung ergeben oder strukturelle Änderungen der DNA bewirken (U:G, T:G und Tg:A), wurden die pZA-Plasmide verwendet, die eine einzelsträngige Lücke innerhalb des EGFP-Gens besitzen. Die Reaktion erfolgte analog dem Einbau von Oligonukleotiden, die ein korrektes Basenpaar mit dem Nachbarstrang ausbilden. Dabei wurden für 20 µg der gap-Plasmide jedoch nur 0,288 nmol (46-facher molarer Überschuss) der Kompetitor-Oligonukleotide verwendet (**Tabelle 2-23**).

Sowohl die konstruierten Plasmide, die korrekte Watson-Crick-Basenpaarungen ausbilden, als auch solche, bei der eine inkorrekte Paarung mit der Base des Nachbarstranges vorliegen, wurden mittels Phenolextraktion isoliert und mit Isopropanol präzipitiert (siehe Kapitel 2.2.3.1 und 2.2.3.2). Auch

hier erfolgte die Analyse des Austauschs nach Elektrophorese in einem EtBr-haltigem Agarose-Gel (0,8 % w/v) (siehe Kapitel 2.2.3.5).

Tabelle 2-23 *Kompetitor-Oligonukleotide zur Konstruktion der modifizierten pZA-Plasmide. Die Oligonukleotide enthalten Uracil (U) oder Thyminglykol (Tg) als Basenmodifikation.*

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
<i>Transkribierter Strang (TS)</i>	
Uracil gepaart mit Adenin (U:A)	TCAGGGCGGAC <u>U</u> GGGTGC
Thyminglykol gepaart mit Adenin (Tg:A)	TCAGGGCGGAC <u>Tg</u> GGGTGC
Uracil fehlgepaart mit Guanin (U:G)	TCAGGGCGGA <u>U</u> TGGGTGC
Thymin fehlgepaart mit Guanin (T:G)	TCAGGGCGGA <u>T</u> TGGGTGC
<i>Nicht-transkribierter Strang (NTS)</i>	
Uracil gepaart mit Adenin (U:A)	TGAGCACCCAG <u>U</u> CCGCCC
Thyminglykol gepaart mit Adenin (Tg:A)	TGAGCACCCAG <u>Tg</u> CCGCCC
Uracil fehlgepaart mit Guanin (U:G)	TGAGCACCC <u>U</u> AGTCCGCCC
Thymin fehlgepaart mit Guanin (T:G)	TGAGCACCC <u>T</u> AGTCCGCCC

2.2.8.4 Nachweis des in den Reporter-Vektoren eingebauten Uracils und Thyminglykols

Zur Verifizierung, ob die konstruierten Plasmide auch Uracil enthalten, wurden 100 ng der entsprechenden pZA-Vektoren mit 1 u Uracil-DNA Glykosylase (UDG) und 2 u Endonuklease IV (Endo IV), die beide aus *E.coli* stammen, in 15 µl BEH-Puffer (inklusive 33 µg/ml Nuklease-freies BSA) für 30 Minuten auf 37°C erwärmt. Die Reaktion wurde durch simultane Zugabe von 5 µl 6× DNA-Ladepuffer gestoppt und die Proben elektrophoretisch in einem EtBr-haltigem Agarose-Gel (0,8 % w/v) aufgetrennt (siehe Kapitel 2.2.3.5).

Zum Nachweis von Thyminglykol in den konstruierten Plasmiden, wurden 100 ng der entsprechenden pZA-Vektoren mit 1 u Endonuklease III (NTH) von *E.coli* in 10 µl 1× Reaktionspuffer für 1 Stunde auf 37°C erwärmt. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte bei 65°C für 15 Minuten und nach Zugabe von 2 µl 6× DNA-Ladepuffer wurden die Proben elektrophoretisch in einem EtBr-haltigem Agarose-Gel aufgetrennt (siehe Kapitel 2.2.3.5).

2.2.9 Schädigung des Reporter-Vektors pEGFP-mODC-ZA durch UV-B-Bestrahlung

2.2.9.1 Generierung von Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren in Plasmid-DNA mittels UV-B-Bestrahlung

Zur Herstellung von UV-Photoprodukten in dem pZA-Vektor, bei denen es sich hauptsächlich um Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPDs) und in kleinerer Menge auch 6-4-Photoprodukte (6-4-PP) handelt, wurden 50 µg Plasmid-DNA in 5 ml Phosphatpuffer in 21cm²-Zellkulturschalen ohne

Abdeckung mit einer UV-B-Lampe (Philips TL20W/12RS) auf schwarzen Untergrund bestrahlt. Die Strahlendosis wurde mittels UV Dosimeter gemessen und betrug 0,12 mW/cm² (2,655 Jm²/s). Nach der Bestrahlung wurden die Proben in ein 50 ml Greiner-Röhrchen überführt, mit 500 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,2) versetzt und mit 3,85 ml Isopropanol präzipitiert (siehe Kapitel 2.2.3.2). Die Zentrifugation erfolgte hierbei für 45 Minuten bei 4°C mit 9.000 × g und die luftgetrockneten Pellets wurden in 100 µl BEH-Puffer aufgenommen.

2.2.9.2 Quantifizierung der UV-B-generierten Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere

Zur Quantifizierung der generierten CPDs wurden 100 ng der bestrahlten Plasmide mit 5 – 150 ng T4 Endonuklease V in 25 µl BE₁₅-KCl (mit 0,02 mg/ml BSA) für 30 Minuten auf 37°C erwärmt. Die Reaktion wurde durch die simultane Zugabe von 5 µl Stop-Puffer (6× DNA Ladepuffer mit 1 % SDS) beendet. Die T4 Endonuklease V erkennt CPDs und spaltet die Glykosyl-Bindung des am 5'-Ende gelegenen Dimer-Paares und katalysiert ebenso die Inzision des DNA-Stranges am 3'-Ende der entstandenen AP-Läsion. Die damit verbundene Überführung der kovalent-geschlossenen (cc) DNA in die offen-zirkuläre Form (oc) lässt sich nach einer Agarose-Gelelektrophorese nachweisen (siehe Kapitel 2.2.3.5). Der Anteil an relaxierter (offen-zirkulärer) DNA wurde bestimmt und die Berechnung der Anzahl an Endonuklease V-generierten Einzelstrangbrüchen an den CPD-Stellen erfolgte mit der angegebenen Formel (**Formel 2-1**). Der Korrekturfaktor, der sich aus der besseren Interkalation des Ethidiumbromids in die offen-zirkuläre im Vergleich zur kovalent-geschlossenen (superhelikalen) DNA-Form ergibt, wurde anhand zahlreicher Versuche für das verwendete System auf 2,4 festgesetzt.

$$SSB_{ges} = -\ln\left(\frac{2,4 \times sc}{2,4 \times sc + oc}\right)$$

Formel 2-1 Berechnung der Anzahl an generierten Einzelstrangbrüchen (SSB) nach Inkubation der UV-B-bestrahlten Plasmid-DNA mit Endonuklease V. $SSB_{ges} = SSB_{vorher} - SSB_{induziert}$. Der Korrekturfaktor 2,4 ergibt sich aus der besseren Interkalation des Ethidiumbromids in die offen-zirkuläre DNA-Form im Vergleich zur superhelikalen. *oc* und *sc* = Fluoreszenzintensität der offen-zirkulären und superhelikalen DNA-Bande.

2.2.10 Host cell reactivation

Für den Host cell reactivation Assay wurden die pEGFP-mODC-ZA-Konstrukte mit eingebautem Uracil bzw. anderen DNA-Modifikationen in die menschlichen oder murinen Zellen transfiziert. Um die EGFP-Expression quantitativ zu messen, wurden zur Transfektion der menschlichen Zellen jeweils 400 ng des konstruierten Reporter-Vektors zusammen mit der gleichen Menge des pDsRed-Monomer N1-Vektors eingesetzt (Khobta et al., 2010a). Bei der Transfektion der MEF wurde hingegen 800 ng der

pZA-Vektoren und 1.500 ng des pDsRed-Monomer N1-Plasmids verwendet. Das unbeschädigte pDsRed-Monomer N1-Plasmid diente dabei zur Markierung der transfizierten Zellen.

2.2.10.1 Fixierung der Zellen mit Formaldehyd

Die mit den Reporter-Konstrukten transfizierten Zellen wurden nach gewünschter Inkubationszeit mit Formaldehyd fixiert. Zur Ermittlung der Expression des EGFP-Gens 24 Stunden nach der Transfektion wurde 4 Stunden nach dieser das Medium der Zellen gegen frisches ausgetauscht, bevor nach weiteren 20 Stunden die Fixierung erfolgte. Um den zeitlichen Verlauf der Reporter-Expression in den Zellen zu analysieren, wurden diese 6 oder 8 Stunden nach der Transfektion zweimal mit PBSCMF gewaschen, mit 0,45 ml Trypsin versetzt und bis zum Ablösen im Brutschrank inkubiert. Nach Resuspendierung der Zellen in Zellkulturmedium wurde ein Aliquot fixiert, während die restlichen Zellen in neue 6-Well-Platten ausgestreut wurden. Das Medium in den 6-Well-Platten wurde daraufhin auf 2 ml aufgefüllt und die Zellen bis zum gewünschten Zeitpunkt weiter kultiviert. Bei Fixierung der Zellen 6, 12 und 24 Stunden nach der Transfektion wurden jeweils 1/3 der Zellen nach 6 Stunden fixiert und genauso viele in eine neue Platte übertragen. Bei den Versuchen, bei denen die EGFP-Expression nach 8, 16, 24, 32 und 48 Stunden nach der Transfektion analysiert werden sollte, wurde 1/3 der Zellen nach 8 Stunden fixiert, während je ca. 1/5 für 16 und 24 Stunden und je ca. 1/10 für 32 und 48 Stunden weiter kultiviert wurden.

Zur Fixierung der Zellen wurden diese nach ein- bis zweimaligem Waschen mit PBSCMF mit 0,45 ml Trypsin versetzt, bis zum Ablösen im Brutschrank bei 37°C inkubiert und in 0,5 ml Medium resuspendiert. Die Proben wurden in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit der Tischzentrifuge 40 – 60 Sekunden zentrifugiert und das Zellpellet in 800 µl eiskaltem PBSCMF unter leichtem Vortexen gelöst. Nach erneuter Zentrifugation (Tischzentrifuge, 40 – 60 Sekunden) wurde der Überstand dekantiert, das Pellet in 0,45 ml eiskaltem PBSCMF resuspendiert und mit 0,5 ml einer 2 % v/v Formaldehyd-PBSCMF-Mischung versetzt. Nach kurzem Vortexen wurden die Proben zur durchflusszytometrischen Analyse der EGFP-Expression bis zum nächsten Tag im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden die ins Reaktionsgefäß überführten Zellen stets im Eis deponiert.

2.2.10.2 Messung der EGFP-Expression der Zellen mittels Durchflusszytometrie

Zur Messung der EGFP-Expression wurden die in Formaldehyd-fixierten Zellen pelletiert (1.200 × g, 2 min, Raumtemperatur) und in 0,45 – 0,8 ml eiskaltem PBSCMF resuspendiert. Die Fluoreszenz des auf dem pEGFP-mODC-ZA-Plasmid codierten EGFPs und des DsRed-Monomers wurden mittels Durchflusszytometrie im FACS Calibur™ bestimmt, wobei die grüne Fluoreszenz des EGFPs im Fluoreszenzkanal 1 (FL-1, 515 – 545 nm) und die rote Fluoreszenz des DsRed-Monomers im Kanal 2 (FL-2, 564 – 606 nm) parallel erfasst wurden. Die Angabe der Fluoreszenz erfolgte in einer

logarithmischen, einheitslosen Skala. Zur Kalibrierung des Durchflusszytometers wurden nicht-transfizierte Zellen sowie Zellen, die nur mit dem pDsRed-Vektor transfiziert worden waren, verwendet. Um sicher zu stellen, dass nur transfizierte Zellen in die Auswertung mit einbezogen wurden, wurde die mediane EGFP-Fluoreszenz nur von Zellen, deren DsRed-Monomer-Fluoreszenz über einen Schwellenwert von 30 (in seltenen Fällen auch 100) lag, bestimmt.

2.2.11 Untersuchung der DNA-Glykosylase-/Endonuklease-Aktivität in Zellextrakten (Cleavage Assay)

Um Zellextrakte für den Cleavage-Assay zu erhalten, wurden die zuvor in eine 125 cm²-Zellkulturflasche ausgestreuten 18 – 20 Millionen Zellen 16 – 24 Stunden später mit 20 ml PBSCMF, welches kurz zuvor mit 0,5 mM PMSF versetzt worden war, gewaschen und in 10 ml PBSCMF (mit 0,5 mM PMSF) mit einem Zellschaber abgekratzt. Nach Zentrifugation (250 × g, 5 min, 4°C) wurde das Zellpellet in 0,5 ml Lyse-Puffer resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Lyse erfolgte durch Sonifizierung der in Eiswasser gekühlten Proben mit dem Bacher GM 70 HD ultrasonic processor (Bacher GmbH, Reutlingen). Vor jedem Probendurchgang wurde der Sonifizierer mit 0,1 % w/v SDS-Lösung und Wasser durch 0,5 – 1-minütiges sonifizieren gewaschen. Die Proben wurden in 4 Durchläufen mit je 20 % Power und 40 % Arbeitszyklen für 40 Sekunden sonifiziert. Erschienen die Proben nach diesen Durchgängen immer noch trübe, wurden sie in 2 weiteren Durchläufen mit je 40 % Power und 40 % Arbeitszyklen für 40 Sekunden sonifiziert. Nach Ultrazentrifugation (100.000 × g, 45 min, 4°C) wurde der Überstand aliquotiert und bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Ein kleiner Teil der Probe wurde 1:100 und 1:1.000 mit Wasser verdünnt und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay (siehe Kapitel 2.2.6.2) bestimmt.

Beim Cleavage-Assay wurden 100 ng der konstruierten pEGFP-mODC-ZA-Vektoren mit eingebauten Uracil bzw. einer anderen Modifikation oder Fehlpaarung zusammen mit 1 – 20 µg Zellextrakt in 15 µl BEH-Puffer (mit 67 mg/l BSA) für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Als Kontrollreaktion wurden die Plasmid-Substrate mit UDG (1u/µg DNA) und Endonuklease IV (2u/µg DNA) von *E.coli* behandelt. Durch Zugabe von 5 µl einer 0,5 % w/v SDS-Lösung und 3-minütiger Inkubation bei 50°C wurde die Reaktion beendet, die Proben mit 6× DNA-Ladepuffer vermischt und 50 ng Plasmid-DNA zur Analyse in einem 0,8 %-igem (w/v) Agarose-Gel (mit Ethidiumbromid) elektrophoretisch analysiert (siehe Kapitel 2.2.3.5). Den Cleavage-Assays wurde optional noch 10 mM Magnesiumchlorid (MgCl₂) oder 20 – 200 µM des APE1-Inhibitors 7-Nitroindol-2-carboxylsäure hinzugefügt. Dieser wurde in DMSO gelöst (60 mM) und weiter mit BEH-Puffer (mit 0,1 g/l BSA) verdünnt.

3. Ergebnisse

3.1 Konstruktion und Verifizierung von Reporter-Vektoren, die ein spezifisch positioniertes Uracil innerhalb des EGFP-Gens besitzen

3.1.1 Konstruktion von pEGFP-mODC-ZA-Vektoren mit einem spezifisch positionierten U:A-Basenpaar innerhalb des EGFP-Gens

Um den Einfluss eines einzelnen U:A-Basenpaares auf die Genexpression zu untersuchen, wurden Reporter-Vektoren konstruiert, die ein spezifisch positioniertes Uracil innerhalb des transkribierten (TS) oder des nicht-transkribierten (NTS) DNA-Stranges des EGFP-Gens besitzen und mit Adenin des Nachbarstranges ein Basenpaar ausbilden (**Abbildung 3-1, A**). Hierzu wurden Nicking-Endonukleasen verwendet, die im Gegensatz zu Restriktionsenzymen nur einen DNA-Strang einschneiden. Der mit Hilfe der Nicking-Endonukleasen Nt.Bpu10I oder Nb.Bpu10I generierte doppelte Einschnitt des transkribierten oder nicht-transkribierten DNA-Stranges des pEGFP-mODC-ZA-Reporter-Vektors erlaubt, das zwischen den beiden Schnittstellen gelegene, native 18-Nukleotid-große ssDNA-Fragment gegen ein synthetisches Oligonukleotid auszutauschen. Das synthetische Oligonukleotid enthielt entweder Uracil (U:A) oder zur Konstruktion des Kontroll-Vektors Thymin (T:A). Der erfolgreiche Einbau des synthetischen Oligonukleotids unter Verdrängung des nativen ssDNA-Fragmentes kann nach einer Agarose-Gelelektrophorese überprüft werden. Die mit der Nicking-Endonuklease verdauten Vektoren wandern aufgrund der generierten Einzelstrangbrüche als offenzirkuläre (oc) Form der DNA durch das Gel (**Abbildung 3-1, B**). Durch Zugabe der Ligase werden die beiden Bruchstellen wieder verschlossen und die Plasmid-DNA wird mit Hilfe des in den Gelen vorhandenen Ethidiumbromids in die kovalent-geschlossene (cc) Form überführt. Dieser Übergang wird jedoch bei Anwesenheit des unphosphorylierten Kompetitor-Oligonukleotides verhindert. Ohne Inkubation mit der Polynukleotidkinase (PNK) besitzt das synthetische Oligonukleotid keine Phosphat-Gruppe am 5'-Ende. Das bedeutet, dass nach erfolgreichem Einbau in den Vektor eine Ligation dieses Endes mit dem 3'-Ende des Plasmids nicht mehr möglich ist und ein Einzelstrangbruch in der DNA zurückbleibt, wodurch das Plasmid in der offenzirkulären Form verweilt. Somit beweist die Abwesenheit der kovalent-geschlossenen DNA-Form, dass ein vollständiger Austausch des nativen 18-mers gegen das synthetische in allen Plasmiden stattgefunden hat. Wenn das Kompetitor-Oligonukleotid dagegen durch den Einsatz der PNK phosphoryliert wird, so kann die Ligation des 5'-Endes des eingebauten Oligonukleotids mit dem Plasmid erfolgen und die kovalent-geschlossenen DNA-Form erscheint wieder in der Spur.

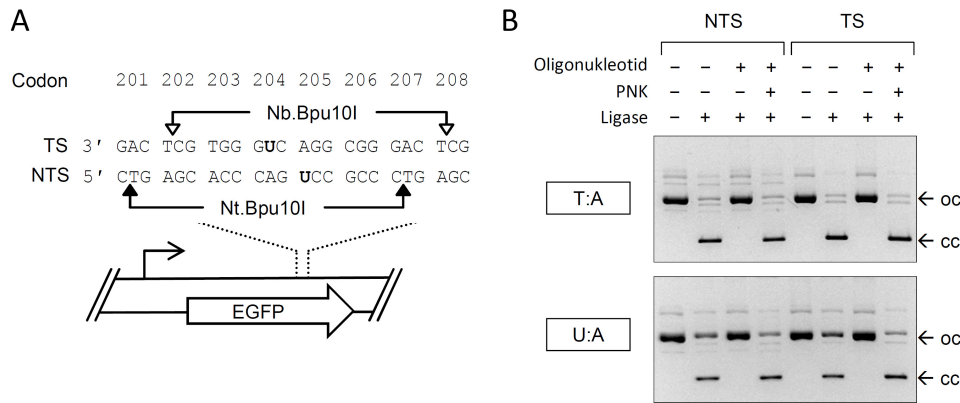


Abbildung 3-1 Konstruktion von Vektoren mit einem einzelnen U:A-Basenpaar. (A) Position von Uracil (U) innerhalb des transkribierten (TS) oder des nicht-transkribierten (NTS) DNA-Stranges der codierenden Sequenz des EGFP-Reportergens (Pfeil). Neben dem Startpunkt der Transkription (gebrochener Pfeil) sind auch die Einschnittstellen der Nicking-Endonukleasen, die zur Konstruktion der modifizierten pEGFP-mODC-ZA-Plasmide verwendet wurden, gezeigt: Nt.Bpu10I; Nb.Bpu10I. (B) EtBr-haltige Agarose-Gele nach Strang-Austausch-Reaktionen der doppelt-ingeschnittenen Plasmid-DNA unter Verwendung von 180-fachem molarem Überschuss an Uracil-enthaltenen Kompetitor-Oligonukleotiden. Nach Phosphorylierung der eingebauten Oligonukleotide durch die Polynukleotidkinase (PNK) lassen sich die konstruierten Vektoren durch Ligation von der offen-zirkulären (oc) in die kovalent-geschlossene (cc) DNA-Form überführen. Die Insertion von unmodifizierten Oligonukleotiden diente der Konstruktion von Kontroll-Plasmiden (T:A). Adaptiert aus (Lühnsdorf et al., 2014) und (Lühnsdorf et al., 2012).

3.1.2 Konstruktion von pEGFP-mODC-ZA-Vektoren mit einer spezifisch positionierten U:G-Fehlpaarung innerhalb des EGFP-Gens

Auf der gleichen Methode beruhend sollten nun pEGFP-mODC-ZA-Vektoren konstruiert werden, die eine spezifisch positionierte U:G-Fehlpaarung innerhalb des EGFP-Gens besitzen (**Abbildung 3-2, A**). Die Strang-Austausch-Reaktionen ergaben, dass trotz 900-fachem molarem Überschuss an Uracil-enthaltenen Oligonukleotiden kein vollständiger Einbau in das Plasmid gelingt, wenn dadurch eine U:G-Fehlpaarung gebildet werden sollte. Dies lässt sich daran erkennen, dass trotz Einsatzes der unphosphorylierten, Uracil-haltigen Kompetitor-Oligonukleotide eine Religation des eingeschnittenen Vektors erfolgen kann und die Plasmid-DNA die kovalent-geschlossenen (cc) Form annimmt (**Abbildung 3-2, B**). Bei der Verdrängung des nativen 18-mers gegen das synthetische Oligonukleotid sollte aufgrund der fehlenden Phosphat-Gruppe am 5'-Ende des Oligonukleotids jedoch keine Ligation dieses Endes mit dem 3'-Ende des Vektors möglich sein, so dass ein Einzelstrangbruch zurückbleibt und die DNA die offen-zirkuläre (oc) Form beibehalten müsste. Zwar wird mit steigender Konzentration der Uracil-enthaltenen Oligonukleotide eine Zunahme der Intensität der Bande der offen-zirkulären und eine Abnahme der kovalent-geschlossenen DNA-Form beobachtet, jedoch verbleiben selbst beim 900-fachen molarem Überschuss 9 (NTS) – 13 (TS) % an kovalent-geschlossener DNA zurück. Dies bedeutet, dass immer noch das native 18-mer zurück in

den Vektor bindet und eine komplette Ligation des Plasmids ermöglicht. Der Einbau des unmodifizierten Oligonukleotids, welches an Stelle der U:G-Fehlpaarung ein C:G-Basenpaar zur Folge hat, gelingt dagegen schon mit einem 180-fachen molaren Überschuss des Kompetitors. Die Ergebnisse zeigen, dass eine einfache Strang-Austausch-Reaktion, bei dem das native Oligonukleotid gegen ein synthetisches in nur einem Schritt ersetzt werden kann, nicht mit ausreichender Effizienz funktioniert, wenn die Basenmodifikation durch eine energetisch ungünstige Fehlpaarung mit der gegenüberliegenden Base die Bindung an die einzelsträngige DNA-Matrize erschwert. In diesen Fällen ist die Bindung des ausgeschnittenen ssDNA-Fragmentes zurück in den Vektor stark begünstigt.

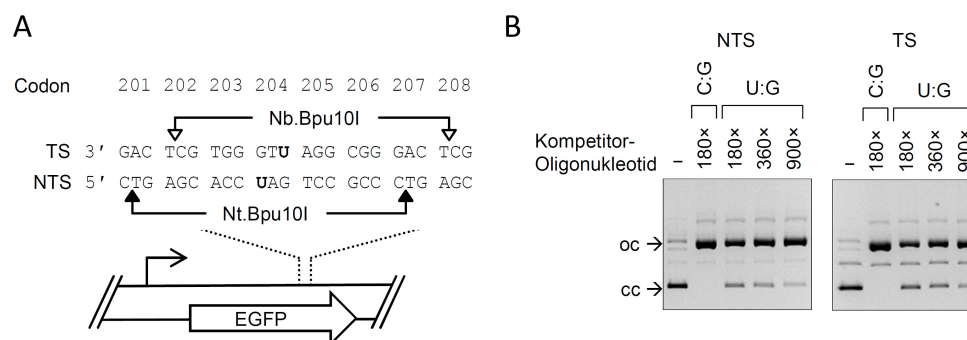


Abbildung 3-2 Konstruktion von Vektoren mit einem spezifisch positioniertem Uracil, das mit Guanin des Nachbarstranges kein reguläres Watson-Crick-Basenpaar ausbildet (U:G). (A) Position von Uracil (U) innerhalb des transkribierten (TS) oder des nicht-transkribierten (NTS) DNA-Stranges der codierenden Sequenz des EGFP-Reportergens (Pfeil). Neben dem Startpunkt der Transkription (gebrochener Pfeil) sind auch die Einschnittstellen der Nicking-Endonucleasen, die zur Konstruktion der modifizierten pEGFP-mODC-ZA-Plasmide verwendet wurden, gezeigt: Nt.Bpu10I; Nb.Bpu10I. (B) EtBr-haltige Agarose-Gele nach Strang-Austausch-Reaktionen der doppelt-ingeschnittenen Plasmid-DNA (oc) unter Verwendung der T4 DNA Ligase und zunehmenden molarem Überschuss an unphosphorylierten Uracil-enthaltenen Kompetitor-Oligonukleotiden. Beim vollständigen Einbau der unphosphorylierten Oligonukleotide wird die Religation der Plasmide unter Ausbildung der kovalent-geschlossenen DNA-Form (cc) verhindert. Als Kontrolle dienten unphosphorylierte, unmodifizierte Oligonukleotide (C:G). Adaptiert aus (Lühnsdorf et al., 2014) und (Lühnsdorf et al., 2012).

Eine Lösung für dieses Problem ist, das native 18-mer Oligonukleotid in einem zusätzlichen Schritt aus den Reaktionsansätzen zu entfernen, so dass es nicht mehr in direkte Konkurrenz mit dem synthetischen Oligonukleotid um die Bindung an die DNA-Matrize treten kann. Durch Zugabe eines im großen Überschuss eingesetzten Oligonukleotids, welches komplementär zu dem nativen 18-mer ist, sollte dieses gebunden werden und die Beseitigung ermöglichen. So konnten Vektoren konstruiert werden, die eine einzelsträngige Lücke (gap) besitzen (siehe Kapitel 2.2.8.2). In diese sollte der Einbau des synthetischen Oligonukleotids ohne Probleme gelingen. Mit dieser Strang-Insertion-Reaktion wurden Reporter-Plasmide konstruiert, die ein spezifisch positioniertes Uracil

oder Thymin im transkribierten oder im nicht-transkribierten DNA-Strang innerhalb des EGFP-Gens besaßen, bei dem dieses mit Guanin des Nachbarstranges eine Fehlpaarung ausbildete (U:G und T:G). Die Position des Thymins in der T:G-Fehlpaarung entsprach dabei der des Uracils in der U:G-Fehlpaarung, die in **Abbildung 3-2, A** gezeigt ist. Der erfolgreiche Einbau des Oligonukleotids, welches die Ausbildung einer U:G- oder T:G-Fehlpaarung bedingt, lässt sich nach einer Agarose-Gelelektrophorese (in Gegenwart von Ethidiumbromid) der Ligationsreaktionen nachweisen. Aufgrund der einzelsträngigen Lücke liegt das Plasmid in der offen-zirkulären (oc) DNA-Form vor. Bei Lokalisation der Lücke im transkribierten DNA-Strang (TS gap) lässt sich das Plasmid auch nach Zugabe der Ligase nicht in die kovalent-geschlossene (cc) Form überführen, was zeigt, dass eine Religation dieses Plasmides nicht erfolgen kann (**Abbildung 3-3**). Auch der Zusatz der PNK oder des unphosphorylierten Oligonukleotides alleine ändert nichts an dieser Tatsache. Ohne Phosphat-Gruppe am 5'-Ende kann dieses Ende des synthetischen Oligonukleotids nicht mit dem 3'-Ende des Vektors ligiert werden. Wird das eingebaute Oligonukleotid jedoch durch die PNK am 5'-Ende phosphoryliert, kann die Ligase beide Enden des Oligonukleotids (und nicht nur das 3'-Ende) mit dem Vektor-Rückgrat verknüpfen. Die damit verbundene Schließung der Lücke lässt sich anhand der Überführung der offen-zirkulären in die kovalent-geschlossene DNA-Form erkennen, welche gleichzeitig die erfolgreiche Inkorporation des synthetischen Oligonukleotids anzeigt. Im Falle der Reporter-Vektoren, deren Lücke im nicht-transkribierten DNA-Strang lokalisiert ist (NTS gap), reicht schon die alleinige Zugabe der Ligase aus, um die offen-zirkuläre DNA-Form in die kovalent-geschlossene zu überführen. Die überraschende Religation des Plasmids lässt sich nach einer Analyse (OligoAnalyzer 3.1) der möglichen Sekundärstrukturen, die der 18-Nukleotid-große einzelsträngige DNA-Strang (TS) ausbilden kann, erklären. So kann sich dieser unter den vorliegenden Bedingungen zu einer Haarnadel zusammenlagern. Dies hat zur Folge, dass beide Enden des Stranges, der die Lücke enthält (NTS), so nahe zusammengeführt werden, dass eine Ligation möglich ist. In Anwesenheit des unphosphorylierten Oligonukleotids unterbleibt jedoch die Ausbildung der kovalent-geschlossenen DNA-Form, was den kompletten Einbau des 18-mers in die Lücke beweist. Dadurch kann zum einen keine Sekundärstruktur mehr ausgebildet werden und zum anderen das ohne Einsatz der PNK unphosphorylierte 5'-Ende Oligonukleotids nicht mit dem Rückgrat des Plasmids verknüpft werden, so dass ein Einzelstrangbruch im Vektor verbleibt. Bei Zugabe der PNK kann nun auch dieser verschlossen werden und die Plasmid-DNA nimmt die kovalent-geschlossene Form ein.

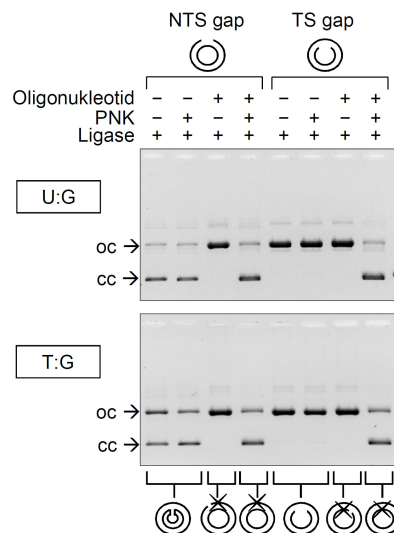


Abbildung 3-3 Konstruktion von Vektoren in denen ein spezifisch positioniertes Uracil oder Thymin mit Guanin des Nachbarstranges eine Fehlpaarung bildet (U:G oder T:G). Plasmide mit einer Lücke (gap) im transkribierten (TS) oder im nicht-transkribierten (NTS) DNA-Strang dienten als Substrate für Strang-Insertion-Reaktionen der in 46-fachem molarem Überschuss eingesetzten, synthetischen Oligonucleotide. Die Reaktionen erfolgten in An- und Abwesenheit der Polynucleotidkinase (PNK) und eine Agarose-Gelelektrophorese (mit EtBr) erlaubte es die kovalent-geschlossene (cc) DNA-Form von der offen-zirkulären (oc) zu trennen. Die Piktogramme symbolisieren die Strukturen der eingesetzten Plasmide bzw. des dominierenden Reaktionsproduktes; das Kreuz steht für die Basenmodifikation bzw. fehlgepaarte Base. Adaptiert aus (Lühnsdorf et al., 2012).

3.1.3 Nachweis des eingebauten Uracils in den konstruierten pEGFP-mODC-ZA-Vektoren

Um die konstruierten Vektoren auf das Vorhandensein von Uracil zu überprüfen, wurden die Plasmide bei 37°C zusammen mit der Uracil-DNA Glykosylase (UDG) und der Endonuklease IV (Endo IV) von *E.coli* inkubiert (siehe Kapitel 2.2.8.4). Nachdem die UDG Uracil vom Ribosephosphat-Rückgrat abgespalten hat, erkennt die Endo IV die entstandene AP-Läsion und hydrolysiert die Phosphodiester-Bindung am 5'-Ende der Läsion. Der durch den Einzelstrangbruch verbundene Übergang der kovalent-geschlossenen DNA-Form zur offen-zirkulären lässt sich in einem Ethidiumbromid-haltigem Agarose-Gel nach elektrophoretischer Trennung nachweisen. Während die unmodifizierten Vektoren (T:A, C:G) nahezu unverändert aus der Reaktion mit UDG und Endo IV hervorgehen, lassen sich die Uracil-enthaltenen Plasmide (U:A, U:G) vollständig in die offen-zirkuläre DNA-Form überführen (**Abbildung 3-4**). Dies beweist, dass alle zirkulären DNA-Moleküle ein Uracil enthalten.

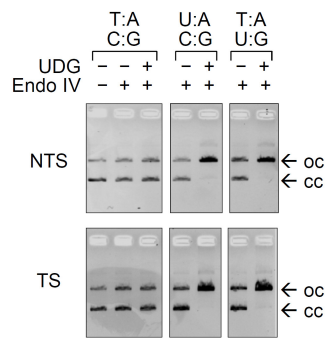


Abbildung 3-4 Verifizierung der Reporter-Vektoren auf die Anwesenheit des eingebauten Uracils (U:A-Basenpaar oder U:G-Fehlpaarung). EtBr-haltige Agarose-Gele der Plasmid-Substrate, die ein einzelnes Uracil im transkribierten (TS) oder nicht-transkribierten (NTS) DNA-Strang besitzen. Die Inkubation mit der Uracil-DNA-Glykosylase (UDG) und der Endonuklease IV (Endo IV) überführt die Uracil-enthaltene DNA von der kovalent-geschlossenen (cc) in die offen-zirkuläre (oc) Form. Unmodifizierte Plasmide (T:A, C:G) bleiben dagegen unverändert. Adaptiert aus (Lühnsdorf et al., 2012).

3.2 Einfluss von Uracil in der DNA auf die Genexpression in menschlichen Zellen

3.2.1 Einfluss eines einzelnen Uracils auf die Expression des Reporter-Vektors pEGFP-mODC-ZA in menschlichen Zellen

Um den Effekt von Uracil auf die Genexpression zu untersuchen, wurden die Uracil-enthaltenden Vektoren zusammen mit einem für das DsRed-Monomer codierenden Plasmid (pDsRed) in die Host-Zellen transfiziert und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten die EGFP-Expression mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Messung der Fluoreszenz des DsRed-Monomers (FL2-H) und des EGFPs (FL1-H) in den Zellen erfolgte simultan in separaten Kanälen des Durchflusszytometers, so dass Dot-Blot-Diagramme der fluoreszierenden Zellen erhalten werden konnten (**Abbildung 3-5, linke Seite**). Die Verwendung des unbeschädigten DsRed-Vektors ermöglicht es, transfizierte Zellen, welche in den oberen beiden Quadranten der Dot-Blots wiederzufinden sind, zu identifizieren und von nicht-transfizierten Zellen zu separieren (siehe Kapitel 2.2.10.2) (Khobta et al., 2009). So wurden ausschließlich Zellen, die auch das DsRed-Monomer exprimieren, zur Analyse der Expression des EGFP-Reportergens herangezogen und die Zellzahl gegen die gemessene EGFP-Fluoreszenz aufgetragen (**Abbildung 3-5, rechte Seite**). Auf diese Weise konnte beobachtet werden, dass ein einzelnes U:A-Basenpaar im Plasmid im Vergleich zu einem T:A-enthaltenden Plasmid eine stark verringerte FL1-Fluoreszenz und damit Expression des Reportergens bewirkt (**Abbildung 3-5**). Dieser Effekt war unabhängig davon, ob Uracil im transkribierten oder im nicht-transkribierten DNA-Strang lokalisiert war. Ebenso führte ein in das Reportergen eingebautes Uracil, das mit Guanin des Nachbarstranges eine Fehlpaarung ausbildet (U:G), zu einer deutlich abgeschwächten EGFP-Fluoreszenz im Vergleich zu Kontroll-Plasmiden mit einem C:G-Basenpaar. Dieser Effekt war erneut

unabhängig von der Lokalisation des Uracils. Die Beobachtung, dass auch Uracil im nicht-transkribierten Strang die Genexpression beeinträchtigt, deutet daraufhin, dass Uracil nicht direkt die Transkriptions-Maschinerie blockiert, da nur Schäden im transkribierten DNA-Strang hierzu in der Lage sein sollten.

