

Einfluss von Resveratrol  
auf oxidative DNA-Schäden und Mutagenese  
*in vivo*

Dissertation zur Erlangung des Grades

**Doktor der Naturwissenschaften**

im Promotionsfach Pharmazie

am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften

der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von

**Markus Fußer**

geboren in Bad Bergzabern

Mainz, 2010

Dekan:

Erster Gutachter:

Zweiter Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 08. Februar 2010

*Wichtig ist, dass man nicht aufhört zu fragen.*

*Albert Einstein*

## Danksagung

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>3</b>
2.1	Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies .....	5
2.1.1	Exogene Quellen reaktiver Sauerstoffspezies .....	6
2.1.2	Endogene Quellen reaktiver Sauerstoffspezies .....	6
2.2	Antioxidative Schutzmechanismen .....	8
2.2.1	Nicht enzymatische Antioxidantien .....	8
2.2.2	Enzymatische Antioxidantien .....	10
2.3	Oxidative DNA-Modifikationen .....	13
2.4	Biologische Konsequenzen oxidativer DNA-Schäden .....	14
2.5	Mechanismen der DNA-Reparatur .....	15
2.5.1	Direkte Schadensreversion .....	16
2.5.2	Basenexcisionsreparatur .....	17
2.5.3	Nucleotidexcisionsreparatur .....	21
2.5.4	Postreplikative Reparatur ( <i>mismatch</i> -Reparatur) .....	22
2.5.5	Doppelstrangbruch-Reparatur .....	22
2.6	Resveratrol .....	23
2.6.1	Allgemeines .....	23
2.6.2	Chemoprävention .....	25
2.6.3	Therapeutisches Potential .....	27
2.6.4	Pharmakokinetik .....	29
<b>3</b>	<b>Zielsetzung .....</b>	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>31</b>
4.1	Material .....	31
4.1.1	Geräte und Software .....	31
4.1.2	Hilfsmaterialien .....	33
4.1.3	Chemikalien .....	35
4.1.4	Enzyme .....	38
4.1.5	DNA .....	38
4.1.6	Primer .....	39
4.1.7	Bakterien .....	41
4.1.8	Zelllinien .....	41
4.1.9	Mäuse .....	42
4.1.10	Verwendete Puffer, Lösungen und Medien .....	44
4.1.10.1	Zellkultur .....	44
4.1.10.2	Isolierung primärer Hepatozyten (Leberperfusion) .....	44
4.1.10.3	Zellproliferation Ki-67 .....	47
4.1.10.4	Alkalische Elution .....	47

4.1.10.5	Glutathion-Gehalt .....	49
4.1.10.6	Big Blue <sup>®</sup> Mutations-Assay .....	49
4.1.10.7	PM2 DNA-Relaxationsassay .....	51
4.1.10.8	Genexpressionsbestimmung durch qRT-PCR.....	52
4.2	Methoden.....	53
4.2.1	Arbeiten mit Zellen .....	53
4.2.1.1	Allgemeine Zellkultur und Zellpflege.....	53
4.2.1.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	53
4.2.1.3	Bestimmung des Proliferationsfaktors .....	54
4.2.1.4	WST1-Assay zur Bestimmung der Toxizität .....	55
4.2.2	Arbeiten mit Tieren.....	56
4.2.2.1	Genotypisierung von Mäusen.....	56
4.2.2.2	Zucht und Haltung von transgenen <i>knockout</i> -Mäusen .....	58
4.2.2.3	Gewinnung primärer Hepatozyten (Leberperfusion).....	59
4.2.2.4	Schädigung der Hepatozyten mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	60
4.2.2.5	Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung von Hepatozyten .....	61
4.2.2.6	Kurzzeit-Behandlung der Mäuse mit Resveratrol .....	61
4.2.2.7	Langzeit-Fütterungsversuch mit Resveratrol .....	62
4.2.2.8	Organentnahmen .....	62
4.2.2.9	Blutentnahme und Serumgewinnung .....	62
4.2.2.10	Zellproliferation mit Ki-67.....	63
4.2.2.11	<i>In vivo</i> Mikrokernbestimmung.....	64
4.2.3	Alkalische Elution .....	66
4.2.3.1	Prinzip .....	66
4.2.3.2	Versuchsaufbau und Vorbereitung .....	67
4.2.3.3	Durchführung der Zelllyse, Enzyminkubation und Elution .....	68
4.2.3.4	Auswertung, Quantifizierung und Berechnung des Schadens.....	69
4.2.3.5	Schnelle Alkalische Elution zur Detektion höherer Schäden ..	71
4.2.3.6	Reparatur in Säugierzellen.....	71
4.2.4	PM2-DNA-Relaxationsassay .....	73
4.2.4.1	Prinzip .....	73
4.2.4.2	Schadensinduktion und Enzymbehandlung .....	74
4.2.4.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	75
4.2.4.4	Auswertung .....	75
4.2.5	Quantifizierung des Glutathion-Gehaltes.....	76
4.2.5.1	Prinzip .....	76
4.2.5.2	Durchführung.....	77
4.2.5.3	Proteinbestimmung nach Bradford.....	78
4.2.6	Mutations-Assay mit transgenen Big Blue <sup>®</sup> -Mäusen .....	78
4.2.6.1	Prinzip .....	78
4.2.6.2	Isolation genomischer DNA.....	80
4.2.6.3	Verpackung der DNA in $\lambda$ Phagen .....	81
4.2.6.4	Kontrolle der Verpackungsreaktion .....	82
4.2.6.5	Ausplattierung der verpackten DNA Proben.....	82

4.2.6.6	Mutantenscreening .....	83
4.2.6.7	Amplifizierung des <i>lacI</i> -Gens der Mutanten.....	84
4.2.6.8	Sequenzierung der Mutationen .....	85
4.2.7	Genexpressionsbestimmung mit quantitativer RT-PCR .....	86
4.2.7.1	Prinzip .....	86
4.2.7.2	RNA Isolierung .....	86
4.2.7.3	Kontrolle der RNA-Integrität .....	87
4.2.7.4	Reverse Transkription .....	88
4.2.7.5	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) .....	89
4.2.7.6	Auswertung .....	90
4.2.8	Statistik.....	91
<b>5 ERGEBNISSE .....</b>		<b>92</b>
5.1	Zelluläre und <i>in vitro</i> Effekte von Resveratrol.....	92
5.1.1	Toxizität von Resveratrol in Wildtyp-Mausembryofibroblasten .....	92
5.1.2	Einfluss von Resveratrol auf die Reparatur oxidativer DNA-Schäden in Zellen.....	94
5.1.3	Einfluss von Resveratrol auf die Glutathion-Spiegel in MEFs .....	96
5.1.4	Beinflussung der Erkennung oxidativer Basenmodifikationen in PM2-DNA von Fpg und OGG1 durch Resveratrol .....	97
5.2	Effekte einer Kurzzeit-Behandlung von Mäusen mit Resveratrol .....	99
5.2.1	Beeinflussung der basalen Spiegel oxidativer DNA-Basenmodifikationen und Einzelstrangbrüchen durch eine Kurzzeit-Behandlung mit Resveratrol .....	99
5.2.2	Korrelation der Zellvitalität der primären Hepatozyten mit den gemessenen DNA-Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Modifikationen .....	103
5.3	Einfluss einer Langzeit-Behandlung mit Resveratrol.....	105
5.3.1	Futtermittelaufnahme während der Resveratrol-Fütterung .....	105
5.3.2	Körpergewicht von Mäusen während der Resveratrol-Fütterung ...	106
5.3.3	Klinische Serumparameter mit Resveratrol behandelte Mäuse ....	108
5.3.4	Beeinflussung der endogenen DNA-Basenmodifikationen durch eine Langzeit-Behandlung mit Resveratrol.....	109
5.3.4.1	Langzeit-Behandlung von Wildtyp-Mäusen .....	109
5.3.4.2	Langzeit-Behandlung von <i>Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup></i> -Mäusen .....	110
5.3.4.3	Langzeit-Behandlung von <i>Ogg1<sup>-/-</sup></i> -Mäusen.....	112
5.3.5	Mikrokerne im Blut von mit Resveratrol behandelten Mäusen .....	113
5.3.6	Mutationsrate in Lebern von Mäusen nach einer Resveratrol Behandlung.....	114
5.3.7	Sequenzierung der Mutationen .....	116
5.4	Untersuchungen zur mechanistischen Erklärung des Schutzes durch Resveratrol.....	123
5.4.1	Vitalität von primären Hepatozyten nach H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	123
5.4.2	Induzierte DNA-Einzelstrangbrüche in primären Hepatozyten .....	124

5.4.3	Bestimmung der Zellproliferation nach Resveratrol.....	125
5.4.3.1	Messung des Lebergewichts .....	125
5.4.3.2	Expression des Proliferationsmarkers Ki-67.....	128
5.4.4	Glutathionspiegel in Hepatozyten von Resveratrol behandelten Mäusen .....	129
5.4.5	Genexpressionsveränderungen durch Resveratrol .....	130
5.5	Einfluss einzelner Antioxidativer Schutzmechanismen auf die Spiegel oxidativer DNA-Basenmodifikationen.....	135
5.5.1	Basale Spiegel von oxidativen DNA-Basenmodifikationen in Knochenmarkszellen von SOD2 hemizygoten Mäusen.....	135
5.5.2	Basale Spiegel von oxidativen DNA-Basenmodifikationen in primären Hepatozyten von HO1-knockout-Mäusen.....	136
<b>6</b>	<b><u>DISKUSSION.....</u></b>	<b>138</b>
6.1	Beeinflusst eine orale Gabe von Resveratrol die oxidativen DNA-Schäden <i>in vivo</i> ? .....	138
6.2	Schützt Resveratrol vor endogenen Mutationen in der Maus?.....	142
6.3	Welche Mechanismen vermitteln den Schutz durch Resveratrol? .....	145
6.4	Führt ein Ausfall einzelner Komponenten der antioxidativen Verteidigung einer Zelle zu erhöhten oxidativen DNA Schäden?.....	152
<b>7</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS.....</u></b>	<b>154</b>
<b>8</b>	<b><u>ANHANG.....</u></b>	<b>178</b>



## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

8-oxoG (8-Hydroxyguanin)	7,8-Dihydro-8-oxoguanin
AOA	Ataxia mit Oculomotor Apraxie
AP-Läsion	Apurinische/apyrimidinische Stelle in der DNA
AT (ATM)	Ataxia telangiectasia (mutated protein)
BER	Basenexcisionsreparatur
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CAT	Katalase (Catalase)
CSA	Cockayne Syndrom Typ A
CSB	Cockayne Syndrom Typ B
CPD	Cyclobutan-Pyrimidindimer
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DR	Direkte Schadensreversion
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
DTNB	Ellmann's Reagenz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fapy	Formamidopyrimidin
FCS	fötale Kälberserum
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase
G6P-DH	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPX	Glutathionperoxidase
GR	Glutathionreduktase
GS	Glutathionsynthetase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
h	Stunde
HO1	Hämoxygenase 1
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie

---

HR	Homologe Rekombination
IE	Internationale Einheiten
MEFs	Mausembryo-Fibroblasten
min	Minute(n)
Mio	Millione(n)
MMR	Fehlpaarungsreparatur ( <i>Mismatch repair</i> )
mRNA	( <i>messenger</i> -) Ribonukleinsäure
NER	Nukleotidexcisionsreparatur
NHEJ	Nicht homologes Endjoining
NBS	Nijmegen breakage syndrom
OGG1	8-Hydroxyguanin-DNA-Glykosylase
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Ro19-8022	[R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl)-carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkription bzw. Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIRT1	Sirtuin 1
sMAF	kleine (small) Maf-Proteine
SOD	Superoxiddismutase
SSB	Einzelstrangbruch ( <i>single-strand break</i> )
TCR	Transkriptionsgekoppelte Reparatur
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
VIS	sichtbares Licht (visible light)
wt	Wildtyp
WY-14,643	[4-Chloro-6-(2,3-dimethyl-phenylamino)-pyrimidin-2-ylsulfanyl]-essigsäure
XO	Xanthinoxidase
XP	Xeroderma pigmentosum
XRCC1	X-ray repair cross complementing group 1
ZVTE	Zentrale Versuchstiereinrichtung

## 1 ZUSAMMENFASSUNG

Oxidative DNA-Basenmodifikationen, wie 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG), werden endogen in allen Zellen gebildet. Die beobachtbaren Spiegel ergeben sich aus dem Gleichgewicht zwischen der Bildung durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS), sowie der gleichzeitigen Reparatur der DNA-Schäden. Durch ihr hohes mutagenes Potential, tragen oxidative DNA-Basenmodifikationen zur spontanen Mutationsrate bei. Der Ausfall wichtiger DNA-Reparaturmechanismen führt in *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Knockout-Mäusen zu einem Anstieg von 8-oxoG und der spontanen Mutationsrate.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die basalen Spiegel an oxidativen Basenmodifikationen und die spontanen Mutationsraten *in vivo* durch die orale Gabe von Resveratrol moduliert werden können. Resveratrol ist ein Pflanzeninhaltsstoff (u.a. aus Rotwein) mit einer Vielzahl von Wirkungen, der bereits in zahlreichen Studien ein chemopräventives Potential gezeigt hat und antioxidativ wirkt.

An verschiedenen Mausgenotypen wurden zum einen eine Kurzzeit-Behandlung (7 Tage mit 100 mg/kg per Gavage) und zum anderen eine Langzeit-Behandlung (3-9 Monate mit 0,04% *ad libitum*) mit Resveratrol durchgeführt. Die oxidativen DNA-Schäden wurden in primären Maushepatozyten mit Hilfe einer modifizierten Alkalischen Elution, mit der bakteriellen Formamidopyrimidin-DNA Glykosylase (FPG) als Sonde, bestimmt. Zur Analyse der Mutationsrate wurde der BigBlue<sup>®</sup>-Mutationsassay mit anschließender Sequenzierung der Mutationen verwendet.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Kurzzeit- und die Langzeit-Behandlung mit Resveratrol die basalen Spiegel oxidativer DNA-Basenmodifikationen senken. Die Reduktion ist jeweils wesentlich ausgeprägter in den reparaturdefizienten *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen zu erkennen. Auch die spontane Mutationsrate wird durch eine mehrmonatige Behandlung mit Resveratrol um ungefähr 20-30% reduziert.

Anschließende mechanistische Untersuchungen zeigten, dass dieser Schutz wahrscheinlich auf einer Induktion der antioxidativen Schutzmechanismen begründet ist. So wurde gefunden, dass primäre Hepatozyten aus mit Resveratrol behandelten

Mäusen wesentlich besser gegen exogenen oxidativen Stress geschützt sind, als Hepatozyten von unbehandelten Tieren. Außerdem sind die oxidativen Markermutationen (GC→TA-Transversionen) stärker von der Reduktion der spontanen Mutationsrate betroffen, als andere Mutationen (z.B. GC→AT-Transitionen). Ein weiterer Hinweis ist die Hochregulation der mRNA-Spiegel von verschiedenen antioxidativen Schutzenzymen, wie Superoxiddismutase 1 / 2, Hämoxygenase 1 und Glutathionperoxidase 1, nach der Gabe von Resveratrol in Mäuselebern.

Die Ergebnisse zeigen erstmalig, dass spontane Mutationen *in vivo* durch Fremdstoffe in der Nahrung reduziert werden können. Im Falle von Resveratrol wird diese Reduktion wahrscheinlich durch eine Stimulation der endogenen antioxidativen Schutzmechanismen ausgelöst.

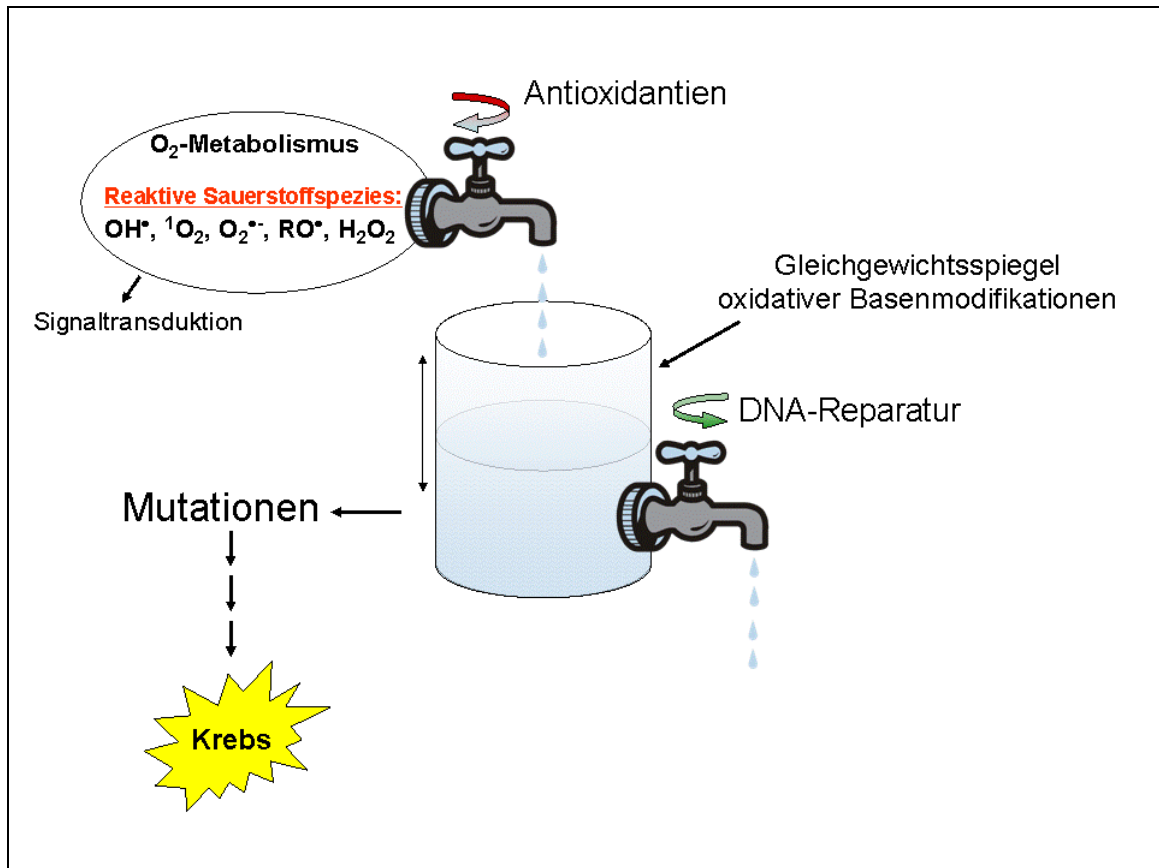
## 2 EINLEITUNG

Krebs war in Deutschland im Jahr 2007, mit 25,6% der Todesfälle, nach den Herz- und Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache (Bundesamt, 2009). Es ist deshalb von großem Interesse den Prozess der Krebsentstehung und des Fortschreitens der Krankheit zu untersuchen. Zusätzlich ist es sehr wichtig verschiedene Faktoren oder Einflüsse zur Prävention von Krebs (Chemoprävention) zu identifizieren und die dahinter stehenden Mechanismen aufzuklären.

Obwohl zahlreiche Kanzerogene in der Umwelt, wie Aflatoxine, polyzyklische Kohlenwasserstoffe, Asbest, Tabakrauch oder Strahlung, bereits identifiziert sind, kann die oft relativ niedrige Exposition mit diesen Noxen die hohe Krebsinzidenz in der Bevölkerung nur teilweise erklären (Ames und Gold, 2000). Endogene Faktoren scheinen also eine wichtige Rolle in der Kanzerogenese zu spielen und könnten diese Diskrepanz zum Teil erklären. Einer dieser endogenen Faktoren sind dabei oxidative DNA-Schäden, welche durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gebildet werden. Diese Schäden sind von besonderem Interesse, da sie anscheinend in allen Zellen gebildet werden und in einem gewissen Gleichgewichtsspiegel (Steady-State-Spiegel) vorkommen (Epe, 2002).

Die Generierung von oxidativen DNA-Schäden ist sehr stark von Umwelt, Ernährung und Lebensstil abhängig, was durch Studien an Zwillingen demonstriert wurde (Lichtenstein et al., 2000). Dem Prozess der Schädigung von DNA durch ROS stehen, schon vor der eigentlichen Generierung, Abwehrmechanismen gegenüber. Dies sind vor allem Antioxidantien, welche die DNA schützen (siehe 2.2). Antioxidantien sind einerseits die direkten Radikalfänger, wie Glutathion (GSH) oder Vitamin C. Aber es gibt andererseits auch ein komplexes Netzwerk von antioxidativen Enzymen, die zur Aufrechterhaltung eines physiologischen Redoxniveaus dienen. Ein weiterer Mechanismus zur Protektion der Zelle sind verschiedene DNA-Reparatursysteme (siehe 2.5), welche oxidative DNA-Modifikationen entfernen und somit einen Beitrag zur genomischen Stabilität leisten. Aus der Bildungsgeschwindigkeit der DNA-Schäden einerseits und der Reparaturgeschwindigkeit andererseits, resultiert in allen Zellen der Steady-State-Spiegel an oxidativen DNA-Schäden, wobei von diesen wahrscheinlich das 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG) die mengenmäßig häufigste Modifikation ist.

In **Abbildung 1** sind der Ursprung und die Einflussfaktoren des Steady-State-Spiegels an oxidativen DNA-Modifikationen schematisch dargestellt.



**Abbildung 1: Basale Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Basenmodifikationen** modifiziert nach (Bercht, 2006; Epe, 2002)

Oxidative Basenmodifikationen können zu Mutationen führen. Durch eine Erhöhung des Gleichgewichtes (z.B. durch exogenen Stress), kommt es zu einem erhöhten Mutationsrisiko. Kommt die entstehende Mutation in einem Tumorsuppresorgen (wie z.B. p53, p16, APC, VHL) oder in einem Onkogen (wie z.B. ras, c-myc) vor, kann es durch einen mehrstufigen Prozess zu einer malignen Entartung und damit Krebs führen. Durch Mutationen in so genannten „caretaker“-Genen, die an der Wahrung der genomischen Stabilität beteiligt sind (z.B. DNA-Reparaturgene), kommt es durch den Ausfall von Schutzmechanismen indirekt zu einer weiteren Erhöhung des Mutationsrisikos (Mutatorhypothese) (Loeb et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, in wieweit die basalen Spiegel oxidativer DNA-Modifikationen durch den Einfluss der Ernährung moduliert werden können und wie sich dies auf die spontane Mutationsrate auswirkt. In den folgenden Kapiteln, werden die Grundlagen der Bildung und Reparatur oxidativer DNA-Basenmodifikationen erläutert.

## 2.1 Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies

In allen aeroben Organismen wird Sauerstoff zur Gewinnung von Energie benötigt. Dabei entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) als Nebenprodukte. Die wichtigsten ROS sind in **Tabelle 1** aufgeführt. Kommt es in einer Körperzelle zu einem Ungleichgewicht von Prooxidantien zu Antioxidantien, so spricht man im allgemeinen von „Oxidativem Stress“ (Sies, 1991). Dies kann entweder durch die vermehrte Bildung oder auch durch den gestörten bzw. verminderten Abbau von ROS entstehen (Sies, 1993). Als Konsequenzen von oxidativem Stress kommt es zur Schädigung von Makromolekülen, wie Nukleinsäuren, Proteinen oder auch Lipiden. Neben diesen Schäden, welche bei der Kanzerogenese, Entzündungen, Neurodegeneration oder zellulären Seneszenz eine Rolle spielen (Maynard et al., 2009), haben ROS aber auch wichtige Funktionen bei den physiologischen Signaltransduktionswegen der Zelle (Palmer und Paulson, 1997; Poli et al., 2004).

**Tabelle 1: Reaktive Sauerstoffspezies und ihre ungefähre Lebensdauer. (Sies, 1993)**

Reaktive Sauerstoffspezies	Halbwertszeit [s]
HO <sup>•</sup> , Hydroxylradikal	10 <sup>-9</sup>
<sup>1</sup> O <sub>2</sub> , Singulett-Sauerstoff	10 <sup>-6</sup>
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> , Superoxidradikal	Dismutation
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Wasserstoffperoxid	stabil, enzymatischer Abbau
RO <sup>•</sup> , Alkoxyradikal	10 <sup>-6</sup>
ROO <sup>•</sup> , Peroxylradikal	5-10
NO <sup>•</sup> , Stickstoffmonoxid	1-10

### 2.1.1 Exogene Quellen reaktiver Sauerstoffspezies

Es gibt verschiedene Umweltfaktoren, welche die in **Tabelle 1** aufgeführten ROS bilden können (Limón-Pacheco und Gonsebatt, 2009). So kann etwa durch Sonnenlicht bzw. UV-Strahlung direkt oxidativer Stress in Zellen ausgelöst werden (Eiberger et al., 2008). Oxidativer Stress entsteht auch durch ionisierende Strahlung und bei der Exposition mit Übergangsmetalle oder chemischen Oxidantien (Ercal et al., 2001; Valko et al., 2006). Ebenfalls können ROS durch verschiedenen Chemotherapeutika, wie z.B. Anthrazykline generiert werden (Kovacic und Osuna, 2000).

Eine weitere Möglichkeit exogener Quellen sind so genannte Photosensibilisatoren (z.B. Ro19-8022 / siehe **Abbildung 11**), welche in die Zelle gelangen, dort nach der Anregung durch sichtbares Licht in einen angeregten Zustand gelangen und danach diese Energie direkt auf die DNA-Basen abgeben bzw. die Energie auf Sauerstoff übertragen. Dadurch werden ROS gebildet und diese können die DNA schädigen (Will et al., 1999).

### 2.1.2 Endogene Quellen reaktiver Sauerstoffspezies

In jeder Zelle werden ROS kontinuierlich beim Metabolismus gebildet, die wichtigsten endogenen Quellen für ROS sind in **Tabelle 2** aufgelistet.

**Tabelle 2: Wichtige endogene Quellen für reaktive Sauerstoffspezies** (Klotz, 2007)

Endogene Quellen reaktiver Sauerstoffspezies
Mitochondriale Atmungskette
Xenobiotika-Metabolismus (Cytochrom-P-450-System)
Purinabbau (Xanthinoxidase)
Granulozyten (NADPH-Oxidase)
Arachidonsäure-Metabolismus
Peroxisomen (speziell Leber)



Während des Sauerstoff Metabolismus in den Mitochondrien wird der Großteil des Sauerstoffs in Wasser umgewandelt, aber 0,2-2% des Sauerstoffs werden zu ROS (Chance et al., 1979). Durch Übertragung von Elektronen aus den Komplexen I und III der Atmungskette auf Sauerstoff entstehen Superoxidradikalanionen ( $O_2^{\bullet-}$ ) (Loschen et al., 1971).  $O_2^{\bullet-}$  ist selbst nicht sehr reaktiv, kann aber entweder spontan oder enzymatisch durch Dismutation abgebaut werden. Dabei entsteht Wasser und  $H_2O_2$ , welches vollständig zu Wasser oder unvollständig in einer metallkatalysierten Fenton-Reaktion zum Hydroxylradikal ( $HO^{\bullet}$ ) reduziert werden kann (Turrens, 2003). Hydroxylradikale sind durch ihre kurze Halbwertszeit und die fehlenden inaktivierenden Enzyme besonders reaktiv. Das entstehende  $H_2O_2$  ist zwar weniger reaktiv, aber es ist recht stabil und kann frei durch Membranen diffundieren. Dadurch leistet es einen wichtigen Beitrag zur Entstehung von oxidativem Stress und Schäden in weiter entfernten Zellkompartimenten (Boveris et al., 2006).

Peroxisomen sind Zellorganelle, die sich im Cytoplasma von eukaryotischen Zellen befinden, und speziell in der Leber haben sie einen großen Anteil an der zellulären  $H_2O_2$ -Produktion (Boveris et al., 1972). Ihre wichtigste Aufgabe ist die peroximale  $\beta$ -Oxidation von langkettigen Fettsäuren (Kunau et al., 1995). Die Proliferation von Peroxisomen kann durch die Gabe von diversen Xenobiotika (z. B. WY14-463 / siehe 4.2.2.10) stimuliert werden, diese erhöhte Proliferation führt zwar in Nagern zu einer Tumorentwicklung (Reddy et al., 1980), aber nicht zu erhöhten Spiegeln oxidativer DNA-Schäden (Trapp et al., 2007b).

Eine weitere Quelle von ROS ist die Xanthinoxidase (XO), ein in vielen Geweben vorkommendes Enzym (Li, C. und Jackson, 2002), welches die Hydroxylierung von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zu Harnsäure katalysiert (Nishino et al., 2008). In beiden Schritten wird molekularer Sauerstoff reduziert und es bildet sich dabei  $O_2^{\bullet-}$  im ersten und  $H_2O_2$  im zweiten Schritt (Valko et al., 2006).

## 2.2 Antioxidative Schutzmechanismen

Antioxidantien sind die erste Verteidigungslinie gegen die Schäden durch ROS (Halliwell, 1996). Die zellulären Antioxidantien sind zum einen „kleine“ Moleküle und zum anderen ein verzweigtes Netzwerk von enzymatischen Antioxidantien, welche effektiv ROS abfangen können (Mates et al., 1999).

### 2.2.1 Nicht enzymatische Antioxidantien

Ein nicht-enzymatisches Antioxidans sollte idealerweise: (I) spezifisch freie Radikale detoxifizieren (keine reaktiven Folgeradikale bilden); (II) Übergangsmetalle chelatieren; (III) andere Antioxidantien regenerieren; (IV) sich positiv auf die Genexpression von Schutzenzymen auswirken; (V) in Geweben und Körperflüssigkeiten in einer physiologisch relevanten Dosis vorkommen; (VI) in hydro- u. lipophilen Bereichen der Zelle wirken.

Die wichtigsten nicht-enzymatischen Antioxidantien sind: Glutathion (GSH), Vitamin C, Vitamin E, Carotinoide oder verschiedene Polyphenole.

Glutathion ist für Zellen die bedeutendste antioxidative Substanz und wichtig für die Aufrechterhaltung des Redoxstatus (Masella et al., 2005). Es kommt intrazellulär je nach Gewebe in Konzentrationen von 2-20 mM vor (Klotz, 2007). GSH ist stark abhängig von den enzymatischen Antioxidantien (siehe 2.2.2), da es von der  $\gamma$ -Glutamylcysteinsynthetase aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin gebildet und durch die Glutathionreduktase (GR) wieder reduziert wird (siehe **Abbildung 2**). GSH kann die Zellen vor oxidativem Stress schützen indem es Hydroxylradikale und Singulett-Sauerstoff direkt abfängt, andere Antioxidantien (siehe unten) regeneriert oder im Zusammenspiel mit der Glutathionperoxidase  $H_2O_2$  und Lipidperoxide detoxifiziert (Masella et al., 2005) (siehe **Abbildung 2**). Bei der Oxidation von GSH kommt es zur Bildung des Glutathiondisulfids (GSSG). Zusätzlich wird GSH im Phase II Fremdstoffmetabolismus von den Glutathion-S-Transferasen als Cofaktor zur Konjugation an Xenobiotika verwendet (Coles und Kadlubar, 2003).

Vitamin C (Ascorbinsäure) ist ein wichtiges und starkes Antioxidants, welches im wässrigen Milieu effektiv ist (Kojo, 2004). Es ist aber aufgrund der ebenfalls gezeigten prooxidativen Eigenschaften (Podmore et al., 1998) immer noch in der Diskussion, ob Vitamin C-Supplementation *in vivo* zu einer Reduktion von oxidativen Schäden führt oder eventuell sogar vor Krebs schützen kann (Naidu, 2003).

Vitamin E ist ein lipophiles Vitamin, welches in unterschiedlichen Formen (vorwiegend  $\alpha$ -Tocopherol) vorliegt und als das hauptsächliche Antioxidants in Zellmembranen angesehen wird (Burton und Ingold, 1989). Seine wichtigste Funktion ist dabei der Schutz vor Lipidperoxidation (Pryor, 2000). Das entstehende  $\alpha$ -Tocopherolradikal wird durch Vitamin C wieder zum  $\alpha$ -Tocopherol regeneriert, dieser antioxidative Redox-Zyklus ist sehr effektiv (Klotz, 2007).

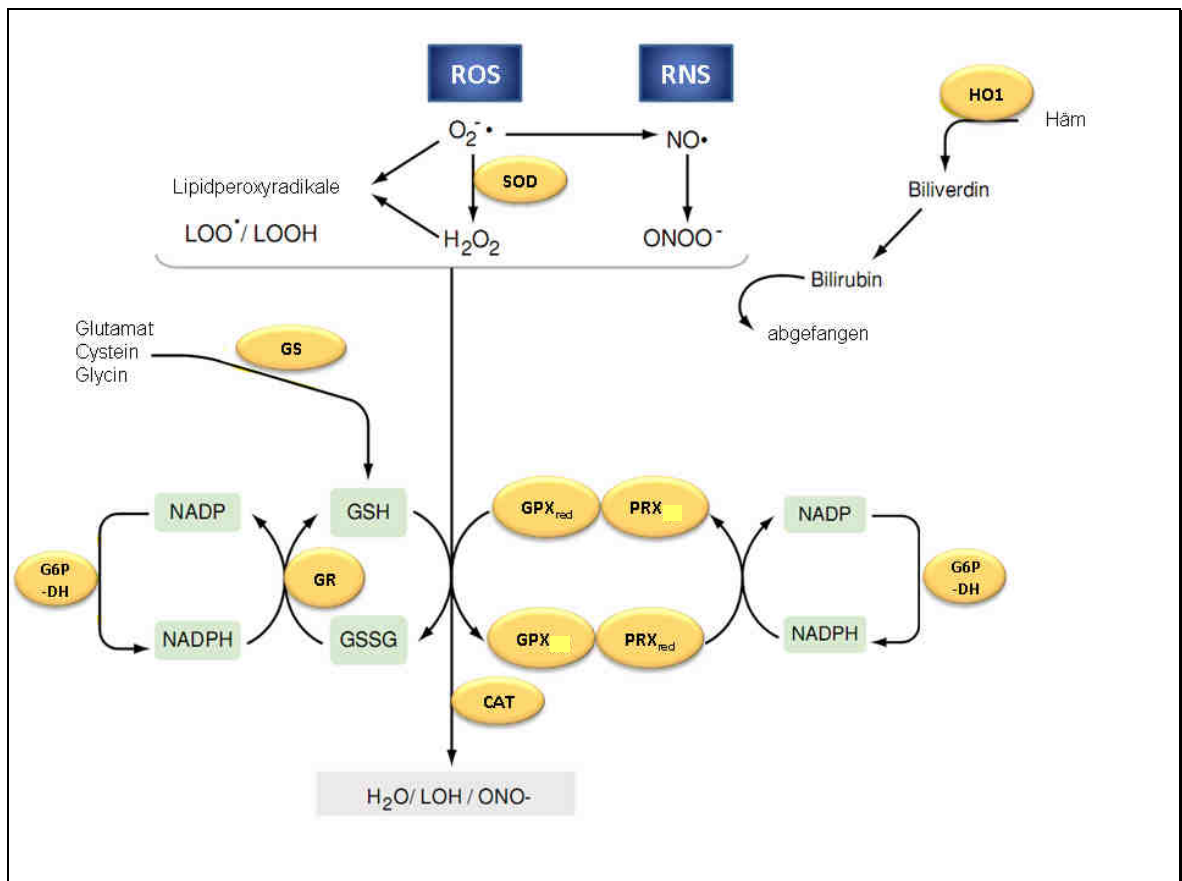
Carotinoide (z.B.  $\beta$ -Caroten oder Lycopin) sind Pigmentfarbstoffe und kommen in einer Vielzahl von Pflanzen und Mikroorganismen vor (Valko et al., 2006). Ihre antioxidativen Eigenschaften bekommen Carotinoide durch ein viele konjugierte Doppelbindungen (Mortensen et al., 2001), wodurch sie effektiv Hydroxylradikale und Singulett-Sauerstoff abfangen können.

Die Polyphenole und speziell die Flavonoide bilden eine große Gruppe von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, welche ubiquitär vorkommen und ein wichtiger Bestandteil der menschlichen Ernährung sind (Rice-Evans, C. A. et al., 1996). Polyphenole können eine Radikalkettenreaktion durch die Bildung von stabilen Phenoxyradikalen stoppen. Die Stabilität des gebildeten Radikals hängt stark von den jeweiligen Substituenten und der Anzahl der Hydroxylgruppen ab (Valko et al., 2006). Einige Polyphenole wirken zusätzlich als Chelatoren für verschiedene Metalle und verhindern dadurch die Fenton-Reaktion von  $H_2O_2$  (Rice-Evans, C., 2001). Unter bestimmten Bedingungen, wie hoher pH-Wert, Anwesenheit von Eisen oder hoher Konzentration, können Polyphenole aber auch prooxidativ wirken, wodurch ihre teilweise zytotoxischen Eigenschaften erklärt werden (Rice-Evans, C., 2001).

Das in der Arbeit verwendete Polyphenol Resveratrol wird im Abschnitt 2.6 noch einmal detailliert besprochen.

## 2.2.2 Enzymatische Antioxidantien

Das Zusammenspiel einiger wichtige Enzyme, die bei der Entgiftung von ROS und Reaktiven Stickstoff Spezies (RNS) beteiligt sind, kann man in **Abbildung 2** erkennen.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des Netzwerkes an antioxidativen Enzymen.** Modifiziert aus (Kensler et al., 2007) Abkürzungen: SOD = Superoxiddismutase, HO1 = Hämoxigenase 1, GS = Glutathionsynthetase, G6P-DH = Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, GPX = Glutathionperoxidase, PRX = Peroxiredoxin, red = reduzierte Form, CAT = Katalase. In gelben Boxen sind NRF2-regulierte Enzyme.

Die Superoxiddismutase (SOD) katalysiert die, auch spontan ablaufende, Dismutation des Superoxidanionradikals zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid um den Faktor 1000-10000 (Liochev und Fridovich, 2007). Im Menschen (und in der Maus) gibt es drei Isoformen der SOD: die cytosolische Cu/Zn-SOD (SOD1), die mitochondriale Mn-SOD (SOD2), und die extrazelluläre SOD (SOD3).

Die SOD1 ist im Cytosol der Zelle gelöst (Zelko et al., 2002), kommt aber auch im Zellkern vor (Barbe et al., 2008). Sie hat in ihren aktiven Zentren jeweils ein Kupfer- und ein Zinkatom gebunden, welche bei der Umsetzung oxidiert und wieder reduziert werden (Mates et al., 1999). Die SOD2 ist vorwiegend auf der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert (Da Cruz et al., 2003), sie ist ein Homotetramer mit jeweils einem Manganatom pro Untereinheit, das während der Dismutation von  $Mn^{3+}$  nach  $Mn^{2+}$  und wieder zurück umgewandelt wird (MacMillan-Crow et al., 1998). Wie wichtig die SOD2 für einen Organismus ist, kann man daran erkennen, dass *Sod2-knockout*-Mäuse nicht lebensfähig sind und bereits nach 3 Wochen an Kardiomyopathie sterben (Li, Y. et al., 1995). Ist das *Sod1*-Gen ausgeschaltet, so überleben die Mäuse zwar dieses Alter, aber sie haben eine etwa um 30% verkürzte Lebensdauer und leiden unter erhöhtem oxidativem Stress (Elchuri et al., 2004). Die extrazelluläre SOD3 ist ein tetramerisches Glycoprotein, welches hauptsächlich für die SOD-Aktivität in Plasma, Lymphe und Synovialflüssigkeit verantwortlich ist (Sandstrom et al., 1994), aber auch im Zellkern vorkommt und dort möglicherweise vor DNA-Schäden schützt (Ookawara et al., 2002).

Glutathionperoxidasen (GPX) vermitteln die Reduktion von Hydroperoxiden unter der Verwendung von GSH, welches dabei zu GSSG oxidiert wird. Die GPX enthalten ein einzelnes Selenocystein im aktiven Zentrum, welches bei der Elimination von Peroxiden zum Selenol (Se-OH) wird (Tappel, 1978). Das oxidierte GSSG wird dann von der Glutathionreduktase (GR) unter NADPH-Verbrauch wieder regeneriert zum GSH und steht für weitere Reaktionen zur Verfügung (siehe **Abbildung 2**). In Säugetieren gibt es 5 unterschiedliche Isoenzyme, wobei die jeweilige Expression stark vom Gewebe abhängig ist (Brigelius-Flohe, 2006). GPX1 kommt annähernd ubiquitär vor allem im Cytosol und Mitochondrien vor.

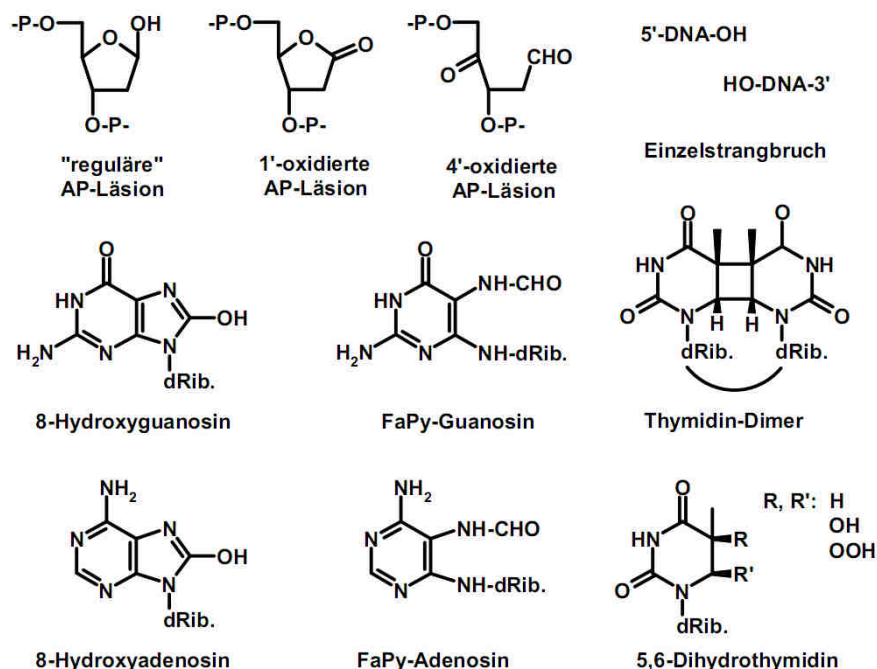
Katalase (CAT) ist ein Enzym, das hauptsächlich in den Peroxisomen lokalisiert ist und in Konkurrenz mit der GPX  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}$  umwandelt. (Valko et al., 2006). Die CAT hat mit eine der höchsten Umsetzungsraten aller Enzyme, ein Molekül kann bis zu 6 Mio. Moleküle  $\text{H}_2\text{O}_2$  pro Minute umwandeln (Kirkman und Gaetani, 2007).

Ein weiteres Enzym, welches zur Wahrung der Redox-Homöostase einer Zelle beiträgt, ist die Hämoxxygenase 1 (HO1) (Applegate et al., 1991). Die HO1 baut prooxidatives Häm zu Biliverdin ab, dabei wird Kohlenmonoxid und  $\text{Fe}^{2+}$  frei (Keyse und Tyrrell, 1989). Biliverdin wird anschließend durch eine weitere Reduktase zu Bilirubin reduziert (Ryter und Choi, 2009). Der genaue Mechanismus, wie HO1 Gewebe vor oxidativem Stress und Schaden schützt, ist bisher noch nicht geklärt. Man geht davon aus, dass alle entstehenden Reaktionsprodukte, einzeln und synergistisch antioxidativ, antiproliferativ und antiapoptotisch wirken können (Ryter et al., 2006).