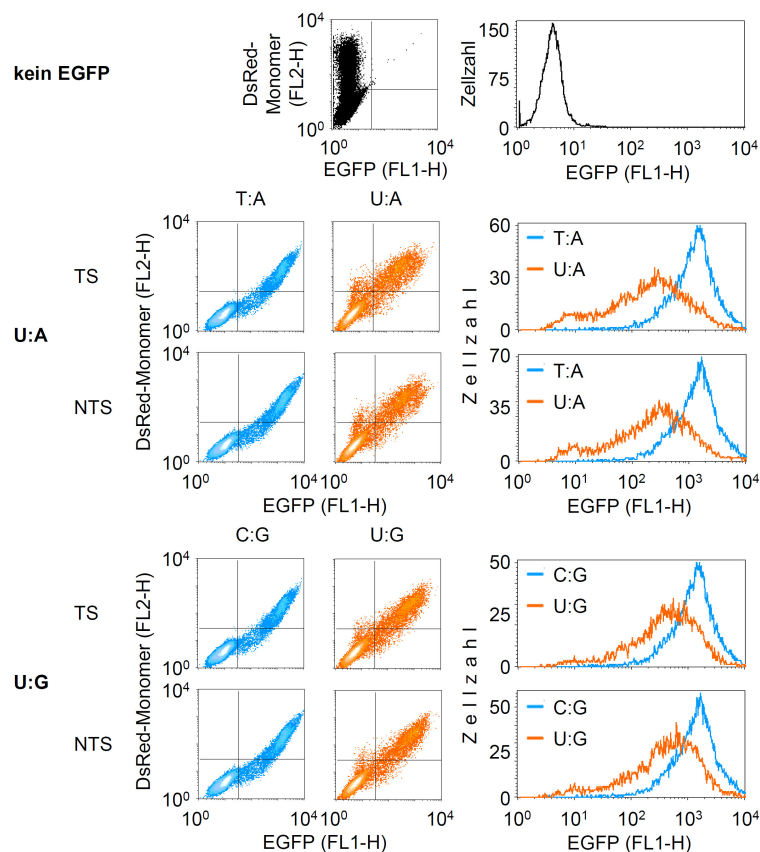


Abbildung 3-5 Expression des DsRed- und EGFP-Gens nach Transfektion in HeLa-Zellen. Durchflusszytometrische Analyse von HeLa-Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit Vektoren, in die ein einzelnes Uracil innerhalb des transkribierten (TS) oder nicht-transkribierten (NTS) DNA-Stranges des EGFP-Reportergens eingebaut wurde. Uracil bildete ein Basenpaar mit Adenin (U:A) oder eine Fehlpaarung mit Guanin (U:G) aus. Die Uracil-enthaltenen Vektoren wurden ebenso wie die korrespondierenden Kontroll-Konstrukte, die entweder Thymin (T:A) oder Cytosin (C:G) an Stelle von Uracil enthielten, mit für das DsRed-Monomer-codierenden Vektoren co-transfiziert. Auf diese Weise ließen sich Überlappungs-Diagramme der Zellzahl gegen die Fluoreszenz erstellen (rechte Seite), die ausschließlich transfizierte Zellen berücksichtigen, welche auch das DsRed-Monomer exprimieren (bestehend aus den Zellen in den beiden oberen Quadranten der Dot-Blots, linke Seite). Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Experiment.

Um diese Vermutung zu überprüfen und einen Hinweis auf den Mechanismus der inhibierten Transkription durch Uracil zu erhalten, wurde die EGFP-Expression der HeLa-Zellen in unterschiedlichen Zeitintervallen (8 – 48 Stunden) nach der Transfektion analysiert. Die mediane

EGFP-Fluoreszenz der mit den Uracil-enthaltenden Reporter-Plasmiden transfizierten Zellen wurde für jeden Zeitpunkt relativ zu den Zellen, denen die unmodifizierten Kontroll-Plasmide (T:A, C:G) eingeschleust worden waren, bestimmt. Ein einzelnes Uracil, sowohl wenn es gepaart mit Adenin (U:A) als auch wenn es fehlgepaart mit Guanin (U:G) vorlag, verursacht 8 Stunden nach der Transfektion in die HeLa-Zellen eine nur minimal verringerte Expression des Reportergens (**Abbildung 3-6, links**). Mit zunehmender Inkubationszeit der Uracil-enthaltenden Plasmide in den Zellen nimmt die EGFP-Fluoreszenz im Vergleich zu den unmodifizierten Referenz-Vektoren jedoch beständig ab. Einen Einfluss der Positionierung von Uracil im transkribierten oder nicht-transkribierten DNA-Strang kann nicht beobachtet werden. Unabhängig vom DNA-Strang beeinträchtigt ein einzelnes U:A-Basenpaar die Expression des EGFP-Gens deutlich stärker als eine U:G-Fehlpaarung.

Zur Untersuchung, ob der negative Effekt von Uracil auf die Genexpression einem allgemeinen Mechanismus in menschlichen Zellen unterliegt, wurden zwei weitere menschliche Zelllinien (MRC-5 und FB2-299) mit den Uracil-enthaltenden Vektoren transfiziert. In der Tat konnte eine den HeLa-Zellen sehr ähnliche zeitabhängige Abnahme der Genexpression in den SV40-transformierten Lungen-Fibroblasten MRC-5 beobachtet werden (**Abbildung 3-6, Mitte**). Auch Versuche mit den primären Fibroblasten FB2-299 ergaben eine verringerte Expression der Uracil-enthaltenden Vektoren 24 Stunden nach der Transfektion (**Abbildung 3-6, rechts**). So scheint Uracil in menschlichen Zellen allgemein einen negativen Einfluss auf die Transkription des Reportergens ausüben zu können. Angenommen, dass der Gentransfer des Vektors und die Synthese sowie korrekte Faltung des EGFP-Proteins einige Stunden in Anspruch nimmt, spiegelt die Fluoreszenz nach 8-stündiger Inkubationszeit in den Zellen annähernd die Expression des vermutlich noch nicht reparierten Plasmides wieder. Die wenn überhaupt nur schwach verringerte Expression des Reportergens zu diesem frühen Zeitpunkt unterstützt somit in vitro-Experimente, in denen Uracil keinen direkten Block der Transkriptions-Maschinerie bewirkt (Kuraoka et al., 2003).

In der selben Publikation konnte zudem gezeigt werden, dass die RNA-Polymerase II, wenn sie bei der Transkription auf Uracil trifft, sowohl Adenin als auch Guanin in annähernd gleichem Umfang in den naszierenden mRNA-Strang einbauen kann. In dem Leseraster des EGFP-Gens könnte dies im Falle des U:A-enthaltenden Plasmides zur Bildung eines mutierten Transkripts führen, bei dessen Translation die Aminosäure Glutamin gegen Arginin im gebildeten Protein ausgetauscht wird. Da jedoch die gemessene Fluoreszenz des EGFP-Proteins in den Zellen unabhängig davon ist, ob Uracil im transkribierten oder nicht-transkribierten DNA-Strang lokalisiert ist, bedeutet dies, dass selbst wenn ein mutiertes Protein gebildet werden sollte, diese Mutation keinen negativen Einfluss auf die Fluoreszenz des EGFP-Proteins ausübt. Die erst nach längerer Inkubationszeit in den Host-Zellen auftretende Abnahme der Genexpression, legt die Vermutung nahe, dass erst die Prozessierung

dieser Basenmodifikation in den Wirtszellen den Auslöser für die verringerte Transkription darstellt. Da die negative Auswirkung eines U:A-Basenpaares auf die Genexpression stärker als die einer U:G-Fehlpaarung ist, lässt vermuten, dass beide Läsionen unterschiedlich prozessiert werden.

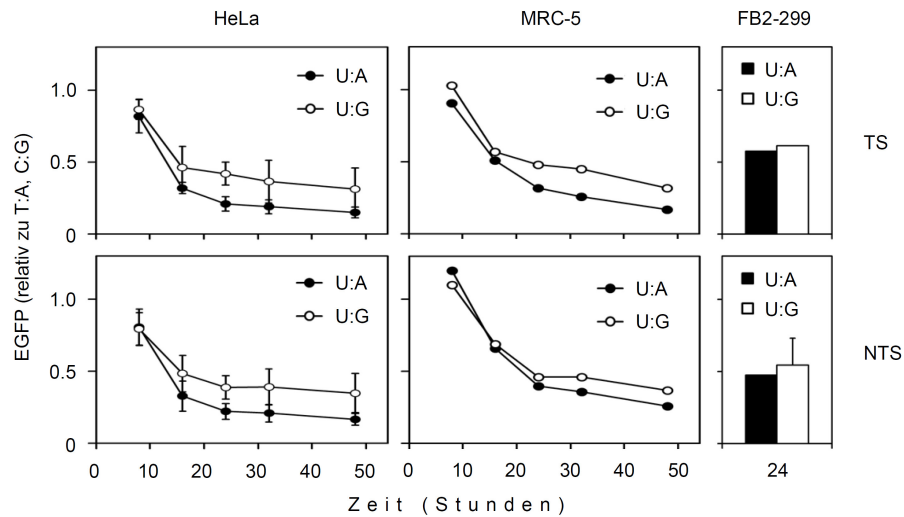


Abbildung 3-6 Auswirkungen eines einzelnen Uracils, welches im transkribierten (TS) oder im nicht-transkribierten (NTS) DNA-Strang innerhalb des EGFP-Reportergens positioniert ist, auf die Expression in menschlichen Host-Zellen (HeLa, MRC-5, FB2-299). Dabei bildet Uracil entweder ein Watson-Crick-Basenpaar mit Adenin (U:A, schwarz) oder eine Fehlpaarung mit Guanin (U:G, weiß). Die EGFP-Expression in den Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie relativ zu den mit unmodifizierten Kontroll-Plasmiden (T:A/C:G) transfizierten Zellen bestimmt. Mittelwerte der HeLa-Zellen aus 5 – 21 (U:A) bzw. 3 – 11 (U:G) Transfektionen, die mit 3 – 5 unabhängig hergestellten Vektor-Präparationen erfolgten (\pm Standardabweichung). Bei den FB2-299-Zellen sind Mittelwert und Variationsbreite der U:G-Plasmide mit Uracil im NTS aus 2 Versuchen mit verschiedenen Präparationen gezeigt. Im Falle der HeLa-Zellen sind zusätzlich Daten eingeflossen, die bereits im Rahmen der Diplomarbeit erhalten wurden (Lühnsdorf, 2010). Adaptiert aus (Lühnsdorf et al., 2014).

3.2.2 Einfluss eines einzelnen fehlgepaarten T:G-Basenpaares auf die Expression des Reporter-Vektors pEGFP-mODC-ZA in HeLa-Zellen

Da Uracil mit Guanin des Nachbarstranges eine Fehlpaarung ausbildet, stellte sich die Frage, ob die Fehlpaarung oder das Fehlen einer korrekten Basenpaarung per se einen Anteil am Effekt dieser Läsion auf die Genexpression besitzt. Um dies zu untersuchen, wurden Expressions-Vektoren, die eine T:G-Fehlpaarung innerhalb des EGFP-Gens enthalten, in die Zellen transfiziert und deren Auswirkungen auf die Transkription mit denen einer U:G-Fehlpaarung verglichen. Anhand der Fluoreszenz-Überlappungs-Diagramme lässt sich erkennen, dass die T:G-enthaltenen Vektoren ansatzweise gleich stark wie die C:G-Kontroll-Vektoren exprimiert werden, während eine einzelne U:G-Fehlpaarung, die Expression des Reportergens deutlich vermindert (**Abbildung 3-7, A**). Aus den EGFP-Fluoreszenzen der Zellen, die relativ zu den mit dem Kontroll-Vektor (C:G) transfizierten Zellen bestimmt wurden, ist ersichtlich, dass im Gegenzug zu der mit der Zeit abnehmenden Transkription der U:G-enthaltenen Plasmide eine Reaktivierung der Genexpression in Anwesenheit einer T:G-Fehlpaarung erfolgt (**Abbildung 3-7, B**). So ist die Genexpression der T:G-enthaltenen Vektoren 6 Stunden nach der Transfektion etwas verringert, steigt jedoch mit zunehmender Inkubationszeit in den Host-Zellen an, bis sie nach 24 Stunden annähernd der unmodifizierten Kontroll-Plasmide entspricht. Hochspekulativ könnte die, zu frühen Zeitpunkten beobachtete, verringerte Transkription der T:G-enthaltenen Vektoren durch die Bindung von Mismatch-Reparatur (MMR)-Proteinen an die Fehlpaarung erklärt werden. Das MMR-initiiierende Heterodimer umspannt bei der Bindung der Fehlpaarungen beide DNA-Stränge und könnte dadurch selbst dann mit der Transkription interferieren, wenn eine Läsion im nicht-transkribierten DNA-Strang lokalisiert ist. Nach erfolgter Reparatur der T:G-Fehlpaarung wäre eine vollkommene Genesung der Reportergen-Expression denkbar. Die sehr unterschiedlichen Auswirkungen der U:G- und der T:G-Fehlpaarung auf die Expression des Reportergens lassen auf eine unterschiedliche Prozessierung beider Substrate schließen. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass eine höhere Effizienz der BER im Falle des fehlgepaarten Uracils womöglich in einer verstärkten Inhibierung der Transkription resultiert, wohingegen die Entfernung der T:G-Fehlpaarung über die Mismatch-Reparatur nach anfänglicher Inhibierung der Transkription mit einer nahezu kompletten Reaktivierung der Genexpression endet.

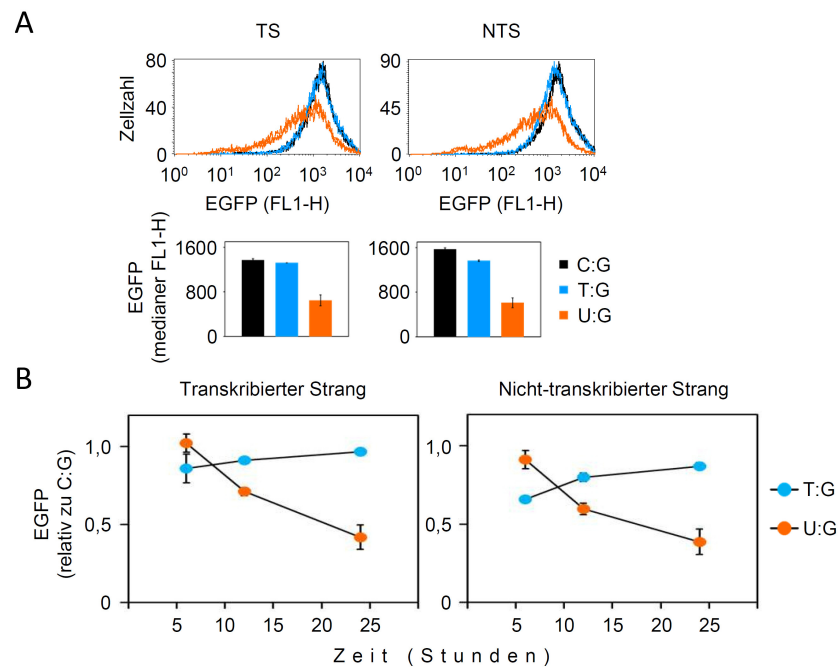


Abbildung 3-7 Einfluss einer einzelnen T:G- oder U:G-Fehlpaarung auf die Expression des EGFP-Reportergens in HeLa-Zellen. Sowohl Thymin (T:G, blau) als auch Uracil (U:G, orange), welche im transkribierten (TS) oder im nicht-transkribierten (NTS) DNA-Strang innerhalb des Reportergens positioniert sind, bilden eine Fehlpaarung mit Guanin. Als Kontrolle dienten die Konstrukte ohne Fehlpaarung (C:G, schwarz) (A) Durchflusszytometrische Analyse der EGFP-Expression 24 Stunden nach der Transfektion und die daraus erhaltenen Überlappungs-Diagramme der Zellzahl gegen die EGFP-Fluoreszenz (oben, gezeigt sind je 2 Linien pro Konstrukt aus 2 unabhängigen Versuchen) sowie medianen Werte (unten, Mittelwert \pm Variationsbreite). (B) EGFP-Expression relativ zu den mit unmodifizierten Kontroll-Plasmiden (C:G) transfizierten Zellen. Mittelwert aus 2 Transfektionen, die mit 2 unabhängig hergestellten Konstrukten erfolgten (\pm Variationsbreite). Adaptiert aus (Lühnsdorf et al., 2014).

3.2.3 Einfluss eines einzelnen Uracils auf die mRNA-Expressions- und die Plasmid-DNA-Level des pEGFP-mODC-ZA-Vektors in HeLa-Zellen

Die verringerte Expression des EGFP-Reportergens in Anwesenheit von Uracil kann höchstwahrscheinlich auf eine Inhibierung der Transkription oder der Bildung eines unvollständigen Transkripts zurückzuführen sein. Um Aufschlüsse über den Mechanismus der abnehmenden Expression des Reportergens zu erhalten, wurden HeLa-Zellen mit den Uracil-enthaltenen Vektoren zusammen mit dem pDsRed-Monomer N1-Plasmid transfiziert und die mRNA-Expressions-Level beider Vektoren 24 Stunden nach der Transfektion mittels RT-qPCR bestimmt (siehe Kapitel 2.2.5). Dabei wurden zwei Fragmente des EGFP-Transkripts amplifiziert. Das erste Primerpaar wurde so gewählt, dass ein Fragment oberhalb (upstream) vom eingebauten Uracil gebildet wird (EGFP1), während das zweite Paar die Stelle der Basenmodifikation mit einschließt (EGFP2) (**Abbildung 3-8, oben**). Dies ermöglicht eine Differenzierung zwischen Prozessen, die lokal an der Stelle der Läsion ablaufen (z.B. die Bildung eines unvollständigen Transkripts) und solchen, die das gesamte Transkript

betreffen. Die zusätzliche Bestimmung der mRNA-Expressionslevel des DsRed-Monomers, welches kein Uracil enthält, diente der Normalisierung der Proben, so dass ungleiche Aufarbeitung und unterschiedliche Effizienz der reversen Transkription Berücksichtigung fanden, was einen quantitativen Vergleich der Proben ermöglicht. Ebenso wurde die mRNA relativ zu der in den Zellen vorhandenen Plasmid-DNA quantifiziert. Die Analyse der mRNA-Expressions-Level ergibt, dass ein einzelnes Uracil die Transkription des Reportergens (oder die Stabilität des Transkripts) in Relation zu den Kontroll-Plasmiden (T:A, C:G) stark beeinträchtigt (**Abbildung 3-8**). Dieser Effekt ist stärker ausgeprägt, wenn Uracil mit Adenin gepaart ist als wenn es eine Fehlpaarung mit Guanin ausbildet, jedoch unabhängig davon, ob Uracil im transkribierten oder nicht-transkribierten DNA-Strang positioniert ist. Ebenso lassen sich keine größeren Unterschiede zwischen den beiden amplifizierten Fragmenten EGFP1 und EGFP2 feststellen. Dies deutet darauf hin, dass Uracil keinen Abbruch der elongierenden Transkriptions-Maschinerie unter Bildung eines verkürzten Transkripts bewirkt. Die stärkere Inhibierung der Transkription durch ein U:A-Basenpaar gegenüber der U:G-Fehlpaarung ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus der durchflusszytometrischen Analyse der Expression des EGFP-Gens (**Abbildung 3-6**).

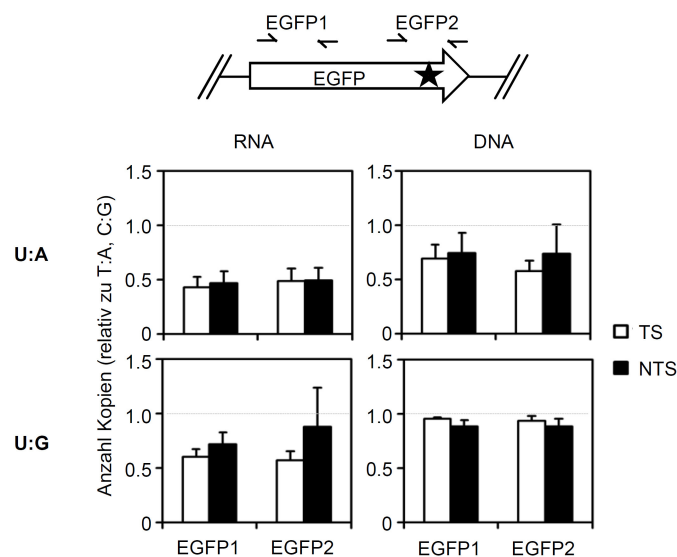


Abbildung 3-8 Realtime quantitativer PCR der mRNA und DNA in HeLa-Zellen 24 Stunden nach Transfektion der Uracil-enthaltenen Vektoren. Schematische Darstellung der Regionen der amplifizierten Fragmente (EGFP1 und EGFP2) innerhalb der EGFP-codierenden Sequenz (Pfeil) relativ zur Position des eingebauten Uracils (Stern), welches entweder im transkribierten (TS) oder nicht-transkribierten (NTS) DNA-Strang positioniert war. mRNA-Quantifizierung aus Mittelwerten von 2 (TS) oder 3 (NTS) Versuchen im Falle der U:A-enthaltenen Plasmide und Quadruplikaten im Falle der U:G-enthaltenen Vektoren (\pm Standardabweichung). Bei der Bestimmung der DNA wurden die Mittelwerte aus 4 Versuchen/Messwerten (\pm Standardabweichung) berechnet. Adaptiert aus (Lühnsdorf et al., 2014).

Neben der RNA wurde parallel auch die DNA aus den transfizierten Zellen isoliert und mittels RT-qPCR analysiert. Dies diente zum einen dazu die mRNA-Ergebnisse in Relation zur vorhandenen Plasmid-DNA auszuwerten und zum anderen um herauszufinden, ob Uracil eine Degradierung der DNA auszulösen vermag, was bereits in Zellen des Immunsystems beobachtet werden konnte (Stenglein et al., 2010). Hierbei ermöglicht die parallele Amplifizierung der unmodifizierten Plasmid-DNA des pDsRed-Monomer N1-Vektors die Normalisierung gegenüber unausgewogener Transfektions-Effizienz und DNA-Isolierung. Bei Betrachtung der DNA-Level der Uracil-enthaltenen Plasmide in den transfizierten Zellen, so lässt sich im Falle einer U:G-Fehlpaarung eine nur marginale Verringerung dieser erkennen, wohingegen ein U:A-Basenpaar eine deutlich stärkere Reduktion der Plasmid-DNA bewirkt (**Abbildung 3-8**). Dies zeigt, dass ein einzelnes Uracil in der DNA durchaus in der Lage ist eine verminderte Aufnahme oder Stabilität des Vektors zu verursachen. Die Abnahme der DNA-Kopienzahl ist weder abhängig davon, ob Uracil im transkribierten oder im nicht-transkribierten DNA-Strang positioniert ist, noch, ob über die Stelle der Läsion amplifiziert wurde oder weit entfernt von dieser. Letztere Beobachtung deutet darauf hin, dass kein lokaler Effekt vorliegt, sondern dass das gesamte Plasmid oder zumindest ein großer Teil davon betroffen ist. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass sich der negative Effekt von Uracil auf die Expression des EGFP-Gens aus einer reduzierten DNA-Kopienzahl und einer zusätzlich verringerten Transkription des Reportergens zusammensetzt, wobei der Einfluss auf die Transkription überwiegt.

3.3 Rolle der Uracil-DNA-Glykosylasen bei der Inhibierung der Genexpression durch Uracil in der DNA

Da Uracil die Expression des EGFP-Reportergens kurze Zeit nach Transfektion in die HeLa- und MRC-5-Zellen nur marginal verringert und erst mit zunehmender Inkubationszeit eine steigende Inhibierung der Transkription beobachtet werden konnte (**Abbildung 3-6**), liegt die Vermutung nahe, dass Uracil erst in Folge intrazellulärer Prozessierung negative Auswirkungen auf die Genexpression besitzt. Auch bei einem weiteren Substrat der Basen-Exzisions-Reparatur konnte eine zeitabhängige Abnahme der Expression eines Reportergens beobachtet werden. So zeigten Untersuchungen der Basenmodifikation 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxoG), dass erst die Exzision der Läsion durch die spezifische DNA-Glykosylase OGG1 der Auslöser für eine inhibierte Transkription ist (Allgayer et al., 2013), (Kitsera et al., 2011). Die Basen-Exzisionsreparatur von Uracil, eingeleitet durch eine der vier Uracil-DNA Glykosylasen (UNG1/2, SMUG1, TDG und MBD4), könnte somit eine bedeutende Rolle bei der zeitabhängigen Abnahme der Genexpression einnehmen. In Folge dieser kommt es zur Generierung von Einzelstrangbrüchen, die unumgänglich als Zwischenprodukte bei der BER entstehen und denen bereits negative Auswirkungen auf die Transkription in in vitro-Versuchen nachgewiesen werden konnte (Kathe et al., 2004). Um herauszufinden, welche Rolle die Exzision von

Uracil bei der Abnahme der Transkription des Reportergens spielt, wurde in HeLa-Zellen die bedeutendsten Uracil-DNA Glykosylasen UNG1/2, SMUG1 und TDG permanent ausgeschaltet. Darüber hinaus wurden LN428-Glioblastoma-Zellen mit UDG-Knockdown (UNG, SMUG1 und TDG) kommerziell erworben.

3.3.1 Knockdown der Uracil-DNA-Glykosylasen in HeLa-Zellen

Zur Stilllegung der Uracil-DNA-Glykosylasen in HeLa-Zellen wurden shRNA-Expressions-Vektoren verwendet, die es ermöglichen RNA-Interferenz in den Zellen auszulösen. Der verwendete Vektor pENTR/pSUPER+ basiert auf dem pSUPER-Vektor, der bereits erfolgreich eingesetzt wurde um Proteine in menschlichen Zielzellen herunterzuregulieren (Brummelkamp et al., 2002). Es wurden pro Glykosylase zwei (UNG1/2) bis drei (SMUG1 und TDG) spezifische shRNA-Sequenzen zur Klonierung in den pENTR/pSUPER+-Vektor aus der Literatur oder aus diversen Datenbanken ausgesucht (siehe Appendix I). Pro Konstrukt wurden 32 stabil transfizierte HeLa-Klone gepickt und die Expression des Zielgens mittels Western Blot oder RT-qPCR untersucht. Der effizienteste Knockdown von UNG1/2 wurde mit einer adaptierten siRNA-Sequenz erzielt, die einerseits vom siRNA-Wizard 3.1 (Invivogen) empfohlen wurde als auch in zwei Publikation erfolgreich eingesetzt worden war (Lu et al., 2007) (Pulukuri et al., 2009). Die eingesetzte shRNA gegen das UNG-Gen richtet sich dabei sowohl gegen die mitochondriale UNG1 als auch die nukleäre UNG2 (**Abbildung 3-9, A**). Im Falle von TDG entstammten die Sequenzen mit der besten Erfolgsquote aus der validierten MISSION®-shRNA-Datenbank (Sigma-Aldrich), wobei ebenso die Haarnadelschleife von der MISSION®-shRNA übernommen wurde. Nachdem die ersten erfolgreichen SMUG1-Knockdown-Klone ebenfalls mit einem der MISSION®-shRNA-Konstrukte (mit Haarnadelschleife) detektiert werden konnten, wurde auf das Screening der mit einem anderen Konstrukt transfizierten Zellen verzichtet. In den folgenden Abbildungen sind aus den 32 untersuchten Klonen, die mit dem erfolgreichsten shRNA-Expressions-Vektor transfiziert wurden, diejenigen mit dem effizientesten Knockdown gezeigt. Die Western Blot Analysen ergaben eine deutlich verringerte Expression der UNG1/2- und TDG-Glykosylasen in mehreren der stabil transfizierten Klone (UNGsh, TDGsh) im Vergleich zu der Referenz-Zelllinie (no sh), bei deren Transfektion der leere shRNA-Expressions-Vektor benutzt wurde (**Abbildung 3-9, B und C**). Für spätere Versuche wurden die UNG1/2-Knockdown-Klone 6 und 12 (UNGsh-c6 und UNGsh-12), die eine verbleibende UNG1/UNG2-Expression von 25/42 % und 15/24 % aufwiesen, sowie der TDG-Knockdown-Klon 6 (TDGsh-c6) mit 4 % verbleibender TDG-Proteinmenge verwendet. Unerwarteterweise konnte keiner der drei getesteten SMUG1-Antikörper das Protein spezifisch detektieren. Deswegen wurde nach Isolierung der RNA aus den Zellen die SMUG1-Expression auf mRNA-Ebene mittels RT-qPCR quantifiziert, bei der einige Klone (SMUG1sh) mit reduzierten SMUG1-Leveln (verbleibende Expression 50 – 65 %) im Vergleich zur Referenz identifiziert werden konnten (**Abbildung 3-9, D**).

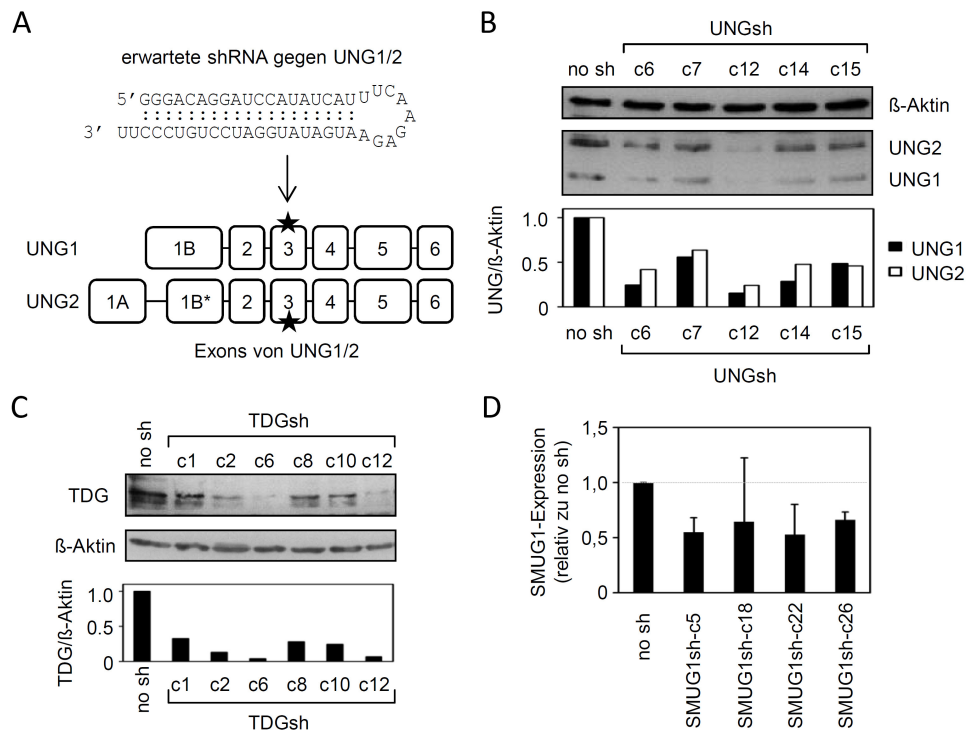


Abbildung 3-9 Knockdown der UNG1/2-, SMUG1- und TDG-DNA-Glykosylasen in HeLa-Zellen mittels shRNA. (A) Vorhergesagte shRNA-Struktur gegen UNG1/2 und dessen spezifischer Angriffspunkt im Transkript. (B – D) Analyse der HeLa-Zell-Klone, die stabil mit den UNG1/2-, SMUG1 oder TDG-shRNA-Expressions-Vektoren (UNGsh, SMUG1sh, TDGsh) oder dem Leervektor (no sh) transfiziert wurden. Western Blot des UNG1/2-Proteins (B) und der TDG-Glykosylase (C) der isogenen Klone mit β -Aktin als Ladekontrolle. (D) Quantifizierung der mRNA des SMUG1-Gens der HeLa-Klone relativ zu GAPDH und der Kontroll-Zelllinie (no sh) mittels RT-qPCR (Mittelwert aus 2 Versuchen jeweils in Duplikaten durchgeführt \pm Variationsbreite). Adaptiert aus (Lühnsdorf et al., 2014).

3.3.2 Einfluss der UDGs auf die Einschnitts-Aktivität von menschlichen Zellextrakten gegenüber Uracil-enthaltenden Vektoren und auf die Genexpression dieser Vektoren in HeLa-Zellen

3.3.2.1 Ermittlung der Einschnitts-Aktivität von menschlichen Zellextrakten gegenüber den Uracil-enthaltenden Reporter-Vektoren

Die Untersuchung der Einschnitts-Aktivität von Zellextrakten gegenüber DNA-Substraten, die eine Basenmodifikation enthalten, erlaubt es, Aufschlüsse über die Glykosylase-Aktivität der Zellen zu erhalten. Dabei wird modifizierte Plasmid-DNA mit Zellextrakten inkubiert, wodurch die endogen aktiven Glykosylasen des Extraktes die modifizierten Basen entfernen, während die AP-Endonukleasen den DNA-Strang des Plasmides an der generierten AP-Läsion einschneiden. Der damit verbundene Übergang von der kovalent-geschlossenen (intakten) zur offen-zirkulären (eingeschnittenen) DNA-Form lässt sich nach einer Agarose-Gelelektrophorese überprüfen. Um zu untersuchen, ob die konstruierten EGFP-Expressions-Vektoren geeignet sind, die endogene Glykosylase-Aktivität nachzuweisen, wurden diese mit HeLa-Zellextrakten inkubiert und anschließend

auf ein EtBr-haltiges Agarose-Gel aufgetragen. Das unmodifizierte Substrat (T:A/C:G) wird von Extrakten der mit dem leeren shRNA-Expressions-Vektor transfizierten HeLa-Zellen (no sh) nicht gespalten, was die Abwesenheit von unspezifischen Endonuklease-Aktivitäten beweist (**Abbildung 3-10**). Der Einschnitt des T:G-enhaltenen Plasmides ist nur sehr schwach ausgeprägt, was eine minimale Glykosylase-Aktivität in den Zellen gegenüber der Fehlpaarung vermuten lässt. Sowohl das Plasmid mit einem U:A-Basenpaar als auch das mit einer U:G-Fehlpaarung wird proportional zur eingesetzten Proteinmenge des Extraktes deutlich eingeschnitten. Dabei muss zur Inzision des U:A-enhaltenen Plasmids ungefähr 7-mal mehr Proteinextrakt eingesetzt werden, um eine vergleichbare Einschnitts-Aktivität wie bei dem Plasmid zu erzielen, welches eine U:G-Fehlpaarung besitzt. Die Ergebnisse zeigen, dass die konstruierten Plasmid-Substrate geeignet sind, um die DNA-Glykosylase-Aktivität in den Extrakten zu bestimmen.

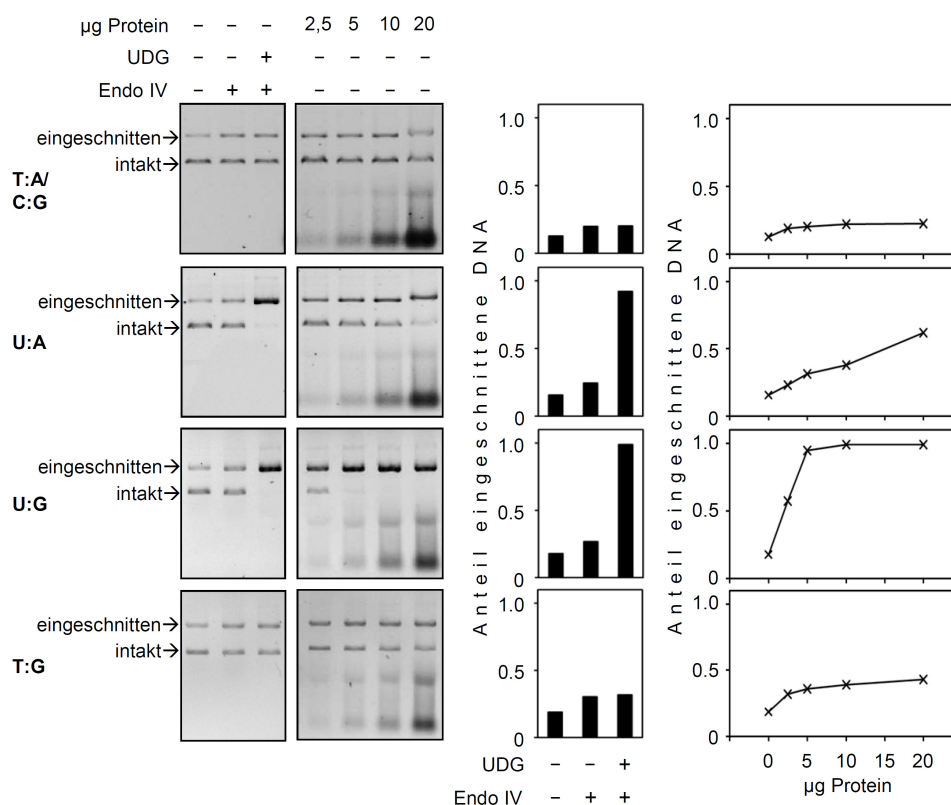


Abbildung 3-10 Einschnitts-Aktivität von Extrakten aus HeLa-Zellen, die stabil mit einem leeren shRNA-Expressions-Vektor transfiziert wurden, gegenüber den konstruierten Reporter-Vektoren. Die Plasmide enthielten ein einzelnes Uracil oder Thymin im nicht-transkribierten Strang, welches entweder mit Adenin gepaart war (U:A oder T:A) oder eine Fehlpaarung mit Guanin ausbildete (U:G oder T:G). Der Einschnitt des DNA-Stranges wurde anhand der Überführung der kovalent-geschlossenen (intakten) zu der offen-zirkulären (eingeschnittenen) DNA-Form nach einer Agarose-Gelelektrophorese (mit EtBr) detektiert und mittels Image Lab 3.0 analysiert. Niedermolekulare DNA-Banden stammen aus den Zellextrakten.

In neueren Untersuchungen ist beschrieben, dass die humane SMUG1- und UNG2-Glykosylase U:G-Fehlpaarung in Abhängigkeit zum vorliegenden Sequenzkontext prozessiert (Doseth et al., 2012). Um Rückschlüsse auf eine mögliche Sequenzpräferenz bei der Inzision des Stranges durch die Zellextrakte zu erhalten, wurde die Einschnitts-Aktivität der Extrakte gegenüber den konstruierten Uracil-enthaltenen Vektoren in Abhängigkeit davon untersucht, ob Uracil im transkribierten oder nicht-transkribierten DNA-Strang positioniert war. Je nach Lokalisierung der DNA-Modifikation ergeben sich unterschiedliche Sequenzkontexte (**Abbildungen 3.1 und 3.2**). Für das U:A-enthaltene Plasmid ergibt sich die Sequenz 5'-CUG für Uracil im transkribierten und 5'-GUC, wenn die DNA-Modifikation im nicht-transkribierten Strang lokalisiert ist. Bei beiden Substraten kann jedoch kein strangabhängiger Einschnitt durch die HeLa-Zellextrakte festgestellt werden (**Abbildung 3-11, A**). Auch im Falle der U:G-Fehlpaarung scheint die Inzision der Plasmide unabhängig davon stattzufinden, ob Uracil im nicht-transkribierten DNA-Strang (5'-CUA) positioniert ist, oder ob die Läsion im transkribierten Strang liegt (5'-AUT). Ebenso ist in Zellextrakten, die aus LN428-Glioblastoma-Zellen stammen, kein strangabhängiger Einschnitt der Uracil-enthaltenen Plasmide zu erkennen (**Abbildung 3-11, B**).

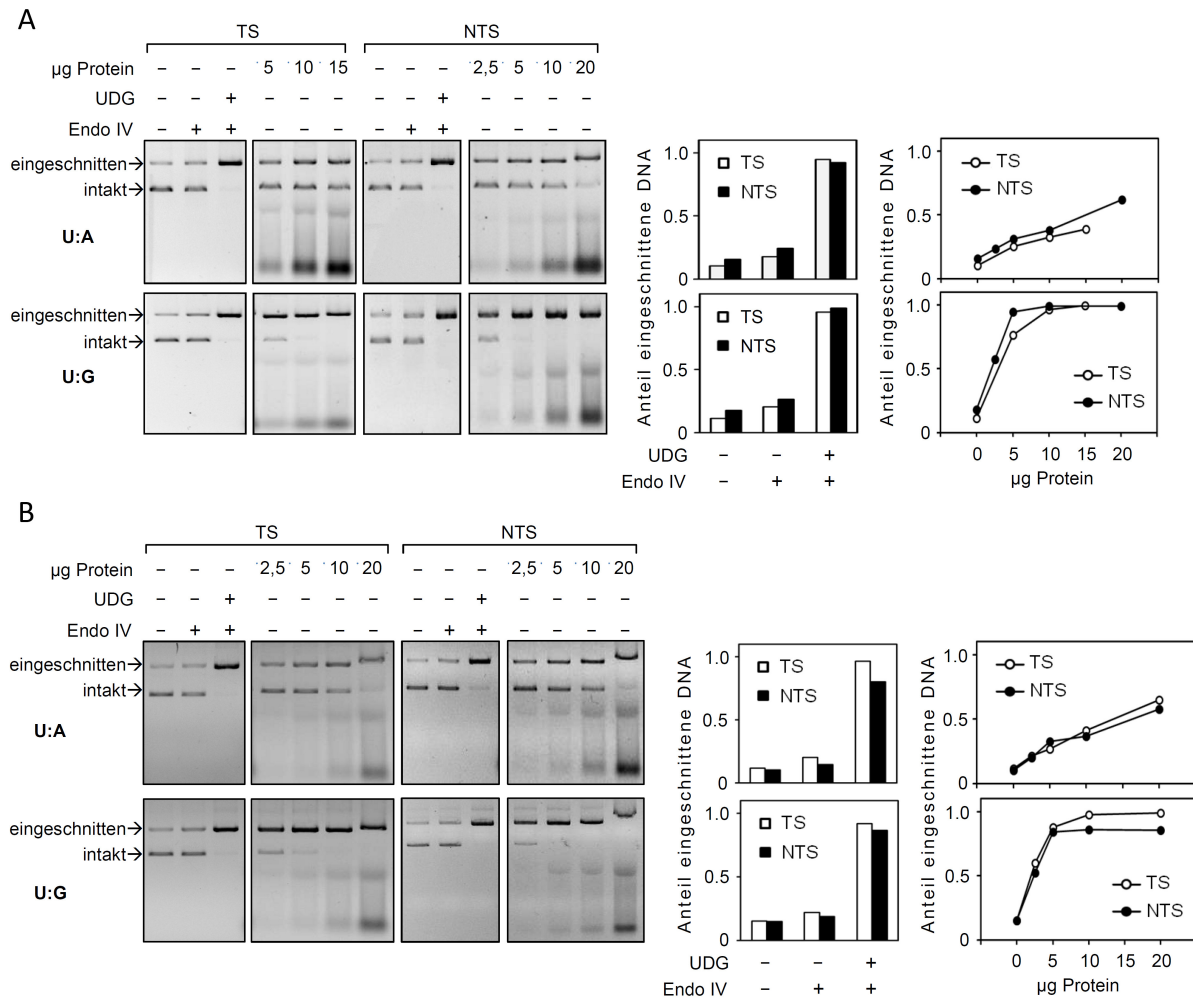


Abbildung 3-11 Einfluss der Position von Uracil auf die Einschnitts-Aktivität von Zellextrakten. Inzision von Plasmiden mit Uracil, welches entweder mit Adenin des Nachbarstranges gepaart war (U:A) oder mit Guanin eine Fehlpaarung bildete (U:G), durch Inkubation mit Extrakten aus HeLa-Zellen, die mit dem leeren shRNA-Expressions-Vektor transfiziert worden waren (A), und LN428-Glioblastoma-Zellen (B). Uracil war entweder im transkribierten (TS, weiß) oder nicht-transkribierten (NTS, schwarz) DNA-Strang platziert.

Um einen unspezifischen Einschnitt der Plasmid-DNA durch Endonukleasen zu verhindern, wurden die Reaktionen in Gegenwart von EDTA durchgeführt. Dieses chelatisiert Magnesium, von dem berichtet wurde, die Einschnitts-Aktivität der menschlichen AP-Endonuklease 1 zu erhöhen (Barzilay et al., 1995). Um zu testen, ob die Reaktionsbedingungen für die Inzision der APE1 in den Extrakten möglicherweise nicht optimal waren, wurde Magnesiumchlorid (10 mM) den Ansätzen zugefügt. Dies führte jedoch lediglich zu einer Zunahme an unspezifischer Nuklease-Aktivität, so dass sowohl das U:A-enhaltene Plasmid als auch das unmodifizierte Kontroll-Plasmid (T:A) verstärkt eingeschnitten wurden (**Abbildung 3-12**). Somit musste von der Zugabe des Salzes zu den Reaktionen abgesehen werden.

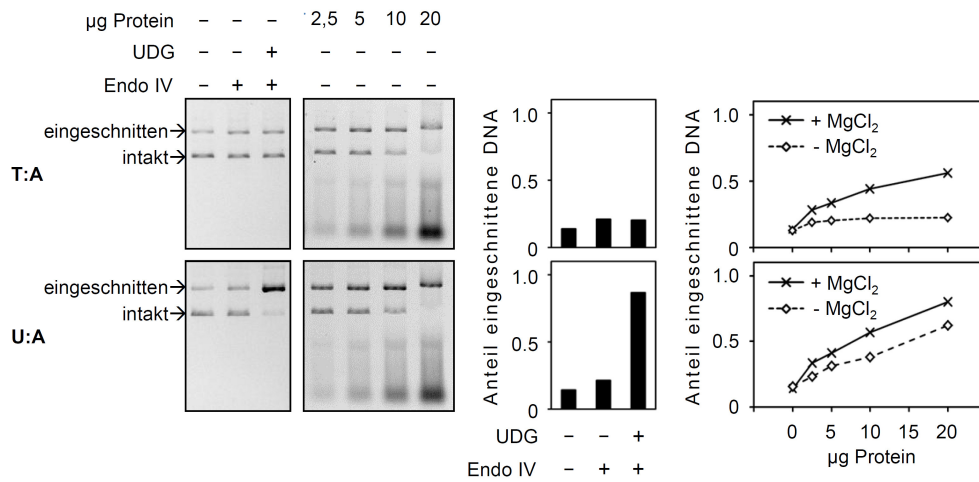


Abbildung 3-12 Einfluss von $MgCl_2$ auf den Einschnitt von Plasmid-Substraten, die im nicht-transkribierten DNA-Strang ein einzelnes Thymin oder Uracil gepaart mit Adenin enthalten (T:A oder U:A). Die Reaktion erfolgte in Anwesenheit von 10 mM $MgCl_2$ mit HeLa-Zellextrakte, die mit dem shRNA-Leervektor stabil transfiziert worden waren. Der Anteil an eingeschnittener DNA wurde zwischen Ansätzen, bei denen $MgCl_2$ zugesetzt wurde (durchgezogene Linie), und solchen, bei denen kein Magnesium zugegeben wurde (gestrichelte Linie), verglichen.

Die Befürchtung, dass die endogen aktiven AP-Endonukleasen möglicherweise bei den verwendeten Bedingungen nicht alle durch die Glykosylasen generierte AP-Läsionen in Einzelstrangbrüche überführen und diese damit der Detektion entgehen, sollte mit einem weiteren Einschnitts-Assay untersucht werden. Bei diesem wurde zusätzlich Endonuklease IV aus *E. coli* beigemischt, welches über eine AP-Endonuklease verfügt und kein Magnesiumchlorid benötigt. Der Anteil an eingeschnittener DNA in Anwesenheit eines U:A-Basenpaars konnte dadurch jedoch nicht erhöht werden (**Abbildung 3-13**), was verdeutlicht, dass die in den Extrakten endogen vorhandene AP-Endonuklease-Aktivität ausreichend ist, um an allen generierten apyrimidinische Stellen den DNA-Strang einzuschneiden.

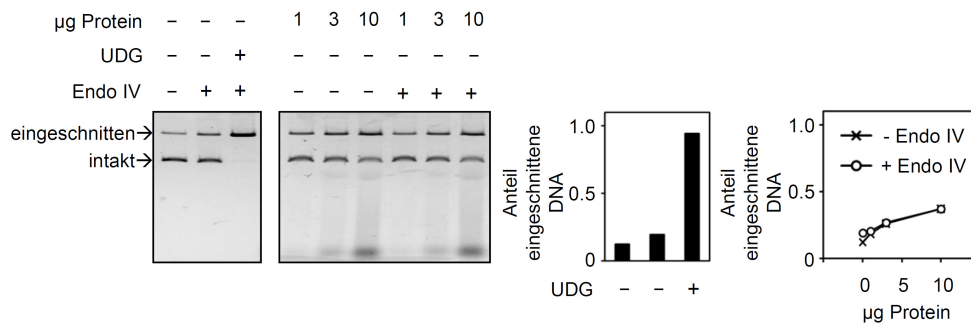


Abbildung 3-13 Einfluss der Endonuklease IV auf die Einschnitts-Aktivität von Zellextrakten gegenüber U:A-Basenpaar-enthaltenden Vektoren. Die Plasmide mit einem im nicht-transkribierten DNA-Strang gelegenen Uracil wurden mit Extrakten aus HeLa-Zellen, die mit dem leeren shRNA-Expressions-Vektor transfiziert worden waren, inkubiert und elektrophoretisch im EtBr-haltigen Agarose-Gel getrennt. Es wurde der Anteil an eingeschnittener DNA aus den Ansätzen, die unbehandelt waren (Kreuze), mit solchen, denen Endonuklease IV (Endo IV) hinzugegeben wurde (weiße Kreise), verglichen.

3.3.2.2 Einfluss des Knockdowns einzelner UDGs auf die Einschnitts-Aktivität von HeLa-Zellextrakten gegenüber den Uracil-enthaltenden Reporter-Vektoren

Nach der Erkenntnis, dass die konstruierten Vektoren zur Untersuchung der Glykosylase-Aktivität geeignet sind, wurde untersucht, in wie weit der Knockdown der UNG1/2-, SMUG1- und TDG-DNA-Glykosylasen Einfluss auf die Uracil-Exzisions-Aktivität in den Zellextrakten besitzt. Dies sollte einen Hinweis darauf geben, welche der UDGs für die Prozessierung von Uracil, vorkommend in einem U:A-Basenpaar oder einer U:G-Fehlpaarung, in den Zellen verantwortlich ist. Zu diesem Zweck, wurden Uracil-enthaltene Plasmide mit Zellextrakten aus HeLa-Zellen, deren Expression der UNG1/2-, SMUG1- oder TDG-Glykosylase mittels shRNA permanent verringert worden waren, inkubiert. Während die Substrate mit einem Uracil (U:A und U:G) proportional zur eingesetzten Menge an Extrakt eingeschnitten werden, bleibt das Substrat ohne Uracil (T:A) intakt (**Abbildung 3-14**). Dies zeigt erneut, dass dieses System zur Untersuchung der UDG-Aktivität geeignet ist und keine unspezifische Endonuklease-Aktivität in den Extrakten detektiert werden kann. Die Einschnitts-Aktivität gegenüber einem Plasmid mit einem U:A-Basenpaar wird durch den Knockdown des UNG-Gens stark verringert, so dass mindestens 4-mal so viel Extrakt der UNG1/2-Knockdown-Zelllinie eingesetzt werden muss, um eine annähernd gleiche Inzision wie bei der Kontroll-Zelllinien (no sh) zu erhalten (**Abbildung 3-14**). Dagegen hatte weder der SMUG1- noch der TDG-Knockdown Einfluss auf die Inzision des Substrates, das ein U:A-Basenpaar besitzt. Dieses Ergebnis bestätigt UNG1/2 als Hauptglykosylasen bei der Prozessierung von U:A-Basenpaaren, was mit bereits veröffentlichten Publikationen übereinstimmt (Kavli et al., 2002), (Visnes et al., 2008).

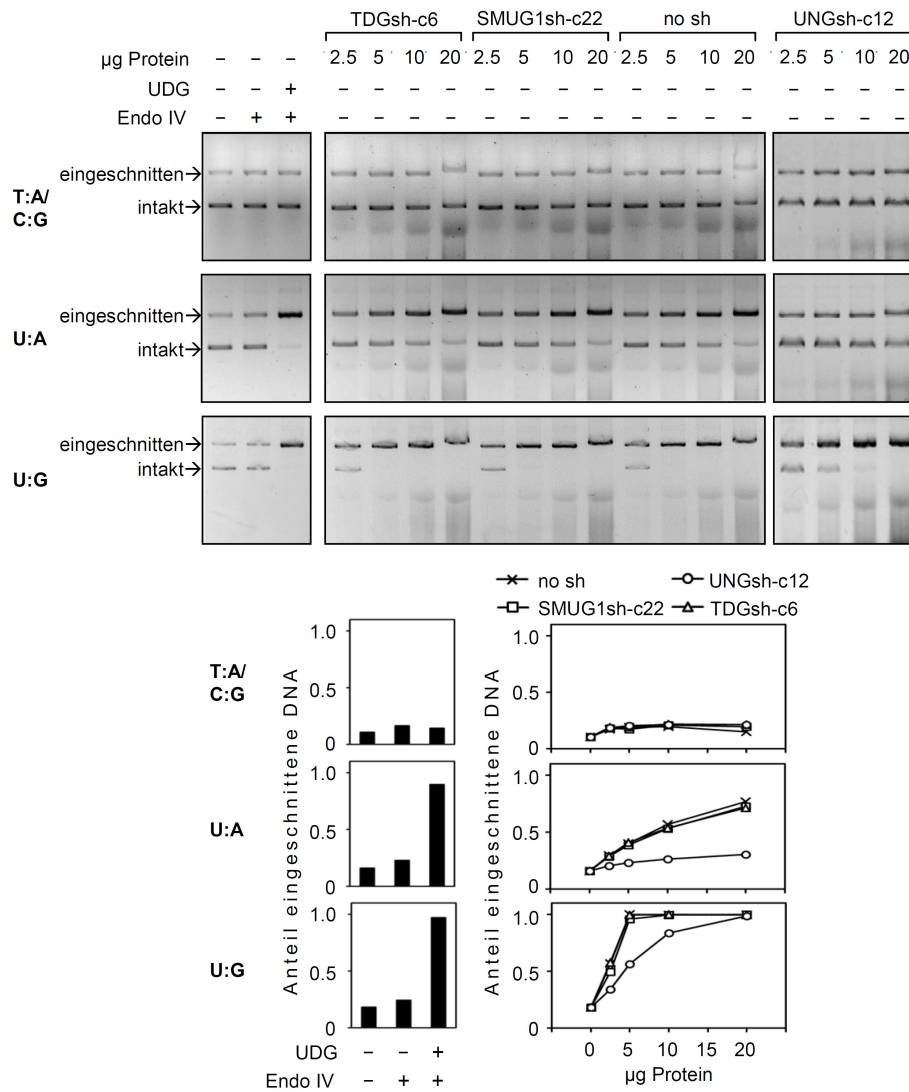


Abbildung 3-14 Einfluss des Knockdowns einzelner UDGs auf den Einschnitt der Plasmid-DNA, die ein einzelnes Uracil im nicht-transkribierten DNA-Strang enthält. EtBr-haltige Agarose-Gele (oben) und Analyse des Anteils der eingeschnittenen DNA (unten) von Plasmiden, die ein einzelnes U:A-Basenpaar oder eine einzelne U:G-Fehlpaarung besitzen, nach Inkubation mit Zellextrakten aus HeLa-Klonen, die mit dem UNG1/2-, SMUG1- oder TDG-shRNA-Konstrukt (UNGsh-c12, SMUG1sh-c22 oder TDGsh-c6) oder dem Leervektor (no sh) stabil transfiziert wurden. Als Kontrolle diente das unmodifizierte Plasmid-Konstrukt (T:A/C:G). Adaptiert aus (Lühnsdorf et al., 2014).

Die Inzision der U:G-Fehlpaarung ist in den Extrakten viel effizienter als die des U:A-Basenpaares und erreicht schon bei einer niedrigen Proteinkonzentration (5 µg) eine Sättigung (**Abbildung 3-14**). Auch die Stärke des Einschnitts der U:G-Fehlpaarung ist unabhängig von der vorhandenen Proteinmenge der SMUG1- oder TDG-Glykosylase in den Extrakten, wird aber bei verringerter Expression des UNG-Gens in den Zellen abgeschwächt. Dieser Effekt ist jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als es bei dem U:A-enthaltenen Substrat der Fall ist. Damit trägt diese Glykosylase zur Exzision von Uracil, wenn es fehlgepaart mit Guanin vorliegt, bei, ist aber nicht das einzige relevante Enzym zur

Entfernung dieser Läsion. Ebenso wird in der Literatur UNG2 als wichtigste Glykosylase zur Prozessierung von U:G-Fehlpaarungen beschrieben, auch wenn im Gegensatz zu dem U:A-Basenpaar noch die Beteiligung anderer UDGs (SMUG1, TDG) nachgewiesen werden konnte (Visnes et al., 2008). Da die 2-fache Menge des Extraktes aus den UNG1/2-Knockdown-Zellen (15/24 % UNG1/2 Restexpression) benötigt wird, um eine der Kontroll-Zelllinie vergleichbare Einschnitts-Aktivität gegenüber dem U:G-enthaltenen Substrat zu erzielen, lässt sich schließen, dass UNG1/2 in diesem Kontext ungefähr 2-mal so aktiv wie die Summe aller anderen UDGs ist. Diese Berechnung ergibt sich aus der **Formel 3-1** wenn man berücksichtigt, dass die verbleibende Expression von UNG1/2 in den Knockdown-Zellen maximal 24 % beträgt (**Abbildung 3-9, B**).

$$U + X = 2 \times (0,24 U + X)$$

$$\rightarrow X = 0,52 U$$

Formel 3-1 Berechnung der Aktivität von UNG1/2 (U) und der anderen UDGs (X) gegenüber der U:G-Fehlpaarung. Es wird die 2-fache Menge des Extraktes des UNG1/2-Knockdown-Klons (rechte Seite) benötigt, um die gleiche Einschnitts-Aktivität wie das Extrakt der Kontroll-Zelllinie (linke Seite) zu erzielen. Der Faktor 0,24 beruht darauf, dass der Knockdown-Klon eine verbleibende UNG1/2-Expression von maximal 24 % aufweist.

3.3.2.3 Einfluss des Knockdowns einzelner UDGs auf die Genexpression der U:A-Basenpaar-enthaltenen Reporter-Vektoren in HeLa-Zellen

Da UNG1/2 in den Zellextrakten wahrscheinlich die einzige Glykosylase ist, die für die Exzision von Uracil aus einem U:A-Basenpaar verantwortlich ist (**Abbildung 3-14**), sollte untersucht werden, ob diese UDG auch bei der Abnahme der Genexpression der Uracil-enthaltenen Reporter-Vektoren eine Rolle spielt. Hierfür wurden Vektoren, die ein U:A-Basenpaar innerhalb des EGFP-Gens enthalten in HeLa-Zellen mit reduzierter UNG1/2-Expression transfiziert und die EGFP-Expression in den Zellen als Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie gemessen. In keiner der Zelllinien konnte kurze Zeit nach der Transfektion eine unterschiedliche Expression zwischen den Zellen, die mit U:A-enthaltenen Vektoren oder mit den Kontroll-Plasmiden (T:A) transfiziert worden waren, beobachtet werden (**Abbildung 3-15**). Dies verdeutlicht einmal mehr, dass Uracil nicht direkt die Transkriptions-Maschinerie blockieren kann. Nach 12-stündiger Inkubation der Vektoren in den Host-Zellen nahm die Expression des EGFP-Gens der U:A-enthaltenen Plasmide in allen Zelllinien in Relation zum Referenz-Plasmid deutlich ab. Die Positionierung von Uracil im transkribierten oder nicht-transkribierten DNA-Strang hatte keinen Einfluss auf die Stärke des negativen Effektes. Dagegen war diese jedoch abhängig von der Menge an UNG1/2 in den Zellen und nahm mit abnehmender Expression der Glykosylase ab. So war die EGFP-Fluoreszenz in der Kontroll-Zelllinie, die nur mit dem

leeren shRNA-Vektor transfiziert worden war (no sh), um ca. 50 % verringert, während in den HeLa-Zellen mit dem besten UNG1/2-Knockdown (UNGsh-c12) die Expression lediglich um 25 % abgenommen hatte. In der Zelllinie mit intermediären UNG1/2-Expressionsleveln (UNGsh-c6) wurde die Transkription durch ein U:A-Basenpaar um 40 % reduziert. Dieses Ergebnis zeigt ganz deutlich, dass der negative Effekt eines U:A-Basenpaares auf die Genexpression durch die Exzision der Basenmodifikation durch UNG1/2 verursacht wird und somit die BER mit der Transkription von Genen zu interferieren scheint. Nichtsdestotrotz konnte in den UNG1/2-Knockdown-Zellen die Inaktivierung der Transkription nicht komplett aufgehoben werden, so dass 24 Stunden nach der Transfektion in allen Zelllinien ein gemeinsamer Tiefpunkt der Expression des U:A-enthaltenen Vektors beobachtet werden konnte. Dies kann mit der zum Teil verbleibenden UNG1/2-Aktivität in den Knockdown-Zellen erklärt werden (**Abbildung 3-9, B**).

Die trotz des Knockdowns des UNG1/2-Proteins weiterhin abnehmende Expression des U:A-Basenpaar-enthaltenen Reportergens lässt sich einerseits mit der verbleibenden UNG1/2-Aktivität in den Zellen erklären, andererseits könnte dieser Befund jedoch auch auf den Einfluss der anderen UDGs zurückzuführen sein. Selbst wenn in den zellfreien Assays zur Untersuchung der Einschnitts-Aktivität keine Beteiligung der SMUG1- oder TDG-Glykosylase gegenüber dem U:A-Substrat beobachtet werden konnte (**Abbildung 3-14**), muss dies (auch aufgrund einer niedrigeren Sensitivität des Assays) nicht mit der Inzision in vivo übereinstimmen. Deshalb sollte nun der Einfluss der anderen UDGs an der Inaktivierung der Transkription analysiert werden. Im Gegensatz zum UNG1/2-Knockdown konnte jedoch nach Transfektion der U:A-enthaltenden Plasmide in HeLa-Zellen, deren SMUG1- oder TDG-Glykosylase mittels shRNA stabil verringert worden waren, zu keinem Zeitpunkt ein Unterschied in der Expression des Reportergens in den Knockdown-Zellen gegenüber der Kontroll-Zelllinie ausgemacht werden (**Abbildung 3-16**). Diese Beobachtung zeigt, dass SMUG1 und TDG im Gegensatz zu UNG1/2 keinen bedeutenden Einfluss auf die Genexpression in Anwesenheit eines U:A-Basenpaares haben. In Übereinstimmung damit wurde auch bei Untersuchungen der Einschnitts-Aktivität der Zellextrakte die Inzision der U:A-Basenpaar-enthaltenen Plasmide fast völlig unterdrückt, sofern die Expression der UNG1/2 Glykosylase verringert war, während der TDG- und SMUG1-Knockdown keine Auswirkungen besaß (**Abbildung 3-14**).

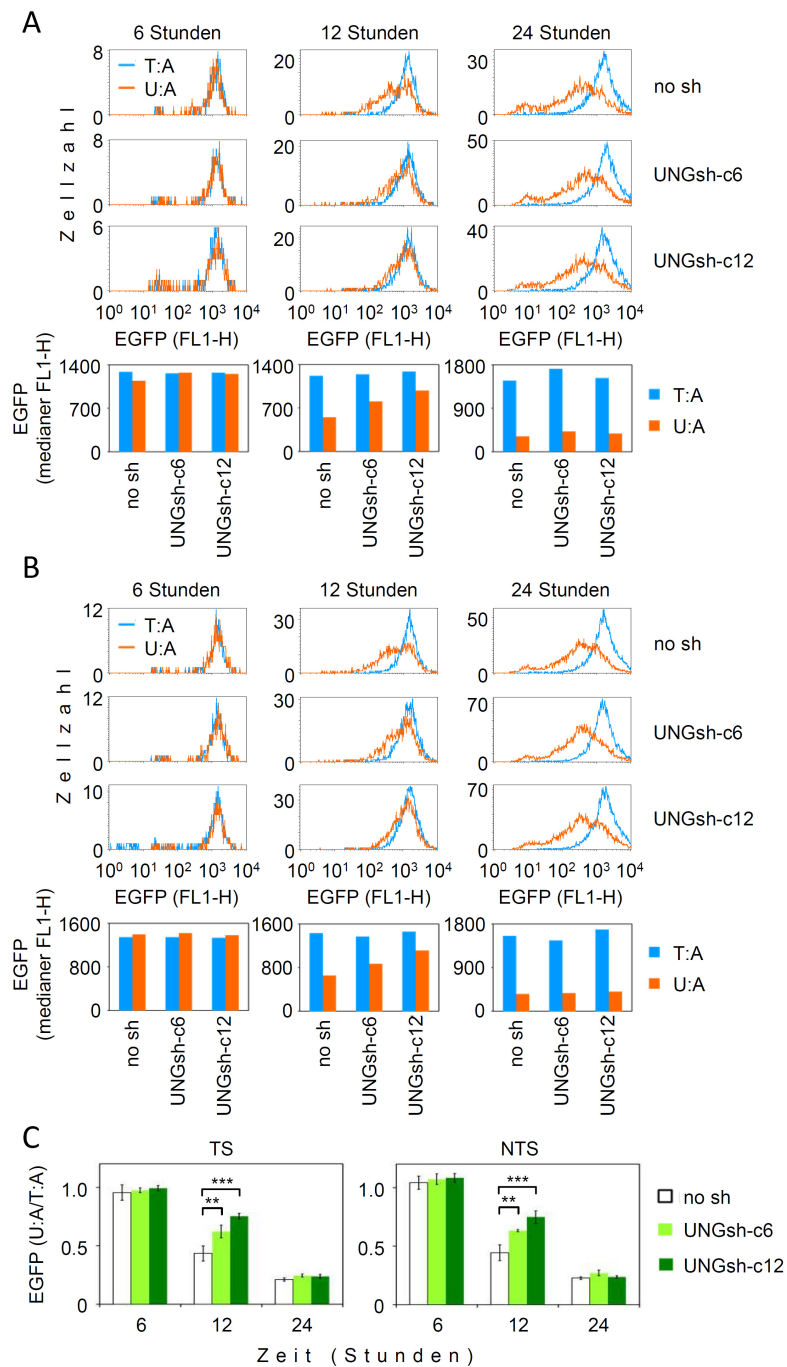


Abbildung 3-15 Einfluss des UNG1/2-Knockdowns auf die Expression eines Reportergens, das ein einzelnes U:A-Basenpaar enthält. Durchflusszytometrische Analyse zweier UNG-shRNA exprimierender HeLa-Klone (UNGsh-c6 und UNGsh-c12) und des Kontroll-Klons (no sh), die mit dem EGFP-Reporterkonstrukt, das ein einzelnes Uracil im transkribierten (A) oder im nicht-transkribierten DNA-Strang (B) enthält, transfiziert wurden. Das Kontroll-Konstrukt enthält Thymin (T:A). (A und B) Überlagerte Verteilungs-Diagramme der EGFP-Fluoreszenz pro Zelle eines repräsentativen Experiments. (C) EGFP-Expression relativ zu den mit unmodifizierten Kontroll-Plasmiden transfizierten Zellen. Mittelwerte aus 3 – 4 Experimenten mit 2 unabhängigen Plasmid-Präparationen, bei denen alle Zelllinien parallel transfiziert wurden (\pm Standardabweichung). Zweiseitig gepaarter Student's T-test: ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Adaptiert aus (Lühnsdorf et al., 2014).

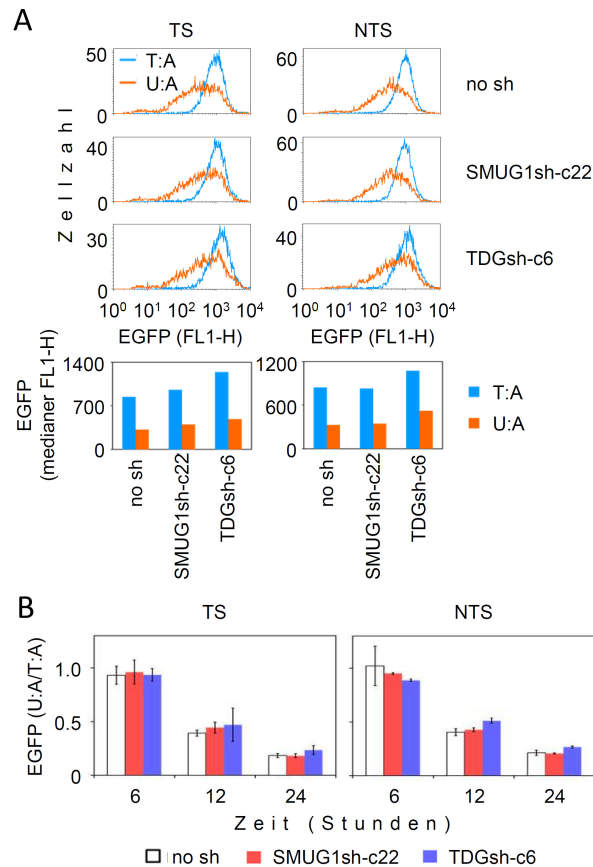


Abbildung 3-16 Durchflusszytometrische Analyse eines SMUG1- und TDG-shRNA exprimierenden HeLa-Klons (SMUG1sh-c22 und TDGsh-c6) und des Kontroll-Klons (no sh), die mit dem U:A-enhaltenen EGFP-Reporterkonstrukt, das ein einzelnes Uracil im transkribierten (TS) oder im nicht-transkribierten (NTS) DNA-Strang enthält, transfiziert wurden. Das Kontroll-Konstrukt enthält Thymin (T:A). (A) Überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Fluoreszenz pro Zelle eines repräsentativen Experiments 12 Stunden nach der Transfektion. (B) EGFP-Expression relativ zu den mit unmodifizierten Kontroll-Plasmiden transfizierten Zellen. Mittelwerte aus 2 Experimenten mit 2 unabhängigen Plasmid-Präparationen, bei denen alle Zelllinien parallel transfiziert wurden (\pm Variationsbreite). Adaptiert aus (Lühnsdorf et al., 2014).