Reguliert werden viele dieser Enzyme durch den Transkriptionsfaktor *nuclear factor erythroid 2-related factor 2* (NRF2) (in **Abbildung 2** in gelben Boxen). NRF2 ist im physiologischen Zustand im Cytoplasma mit dem *Kelch ECH associating protein 1* (KEAP1) verbunden (Itoh et al., 1999). KEAP1 ist über das Actin-Cytoskelett mit NRF2 gekoppelt und vermittelt die proteasomale Degradation von NRF2 (Kang et al., 2004). Kommt es nun zu einem Stresssignal, so wird NRF2 frei, transloziert in den Zellkern und bindet an das *antioxdativ response element* (ARE). Als primäre Sensoren für den Stress dienen dabei mehrere benachbarte Cysteinreste in KEAP1 (Wakabayashi et al., 2004), welche nach einer Oxidation ihre Konformation ändern und dadurch NRF2 freigegeben wird (Dinkova-Kostova et al., 2002). Neben den oben beschriebenen antioxidativen Enzymen werden zusätzlich noch Gene des Fremdstoffmetabolismus, der NADPH-Synthese und von Efflux-Transportern über den KEAP1-NRF2-ARE-Weg reguliert (Kensler et al., 2007).

## 2.3 Oxidative DNA-Modifikationen

Durch ROS kann DNA auf unterschiedliche Art und Weise geschädigt werden. Es konnten bis zum heutigen Zeitpunkt mehr als 100 unterschiedliche DNA-Modifikationen identifiziert werden (Bjelland und Seeberg, 2003; Dizdaroglu, 1992). Bei diesen kann die DNA-Base oder auch das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA geschädigt werden. Es gibt Einzel- und Doppelstrangbrüche, modifizierte Basen, abasische Stellen (AP-Läsionen), sowie Protein-DNA-Addukte. Einige der wichtigsten DNA-Schäden sind in **Abbildung 3** abgebildet.



**Abbildung 3: Chemische Strukturen einiger wichtiger DNA-Schäden**

Zu den in der Zelle am häufigsten vorkommenden DNA-Modifikationen gehört das 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG), welches zusätzlich auch stark mutagen ist. Es entsteht entweder durch die Addition eines Hydroxylradikals an Position C8 des Guanins (Epe, 1995) oder durch die Einwirkung von Singulett-Sauerstoff (Halliwell und Aruoma, 1991). Die relative Häufigkeit dieser Modifikation ist durch das besonders niedrige Oxidationspotential von Guanin im Vergleich zu den anderen DNA-Basen bedingt (Huttermann, 1982). 8-oxoG liegt in der DNA überwiegend in

der Ketoform vor, wodurch eine Fehlpaarung mit Adenin bei der Replikation möglich ist (Shibutani et al., 1991) (siehe 2.4). Oxidierte AP-Stellen entstehen durch einen radikalischen Angriff an Position 1,2 oder 4 der Desoxyribose (Epe, 1995). Durch spontane Depurinierung entstehen nicht oxidierte AP-Läsionen (Lindahl, 1993).

## 2.4 Biologische Konsequenzen oxidativer DNA-Schäden

In der Zelle können DNA-Schäden auf mehrere Arten prozessiert werden (Friedberg, E.C., 2003). Ein DNA-Schaden kann durch eines der unterschiedlichen Reparatursysteme (siehe 2.5) erkannt werden und vollständig repariert werden. Eine weitere Möglichkeit ist zuerst die Aktivierung von Signalkaskaden, welche in einem Zellzyklusarrest enden, dadurch wird der Zelle weitere Zeit gegeben den Schaden zu reparieren (Jackson und Bartek, 2009). Eine dritte Option ist die Toleranz eines für die Zelle nicht gefährlichen Schadens durch unterschiedliche Polymerasen bei der so genannten „*translesion synthesis*“ (Takata und Wood, 2009). Sind zu viele oder nicht reparierbare DNA-Schäden in der Zelle, so kann der programmierte Zelltod (Apoptose) oder Nekrose eingeleitet werden (Roos und Kaina, 2006). Wird ein DNA-Schaden nicht oder nur unzureichend repariert, kann dieser in der folgenden Zellteilung als Mutation fixiert werden. Eine Mutation ist gefährlich, da es der initiale Schritt bei der Tumorentstehung ist, allerdings sind Mutationen auch für die Evolution von Organismen wichtig.

7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG) ist, wie bereits erwähnt die intrazellulär am häufigsten vorkommende oxidative DNA-Basenmodifikation. Da bei der Replikation gegenüber einem 8-oxoG ein Adenin eingebaut werden kann, besitzt 8-oxoG ein hohes mutagenes Potential (Tchou und Grollman, 1993; Wood, M. L. et al., 1992). Bei Untersuchungen zur Mutationsfrequenz in Säugerzellen, konnte gezeigt werden, dass ein einzelnes 8-oxoG in einem einzelsträngigen Vektor mit 2-5% zu Mutationen führt, welche vorwiegend G:C nach T:A Transversionen sind (Moriya, 1993).



Formamidopyrimidine (Fapy-Guanin und Fapy-Adenin) besitzen kein mutagenes Potential. Sie führen aber zur Hemmung der Replikation (O'Connor et al., 1988) und sind zytotoxisch (Tudek et al., 1992).

AP-Läsionen können über unterschiedliche Mechanismen ebenfalls zu Mutationen führen (Epe, 1995). Durch das Fehlen der Base kommt es zum Block der Transkription und der Replikation (Yu et al., 2003). Zusätzlich kann es während der Replikation zu Basenfehlpaarungen kommen und durch eine spontane Hydrolyse können DNA-Einzelstrangbrüche entstehen (Lindahl, 1993).

Einzelstrangbrüche (SSB) entstehen sehr leicht durch den direkten Angriff von ROS auf das DNA-Grundgerüst und werden sehr schnell repariert (Caldecott, 2001). Ein mutagenes Potential von SSB kann nicht ausgeschlossen werden (Epe, 1995), und sie führen zu einer starken Inhibition der Transkription (Lingg, 2009).

## 2.5 Mechanismen der DNA-Reparatur

Da die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität essentiell ist, gibt es in allen Organismen ein stark verzweigtes Netzwerk an DNA-Reparaturmechanismen. Unterschiedliche Arten von DNA-Schäden werden dabei bevorzugt von bestimmten Reparaturwegen aus dem Genom entfernt, aber es gibt auch vielfältige Interaktionsmöglichkeiten und Regulationsmechanismen zwischen den einzelnen Wegen (Kovtun und McMurray, 2007). Die Wichtigkeit dieses Systems lässt sich u.a. an der Tatsache erkennen, dass im Menschen Mutationen in unterschiedlichen Reparaturproteinen zu schwerwiegenden Erbkrankheiten, welche sich durch eine Anfälligkeit für Krebserkrankungen (z.B. Ataxia Telangiectasia, Xeroderma Pigmentosum, Nijmegen Breakage Syndrom) (Hoeijmakers, 2001; Thoms et al., 2007), neurologische Defekte (z.B. Cockayne Syndrom, Ataxia Oculomotor Apraxie) (Rass et al., 2007) und vorzeitiges Altern (z.B. Cockayne Syndrom, Werners Disease) (Brosh und Bohr, 2007) auszeichnen, führen.

In den letzten Jahren ist die DNA-Reparatur auch mehr und mehr als Target in der Krebstherapie, entweder als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika, von Interesse (Helleday et al., 2008). So werden zum Beispiel Inhibitoren der Poly-ADP-Polymerase 1 (PARP1) in klinischen Phasen für die Therapie von Brustkrebs eingesetzt (Farmer et al., 2005; Opar, 2009) oder es werden Inhibitoren der O<sup>6</sup>-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) in Kombination mit Alkylantien angewendet (Ranson et al., 2006).

Im Folgenden werden nun die wichtigsten Reparaturwege kurz vorgestellt. Ein Fokus liegt dabei vor allem auf denen für die Reparatur von oxidativen DNA-Schäden wichtigen Mechanismen.

### 2.5.1 Direkte Schadensreversion

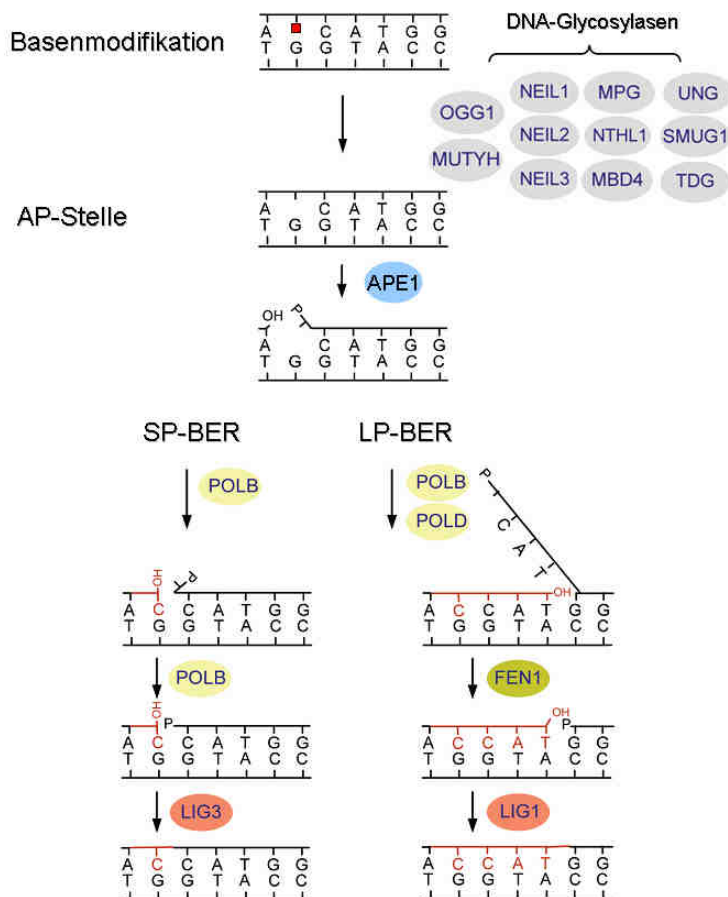
Die direkte Schadensreversion ist ein sehr einfacher Reparaturmechanismus. Es ist dafür nur ein Protein notwendig, welches praktisch ohne Fehler mit einer hohen Substratspezifität einen Schaden ohne Einschnitt der DNA entfernt (Eker et al., 2009). Nach dem heutigen Kenntnisstand ist die direkte Reversion nicht wesentlich an der Reparatur oxidativer Basenmodifikationen beteiligt, aber wichtig bei der Reparatur von methylierten Basen und UV-induzierten DNA-Schäden.

So wird O<sup>6</sup>-Methylguanin unter anderem durch die MGMT repariert, indem die Methylgruppe des Substrats in einer irreversiblen Reaktion auf eine Cysteingruppe im aktiven Zentrum des Enzyms übertragen wird (Daniels et al., 2004). Ein weiteres Beispiel ist die oxidative Dealkylierung von 1-Methyladenin und 3-Methylcytosin durch Dioxygenasen wie ABH2 oder ABH3 (Aas et al., 2003).

## 2.5.2 Basenexcisionsreparatur

Basenexcisionsreparatur (BER) ist der wichtigste Reparaturweg für Basenveränderungen, welche durch Oxidation (siehe 2.3), endogene Alkylierung, Desaminierung und Depurinierung/Depyrimidinierung entstehen (Robertson et al., 2009).

Wie in **Abbildung 4** dargestellt, lässt sich die BER in zwei Unterwege einteilen. Die „short-patch-BER“ (SP-BER) bei der genau ein Nukleotid ersetzt wird und die „long-patch-BER“ (LP-BER) bei der 2-8 Nukleotide ausgetauscht werden.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der Basenexcisionsreparatur** modifiziert nach (Robertson et al., 2009)

Der erste Schritt in der BER ist die Erkennung der geschädigten DNA-Base durch eine Glycosylase, welche die N-glykosidische-Bindung spaltet und so die Base entfernt. Durch eine monofunktionelle Glycosylase (z.B. die Uracil-DNA-Glycosylase UNG) entsteht dadurch eine apurinische bzw. apyrimidinische Stelle (AP-Stelle), welche anschließend durch die AP-Endonuclease 1 (APE1) in 5'-Position zur AP-Stelle eingeschnitten wird (David et al., 2007). Ein mögliche Alternative hierzu sind bifunktionelle Glycosylasen (z.B. OGG1), welche zusätzlich zu ihrer Glycosylase-Aktivität noch ein AP-Lyase-Funktion haben, hier erfolgt die Spaltung in 3'-Position zur AP-Stelle. (Boiteux et al., 1987) Der so neu entstandene Einzelstrangbruch in der DNA wird durch die APE1 zu einer Ein-Nukleotid-Lücke in der DNA weiterverarbeitet.

Für die weitere Prozessierung ist wichtig, dass die so entstandene Lücke eine 3'-Hydroxyl- und eine 5'-Phosphatgruppe trägt. Eine 5'-Phosphatgruppe wird durch die Polymerase  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) entfernt (Matsumoto und Kim, 1995; Sobol et al., 1996), aber auch andere nicht ligierbare Enden werden z.B. durch Aprataxin (Ahel et al., 2006) oder die Polynukleotidkinase (Breslin und Caldecott, 2009) für die Weiterverarbeitung vorbereitet. In der SP-BER füllt die Polymerase  $\beta$  (Pol  $\beta$ ) diese Lücke wieder auf und im letzten Schritt wird die Integrität der DNA-Helix durch die Ligase 3 in Zusammenspiel mit dem Gerüstprotein XRCC1 wiederhergestellt (Kubota et al., 1996).

Bei der LP-BER wird ebenfalls durch APE1 ein Einzelstrangbruch generiert, dann kommt es durch die Rekrutierung von Pol  $\beta$  oder Pol  $\delta$  zu einer Initiation dieses Reparaturweges. Es erfolgt eine Verdrängung des alten Stranges der DNA und eine Neusynthese von 2 bis 8 Nukleotiden durch die Polymerase (Frosina et al., 1996). Der so generierte überhängende Strang wird durch die *flap*-Endonuclease (FEN1) in Abhängigkeit von dem Replikationsfaktor C (RFC) und dem *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) abgeschnitten (Klungland und Lindahl, 1997). Im abschließenden Schritt wird die DNA dann durch die Ligase 1 wieder verschlossen.

Der genaue Regulationsmechanismus zwischen den beiden BER-Wegen ist bisher noch nicht bekannt. Es gibt möglicherweise einen Einfluss durch den lokalen ATP-Gehalt (Petermann et al., 2003), die vorliegende Läsion oder den Zellzyklus (Fortini und Dogliotti, 2007).

Die Erkennung der geschädigten Basen durch die Glycosylase ist ein entscheidender Schritt bei der BER. Bis zum heutigen Zeitpunkt sind im Menschen 11 verschiedene DNA-Glycosylasen charakterisiert worden. In **Tabelle 3** sind die einzelnen Glycosylasen und ihre wichtigsten Substrate aufgeführt.

**Tabelle 3: Menschliche DNA-Glycosylasen und ihre Substrate** nach (Barnes und Lindahl, 2004; Robertson et al., 2009)

Enzym	Substrate
OGG1	8-oxoG, fapyG, 8-oxoA
MUTYH	A gegenüber 8-oxoG
NTHL1	Tg, FapyG, DHU, 5-OHU, 5-OHC
NEIL1	Tg, FapyG, DHU, 5-OHU, 5-OHC, fapyA, 8-oxoG
NEIL2	wie NEIL1
NEIL3	unbekannt
UNG	Uracil
SMUG1	Uracil, 5-OH-meU
TDG	T, U, EthenoC (ab CpG-Stellen)
MBD4	T und U gegenüber G (an CpG-Stellen)
MPG	3-meA, 7-meG, Hypoxanthin, EthenoA

Die Enzyme OGG1 und MUTYH sind für die Reparatur von 8-oxoG besonders wichtig und tragen damit zur Wahrung der genomischen Stabilität und dem Schutz gegen oxidative DNA-Schäden bei. Speziell die durch die mögliche Fehlpaarung mit Adenin und bei einer weiteren Replikation entstehende G:C nach T:A Transversion wird durch diese Enzyme verhindert.

## OGG1

Das OGG1 Gen codiert für die 7,8-Dihydro-8-oxoguanin-DNA-Glycosylase, welche sehr effektiv die N-glykosidische Bindung zwischen dem Zucker und dem 8-oxoG auflöst (Michaels et al., 1992). Es ist eine bifunktionelle Glycosylase mit einer AP-Lyase-Aktivität (Bjoras et al., 1997; Boiteux und Radicella, 2000), die zusätzlich noch FapyG und AP-Stellen erkennt (Dherin et al., 1999). In Prokaryoten wie E.coli ist die Funktion von OGG1 durch die Formamido-Pyrimidin-Glycosylase (Fpg) ebenfalls vorhanden (Boiteux et al., 1987). Fpg ist strukturell nicht verwandt mit OGG1, besitzt aber eine sehr ähnliche Aktivität, so dass das eukaryotische OGG1 den Defekt eines in Fpg mutierten E.coli Stamms komplementieren kann (Radicella et al., 1997). Diese ähnliche Aktivität und die Möglichkeit DNA-Modifikationen in Einzelstrangbrüche zu überführen macht man sich bei der Quantifizierung von oxidativen DNA-Basenmodifikationen mit Hilfe der Alkalischen Elution (siehe 4.2.3) zu Nutze. (Epe und Hegler, 1994)

In Mäusen führt ein Fehlen des OGG1 Proteins (*Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse) zwar nicht zu einem schwerwiegenden Phänotyp, aber die basalen Spiegel der oxidativen DNA-Basenmodifikationen akkumulieren im Laufe des Lebens in verschiedenen Organen (Klungland et al., 1999; Osterod et al., 2001). Zusätzlich ist auch die spontane Mutationsrate der Tiere erhöht, was zum größten Teil durch vermehrte G:C nach T:A Transversionen begründet ist (Klungland et al., 1999).

## MUTYH

MUTYH (MutY homolog) ist eine monofunktionelle Glycosylase, welche Adenin aus der DNA entfernt, wenn mit einem 8-oxoG gepaart ist (David et al., 2007; Michaels et al., 1992). Dadurch ergibt sich für OGG1 eine weitere Chance das 8-oxoG zu entfernen und eventuelle Mutationen zu verhindern.

MUTY knockout Mäuse haben keinen offensichtlichen Phänotyp und keine Prädisposition für eine Tumorentwicklung (Xie et al., 2004). In *Mutyh*<sup>-/-</sup>-Mäusen kommt es in verschiedenen Geweben zu keiner Akkumulation von 8-oxoG (Russo et al., 2004).

Erst bei einem Ausfall beider Reparaturenzyme für 8-oxoG in *Mutyh*<sup>-/-</sup>*Ogg1*<sup>-/-</sup> *knockout* Mäusen kommt es zu einer erhöhten Tumorzinzidenz in diversen Organen (Russo et al., 2004).

### 2.5.3 Nucleotidexcisionsreparatur

Die Nucleotidexcisionsreparatur (NER) ist ein sehr vielseitiger Reparaturweg, der einer Vielzahl unterschiedlicher Läsionen, wie durch Sonnenlicht entstehende Pyrimidindimere oder DNA-Addukte durch Chemikalien, erkennen und reparieren kann (Ura und Hayes, 2002). Es gibt auch ein paar spezielle oxidierte Basen, welche durch die NER repariert werden, da sie von der BER nicht prozessiert werden können (Brooks, 2007). Die NER wird in die Globale Genom Reparatur (GGR), welche das gesamte Genom reparieren kann (Nospikel, 2009), und in die Transkriptionsgekoppelte Reparatur (TCR), welche den transkribierten Bereich bevorzugt repariert (Tornaletti, 2009), unterteilt.

Bei der GGR-NER wird die Anwesenheit eines Schadens durch eine Verdrehung der DNA-Struktur erkannt. Dies geschieht vorwiegend von dem XPC-HR23B-Cen2-Komplex (Xeroderma pigmentosum Protein C / human homolog of yeast RAD23 / Centrin 2) (Araki et al., 2001). Der geschädigte Strang wird identifiziert, dann wird der aus 10 Untereinheiten bestehende TFIIH-Transkriptionsfaktor rekrutiert (Friedberg, E. C., 2001). Die Helicasen XPB und XPD dieses Komplexes entwinden die DNA (Winkler et al., 2001) und durch die Endonucleasen XPG und XPF wird ein kurzes Oligonukleotid (25-30 Nukleotide), welches den Schaden überspannt, herausgeschnitten. Abschließend wird die Lücke durch eine Polymerase wieder gefüllt und mit der Ligase 1 bzw. Ligase 3 (Moser et al., 2007) die DNA wieder verschlossen (Friedberg, E. C., 2001; Nospikel, 2009).

Für die Reparatur von 8-oxoG spielt die GGR-NER nur eine untergeordnete Rolle, wie durch Analyse der Reparaturgeschwindigkeit von *Xpc*<sup>-/-</sup>-Fibroblasten nach Bestrahlung mit Ro19-8022 und sichtbarem Licht (vgl. 4.2.3.6) gezeigt wurde. (Flohr-Beckhaus, unpublizierte Daten)

Bei der TCR werden die gleichen Proteine benötigt, nur erfolgt hier die Erkennung des Schadens nicht durch XPC, sondern über eine Blockade der RNA Polymerase II (Tornaletti, 2009). Es werden für die Rekrutierung der restlichen Reparaturproteine und für die Entfernung der RNA-Polymerase II noch die Proteine CSA und CSB benötigt. (Laine und Egly, 2006; van den Boom et al., 2002)

#### 2.5.4 Postreplikative Reparatur (*mismatch*-Reparatur)

Die Aufgabe der *mismatch*-Reparatur ist es, falsch gepaarte Basen oder zusätzliche Basen postreplikativ aus dem Genom zu entfernen, um eventuelle Mutationen zu vermeiden (Marti et al., 2002). Die Fehlpaarungen entstehen vor allem durch fehlerhafte Polymerasen bei der Replikation der DNA oder Basenmodifikationen (Kunz et al., 2009). Die falsch gepaarten Basen werden dann von den Komplexen aus MutS-Komplexe erkannt, und durch MutL Proteine herausgeschnitten und weiter prozessiert (Kunz et al., 2009).

Die *mismatch*-Reparatur hat im Menschen einen wichtigen Beitrag zur Wahrung der genomischen Stabilität. Es konnte gezeigt werden, dass Mutationen in den Genen für MSH (menschliches mutS homolog) zu einem erhöhten Risiko der Tumorentstehung führt (Peltomaki, 2003).

#### 2.5.5 Doppelstrangbruch-Reparatur

Doppelstrangbrüche der DNA (DSB) entstehen hauptsächlich durch Angriffe von ionisierender Strahlung auf das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA oder durch direkte Fehler bei der Replikation (Pardo et al., 2009). Es gibt in eukaryotischen Zellen ein ausgefeiltes Signal-Netzwerk, welches durch die Aktivierung von Checkpoints der Zelle Zeit zur Reparatur gibt (Khanna und Jackson, 2001; Weinert und Hartwell, 1988). DSB werden vorwiegend über zwei Hauptwege prozessiert, das Nicht-homologe Endjoining (NHEJ) und die Homologe Rekombination (HR). Beim NHEJ werden die zwei losen Enden der DNA wieder zusammengefügt, indem zuerst die Enden stabilisiert, dann vorbereitet und anschließend wieder ligiert werden (Khanna and Jackson, 2001). Bei den komplexen Mechanismen der HR wird der DSB durch Austausch oder einem Transfer von identischen Sequenzen aus einem intakten DNA-Molekül durchgeführt (Pardo et al., 2009).



## 2.6 Resveratrol

### 2.6.1 Allgemeines

Resveratrol (trans - 3,4',5- Trihydroxystilben) ist ein Pflanzeninhaltsstoff, welcher in Weintrauben, Erdnüssen, Knöterich und anderen Pflanzen vorkommt (Baur und Sinclair, 2006). Resveratrol wird vor allem in den Schalen von Weintrauben gebildet und kommt, durch die Fermentation dieser bei der Weinherstellung, besonders in Rotwein in einer Konzentration von 8-14 mg/l vor (Burns et al., 2002; Careri et al., 2004). Es wurde ursprünglich als ein so genanntes Phytoalexin charakterisiert (Langcake und Pryce, 1977), d.h. es ist eine Substanz, die in der Pflanze als Antwort auf exogenen Stress, wie z.B. virale Infektionen, Pilzbefall, UV-Strahlung oder Nahrungsmangel gebildet wird.

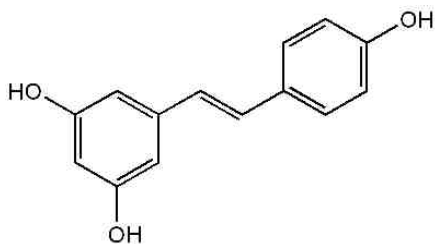
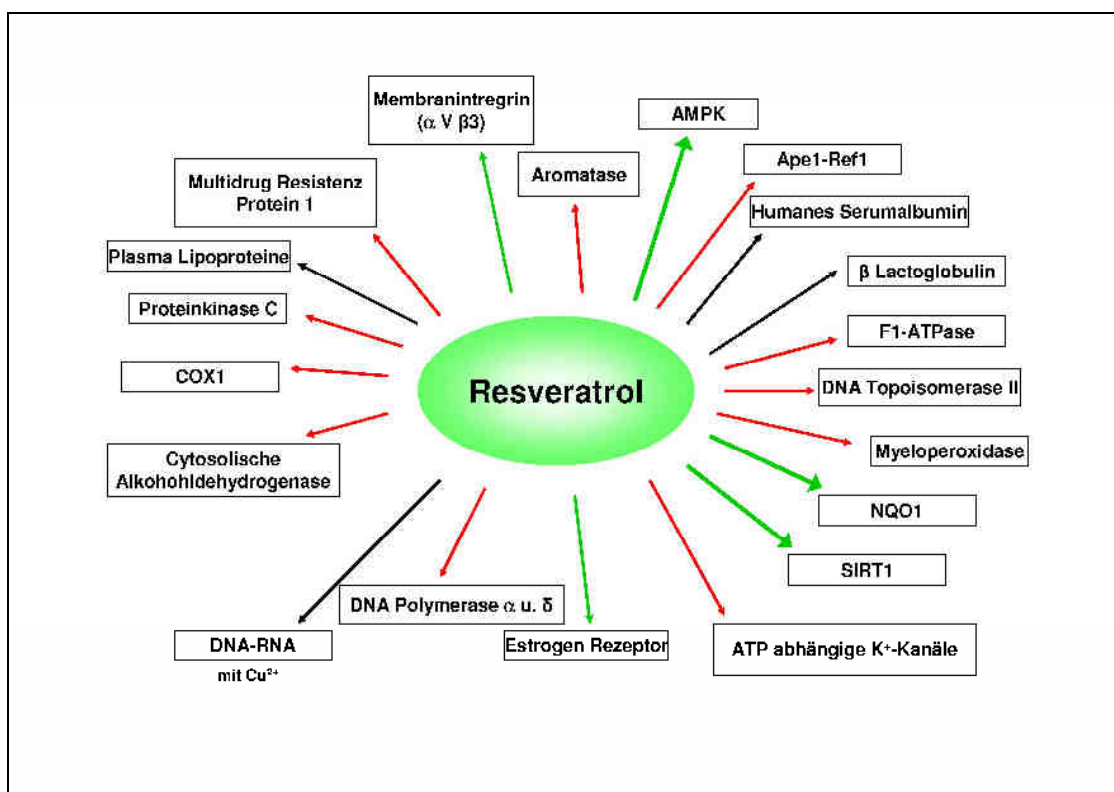


Abbildung 5: Chemische Struktur von Resveratrol

Von großem wissenschaftlichem Interesse ist die Substanz seit einem Bericht, dass Resveratrol für die kardioprotektiven Effekte von Rotwein mitverantwortlich sein könnte. Es wird in Verbindung mit dem „French Paradox“ gebracht, einer epidemiologischen Beobachtung, dass Franzosen trotz einer fettreichen Ernährung weniger kardiovaskuläre Ereignisse erleiden (Renaud und de Lorgeril, 1992). Speziell seit dem Bericht von *Jang et al.* Ende der 1990er Jahre, in dem das Potential der Kanzerogenesehemmung durch Resveratrol berichtet wird (Jang et al., 1997), ist der Pflanzeninhaltsstoff von sehr großem Interesse. Es gibt zahlreiche Befunde, dass Resveratrol bei einer Vielzahl von Erkrankungen präventiv wirken kann oder das Fortschreiten dieser verringern kann, darunter Krebs (Bishayee, 2009), kardiovaskuläre Ereignisse (Hao und He, 2004), Diabetes (Milne et al., 2007), Neurodegenerative Erkrankungen (Anekonda, 2006) und die Alterung (Markus und Morris, 2008).

Viele der für Resveratrol beschriebenen Effekte, sind aus Zellkultur- oder *in vitro*-Modellen abgeleitet. Aber auch *in vivo* gibt es zahlreiche positive Ergebnisse (Baur und Sinclair, 2006), wobei die direkten molekularen Targets, durch welche Resveratrol diese gesundheitsfördernden Effekte auslöst, noch nicht eindeutig identifiziert bzw. charakterisiert sind (Athar et al., 2009; Pirola und Frojdo, 2008). Es gibt eine Vielzahl von Proteinen, mit denen Resveratrol auf biochemischer Ebene direkt interagiert und diese meist inaktiviert (Harikumar und Aggarwal, 2008).



**Abbildung 6: Direkte biochemische Interaktionspartner von Resveratrol** (Gatz und Wiesmuller, 2008; Harikumar und Aggarwal, 2008; Pirola und Frojdo, 2008), rote Pfeile = Hemmung, grüne Pfeile = Aktivierung, schwarze Pfeile = Bindung.

Im Menschen gibt es neben zahlreichen Studien zur oralen Bioverfügbarkeit (siehe 2.6.4) von Resveratrol (Bishayee, 2009), auch schon klinischen Studien zur Therapie von Kolonkarzinom oder der Insulinresistenz beim Metabolischen Syndrom (NIH, 2009).

Im Folgenden soll auf einige Wirkungen von Resveratrol noch einmal genauer eingegangen werden.

## 2.6.2 Chemoprävention

Seit dem ersten Befund, dass Resveratrol die Krebsentstehung verhindern kann (Jang et al., 1997), ist das chemopräventive Potential dieser Substanz in vielen Studien untersucht worden. Neben den zahlreichen Befunden in Krebszelllinien (Saiko et al., 2008), gibt es auch *in vivo* einige Ergebnisse, dass Resveratrol die Kanzerogenese verhindern oder zumindest verzögern kann, ein Teil dieser sind in **Tabelle 4** aufgeführt.

**Tabelle 4: *In vivo* Effekte von Resveratrol bei Krebsentwicklung** Daten aus (Bishayee, 2009; Harikumar und Aggarwal, 2008; Saiko et al., 2008) Abkürzungen: DMBA = Dimethylbenz(a)anthracen, TPA = Tetradecanoyl-Phorbolacetat, MNU = Methylnitrosoharnstoff, DMH = Dimethylhydrazin, TRAMP = Transgenic adenocarcinoma mouse prostate, DENA = Diethylnitrosamin.

Resveratrol schützt vor...	Referenzen
Tumoren / Papillomen in der Haut nach Initiation (DMBA) und Promotion (TPA) in Mäusen	(Jang et al., 1997), (Jang und Pezzuto, 1998), (Kapadia et al., 2002), (Soleas et al., 2002)
UVB-induzierter Photokarzinogenese in Mäusen	(Afaq et al., 2003) (Reagan-Shaw et al., 2004) (Aziz et al., 2005)
DMBA-induziertem Mammakarzinom in Ratten	(Banerjee et al., 2002) (Whitsett et al., 2006)
MNU-induzierter Mammatumorgenese in Ratten	(Bhat et al., 2001)
Progression von Prostatakrebs im TRAMP Mausmodell	(Harper et al., 2007)
DMH-induzierter Kolonkarzinogenese in Ratten	(Sengottuvelan et al., 2006)
Kolon- u. Dünndarmtumoren in <i>Apc<sup>Mm/+</sup></i> -Mäusen	(Sale et al., 2005) (Schneider et al., 2001)
Tumorwachstum von Hepatomzellen in Ratten	(Carbo et al., 1999) (Miura et al., 2003)
DENA-intitierter Hepatokarzinogenese in Ratten	(Bishayee und Dhir, 2009)
Metastasierung von Lungenkarzinomzellen in Mäusen	(Lee et al., 2006) (Busquets et al., 2007)
Wachstum von implantierten Neuroblastomzellen in Mäusen	(Chen, Y. et al., 2004) (van Ginkel et al., 2007)

Es gibt unterschiedliche Mechanismen, die für diese aufgeführten Wirkungen von Resveratrol hauptsächlich verantwortlich gemacht werden.

Nach einer Behandlung mit Resveratrol kommt es in Tumorgewebe und Krebszelllinien zu einer Induktion der Apoptose. Diese proapoptotische Wirkung wird im extrinsischen Weg der Apoptose über eine Umverteilung der „Todesrezeptoren“ und verstärkter Bildung des „death-inducing signaling complex“ (DISC) vermittelt (Delmas et al., 2003; Delmas et al., 2004). Im intrinsischen (mitochondrialen) Weg der Apoptose bewirkt Resveratrol eine verstärkte Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials und als Folge eine Aktivierung von Caspase 3 und Caspase 9 (Dorrie et al., 2001; Sareen et al., 2006).

Zusätzlich wirkt Resveratrol durch einen Zellzyklusarrest antiproliferativ. Je nach Zellart kann der Zellzyklus am G1/S-Checkpoint (Ahmad et al., 2001), in der S-Phase (Estrov et al., 2003) oder am G2/M-Checkpoint (Liang et al., 2003) gestoppt werden. Es wurde gezeigt, dass Resveratrol zu einer Anreicherung von p53 (Hsieh et al., 1999; Huang et al., 1999; Narayanan et al., 2003), sowie zu einer Aktivierung von dessen Zielgenen (She et al., 2001), führen kann.

Resveratrol kann auch die Angiogenese während der Tumorentstehung verhindern (Kimura und Okuda, 2001; Tseng et al., 2004). Dies erfolgt möglicherweise durch die gezeigte Expressionshemmung der Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) (Banerjee et al., 2002; Woo et al., 2004) oder durch eine erniedrigte *hypoxia inducible factor 1* (HIF1)-abhängige vascular epidermal growth factor (VEGF)-Anreicherung (Zhang et al., 2005).

Neben diesen, innerhalb der Kanzerogenese hauptsächlich bei der Promotion und Progression angreifenden Mechanismen, wird aber auch direkt die Initiation verhindert. In verschiedenen Zellkulturmodellen konnte Resveratrol oxidative Schäden (u.a. an der DNA), welche durch Oxidantien induziert wurden, verhindern. Es ist bekannt, dass Resveratrol als Antioxidanz *in vitro* freie Radikale abfangen (Leonard et al., 2003) und zusätzlich in Zellen die Neusynthese von antioxidativen Enzymen (z.B. Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase, Hämoxigenase) induzieren kann. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Resveratrol *in vitro*, so ähnlich wie andere Polyphenole auch, leichte prooxidative Eigenschaften hat (de la Lastra und Villegas, 2007). Durch diese milde prooxidative Wirkung, könnte zum Beispiel der KEAP1-NRF2-Komplex (siehe 2.2.2) gespalten werden und die Induktion von antioxidativen Enzymen gestartet werden.

### 2.6.3 Therapeutisches Potential

Neben der Chemoprävention gibt es noch weitere Krankheiten, bei denen Resveratrol helfen könnte. Die wichtigsten Befunde werden hier noch einmal zusammengefasst.

#### **Kardiovaskuläre Ereignisse**

Die postulierte Assoziation von Rotwein und dadurch auch von dem Inhaltsstoff Resveratrol mit dem „French-Paradox“ (Renaud und de Lorgeril, 1992), lässt einen Schutz des Herz-Kreislauf-Systems vermuten. Orale Gabe von Resveratrol schützt *in vivo* vor der erhöhten Thrombozytenaggregation bei einer Hypercholesterinämie (Wang et al., 2002) und kann die Größe von Thromben nach einem Laser-induzierten Endothelschaden verringern (Zini et al., 1999). Der dahinter stehende Mechanismus könnte die stärkere und teilweise irreversible Inhibition der Cyclooxygenase 1 (COX1) gegenüber der Cyclooxygenase 2 (COX2) sein (Jang et al., 1997; Szewczuk et al., 2004). Zusätzlich kann Resveratrol isolierte Arterien relaxieren (Naderali et al., 2000) und in Schlaganfall prädisponierten, spontan hypertensiven Ratten kann es verschiedene Marker von oxidativem Stress senken (Mizutani et al., 2001).

#### **Inflammation und Autoimmunerkrankungen**

Resveratrol ist ein potenter Inhibitor der COX *in vivo*, dadurch werden weniger proinflammatorische Prostaglandine gebildet (Khanduja et al., 2004; Szewczuk et al., 2004). Intravenös gegebenes Resveratrol schützt vor der Entzündung, welche durch ischämische Reperfusion, durch Xanthin Oxidase gebildetes Superoxid und durch den Thrombozyten aktivierenden Faktor induziert wird (Shigematsu et al., 2003). Ebenfalls, wird NF- $\kappa$ B indirekt durch die Blockade des „Upstream“-Aktivators PKC $\delta$  gehemmt (Storz et al., 2004).

### **Alterung bzw. Lebensverlängerung**

Resveratrol Administration hat in *Saccharomyces cerevisiae* (Howitz et al., 2003), *Caenorhabditis elegans* (Wood, J. G. et al., 2004), *Drosophila melanogaster* (Bauer et al., 2004; Wood, J. G. et al., 2004) und *Nothobranchius furzeri* (Valenzano et al., 2006) zu einer Verlängerung der maximalen und mittleren Lebensdauer geführt. In Säugetieren verlängert Resveratrol das Leben und verbessert die motorischen Fähigkeiten von Mäusen, welche mit einer Hochkalorie-Diät gefüttert wurden (Baur et al., 2006). Bei Mäusen, die mit einer Standard-Diät ernährt werden, kommt es zwar nicht zu einer Lebensverlängerung durch Resveratrol, allerdings werden auch hier altersabhängige Parameter, wie motorische Koordination oder Knochendichte, verbessert (Pearson, K. J. et al., 2008). Viele dieser erhöhten Lebensdauern werden mit einer Aktivierung von Sirtuin 1 (SIRT1) in Verbindung gebracht (Howitz et al., 2003). Obwohl diese Stimulation sehr umstritten ist (Behar et al., 2009; Kaeberlein et al., 2005), sind viele der lebensverlängernde Effekte zumindest als SIRT1-abhängig identifiziert worden (Baur und Sinclair, 2006). Möglicherweise ist der verantwortliche Signalweg ähnlich wie bei der Kalorien-Restriktion, welche eine schon lange bekannte (McCay und Crowell, 1934) und die am besten untersuchte Möglichkeit ist, die Lebensdauer von Säugetieren um bis zu 50% zu verlängern (Ingram et al., 2006).

### **Diabetes**

Auch bei Diabetes mellitus oder allgemeiner den Symptomen des Metabolischen Syndroms hat Resveratrol einen Nutzen (Milne et al., 2007). So wurde *in vivo* gezeigt, dass man Mäuse durch Resveratrol-Gabe vor einer Insulinresistenz schützen kann (Lagouge et al., 2006) und auch die Insulinsensitivität in mit Hochkaloriediät gefütterten Mäusen deutlich verbessert wird (Baur et al., 2006).

#### 2.6.4 Pharmakokinetik

Pharmakokinetische Parameter für Resveratrol in der Maus sind bisher noch nicht verfügbar, aber für andere Spezies (inkl. Ratten) wurden bereits Studien durchgeführt.

Resveratrol hat eine Bioverfügbarkeit von ungefähr 38% in der Ratte, die Halbwertszeit nach einer i.v. Applikation ist 8-14 min. Oral wird Resveratrol im Darm fast vollständig und schnell resorbiert (Marier et al., 2002). Bei der ersten Leberpassage wird es allerdings sehr stark metabolisiert, wobei die am häufigsten vorkommenden Metabolite Resveratrol-Glucuronide sind (Marier et al., 2002). Diese unterliegen einem entero-hepatischen Kreislauf, haben eine Halbwertszeit von mindestens 9 h und ihnen wird ebenfalls eine gewisse Wirksamkeit zugesprochen (Baur und Sinclair, 2006; Saiko et al., 2008). Im Menschen wird Resveratrol gut resorbiert und ebenfalls schnell sulfatiert und glucuronidiert, was zu einer Halbwertszeit von ungefähr 30 min führt (Walle et al., 2004).

### 3 ZIELSETZUNG

Unter der Annahme, dass endogen gebildete oxidative DNA-Schäden eine erhebliche Bedeutung bei der Entstehung von Krebs und anderen degenerativen Erkrankungen zukommt, ist es wichtig, Substanzen zu finden, die die physiologischen basalen Spiegel dieser Schäden senken können. Die in Kapitel 2.6 beschriebenen Wirkungen und Wirkmechanismen von Resveratrol lassen erwarten, dass Resveratrol basale Spiegel von oxidativen DNA-Schäden (z.B. 8-oxoG) senken kann. Aufgrund der Mutagenität von 8-oxoG könnte dies zu einer Reduktion der spontanen Mutationsrate führen und damit einen Beitrag zum chemopräventiven Potential von Resveratrol leisten.

Ziel dieser Arbeit war es, diese erwarteten Wirkungen *in vivo* zu prüfen. Zusätzlich sollten *in vitro* und in Zellkulturmodellen mechanistische Untersuchungen durchgeführt werden. Die Substanz sollte verschiedenen Mausstämmen oral verabreicht und anschließend die basalen oxidativen DNA-Schäden in primären Hepatozyten analysiert werden. Die Behandlung der Mäuse sollte entweder für 7 Tage mit 100 mg/kg Körpergewicht per Gavage oder für mehrere Monate mit 0,04% *ad libitum* erfolgen. Die DNA-Schäden sollten in reparaturdefizienten *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen quantifiziert werden, da diese durch ihre erhöhten Spiegel, ein hervorragendes Werkzeug sind, um mögliche protektive Effekte nachzuweisen, ohne die Mäuse einem Stressor bzw. Oxidanz auszusetzen. Ein weiterer Endpunkt, welcher untersucht werden sollte, war die spontane Mutationsrate nach einer mehrmonatigen Resveratrol-Behandlung. Dies soll möglich gemacht werden durch das Einkreuzen des transgenen, bakteriellen *lacI*-Gens von BigBlue<sup>®</sup>-Mäusen als Mutationsmarker in den reparaturdefizienten *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Stamm.

Es sollte weiterhin untersucht werden, durch welche Mechanismen Resveratrol eine mögliche Protektion vor oxidativen DNA-Schäden und Mutagenese vermitteln könnte. Ausgehend von den erzielten Erkenntnissen sollten folgende Wirkmechanismen geprüft werden:

(I) eine Induktion der Reparatur, (II) direkte Radikalfängereigenschaften, (III) eine mögliche Kompaktierung des globalen Chromatinstatus (z.B. durch Stimulation von Histondeacetylasen), (IV) eine Stimulation der Leberzellproliferation oder (V) eine Verbesserung des antioxidativen Schutzes der Zellen.

Als letzte Fragestellung, sollte untersucht werden, ob der Ausfall einzelner antioxidativer Enzyme (SOD, HO1) zu erhöhten oxidativen DNA-Basenmodifikationen in Mäusen führt.



## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte und Software

Brutschrank (Bakterien)	Kelvitron E, B6200 (Heraeus Instruments, Hanau)
Brutschränke (Zellkultur)	CO <sub>2</sub> -Inkubator BB16, BB6060 O <sub>2</sub> und Hera-Cell (Heraeus Instruments, Hanau)
Coulter-Counter	Z2™ (Beckman Coulter, Fullerton, USA)
Destillations-Apparatur	Destamat® (Heraeus, Hanau)
Durchflusszytometer	FACScalibur FACS System mit CellQuest™ Pro Software (Becton Dickinson, Heidelberg)
Fluoreszenz-Mikroskop	(Zeiss, Oberkochen) Filter 46 63 01-9901 (Leica Mikrosysteme, Bensheim)
Fluorimeter	TKO 100, DNA Fluorimeter (Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA) SFM 25 Fluorimeter (Kontron Instruments, Zürich, Schweiz)
Fraktionssammler	Ultrorac 2070 II (Pharmacia / LKB, Uppsala, Schweden) und MM 10, Neolab 4 mit Zeitnehmer SM 999 (Neolab, Heidelberg)
Gefrierschrank (-20 °C)	KG 3666-23 (Liebherr)
Gefrierschrank (-70 °C)	Colora UF 85-300S (Colora, Lorch)
Gelapparatur	PerfectBlue™ Gelsystem Mini M (Peqlab, Erlangen)
Gel-Dokumentationssystem	BioRad Gel Doc 1000 + Molecular Analyst® (v 2.1, 1995, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA)
Gewebehomogenisator	Wheaton Dounce Tissue Grinder (VWR) Pellet Pestle (SIGMA, Steinheim)
Halogenlampe (1000 W)	Osram SLG 1000-Studio (Osram, München) mit Flecta Halogen Mini-Brenner (Reflekta)
Heizblock	Thermoblock-Thermostat (Gebr. Liebisch, Bielefeld)

---

Kühlzentrifuge	Sorvall Superspeed RC2-B (Sorvall, Conn., USA)
Lichtmikroskop	Telaval 31 (Zeiss, Oberkochen)
Magnetrührer	Ikamag RET-G (Ika-Werk, Janke &Kunkel, Staufen i. Br.)
Microplate-Reader	Spectrafluor Plus (Tecan, Crailsheim) inkl. Software Magellan
Mikrowelle	Micromat 175 Z (AEG) und Dimension 4 (Panasonic Service, Wiesbaden)
Multipette	Pipette DISCOVERY Comfort DV12 (Abimed, Langenfeld)
PCR-Cycler	TGradient Thermocycler Biometra®; (Biometra, Göttingen)
Peristaltikpumpe	ISM 759 (20 Kanäle), (Ismatec Laboratoriumstechnik, Schweiz)
pH-Meter	PHM 62 (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark)
Pipetten	Pipetman P 20, P 100, P 200, P 1000, P 5000 P 10000 (Gilson, Frankreich)
Pipettierhilfe	Pipetus-akku (Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt)
Primer Designer 4	V4.1 Scientific & Educational Software (Cary, North Carolina, USA)
Rotoren für Kühlzentrifuge	SS-34, GS-3 (Sorvall, New.t.on, Conn., USA)
Realtime-PCR-Cycler	Lightcycler® 1.5 Real Time PCR System mit Software Version 3.5.3 (Roche Diagnostics; Mannheim)
Schüttelinkubator (Bakterien)	TH25/SM25 Digi (Edmund Bühler, Bodelshausen)
Spannungsquelle	Power PAC- 3000 (BioRad, Hercules, USA)
Spektralphotometer	WPA Biowave, S 2100 (Whatman Biometra, Göttingen)
Staden Package Trev 1.9 Software	Open Source Software (BSD-Lizenz); <a href="http://www.sourceforge.net">www.sourceforge.net</a>
Sterile Werkbank	Lamin Air® HB 2472 und HB 2448 (Heraeus Instruments, Hanau)
Thermostat für Haake W19	Haake D8 (Haake, Karlsruhe)

Tischschüttler	GFL 3015 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
Trockenschrank	(Heraeus Instruments, Hanau)
Ultraschall-Homogenisator	SONOPULS; HD 70 mit Sonotrode MS 73 und (Sonifier) HF-Generator GM 70 (70 W, 20 kHz) (Bachofer, Reutlingen)
Ultrazentrifuge (UZ)	Optima LE-80K (Beckman Instruments, Palo Alto, Kalifornien, USA)
Vortexer	Vortex Genie 2, Model G-560E (Scientific Industries, Bohemia, N.Y., USA)
Waagen	PB 3002, Delta Range, max. 3100g (Mettler Toledo, Schweiz) AG 245, max. 210g (Mettler Toledo, Schweiz)
Wasserbad (heizbar bis 100 °C)	Köttermann Type 3042 (Köttermann, Uetze-Hänigsen, Deutschland)
Wasserbad	Haake K, Haake LH mit Kältethermostat Haake F3 (Haake, Karlsruhe)
Zählkammer	Neubauer Kammer (Marienfeld, Deutschland)
Zentrifugen	Hettich Micro Rapid/K und Hettich Universal/K2S (Hettich, Tuttlingen), Biofuge 28RS und Sigma 3K-2 (Heraeus Instruments, Osterode am Harz) Eppendorf 5415D (Eppendorf, Hamburg)

#### 4.1.2 Hilfsmaterialien

96-Well-Platten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Dialyseschläuche	Spectra Por (Spectrum Medical Ind., Los Angeles, CA, USA)
DirectPCR® Lysis Reagent (Tail)	Peqlab, Erlangen
Einmalpipetten, steril	Hartenstein, Würzburg
Filter (Alkal. Elution)	Isopore Membranfilter, 2 µm, Ø: 25 mm, (Millipore, Schwalbach)
Filterhalter (Alkal. Elution)	Swinnex SX 2500 (Millipore, Schwalbach)
FITC Mouse Anti-Human Ki-67 Set	Becton Dickinson, Heidelberg
GFX™ PCR DNA and Gel Purification Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Glaspipetten (Zellkultur)	Hartenstein, Würzburg

Impfeschlingen	Hartenstein, Würzburg
Infusionsset mit Flügelkanüle (0,8 × 20 mm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Kulturröhrchen PP, steril	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Lightcycler® FastStart DNA Master <sup>PLUS</sup> mix SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim
Objektträger	Hartenstein, Würzburg
Ohrmarkierungen und Ohrmarkenzange für Kleinnager	Hartenstein, Würzburg
Pasteurpipetten	Hartenstein, Würzburg
Plastikkleinwaren	Eppendorf, Hamburg
Plastikspitzen (Einweg)	Hartenstein, Würzburg
Prüfdiät (Mäuse) + 0,04% Resveratrol	Altromin, Lage
Prüfdiät (Mäuse) + 0,025% WY-14,643	Altromin, Lage
RecoverEase™ DNA Isolation Kit	Stratagene, Heidelberg
Safelock® Caps (1,5 / 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Screeningplatten	Nunc, Wiesbaden
Spritzen (Alkal. Elution)	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter (0,22 µM; Spritzenaufsatz)	Schleicher & Schüll, Dassel
Sterilfilter (0,22 µM; Bottle-Top)	Nunc, Wiesbaden
Transpack® Packaging Extract	Stratagene, Heidelberg
Trifill Pipettenreservoir	Roth, Karlsruhe
Trizol® Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellproliferations-Assay WST-1®	Roche Diagnostics, Mannheim
Zellsieb (Cellstrainer Ø 100µm)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen, Plastik	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zuchtdiät (Mäuse), Standard	Altromin, Lage

### 4.1.3 Chemikalien

Agarose (Typ I, low EEO)	Invitrogen, Karlsruhe
Aktivkohle	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma Aldrich, Steinheim
Bacto-Agar	Difco Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Frankreich
Bacto-Trypton (Pepton)	Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe
Biorad-Farbstoffkonzentrat	BioRad, Hercules, CA, USA
Bisbenzimid (Hoechst Nr. 33258)	Sigma Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Carbogen (95% O <sub>2</sub> , 5% CO <sub>2</sub> )	Linde, Höllriegelskreuth
Casein-Pepton	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DAPI	Sigma Aldrich, Steinheim
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma Aldrich, Steinheim
Dextran-Natriumsalz	Pharmacia Upjohn, Dänemark
D-Glucose x 1 H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
di-Kaliumhydrogenphosphat x 3 H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat x 2 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Dithioerythritol	Sigma Aldrich, Steinheim
DL-Buthioninsulfoximin	Sigma Aldrich, Steinheim
DMEM Medium high Glucose	PAA, Cölbe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich, Steinheim
DNA-Marker Nr. II + VI	Roche Biosciences, Mannheim
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
EGTA (Ethylenglycol-bis(β-amino- ethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
Eichlösungen Puffer (pH 5, 7, 8, 10, 11)	Merck, Darmstadt
Eindeckmittel EDL-2	Linaris, Bettingen am Main
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, technisch	Merck, Darmstadt

---

Ethanol, absolut	Roth, Karlsruhe
Ethanol, 4,5-5%	Diverse Brauereien, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd 36%	Sigma-Aldrich, Steinheim
Formamid 90%	Sigma Aldrich, Steinheim
Glutathion (Glu-Cys-Gly)	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycerol	Sigma Aldrich, Steinheim
Harnstoff	Sigma Aldrich, Steinheim
Hefeextrakt	Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Heparin, 5000 I.E	Ratiopharm, Ulm
HEPES ([N-2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'- [2-ethansulfonsäure])	Sigma Aldrich, Steinheim
Insulin (I-5500)	Sigma Aldrich, Steinheim
Isofluran (Forene <sup>®</sup> )	Baxter, München
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma Aldrich, Steinheim
Isoton II-Lösung	Beckman Coulter, Krefeld
Kälberserum, fötales	PAA, Cölbe
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Kohlendioxid (CO <sub>2</sub> )	Linde, Höllriegelskreuth
L-Alanin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Arginin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Asparagin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Asparaginsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Citrullin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Cystein	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Glutaminsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Histidin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Isoleucin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Leucin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Lysin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Methionin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Ornithin	Sigma Aldrich, Steinheim

L-Phenylalanin	Roth, Karlsruhe
L-Prolin	Roth, Karlsruhe
L-Serin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Threonin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Tryptophan	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Tyrosin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Valin	Sigma Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat x 7 H <sub>2</sub> O	Roth, Karlsruhe
MOPS	Sigma Aldrich, Steinheim
(2-(N-Morpholino)propansulfonsäure)	
Maltose	Sigma Aldrich, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin	BioRad, Hercules, USA
NADPH, Tetranatriumsalz	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat x 1 H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nutrient broth	Becton Dickinson, Heidelberg
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAA, Cölbe
Phenol	Sigma Aldrich, Steinheim
Resveratrol (>98% HPLC grade)	Sigma Aldrich, Steinheim Evonik Degussa, Essen
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ro19-8022	Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz
Salzsäure 25%, 37%	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure 96%	Merck, Darmstadt
Stickstoff, flüssig	Linde, Höllriegelskreuth
Tetraethylammoniumhydroxid (TEAH)	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypanblau-Lösung 0,4%	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin /EDTA-Lösung	PAA, Cölbe
Wasserstoffperoxid-Lösung (8,8 M)	Sigma Aldrich, Steinheim

#### 4.1.4 Enzyme

Collagenase Typ IA (C 5138)	Sigma Aldrich, Steinheim
DNase I (D 5025)	Sigma Aldrich, Steinheim
Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (rein)	aus <i>E. coli</i> ; zur Verfügung gestellt von S. Boiteux.
Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Rohextrakt)	aus <i>E. coli</i> ; hergestellt von M. Osterod nach (Boiteux et al., 1990).
Glutathionreduktase	Stratagene, Heidelberg
Humanes OGG1-Protein (rein)	zur Verfügung gestellt von S.Boiteux
Pfu-Turbo DNA Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Proteinase K (lyophilisiert)	Roth, Karlsruhe
Ribonuclease A (RNase A)	Sigma Aldrich, Steinheim
Taq DNA Polymerase peqGOLD	Peqlab, Erlangen

#### 4.1.5 DNA

PM2-Plasmid-DNA	Größe: 10000 bp; DNA des Bakteriophagen PM2; Präparation nach Salditt (Salditt et al., 1972) von Ina Schulz, Mainz
Kalbsthymus-DNA	Sigma Aldrich, Steinheim
GenRuler™ 1kb Plus DNA Standard	Fermentas; St. Leon-Rot
Quick-Load™ 1 kb DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt a.Main
Quick-Load™ 100 bp DNA Ladder	New England Biolabs, Frankfurt a.Main



#### 4.1.6 Primer

Die eingesetzten Oligonukleotide wurden von Operon Biotechnologies (Köln) bzw. nach deren Fusion von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen. Wenn nicht anders angegeben, sind alle Primer für die Verwendung von murinem Material (*Mus musculus*).

##### Primer für Genotypisierungen

Vor erstmaliger Verwendung wurde von den PCR-Primern eine 25 µM Stammlösung in TE-Puffer (pH 8,0) erstellt, die Lösung aliquotiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

Primer	Sequenz 5' → 3'
Ogg1 for	ATGAGGACCAAGCTAGGTGAC
Ogg1 rev WT	GCCTCACAATCAACTTATCCC
Ogg1 rev KO	ATCTGCGTGTTCGAATTCGCCAAT
Csb for WT	GCTGCTTATAATAATGCTCATCTCC
Csb for KO	ATCTGCGTGTTCGAATTCGCCAATG
Csb rev	GTCTTCTGATGACGTTAGCTATGAG
β-actin for	CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG
β-actin rev	TGACGGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA
lacI for	Aus Lizenzgründen darf die Sequenz nicht veröffentlicht werden
lacI rev	Aus Lizenzgründen darf die Sequenz nicht veröffentlicht werden

## Primer für qRT-PCR

Alle Primer werden unter sterilen Bedingungen mit TE-Puffer (pH 8,0) auf eine Konzentration von 200 µM gebracht. Diese Stammlösungen wurden mit sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auf eine Endkonzentration von 2 µM verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Primer	Sequenz 5' → 3'
18S for	TAAGTCCCTGCCCTTTGTACACA
18S rev	GATCCGAGGGCCTCACTAAAC
36B4 for	GCCACCTGGAGAACAACCC
36B4 rev	GCCAACAGCATATCCCGAATC
ACTb for	GACAGGATGCAGAAGGAGAT
ACTb rev	CTGCTTGCTGATCCACATCT
CAT for	ATTGCGTTCTTAGGCTTCTC
CAT rev	ACGCTTCAACAGTGCTAATG
GAPDH for	TGCACCACCAACTGCTTAGC
GAPDH rev	ATGGCATGGACTGTGGTCAT
GPX1 for	CCTTGCCAACACCCAGTGA
GPX1 rev	CCGGAGACCAAATGATGTACTION
HO1 for	GGTGATGCTGACAGAGGAACAC
HO1 rev	TAGCAGGCCTCTGACGAAGTG
NRF2 for	CTACAGTCCCAGCAGGACAT
NRF2 rev	GGGAGGAATTCTCCTGTTTC
SIRT1 for	TTGTGAAGCTGTTTCGTGGAG
SIRT1 rev	GGCGTGGAGGTTTTTCAGTA
SOD1 for	CCAGTGCAGGACCTCATTTTAAT
SOD1 rev	TCTCCAACATGCCTCTCTTCATC
SOD2 for	GCTCTGGCCAAGGGAGATG
SOD2 rev	TGTCCCCCACCATTGAACTT
SOD3 for	TTCTTGTTCTACGGCTTGCTACTG
SOD3 rev	AGCTGGACTCCCCTGGATTT

## Primer zur Sequenzierung der BigBlue-Mutationen

Die Primer zur Sequenzierung wurden mit TE-Puffer (pH 8,0) auf die Konzentration 3,5 µM gebracht und bei 4 °C gelagert.

Primer	Sequenz 5' → 3'
lacI 1	GCGTCGATTTTTGTGATG
lacI 2	CGGCGATGGCGGAGCTG
lacI 3	TCTGGTCGCATTGGGTC
lacI 4	CTCTCTCAGGGCCAGGC
lacI 11	CGCTATTACGCCAGCTG
lacI 12	CGTAATACATGGTCATAGC
lacI 13	AGCCCGGACTCGGTAAT
lacI 14	CCAGCGGATAGTTAATGA

### 4.1.7 Bakterien

#### *Escherichia coli* SCS-8

*E. Coli* Stamm hergestellt von der Firma Stratagene. Dieser Stamm ist genetisch so verändert, dass er nur den  $\beta$ -Teil der  $\beta$ -Galaktosidase exprimiert, dadurch kann er für den BigBlue<sup>®</sup>-Mutations-Assay eingesetzt werden.

### 4.1.8 Zelllinien

#### F11.1

Spontan immortalisierte Mausembryo-Fibroblasten aus C57Bl/6-Wildtyp-Mäusen. Die Zellen wurden von D. Barnes (Imperial Cancer Research Fund, Clare Hall Laboratories, South Mimms, UK) erhalten. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 22 Stunden.

#### 4.1.9 Mäuse

Sämtliche Tiere wurden in den Zentralen Versuchstiereinrichtungen (ZVTE) der Universität Mainz unter einem 12 h dauernden Hell- / Dunkelrhythmus gehalten. Die Bedingungen dafür waren: Temperatur  $22,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$  und eine relative Luftfeuchtigkeit von 50-70%. Die routinemäßige Pflege der Tiere erfolgte, wenn nicht anders angegeben, durch die Tierpfleger der ZVTE der Universität Mainz. Die Zucht, Haltung und alle durchgeführten Tierversuche erfolgten nach den Bestimmungen des Deutschen Tierschutzgesetzes.

##### BigBlue<sup>®</sup>-Mäuse

Homozygot transgene männliche BigBlue<sup>®</sup>-Mäuse wurden im Alter von 6 Wochen von der Firma Stratagene (Germantown, USA) bereitgestellt. Diese Mäuse haben den Stammbhintergrund C57BL/6 und tragen auf Chromosom 4 ein Transgen für das bakterielle *lacI*-Gen. (vgl. 4.2.6.1)

##### C57BL/6 (Wildtyp)

Die Tiere wurden von Charles-River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und in der Produktionszucht der ZVTE der Universität Mainz unter SPF-Bedingungen gehalten und vermehrt.

##### *Ogg1*<sup>-/-</sup> *Csb*<sup>-/-</sup> - Mäuse

Die Tiere wurden durch Kreuzung von *Ogg1*<sup>-/-</sup>-*knockout*- (Klungland et al., 1999) mit *Csb*<sup>-/-</sup>-*knockout*-Mäusen von A. Klungland (Department of Molecular Biology, Rikshospitalet, Oslo, Norwegen) generiert. Die *Csb*-knockout Mäuse sind generiert von G. van der Horst und tragen eine Mutation, welche das Protein schwer trunkiert (van der Horst et al., 1997), zur vereinfachten Darstellung sind sie trotzdem als *Csb*<sup>-/-</sup> gekennzeichnet. Die Haltung der Tiere erfolgt in der Produktionszucht der ZVTE unter speziellen pathogenfreien Bedingungen.

### Unterschiedliche *Ogg1*<sup>-/-</sup> *Csb*<sup>-/-</sup> / *Blue*<sup>+</sup> -Mäuse

Für die BigBlue-Mutationsanalyse wurden durch Kreuzung von BigBlue<sup>®</sup>-Mäusen mit *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>-Mäusen in drei Schritten diverse homozygote Mauslinien generiert (vgl. Kapitel 4.2.2.2).

### *ApoE1*<sup>-/-</sup> Mäuse

Die Mäuse wurden von H. Li (Insitut für Pharmakologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) zur Verfügung gestellt.

### *Sod2*<sup>+/-</sup> - Mäuse

Die Tiere wurden in Ulm bei L.K. Rudolph gehalten. *Sod2*<sup>+/-</sup>-Mäuse wurden von Jackson Laboratory (Stamm-Nr.002973) bezogen und mit *mTerc*<sup>-/-</sup> Mäusen gekreuzt, dadurch entstanden die Genotypen *mTerc*<sup>+</sup>*Sod2*<sup>+/-</sup> und *mTerc*<sup>+</sup>*Sod2*<sup>-/-</sup> (*Guachalla et al., 2009*).

### *HO1*<sup>-/-</sup> und *HO1*<sup>+/-</sup> Mäuse

Die Mäuse wurden von A. Daiber (Institut für Pharmakologie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz) zur Verfügung gestellt.

## 4.1.10 Verwendete Puffer, Lösungen und Medien

### 4.1.10.1 Zellkultur

PBSCMF (pH 7,5) (autoklaviert)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Kulturmedium für F11.1-MEF-Zellen	DMEM (4,5 g/l Glucose) 15% FCS 1% Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg/ml)

### 4.1.10.2 Isolierung primärer Hepatozyten (Leberperfusion)

Für die Isolation von primären murinen Hepatozyten werden folgende Lösungen vorbereitet. Wenn nicht anders angegeben, werden diese autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

Glucose-Lösung:	D(+)-Glucose Monohydrat	50 mM
HEPES-Puffer:	HEPES (freie Säure)	250 mM
	pH: 8,5 / 7,6 (mit 2 N NaOH eingestellt)	
Krebs-Henseleit-Puffer:	NaCl	1000 mM
	KCl	24 mM
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	12 mM
	pH: 7,6 (mit 10N NaOH eingestellt)	

Aminosäure-Lösung:	L-Alanin	3,0 mM
	L-Asparaginsäure	1,0 mM
	L-Asparagin	3,0 mM
	L-Citrullin	1,5 mM
	L-Cystein	0,8 mM
	L-Histidin	6,4 mM
	L-Glutaminsäure	6,8 mM
	Glycin	13,3 mM
	L-Isoleucin	3,0 mM
	L-Leucin	6,1 mM
	L-Lysin	7,1 mM
	L-Methionin	3,7 mM
	L-Ornithin	3,8 mM
	L-Phenylalanin	3,3 mM
	L-Prolin	4,8 mM
	L-Serin	6,2 mM
	L-Threonin	11,3 mM
	L-Tryptophan	3,2 mM
L-Tyrosin	3,0 mM	
L-Valin	6,8 mM	

Die Aminosäuren werden in 90% des Volumens  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  aufgenommen. Nach längerem Rühren wird mit 10 M NaOH der pH-Wert auf 11 eingestellt und für mindestens 10 min gerührt. Durch Zugabe von  $\text{HCl}_{\text{konz}}$  wird der pH-Wert auf 7,6 eingestellt und die Lösung mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  auf das Endvolumen aufgefüllt. Die Lösung wird sterilfiltriert und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Die Haltbarkeit beträgt 2-3 Monate.