3.3.2.4 Expression eines 5-hmU-enhaltenen Reporter-Vektors in HeLa-Zellen und der Einfluss des SMUG1-Knockdowns

Bei der Auswahl der SMUG1-Knockdown-Klone wurden lediglich die mRNA-Level als Selektionskriterium verwendet (siehe Kapitel 3.3.1), was die Frage aufwirft, in wie weit der verringerte mRNA-Transkript des SMUG1-Proteins auch den Proteinspiegel betrifft und eine funktionelle Beeinträchtigung der Glykosylase-Aktivität in den Zellen zur Folge hat. Eine Sonderstellung der menschlichen SMUG1-Glykosylase gegenüber den anderen UDGs besteht darin, dass sie eine starke Aktivität gegenüber der DNA-Basenmodifikation 5-Hydroxymethyluracil (5-hmU) besitzt und für dessen Entfernung wohl alleine zuständig ist (Masaoka et al., 2003). Dieses BER-Substrat eignet sich somit hervorragend, um die SMUG1-Aktivität in den Knockdown-Zellen zu überprüfen. Unter

Verwendung der Strang-Austausch-Reaktion, die sich bereits zur Konstruktion der U:A-enthaltenen Plasmide bewährt hatte (siehe Kapitel 3.1.1) wurden von Julia Allgayer Reporter-Vektoren konstruiert und zur Verfügung gestellt, die drei 5-hmUs innerhalb der 5'-UTR des EGFP-Gens besaßen und mit Adeninen des Nachbarstranges Basenpaare ausbildeten (3× 5-hmU:A) (**Abbildung 3-17, A**). Diese Modifikation wurde aus technischen Gründen in den pEGFP-mODC-ZAJ-Vektor (pZAJ) eingefügt. Dieser entspringt dem pEGFP-mODC-ZA-Vektor, unterscheidet sich aber in einer Punktmutation weit außerhalb des P_{CMV} -Promotors und des transkribierten Bereiches. In Zellextrakten konnte jedoch keine Inzision des 5-hmU-enthaltenen Vektors detektiert werden (getestet von Julia Allgayer). Dies ist einer zu geringen Sensitivität des Assays bzw. zu niedriger Aktivität der SMUG1-Glykosylase in den Extrakten gegenüber dem 5-hmU:A-Substrat geschuldet (Kavli et al., 2002). Sollte die Prozessierung des BER-Substrates 5-hmU durch die SMUG1-Glykosylase eine Abnahme der Genexpression verursachen, so würde man durch den Knockdown des Enzyms eine stärkere Transkription des Reporter-Vektors erwarten. Um den funktionellen Knockdown der SMUG1-Glykosylase zu überprüfen, wurde der 5-hmU-enthaltene Reporter-Vektor deshalb in Zellen mit unterschiedlichem mRNA-Transkript-Leveln des SMUG1-Gens transfiziert. Die Expressionsanalyse ergab, dass kurze Zeit nach der Transfektion die Transkription des 5-hmU-enthaltenen Vektors in etwa der unmodifizierten Referenz (T:A) entsprach (**Abbildung 3-17, B**). Dies zeigt, dass 5-hmU analog zu Uracil keine direkte Blockade der RNA-Polymerase II auszulösen vermag. Erst zu einem späteren Zeitpunkt ist ein negativer Effekt der Läsionen auf die Expression des Reportergens auszumachen, welcher mit längerer Inkubation der Plasmide in den Zellen zunimmt. Bemerkenswerterweise ist in allen untersuchten SMUG1-Knockdown-Klonen die Abnahme der Expression des Vektors, der die Basenmodifikationen enthält, im Vergleich zur Referenz-Zelllinie (no sh) deutlich abgeschwächt, was besonders gut bei der Betrachtung des überlagerten Verteilungs-Diagramms der EGFP-Fluoreszenz des SMUG1-Knockdown-Klons 22 (SMUG1sh-c22) und der Kontroll-Zelllinie zu erkennen ist (**Abbildung 3-17, C**). Diese Beobachtungen beweisen, dass 5-hmU nicht direkt, sondern erst der Einschnitt der Basenmodifikation durch die SMUG1-Glykosylase die Transkription zum Erliegen bringt. Zusätzlich verdeutlicht die drastische Abschwächung des negativen Effektes in den SMUG1sh-Zellen den sehr erfolgreichen SMUG1-Knockdown mit einer stark verminderten DNA-Glykosylase-Aktivität. Des Weiteren bestätigt dieses Ergebnis die frühere Aussage, dass SMUG1 zur zellulären Prozessierung der U:A-Konstrukte irrelevant ist. Andernfalls würde der Knockdown von SMUG1 auch die Stärke der Transkriptions-Inhibierung eines U:A-Basenpaars dämpfen, was offensichtlich nicht der Fall ist (**Abbildung 3-16**).

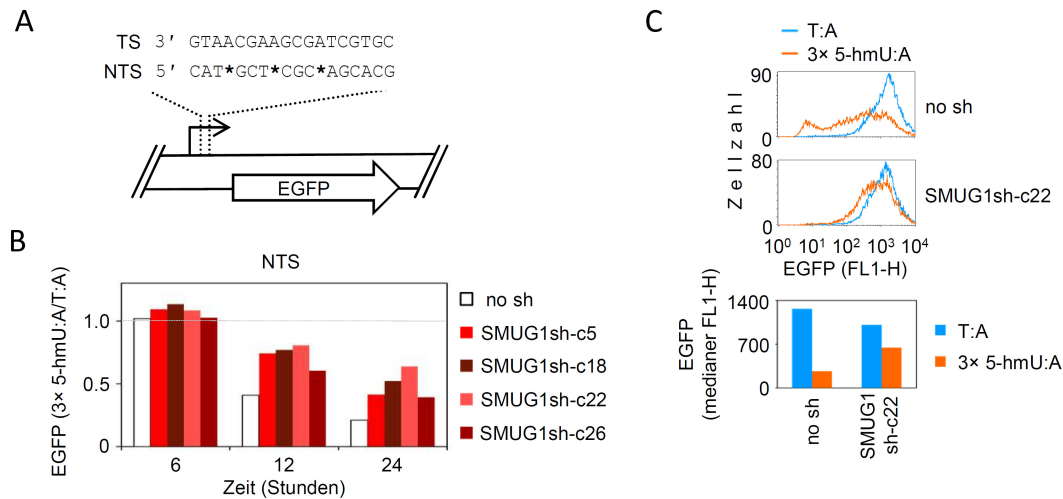


Abbildung 3-17 Einfluss des SMUG1-Knockdowns auf die Expression eines 5-hmU:A-enthaltenen Vektors in HeLa-Zellen. Durchflusszytometrische Analyse der SMUG1-shRNA-exprimierenden HeLa-Klone (SMUG1sh) und des Kontroll-Klons (no sh), die mit einem Reporter-Vektor transfiziert wurden, der drei 5-hmU:A-Basenpaare enthält (3x 5-hmU:A). (A) Position der drei 5-hmUs (**Stern**) innerhalb der 5'-UTR des nicht-transkribierten (NTS) DNA-Stranges des EGFP-Reportergens. Gezeigt sind der Startpunkt der Transkription (gebrochener Pfeil) sowie die codierende Sequenz (Pfeil). (B) EGFP-Expression relativ zu den mit unmodifizierten Kontroll-Plasmiden (T:A) transfizierten Zellen. (C) Überlagerte Verteilungs-Diagramme der EGFP-Fluoreszenz pro Zelle 24 Stunden nach der Transfektion des 5-hmU:A-enthaltenen Vektors (orange) oder des Kontroll-Vektors (blau) und die medianen Werte. Adaptiert aus (Lühnsdorf et al., 2014).

3.3.2.5 Genexpression der U:G-Fehlpaarung-enthaltenen Reporter-Vektoren in den UDG-Knockdown-Zellen

Aus den Untersuchungen der Einschnitts-Aktivität der verschiedenen UDG-Knockdown-Zellextrakten gegenüber einem Plasmid-Substrat, das eine U:G-Fehlpaarung enthält, konnte gezeigt werden, dass UNG1/2 eine wichtige Glykosylase zur Entfernung der Läsion ist, auch wenn sich nicht die gesamte Inzision der Plasmide auf sie zurückführen lässt (**Abbildung 3-14**). Um zu überprüfen, inwieweit UNG1/2 die Expression von Reporter-Vektoren, die eine U:G-Fehlpaarung enthalten, beeinflusst, wurden nun Genexpressions-Analysen in den UNG1/2-Knockdown-Zellen durchgeführt. Ähnlich zu den Wildtyp-Zellen ist auch in dem Kontroll-Klon (no sh) 6 Stunden nach der Transfektion keine Inhibierung der Transkription durch Uracil auszumachen, während mit zunehmender Inkubationszeit der Plasmide in den Zellen die Genexpression der U:G-enthaltenen Vektoren im Vergleich zu den Kontroll-Plasmiden (C:G) verringert wird (**Abbildung 3-18**). Analog dem U:A-Basenpaar ist zu erkennen, dass der negative Effekt einer U:G-Fehlpaarung auf die EGFP-Expression unabhängig davon ist, ob Uracil im transkribierten oder nicht-transkribierten DNA-Strang positioniert ist. Im Gegensatz zu der U:A-Basenpaarung konnte jedoch im Fall der U:G-Fehlpaarung kein Einfluss des UNG1/2-Knockdowns auf die Expression des EGFP-Gens beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass trotz des gefunden Einflusses der UNG1/2-Glykosylase auf die Inzision der U:G-Fehlpaarung, in vivo

eine andere UDG oder ein anderer Reparaturweg an der Prozessierung von Uracil in diesem Kontext und der damit verbundenen Inhibierung der Transkription beteiligt ist.

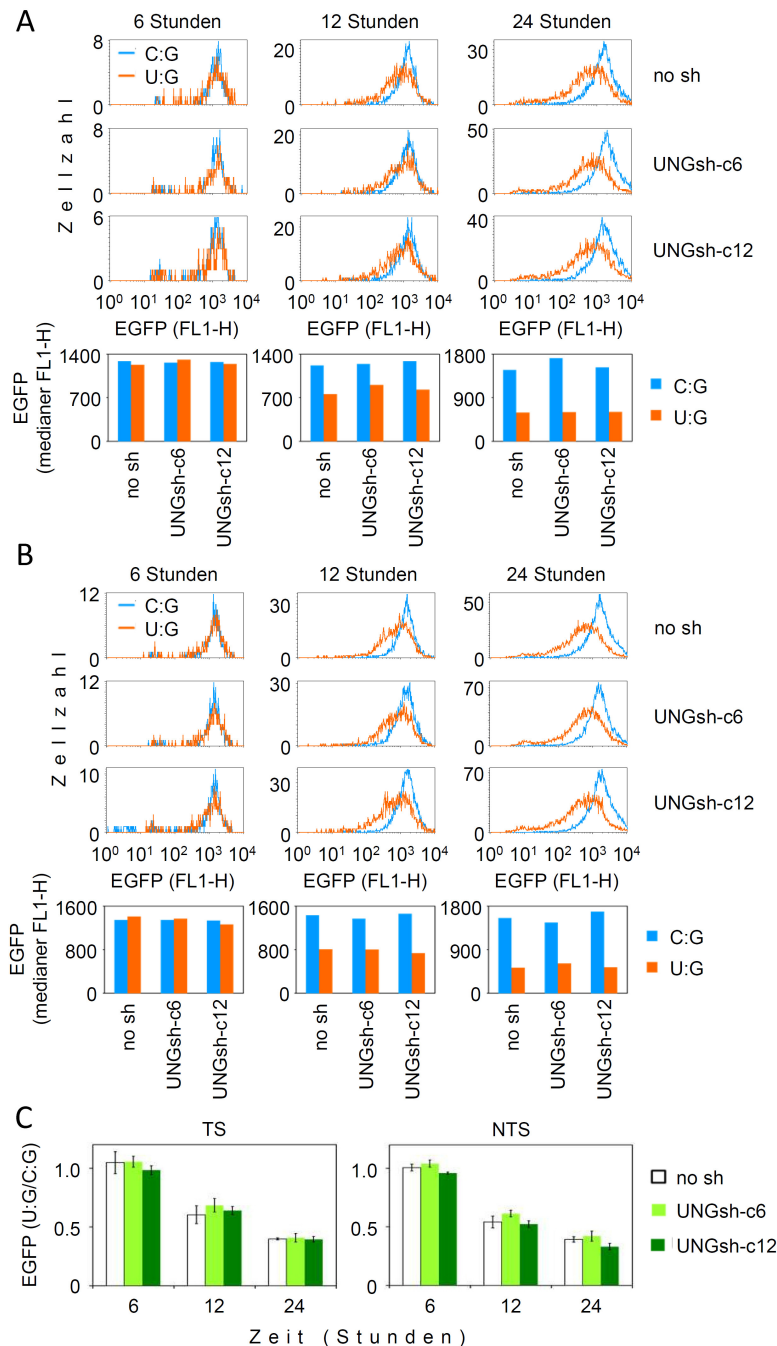


Abbildung 3-18 Einfluss des UNG1/2-Knockdowns auf die Expression eines Reportergens, das eine einzelne U:G-Fehlpaarung enthält. Durchflusszytometrische Analyse zweier UNG-shRNA exprimierender HeLa-Klone (UNGsh-c6 und UNGsh-c12) und des Kontroll-Klons (no sh), die mit dem EGFP-Reporterkonstrukt, das ein einzelnes Uracil im transkribierten (A) oder im nicht-transkribierten DNA-Strang (B) enthält, transfiziert wurden. Das Kontroll-Konstrukt enthält Cytosin (C:G). (A und B) Überlagerte Verteilungs-Diagramme der EGFP-Fluoreszenz pro Zelle eines repräsentativen Experiments. (C) EGFP-Expression relativ zu den mit unmodifizierten Kontroll-Plasmiden transfizierten Zellen. Mittelwert aus 3 – 4 Experimenten mit 2 unabhängigen Plasmid-Präparationen, bei denen alle Zelllinien parallel transfiziert wurden (\pm Standardabweichung). Adaptiert aus (Lühnsdorf et al., 2014).

Auch wenn der Knockdown der SMUG1- und TDG-Glykosylase keine Auswirkungen auf die Einschnitts-Aktivität von Zellextrakten gegenüber einem Plasmid-Substrat mit U:G-Fehlpaarung zur Folge hatte (**Abbildung 3-14**), kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine dieser Glykosylasen in den Zellen effizienter arbeitet und damit die BER-initiierte Inhibierung der Transkription bewirkt. Ebenso könnte die Sensitivität des Einschnitts-Assays nicht ausreichend sein, um die Glykosylase-Aktivität zu detektieren. Daher wurden die Expressions-Vektoren mit einer U:G-Fehlpaarung auch in die SMUG1- und TDG-Knockdown-Zellen transfiziert. Jedoch konnte auch hier, wie im Falle des UNG1/2-Knockdowns, keine Veränderung bei der Expression des modifizierten Reportergens im Vergleich zu der Kontroll-Zelllinie beobachtet werden (**Abbildung 3-19**). Demnach muss eine andere Glykosylase oder ein anderer Mechanismus für die gestörte Transkription des Reportergens im U:G-Kontext verantwortlich sein.

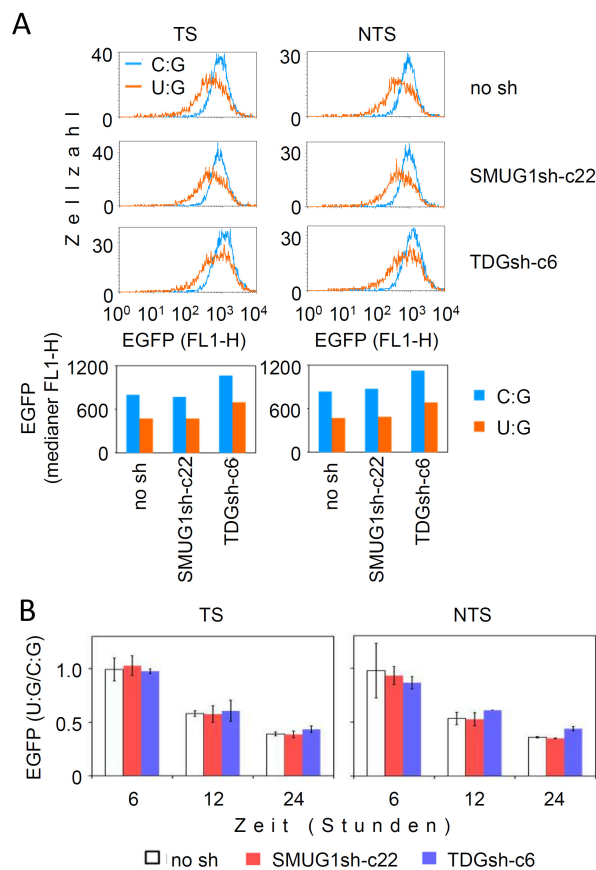


Abbildung 3-19 Einfluss des SMUG1- und TDG-Knockdowns auf die Expression eines Reportergens, das eine einzelne U:G-Fehlpaarung enthält. Durchflusszytometrische Analyse eines SMUG1- und TDG-shRNA exprimierenden HeLa-Klons (SMUG1sh-c22 und TDGsh-c6) und des Kontroll-Klons (no sh), die mit dem EGFP-Reporterkonstrukt, das ein einzelnes Uracil im transkribierten (TS) oder im nicht-transkribierten (NTS) DNA-Strang enthält, transfiziert wurden. Das Kontroll-Konstrukt enthält Cytosin (C:G). (A) Überlagerte Verteilungsdiagramme der EGFP-Fluoreszenz pro Zelle eines repräsentativen Experiments 12 Stunden nach der Transfektion. (B) EGFP-Expression relativ zu den mit unmodifizierten Kontroll-Plasmiden transfizierten Zellen. Mittelwert aus 2 Experimenten mit 2 unabhängigen Plasmid-Präparationen, bei denen alle Zelllinien parallel transfiziert wurden (Mittelwert \pm Variationsbreite). Adaptiert aus (Lühnsdorf et al., 2014).

3.3.3 Einfluss der UDGs auf die Einschnitts-Aktivität von LN428-Zellextrakten gegenüber Uracil-enthaltenden Vektoren und auf die Genexpression dieser Vektoren in LN428-Zellen

Um den negativen Einfluss der durch die UDGs eingeleiteten BER von Uracil auf die Genexpression in einem weiteren Zell-System zu überprüfen, wurden LN428-Glioblastoma-Zellen bezogen, deren Expression des UNG-, SMUG1- oder TDG-Gens mittels lentiviraler Transduktion zielspezifischer shRNA-Vektoren herabgesenkt worden war.

3.3.3.1 Nachweis des Knockdowns der einzelnen Uracil-DNA-Glykosylasen in LN428-Zellen

Zur Überprüfung der verringerten Proteinmenge von UNG1/2 und TDG in den Glioblastoma-Zellen wurden Extrakte der Knockdown-Klone mittels Western Blot analysiert (**Abbildungen 3-20, A und B**). Die Expression der UNG1/2-Glykosylase war im UNG-Knockdown-Klon (UNGsh) im Vergleich zu der Kontroll-Zelllinie (control) mehr als 6-fach verringert und auch die Menge an TDG war im entsprechenden Klon (TDGsh) 3-fach reduziert. Weil keiner der getesteten Antikörper SMUG1 spezifisch in Zellextrakten detektieren konnte, wurde der Knockdown in der SMUG1-shRNA-Zelllinie (SMUG1sh) nach Isolierung der RNA aus den Zellen und Umschreibung dieser in cDNA mittels RT-qPCR nachgewiesen (**Abbildung 3-20, C**). Im Vergleich zur Kontrolle beträgt die SMUG1-Expression in diesem Klon nur 23 %.

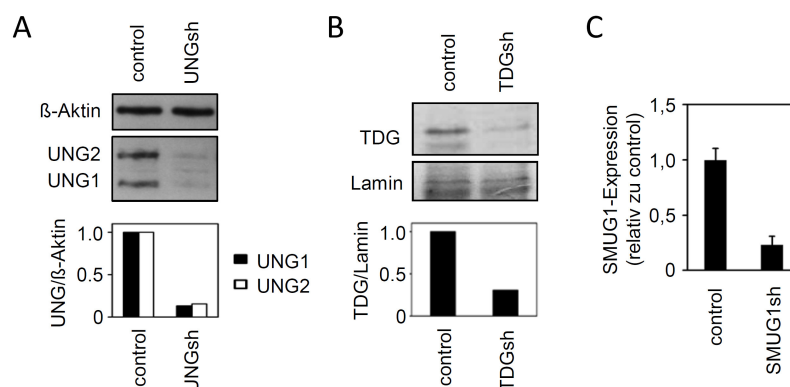


Abbildung 3-20 Nachweis des UNG1/2-, TDG- und SMUG1-Knockdowns in LN428-Zellen. Analyse von LN428-Glioblastoma-Zellen, die die UNG-, TDG- oder SMUG1-shRNA (UNGsh, SMUG1sh, TDGsh) exprimieren. (A und B) Western Blot des UNG1/2- (A) und des TDG-Proteins (B) der Zellen im Vergleich zu der LN428-Kontroll-Zelllinie (control). β -Aktin oder Lamin diente als Ladekontrolle. (C) Quantifizierung der SMUG1-mRNA-Expression mittels RT-qPCR relativ zu GAPDH und der Kontroll-Zelllinie (Mittelwerte aus 2 Versuchen jeweils in Duplikaten durchgeführt \pm Variationsbreite). Adaptiert aus (Lühnsdorf et al., 2014).

3.3.3.2 Genexpression eines 5-hmU-enhaltenen Reporter-Vektors in LN428-Zellen und der Einfluss des SMUG1-Knockdowns

Analog zur Verifizierung des SMUG1-Knockdown in den HeLa-Zellen (siehe Kapitel 3.3.2.4) wurde neben der mRNA-Analyse auch ein funktioneller Assay angewandt, um den Knockdown in den Glioblastoma-Zellen nachzuweisen. Dazu wurden Expressionsanalysen in der LN428-Zelllinie, bei der das SMUG1-Gen herunterreguliert worden war, mit Plasmiden, die drei 5-hmU:A-Basenpaare in der 5'-UTR des nicht-transkribierten DNA-Stranges des EGFP-Reportergens als spezifisches Substrat für die SMUG1-Glykosylase besitzen, durchgeführt. Die drei 5-hmU:A-Basenpaare bewirken eine zeitabhängige Abnahme der Expression des Reportergens in der Kontroll-Zelllinie, welche durch den Knockdown der SMUG1-Glykosylase fast vollständig aufgehalten werden kann (**Abbildung 3-21, A und B**). Das Ergebnis ist vergleichbar mit dem aus den HeLa-Zellen (**Abbildung 3-17**) und beweist, dass die Exzision der Basenmodifikation durch die SMUG1-Glykosylase die Abnahme der Transkription triggert. Darüber hinaus konnte die funktionelle Auswirkung des Knockdowns des SMUG1-Proteins in den LN428-Glioblastoma-Zellen nachgewiesen werden.

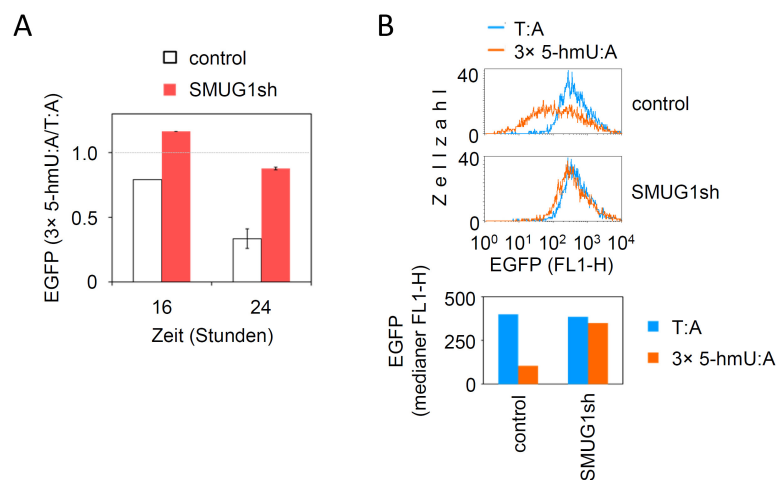


Abbildung 3-21 Einfluss des SMUG1-Knockdowns auf die Expression eines 5-hmU:A-enhaltenen Vektors in LN428-Glioblastoma-Zellen. Durchflusszytometrische Analyse der SMUG1-shRNA-exprimierenden Zelllinie (SMUG1sh) und der Kontroll-Zelllinie (control), die mit einem Reporter-Vektor transfiziert wurden, der drei 5-hmU:A-Basenpaare enthält (3x 5-hmU:A). (A) EGFP-Expression relativ zu den mit unmodifizierten Kontroll-Plasmiden (T:A) transfizierten Zellen. Mittelwerte aus 3 Versuchen \pm Standardabweichung für die Werte 24 Stunden nach Transfektion. (B) Überlagerte Verteilungs-Diagramme der EGFP-Fluoreszenz pro Zelle 24 Stunden nach der Transfektion des 5-hmU:A-enhaltenen Vektors (orange) oder des Kontroll-Vektors (blau) und die medianen Werte. Adaptiert aus (Lühnsdorf et al., 2014).

3.3.3.3 Einschnitts-Aktivität von LN428-Zellextrakten gegenüber den Uracil-enthaltenen

Reporter-Vektoren: Einfluss des Knockdowns einzelner UDGs

Durch Inkubation der Uracil-enthaltenen Plasmide mit Extrakten aus den Glioblastoma-Zellen, deren Expression der UNG1/2-, SMUG1- oder TDG-Glykosylase herabgesenkt worden war, sollte der Einfluss der jeweiligen UDG auf die Exzision von Uracil untersucht und mit den Ergebnissen aus den HeLa-stammenden Zelllinien verglichen werden. Während Substrate, die Uracil enthalten (U:A und U:G), mit zunehmender Menge an Zellextrakt eingeschnitten werden, trifft dies für die unmodifizierten Referenz-Plasmide (T:A/C:G) nicht zu, was ein Beweis dafür ist, dass keine unspezifische Endonuklease aktiv ist (**Abbildung 3-22**). Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Plasmide besser eingeschnitten werden, wenn Uracil fehlgepaart mit Guanin vorliegt, als wenn es ein Basenpaar mit Adenin bildet. Sowohl für das U:A-Basenpaar als auch für die U:G-Fehlpaarung bleibt die Inzision der Plasmide trotz des Knockdowns der SMUG1- oder der TDG-Glykosylase identisch mit dem, der durch Inkubation mit den UDG-profizienten Zellextrakten (control) erzielt wird. Nur der Knockdown des UNG-Gens bewirkt einen abgeschwächten Einschnitt beider Uracil-enthaltener Substrate. Abgeschätzt von der eingesetzten Proteinmenge lässt sich sagen, dass im Falle des U:A-Basenpaars die Einschnitts-Aktivität in den Extrakten der UNG-Knockdown-Zellen mindestens 4- bis 10-fach und für die U:G-Fehlpaarung mehr als 2-fach verringert ist. Alle diese Resultate entsprechen qualitativ den Ergebnissen, die mit den HeLa-Extrakten erzielt wurden (**Abbildung 3-14**) und deuten darauf hin, dass UNG1/2 an der Exzision der U:G-Fehlpaarung beteiligt, aber wohl nicht alleine für die Entfernung von Uracil in diesem Kontext zuständig ist. Außerdem bestätigen die Ergebnisse, dass UNG1/2 die bedeutendste, wenn nicht sogar einzige UDG ist, die für die Prozessierung von Uracil in einem U:A-Basenpaar verantwortlich ist.

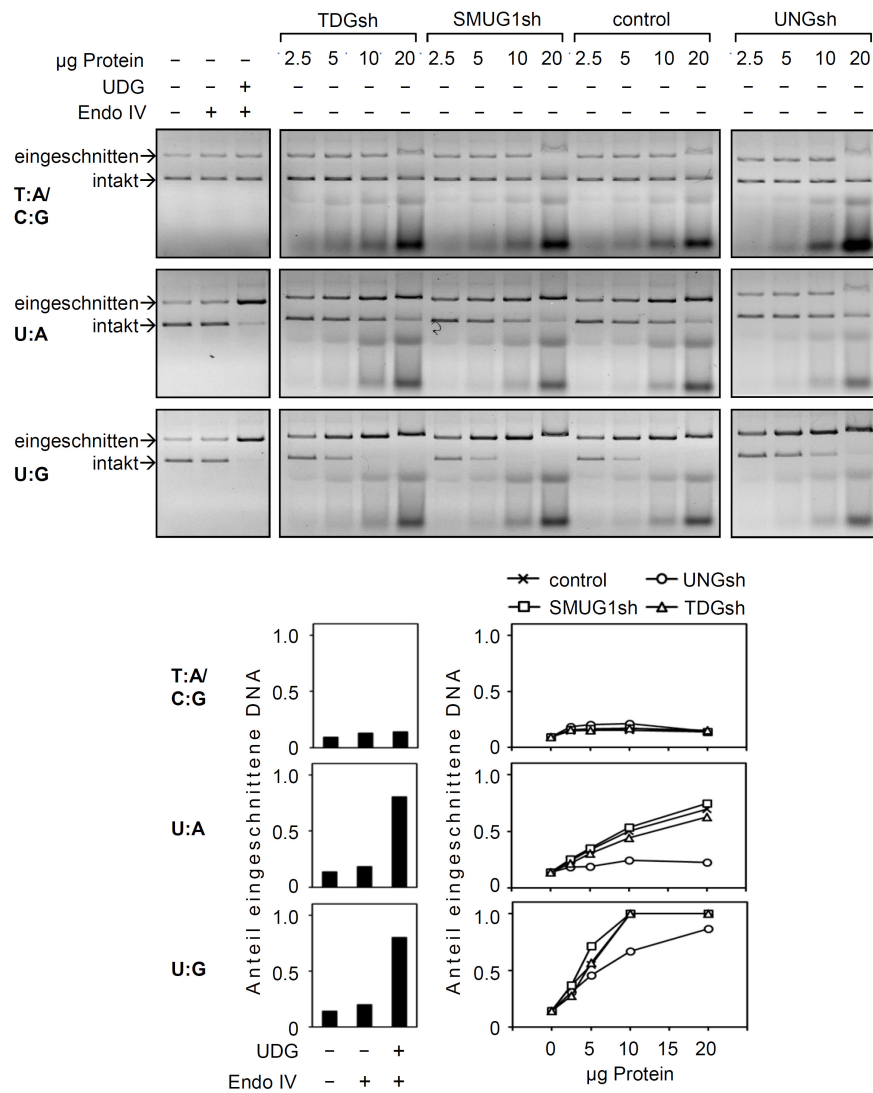


Abbildung 3-22 Einfluss der UDG-Knockdowns auf den Einschnitt der Uracil-enthaltene Plasmid-DNA in LN428-Glioblastoma-Zellen. EtBr-haltige Agarose-Gele (oben) und Analyse des Anteils der eingeschnittenen DNA (unten) von Plasmiden, die ein einzelnes U:A-Basenpaar oder eine einzelne U:G-Fehlpaarung besitzen, nach Inkubation mit Zellextrakten aus LN428-Zellen, deren Expression der UNG1/2-, SMUG1- oder TDG-DNA-Glykosylase (UNGsh, SMUG1sh, TDGsh) mittels shRNA herabgesenkt wurde, und der LN428-Kontroll-Zelllinie (control). Als Kontrolle diente das unmodifizierte Plasmid-Konstrukt (T:A/C:G). Adaptiert aus (Lühnsdorf et al., 2014).

3.3.3.4 Genexpression der Uracil-enthaltene Reporter-Vektoren in LN428-Zellen: Einfluss des Knockdowns einzelner UDGs

Da auch in den LN428-Glioblastoma-Zellen eine Uracil-Exzisions-Aktivität nachgewiesen werden konnte (Abbildung 3-22), lässt sich überprüfen, ob auch in dieser Zelllinie die Exzisions der Basenmodifikation eine verminderte Expression der Uracil-enthaltene Reporter-Konstrukten bewirkt und ob die Einschnitts-Aktivität mit der abnehmenden Transkription korreliert. Genexpressions-Analysen ergaben, dass die Transkription von beiden Uracil-enthaltene Plasmiden

kurze Zeit nach der Einschleusung dieser relativ zu dem Referenz-Plasmiden (T:A, C:G) in der LN428-Kontroll-Zelllinie (control) kaum verringert war (**Abbildung 3-23**). Ein deutlich negativer Effekt auf die Expression, der sukzessiv mit zunehmender Inkubationszeit wächst, ist nach weiterer Inkubation der Plasmide in den Zellen auszumachen. Dies entspricht dem Ergebnis aus anderen Zelllinien (HeLa und MRC-5) (**Abbildung 3-6**) und bekräftigt, dass die Prozessierung der Läsion Trigger für die verringerte Expression ist.

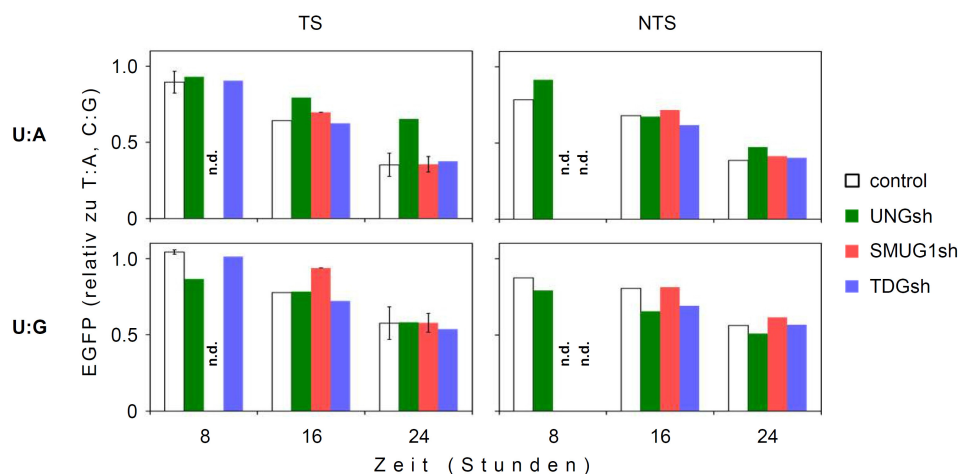


Abbildung 3-23 Einfluss des Knockdowns einzelner UDGs in LN428-Zellen auf die Expression der Uracil-enthaltenen Plasmide. Durchflusszytometrische Analyse von LN428-Zellen, deren Expression der UNG1/2-, SMUG1- und TDG-DNA-Glykosylase (UNGsh, SMUG1sh, TDGsh) mittels shRNA herabgesenkt wurde, und der LN428-Kontroll-Zelllinie (control) nach Transfektion mit dem EGFP-Reporter-Konstrukt, das ein einzelnes Uracil gepaart mit Adenin (U:A) oder fehlgepaart mit Guanin (U:G) im transkribierten (TS) oder im nicht-transkribierten (NTS) DNA-Strang enthält. EGFP-Expression relativ zu den mit unmodifizierten Kontroll-Plasmiden (T:A, C:G) transfizierten Zellen. Mittelwerte aus 2 Versuchen \pm Variationsbreite für den TS von control und SMUG1sh nach 8 und/oder 24 Stunden (3 Versuche control, U:A \pm Standardabweichung). n.d. = nicht bestimmt.

Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob analog der HeLa-entstammenden Zellen (siehe Kapitel 3.3.2) eine der Glykosylasen der Auslöser für die abnehmende Transkription in den LN428-Zellen darstellt, wurden die Uracil-enthaltenen Vektoren in die UNG-, SMUG1- und TDG-Knockdown Zellen transfiziert. Doch weder der SMUG1- noch der TDG-Knockdown beeinflusst die zeitabhängige Abnahme der Transkription der Uracil-enthaltenen Vektoren (**Abbildung 3-23**). Ebenso hat der UNG-Knockdown auch in der Glioblastoma-Zelllinie keinerlei Auswirkungen auf die Expression der U:G-enthaltenen Vektoren. Das lässt sich damit erklären, dass trotz des Einflusses der UNG1/2 auf die Exzision der Läsion in Versuchen mit Zellextrakten in vivo ein anderer Prozessierungsweg eine entscheidende Rolle spielen muss. In den UNG-Knockdown-Zellen verläuft die Abnahme der EGFP-

Expression des U:A-enhaltenen Plasmids verlangsamt ab, sofern Uracil im transkribierten DNA-Strang positioniert ist. Dies zeigt, dass erst die Exzision von Uracil durch UNG1/2 der Auslöser für die inhibierte Transkription ist. Warum der Einfluss des UNG-Knockdowns bei Positionierung der Läsion im nicht-transkribierten Strang kaum erkennbar ist, bleibt fraglich. Eine strangspezifische und damit sequenzabhängige Exzision von Uracil in Abwesenheit von UNG1/2 lässt sich nicht gänzlich ausschließen, auch wenn in Einschnitts-Assays mit UNG-Knockdown-Extrakten unabhängig von der Lokalisierung des Uracils nahezu keine verbleibende Inzision des U:A-enhaltenen Plasmides beobachtet werden konnte (**Abbildung 3-24**). Eine mögliche Erklärung wäre, dass trotz der sequenzunabhängigen Inzision in den Extrakten, in der Zelle in Anwesenheit der Transkription die DNA-Stränge unterschiedlich eingeschnitten werden. Abgesehen davon stimmen die Ergebnisse aus den LN428-Glioblastoma-Zellen jedoch mit denen, die aus den UDG-defizienten HeLa-Zellen erhalten wurden, überein (siehe Kapitel 3.3.2) und bestätigen, dass die Initiierung der BER von Uracil der Hauptauslöser für die verringerte Transkription des Reportergens ist.

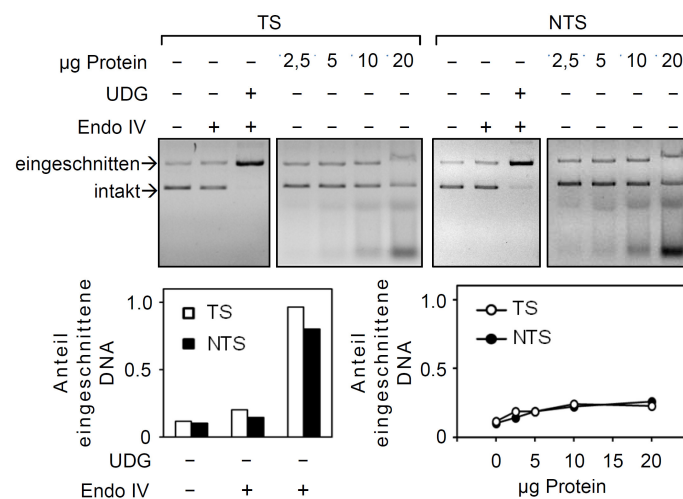


Abbildung 3-24 Einfluss der Position von Uracil auf die Einschnitts-Aktivität von LN428-Zellextrakten, deren UNG-Genexpression mittels shRNA herabgesenkt wurde. EtBr-haltige Agarose-Gele (oben) und Analyse des Anteils der eingeschnittenen DNA (unten) von Plasmiden, die ein einzelnes U:A-Basenpaar besitzen, nach Inkubation mit den Extrakten. Uracil war entweder im transkribierten (TS, weiß) oder nicht-transkribierten (NTS, schwarz) Strang platziert.

3.4 Einfluss der AP-Endonuklease 1 auf die Genexpression der Uracil-enhaltenen Reporter-Vektoren in HeLa-Zellen

Da Uracil selbst keine Blockade der RNA-Polymerase auszulösen vermag und es somit erst nach der Exzision von Uracil (und auch 5-hmU) durch die prozessierende UDG zur Inhibierung der

Transkription kommt (siehe Kapitel 3.3), wurde untersucht, welche Rolle die menschliche AP-Endonuklease 1 (APE1) bei der Inaktivierung des Reportergens spielt. Die APE1-Endonuklease ist Bestandteil der BER und katalysiert den Einschnitt der DNA am 5'-Ende der durch den Einsatz der monofunktionellen Glykosylasen entstandenen AP-Läsion. Aus in vitro-Versuchen existieren sowohl Belege für einen Stop der RNA-Polymerase beim Auftreffen auf eine AP-Läsion (Tornaletti et al., 2006), als auch Berichte, die das Gegenteil von einem AP-Analogen proklamieren (Kuraoka et al., 2003). Aus in vivo-Versuchen, die dieser Arbeit vorangegangen sind, konnte beobachtet werden, dass eine AP-Läsion keine Blockade der Transkription bewirken kann. So wurde nach Transfektion von Vektoren, die eine spezifisch positionierte apyrimidinische Stelle innerhalb eines Reportergens besitzen, keine verringerte Genexpression kurze Zeit nach der Einschleusung der Plasmide in die Zellen beobachtet (Lühnsdorf, 2010). Analog der Uracil-enthaltenen Vektoren nahm die Transkription des Reportergens erst mit zunehmender Inkubationszeit und unabhängig von der Position der Läsion (transkribierter oder nicht-transkribierter DNA-Strang) in den HeLa-Host-Zellen ab. Dementsprechend triggert womöglich erst die Prozessierung der AP-Läsion durch die Endonuklease die verringerte Genexpression. Um diese Vermutung zu untersuchen, wurden Experimente mit dem APE1-Inhibitor 7-Nitroindol-2-carboxylsäure (NCA) durchgeführt. Dieser sollte nach einem Bericht von Madhusudan et al. in vitro die Endonuklease-Aktivität in HeLa-Zellextrakten inhibieren ($IC_{50} = 3 \mu\text{M}$) und in menschlichen Zellen (HT1080) eine Akkumulation von AP-Läsionen sowie eine erhöhte Empfindlichkeit der Zellen gegenüber alkylierenden Agentien vermitteln (Madhusudan et al., 2005).

3.4.1 Einfluss des APE1-Inhibitors 7-Nitroindol-2-carboxylsäure auf das Wachstum und Überleben der HeLa-Zellen

Um eine Grenzkonzentration des APE1-Inhibitors für die Versuche zu bestimmen, in dem weder das Wachstum noch das Überleben der Zellen eingeschränkt wird, wurden HeLa-Zellen mit einer Konzentrationsreihe von NCA für 24 Stunden inkubiert. Dabei ließ sich erst ab einer Konzentration von $300 \mu\text{M}$ ein stark negativer Effekt auf die Zellzahl ausmachen (**Abbildung 3-25**).

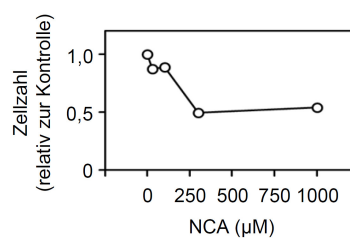


Abbildung 3-25 Einfluss des APE1-Inhibitors auf das Wachstum und/oder Überleben von HeLa-Zellen. Zellzahl nach 24-stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen (30, 100, 100, 1.000 μM) des APE1-Inhibitor (7-Nitroindol-2-carboxylsäure, NCA) relativ zu den Zellen, die nur mit dem Lösungsmittel inkubiert wurden.

3.4.2 Einfluss des APE1-Inhibitors auf die Genexpression der Uracil-enthaltenen Reporter-Vektoren in HeLa-Zellen

Sollte nicht die Exzision von Uracil durch die Glykosylase sondern erst der Einschnitt des DNA-Stranges der downstream-arbeitenden AP-Endonuklease 1 der Auslöser für die abnehmende Genexpression der modifizierten Reporter-Vektoren sein, müsste der Inhibitor dem entgegenwirken. So wurden HeLa-Zellen mit Plasmiden, die eine U:G-Fehlpaarung im EGFP-Gen besitzen, in Anwesenheit unterschiedlicher NCA-Konzentrationen (30 – 1.000 μM) zusammen mit dem pDsRed-Vektor (als Marker für transfizierte Zellen) transfiziert und die Expression des Reportergens mittels Durchflusszytometrie analysiert. Aus den Dot-Blot-Diagrammen der EGFP- und DsRed-Fluoreszenzen der Zellen ist ersichtlich, dass ab dem toxischen Konzentrationsbereich (ab 300 μM) des Inhibitors, beide Fluoreszenzen der nicht-transfizierten Zellen (linker unterer Quadrant) deutlich beeinflusst werden und diese nun im linken oberen und teilweise auch im rechten oberen Quadranten der Dot-Blots auftauchen (**Abbildung 3-26, A**). Durch die Verschiebung der nicht-transfizierten Zellen zu höheren Fluoreszenzen hin, wurde zur Auswertung dieses Versuches ein höherer Grenzwert der Fluoreszenz des roten Kanals (FL2-H) gewählt (Grenzwert 100), um ausschließlich die EGFP-Fluoreszenz transfizierter Zellen zu analysieren (siehe Kapitel 2.2.10.2). Ein Einfluss des APE1-Inhibitors auf die Expression des Plasmids, bei dem Uracil im nicht-transkribierten DNA-Strang lokalisiert ist und mit Guanin eine Fehlpaarung bildet, ist jedoch nicht zu erkennen (**Abbildung 3-26, B**). Unabhängig von der Konzentration des eingesetzten Inhibitors ist die Expression des Vektors, der eine U:G-Fehlpaarung besitzt, im Vergleich zu dem Kontroll-Plasmid (C:G) um ca. 50 % reduziert.

Neben der U:G-Fehlpaarung wurde auch der Einfluss des APE-1 Inhibitors auf die negativen Auswirkungen, die ein einzelnes U:A-Basenpaar auf die Genexpression ausübt, untersucht. Für diesen Versuch wurde mit einer NCA-Konzentration von 200 μM gearbeitet. Bei dieser sollte nur ein geringer Einfluss auf das Wachstum und/oder Überleben der Zellen zu erwarten sein und die Fluoreszenzen der Zellen unbeeinflusst bleiben. In HeLa-Zellen konnte jedoch auch bei der Transfektion der Plasmide, die ein U:A-Basenpaar enthalten, keine erhöhte Transkription durch Zugabe des Inhibitors im Vergleich zu der Kontrolle beobachtet werden (**Abbildung 3-27**). Diese Ergebnisse deuten entweder darauf hin, dass das Prozessieren von Läsionen durch die APE1 doch keine Inhibierung der Transkription nach sich zieht oder dass der Inhibitor keine Wirkung besitzt. Letzteres scheint wahrscheinlicher zu sein, da auch in vitro-Assays aus einem anderen Labor an der Qualität des APE1-Inhibitors zweifeln lassen (Bapat, Fishel & Kelley, 2009). Auf einen stabilen Knockdown des Enzyms wurde verzichtet, da die AP-Endonuklease 1 neben der DNA-Reparatur noch an zahlreiche weiteren wichtigen Funktionen in der Zelle beteiligt ist (Li & Wilson, 2014) und ein zu großer Eingriff in die zellulären Prozesse vermieden werden sollte.

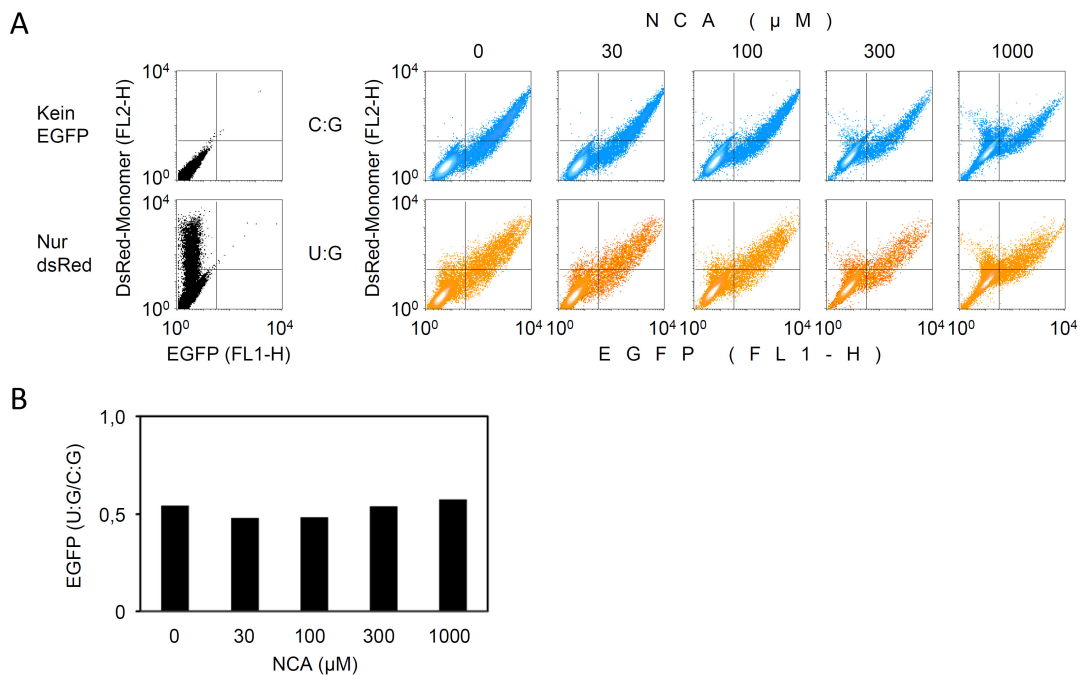


Abbildung 3-26 Expression von Reporter-Vektoren mit einer U:G-Fehlpaarung in Anwesenheit von 7-Nitroindol-2-carboxylsäure (NCA). Durchflusszytometrische Analyse von HeLa-Zellen nach Transfektion von Plasmiden, bei denen ein Uracil (U:G) oder Cytosin (C:G) im nicht-transkribierten DNA-Strang innerhalb des EGFP-Gens positioniert ist. Der Inhibitor wurde in Konzentrationen von 30, 100, 300 und 1.000 μM hinzugegeben. (A) Durch Co-Transfektion mit dem DsRed-Vektor konnten Dot-Blot-Diagramme der beiden Fluoreszenzen in den Zellen 24 Stunden nach der Transfektion erstellt werden. (B) EGFP-Fluoreszenz der mit dem U:G-enthaltenen Plasmid transfizierten Zellen relativ zu solchen, die das Kontroll-Plasmid (C:G) exprimieren, 24 Stunden nach der Transfektion.

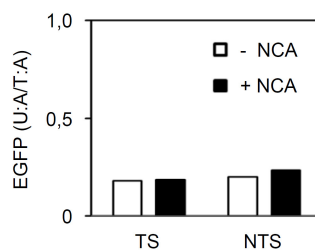


Abbildung 3-27 Expression von Vektoren, die ein U:A-Basenpaar enthalten, in Anwesenheit des APE1-Inhibitors 7-Nitroindol-2-carboxylsäure (NCA). Durchflusszytometrische Analyse von HeLa-Zellen nach der Transfektion von Plasmiden, bei denen ein Uracil entweder im transkribierten (TS) oder nicht-transkribierten (NTS) DNA-Strang innerhalb des EGFP-Gens positioniert ist. Die Transfektion erfolgte in An- und Abwesenheit von 200 μM des APE1-Inhibitor (\pm NCA) und die EGFP-Expression der mit den U:A-enthaltenen Vektoren transfizierten Zellen wurde 24 Stunden nach der Transfektion relativ zu den Zellen, in die die Kontroll-Vektoren (T:A) eingeschleust wurden, bestimmt.

3.4.3 Kontrolle der Aktivität des APE1-Inhibitors

Um die Aktivität des Inhibitors zu überprüfen, wurde ein zellfreier Einschnitts-Assay mit HeLa-Zellextrakten und den Uracil-enthaltenen Plasmiden in Anwesenheit von NCA durchgeführt. In diesem Assay wird Uracil erst durch die im Extrakt vorhandenen UDGs in eine apyrimidinische Stelle überführt, die daraufhin von den endogen aktiven Endonukleasen erkannt werden, welche die Inzision des DNA-Strangs katalysieren (siehe Kapitel 2.2.11). Weder im Falle des U:A- noch des U:G-enthaltenen Substrates wird die Einschnitts-Aktivität der Zellextrakte durch den Inhibitor herabgesenkt (**Abbildung 3-28**). Dies lässt vermuten, dass NCA nicht in der Lage ist APE1 (als bedeutendste Endonuklease in Säugetieren) zu inaktivieren. Somit kann die Frage, ob erst der durch APE1 generierte Einzelstrangbruch der Auslöser für die verringerte Expression der Uracil-enthaltenen Vektoren ist, durch Experimente mit diesem Inhibitor nicht beantwortet werden.

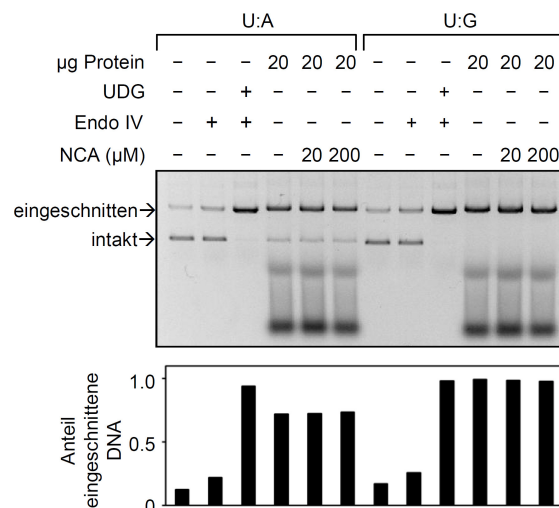


Abbildung 3-28 Einschnitts-Aktivität von HeLa-Zellextrakten in Anwesenheit des angeblichen APE1-Inhibitors 7-Nitroindol-2-carboxylsäure (NCA). Es wurden Plasmide eingesetzt, bei denen Uracil im nicht-transkribierten DNA-Strang positioniert ist und entweder mit Adenin ein Basenpaar bildet (U:A) oder fehlgepaart mit Guanin vorliegt (U:G). Die Konzentration des angeblichen APE1-Inhibitors in den Extrakten wurde variiert (20 – 200 µM) und der Ausschnitt von Uracil, der mit dem anschließenden Einschnitt des DNA-Stranges neben der AP-Läsion durch die Endonuklease gekoppelt ist, wurde anhand der Überführung der kovalent-geschlossenen (intakten) zu der offen-zirkulären (eingeschnittenen) DNA-Form in einem EtBr-haltigen Agarose-Gel detektiert und mittels Image Lab 3.0 analysiert.

3.5 Einfluss eines einzelnen Thyminglykols auf die Genexpression in HeLa-Zellen

3.5.1 Konstruktion und Verifizierung von pEGFP-mODC-ZA-Reporter-Vektoren mit einem spezifisch positioniertem Thyminglykol innerhalb des EGFP-Gens

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Uracil und 5-hmU nicht direkt, sondern erst nach Exzision der Läsion durch eine der Uracil-DNA-Glykosylasen mit der Transkription eines Reportergens interferieren (siehe Kapitel 3.3), war es sinnvoll zu überprüfen, ob dies auch für andere Substrate der BER zutrifft. Eine der häufigsten oxidativen Basenmodifikationen stellt 5,6-Dihydroxy-5,6-dihydrothymidin (Thyminglykol) dar. Es entsteht durch ionisierende Strahlung und oxidativen Stress und wird größtenteils über die bifunktionelle NTHL1- und NEIL1-Glykosylase aus der DNA entfernt. Im Gegensatz zu den monofunktionellen UDGs verfügt diese zusätzlich über eine β - (NTHL1) oder β,δ - (NEIL1) Lyase-Aktivität, was sie neben der Entfernung der geschädigten Base auch gleich zum Einschnitt des DNA-Stranges befähigt. Um zu überprüfen, welche Auswirkungen Thyminglykol oder seine Prozessierung durch eine der bifunktionellen Glykosylasen auf die Transkription ausübt, wurden Vektoren konstruiert, die ein einzelnes Thyminglykol im transkribierten oder nicht-transkribierten DNA-Strang innerhalb eines EGFP-Reportergens enthalten (**Abbildung 3-29, A**). Da diese Läsion eine Distorsion des DNA-Moleküls bewirkt (Wallace, 2002), wurde zum Einbau der synthetischen Thyminglykol-enthaltenen Oligonukleotide in den pEGFP-mODC-ZA-Vektor die Strang-Insertion-Reaktion verwendet, die sich schon bei der Konstruktion der Plasmide mit einer U:G- und T:G-Fehlpaarung bewährt hatte (siehe Kapitel 2.2.8). Der erfolgreiche Einbau der Thyminglykol-enthaltenen Oligonukleotide in den Expressions-Vektor, der eine 18 Nukleotid große, einzelsträngige Lücke innerhalb des transkribierten oder nicht-transkribierten Stranges besitzt, lässt sich durch Ligations-Reaktionen in An- und Abwesenheit der Polynukleotidkinase nachweisen (**Abbildung 3-29, B**). Das Plasmid mit einer Lücke im nicht-transkribierten Strang (NTS gap), das analog der DNA mit einem Einzelstrangbruch als offen-zirkuläre (oc) Form durch das EtBr-haltige Gel wandert, lässt sich überraschenderweise durch Zugabe der Ligase in die kovalent-geschlossene (cc) Form überführen. Die Ausbildung einer Sekundärstruktur (Haarnadel) in der einzelsträngigen DNA des transkribierten Stranges erklärt dieses unerwartete Ergebnis und bewirkt, dass die beiden losen Enden des nicht-transkribierten Stranges nahe genug zusammenkommen, um ligiert werden zu können, womit das Plasmid in die kovalent-geschlossene Form übergeht. Dies konnte bereits bei der Konstruktion der Vektoren, in die eine U:G- und T:G-Fehlpaarung eingebaut werden sollte, beobachtet werden (**Abbildung 3-3**). Da der Einsatz des unphosphorylierten Thyminglykol-Oligonukleotids die Religation des Plasmids komplett verhindert, beweist dies den erfolgreichen Einbau des 18-mers in die Lücke. Die Ausbildung der Sekundärstruktur ist nun nicht mehr möglich und eine vollständige Ligation des Oligonukleotids in den Vektor kann ebenso wenig erfolgen, da hierzu die 5'-Phosphatgruppe im synthetischen 18-mer fehlt. Erst nach Phosphorylierung des 5'-Endes des synthetischen

Oligonukleotids durch die Polynukleotidkinase kann die Ligation beider Enden katalysiert werden, woraufhin das Plasmid die kovalent-geschlossene DNA-Form einnimmt. Bei Plasmiden, die eine Lücke im transkribierten DNA-Strang besitzen (TS gap), wird keine Sekundärstruktur ausgebildet, die eine Ligation des Vektors ermöglicht. Erst der Übergang von der offen-zirkulären zur kovalent-geschlossenen DNA-Form nach Zugabe der Thyminglykol-Oligonukleotide unter Verwendung der Kinase und der Ligase, beweist den kompletten Einbau der synthetischen Oligonukleotide in die Vektoren.

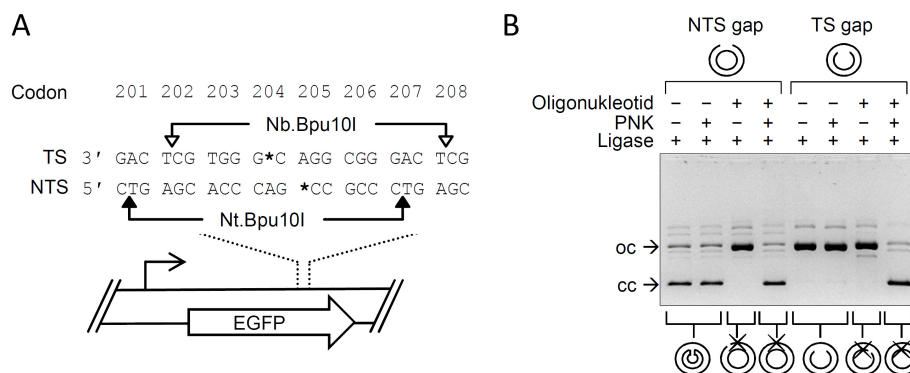


Abbildung 3-29 Konstruktion von Vektoren in denen ein spezifisch positioniertes Thyminglykol mit Adenin des Nachbarstranges ein Basenpaar bildet (Tg:A). (A) Position von Thyminglykol (**Stern**) innerhalb des transkribierten (TS) oder des nicht-transkribierten (NTS) DNA-Stranges der codierenden Sequenz des EGFP-Reportergens (Pfeil). Neben dem Startpunkt der Transkription (gebrochener Pfeil) sind auch die Einschnittstellen der Nicking-Endonukleasen, die zur Konstruktion der modifizierten pEGFP-mODC-ZA-Plasmide verwendet wurden, gezeigt: Nt.Bpu10I; Nb.Bpu10I. (B) Plasmide mit einer Lücke (gap) in einen der DNA-Stränge dienen als Substrate für Strang-Insertion-Reaktionen der in 46-fachem molarem Überschuss eingesetzten, synthetischen Thyminglykol-Oligonukleotide. Die Reaktionen erfolgten in An- und Abwesenheit der Polynukleotidkinase (PNK) und mittels Agarose-Gelelektrophorese (mit EtBr) konnte die kovalent-geschlossene (cc) von der offen-zirkulären (oc) DNA-Form getrennt werden. Die Piktogramme symbolisieren die Strukturen der eingesetzten Plasmide bzw. des dominierenden Reaktionsproduktes; das Kreuz steht für die Basenmodifikation. Adaptiert aus (Lühnsdorf et al., 2012).

Zum Nachweis des Thyminglykols in den konstruierten Reporter-Vektoren, wurden diese mit der Endonuklease III (NTH) von *E. coli* inkubiert (siehe Kapitel 2.2.8.4). Dieses Enzym besitzt sowohl eine N-Glykosylase- als auch eine AP-Lyase-Aktivität, die es ihm ermöglicht Thyminglykol aus der DNA auszuschneiden und am 3'-Ende der generierten AP-Läsion den Strang zu spalten. Der damit verbundene Übergang der intakten (kovalent-geschlossenen) DNA in die eingeschnittene (offen-zirkuläre) Form lässt sich nach Elektrophorese in einem EtBr-haltigem Agarose-Gel nachweisen. Während die Kontroll-Plasmide, die ein T:A-Basenpaar enthalten, nicht von der NTH prozessiert werden, ist ein kompletter Einschnitt der Vektoren in Anwesenheit eines Tg:A-Basenpaares zu

beobachten, was das Vorhandensein von Thyminglykol in den entsprechenden Vektoren beweist (**Abbildung 3-30**).

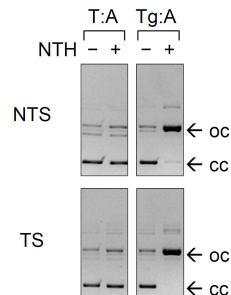


Abbildung 3-30 Verifizierung der Plasmid-DNA auf die Anwesenheit des eingebauten Thyminglykols (Tg:A). EtBr-haltige Agarose Gele der Plasmid-Substrate, die ein einzelnes Thyminglykol im transkribierten (TS) oder nicht-transkribierten (NTS) DNA-Strang besitzen. Die Inkubation mit der Endonuklease III (NTH) überführt die Thyminglykol-enthaltene DNA von der kovalent-geschlossenen (cc) in die offen-zirkuläre (oc) Form. Unmodifizierte Plasmide (T:A) bleiben dagegen unverändert. Adaptiert aus (Lühnsdorf et al., 2012).

3.5.2 Einfluss eines einzelnen Thyminglykols auf die Expression des Reporter-Vektors pEGFP-mODC-ZA in HeLa-Zellen

Um die Auswirkungen eines einzelnen Thyminglykols auf die Expression zu untersuchen, wurden die konstruierten Vektoren, die Thyminglykol im transkribierten oder nicht-transkribierten DNA-Strang des EGFP-Reportergens enthalten, in HeLa-Zellen transfiziert und die Bildung der EGFP-Fluoreszenz in den Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe Kapitel 2.2.10). So bewirkt ein einzelnes Thyminglykol (Tg:A) eine starke Abnahme der Expression im Vergleich zu den konstruierten Vektoren ohne Basenmodifikation (T:A) (**Abbildung 3-31**). Schon kurze Zeit nach der Einschleusung der Plasmide in die Host-Zellen konnte eine deutlich verringerte Fluoreszenz beobachtet werden, die mit zunehmender Inkubationszeit der Thyminglykol-enthaltenden Vektoren in den Zellen weiter absinkt. Dabei scheint die Lokalisation des Thyminglykols im transkribierten (TS) oder nicht-transkribierten (NTS) DNA-Strang keine oder eine nur minimale Auswirkung auf die Stärke des negativen Effektes zu besitzen. Die schon frühzeitige Inhibierung der Transkription durch ein Thyminglykol lässt die Vermutung zu, dass diese Läsion eine direkte Blockade der RNA-Polymerase II bewirken kann. Gegen eine direkte Blockade durch die Läsion spricht jedoch die Tatsache, dass die Stärke der Inhibierung nahezu keine Strangabhängigkeit zeigt. Jedoch sollten nur Schäden im transkribierten Strang in der Lage sein, direkt mit der elongierenden RNA-Polymerase zu interferieren. Aus in vitro Versuchen sind widersprüchliche Ergebnisse über das Transkriptions-blockierende-Potential des Thyminglykols zu finden. So wird von einer Pausierung (Kathe et al., 2004) oder einer Blockade (Charlet-Berguerand et

al., 2006) der RNA-Polymerase als auch über einer effizienten Überwindung (Tornaletti et al., 2001) dieser Läsion berichtet. Die, analog der Uracil-enthaltenen Vektoren, mit zunehmender Inkubationszeit der Thyminglykol-enthaltenen Vektoren stetig abnehmende Expression des Reportergens, lässt einen ähnlichen Mechanismus für beide BER-Substrate vermuten, bei der erst die intrazelluläre Prozessierung des Schadens die Transkription inhibiert. Möglicherweise ist auch hier die Exzision der Basenmodifikation, welche durch die NTHL1- oder NEIL1-Glykosylase katalysiert wird, der Trigger. Eine schnellere Erkennung und Ausschneidung des Thyminglykols durch die beteiligten Glykosylasen und der damit verbundene frühere Eintritt des negativen Effektes auf die Transkription, könnte den Befund der frühzeitig verringerten Genexpression erklären.

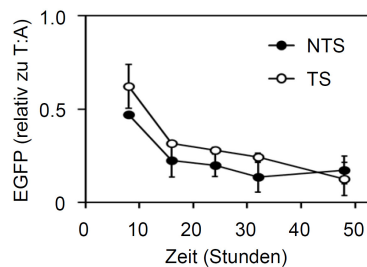


Abbildung 3-31 Einfluss eines einzelnen Thyminglykols, welches im transkribierten (TS) oder im nicht-transkribierten (NTS) DNA-Strang innerhalb des Reportergens positioniert ist, auf die Expression in HeLa-Zellen. Dabei bildet Thyminglykol mit Adenin ein Basenpaar (Tg:A). Die EGFP-Expression in den Zellen wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie relativ zu den mit unmodifizierten Kontroll-Plasmiden (T:A) transfizierten Zellen gemessen. Mittelwerte aus 2 – 4 Transfektionen, die mit 2 unabhängig hergestellten Substraten erfolgten (\pm Standardabweichung bzw. Variationsbreite).

3.5.3 Einfluss eines einzelnen Thyminglykols auf die mRNA-Expressions- und die Plasmid-DNA-Level des pEGFP-mODC-ZA-Vektors in HeLa-Zellen

Um herauszufinden, ob eine verringerte Transkription des Thyminglykol-enthaltenen Vektors der Grund für die verringerte Genexpression ist oder ob eine verminderten Aufnahme bzw. Stabilität der Vektor-DNA hierfür verantwortlich ist, wurde 24 Stunden nach der Transfektion die RNA und die DNA aus den HeLa-Zellen isoliert und mittels RT-qPCR das EGFP-Transkript und die verbleibende Plasmid-DNA quantifiziert. Die Menge des RNA-Transkripts wurde dabei in Relation zu der isolierten Plasmid-DNA bestimmt (siehe Kapitel 2.2.5). Schaut man sich die mRNA-Level des EGFP-Gens an, so erkennt man, dass ein einziges Thyminglykol eine Reduktion dieser im Vergleich zu der Kontrolle (T:A) in den Zellen bewirkt (**Abbildung 3-32**). Dies lässt auf eine inhibierte Transkription (oder eine verringerte Stabilität) der EGFP-mRNA schließen. Das EGFP1-Amplikon, welches zwar innerhalb des EGFP-Gens jedoch weit oberhalb (upstream) der eingefügten Basenmodifikation gelegen ist, wird quantitativ im

gleichen Ausmaße gebildet wie das EGFP2-Fragment, welches genau über die Stelle des eingebauten Thyminglykols amplifiziert. Dies bedeutet, dass die Basenmodifikation keinen Abbruch der Transkription verursacht, da in diesem Falle eine verringerte Menge des EGFP2-Amplikons zu erwarten gewesen wäre. Dasselbe Ergebnis konnte bereits mit den Uracil-enthaltenen Vektoren erhalten werden (**Abbildung 3-8**). Aus der Quantifizierung der Plasmid-DNA ergibt sich ebenfalls eine Abnahme der DNA-Level der Thyminglykol-enthaltenden Vektoren im Vergleich zu den Referenz-Plasmiden (**Abbildung 3-32**). Die Beobachtung, dass das EGFP1- und EGFP2-Amplikon annähernd im gleichen Maße betroffen ist, lässt den Schluss zu, dass der gesamte Vektor und nicht nur der Teil, der die Basenmodifikation enthält (EGFP2), vermindert aufgenommen oder degradiert (bzw. aus der Zelle ausgeschleust) wird. Zusammenfassend kann man somit sagen, dass sich die verringerte Genexpression der Thyminglykol-enthaltenden Vektoren aus den kombinierten Effekten einer inhibierten Transkription und einer verringerten Aufnahme und/oder Stabilität der modifizierten DNA zusammensetzt.

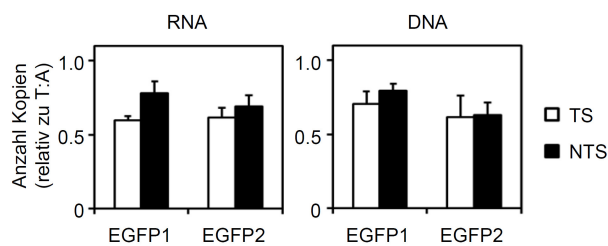


Abbildung 3-32 Realtime quantitative PCR der mRNA und DNA in HeLa-Zellen, die 24 Stunden zuvor mit Thyminglykol-enthaltenden Vektoren transfiziert wurden. Die mRNA- und DNA-Quantifizierung erfolgte aus Duplikaten von Duplikaten (Mittelwert \pm Standardabweichung) relativ zu den mit unmodifizierten Plasmiden (T:A) transfizierten Zellen. EGFP1 und EGFP2 sind die Amplifikationsprodukte innerhalb der EGFP-codierenden Region, die durch den Einsatz von unterschiedlichen Primern erhalten wurden. Die Primer von EGFP1 amplifizieren oberhalb (upstream) der DNA-Läsion während EGFP2 das Produkt darstellt, bei dem über die Position des Schadens vervielfältigt wird.

3.6 Einfluss des CSB-Proteins auf die Expression von Reporter-Vektoren in

Anwesenheit verschiedener DNA-Modifikationen

Das Ausmaß, mit dem Thyminglykol direkt mit der Elongation der mRNA durch die RNA-Polymerase II zu interferieren vermag, ist unter anderem von der Anwesenheit von zahlreichen Faktoren abhängig, die eine Überwindung dieser DNA-distorsierenden Läsion ermöglichen. Während zum Beispiel der Transkriptionsfaktor TFIIIS erst nach Blockade der Polymerase eine Spaltung des Transkriptes vermittelt und so eine Fortsetzung der Transkription ermöglicht, helfen Proteine wie CSB und Elongin der Polymerase bestimmte Läsionen ohne längere Arretierung zu überqueren (Sims,

Belotserkovskaya & Reinberg, 2004). Darüber hinaus ist CSB auch an der Reparatur der Transkriptions-blockierenden Läsionen über die sogenannte transkriptionsgekoppelte Nukleotid-Exzisions-Reparatur (TCR) beteiligt und gehört zur Familie der SWI/SNF-ATPasen, welche als Chromatin-Remodeler bekannt sind (Fousteri & Mullenders, 2008), (Citterio et al., 2000). In in vitro-Versuchen konnte gezeigt werden, dass das CSB-Protein die RNA-Polymerase II zur Überbrückung von Thyminglykol und auch anderen Läsionen wie 8-oxoG stimulieren kann (Charlet-Berguerand et al., 2006). Demnach könnte CSB der Transkriptions-Maschinerie bei der Überwindung der untersuchten Basenmodifikationen helfen. Diese Funktion des CSB-Proteins scheint jedoch weniger für die inhibierte Transkription der Thyminglykol-enthaltenen Plasmide von Bedeutung zu sein, da durch die (wenn überhaupt) nur sehr schwach ausgeprägte Strang-Abhängigkeit davon auszugehen ist, dass keine direkte Blockade der Transkription Auslöser für den negativen Effekt der Läsion auf die Expression des EGFP-Gens ist (**Abbildung 3-31**). Eine scheinbar weitere Funktion des CSB-Proteins ist, dass es mit einigen Enzymen der BER interagiert und deren katalytische Aktivität erhöhen kann. So wird die Inzision von Plasmiden mit Formamido-pyrimidinen, die wie Thyminglykol ein Substrat der NEIL1-Glykosylase darstellen, durch rekombinantes CSB verbessert (Muftuoglu et al., 2009). Auch die Exzision eines AP-Analogons durch die AP-Endonuklease 1 wird bei Anwesenheit eines rekombinanten CSB-Proteins stimuliert, auch wenn dieses Ergebnis in Zellextrakten nicht bestätigt werden konnte (Wong et al., 2007). Ein weiterer Interaktionspartner des CSB-Proteins ist PARP-1 (Thorslund et al., 2005), ein Enzym, das Einzelstrangbrüche bindet und womöglich auch an BER von Läsionen beteiligt ist. Auch mit der OGG1-Glykosylase interagiert CSB und fördert dabei seine katalytische Aktivität (Tuo et al., 2002). Zudem konnte gezeigt werden, dass CSB die Expression von OGG1 fördert (Dianov et al., 1999), (Javeri et al., 2011).