Glutamin-Lösung (pH 7,6):	L-Glutamin	48 mM
---------------------------	------------	-------

Die Lösung wird durch Verdünnung einer 200 mM Glutamin-Lösung (PAA, Cölbe) mit sterilem  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  hergestellt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Insulin-Lösung:	Insulin (I-5500)	2 g/l
-----------------	------------------	-------

Insulin wird in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  durch Zugabe von einigen Tropfen 1 M NaOH in Lösung gebracht. Diese wird mit 1 M HCl auf pH 7,4–7,6 eingestellt, (zu beachten ist, dass Insulin nicht wieder ausfällt), sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

EGTA-Lösung: EGTA 125 mM

EGTA wird in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  aufgenommen und durch Zugabe von 1-2 Tropfen 1 M NaOH gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird auf 7,6 eingestellt, die Lösung sterilfiltriert, aliquotiert und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

$\text{CaCl}_2$ -Lösung:  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  129 mM

$\text{MgSO}_4$ -Lösung:  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  100 mM

Aus den oben genannten Stammlösungen werden nun vor den Versuchen die benötigten Puffer unter sterilen Bedingungen frisch hergestellt (1 - 3 Tage vor dem Versuch):

Angegeben ist die benötigte Menge für die Durchführung der Leberperfusion einer Maus.

EGTA-Puffer:  
63 ml Glucose-Lösung  
10 ml Krebs-Henseleit-Puffer  
10 ml HEPES-Puffer (pH 8,5)  
15 ml Aminosäure-Lösung  
1 ml Glutamin-Lösung  
0,5 ml Insulin-Lösung  
0,4 ml EGTA-Lösung

Kollagenase-Puffer:  
30 ml Glucose-Lösung  
4,8 ml Krebs-Henseleit-Puffer  
4,8 ml HEPES-Puffer (pH 8,5)  
7,2 ml Aminosäure-Lösung  
1,9 ml  $\text{CaCl}_2$ -Lösung  
0,5 ml Glutamin-Lösung  
0,3 ml Insulin-Lösung  
14,5 mg Kollagenase

Die  $\text{CaCl}_2$ -Lösung wird erst unmittelbar vor Benutzung des Kollagenase-Puffers bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  zugesetzt. Die Kollagenase wird bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert, kurz vor der Anwendung abgewogen und die entsprechende Menge unter leichtem Schütteln im Kollagenasepuffer gelöst.



---

Suspensions-Puffer:	75 ml Glucose-Lösung
	12 ml Krebs-Henseleit-Puffer
	12 ml HEPES-Puffer (pH 7,6)
	18 ml Aminosäure-Lösung
	1,2 ml Glutamin-Lösung
	0,6 ml Insulin-Lösung
	1 ml CaCl <sub>2</sub> -Lösung
	0,5 ml MgSO <sub>4</sub> -Lösung
	0,24 g BSA

Das BSA wird abgewogen und kurz vor Verwendung des Puffers bei 4 °C gelöst.

#### 4.1.10.3 Zellproliferation Ki-67

PBS	pH 7,5	137 mM NaCl
(autoklaviert)		2,7 mM KCl
		6,5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		0,9 mM CaCl <sub>2</sub>
		0,9 mM MgCl <sub>2</sub>

Waschpuffer    PBS mit 1% FCS

#### 4.1.10.4 Alkalische Elution

PBSCMF	pH 7,5	137 mM NaCl
(autoklaviert)		2,7 mM KCl
		6,5 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

BE <sub>1</sub> -Puffer	pH 7,5	100 mM NaCl
(autoklaviert)		20 mM Tris/HCl
		1 mM Na <sub>2</sub> EDTA

BE <sub>1</sub> /BSA-Puffer (autoklaviert)	pH 7,5	100 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 1 mM Na <sub>2</sub> EDTA 0,50 g/l BSA
Lysepuffer (mit Proteinase K)	pH 10,0	100 mM Glycin 20 mM Na <sub>2</sub> EDTA 2 % SDS pH-Wert mit 2 N NaOH eingestellt (400 mg/l Proteinase K)
Waschpuffer (autoklaviert)	pH 10,0	20 mM Na <sub>2</sub> EDTA pH-Wert mit 2 N NaOH eingestellt
Elutionspuffer	pH 12,15	20 mM EDTA pH-Wert mit TEAH eingestellt
DNA-Standard		200 µg/ml Kalbsthymus-DNA in BE <sub>1</sub> -Puffer
Aliquotiert und bei -20 °C gelagert.		
Bisbenzimid-Stammlösung (Hoechst No. 33258)		0,15 mM in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Aliquotiert und bei -20 °C gelagert.		
Phosphatpuffer pH 6,0 (autoklaviert)		68,1 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 15,8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
Phosphatpuffer pH 7,2 (autoklaviert)		21,7 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 93,0 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
mit Bisbenzimid (1 % (v/v) Bisbenzimid-Stammlösung)		

Die Bisbenzimid-Lösung wird dem autoklavierten Phosphatpuffer pH 7,2 erst unmittelbar vor Gebrauch zugesetzt und lichtgeschützt gelagert.

#### 4.1.10.5 Glutathion-Gehalt

TCA-Puffer (sterilfiltriert)	5 ml 20%ige Trichloressigsäure 40 µl EDTA (0,5 M, pH 8,0) 2 ml HCl (1 N) Ad 60 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Phosphat/EDTA-Puffer (pH 7,5) (autoklaviert)	7,98 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,86 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,18 g Na <sub>2</sub> EDTA Ad 500 ml mit H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Phosphat/NADPH-Lösung	0,3 mM Na <sub>4</sub> NADPH
DTNB-Reagenz (lichtgeschützt gelagert)	6 mM DNTB in Phosphat/EDTA-Puffer
Glutathion-Standardlösung (frisch hergestellt)	20 mM Glutathion (reduziert) in Phosphat/EDTA-Puffer
BSA-Lösung (frisch hergestellt)	1 µg/ml BSA in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>

#### 4.1.10.6 Big Blue<sup>®</sup> Mutations-Assay

LB-Tetrazyklin Agar (pro Liter)	10 g NaCl 10 g Bacto-tryptone 5 g Hefe-Extrakt 20 g Agar
---------------------------------	---

In 800 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> lösen, den pH auf 7,0 mit 1N NaOH einstellen und auf 1000 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auffüllen. Den 55 °C warmen Agar mit 12,5 mg / l Tetrazyklin versetzen, gut mischen und die Agarplatten gießen. Lagerung bei 4 °C im Dunkeln.

NZY-Agar-Platten (pro Liter) (autoklaviert)	5,0 g NaCl 2,0 g MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O 5,0 g Hefe-Extrakt 10,0 g Casein Pepton 20,0 g Agar
--	---

In 800 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> lösen, den pH auf 7,0 mit 1N NaOH einstellen und auf 1000 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auffüllen. Lagerung für 2 Wochen bei 4 °C.

NZY Broth Medium	5,0 g NaCl
(autoklaviert)	2,0 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
	5,0 g Hefeextrakt
	10,0 g Casein-Pepton

Die Substanzen werden in 800 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gelöst, der pH-Wert mit 10 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt, das Volumen mit H<sub>2</sub>O auf 1 Liter ergänzt.

Lysepuffer I	8,20 g NaCl
	0,22 g KCl
	120 g Sucrose
	0,30 g EDTA
	10 ml Triton® X-100
	1,58 g Tris-HCl (pH 8,3)

In 800 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> lösen, den pH mit 1N-NaOH auf 8,3 einstellen und mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auf 1000 ml auffüllen.

Lysepuffer II	1,75 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
(autoklaviert)	8,0 g NaCl
	0,2 g KCl
	0,2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)

Die Substanzen werden in 800 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gelöst, der pH-Wert mit 1 N NaOH auf pH 8,0 eingestellt und das Volumen auf 1000 ml ergänzt.

Kurz vor der Anwendung wird der Lösung pro Milliliter 20 µl eines RNase-IT™ Ribonuklease-Cocktails zugesetzt.

Maltose 20% (w/v) / MgSO <sub>4</sub> (1 M)	20,0 g Maltose
Lösung	24,6 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> ad 100 ml

Die Lösung wird sterilfiltriert und kann bei 4 °C bis zu 6 Monaten gelagert werden.

MgSO <sub>4</sub> Lösung (10 mM)	2,46 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O
(autoklaviert)	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> ad 1000 ml

Die Lösung wird bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Proteinase K-Lösung (2mg/ml)	100 mg Proteinase K 30 ml steriles H <sub>2</sub> O 10 ml SDS-Lösung 10% (w/v) 10 ml 0,5 M EDTA (pH 7,5)
TE-Puffer (autoklaviert)	10 mM Tris-HCL (pH 7,5) 1 mM EDTA H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> ad 1000 ml
SM-Puffer (autoklaviert)	5,8 g NaCl 2,0 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 50,0 ml Tris-HCl (1 M) pH 7,5 5,0 ml Gelatinelösung 2% (w/v) H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> ad 1000 ml

Die Lösung kann bis zu einem Jahr bei Raumtemperatur gelagert werden.

#### 4.1.10.7 PM2 DNA-Relaxationsassay

Fällungslösung	pH 7,2	95 ml EtOH 5 ml 2,5 M Na-Acetat
BE <sub>1</sub> -Puffer	pH 7,5	20 mM Tris 100 mM NaCl 1 mM EDTA
TAE-Puffer (1x)		40 mM Tris 50 mM Natriumacetat 10 mM EDTA
Stoppuffer		1 ml TAE (10fach) 7ml Glycerin 5 mg Bromphenolblau 2 ml 50 mM EDTA (pH 7,0) + 0,5% SDS
Resveratrol-Stammlösung		30 bzw. 60 mM in DMSO

#### 4.1.10.8 Genexpressionsbestimmung durch qRT-PCR

DEPC-Wasser DEPC 0,01% (v/v) in steriles H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

Gut mischen, übernacht bei Raumtemperatur inkubieren und anschließend autoklavieren.

Ethanol 75% (v/v) 75 ml Ethanol<sub>abs</sub>  
Ad 100 ml mit DEPC-Wasser

MOPS (10x) MOPS 41,80 g  
Natriumacetat 4,10 g  
EDTA 3,72 g  
Ad 1000 ml mit DEPC-H<sub>2</sub>O

pH mit NaOH auf 7,0 einstellen und autoklavieren

MOPS (1x) 9 Teile DEPC-H<sub>2</sub>O + 1 Teil MOPS (10x)

2x RNA loading dye Fermentas, St.Leon-Rot

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Arbeiten mit Zellen

#### 4.2.1.1 Allgemeine Zellkultur und Zellpflege

Bei der Arbeit mit Zelllinien wird unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Alle in dieser Arbeit beschriebenen Zelllinien werden bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 99% Luftfeuchtigkeit im Zellkulturbrutschrank kultiviert. Abhängig von der jeweiligen Verdopplungszeit werden Zellen passagiert (subkultiviert). Dazu wird bei adhärenz wachsenden Zellen das Medium mit einer sterilen Pipette entfernt und das restliche Medium mit 10 ml PBSCMF gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung überschwenkt und für 2-3 Minuten bei 37 °C inkubiert, um die Zellen von der beschichteten Zellkulturflasche abzulösen. Die Zellen werden danach in dem für sie geeigneten Medium resuspendiert bis die Zellen gut vereinzelt sind. Ein definiertes Volumen dieser Zellsuspension wird in ISOTON II-Lösung überführt und die Anzahl der Zellen mit Hilfe eines Coulter Counter™ Gerätes bestimmt. Es ist nun möglich einen Teil der Zellen in eine neue Kulturflasche zu überführen und die Zellen weiterzukultivieren. Da die MEF-Zelllinien mit längerer Zeit in Kultur (hohe Passagenzahlen) ihre Eigenschaften ändern können, sollten möglichst immer Zellen mit niedriger Passagenzahl verwendet werden. Falls nicht anders angegeben, werden für alle Versuche Zellen verwendet, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden.

#### 4.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff dient zur Langzeit-Lagerung und Sicherung vorhandener Zelllinien. Dazu werden die Zellen nach dem Ablösen in frischem Kulturmedium aufgenommen, gezählt und für 10 min mit 1000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Zellpellet in eiskaltem Einfriermedium (Kulturmedium mit 10% DMSO) aufgenommen (Konzentration: 2 Mio/ml) und die Zellen resuspendiert. Danach werden die Zellen für 2 h bei -20 °C

eingefroren, anschließend werden die Kryoröhrchen über Nacht bei  $-70\text{ °C}$  gelagert und zum Schluß in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Reaktivierung werden die Zellen bei  $37\text{ °C}$  möglichst schnell aufgetaut und die Zellsuspension direkt in 20 ml warmes Kulturmedium überführt. Zur Entfernung des zelltoxischen DMSO wird die Zellsuspension für 10 min bei  $1000\text{ g}$  zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen werden nun in eine Zellkulturflasche überführt und unter Kulturbedingungen im Inkubator gelagert.

#### 4.2.1.3 Bestimmung des Proliferationsfaktors

##### Prinzip

Die Bestimmung des Proliferationsfaktors ist eine einfache und schnelle Methode zur Abschätzung der Toxizität einer Substanz. Dazu werden Säugerzellen mit einer Substanz inkubiert und die Proliferation der Zellen durch Zählung der Zellzahl bestimmt. Durch einen Vergleich mit unbehandelten Zellen kann man die Toxizität bestimmen.

##### Durchführung

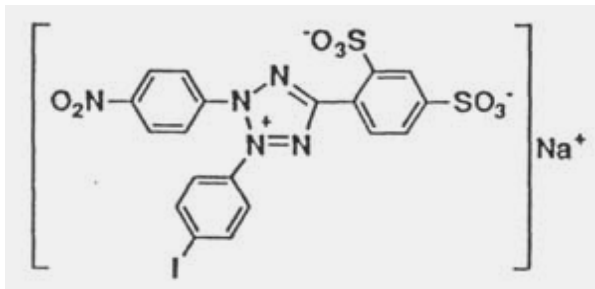
Nach dem Ablösen und Zählen (vgl. 4.2.1.1) von adhärent wachsenden F11.1-Zellen werden pro Konzentration der Substanz jeweils in 2 Ansätzen genau  $0,5 \times 10^6$  Zellen in eine  $25\text{ cm}^2$ -Zellkulturflasche ausgestreut. Zusätzlich werden 2 Referenzflaschen mit der gleichen Zellzahl ausgestreut. Nach einer ausreichenden Anwachszeit (ca. 12-24 h) wird das Medium gewechselt und die Zellen mit den unterschiedlichen Konzentrationen Resveratrol ( $0,1 - 200\text{ }\mu\text{M}$ ) und einer Lösungsmittelkontrolle (0,2% DMSO) inkubiert. Die Referenzflaschen werden gleichzeitig abgelöst und gezählt, um die Zellzahl zum Zeitpunkt  $t_0$  zu erhalten. Danach werden die Zellen für 24 h unter Kulturbedingungen mit Resveratrol im Medium weiterinkubiert. Im Anschluss wird die Zellzahl der einzelnen Flaschen bestimmt ( $t_1$ ) und aus dem Mittelwert der jeweilige Proliferationsfaktor pro Konzentration berechnet. Dazu wird der Quotient aus der mittleren Zellzahl  $t_1$  zur mittleren Zellzahl  $t_0$  gebildet.



#### 4.2.1.4 WST1-Assay zur Bestimmung der Toxizität

##### Prinzip

Mit Hilfe des WST1-Assays lässt sich das zytotoxische Potential von Substanzen beurteilen. Hierbei wird die metabolische Aktivität der Zellen bestimmt, indem der Umsatz des Tetrazoliumsalzes WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzen-disulfonat, siehe **Abbildung 7**) in Anwesenheit eines elektronenbindenden Reagenz zum roten Formazan gemessen wird.



**Abbildung 7: Chemische Struktur von WST-1**

Hierbei ist die Menge des durch Dehydrogenasen gebildeten Formazans proportional zur Menge der lebenden Zellen. Die dadurch entstehende Farbvertiefung kann durch Messung der Absorption bei 450 nm photometrisch quantifiziert werden.

##### Durchführung

Am Tag vor Versuchsbeginn werden die Zellen abgelöst, verdünnt und in einer 96-Well-Platte jeweils 10000 Zellen in 100  $\mu$ l pro Well ausgestreut. Am darauf folgenden Tag wird zusätzlich mit unterschiedlichen Konzentrationen Resveratrol für 18 h inkubiert. Im Anschluss an diese Schädigung werden pro Well 10  $\mu$ l des Farbstoffs WST-1 zugegeben und direkt die Absorption bei 450 nm im Microplate-Reader gemessen ( $t_0$ ). Nach 2 h wird erneut die Absorption bestimmt ( $t_1$ ) und der Wert  $t_0$  hiervon subtrahiert. Zur Berechnung der Toxizität wird die Zunahme der Absorption in Relation zur unbehandelten Kontrolle gesetzt.

## 4.2.2 Arbeiten mit Tieren

### 4.2.2.1 Genotypisierung von Mäusen

Um den entsprechenden Genotyp der Mäuse zu überprüfen kann aus Schwanzbiopsien der Mäuse DNA isoliert werden und diese mit einer PCR und spezifischen Primern analysiert werden. Die Genotypen können durch die unterschiedliche Größe der Fragmente im Agarose-Gel differenziert werden. Dazu wird wie folgt vorgegangen:

#### **Markierung der Tiere:**

Um die Tiere nach einer Typisierung unterscheiden zu können, werden sie mit Hilfe einer Ohrmarkenzange und speziellen Nagerohrmarken gekennzeichnet.

#### **Gewinnung der Schwanzbiopsien:**

Zur Gewinnung von Schwanzbiopsien wird den Tieren mit einer Pinzette und mittels einer mit EtOH 70% und Wasser gereinigten Schere ca. 0,5 cm ihres Schwanzes abgetrennt.

Aus Tierschutzgründen werden Schwanzbiopsien nur bis zur 4 Wochen nach der Geburt entnommen.

#### **DNA-Isolation:**

Die Schwanzbiopsien werden mit dem DirectPCR® Lysis-Reagenz aufgearbeitet. Dazu wird dem Reagenz Proteinase K mit einer Konzentration von 0,3-0,5 mg / ml zugegeben und 250 µl dieser Lösung zum Schwanzstück gegeben. Dieser Mix wird bis zur vollständigen Lyse für 6-16 h bei 55 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wird das Reaktionsgefäß für 45 min auf 90 °C erhitzt. Diese Lösung kann entweder direkt für die PCR verwendet werden oder bei -20 °C eingefroren werden.

### Polymerase-Kettenreaktion:

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist es möglich *in vitro* ein beliebiges DNA-Stück zu vervielfältigen. Die Position und Länge des Amplikons wird dabei durch die Wahl der Primer bestimmt. Durch die Kombination von drei verschiedenen Primern, einem 3'-Primer für das Wildtyp-Allel, einem 3'-Primer für die knockout-Sequenz und einem 5'-Primer für beide Formen, können sowohl Wildtyp- und *knockout*-, als auch heterozygote Tiere identifiziert werden.

Es wird jeweils ein Mastermix angefertigt und dann dieser auf die jeweiligen Reaktionsgefäße verteilt. Zu jedem Ansatz wird jeweils 1µl der lysierten Schwanzbiopsie pipettiert.

**Tabelle 5: Zusammensetzungen der Mastermixe für die *Csb*, *Ogg1* und *Lacl*.** Alle Angaben sind in µl. Die empfohlene Reihenfolge der Zugabe zur Mischung ist von oben nach unten.

	<i>Csb</i>	<i>Ogg1</i>	<i>lacl</i>
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> steril	26,75	26,75	40,25
Reaktionspuffer Y	5	5	5
Enhancer Lösung P	10	10	-
dNTP-Mix (10mM)	1	1	1,5
Upstream Primer (25 µM)	2	2	1
Downstream Primer KO (25 µM)	2	2	1
Downstream Primer WT (25 µM)	2	2	-
Taq-Polymerase	0,25	0,25	0,25
Mastermix	49	49	49
+ DNA-Template	1	1	1
Summe	50	50	50

Die Proben werden kurz gemischt und die PCR mit den folgenden aufgeführten Bedingungen gestartet.

<i>Csb</i> / <i>Ogg1</i>	<i>lacl</i>
1 Zyklus: 94 °C, 3 min	1 Zyklus: 95 °C, 5 min
35 Zyklen: 94 °C, 45 s	35 Zyklen: 95 °C, 30 s
59 °C, 1 min	53 °C, 45 s
72 °C, 2 min	72 °C, 75 s
1 Zyklus: 72 °C, 10 min	1 Zyklus: 72 °C, 10 min

Die amplifizierten DNA-Stücke können nun mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (siehe 4.2.4.3) aufgetrennt und die Länge der Banden mit Hilfe eines DNA-Markers zugeordnet werden.

#### 4.2.2.2 Zucht und Haltung von transgenen *knockout*-Mäusen

##### Prinzip

Durch die Verpaarung von Mäusen, in deren Genom ein Transgen integriert wurde, mit Mäusen, bei denen ein oder mehrere Gene gentechnisch ausgeschaltet wurden („*knockout*“), ist es möglich transgene *knockout*-Mäuse zu generieren. Dies ist möglich, da alle Merkmale auf unterschiedlichen Chromosomen liegen.

Bezeichnung	Lokalisation	Pubmed GeneID / Literatur
<i>Csb</i>	Chromosom 14	319955
<i>Ogg1</i>	Chromosom 6	18214
<i>lacI</i> (BigBlue®)	Chromosom 4	(Dycaico et al., 1994)

**Tabelle 6: Lokalisation der unterschiedlichen Genorte im Mausgenom**

##### Durchführung

In einem ersten Zuchtschritt werden ein BigBlue<sup>+/+</sup>-Männchen polygam mit zwei *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup> Weibchen verpaart. Die daraus entstehende F1-Generation hat den Genotyp *Ogg1*<sup>+/-</sup>*Csb*<sup>+/-</sup>*Blue*<sup>+/-</sup>. Im darauf folgenden 2. Zuchtschritt werden die *Ogg1*<sup>+/-</sup>*Csb*<sup>+/-</sup>*Blue*<sup>+/-</sup> Mäuse untereinander verpaart. Aus dieser Paarung können insgesamt 27 unterscheidbare Genotypen hervorgehen. Durch Genotypisierung können die homozygoten knockout-Tiere, welche das *lacI* Transgen tragen, identifiziert werden. In einem 3. Zuchtschritt werden folgende 4 Genotypen untereinander verpaart: *Ogg1*<sup>+/+</sup>*Csb*<sup>+/+</sup>*Blue*<sup>+</sup> (*wtBlue*), *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>+/+</sup>*Blue*<sup>+</sup> (*Ogg1*<sup>-/-</sup>*Blue*), *Ogg1*<sup>+/+</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>*Blue*<sup>+</sup> (*Csb*<sup>-/-</sup>*Blue*), und *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>*Blue*<sup>+</sup> (*Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>*Blue*), um diese Stämme zu erhalten. In den Klammern ist der zur vereinfachten Kennzeichnung benutzte Name angegeben. Da das *lacI* Gen der BigBlue® dominant vererbt wird, ist es dauerhaft notwendig die Nachfahren der Zuchtstämme auf das Transgen hin zu überprüfen.