Das CSB-Protein kann also indirekt über eine erhöhte Genexpression oder direkt über eine physikalische Interaktion die Effizienz einiger BER-Enzyme erhöhen. Sowohl über diesen Mechanismus als auch über seine Funktion als Elongationsfaktor der angehaltenen RNA-Polymerase II in Gegenwart von DNA-Schäden sowie über die TCR kann CSB einen Einfluss auf die Genexpression in Anwesenheit von BER-Substraten (Thyminglykol, Uracil und 5-hmU) ausüben (**Abbildung 3-33**). Diese Vermutung wurde in Versuchen mit Maus-Embryo-Fibroblasten (MEFs), die aus Tieren mit einer homozygoten CSB-Null-Mutation entstammen und HeLa-Zellen, deren CSB-Expression via shRNA herabgesetzt wurde, untersucht.

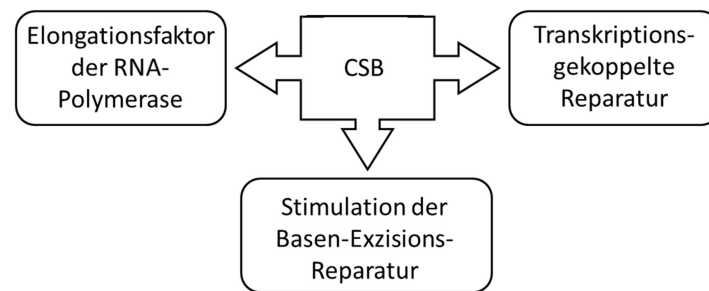


Abbildung 3-33 Funktionen des CSB-Proteins, mit denen es die Transkription in Gegenwart von BER-Substraten beeinflussen könnte.

3.6.1 Einfluss des CSB-Knockdowns auf die Genexpression der Thyminglykol-enthaltenen Reporter-Vektoren in Maus-Embryo-Fibroblasten

Um zu überprüfen, welche Auswirkungen CSB auf die Expression der Thyminglykol-enthaltenen Vektoren ausübt, wurden die Plasmide in Maus-Embryo-Fibroblasten transfiziert, die eine CSB-Null-Mutation ($Csb^{mut/mut}$) besitzen. Die EGFP-Expression in den Wildtyp-Zellen (F11.1) mit intaktem CSB zeigte überraschenderweise nur einen minimalen negativen Einfluss von Thyminglykol (Tg:A) auf die Expression des Reportergens im Vergleich zu den unmodifizierten Vektoren (T:A) (**Abbildung 3-34**). In beiden MEF-Zelllinien mit Mutationen im CSB-Gen ($Csb^{mut/mut}$ und $Csb^{mut/mut} Ogg1^{-/-}$) ist die EGFP-Fluoreszenz signifikant abgeschwächt. Somit scheint ein intaktes CSB-Protein in Mauszellen für die Expression von Reporter-Plasmiden, die ein einzelnes Thyminglykol besitzen, von Bedeutung zu sein. Da der negative Effekt unabhängig davon auftritt, ob die Basenmodifikation im transkribierten oder nicht-transkribierten DNA-Strang lokalisiert ist, lässt sich eine bessere Überwindung von Elongationsblockierenden Substraten weniger als Erklärung für die Wirkung von CSB heranziehen, da dies nur den transkribierten Strang betreffen würde. Vielmehr scheint die veränderte Modulation von BER-Enzymen der ausschlaggebende Punkt für die herabgesenkte Transkription des Thyminglykol-enthaltenen Plasmids zu sein. Auch für andere Substrate der BER, wie 8-oxoG, Uracil und einer AP-Läsion, konnte in $Csb^{mut/mut}$ -MEF gezeigt werden, dass die Expression eines Reportergens im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen herabgesenkt ist (Kitsera et al., 2011). Merkwürdigerweise wurde im Gegensatz zu den Wildtyp-MEFs in menschlichen HeLa-Zellen eine starke Inhibierung der Transkription beobachtet, wenn Thyminglykol im Reportergen eingebaut worden war (**Abbildungen 3-31 und 3-32**). Entweder könnten veränderte genetische Faktoren in den MEFs oder der Speziesunterschied der Grund für diese Divergenz sein. In denselben CSB-defizienten MEFs wurde zudem eine unerwartet hohe Inhibierung der Transkription eines Reportergens durch einen Einzelstrangbruch festgestellt, was jedoch nicht in menschlichen Zellen aus CSB-Patienten

beobachtet werden konnte (Khubta et al., 2010b). Der Grund hierfür blieb unbeantwortet und verdeutlicht, dass die Generierung einer CSB-defizienten, isogenen, menschlichen Zelllinie nötig ist, um Aufschlüsse über die Funktion des CSB-Proteins zu erhalten.

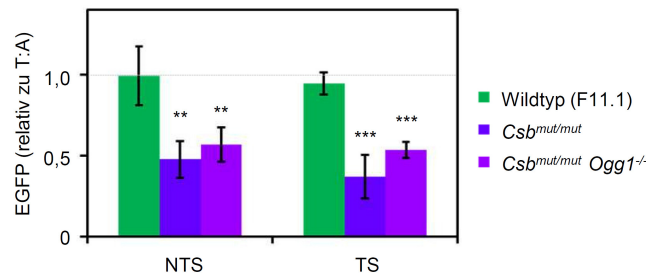


Abbildung 3-34 Einfluss eines einzelnen Thyminglykols im transkribierten (TS) oder im nicht-transkribierten (NTS) DNA-Strang innerhalb des EGFP-Gens auf die Expression in Wildtyp-MEFs (F11.1) und MEF-Zelllinien, die eine CSB-Null-Mutation besitzen (*Csb^{mut/mut}* und *Csb^{mut/mut} Ogg1^{-/-}*). Die EGFP-Expression wurde mit Hilfe des Durchflusszytometers 24 Stunden nach der Transfektion relativ zu den mit unmodifizierten Kontroll-Vektoren (T:A) transfizierten Zellen gemessen. Mittelwerte aus 3 (*Csb^{mut/mut}*) bzw. 4 (Wildtyp und *Csb^{mut/mut} Ogg1^{-/-}*) Transfektionen, die mit 2 unabhängig hergestellten Substraten erfolgten (\pm Standardabweichung). Zweiseitig gepaarter Student's T-test: ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

3.6.2 Einfluss des CSB-Knockdowns auf die Genexpression von modifizierten Reporter-Vektoren in HeLa-Zellen

3.6.2.1 Knockdown des CSB-Proteins in HeLa-Zellen

Um ein isogenes Zellsystem zu generieren, in dem die Expression des menschlichen CSB-Proteins herabgesetzt ist, wurde ein Vektor eingesetzt, der in der Lage ist, in den Zellen RNA-Interferenz auszulösen (siehe Kapitel 2.2.7). Der anfänglich zu diesem Zweck konstruierte Vektor basierte auf der Expression von artifizierender mikro-RNA (amiRNA) in den Host-Zellen nach dem Vorbild von Hu *et al.* (Hu et al., 2009). Mit dieser Methode wurde jedoch kein Erfolg verzeichnet (Daten nicht gezeigt), so dass analog zum Knockdown des UNG-, SMUG1- und TDG-Gens, ein spezifischer shRNA-Expressionsvektor aus dem pENTR/pSUPER+-Vektor konstruiert wurde, welcher auf das bereits etablierte pSUPER-Plasmid basiert (Brummelkamp et al., 2002). Zum Knockdown des CSB-Gens wurden zwei Konstrukte mit unterschiedlicher shRNA-Sequenz ausprobiert, wobei beide Sequenzen derselben shRNA-Datenbank (Eurofins MWG Operon) entstammten (siehe Appendix I). Nach Klonierung der spezifischen shRNA-Inserts in den pENTR/pSUPER+-Vektor wurden die Konstrukte in HeLa-Zellen stabil transfiziert. Pro shRNA-Expressionsvektor wurden 32 Klone gepickt und deren Expression des CSB-Proteins mittels Western Blot analysiert. Die drei effizientesten CSB-Knockdown-Klone (CSBsh) exprimieren alle dieselbe shRNA-Sequenz und weisen eine starke Reduktion des CSB-Proteins (Bande

bei ca. 200 kDa) auf (**Abbildung 3-35**). Relativ zu der mit dem leeren shRNA-Expressions-Vektor transfizierten Zelllinie (no sh) beträgt die verbleibende CSB-Expression 9 % (CSBsh-c21), 12 % (CSBsh-c22) und 29 % (CSBsh-c7). Bei der starken, unspezifischen Bande bei ca. 160 kDa, die ebenfalls durch den CSB-Antikörper erkannt wird und in allen Zellen vorhanden ist, könnte es sich um das CSB-PiggyBac-Fusions-Protein handeln, das durch alternatives Splicen der ersten 5 Exons des CSB-Proteins an ein PiggyBac Transposable Element entsteht (Newman et al., 2008). Diese Bande ist im Gegensatz zum CSB-Protein auch in den CSB-defizienten humanen Haut-Fibroblasten (CS1AN.SV) zu finden.

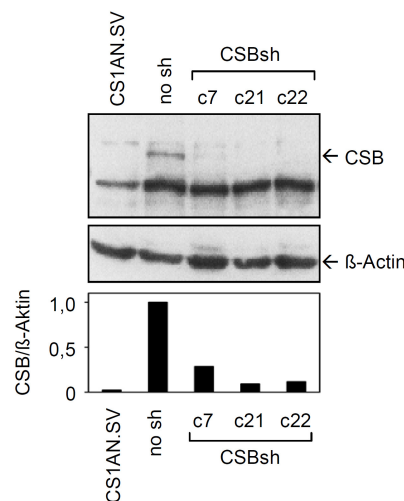


Abbildung 3-35 Knockdown des CSB-Proteins in HeLa-Zellen mittels shRNA. Western Blots des CSB-Proteins von HeLa-Zell-Klonen, die stabil mit den CSB-shRNA-Expressions-Vektoren (CSBsh) oder dem Leervektor (no sh) transfiziert wurden. Ebenso wurde eine humane Zelllinie, die aus einem CSB-Patienten stammt (CS1AN.SV), aufgetragen. Als Ladekontrolle diente β -Aktin. Adaptiert aus (Kitsera et al., 2014).

Um zu überprüfen, ob der CSB-Knockdown die Proliferation der Zellen beeinflusst, wurde eine Wachstumskurve erstellt. Diese zeigt ein etwas langsames Wachstum der CSB-Klone 7 und 21 während die Proliferation von Klon 22 in etwa der der Kontroll-Zelllinie (no sh) entspricht (**Abbildung 3-36, A**). Die berechneten Verdopplungszeiten betragen 14,7 (no sh), 14,9 (CSBsh-c22), 17,3 (CSBsh-c7) und 18 Stunden (CSBsh-c21). Demnach beeinträchtigt der CSB-Knockdown nur im geringen Ausmaße die Proliferation der Zellen.

Ein prägnantes Merkmal der CSB-Defizienz ist die erhöhte Empfindlichkeit der Zellen gegenüber UV-Bestrahlung. Dies reflektiert die Unfähigkeit der Zellen Transkriptionsgekoppelte Nukleotid-Exzisions-Reparatur (TCR) von sperrigen UV-Läsionen, wie Cyclobutan-Pyrimidin-Dimeren (CPD) oder 6-4-Photoprodukten (6-4-PP), auszuführen und die am Schaden gestoppte RNA-Synthese wieder in Gang

zu bringen (Fousteri & Mullenders, 2008). Um diesen strahlungssensitiven Phänotyp in den generierten CSB-Knockdown-Zellen nachzuweisen, wurden die Zellen mit UV-C bestrahlt und deren Fähigkeit Kolonien zu bilden untersucht. Schon bei einer geringen Strahlungs-dosis von $7,8 \text{ J/m}^2$ bilden alle CSB-Knockdown-Zellen signifikant weniger Kolonien als die Kontroll-Zelllinie (no sh) aus, was bei höheren UV-Dosen noch deutlich stärker ausgeprägt ist (**Abbildung 3-36, B**). Die Zellen mit verringerter Expression des CSB-Gens zeigen somit die in der Literatur beschriebene erhöhte Sensibilität gegenüber der UV-C-Bestrahlung.

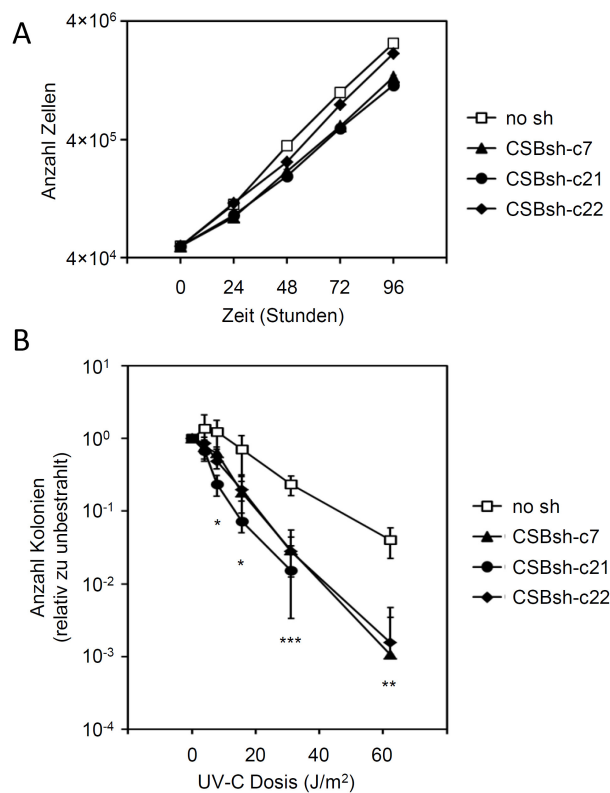


Abbildung 3-36 Einfluss des CSB-Knockdowns in HeLa-Zellen auf die Proliferation und die Fähigkeit nach UV-C-Bestrahlung Kolonien auszubilden. (A) Anzahl der CSB-Knockdown-Zellen nach unterschiedlich langer Kultivierung. (B) Anzahl gebildeter Kolonien der CSB-Knockdown Zellen (CSBsh-c7, CSBsh-c21, CSBsh-c22) und der mit dem Leervektor stabil transfizierten Kontroll-Zelllinie (no sh) nach UV-C-Bestrahlung relativ zu den unbestrahlten Proben. Mittelwerte aus 4 (CSBsh-c21, CSBsh-c22) – 5 (no sh, CSBsh-c7) Versuchen \pm Standardabweichung. Zweiseitig gepaarter Student's T-test: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

3.6.2.2 Genexpression der UV-B geschädigten pEGFP-mODC-ZA-Reporter-Vektoren in CSB-Knockdown-Zellen

UV-Strahlung generiert CPDs und 6-4-Photoprodukte in der DNA, wobei bevorzugt CPDs entstehen. Es ist bekannt, dass beide Läsionen bei Generierung im transkribierten DNA-Strang einen starken Block der elongierenden RNA-Polymerase II in vitro verursachen (Donahue et al., 1994), (Tornaletti et al., 1997), (Selby et al., 1997), (Mei Kwei et al., 2004). Um nachzuweisen, dass der Knockdown des CSB-Proteins funktionelle Folgen für die Transkription der beschädigten DNA hat, wurde der pEGFP-mODC-ZA-Expressions-Vektor mit UV-B Strahlung geschädigt und in die CSB-defizienten Zellen transfiziert (Host cell reactivation, siehe Kapitel 2.2.10). Die durchschnittliche Menge an CPDs in den Vektoren wurde durch Inkubation der Plasmide mit der T4 Endonuklease V (T4 Endo V) bestimmt, welche die generierten Dimere erkennt und den DNA-Strang an dieser Stelle einschneidet (siehe Kapitel 2.2.9). Die damit verbundene Überführung der kovalent-geschlossenen (cc) DNA-Form in die relaxierte, offen-zirkuläre (oc) lässt sich nach einer Agarose-Gelelektrophorese erkennen. In keiner der Spuren, in denen das unbestrahlte Plasmid (0 min UV-B) mit der Endonuklease V inkubiert wurde, lässt sich eine Zunahme der offen-zirkulären DNA-Form im Vergleich zu den Endonuklease-unbehandelten Proben erkennen (**Abbildung 3-37**). Das bedeutet, dass das Enzym nicht unspezifisch die DNA einschneidet. Weiterhin ist aus den den Spuren ohne Endonuklease ersichtlich, dass durch die UV-B-Bestrahlung per se keine Einzelstrangbrüche generiert werden, da ansonsten eine Zunahme der relaxierten Form im Vergleich zur unbestrahlten Probe zu erwarten wäre. Ein Übergang der intakten zur relaxierten Form ist dagegen bei den UV-B-bestrahlten Vektoren, die mit der Endonuklease V inkubiert wurden, zu beobachten und bestätigt die Entstehung von CPDs durch die Bestrahlung. Zur Quantifizierung muss sichergestellt werden, dass alle CPDs im Plasmid erkannt und eingeschnitten werden, weshalb eine Sättigung mit T4 Endo V erreicht werden muss. Dies ist jedoch weder bei Verwendung von 5 ng noch bei 30 ng Endonuklease in den Reaktionsansätzen gegeben. So erfolgte die Berechnung der erzeugten CPDs anhand des Ansatzes mit der höchstmöglichen Enzymkonzentration (150 ng). Aufgrund des Mangels an intakter, kovalent-geschlossener DNA in den länger bestrahlten Plasmiden (12 und 24 Minuten), konnte die Anzahl an CPDs nur für die 4 Minuten bestrahlte Probe direkt bestimmt werden. Durch Extrapolation dieses Wertes wurde auch die Menge an CPDs in den länger bestrahlten Vektoren abgeschätzt. So enthalten die Expressions-Vektoren, die 12 und 24 Minuten bestrahlt wurden, mindestens 3,6 und 7,2 CPDs pro Molekül bzw. 0,7 und 1,4 CPDs innerhalb des transkribierten Stranges des EGFP-Gens.

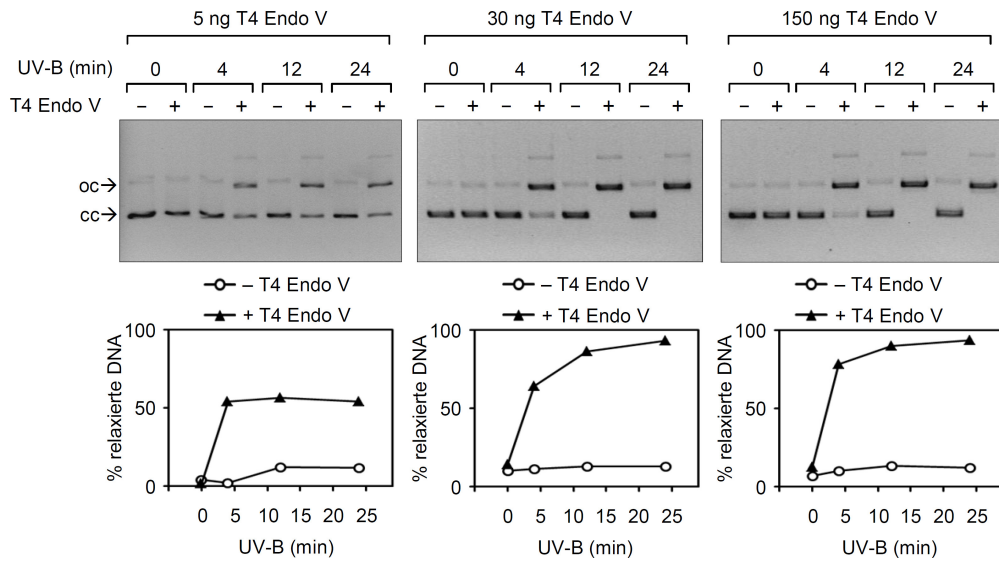


Abbildung 3-37 Quantifizierung der generierten CPDs in UV-B-bestrahlten Reporter-Vektoren. Durch Inkubation mit der T4 Endonuklease V (T4 Endo V) wird der DNA-Strang bei den durch Irradiation erzeugten Dimeren eingeschnitten, wodurch die DNA von der kovalent-geschlossenen (cc) in die relaxierte, offen-zirkuläre Form (oc) überführt wird. Die Trennung der beiden DNA-Formen erfolgte elektrophoretisch in einem Agarose-Gel und der Anteil an relaxierter DNA wurde bestimmt.

Durch Transfektion der UV-B-bestrahlten Vektoren in HeLa-Zellen sollte zunächst der Einfluss der generierten CPDs auf die Transkription des EGFP-Reportergens untersucht werden. Dabei wurden die Plasmide verwendet, die mindestens 0,7 oder 1,4 CPDs (12 oder 24 min UV-B) innerhalb des transkribierten Stranges des EGFP-Gens enthielten. Die Expression des Reportergens in den UV-B-beschädigten Plasmiden ist 8 Stunden nach der Einschleusung in die Zellen relativ zu den mit unbestrahlten Vektor transfizierten Zellen (0 min UV-B) deutlich und abhängig von der eingesetzten UV-Dosis verringert (**Abbildung 3-38**). Die verringerte Genexpression zu einem solch frühen Zeitpunkt lässt vermuten, dass die durch UV-B-Bestrahlung entstandenen Läsionen (vornehmlich CPDs) die RNA-Polymerase II bei der Elongation blockieren. Mit zunehmender Inkubationszeit der Plasmide in den Host-Zellen steigt die Expression der geschädigten Vektoren leicht an und erreicht für die 12 Minuten bestrahlten Plasmide nach 48 Stunden sogar die des nicht geschädigten Vektors. Das Wiedererlangen der Expression des Reportergens mit der Zeit spiegelt wahrscheinlich die fortschreitende Reparatur der erzeugten Läsionen wieder. Im Falle der länger bestrahlten Vektoren wird jedoch keine komplette Genesung der Transkription erreicht. Die durch 24-minütiger Bestrahlung induzierten DNA-Schäden können offensichtlich nicht mehr vollständig repariert werden.

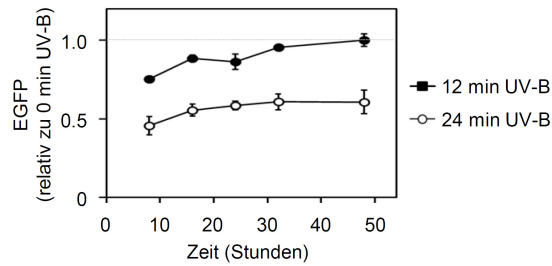


Abbildung 3-38 Einfluss der UV-B-bestrahlten Plasmide auf die Expression des EGFP-Reportergens in HeLa-Zellen. Nach der Transfektion in die Zellen wurde die EGFP-Expression der Plasmide, die entweder 12 oder 24 Minuten der UV-B-Strahlung ausgesetzt waren (12 oder 24 min UV-B), mit Hilfe des Durchflusszytometers relativ zu den mit dem unbestrahlten Vektor (0 min UV-B) transfizierten Zellen gemessen.

Aus Host cell reactivations von UV-bestrahlter Plasmid-DNA konnte in früheren Arbeiten beobachtet werden, dass das CSB-Protein für die Genexpression von UV-bestrahlten Vektoren benötigt wird (Spivak & Hanawalt, 2006). Dies soll die Unfähigkeit von CSB-defizienten Zellen die UV-induzierten Läsionen mittels TCR zu reparieren und die angehaltene Transkription des geschädigten Reportergens wieder in Gang zu bringen widerspiegeln (Fousteri & Mullenders, 2008). Um zu untersuchen, welche Rolle dem CSB-Protein bei der Überwindung der UV-B-induzierten Läsionen zukommt und ob die CSB-abhängige TCR für die Wiederherstellung der Genexpression der UV-B-bestrahlten Plasmide von Bedeutung ist, wurden die bestrahlten Reporter-Vektoren in die CSB-Knockdown-Zellen transfiziert. Die Messung der EGFP-Fluoreszenz zeigt, dass eine verringerte Transkription der geschädigten Vektoren (12 und 24 min UV-B) relativ zu den unbeschädigten Kontroll-Vektoren (0 min UV-B) in den Zellen auszumachen ist (**Abbildung 3-39**). In den Zelllinien, deren CSB-Protein herunterreguliert wurde (CSBsh), scheint die Expression der beiden bestrahlten Vektoren im Vergleich zur Kontroll-Zelllinie (no sh) nur sehr schwach oder gar nicht verringert zu sein. Ebenso lässt sich unabhängig von der CSB-Expression und der Bestrahlungsdauer eine partielle Wiederherstellung der Fluoreszenz nach 24-stündiger Inkubation erkennen. Dieses unerwartete Ergebnis könnte dadurch erklärt werden, dass der Knockdown des CSB-Gens nicht ausreichend ist, um die Reparatur von UV-induzierten Schäden signifikant zu beeinträchtigen.

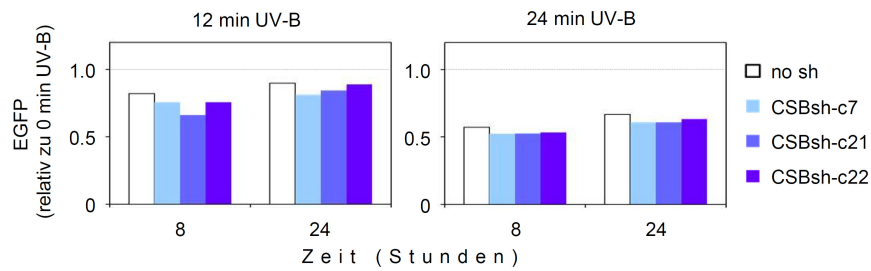


Abbildung 3-39 EGFP-Expression der UV-B-bestrahlten Reporter-Vektoren in CSB-Knockdown-Zellen. Die aus HeLa-Zellen entsprungene CSB-Knockdown-Zelllinie (CSBsh-c7, CSBsh-c21 und CSBsh-c22) und die Kontroll-Zelllinie (no sh) wurden mit UV-B-bestrahlten Vektoren (12 min oder 24 min UV-B) transfiziert und die Expression des EGFP-Gens in den Zellen mittels Durchflusszytometer relativ zu den mit nicht geschädigtem Vektor (0 min UV-B) transfizierten Zellen bestimmt.

3.6.2.3 Einfluss des CSB-Knockdowns auf die Genexpression von Thymin-Thymin-Dimer-enthaltenen Reporter-Vektoren

Ein großer Nachteil der UV-bestrahlten Vektoren ist es, dass die genaue Lokalisation der induzierten CPDs nicht bekannt ist. Diese könnten, sofern sie im Promotor liegen, zum Beispiel die Bindung von Transkriptionsfaktoren beeinflussen und so die Expression des Reportergens verringern ohne mit der RNA-Polymerase II in Kontakt zu kommen. Aus diesem Grund wurden pEGFP-mODC-ZAJ-Vektoren eingesetzt, die ein spezifisch positioniertes Thymin-Thymin-Dimer (TT-CPD) in der 5'-UTR innerhalb des transkribierten oder nicht-transkribierten DNA-Strangs des EGFP-Reportergens enthielten und von Dr. Nataliya Kitsera zur Verfügung gestellt wurden (Kitsera et al., 2014). Mit denselben Konstrukten konnte eine deutliche Blockade der Transkription in NER-defizienten XPA-Zellen bereits nachgewiesen werden (Khobta und Kitsera, nicht-publizierte Daten). Die Transfektion dieser Vektoren in HeLa-Zellen mit unterschiedlicher Expression des CSB-Gens ergab, dass ein einzelnes TT-CPD im transkribierten Strang ausreichend ist, um die Genexpression in der Kontroll-Zelllinie in Relation zum Referenz-Plasmid (TT) 8 Stunden nach der Plasmid-Einschleusung leicht abzuschwächen (**Abbildung 3-40**). Dies beweist eine Blockade der Transkriptions-Maschinerie, dessen Ausmaß durch die Anwesenheit der aktiven, globalen genomischen Nukleotid-Exzisions-Reparatur (GG-NER), die unabhängig von der Transkriptionsgekoppelten Nukleotid-Exzisions-Reparatur (TCR) sperrige DNA-Läsionen entfernt, abgeschwächt wird. In den CSB-Knockdown-Zellen ist der negative Effekt auf die Transkription deutlich verstärkt, auch wenn die Transkription nicht vollständig zum Erliegen kommt. In den Zell-Linien mit herunterreguliertem CSB lässt sich ebenso wie in den Referenz-Zellen eine schwache Reaktivierung der Expression des Reportergens mit zunehmender Inkubationszeit der Vektoren in den Host-Zellen beobachten. Bei Vektoren, bei denen das TT-Dimer im nicht-transkribierten DNA-Strang positioniert ist, ist die Transkription ebenfalls verringert. Dieser negative Effekt ist jedoch unabhängig von dem CSB-Status der Zellen, und auch nach längerer Inkubation der

Plasmide in den Host-Zellen ist mit Ausnahme der Kontroll-Zelllinie keine Reaktivierung der Transkription erkennbar. Insgesamt weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass der CSB-Knockdown nur einen relativ milden Effekt auf die Transkription in Anwesenheit eines TT-Dimers im transkribierten Strang ausübt. Es lässt sich vermuten, dass die Reparatur der Dimere (Reaktivierung der Genexpression) nahezu normal in CSB-Knockdown-Zellen verläuft. Tatsächlich zeigen letzte Untersuchungen meiner Kollegen an einer Zelllinie, die aus CSB-Patienten stammt, dass die Reparatur des TT-Dimers hauptsächlich CSB-unabhängig verläuft (Kitsera et al., 2014). Ebenso konnte in diesen Versuchen die Hemmung der Genexpression durch ein einzelnes TT-Dimer im nicht-transkribierten DNA-Strang bestätigt werden. Die negative Auswirkung, die ein TT-Dimer im nicht-transkribierten Strang verursacht, ist schwer zu erklären. Eine direkte Blockade der Transkription durch eine Läsion im nicht-transkribierten Strang erscheint unwahrscheinlich und wird gerade untersucht.

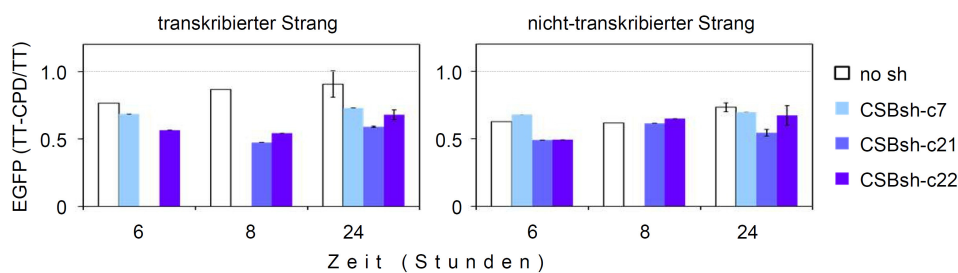


Abbildung 3-40 Einfluss des CSB-Knockdowns in HeLa-Zellen auf die Expression von Plasmiden, die ein einzelnes TT-Dimer besitzen. Durchflusszytometrische Analyse von HeLa-Zellen, deren CSB-Gen mittels shRNA herunterreguliert wurde (CSBsh-7, CSBsh-c21, CSBsh-c22), und des Kontroll-Klons (no sh), die mit dem EGFP-Reporter-Vektor, der ein einzelnes TT-Dimer innerhalb des transkribierten oder des nicht-transkribierten DNA-Stranges des EGFP-Reportergens besitzt (TT-CPD), transfiziert wurden. Die EGFP-Expression in den Zellen wurde relativ zu den mit unmodifizierten Kontroll-Plasmiden (TT) transfizierten Zellen bestimmt. Mittelwerte aus 2 Versuchen \pm Variationsbreite. Die Versuche wurden gemeinsam mit Dr. Nataliya Kitsera durchgeführt.

3.6.2.4 Einfluss des CSB-Knockdowns auf die Genexpression von 3-(Deoxyguanosin-N²-yl)-2-acetylaminofluoren-enthaltenen Reporter-Vektoren

In einer neueren Studie wurde ein anderes DNA-Addukt, namentlich 3-(Deoxyguanosin-N²-yl)-2-acetylaminofluoren (G(N²)AAF), identifiziert, welches eine unüberwindbare Barriere für die RNA-Polymerase II in vivo darstellt und in Abwesenheit des CSB-Proteins nicht über die TCR repariert werden kann, während ein TT-Dimer eine deutlich schwächeren Transkriptions-Block unter gleichen Bedingungen ausübt (Kitsera et al., 2014). Dieses AAF-Addukt stellt somit im Gegensatz zum CPD das ideale Substrat da, um die Bedeutung des CSB-Proteins für die Transkription in Gegenwart einer

blockierenden Läsion zu verifizieren. Genexpressions-Analysen ergaben, dass der pEGFP-mODC-ZAJ-Vektor mit einem einzelnen $G(N^2)AAF$ in der 5'-UTR des transkribierten DNA-Stranges des Reportergens in den CSB-profizienten-Zellen (HeLa und no sh) eine nur leicht abgeschwächte Fluoreszenz im Vergleich zum unmodifizierten Referenz-Plasmid (G:C) bewirkt (**Abbildung 3-41, A**). Die CSB-Knockdown-Zellen (CSBsh-c21) zeigen dagegen eine stark verringerte Transkription bei Anwesenheit des AAF-Adduktes. Schon nach 6 Stunden ist die Transkription des Reportergens mit der Läsion im transkribierten Strang in den beiden CSB-Knockdown-Klonen (Klon 7 und 21) deutlich schwächer als in der Kontroll-Zelllinie und bleibt auch 24 Stunden später unverändert niedrig (**Abbildung 3-41, B**). Die Lokalisation des AAF-Adduktes im nicht-transkribierten Strang des EGFP-Gens verursacht dagegen in allen Zelllinien, unabhängig vom CSB-Status, eine nur leichte Abnahme der Expression im Vergleich zur Referenz. Insgesamt bestätigen diese Ergebnisse, dass CSB unabdingbar für die Genexpression in Anwesenheit eines transkriptionsblockierenden AAF-Adduktes ist (Kitsera et al., 2014), womit auch der Beweis für die funktionelle Konsequenz des CSB-Knockdowns in den generierten HeLa-Klonen erbracht werden konnte.

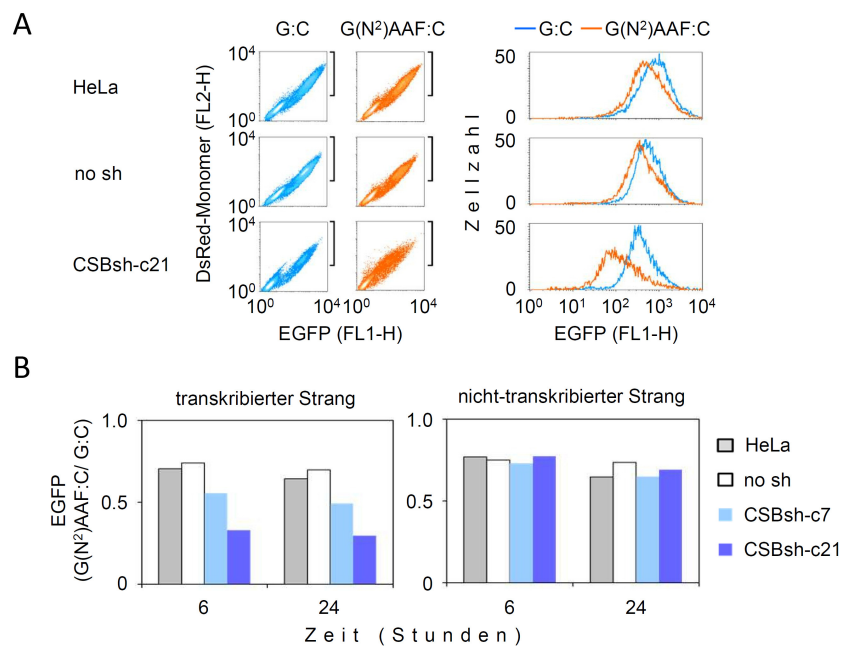


Abbildung 3-41 Einfluss des CSB-Knockdowns auf die Expression von Vektoren, die ein einzelnes $G(N^2)AAF$ innerhalb des transkribierten oder nicht-transkribierten Strang des EGFP-Reportergens besitzen. Durchflusszytometrische Analyse der Expression der Acetylaminofluoren-enthaltenen Vektoren ($G(N^2)AAF:C$) und der unmodifizierten Kontroll-Plasmide (G:C) nach der Transfektion in HeLa-Zellen, die stabil mit einem shRNA-Expressions-Vektor gegen CSB (CSBsh) oder mit einem Leervektor (no sh) transfiziert worden waren. (A) Dot-Blot-Diagramme der DsRed-Monomer- und EGFP-Fluoreszenz des Vektors mit $G(N^2)AAF$ im transkribierten DNA-Strang (links) und daraus resultierenden überlagerte Verteilungs-Diagramme der EGFP-Fluoreszenz der transfizierten Zellen (rechts) 24 Stunden nach Transfektion. Adaptiert aus (Kitsera et al., 2014). (B) Die mediane EGFP-Expression in den Zellen wurde relativ zu den mit unmodifizierten Kontroll-Plasmiden transfizierten Zellen bestimmt. Die Versuche wurden gemeinsam mit Dr. Nataliya Kitsera durchgeführt.

3.6.2.5 Genexpression von Reporter-Vektoren mit verschiedenen DNA-Modifikationen (Uracil, Thyminglykol, 8-oxoG und SSB) in CSB-Knockdown-Zellen

Durch den permanenten Knockdown des CSB-Proteins in HeLa-Zellen konnte nun der Einfluss des menschlichen CSBs auf die Expression von Reporter-Vektoren, die ein BER-Substrat (Uracil, Thyminglykol, 8-oxoG) oder ein BER-Intermediat (Einzelstrangbruch) als DNA-Modifikation im transkribierten oder nicht-transkribierten Strang des EGFP-Gens enthalten, untersucht werden. Hierzu wurden die modifizierten Expressions-Vektoren in die CSB-profizienten oder -defizienten HeLa-Zellen transfiziert. Die pTL-ZA-Vektoren mit einem spezifisch positionierten Einzelstrangbruch wurden von Dr. Thomas Lingg und Dr. Daniela Krimm erhalten (Khobta et al., 2010b) während die 8-oxoG-enthaltenen pEGFP-mODC-ZA-Plasmide von Dr. Nataliya Kitsera zur Verfügung gestellt wurden (Kitsera et al., 2011). Kurze Zeit nach der Einschleusung in die Host-Zellen bewirkten ein Uracil gepaart mit Adenin (U:A) oder ein Thyminglykol (Tg:A) unabhängig von der Lokalisation in den Vektoren wenn überhaupt eine nur marginale Abnahme der Expression relativ zum Referenz-Plasmid (T:A) (**Abbildung 3-42**). Durch die Wahl eines früheren Zeitpunktes zur Fixierung der Zellen (6 Stunden im Gegensatz zu den 8 Stunden aus früheren Versuchen, siehe Kapitel 3.5.2) nach Transfektion der Thyminglykol-enthaltenen Vektoren konnte klar nachgewiesen werden, dass diese Läsion selbst keine direkte Blockade der RNA-Polymerase II auszulösen vermag. Auch ein einzelnes 8-oxoG übte strangunabhängig kurze Zeit nach der Einschleusung in die Host-Zellen keinen Einfluss auf die Transkription des Reportergens aus (**Abbildung 3-42**). Dieses Ergebnis bekräftigt die Daten aus anderen Studien, nach denen 8-oxoG keine Transkriptions-blockierende Läsion ist (Kitsera et al., 2011), (Allgayer et al., 2013). Im Gegensatz dazu bedingt ein Einzelstrangbruch (SSB, mit 3'-OH und 5'-Phosphat-Ende) unabhängig davon, ob er im transkribierten oder nicht-transkribierten Strang positioniert ist, schon frühzeitig eine stark verringerte EGFP-Fluoreszenz (**Abbildung 3-42**). Bei allen drei Substraten der BER (Uracil, Thyminglykol und 8-oxoG) ist eine zeitabhängige Abnahme der Genexpression zu erkennen, was ein BER-Intermediat (höchstwahrscheinlich ein SSB) als gemeinsamen Auslöser vermuten lässt. Im Falle des U:A-Basenpaares konnte dies durch den Knockdown der Glykosylasen UNG1/2 nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.3.2.3) und auch für ein 8-oxoG wurde die Rolle von OGG1 bei der Inhibierung der Transkription durch diese Läsion bereits demonstriert (Kitsera et al., 2011). Die nahezu unverändert starke Genexpression bei Lokalisation von 8-oxoG im transkribierten DNA-Strang, lässt sich durch den dabei vorliegenden Sequenzkontext erklären, bei dem die Basenmodifikation nur sehr schwach von OGG1 prozessiert wird (Allgayer et al., 2013). Bei keiner der untersuchten Läsionen konnte eine Auswirkung des CSB-Knockdowns auf die Genexpression der modifizierten Vektoren beobachtet werden. Dies bedeutet, dass das CSB-Protein in menschlichen Zellen keine essentielle Funktion bei der Transkription in Anwesenheit dieser

BER-Substrate/Intermediate besitzt und auch die Inhibierung der Genexpression unabhängig von CSB erfolgt.

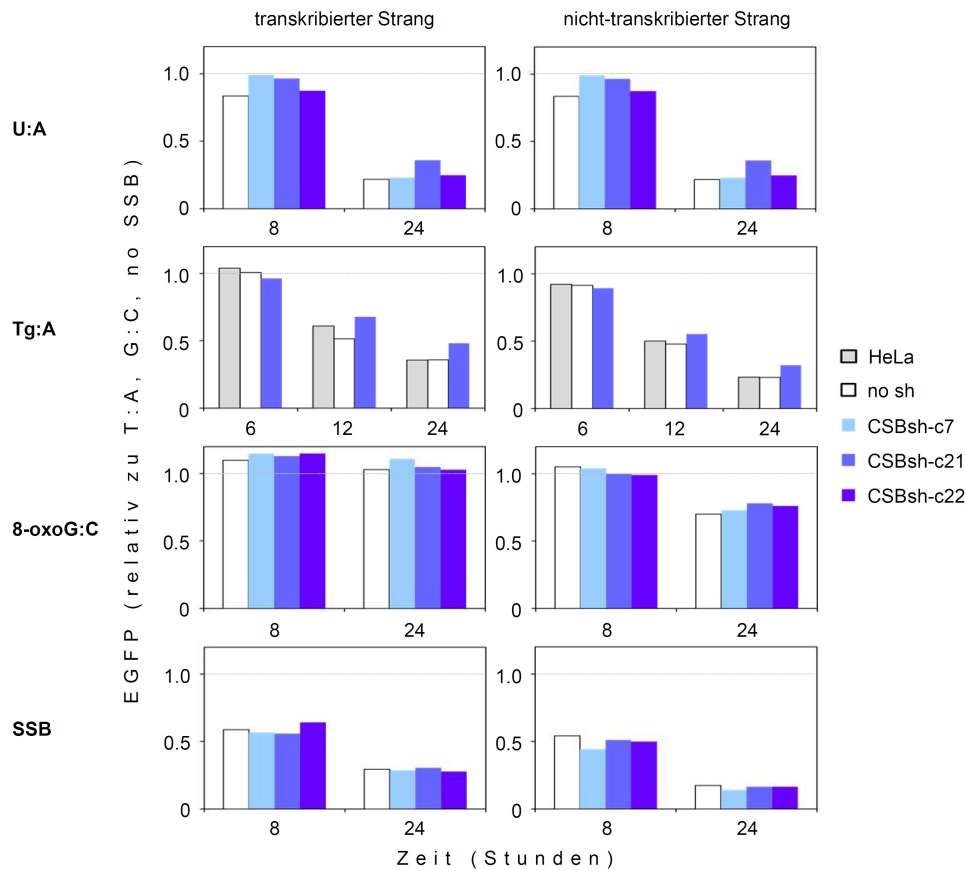


Abbildung 3-42 Expression eines Reporter-Vektors, der ein Uracil (U:A-Baenpaar), Thyminglykol (Tg:A), 8-Oxo-7,8-dihydroguanin (8-oxoG) oder Einzelstrangbruch (SSB, mit 3'-OH und 5'-Phosphat-Ende) enthält, in CSB-Knockdown-Zellen. Die Läsionen waren innerhalb des transkribierten oder nicht-transkribierten DNA-Stranges des EGFP-Gens lokalisiert. Die durchflusszytometrische Analyse der Expression erfolgte nach der Transfektion der Reporter-Vektoren in die HeLa-Wildtyp-Zellen, die CSB-Knockdown-Klone (CSBsh) oder die Kontroll-Klone (no sh). Die jeweilige EGFP-Fluoreszenz der Zellen wurde relativ zu der mit unmodifizierten Kontroll-Vektoren (T:A, G:C, no SSB) transfizierten Zellen bestimmt.

4. Diskussion

4.1 Verringerte Genexpression durch ein einzelnes Uracil in der DNA

DNA-Schäden können nicht nur zu Mutationen führen und damit die Krebsentstehung einleiten, sondern auch mit der Expression des geschädigten Gens interferieren. Zahlreiche Läsionen stellen ein Hindernis für die elongierende RNA-Polymerase dar, insbesondere, wenn sie im transkribierten DNA-Strang auftreten (Khobta & Epe, 2012). Dies kann die Expression lebenswichtiger Proteine, besonders wenn diese nur kurze mRNA- und Protein-Halbwertszeiten besitzen, beeinträchtigen. Neben sperrigen Läsionen, wie CPDs und 6-4-PPs (Donahue et al., 1994), (Tornaletti et al., 1997), (Selby et al., 1997), (Mei Kwei et al., 2004), die durch UV-Bestrahlung generiert werden, können auch Einzelstrangbrüche (Kathe et al., 2004); (Roy et al., 2010) mit der Transkriptions-Maschinerie interferieren. Diese können sowohl durch reaktive Sauerstoffspezies in der Zelle entstehen, als auch bei zahlreichen enzymatischen Vorgängen wie der Transkription oder Replikation als Zwischenprodukte gebildet werden (Caldecott, 2008), (Wang, 2002). Auch die Korrektur von DNA-Basenmodifikationen über die BER führt unweigerlich über die Bildung dieser potentiell toxischen Intermediate. Eine der am häufigsten vorkommenden DNA-Läsion, die zudem über diesen Reparaturweg aus der DNA entfernt wird, ist Uracil.

Um zu untersuchen, welche Auswirkungen Uracil und dessen Reparatur auf die Genexpression ausüben, wurden Expressions-Vektoren konstruiert, bei denen ein einzelnes Uracil gepaart mit Adenin (U:A) oder fehlgepaart mit Guanin (U:G) im transkribierten oder nicht-transkribierten DNA-Strang innerhalb eines EGFP-Reportergens eingebaut wurde. Des Weiteren wurden die BER-initiiierenden Uracil-DNA-Glykosylasen UNG1/2, SMUG1 oder TDG mittels shRNA in HeLa-Zellen permanent herunterreguliert sowie bereits generierte UDG-defiziente LN428-Glioblastoma-Zellen verwendet. Die Transfektion der konstruierten Expressions-Vektoren in menschliche Zellen (HeLa und MRC-5) ergab, dass ein einzelnes Uracil, unabhängig davon ob es gepaart mit Adenin vorliegt oder mit Guanin eine Fehlpaarung ausbildet, keine direkte Blockade der RNA-Polymerase II verursacht. Dies lässt sich daran erkennen, dass zu einem frühen Zeitpunkt nach der Einschleusung der Uracil-enthaltenen Vektoren in die Zellen deren Expression identisch mit der der unmodifizierten Kontroll-Vektoren ist (**Abbildungen 3-6, 3-15 und 3-18**). Die im Anschluss daran auftretende und mit der Zeit stetig zunehmende Inhibierung der Genexpression in Anwesenheit des Schadens lässt vermuten, dass erst die intrazelluläre Prozessierung dieser Läsion der Auslöser für die verringerte Transkription des Reportergens darstellt. Diese Schlussfolgerung stimmt mit Ergebnissen aus zellfreien Transkriptions-Assays überein, bei denen Uracil keine direkte Blockade der RNA-Polymerase II bewirkt (Kuraoka et al., 2003), sondern erst Reparatur-Intermediate wie

Einzelstrangbrüche hierzu befähigt sind (Kathe et al., 2004). Als weitere Basenmodifikation, die über die BER in den Zellen entfernt wird, wurde 5-hmU untersucht. Genexpressions-Analysen mit Vektoren, die diese Läsion enthielten, zeigten ebenso wie die Uracil-enthaltenen Vektoren eine erst mit der Zeit zunehmende Inhibierung der Transkription, was beweist, dass auch 5-hmU per se keinen direkten Einfluss auf die Transkriptions-Maschinerie besitzt (**Abbildung 3-17**). Neben Uracil und 5-hmU konnte auch eine dritte Basenmodifikation, Thyminglykol, keine direkt Blockade der Transkription bewirken. Auch hier wurde erst in Folge ihrer intrazellulären Prozessierung eine zunehmende Inhibierung der Genexpression ausgelöst (**Abbildungen 3-31 und 3-42**). Dahingegen existieren aus zellfreien Versuchen unterschiedliche Ergebnisse über das Transkriptions-blockierende Potential dieser Läsion, so dass eine Studie der RNA-Polymerase eine effiziente Überwindung des Schadens einräumt (Tornaletti et al., 2001), während andere eine Blockade der Transkriptions-Maschinerie beobachten (Kathe et al., 2004), (Kuraoka et al., 2007). Die Differenzen könnten auf der An- und Abwesenheit von verschiedenen Elongations-Faktoren in den Transkriptions-Assays beruhen, die der Polymerase bei der Überwindung des Schadens helfen (Charlet-Berguerand et al., 2006).

4.2 Die Rolle einzelner UDGs bei der Inhibierung der Genexpression durch ein U:A- und 5-hmU:A-Basenpaar und einer U:G-Fehlpaarung

Die Beobachtung, dass die untersuchten BER-Substrate (Uracil, 5-hmU und Thyminglykol) eine ähnliche verzögerte Abnahme der Expression des Reportergens verursachen, lassen die BER als gemeinsamen Auslöser der Inhibierung vermuten. Unterstützend zu dieser Hypothese konnte im Falle der bifunktionellen Glykosylase OGG1 gezeigt werden, dass erst die von ihr katalysierte Exzision der Basenmodifikation 8-oxoG die Transkription zum Erliegen bringt (Kitsera et al., 2011), (Allgayer et al., 2013). Dass ebenso die Initiierung der BER über monofunktionelle Glykosylasen eine Inhibierung der Transkription zur Folge haben kann, konnte im Rahmen dieser Arbeit in Zellen, deren SMUG1-Glykosylase mittels shRNA permanent herunterreguliert worden war, bewiesen werden. Fehlt die für die Exzision von 5-hmU zuständige SMUG1-Glykosylase, konnte die zeitabhängige Abnahme der Genexpression des 5-hmU-enthaltenen Vektors im Vergleich zum Kontroll-Plasmid nahezu vollständig verhindert werden (**Abbildungen 3-17 und 3-21**). Dies beweist zudem, dass ein 5-hmU:A-Basenpaar ausschließlich von SMUG1 prozessiert wird.

Host cell reactivations der Vektoren, die Uracil gepaart mit Adenin enthalten, ergaben, dass der Knockdown von UNG1/2 in HeLa-Zellen eine deutliche Retardierung des negativen Effektes auf die Transkription bewirkt, während weder die verringerte Expression der SMUG1- noch der der TDG-Glykosylase Auswirkungen zeigte (**Abbildungen 3-15 und 3-16**). Dies beweist, dass UNG1/2 hauptverantwortlich für die Exzision dieser Läsion in den Zellen ist und für die Inhibierung der Transkription in Anwesenheit eines U:A-Basenpaares verantwortlich ist. Die dominante Rolle dieser

Glykosylase bei der Exzision von Uracil aus einer Paarung mit Adenin konnte zudem durch Analysen der Einschnitts-Aktivitäten von HeLa-Zellextrakten nachgewiesen werden. In diesen führte die verringerte Expression von UNG1/2 zu einem nahezu kompletten Verlust der Inzision des Plasmid-Substrates, welches ein U:A-Basenpaar enthält (**Abbildung 3-14**). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit früheren zellfreien Versuchen, die auf Immunodepletierung der UDGs basieren und UNG1/2 als hauptverantwortliche Glykosylase zur Entfernung eines U:A-Basenpaares identifizierten (Kavli et al., 2002), (Kavli et al., 2005), (Visnes et al., 2008). Eine Beteiligung der SMUG1- oder TDG-Glykosylase an der U:A-Prozessierung erscheint unwahrscheinlich, da der Knockdown der beiden UDGs weder die Einschnitts-Aktivität der Zellextrakte gegenüber den Uracil-enthaltenen Plasmid-Substraten noch die durch Uracil verursachte Suppression der Transkription der Vektoren beeinflussen konnte (**Abbildungen 3-14 und 3-16**).

Im Falle einer U:G-Fehlpaarung hatte der Knockdown der Glykosylase UNG1/2 zu keinem der drei Zeitpunkte nach der Transfektion Auswirkungen auf die mit der Zeit abnehmende Genexpression der Vektoren (**Abbildungen 3-18 und 3-23**). Dieses Ergebnis lässt sich sowohl in den HeLa- als auch den Glioblastoma-Zellen beobachten und bedeutet, dass UNG1/2 keine entscheidende Rolle bei der Prozessierung einer U:G-Fehlpaarung einnimmt. Übereinstimmend damit konnte bei Untersuchungen der Einschnitts-Aktivität der Zellextrakte die Inzision des Uracil-enthaltenen Substrates zwar abgeschwächt, aber nicht vollkommen inhibiert werden, wenn die Expression der UNG1/2-Glykosylase verringert war (**Abbildungen 3-14 und 3-22**). Dies zeigt, dass UNG1/2 an der Exzision von Uracil, wenn diese Läsion fehlgepaart mit Guanin auftritt, zwar beteiligt ist, aber nicht alleine für die Entfernung der Läsion zuständig ist. Auch andere zellfreie Studien lassen eine Beteiligung von anderen Glykosylasen (SMUG1 und TDG) neben UNG1/2 an der Reparatur dieses DNA-Schadens vermuten (Kavli et al., 2002), (Visnes et al., 2008). Jedoch konnte gezeigt werden, dass SMUG1 oder TDG weder bei der Einschnitts-Aktivität der Zellextrakte gegenüber dem fehlgepaarten Uracil (**Abbildungen 3-14 und 3-22**) noch bei der negativen Auswirkung dieser Läsion auf die Transkription eine bedeutende Rolle spielt (**Abbildungen 3-19 und 3-23**). Die restliche Einschnitts-Aktivität der U:G-Plasmide in den UNG1/2-Knockdown Zellen könnte auch von MBD4 herrühren. Jedoch ist diese Glykosylase vornehmlich im CpG-Kontext aktiv (Hendrich et al., 1999), (Petronzelli et al., 2000a), welcher in den eingesetzten Vektoren nicht vorhanden war. Auch konnte in Versuchen mit Antikörpern gegen UNG1/2, SMUG1 und TDG beobachtet werden, dass bei gleichzeitigem Einsatz dieser die BER-Aktivität gegenüber einer U:G-Fehlpaarung in Zellextrakten nahezu vollständig inhibiert werden konnte (Visnes et al., 2008), was zeigt, dass dieser Glykosylase eine untergeordnete Rolle bei der Prozessierung einer U:G-Fehlpaarung zukommt. Eine weitere Möglichkeit, die in Betracht gezogen werden muss, ist, dass beim Knockdown von einer UDG andere UDGs an deren

Stelle einspringen und die Exzision von Uracil katalysieren und damit den Ausfall der erstgenannten kompensieren können.

Neben der Prozessierung über verschiedene UDGs existieren zudem Berichte, die der Mismatch-Reparatur (MMR) eine Beteiligung an der Beseitigung der U:G-Fehlpaarung einräumen. So konnte zum einen die Bindung von MMR-Proteinen an ein fehlgepaartes Uracil gezeigt (Wilson et al., 2005), als auch die Korrektur der Fehlpaarung über diesen Reparaturweg nachgewiesen werden, sofern auch gleichzeitig ein nahegelegener Einzelstrangbruch oder weiteres Uracil in der DNA vorhanden ist (Schanz et al., 2009). Die Möglichkeit der Prozessierung der U:G-Fehlpaarung über die MMR wurde in dieser Arbeit berücksichtigt. Um zu sehen welchen Einfluss der MMR-Reparaturweg auf die Genexpression ausübt, wurden Host cell reactivations mit Reporter-Vektoren durchgeführt, die eine einzelne T:G-Fehlpaarung, als klassisches MMR-Substrat, enthielten. Jedoch zeigten die Genexpressions-Analysen, dass eine T:G-Fehlpaarung, eine der U:G-Fehlpaarung gegensätzliche Auswirkung auf die Genexpression hat, bei der die Transkription des Reportergens mit zunehmender Zeit anstieg (**Abbildung 3-7**). Dies lässt eine unterschiedliche Prozessierung der beiden Fehlpaarungen in der Zelle vermuten.

Des Weiteren konnte in Versuchen demonstriert werden, dass unabhängig von der Glykosylase die AP-Endonuklease 1 auch direkt dazu befähigt ist die Inzision des DNA-Stranges bei einer U:G-Fehlpaarung zu katalysieren (Prorok et al., 2013). Der sogenannte Nukleotid-Inzisions-Reparaturweg (NIR) stellt somit eine naheliegende Erklärung da, um die verringerte Genexpression trotz Knockdown des UNG-Gens zu erklären.

4.3 Genexpression von Reporter-Vektoren mit verschiedenen DNA-Modifikationen in CSB-Knockdown-Zellen

Basierend auf zahlreichen Berichten kommt dem CSB-Protein eine besondere Rolle bei der Transkription in Gegenwart von DNA-Schäden zu. Zum einen ist CSB an der transkriptionsgekoppelten Nukleotid-Exzisions-Reparatur (TCR) von Basenmodifikationen, die einen Arrest der transkribierenden RNA-Polymerase verursachen, beteiligt (Fousteri & Mullenders, 2008). Zum anderen kann CSB auch der elongierenden RNA-Polymerase dabei helfen, Transkriptionsblockierende Läsionen zu überwinden, was im Falle von Thyminglykol und 8-oxoG beobachtet werden konnte (Charlet-Berguerand et al., 2006). Außerdem wird behauptet, dass CSB sowohl indirekt über eine erhöhte Genexpression (OGG1) als auch durch direkte Interaktion (OGG1, NEIL1, APE1) die Effizienz von Enzymen der BER erhöhen kann (Muftuoglu et al., 2009), (Wong et al., 2007), (Thorslund et al., 2005), (Tuo et al., 2002), (Dianov et al., 1999), (Javeri et al., 2011). Darüber hinaus wird das Protein mit der Remodellierung von Chromatin in Verbindung gebracht (Citterio et al.,

2000). Es wäre somit denkbar, dass das CSB-Protein auf mehreren Ebenen Einfluss auf die Genexpression in Gegenwart von BER-Substraten einnehmen kann. In *Csb^{mut/mut}*-Maus-Embryo-Fibroblasten wurde im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen eine starke Inhibierung der Transkription des Reportergens in Gegenwart eines Thyminglykols beobachtet (**Abbildung 3-34**). Dies konnte in denselben Zelllinien auch für weitere DNA-Basenmodifikationen wie Uracil, AP-Läsion (Lühnsdorf, 2010), 8-oxoG (Kitsera et al., 2011) und einem Einzelstrangbruch (Khobta et al., 2010b) festgestellt werden. Jedoch ist dieses Maus-Modell nicht geeignet, um den Einfluss des CSB-Proteins zu untersuchen. So zeigten Genexpressions-Analysen der Wildtyp-MEFs, dass im Gegensatz zu menschlichen Zellen keine Inhibierung der Transkription durch ein Thyminglykol 24 Stunden nach der Transfektion verursacht wird (vergleiche **Abbildung 3-31 und 3-34**). Außerdem konnte in den CSB-defizienten MEFs eine unerwartet starke Abnahme der Genexpression von Vektoren mit einem Einzelstrangbruch detektiert werden, was im Gegensatz zu den Ergebnissen steht, die aus menschlichen Zellen eines CSB-Patienten erhalten wurden (Khobta et al., 2010b). Der unterschiedliche Phänotyp der Mauszellen und der menschlichen Zellen machte es nötig ein menschliches, isogenes Zell-Modell zu generieren, um Aufschlüsse über die Funktion des CSB-Proteins zu erhalten. Hierfür wurde das CSB-Protein in HeLa-Zellen permanent mittels shRNA herunter reguliert (**Abbildung 3-35**). In diesen konnte die CSB-abhängige TCR der Transkriptionsblockierenden Läsion G(N²)AAF vollständig verhindert werden, wenn die Modifikation im transkribierten DNA-Strang lokalisiert worden war (**Abbildung 3-41**), womit der Beweis für den funktionellen Knockdown geliefert werden konnte. Bei der anschließenden Untersuchung von Vektoren, die ein Uracil (U:A), Thyminglykol, 8-oxoG oder einen Einzelstrangbruch (mit 3'-OH und 5'-Phosphat-Ende) enthielten, konnte kein Effekt der verringerten CSB-Expression auf die Transkription des Reportergens ausgemacht werden (**Abbildung 3-42**). Dies zeigt, dass CSB keine essentielle Funktion bei der Transkription in Gegenwart der untersuchten BER-Substrate/Intermediate hat.

4.4 Mechanismus und biologische Bedeutung der Inhibierung der Genexpression durch DNA-Glykosylasen: ein Ausblick

Von Zellen des Immunsystems ist bekannt, dass Cytosin in viraler DNA durch Mitglieder der APOBEC-Familie desaminiert wird, was eine UNG2-abhängige Degradierung der nicht-genomischen DNA zur Folge hat (Stenglein et al., 2010). Um zu testen, ob ein einzelnes Uracil in den konstruierten Reporter-Vektoren den Abbau der DNA induzieren kann, wurde mittels RT-qPCR die Plasmid-DNA der Zellen nach der Transfektion quantifiziert. Dabei hatte ein U:A-Basenpaar eine verminderte Aufnahme bzw. Stabilität der DNA in den Zellen zur Folge (**Abbildung 3-8**). Jedoch konnte dies bei weitem nicht die Stärke des negativen Effektes dieser Läsion auf Proteinebene erklären. In Übereinstimmung damit wurde zusätzlich zu den verringerten DNA-Leveln auch eine Abnahme des

mRNA-Transkriptes des U:A-enhaltenen Reportergens beobachtet (**Abbildung 3-8**). Diese überwiegt deutlich und zeigt, dass die verringerte Transkription hauptverantwortlich für die inhibierte Genexpression in Gegenwart eines U:A-Basenpaares ist. Ebenso wirken auch bei einem Thyminglykol sowohl die verminderte DNA-Menge als auch die verringerte Transkription auf die abnehmende Genexpression der transfizierten Vektoren ein (**Abbildung 3-32**). Schließlich konnte auch für ein mit Guanin fehlgepaartes Uracil verringerte mRNA-Level detektiert werden, wobei die DNA-Kopienzahl unverändert blieb (**Abbildung 3-8**). Somit scheint der negative Effekt auf die Transkription des Reportergens eine allgemeine Eigenschaft aller untersuchten Läsionen zu sein. Des Weiteren waren bei allen untersuchten DNA-Basenmodifikationen die Auswirkungen auf die Plasmid-DNA und das mRNA-Transkript unabhängig davon, ob das EGFP-Gen abseits von der Läsion (upstream) amplifiziert wurde oder ob das Amplikon so gewählt wurde, dass es die Position des Schadens mit einschließt. Dies bedeutet einerseits, dass die Modifikationen keinen Abbruch der Transkription unter Bildung eines verkürzten Transkripts bewirken können und lässt damit einen Signalmechanismus vermuten, über den die BER-Komponenten oder –Intermediate mit Promoter-Elementen kommunizieren.

Interessanterweise besitzt eine U:G-Fehlpaarung einen deutlich schwächeren Effekt auf die Genexpression als ein U:A-Basenpaar (**Abbildung 3-6**), obwohl die Einschnitts-Aktivität von Zellextrakten gegenüber der Fehlpaarung wesentlich effizienter ist (**Abbildungen 3-10 und 3-11**). Möglicherweise könnte dieser Unterschied daher rühren, dass beide Uracile je nach Basenpaarung von anderen Glykosylasen oder Reparaturmechanismen prozessiert werden. So könnte ein direkter Einschnitt der DNA bei der U:G-Fehlpaarung durch die APE1 erfolgen (Prorok et al., 2013), während das U:A-Basenpaar zunächst über UNG1/2 in der Zelle prozessiert wird, bevor es Substrat für die Endonuklease darstellt. Ebenso denkbar wäre es, dass die U:G-Fehlpaarung neben der Basen-Exzisions- oder Nukleotid-Inzisions-Reparatur zusätzlich auch im geringen Maße über die Mismatch-Reparatur aus der DNA entfernt wird. So konnte bei einem klassischen MMR-Substrat, einer T:G-Fehlpaarung, nach anfänglicher Inhibierung eine partielle Reaktivierung der Transkription beobachtet werden (**Abbildung 3-7**). Das Zusammenspiel der MMR-verursachten Reaktivierung und der BER- oder NIR-initiierten Inhibierung könnte den schwächere Effekt auf die Genexpression der U:G-Fehlpaarung gegenüber dem U:A-Basenpaar erklären. Neben den mechanistischen Unterschieden könnten auch kinetische Differenzen bei der Prozessierung der Läsionen die verschieden starke Auswirkung des U:A-Basenpaares und der U:G-Fehlpaarung erklären. Sofern die Verweildauer der auftretenden Reparatur-Intermediate (z.B. Einzelstrangbrüche) proportional zu der inhibierten Transkription ist, könnte eine unterschiedliche Kinetik bei der Prozessierung der nach der Exzision von Uracil entstandenen apyrimidinischen Stelle der Grund hierfür sein. Eine bessere Kopplung der einzelnen Reparaturschritte der AP-Läsion, wenn diese gegenüber Guanin lokalisiert ist, könnte die Wahrscheinlichkeit einer Kollision der RNA-Polymerase II mit dem Intermediat verringern und damit

eine geringere Beeinträchtigung der Transkription bedingen. In der Tat konnten in BER-Assays mit Zellextrakten sowohl Uracil als auch der AP-Läsion eine schnellere Reparatur nachgewiesen werden, wenn diese gegenüber Guanin anstatt Adenin positioniert war (Visnes et al., 2008).

Das Auftreten von toxischen Intermediaten bei der BER einer Läsion ist eine unvermeidbare Konsequenz dieses Reparaturweges. Da in vorangegangener Arbeit gezeigt werden konnte, dass der negative Effekt einer einzelnen AP-Läsion in einem Reporter-Vektor ähnlich wie Uracil erst zeitlich verzögert eintritt, erscheint dieses frühe Zwischenprodukt nicht der direkte Auslöser für die verringerte Transkription zu sein (Lühnsdorf, 2010). Dagegen konnten schon mehrere Studien einem Einzelstrangbruch in vitro eine negative Auswirkung auf die Transkription bescheinigen (Kathe et al., 2004), (Roy et al., 2010). Auch in Genexpressions-Analysen bewirkt ein Einzelstrangbruch im Reporter-Vektor eine frühzeitige Inhibierung der Transkription (**Abbildung 3-42**). Sollte tatsächlich dieses Reparatur-Intermediat der Auslöser für die verringerte Expression sein, käme den Polymerasen und Ligasen der BER eine besonders kritische Rolle in diesem Prozess zu, da diese zur weiteren Prozessierung der intermediär gebildeten Einzelstrangbrüche benötigt werden und die Verzahnung der einzelnen Reparaturschritte über die Verweildauer der jeweiligen Intermediate in der Zelle bestimmt.

Abschließend soll über die mögliche physiologische Bedeutung der inhibierten Genexpression, die ein einzelnes Uracil bewirken kann, diskutiert werden. Und in der Tat gibt es Momente, in denen eine unterdrückte Transkription durchaus sinnvoll erscheint. So ist zum Beispiel bekannt, dass eine Kollision der Transkription und Replikation genomische Instabilität zur Folge hat (Aguilera & Garcia-Muse, 2013), (Helmrich et al., 2013). Das während der Replikation fehleringebaute dUMP könnte somit durch eine verringerte Transkription des naszierenden DNA-Stranges dieser Gefahr für die Zelle entgegen wirken. Ebenso denkbar wäre es, dass die APOBEC-Enzym-katalysierte massive Generierung von Uracil in viraler DNA nicht nur die Degradierung der Fremd-DNA in den Zellen des Immunsystems zur Folge hat (Stenglein et al., 2010), sondern gleichzeitig auch die Genexpression der viralen DNA verhindern soll. In diesem Falle käme der Prozessierung von Uracil eine Rolle bei der angeborenen Immunabwehr zu.

Zusammenfassend zeigen die Resultate, die im Rahmen dieser Arbeit erzielt wurden, dass ein einzelnes Uracil, sowohl wenn es mit Adenin gepaart ist, als auch wenn es eine Fehlpaarung mit Guanin ausbildet, keine direkte Blockade der RNA-Polymerase II verursachen kann. Vielmehr ist erst die Exzision der Läsion durch die Glykosylase und die damit verbundene Initiierung der Basen-Exzisions-Reparatur der Auslöser für die niedrige Expression des Reportergens. Im Falle des U:A-Basenpaares ist UNG1/2 für die Prozessierung und damit auch für die abnehmende Genexpression in den HeLa-Zellen verantwortlich. Dahingegen konnte bei der U:G-Fehlpaarung für keine der

untersuchten Uracil-DNA-Glykosylasen (UNG1/2, SMUG1 oder TDG) beobachtet werden, dass diese eine Rolle bei der Exzision der Läsion oder der verringerte Genexpression spielen. Das lässt den Einfluss einer weiteren Glykosylase oder eines anderen Reparatur-Mechanismus (z.B. direkter Einschnitt des lädierten DNA-Stranges durch APE1) vermuten. Ein Modelvorschlag für die Inhibierung der Transkription in den HeLa-Zellen ist in **Abbildung 4-1** gezeigt.

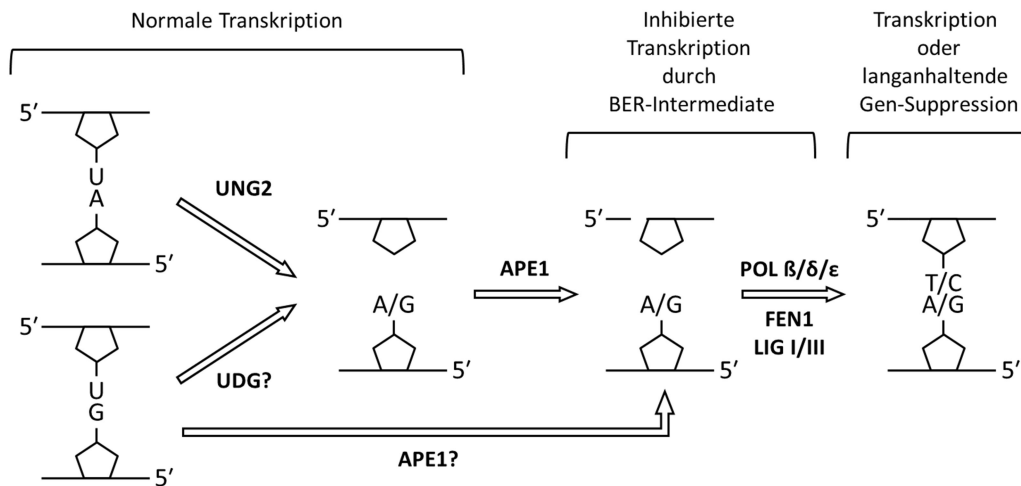


Abbildung 4-1 Model zur Inhibition der Transkription durch Uracil in der DNA.

5. Literaturverzeichnis

AGUILERA, A. & GARCIA-MUSE, T. (2013). Causes of genome instability. *Annu Rev Genet* 47, 1-32.

AKBARI, M., OTTERLEI, M., PENA-DIAZ, J., AAS, P. A., KAVLI, B., LIABAKK, N. B., HAGEN, L., IMAI, K., DURANDY, A., SLUPPHAUG, G. & KROKAN, H. E. (2004). Repair of U/G and U/A in DNA by UNG2-associated repair complexes takes place predominantly by short-patch repair both in proliferating and growth-arrested cells. *Nucleic Acids Res* 32, 5486-98.

AKBARI, M., VISNES, T., KROKAN, H. E. & OTTERLEI, M. (2008). Mitochondrial base excision repair of uracil and AP sites takes place by single-nucleotide insertion and long-patch DNA synthesis. *DNA Repair (Amst)* 7, 605-16.