#### 4.2.2.3 Gewinnung primärer Hepatozyten (Leberperfusion)

Die Hepatozyten der Maus werden mit Hilfe einer modifizierten 2-Schritt-EGTA/Kollagenase Perfusions-Technik isoliert (Hengstler et al., 2000; Seglen, 1976).

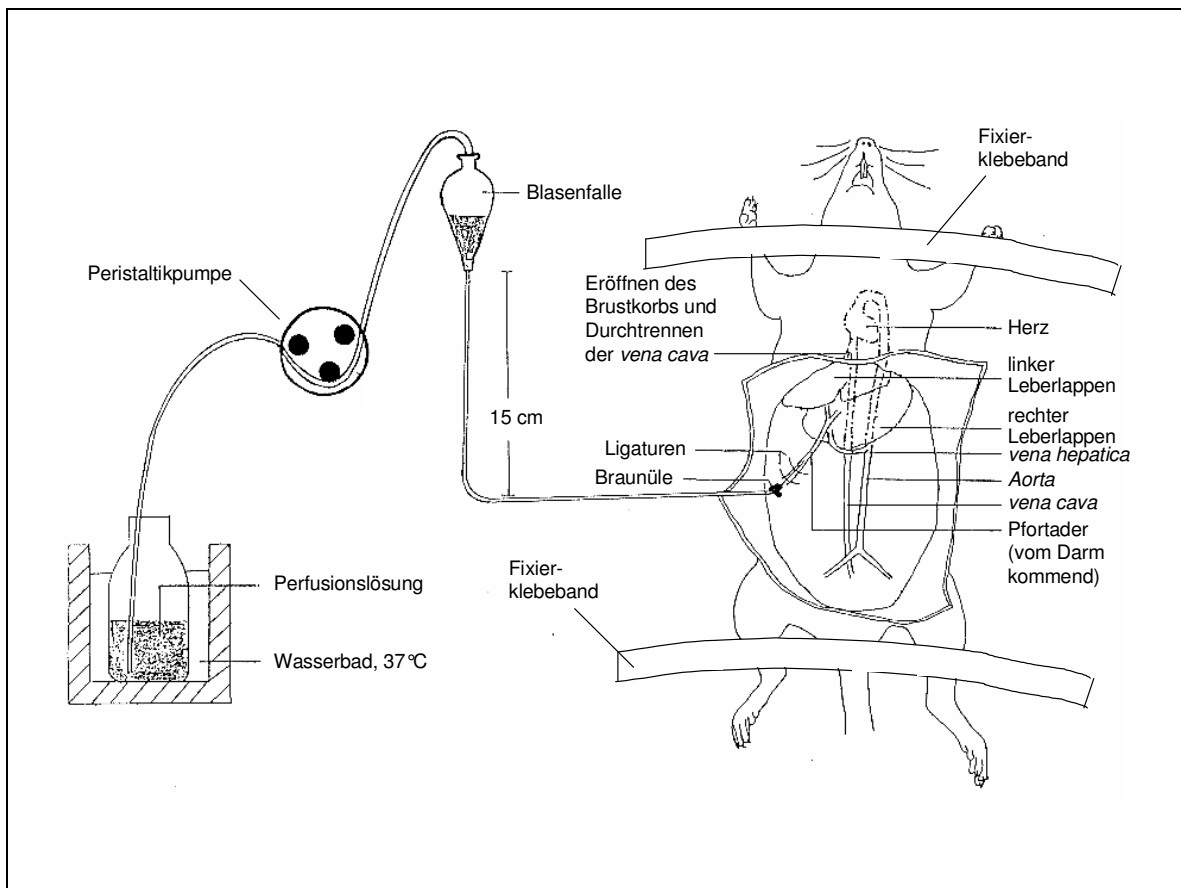


Abbildung 8: Schematische Darstellung der in vivo Leberperfusion

Die Mäuse werden in einer mit Isofluran gesättigten Kammer getötet, gewogen und auf einem Metallgestell mit Klebeband fixiert. Der Bauchraum wird geöffnet und anschließend die Pfortader (Vena portae) freigelegt. Mit einer chirurgischen Schere wird die Pfortader vorsichtig angeschnitten; es ist darauf zu achten, das Gefäß nicht komplett zu durchtrennen. Nun wird mit einem Faden eine Schlinge um die Pfortader gelegt, damit später die Flügelkanüle fixiert werden kann. Anschließend wird eine Flügelkanüle, die mit einem Pumpenschlauch verbunden ist, in das eröffnete Gefäß eingeführt und fixiert. Die Aorta wird durchtrennt und die Leber luftblasenfrei für 15 min (Pumpgeschwindigkeit max. 1 ml/min) mit EGTA-Puffer perfundiert.

Anschließend wird der Puffer gewechselt und für 20-25 min mit Kollagenase-Puffer perfundiert (max. 1 ml/min). EGTA- und Kollagenase-Puffer werden während der gesamten Perfusion im Wasserbad auf 37 °C temperiert und mit Carbogen (5 Volumenteile CO<sub>2</sub> und 95 Teile O<sub>2</sub>) begast. Der pH-Wert der Puffer wird dadurch auf 7,8 - 7,5 gesenkt, was für die Kollagenase das Optimum darstellt. Nach erfolgter Perfusion wird die komplette Leber in 30 ml eisgekühlten Suspensionspuffer überführt, vorsichtig die Gallenblase entfernt und gewogen. Mit Hilfe einer Pinzette kann nun die Leberkapsel geöffnet und vorsichtig die Hepatozyten aus dem Gewebeverband freigesetzt werden. Diese Zellsuspension wird , um größere Gewebestücke abzutrennen, durch ein 100 µm Zellsieb in ein Zentrifugenröhrchen filtriert. Die Hepatozyten werden nun bei 15 g und 4 °C für 10 min abzentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Nach Zugabe von 20 ml kaltem Suspensionspuffer werden die Zellen durch vorsichtiges Schwenken vereinzelt und dieser Waschschrift einmal wiederholt. Die Zellen werden vor der Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

#### 4.2.2.4 Schädigung der Hepatozyten mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Die frisch isolierten Hepatozyten werden 10 min bei 15 g und 4 °C abzentrifugiert, anschließend werden die Zellen in Suspensionspuffer bis zu einer Konzentration von 0,5 Mio. Zellen / ml resuspendiert. Danach wird die Suspension aufgeteilt und mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> versetzt. Dazu wird eine Stammlösung zugegeben, um eine Endkonzentration von 100 µM bzw. 250 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu erreichen. Diese Zellsuspension wird anschließend bei 37 °C für 15 min im Rüttelinkubator geschüttelt. Die Reaktion wird mit Katalase und Inkubation auf Eis abgestoppt.

Danach wird entweder die Vitalität (relativ zur Vitalität direkt nach der Isolation) mit Trypanblau-Ausschluss bestimmt (siehe 4.2.2.5) oder die induzierten Einzelstrangbrüche mit Hilfe der Alkalischen Elution gemessen (siehe 4.2.3).

#### 4.2.2.5 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung von Hepatozyten

Die Vitalität der primären Hepatozyten wird mittels Trypanblau-Ausschluss bestimmt. Trypanblau ist ein hydrophiler Farbstoff der eine intakte Zellmembran nicht durchdringen kann.

200  $\mu$ l der Hepatozyten-Zellsuspension werden mit 200  $\mu$ l Trypanblau-Lösung (4 mg/ml in PBS) gemischt. Da Hepatozyten sehr empfindlich gegenüber Scherkräften sind und vorsichtig gehandhabt werden sollten, werden abgeschnittene Pipettenspitzen (ca. 5 mm abgeschnitten) verwendet. In einer Neubauer-Kammer werden im Lichtmikroskop die nicht gefärbten lebenden Zellen und blau gefärbten toten Zellen gezählt. Daraus kann die Anzahl der Zellen berechnet werden und die Vitalität als prozentualer Anteil der lebenden Zellen bestimmt werden. Da Trypanblau selbst zytotoxisch ist, muss darauf geachtet werden zügig zu arbeiten.

#### 4.2.2.6 Kurzzeit-Behandlung der Mäuse mit Resveratrol

Die Kurzzeit-Behandlung der Tiere erfolgte durch die Applikation *per Gavage* (Schlundsondierung) am Institut für Pharmakologie durch einen tierversuchserfahrenen Experimentator.

Dazu wird Resveratrol in DMSO gelöst und den Mäusen mit einer Konzentration von 100 mg/kg Körpergewicht einmal pro Tag für 7 Tage lang appliziert. Als Lösungsmittelkontrolle wurde den Mäusen eine entsprechende Dosis DMSO (max. 200  $\mu$ l) verabreicht. Die Gabe wurde immer ungefähr zum gleichen Tageszeitpunkt durchgeführt. Die Isolation der Hepatozyten erfolgte am Tag nach der letzten Behandlung.

#### 4.2.2.7 Langzeit-Fütterungsversuch mit Resveratrol

Für den Langzeit-Fütterungsversuch wurde den Mäusen Haltungsfutter, mit einer Konzentration von 0,04% Resveratrol *ad libitum*, verabreicht. Dies erfolgte analog zu einer Studie von Baur et al. (Baur et al., 2006). Die Prüfdiät wurde von der Firma Altromin hergestellt. Das Futter wurde maximal für 2 Wochen den Mäusen im Käfig zur Verfügung gestellt. Das Resveratrol-haltige Futter wurde jeweils für den Zeitraum von 3 Monaten angefertigt. Das, sich nicht direkt im Käfig befindende Futter wurde während dieser Zeit unter Vakuum und vor Licht geschützt bei 4 °C gelagert.

Die Fütterung begann direkt nach dem Trennen der jungen Mäuse von den Eltern („absetzen“). Die Tiere wurden randomisiert der Verum- oder Kontrollgruppe zugeordnet.

#### 4.2.2.8 Organentnahmen

Zur Bestimmung der BigBlue-Mutationen und zur Genexpressionsbestimmung müssen den Mäusen die Lebern entnommen werden. Dazu werden die Mäuse mit Isofluran betäubt und direkt danach durch Genickbruch getötet. Anschließend wird schnell der Bauchraum geöffnet und die Leber entnommen. Es werden verschiedene Proben entnommen, die immer aus den gleichen Leberlappen bestehen und ähnlich groß sind. Das Material wird in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und danach teilweise bei -70 °C gelagert.

#### 4.2.2.9 Blutentnahme und Serumgewinnung

Zur Gewinnung von Serum aus Mäuseblut wird eine mit Isofluran betäubte Maus mit einer Nagerguillotine dekapitiert und das austretende Blut in einem Zentrifugenröhrchen gesammelt. Danach wird das Blut in ein 1,5 ml Cap überführt und für 30-60 min bei Raumtemperatur gerinnen gelassen. Der Blutpropfen wird von der Wand gelöst und bei 2500 U/min für 10 min zentrifugiert. Der klare Überstand wird nun zur Bestimmung diverser Laborparameter auf Eis zu der Firma Biocontrol (Ingelheim) gebracht.



#### 4.2.2.10 Zellproliferation mit Ki-67

##### Prinzip

Die Proliferation der Hepatozyten kann durch den durchflusszytometrischen Nachweis des Antigens Ki-67 gemessen werden. Ki-67 ist ein nukleäres proliferations-assoziiertes Protein mit unbekannter Funktion, welches in allen aktiven Zellzyklusphasen, aber nicht in der Ruhephase  $G_0$  exprimiert wird (Kubbutat et al., 1994). Leberzellen sind im adulten Organismus normalerweise ausdifferenziert und exprimieren erst nach einer Stimulation das Ki-67 Antigen, welches anschließend mit einem FITC-markierten Antikörper nachgewiesen werden.

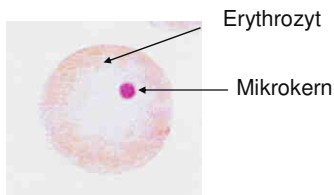
##### Durchführung

Frisch isolierte Hepatozyten (5 Mio.) werden durch die tropfenweise Zugabe von 5 ml eiskaltem Ethanol (70%) unter ständigem vortexen fixiert. Die so verarbeiteten Zellen werden bei  $-20\text{ °C}$  gelagert. Zur Rehydratisierung werden die Zellen in 30 ml Waschpuffer resuspendiert und danach für 10 min bei  $4\text{ °C}$  und  $10000\text{ g}$  zentrifugiert. Die Zellen werden einmal mit 20-30 ml Waschpuffer gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Pellet wird dann mit Waschpuffer auf eine Konzentration von 10 Mio Zellen / ml eingestellt. Von dieser Suspension werden  $100\text{ }\mu\text{l}$  in ein frisches Cap überführt (1 Mio Zellen). Zu diesen Zellen werden  $20\text{ }\mu\text{l}$  der Antikörper-Lösung gegeben, gemischt und im Dunkeln für 30 min unter Schütteln bei RT inkubiert. Danach wird dreimal mit 1 ml PBS gewaschen und für 5 min bei  $4\text{ °C}$  und  $1500\text{ g}$  abzentrifugiert. Das Zellpellet wird anschließend in  $750\text{ }\mu\text{l}$  Waschpuffer resuspendiert und im FACS analysiert. Dazu werden nicht mit Antikörper behandelte Zellen als Referenz verwendet. Die FITC-Fluoreszenz (FL-1) wird durch Verschiebung im Histogramm in den Bereich, in dem unbehandelte Zellen nicht fluoreszieren, quantifiziert.

#### 4.2.2.11 *In vivo* Mikrokernbestimmung

##### Prinzip

Mikrokerne sind Kondensationsprodukte aus Chromosomenfragmenten oder aus ganzen Chromosomen, die während der Teilung nicht in eine der beiden Tochterzellkerne integriert werden konnten. Wie auch der Zellkern besitzen sie eine Zellmembran, jedoch sind sie wesentlich kleiner als normale Zellkerne. Mikrokerntests *in vivo* können sowohl mit Mausknochenmark (Heddle, 1973), als auch mit Erythrozyten (MacGregor et al., 1980) durchgeführt werden und sind Standardverfahren zur Beurteilung des genotoxischen Potentials von Substanzen (OECD, 1997). Mikrokerne in Erythrozyten entstehen bereits in den Erythroblasten, den Vorläuferzellen der Erythrozyten. Einige Stunden nach der letzten mitotischen Zellteilung eines Erythroblasten wird der Zellkern ausgestoßen, ein eventueller Mikrokern kann aber im ausgereiften Erythrozyten durch Anfärbung nachgewiesen werden.



**Abbildung 9: Mikrokernhaltiger Erythrozyt**

Zur Auswertung bezieht man die Anzahl der mikrokernhaltigen Erythrozyten auf die Erythrozyten ohne Mikrokerne.

## Durchführung

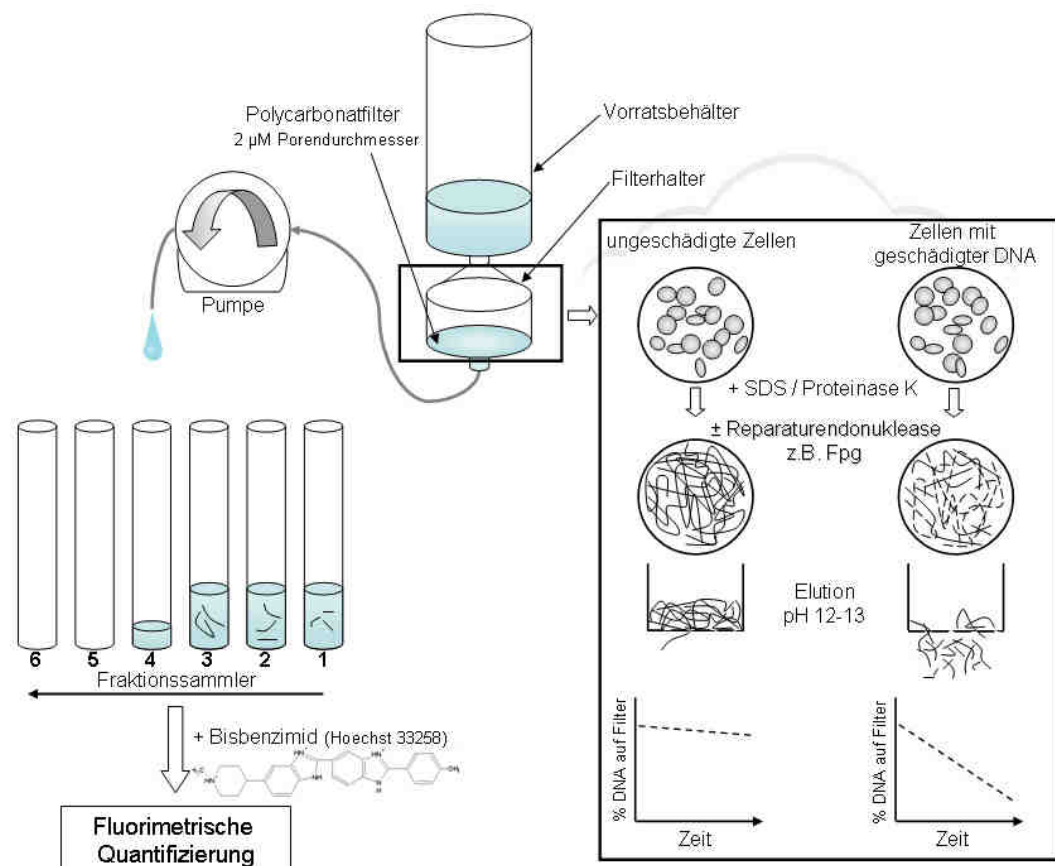
Ungefähr 10 µl peripheres Blut, welches entweder direkt nach Öffnen der Aorta bei der Leberperfusion (vgl. 4.2.2.3) oder nach Dekapitation der Mäuse (vgl. 4.2.2.9) gewonnen wird, wird auf einen Objektträger gegeben und mit einem weiteren Objektträger so ausgezogen, dass der Ausstrich am Ende des Objektträgers sehr dünn ausläuft. Die Präparate werden nun mindestens 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend im Tauchverfahren gefärbt (Rick, 1977). Der Objektträger wird in eine May-Grünwald-Lösung eingetaucht und diese für 5 min einwirken lassen. Anschließend wird mit neutralem H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> abgespült und darin für 5 min eingetaucht. Danach entfernt man das Wasser sorgfältig und färbt die Präparate mit GIEMSA-Gebrauchslösung für 15-20 min. Im Anschluss werden die Präparate 2 x mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> gewaschen (je 5 min) und die Unterseite der Ausstriche mit Ethanol gesäubert, um eventuelle Präzipitate zu entfernen. Nach der Färbung können Erythrozyten (rosa bis rot), Zellkerne (blau-violett), Lymphozyten (hellblau bis blau) und Thrombozyten (rot-violett) zu erkennen sein. Die Proben werden nun von einer Person verblindet und von einer weiteren Person am Mikroskop (Vergrößerung 1:100) ausgezählt. Es werden pro untersuchten Tier die Mikrokerne in 2000 Erythrozyten auf mindestens 2 Objektträgern ausgezählt.

## 4.2.3 Alkalische Elution

### 4.2.3.1 Prinzip

Die Alkalische Elution ist eine hochempfindliche Methode zur Quantifizierung von DNA-Einzelstrangbrüchen (SSB) in Säugerzellen und wurde von Kohn et al. in den 1970er Jahren entwickelt (Kohn et al., 1976). Bei der Methode macht man sich zu nutzen, dass einzelsträngige DNA je nach ihrer Länge unterschiedlich schnell durch einen Filter eluiert werden kann. Durch eine modifizierte Methode, mit dem Einsatz von unterschiedlichen DNA-Reparaturenukleasen, kann man zusätzlich zu den SSB auch DNA-Basenmodifikationen detektieren (Epe und Hegler, 1994), da diese Reparaturenzyme für sie spezifische DNA-Basenmodifikationen erkennen und dort die DNA einschneiden, wodurch ein zusätzlicher SSB generiert wird.

In **Abbildung 10** ist der schematische Aufbau der Alkalischen Elution dargestellt.



**Abbildung 10:** Schematische Darstellung der Alkalischen Elution

Mit der Alkalischen Elution ist es möglich DNA-Schäden bis zu einer Nachweisgrenze von bis zu 0,5 Läsionen pro  $10^7$  Basenpaare zu detektieren. Damit ist diese Methode ungefähr 200-mal empfindlicher als in-vitro- Methoden zur Erkennung von DNA-Schäden, wie der PM2-Relaxations-Assay (siehe 4.1.10.7) (Hollenbach et al., 1999).

Bei der Alkalischen Elution werden die zu analysierenden Säugerzellen zunächst in einer Zellsuspension auf einem Polycarbonatfilter (Porendurchmesser 2  $\mu\text{m}$ ) aufgetragen, dann werden die Zellen durch Inkubation mit einem SDS / Proteinase K – haltigen Puffer lysiert. Dies führt zu einer Entfernung von Zellbestandteilen, wie Proteine, Membranen und RNA. Auf dem Filter bleibt die reine doppelsträngige DNA zurück. Nach dem Wegwaschen des Lysepuffers, kann die DNA mit Reparaturenukleasen inkubiert werden. Durch Zugabe eines alkalischen Elutionspuffers (pH 12,15) wird die DNA denaturiert und die Elution gestartet. Stark geschädigte DNA ist im Durchschnitt kürzer als ungeschädigte und kann dadurch schneller durch die Poren des Filters eluieren. Die DNA wird in unterschiedlichen Fraktionen gesammelt und nach Neutralisation mit Phosphatpuffer (pH 6,0) mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffs Bisbenzimid (Hoechst 33258) fluorimetrisch quantifiziert. Dadurch kann die Elutionsrate berechnet werden und nach Kalibrierung mit  $\gamma$ -Strahlung (6 Gy entsprechen 1 Läsion pro  $10^6$  bp) (Kohn et al., 1976), die Anzahl der DNA-Schäden berechnet werden.