ALLGAYER, J., KITSER, N., VON DER LIPPEN, C., EPE, B. & KHOBTA, A. (2013). Modulation of base excision repair of 8-oxoguanine by the nucleotide sequence. *Nucleic Acids Res* 41, 8559-71.

AN, Q., ROBINS, P., LINDAHL, T. & BARNES, D. E. (2005). C → T mutagenesis and gamma-radiation sensitivity due to deficiency in the Smug1 and Ung DNA glycosylases. *EMBO J* 24, 2205-13.

ANDERSEN, S., HEINE, T., SNEVE, R., KONIG, I., KROKAN, H. E., EPE, B. & NILSEN, H. (2005). Incorporation of dUMP into DNA is a major source of spontaneous DNA damage, while excision of uracil is not required for cytotoxicity of fluoropyrimidines in mouse embryonic fibroblasts. *Carcinogenesis* 26, 547-55.

BAPAT, A., FISHEL, M. L. & KELLEY, M. R. (2009). Going ape as an approach to cancer therapeutics. *Antioxid Redox Signal* 11, 651-68.

BARZILAY, G., MOL, C. D., ROBSON, C. N., WALKER, L. J., CUNNINGHAM, R. P., TAINER, J. A. & HICKSON, I. D. (1995). Identification of critical active-site residues in the multifunctional human DNA repair enzyme HAP1. *Nat Struct Biol* 2, 561-8.

BELLACOSA, A., CICCHILLITTI, L., SCHEPIS, F., RICCIO, A., YEUNG, A. T., MATSUMOTO, Y., GOLEMIS, E. A., GENUARDI, M. & NERI, G. (1999). MED1, a novel human methyl-CpG-binding endonuclease, interacts with DNA mismatch repair protein MLH1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3969-74.

BOITEUX, S. & GUILLET, M. (2004). Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* 3, 1-12.

BOORSTEIN, R. J., CUMMINGS, A., JR., MARENSTEIN, D. R., CHAN, M. K., MA, Y., NEUBERT, T. A., BROWN, S. M. & TEEBOR, G. W. (2001). Definitive identification of mammalian 5-hydroxymethyluracil DNA N-glycosylase activity as SMUG1. *J Biol Chem* 276, 41991-7.

BRUMMELKAMP, T. R., BERNARDS, R. & AGAMI, R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296, 550-3.

CALDECOTT, K. W. (2008). Single-strand break repair and genetic disease. *Nat Rev Genet* 9, 619-31.

CAULFIELD, J. L., WISHNOK, J. S. & TANNENBAUM, S. R. (1998). Nitric Oxide-induced Deamination of Cytosine and Guanine in Deoxynucleosides and Oligonucleotides. *Journal of Biological Chemistry* 273, 12689-12695.

- CHAN, M. K., OCAMPO-HAFALLA, M. T., VARTANIAN, V., JARUGA, P., KIRKALI, G., KOENIG, K. L., BROWN, S., LLOYD, R. S., DIZDAROGLU, M. & TEEBOR, G. W. (2009). Targeted deletion of the genes encoding NTH1 and NEIL1 DNA N-glycosylases reveals the existence of novel carcinogenic oxidative damage to DNA. *DNA Repair (Amst)* 8, 786-94.
- CHARLET-BERGUERAND, N., FEUERHAHN, S., KONG, S. E., ZISERMAN, H., CONAWAY, J. W., CONAWAY, R. & EGLY, J. M. (2006). RNA polymerase II bypass of oxidative DNA damage is regulated by transcription elongation factors. *EMBO J* 25, 5481-91.
- CITTERIO, E., VAN DEN BOOM, V., SCHNITZLER, G., KANAAR, R., BONTE, E., KINGSTON, R. E., HOEIJMAKERS, J. H. & VERMEULEN, W. (2000). ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor. *Mol Cell Biol* 20, 7643-53.
- CORTAZAR, D., KUNZ, C., SELFRIDGE, J., LETTIERI, T., SAITO, Y., MACDOUGALL, E., WIRZ, A., SCHUERMAN, D., JACOBS, A. L., SIEGRIST, F., STEINACHER, R., JIRICNY, J., BIRD, A. & SCHAR, P. (2011). Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability. *Nature* 470, 419-23.
- CORTELLINO, S., XU, J., SANNAI, M., MOORE, R., CARETTI, E., CIGLIANO, A., LE COZ, M., DEVARAJAN, K., WESSELS, A., SOPRANO, D., ABRAMOWITZ, L. K., BARTOLOMEI, M. S., RAMBOW, F., BASSI, M. R., BRUNO, T., FANCIULLI, M., RENNER, C., KLEIN-SZANTO, A. J., MATSUMOTO, Y., KOBİ, D., DAVIDSON, I., ALBERTI, C., LARUE, L. & BELLACOSA, A. (2011). Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell* 146, 67-79.
- DALTON, S. R. & BELLACOSA, A. (2012). DNA demethylation by TDG. *Epigenomics* 4, 459-67.
- DAVID, S. S., O'SHEA, V. L. & KUNDU, S. (2007). Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 447, 941-50.
- DI NOIA, J. M. & NEUBERGER, M. S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annual Review of Biochemistry, Vol 79* 76, 1-22.
- DIANOV, G., BISCHOFF, C., SUNESEN, M. & BOHR, V. A. (1999). Repair of 8-oxoguanine in DNA is deficient in Cockayne syndrome group B cells. *Nucleic Acids Res* 27, 1365-8.
- DONAHUE, B. A., YIN, S., TAYLOR, J. S., REINES, D. & HANAWALT, P. C. (1994). Transcript cleavage by RNA polymerase II arrested by a cyclobutane pyrimidine dimer in the DNA template. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8502-6.
- DOSETH, B., EKRE, C., SLUPPHAUG, G., KROKAN, H. E. & KAVLI, B. (2012). Strikingly different properties of uracil-DNA glycosylases UNG2 and SMUG1 may explain divergent roles in processing of genomic uracil. *DNA Repair (Amst)* 11, 587-93.
- DOSETH, B., VISNES, T., WALLENIS, A., ERICSSON, I., SARNO, A., PETTERSEN, H. S., FLATBERG, A., CATTERALL, T., SLUPPHAUG, G., KROKAN, H. E. & KAVLI, B. (2011). Uracil-DNA glycosylase in base excision repair and adaptive immunity: species differences between man and mouse. *J Biol Chem* 286, 16669-80.
- FORTINI, P. & DOGLIOTTI, E. (2007). Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst)* 6, 398-409.

- FORTINI, P., PARLANTI, E., SIDORKINA, O. M., LAVAL, J. & DOGLIOTTI, E. (1999). The Type of DNA Glycosylase Determines the Base Excision Repair Pathway in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* 274, 15230-15236.
- FOUSTERI, M. & MULLENDERS, L. H. (2008). Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Research* 18, 73-84.
- FRIEDBERG, E. C. & MEIRA, L. B. (2006). Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting biological responses to DNA damage Version 7. *DNA Repair (Amst)* 5, 189-209.
- GALASHEVSKAYA, A., SARNO, A., VAGBO, C. B., AAS, P. A., HAGEN, L., SLUPPHAUG, G. & KROKAN, H. E. (2013). A robust, sensitive assay for genomic uracil determination by LC/MS/MS reveals lower levels than previously reported. *DNA Repair (Amst)* 12, 699-706.
- GREENMAN, C., STEPHENS, P., SMITH, R., DALGLIESH, G. L., HUNTER, C., BIGNELL, G., DAVIES, H., TEAGUE, J., BUTLER, A., STEVENS, C., EDKINS, S., O'MEARA, S., VASTRIK, I., SCHMIDT, E. E., AVIS, T., BARTHORPE, S., BHAMRA, G., BUCK, G., CHOUDHURY, B., CLEMENTS, J., COLE, J., DICKS, E., FORBES, S., GRAY, K., HALLIDAY, K., HARRISON, R., HILLS, K., HINTON, J., JENKINSON, A., JONES, D., MENZIES, A., MIRONENKO, T., PERRY, J., RAINE, K., RICHARDSON, D., SHEPHERD, R., SMALL, A., TOFTS, C., VARIAN, J., WEBB, T., WEST, S., WIDAA, S., YATES, A., CAHILL, D. P., LOUIS, D. N., GOLDSTRAW, P., NICHOLSON, A. G., BRASSEUR, F., LOOIJENGA, L., WEBER, B. L., CHIEW, Y. E., DEFAZIO, A., GREAVES, M. F., GREEN, A. R., CAMPBELL, P., BIRNEY, E., EASTON, D. F., CHENEVIX-TRENCH, G., TAN, M. H., KHOO, S. K., TEH, B. T., YUEN, S. T., LEUNG, S. Y., WOOSTER, R., FUTREAL, P. A. & STRATTON, M. R. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446, 153-8.
- GROS, L., ISHCENKO, A. A., IDE, H., ELDER, R. H. & SAPARBAEV, M. K. (2004). The major human AP endonuclease (Ape1) is involved in the nucleotide incision repair pathway. *Nucleic Acids Res* 32, 73-81.
- GU, H., MARTH, J. D., ORBAN, P. C., MOSSMANN, H. & RAJEWSKY, K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265, 103-6.
- HARDELAND, U., KUNZ, C., FOCKE, F., SZADKOWSKI, M. & SCHAR, P. (2007). Cell cycle regulation as a mechanism for functional separation of the apparently redundant uracil DNA glycosylases TDG and UNG2. *Nucleic Acids Res* 35, 3859-67.
- HASHIMOTO, H., HONG, S., BHAGWAT, A. S., ZHANG, X. & CHENG, X. (2012). Excision of 5-hydroxymethyluracil and 5-carboxylcytosine by the thymine DNA glycosylase domain: its structural basis and implications for active DNA demethylation. *Nucleic Acids Res* 40, 10203-14.
- HAUG, T., SKORPEN, F., AAS, P. A., MALM, V., SKJELBRED, C. & KROKAN, H. E. (1998). Regulation of expression of nuclear and mitochondrial forms of human uracil-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res* 26, 1449-57.
- HAUSHALTER, K. A., TODD STUKENBERG, M. W., KIRSCHNER, M. W. & VERDINE, G. L. (1999). Identification of a new uracil-DNA glycosylase family by expression cloning using synthetic inhibitors. *Curr Biol* 9, 174-85.
- HE, Y. F., LI, B. Z., LI, Z., LIU, P., WANG, Y., TANG, Q., DING, J., JIA, Y., CHEN, Z., LI, L., SUN, Y., LI, X., DAI, Q., SONG, C. X., ZHANG, K., HE, C. & XU, G. L. (2011). Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. *Science* 333, 1303-7.

- HELMRICH, A., BALLARINO, M., NUDLER, E. & TORA, L. (2013). Transcription-replication encounters, consequences and genomic instability. *Nat Struct Mol Biol* 20, 412-8.
- HENDRICH, B., HARDELAND, U., NG, H. H., JIRICNY, J. & BIRD, A. (1999). The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* 401, 301-4.
- HU, T., FU, Q., CHEN, P., MA, L., SIN, O. & GUO, D. (2009). Construction of an artificial MicroRNA expression vector for simultaneous inhibition of multiple genes in mammalian cells. *Int J Mol Sci* 10, 2158-68.
- IMAI, K., SLUPPHAUG, G., LEE, W. I., REVY, P., NONOYAMA, S., CATALAN, N., YEL, L., FORVEILLE, M., KAVLI, B., KROKAN, H. E., OCHS, H. D., FISCHER, A. & DURANDY, A. (2003). Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol* 4, 1023-8.
- INOUE, H., NOJIMA, H. & OKAYAMA, H. (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* 96, 23-8.
- ISCHENKO, A. A. & SAPARBAEV, M. K. (2002). Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage. *Nature* 415, 183-7.
- JACOBS, A. L. & SCHAR, P. (2012). DNA glycosylases: in DNA repair and beyond. *Chromosoma* 121, 1-20.
- JAVERI, A., GUY LYONS, J., HUANG, X. X. & HALLIDAY, G. M. (2011). Downregulation of Cockayne syndrome B protein reduces human 8-oxoguanine DNA glycosylase-1 expression and repair of UV radiation-induced 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanine. *Cancer Science* 102, 1651-1658.
- JOHNSON, J. M. & LATIMER, J. J. (2005). Analysis of DNA repair using transfection-based host cell reactivation. *Methods Mol Biol* 291, 321-35.
- KATHE, S. D., SHEN, G. P. & WALLACE, S. S. (2004). Single-stranded breaks in DNA but not oxidative DNA base damages block transcriptional elongation by RNA polymerase II in HeLa cell nuclear extracts. *J Biol Chem* 279, 18511-20.
- KAVLI, B., ANDERSEN, S., OTTERLEI, M., LIABAKK, N. B., IMAI, K., FISCHER, A., DURANDY, A., KROKAN, H. E. & SLUPPHAUG, G. (2005). B cells from hyper-IgM patients carrying UNG mutations lack ability to remove uracil from ssDNA and have elevated genomic uracil. *J Exp Med* 201, 2011-21.
- KAVLI, B., OTTERLEI, M., SLUPPHAUG, G. & KROKAN, H. E. (2007). Uracil in DNA--general mutagen, but normal intermediate in acquired immunity. *DNA Repair (Amst)* 6, 505-16.
- KAVLI, B., SUNDHEIM, O., AKBARI, M., OTTERLEI, M., NILSEN, H., SKORPEN, F., AAS, P. A., HAGEN, L., KROKAN, H. E. & SLUPPHAUG, G. (2002). hUNG2 is the major repair enzyme for removal of uracil from U:A matches, U:G mismatches, and U in single-stranded DNA, with hSMUG1 as a broad specificity backup. *J Biol Chem* 277, 39926-36.
- KEMMERICH, K., DINGLER, F. A., RADA, C. & NEUBERGER, M. S. (2012). Germline ablation of SMUG1 DNA glycosylase causes loss of 5-hydroxymethyluracil- and UNG-backup uracil-excision activities and increases cancer predisposition of Ung^{-/-}Msh2^{-/-} mice. *Nucleic Acids Res* 40, 6016-25.

- KHOBTA, A., ANDERHUB, S., KITSER, N. & EPE, B. (2010a). Gene silencing induced by oxidative DNA base damage: association with local decrease of histone H4 acetylation in the promoter region. *Nucleic Acids Res* 38, 4285-95.
- KHOBTA, A. & EPE, B. (2012). Interactions between DNA damage, repair, and transcription. *Mutat Res* 736, 5-14.
- KHOBTA, A., KITSER, N., SPECKMANN, B. & EPE, B. (2009). 8-Oxoguanine DNA glycosylase (Ogg1) causes a transcriptional inactivation of damaged DNA in the absence of functional Cockayne syndrome B (Csb) protein. *DNA Repair (Amst)* 8, 309-17.
- KHOBTA, A., LINGG, T., SCHULZ, I., WARKEN, D., KITSER, N. & EPE, B. (2010b). Mouse CSB protein is important for gene expression in the presence of a single-strand break in the non-transcribed DNA strand. *DNA Repair (Amst)* 9, 985-993.
- KITSER, N., GASTEIGER, K., LÜHNSDORF, B., ALLGAYER, J., EPE, B., CARELL, T. & KHOBTA, A. (2014). Cockayne syndrome: varied requirement of transcription-coupled nucleotide excision repair for the removal of three structurally different adducts from transcribed DNA. *Plos One* 9, e94405.
- KITSER, N., STATHIS, D., LÜHNSDORF, B., MULLER, H., CARELL, T., EPE, B. & KHOBTA, A. (2011). 8-Oxo-7,8-dihydroguanine in DNA does not constitute a barrier to transcription, but is converted into transcription-blocking damage by OGG1. *Nucleic Acids Res* 39, 5926-34.
- KLUNGLAND, A., ROSEWELL, I., HOLLENBACH, S., LARSEN, E., DALY, G., EPE, B., SEEBERG, E., LINDAHL, T. & BARNES, D. E. (1999). Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13300-5.
- KOHLI, R. M. & ZHANG, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 502, 472-9.
- KROKAN, H. E. & BJORAS, M. (2013). Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a012583.
- KROKAN, H. E., DRABLOS, F. & SLUPPHAUG, G. (2002). Uracil in DNA--occurrence, consequences and repair. *Oncogene* 21, 8935-48.
- KURAOKA, I., ENDOU, M., YAMAGUCHI, Y., WADA, T., HANDA, H. & TANAKA, K. (2003). Effects of endogenous DNA base lesions on transcription elongation by mammalian RNA polymerase II. Implications for transcription-coupled DNA repair and transcriptional mutagenesis. *J Biol Chem* 278, 7294-9.
- KURAOKA, I., SUZUKI, K., ITO, S., HAYASHIDA, M., KWEI, J. S., IKEGAMI, T., HANDA, H., NAKABEPPU, Y. & TANAKA, K. (2007). RNA polymerase II bypasses 8-oxoguanine in the presence of transcription elongation factor TFIIS. *DNA Repair (Amst)* 6, 841-51.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- LARSON, E. D., BEDNARSKI, D. W. & MAIZELS, N. (2008). High-fidelity correction of genomic uracil by human mismatch repair activities. *BMC Mol Biol* 9, 94.

- LARSON, E. D., DUQUETTE, M. L., CUMMINGS, W. J., STREIFF, R. J. & MAIZELS, N. (2005). MutSalpha binds to and promotes synapsis of transcriptionally activated immunoglobulin switch regions. *Curr Biol* 15, 470-4.
- LI, E. (2002). Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet* 3, 662-73.
- LI, M. & WILSON, D. M., 3RD. (2014). Human apurinic/aprimidinic endonuclease 1. *Antioxid Redox Signal* 20, 678-707.
- LINDAHL, T. (1974). An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 3649-53.
- LINDAHL, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709-15.
- LOEB, L. A. (1985). Apurinic sites as mutagenic intermediates. *Cell* 40, 483-4.
- LOEB, L. A. & PRESTON, B. D. (1986). Mutagenesis by apurinic/aprimidinic sites. *Annu Rev Genet* 20, 201-30.
- LU, C. C., HUANG, H. T., WANG, J. T., SLUPPHAUG, G., LI, T. K., WU, M. C., CHEN, Y. C., LEE, C. P. & CHEN, M. R. (2007). Characterization of the uracil-DNA glycosylase activity of Epstein-Barr virus BKRF3 and its role in lytic viral DNA replication. *J Virol* 81, 1195-208.
- LÜHNSDORF, B., EPE, B. & KHOBTA, A. (2014). Excision of uracil from transcribed DNA negatively affects gene expression. *J Biol Chem* 289, 22008-18.
- LÜHNSDORF, B., KITSER, N., WARKEN, D., LINGG, T., EPE, B. & KHOBTA, A. (2012). Generation of reporter plasmids containing defined base modifications in the DNA strand of choice. *Anal Biochem* 425, 47-53.
- LÜHNSDORF, B. (2010). Einfluss einer spezifisch positionierten DNA-Modifikation- Uracil und apyrimidinische Stelle -auf die Genexpression. *Diplomarbeit, Institut für Pharmazie und Biochemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Arbeitskreis Prof. Dr. B. Epe*
- MADHUSUDAN, S., SMART, F., SHRIMPTON, P., PARSONS, J. L., GARDINER, L., HOULBROOK, S., TALBOT, D. C., HAMMONDS, T., FREEMONT, P. A., STERNBERG, M. J., DIANOV, G. L. & HICKSON, I. D. (2005). Isolation of a small molecule inhibitor of DNA base excision repair. *Nucleic Acids Res* 33, 4711-24.
- MAITI, A. & DROHAT, A. C. (2011). Thymine DNA glycosylase can rapidly excise 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine: potential implications for active demethylation of CpG sites. *J Biol Chem* 286, 35334-8.
- MALYARCHUK, S. & HARRISON, L. (2005). DNA repair of clustered uracils in HeLa cells. *J Mol Biol* 345, 731-43.
- MASAOKA, A., MATSUBARA, M., HASEGAWA, R., TANAKA, T., KURISU, S., TERATO, H., OHYAMA, Y., KARINO, N., MATSUDA, A. & IDE, H. (2003). Mammalian 5-formyluracil-DNA glycosylase. 2. Role of SMUG1 uracil-DNA glycosylase in repair of 5-formyluracil and other oxidized and deaminated base lesions. *Biochemistry* 42, 5003-12.

- MEI KWEI, J. S., KURAOKA, I., HORIBATA, K., UBUKATA, M., KOBATAKE, E., IWAI, S., HANDA, H. & TANAKA, K. (2004). Blockage of RNA polymerase II at a cyclobutane pyrimidine dimer and 6-4 photoproduct. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 1133-8.
- MISSERO, C., PIRRO, M. T., SIMEONE, S., PISCHETOLA, M. & DI LAURO, R. (2001). The DNA glycosylase T:G mismatch-specific thymine DNA glycosylase represses thyroid transcription factor-1-activated transcription. *J Biol Chem* 276, 33569-75.
- MORERA, S., GRIN, I., VIGOUROUX, A., COUVE, S., HENRIOT, V., SAPARBAEV, M. & ISHCHEENKO, A. A. (2012). Biochemical and structural characterization of the glycosylase domain of MBD4 bound to thymine and 5-hydroxymethyluracil-containing DNA. *Nucleic Acids Res* 40, 9917-26.
- MUFTUOGLU, M., DE SOUZA-PINTO, N. C., DOGAN, A., AAMANN, M., STEVNSNER, T., RYBANSKA, I., KIRKALI, G., DIZDAROGLU, M. & BOHR, V. A. (2009). Cockayne syndrome group B protein stimulates repair of formamidopyrimidines by NEIL1 DNA glycosylase. *J Biol Chem* 284, 9270-9.
- NEDDERMANN, P. & JIRICNY, J. (1993). The purification of a mismatch-specific thymine-DNA glycosylase from HeLa cells. *J Biol Chem* 268, 21218-24.
- NEDDERMANN, P. & JIRICNY, J. (1994). Efficient removal of uracil from G.U mispairs by the mismatch-specific thymine DNA glycosylase from HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1642-6.
- NEWMAN, J. C., BAILEY, A. D., FAN, H. Y., PAVELITZ, T. & WEINER, A. M. (2008). An abundant evolutionarily conserved CSB-PiggyBac fusion protein expressed in Cockayne syndrome. *Plos Genetics* 4, e1000031.
- NILSEN, H., HAUSHALTER, K. A., ROBINS, P., BARNES, D. E., VERDINE, G. L. & LINDAHL, T. (2001). Excision of deaminated cytosine from the vertebrate genome: role of the SMUG1 uracil-DNA glycosylase. *EMBO J* 20, 4278-86.
- NILSEN, H., OTTERLEI, M., HAUG, T., SOLUM, K., NAGELHUS, T. A., SKORPEN, F. & KROKAN, H. E. (1997). Nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylases are generated by alternative splicing and transcription from different positions in the UNG gene. *Nucleic Acids Res* 25, 750-5.
- NILSEN, H., ROSEWELL, I., ROBINS, P., SKJELBRED, C. F., ANDERSEN, S., SLUPPHAUG, G., DALY, G., KROKAN, H. E., LINDAHL, T. & BARNES, D. E. (2000). Uracil-DNA glycosylase (UNG)-deficient mice reveal a primary role of the enzyme during DNA replication. *Mol Cell* 5, 1059-65.
- NILSEN, H., STAMP, G., ANDERSEN, S., HRIVNAK, G., KROKAN, H. E., LINDAHL, T. & BARNES, D. E. (2003). Gene-targeted mice lacking the Ung uracil-DNA glycosylase develop B-cell lymphomas. *Oncogene* 22, 5381-6.
- OSTEROD, M., HOLLENBACH, S., HENGSTLER, J. G., BARNES, D. E., LINDAHL, T. & EPE, B. (2001). Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1) deficient mice. *Carcinogenesis* 22, 1459-63.
- OTTERLEI, M., WARBRICK, E., NAGELHUS, T. A., HAUG, T., SLUPPHAUG, G., AKBARI, M., AAS, P. A., STEINSBEKK, K., BAKKE, O. & KROKAN, H. E. (1999). Post-replicative base excision repair in replication foci. *EMBO J* 18, 3834-44.

- PETRONZELLI, F., RICCIO, A., MARKHAM, G. D., SEEHOLZER, S. H., GENUARDI, M., KARBOWSKI, M., YEUNG, A. T., MATSUMOTO, Y. & BELLACOSA, A. (2000a). Investigation of the substrate spectrum of the human mismatch-specific DNA N-glycosylase MED1 (MBD4): fundamental role of the catalytic domain. *J Cell Physiol* 185, 473-80.
- PETRONZELLI, F., RICCIO, A., MARKHAM, G. D., SEEHOLZER, S. H., STOERKER, J., GENUARDI, M., YEUNG, A. T., MATSUMOTO, Y. & BELLACOSA, A. (2000b). Biphasic kinetics of the human DNA repair protein MED1 (MBD4), a mismatch-specific DNA N-glycosylase. *J Biol Chem* 275, 32422-9.
- PROROK, P., ALILI, D., SAINT-PIERRE, C., GASPARUTTO, D., ZHARKOV, D. O., ISHCHENKO, A. A., TUDEK, B. & SAPARBAEV, M. K. (2013). Uracil in duplex DNA is a substrate for the nucleotide incision repair pathway in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E3695-703.
- PULUKURI, S. M., KNOST, J. A., ESTES, N. & RAO, J. S. (2009). Small interfering RNA-directed knockdown of uracil DNA glycosylase induces apoptosis and sensitizes human prostate cancer cells to genotoxic stress. *Mol Cancer Res* 7, 1285-93.
- RADA, C., WILLIAMS, G. T., NILSEN, H., BARNES, D. E., LINDAHL, T. & NEUBERGER, M. S. (2002). Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr Biol* 12, 1748-55.
- RADANY, E. H., DORNFELD, K. J., SANDERSON, R. J., SAVAGE, M. K., MAJUMDAR, A., SEIDMAN, M. M. & MOSBAUGH, D. W. (2000). Increased spontaneous mutation frequency in human cells expressing the phage PBS2-encoded inhibitor of uracil-DNA glycosylase. *Mutat Res* 461, 41-58.
- ROY, D., ZHANG, Z., LU, Z., HSIEH, C. L. & LIEBER, M. R. (2010). Competition between the RNA transcript and the nontemplate DNA strand during R-loop formation in vitro: a nick can serve as a strong R-loop initiation site. *Mol Cell Biol* 30, 146-59.
- RUSMINTRATIP, V. & SOWERS, L. C. (2000). An unexpectedly high excision capacity for mispaired 5-hydroxymethyluracil in human cell extracts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14183-7.
- SCHANZ, S., CASTOR, D., FISCHER, F. & JIRICNY, J. (2009). Interference of mismatch and base excision repair during the processing of adjacent U/G mispairs may play a key role in somatic hypermutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5593-8.
- SCHMITT, M. W., MATSUMOTO, Y. & LOEB, L. A. (2009). High fidelity and lesion bypass capability of human DNA polymerase delta. *Biochimie* 91, 1163-72.
- SELBY, C. P., DRAPKIN, R., REINBERG, D. & SANCAR, A. (1997). RNA polymerase II stalled at a thymine dimer: footprint and effect on excision repair. *Nucleic Acids Res* 25, 787-93.
- SELBY, C. P. & SANCAR, A. (1997). Cockayne syndrome group B protein enhances elongation by RNA polymerase II. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11205-9.
- SIMS, R. J., 3RD, BELOTSEKOVSKAYA, R. & REINBERG, D. (2004). Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes Dev* 18, 2437-68.
- SOUSA, M. M., KROKAN, H. E. & SLUPPHAUG, G. (2007). DNA-uracil and human pathology. *Mol Aspects Med* 28, 276-306.

- SPIVAK, G. & HANAWALT, P. C. (2006). Host cell reactivation of plasmids containing oxidative DNA lesions is defective in Cockayne syndrome but normal in UV-sensitive syndrome fibroblasts. *DNA Repair (Amst)* 5, 13-22.
- STARCEVIC, D., DALAL, S. & SWEASY, J. B. (2004). Is there a link between DNA polymerase beta and cancer? *Cell Cycle* 3, 998-1001.
- STENGLEIN, M. D., BURNS, M. B., LI, M., LENGYEL, J. & HARRIS, R. S. (2010). APOBEC3 proteins mediate the clearance of foreign DNA from human cells. *Nat Struct Mol Biol* 17, 222-9.
- SVILAR, D., GOELLNER, E. M., ALMEIDA, K. H. & SOBOL, R. W. (2011). Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. *Antioxid Redox Signal* 14, 2491-507.
- THORSLUND, T., VON KOBBE, C., HARRIGAN, J. A., INDIG, F. E., CHRISTIANSEN, M., STEVNSNER, T. & BOHR, V. A. (2005). Cooperation of the Cockayne syndrome group B protein and poly(ADP-ribose) polymerase 1 in the response to oxidative stress. *Mol Cell Biol* 25, 7625-36.
- TORNALETTI, S., DONAHUE, B. A., REINES, D. & HANAWALT, P. C. (1997). Nucleotide sequence context effect of a cyclobutane pyrimidine dimer upon RNA polymerase II transcription. *J Biol Chem* 272, 31719-24.
- TORNALETTI, S., MAEDA, L. S. & HANAWALT, P. C. (2006). Transcription arrest at an abasic site in the transcribed strand of template DNA. *Chemical Research in Toxicology* 19, 1215-1220.
- TORNALETTI, S., MAEDA, L. S., LLOYD, D. R., REINES, D. & HANAWALT, P. C. (2001). Effect of thymine glycol on transcription elongation by T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymerase II. *J Biol Chem* 276, 45367-71.
- TRAUT, T. W. (1994). Physiological concentrations of purines and pyrimidines. *Molecular and Cellular Biochemistry* 140, 1-22.
- TUO, J., CHEN, C., ZENG, X., CHRISTIANSEN, M. & BOHR, V. A. (2002). Functional crosstalk between hOgg1 and the helicase domain of Cockayne syndrome group B protein. *DNA Repair (Amst)* 1, 913-27.
- UM, S., HARBERS, M., BENECKE, A., PIERRAT, B., LOSSON, R. & CHAMBON, P. (1998). Retinoic Acid Receptors Interact Physically and Functionally with the T:G Mismatch-specific Thymine-DNA Glycosylase. *Journal of Biological Chemistry* 273, 20728-20736.
- VARANI, G. & MCCLAIN, W. H. (2000). The G x U wobble base pair. A fundamental building block of RNA structure crucial to RNA function in diverse biological systems. *Embo Reports* 1, 18-23.
- VERRI, A., MAZZARELLO, P., BIAMONTI, G., SPADARI, S. & FOCHER, F. (1990). The specific binding of nuclear protein(s) to the cAMP responsive element (CRE) sequence (TGACGTCA) is reduced by the misincorporation of U and increased by the deamination of C. *Nucleic Acids Res* 18, 5775-80.
- VISNES, T., AKBARI, M., HAGEN, L., SLUPPHAUG, G. & KROKAN, H. E. (2008). The rate of base excision repair of uracil is controlled by the initiating glycosylase. *DNA Repair (Amst)* 7, 1869-81.
- WALLACE, S. S. (2002). Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med* 33, 1-14.

- WANG, J. C. (2002). Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 430-40.
- WATERS, T. R. & SWANN, P. F. (1998). Kinetics of the action of thymine DNA glycosylase. *J Biol Chem* 273, 20007-14.
- WEIL, A. F., GHOSH, D., ZHOU, Y., SEIPLE, L., MCMAHON, M. A., SPIVAK, A. M., SILICIANO, R. F. & STIVERS, J. T. (2013). Uracil DNA glycosylase initiates degradation of HIV-1 cDNA containing misincorporated dUTP and prevents viral integration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E448-57.
- WILSON, T. M., VAISMAN, A., MARTOMO, S. A., SULLIVAN, P., LAN, L., HANAOKA, F., YASUI, A., WOODGATE, R. & GEARHART, P. J. (2005). MSH2-MSH6 stimulates DNA polymerase eta, suggesting a role for A:T mutations in antibody genes. *J Exp Med* 201, 637-45.
- WONG, H. K., MUFTUOGLU, M., BECK, G., IMAM, S. Z., BOHR, V. A. & WILSON, D. M., 3RD. (2007). Cockayne syndrome B protein stimulates apurinic endonuclease 1 activity and protects against agents that introduce base excision repair intermediates. *Nucleic Acids Res* 35, 4103-13.
- XIE, Y., YANG, H., CUNANAN, C., OKAMOTO, K., SHIBATA, D., PAN, J., BARNES, D. E., LINDAHL, T., MCILHATTON, M., FISHEL, R. & MILLER, J. H. (2004). Deficiencies in mouse Myh and Ogg1 result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors. *Cancer Res* 64, 3096-102.
- YAMTICH, J., STARCEVIC, D., LAUPER, J., SMITH, E., SHI, I., RANGARAJAN, S., JAEGER, J. & SWEASY, J. B. (2010). Hinge residue I174 is critical for proper dNTP selection by DNA polymerase beta. *Biochemistry* 49, 2326-34.
- YANG, B., CHEN, K., ZHANG, C., HUANG, S. & ZHANG, H. (2007). Virion-associated uracil DNA glycosylase-2 and apurinic/aprimidinic endonuclease are involved in the degradation of APOBEC3G-edited nascent HIV-1 DNA. *J Biol Chem* 282, 11667-75.

Appendix I

Übersicht über die verwendeten UNG1/2-, TDG-, SMUG1- und CSB-shRNA-Sequenzen zur Insertion zwischen die BglIII- und HindIII-Schnittstellen des pENTR/pSUPER+-Vektors (**Tabelle A-1**).

Tabelle A-1 Übersicht über die verwendeten shRNA-Sequenzen zum Knockdown des UNG1/2-, CSB-, SMUG1 und TDG-Gens. Die gezeigten Sequenzen wurden in den shRNA-Expressions-Vektor pENTR/pSUPER+ kloniert und auf ihre Effizienz nach stabiler Transfektion in HeLa-Zellen getestet.

Ziel-protein	Konstrukt	Sequenz (5' → 3')			Quelle der Sequenz	Effizientester Knockdown
		5'-Ende	Sense-Strang	Loop	Antisense-Strang	3'-Ende
UNG1/2	A	GATCCCCCATCAAGCCAACTCTCATTTCAAGAGAATGAGAGTTGGCTTGATGGTTTTTGGAAA				
	B	GATCCCCGGGACAGGATCCATATCATTTCAAGAGAATGATATGGATCCCTGTCCTTTTTGGAAA				
CSB	A	GATCCCCGGGAAAGCAAGGTTGTAAATTCAGAGATTACAACTTGTCTTCTTCTTTTTGGAAA				
	B	GATCCCCGGAACCTGGATCAGATGTTCTTCAAGAGAGAACATCTGATCCAGTTCTTTTTGGAAA				
SMUG1	A1	GATCCGGCCAGA CAAAGCATGGGACATCTCGAGATGTCCTCCATGCTTTGTCCTTTTTGGAAA				
	A2	GATCCCCAAGACAAAGCATGGACATTCAGAGATGTCCTCCATGCTTTGTCCTTTTTGGAAA				
	B	GATCCCCATCATCTACAATCCGTGGTTCAAGAGACCACGGGATGTAGATGATTTTTTGGAAA				
TDG	A1	GATCCGGGAACGAAATATGGACGTTCAACTCGAGTTGAAACGTCCTATATTTCTTTTTTGGAAA				
	A2	GATCCCCAACGAAATATGGACGTTCAATTCAGAGATGAAACGTCCTATATTTCTTTTTTGGAAA				
	B	GATCCCCCTTCGTGAAGGAGGACGTAATTCAGAGATACGTCCTCCTCACGAAATTTTTTGGAAA				

Appendix II

Eigene Publikationen, die mit der Dissertation verbunden sind:

KITSER, N., STATHIS, D., LÜHNSDORF, B., MULLER, H., CARELL, T., EPE, B. & KHOBTA, A. (2011). 8-Oxo-7,8-dihydroguanine in DNA does not constitute a barrier to transcription, but is converted into transcription-blocking damage by OGG1. *Nucleic Acids Res* 39, 5926-34.

LÜHNSDORF, B., KITSER, N., WARKEN, D., LINGG, T., EPE, B. & KHOBTA, A. (2012). Generation of reporter plasmids containing defined base modifications in the DNA strand of choice. *Anal Biochem* 425, 47-53.

LÜHNSDORF, B., EPE, B. & KHOBTA, A. (2014). Excision of uracil from transcribed DNA negatively affects gene expression. *J Biol Chem* 289, 22008-18.

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