#### 4.2.3.2 Versuchsaufbau und Vorbereitung

Es wird für jeden Ansatz (Spur) eine kolbenlose Einwegspritze mit einem Filterhalter verwendet. Dieser enthält im unteren Teil einen Frittenboden auf welchem der Polycarbonatfilter mit einem durchschnittlichen Porendurchmesser von 2  $\mu\text{m}$  und einem Durchmesser von 25 mm blasenfrei aufliegt. Alle Zellsuspensionen und Lösungen werden von oben in die Einwegspritze pipettiert. Mit Hilfe einer mehrkanaligen Peristaltikpumpe wird die Flüssigkeit durch Spritze, Filterhalter, Filter und Dialyseschlauch in ein Abfallgefäß gepumpt. Die Temperatur des Systems wird durch ein temperierbares Wasserbad, in welchem der Filterhalter eingetaucht ist, gewährleistet. Während der Elution der einzelsträngigen DNA wird das Abfallgefäß durch einen Fraktionssammler ersetzt. (siehe **Abbildung 10**)

Zur Vorbereitung der Anlage, werden die Frittenböden und die Polycarbonatfilter nach dem Einbau in den Filterhalter mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  und PBSCMF (2 x 2,5 ml) gespült. Es ist zu beachten, dass immer auch eine Spur für den Wert ohne Enzym vorbereitet wird. Der Filterhalter wird danach mit 2 ml PBSCMF gefüllt und das Wasserbad nach Eintauchen der Filterhalter auf 4 °C temperiert, um später eine mögliche Reparatur der Zellen zu verhindern.

#### 4.2.3.3 Durchführung der Zellyse, Enzyminkubation und Elution

Es werden  $10^6$  Zellen pro Spur in einer Zellsuspension aufgetragen, dies entspricht ungefähr 10 ng DNA, bei Hepatozyten werden aufgrund ihrer ausgeprägten Polyploidie nur  $0,5 \times 10^6$  Zellen aufgetragen. Die aufgetragenen Zellen werden, um das Kulturmedium zu entfernen, zweimal mit jeweils 2,5 ml kaltem PBSCMF bei maximaler Pumpleistung gewaschen. Am Ende des zweiten Spülvorganges wird das Wasserbad auf 25 °C eingestellt. Sobald die Temperatur 15 °C erreicht hat (bei einer niedrigeren Temperatur würde das SDS im Lysepuffer ausfallen), werden die Zellen mit 2 ml Lysepuffer bei maximaler Pumpleistung lysiert. Anschließend wird zur vollständigen Zellyse und zum Entfernen von Proteinen 5 ml Lysepuffer mit Proteinase K (0,4 mg/ml) in 90 min durchgepumpt. Nach dem Abschluß der Lyse wird 7 mal mit 5 ml BE1-Puffer gewaschen, dazu wird der Puffer mit maximaler Geschwindigkeit durchgepumpt und die im Vorratsbehälter vorhandenen Reste des Lysepuffers mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Es ist dabei darauf zu achten, dass die Wände des Vorratsbehälters vollständig von SDS befreit werden, da dieses bei der späteren Enzyminkubation stören würde. Während des Waschens wird die Temperatur auf 37 °C erhöht, um für die Reparaturoendonuklease optimale Bedingungen herzustellen.

Für die Enzyminkubation wird 2 ml Enzymlösung auf die DNA gegeben, zuerst wird 1 ml mit maximaler Pumpleistung durchgesaugt und dann der restliche 1 ml bei 37 °C für 50 min durchgepumpt.

Die verwendete Enzymlösung wird aus Fpg-Rohextrakt hergestellt mit einer Fpg-Konzentration von 1 µg/ml in BE1-Puffer mit 0,5 mg/ml BSA. Nach der Enzyminkubation wird die Temperatur auf 25 °C heruntergestellt und die Abkühlung eventuell mit Kühlaggregaten beschleunigt. Die Reste der Enzymlösung werden vom

Filter abpipettiert, danach wird zweimal mit 5 ml BE1-Puffer und einmal mit 4 ml Waschpuffer (pH 10) gewaschen. Anschließend wird das Abfallgefäß durch den Fraktionssammler ersetzt und das Vorratsgefäß vollständig mit alkalischem Elutionspuffer (pH 12,15) gefüllt. Die Elution erfolgt über 11 h mit einer Pumpgeschwindigkeit von 1,9 ml/h, alle 120 min wird die Fraktion gewechselt, dadurch erhält man 6 Fraktionen. Der restliche Elutionspuffer, der sich nach der Elution noch in den Vorratsbehältern befindet, wird in die letzte Fraktion gepumpt. Das Volumen der letzten Fraktion (Filterwert) und das Volumen der einzelnen Fraktionen (Fraktionsvolumen) werden bestimmt. Der Filterhalter mit Filter wird auseinander gebaut. Anschließend wird der Filter, der Frittenboden und das Fraktionsvolumen jeder Spur in einem Coulter-Counter<sup>TM</sup>-Döschen vereinigt. Dieses wird dann für mindestens 2 h bei 60 °C im Wasserbad geschüttelt. Dadurch wird die auf dem Filter verbleibende DNA in Lösung gebracht. Nach dieser Inkubation wird ein, dem Fraktionsvolumen entsprechendes, Volumen entnommen und analog den restlichen Fraktionen weiterverarbeitet.

#### 4.2.3.4 Auswertung, Quantifizierung und Berechnung des Schadens

Die einzelnen Fraktionen werden mit dem gleichen Volumen Phosphatpuffer (PP pH 6,0) neutralisiert. Dadurch bilden sich DNA-Doppelstrang-Konglomerate aus. Anschließend wird das gleiche Volumen (entsprechend dem Fraktionsvolumen) Bisbenzimid (Hoechst 33528), mit Konzentration 1,5 µM in neutralem Phosphatpuffer (PP pH 7,2), zugesetzt. Eine ausreichende Durchmischung der Flüssigkeiten ist an diesem Punkt sehr wichtig. Die Proben werden für 15 min inkubiert, um eine vollständige Interkalation zu gewährleisten. Der DNA-Gehalt wird anschließend für jede einzelne Fraktion fluorimetrisch bestimmt. (Exzitationswellenlänge von 360 nm und Emissionswellenlänge 450 nm). Das Fluorimeter wird zuvor mit einer Blindprobe (Elutionspuffer; PP pH 6,0; 1,5 µM Bisbenzimid in PP pH 7,2) auf einen Nullwert eingestellt. Einzelne Fraktionen aus einer zellfreien Spur werden ebenfalls bestimmt und von den Werten der dazugehörigen Fraktionen subtrahiert. Die Gesamtmenge der DNA einer Spur ist proportional zu der Summe der Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Fraktionen. Dadurch kann man den

prozentualen Anteil von DNA auf dem Filter zu den bestimmten Zeitpunkten berechnen. Trägt man nun den DNA-Gehalt im halblogarithmischen Maßstab gegen die Zeit auf, erhält man dadurch eine Gerade, deren Steigung direkt proportional zur Anzahl der Einzelstrangbrüche ist. Eine zufällige Verteilung der Schäden in der Kern-DNA ist Voraussetzung für diese Berechnungsmethode. Die absolute Zahl an Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Modifikationen kann mit folgender Gleichung berechnet werden.

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

**Formel 1: Gleichung zur Berechnung der DNA-Modifikationen in der Alkalischen Elution**  
SSB (Zahl der Einzelstrangbrüche), FPG (Zahl der Fpg-sensitiven Modifikationen), m = mittlere Steigung der Gerade

Der Faktor -2,24 wurde durch eine experimentelle Kalibrierung mit  $\gamma$ -Strahlung bestimmt (Epe et al., 1993; Pflaum, 1996). Um die Fpg-sensitiven Modifikationen zu berechnen werden die in Parallelansätzen ermittelten Einzelstrangbrüche von dem jeweiligen Wert abgezogen. Die absolute DNA-Menge in  $\mu\text{g}$  kann durch den Vergleich mit einer Probe von 4  $\mu\text{g}$  Kalbsthymus-DNA in Elutionspuffer, welche wie oben beschrieben vermessen wird, berechnet werden.

<b>Bakterielles Enzym</b>	<b>Fpg</b>
<b>Humanes homologe Protein</b>	Ogg1
<b>AP-Läsionen</b>	
Normal	+
1'-oxidiert	-
4'-oxidiert	+
<b>Basenmodifikationen</b>	
8-oxoG	+
FaPy-Guanin	+
FaPy-Adenin	(+)

**Tabelle 7: Erkennungsspektrum von Fpg** nach Epe 1995, (+) nicht prozessiert von Ogg1



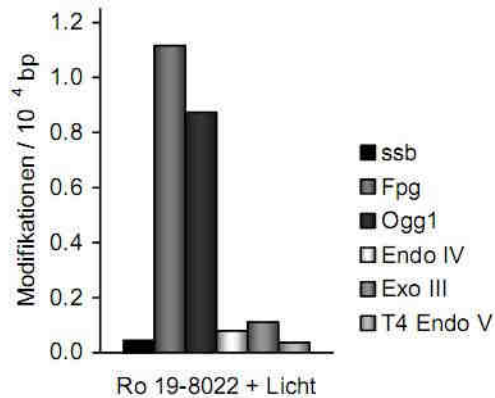
#### 4.2.3.5 Schnelle Alkalische Elution zur Detektion höherer Schäden

Da sich bisher beschriebenen Elution Schäden bis zu maximal etwa 0,9 Strangbrüchen pro  $10^6$  bp nachweisen lassen, kann die oben beschriebene Technik zur Messung höherer Schäden einfach abgewandelt werden. Dazu erhöht man die Pumpgeschwindigkeit während der eigentlichen alkalischen Elution auf 30 ml/h. Dadurch wird die Empfindlichkeit der Methode etwas niedriger, dafür können aber Schäden bis maximal 3 pro  $10^6$  bp detektiert werden. Die Gesamtelutionszeit verringert sich von 11 h auf 54 min, wobei bei gleichem Fraktionsvolumen und Fraktionsanzahl sich die Zeit pro Fraktion auf 9 min reduziert. Auch hier wird mit Schädigung durch  $\gamma$ -Strahlung kalibriert. Der durch Bestrahlungsexperimente ermittelte Faktor für die „schnelle Alkalische Elution“ ist -8,6 (Ballmaier, 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde die „schnelle Alkalische Elution“ zur Bestimmung der Fpg-sensitiven Modifikationen in den reparaturdefizienten *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup> Mäusen verwendet.

#### 4.2.3.6 Reparatur in Säugierzellen

Zur Bestimmung der Reparatur in Säugierzellen werden zuerst in parallel Ansätzen ein Teil der Zellen vor der Aufarbeitung geschädigt und anschließend für die Reparaturzeit unter Kulturbedingungen inkubiert.

Zur Bestimmung der Reparatur von oxidativen DNA-Schäden wird der Photosensibilisator Ro19-8022 und die Bestrahlung mit sichtbarem Licht eingesetzt. Wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, induziert dieser vor allem Fpg-sensitive und Ogg1-sensitive Modifikationen, welche zum Hauptteil 8-oxoG entsprechen (Flohr, 2003; Will et al., 1999).



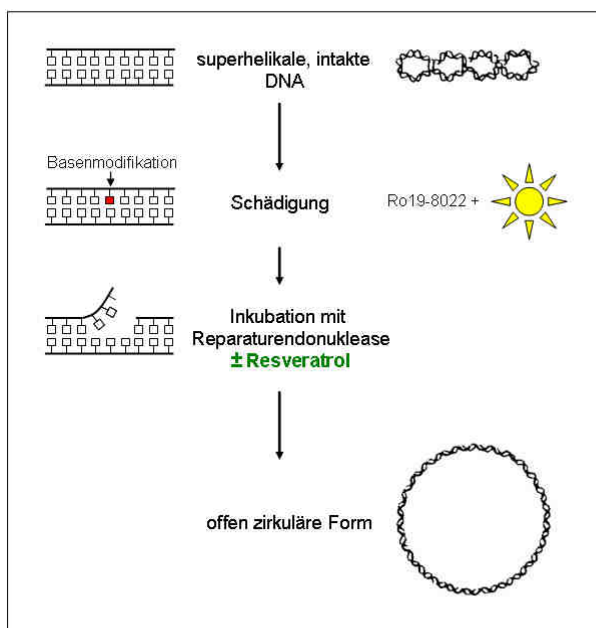
**Abbildung 11: Schadensspektrum von Ro19-8022.** Schaden bestimmt im PM2-Relaxationsassay nach Schädigung mit 50  $\mu$ M Ro19-8022 + 225  $\text{kJ/m}^2$  sichtbares Licht. (modifiziert aus Flohr, 2003)

Dazu werden adhärenente Zellen in einer 75  $\text{cm}^2$  Zellkulturflasche zunächst zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen und anschließend mit 10 ml einer 50 nM Ro19-8022-Lösung in PBSCMF versetzt. Die Zellen werden für 10 min mit sichtbarem Licht (Halogenlampe 1000 W) auf Eis bestrahlt. Der Abstand zwischen Lampe und Zellen beträgt dabei 38 cm. Dies entspricht einer Energiedosis von 166  $\text{kJ/m}^2$  im Wellenlängenbereich von 400-800 nm. Um noch vorhandene Ro19-8022-Substanz zu entfernen, werden die Zellen nach der Schädigung zweimal mit PBSCMF gewaschen. Danach werden sie in Vollmedium im Brutschrank (37  $^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) für die angegebene Reparaturzeit inkubiert. Zusätzlich zu diesen Ansätzen und der Kontrolle mit den ungeschädigten Zellen (Steady-State) wird eine weitere Flasche mit Zellen vorbereitet. Diese wird direkt vor der Aufarbeitung (zum Zeitpunkt  $t=0\text{h}$ ), nach obiger Anleitung geschädigt. Nach Durchführung der alkalischen Elution wird die Anzahl der induzierten DNA-Modifikationen im geschädigten Ansatz ohne Reparatur ( $t=0\text{h}$ ) mit 100% Schaden gleichgesetzt.

## 4.2.4 PM2-DNA-Relaxationsassay

### 4.2.4.1 Prinzip

Mit dem PM2-Relaxationsassay ist es möglich zellfrei *in vitro* DNA-Schäden nachzuweisen (siehe **Abbildung 12**): Man macht sich hierbei zu Nutzen, dass die Plasmid-DNA des Bakteriophagen PM2 im ungeschädigten Zustand in einer superhelikalen Form vorliegt. Kommt es nun zu einem Einzelstrangbruch, so geht das superhelikale Plasmid in die offen zirkuläre Form über. Bei einem Doppelstrangbruch kommt es zu einer Linearisierung des Plasmides. Verschiedene DNA-Reparaturenendonukleasen können eingesetzt werden, um für sie spezifische Basenmodifikationen zu erkennen und dort zusätzliche Einzelstrangbrüche zu generieren. (Epe et al., 1988) Die unterschiedlichen Konformationen des Plasmides können dann im Agarosegel aufgetrennt werden, da sie unterschiedlich viel Raum einnehmen. Die kompakte superhelikale Form wandert im Gel am weitesten, die offen zirkuläre Form wird dagegen stärker von der Gelstruktur zurückgehalten und das lineare Plasmid liegt von der Laufstrecke zwischen den beiden anderen Konformationen.



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung des PM2-Relaxationsassays

#### 4.2.4.2 Schadensinduktion und Enzymbehandlung

Zur Induktion von oxidativen Basenmodifikationen wird der Photosensibilisator Ro19-8022 und sichtbares Licht verwendet (Schadensprofil siehe **Abbildung 11**): In Phosphatpuffer gelöste PM2-DNA wird mit 50  $\mu\text{M}$  Ro19-8022 versetzt und auf einer Tüpfelplatte mit einer Halogenlampe (1000 W) im Abstand von 47 cm für 20 min auf Eis bestrahlt. Als Kontrolle wird DNA ohne Photosensibilisator bestrahlt. Anschließend wird die DNA mit der Fällungslösung versetzt und für 30 min bei -20 °C präzipitiert. Danach wird sie zweimal für 10 min bei 12000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wird die geschädigte DNA mit 70% Ethanol gewaschen und wiederum abzentrifugiert. Der Überstand wird möglichst rückstandsfrei abpipettiert und das DNA-Pellet in BE1-Puffer aufgenommen. Nach einer Kontroll-Gelelektrophorese mit einem bekannten PM2-Standard wird die Konzentration mit BE1-Puffer auf genau 0,2  $\mu\text{g}$  DNA in 10  $\mu\text{l}$  eingestellt.

<i><b>Enzym</b></i>	<i><b>Puffer</b></i>	Anwendungskonzentration
Fpg	BE <sub>1</sub> 0,1 mg/ml BSA	1 $\mu\text{g/ml}$
Ogg1	BE <sub>1</sub> 0,1 mg/ml BSA	0,014; 0,041; 1,11; 3,3; 10; 20; 30 $\mu\text{g/ml}$

**Tabelle 8: Konzentration und Puffer der eingesetzten Enzyme.**

Danach werden jeweils 10  $\mu\text{l}$  der PM2-DNA-Lösung (0,2  $\mu\text{g}$ ) mit 10  $\mu\text{l}$  der Enzymlösung gemischt, zusätzlich wird ein Ansatz ohne Enzym hergestellt. Zusätzlich werden dem Reaktionsansatz 10  $\mu\text{l}$  einer Resveratrol-Lösung (150 bzw. 300  $\mu\text{M}$  in BE1-Puffer mit 0,5% DMSO) beziehungsweise eine Lösungsmittelkontrolle zugesetzt, um die Endkonzentrationen 0, 50 und 100  $\mu\text{M}$  in den Ansätzen zu erreichen.

Die Ansätze werden anschließend 30 min bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Zum Abbruch der Enzymreaktion werden gleichzeitig jeweils 10  $\mu\text{l}$  Stopppuffer zugesetzt und kurz gevortext.

#### 4.2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mit einer Agarosegel-Elektrophorese in einem 0,8%igen Gel werden die Plasmide nach ihrer Konformation getrennt. Dazu wird 0,8 g Agarose in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit TAE-Puffer auf 100 g aufgefüllt. Durch Erhitzen in der Mikrowelle wird die Agarose vollständig gelöst, bis keine Schlieren mehr erkennbar sind. Verdampftes Wasser wird ergänzt. Wenn die Agarose-Lösung auf ungefähr 50-60 °C abgekühlt ist, wird sie in die vorbereitete Kammer gegossen. Sobald das Gel ausgehärtet ist, wird es mit TAE-Puffer überschichtet. Nachdem man jeweils ein Probe (40 µl) pro Spur aufgetragen hat, wird das Gel für 90 Minuten bei 80 V angeschlossen. Anschließend wird das Gel zur Färbung in ein Ethidiumbromidbad (0,5 µg/ml H<sub>2</sub>O) überführt und mind. 1 h auf dem Tischschüttler gefärbt.

#### 4.2.4.4 Auswertung

Die Auswertung des Gels wird auf einem UV-Leuchttisch ( $\lambda = 312 \text{ nm}$ ) durchgeführt. Durch eine digitale CCD-Kamera, wird eine Aufnahme des Gels erstellt und gespeichert. Es werden nun die jeweiligen Anteile der einzelnen Plasmid-Konformationen an der gesamten DNA-Menge pro Spur bestimmt. Dazu wird, mit Hilfe des Programms Molecular Analyst<sup>TM</sup>, über die gemessenen Fluoreszenzintensitäten integriert.

Mit Hilfe der **Formel 2** können daraus die Zahl der Einzelstrangbrüche und die Endonuklease-sensitiven DNA-Modifikationen pro Molekül berechnet werden. Die logarithmische Formel berücksichtigt, dass nur der erste Strangbruch zu einer Relaxation des Moleküls führt und setzt eine zufällige Verteilung (Poisson-Verteilung) der Strangbrüche voraus. Der geringeren Interkalation des Ethidiumbromids in die superhelikale DNA und die damit verbundene geringere Fluoreszenz wird durch den Korrekturfaktor 1,42 Rechnung getragen (Lloyd et al., 1978).

$$ESS + SSB = \frac{-\ln x(1,42x F_{sup})}{(1,42x F_{sup} + F_{oc})}$$

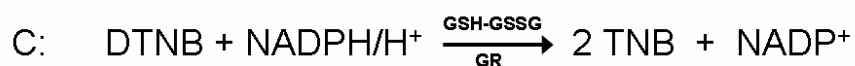
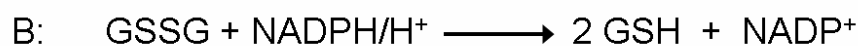
**Formel 2: Gleichung zur Berechnung der Einzelstrangbrüche (SSB) und Endonuklease-sensitiven Modifikationen (ESS) im DNA-Relaxationsassay;**  $F_{sup}$  = Fluoreszenz-intensität der superhelikalen Form der DNA;  $F_{oc}$  = Fluoreszenzintensität der offen zirkulären Form der DNA.

Zur Bestimmung der Endonuklease-sensitiven DNA-Modifikationen wird die Anzahl der Einzelstrangbrüche, die in der Probe ohne Endonuklease ermittelt wurden, von den insgesamt errechneten Einzelstrangbrüchen aus den Proben mit Enzym abgezogen.

## 4.2.5 Quantifizierung des Glutathion-Gehaltes

### 4.2.5.1 Prinzip

Zur Quantifizierung des Gesamtglutathion-Gehaltes in Zellen wird die Methode nach Griffith (Griffith, 1985) benutzt. Hierbei dient als Detektionsreagenz 5,5'-Dithio-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellman's Reagenz), welches mit Thiolgruppen, wie in Glutathion (GSH) vorhanden, unter Bildung von 5'-Thio-(2-nitrobenzoesäure) (TNB) reagiert. (siehe **Formel 3 A**). Es bildet sich dabei oxidiertes Glutathion (GSSG), welches durch das Enzym Glutathionreduktase (GR) mit dem Co-Faktor NADPH/H<sup>+</sup> wieder zu GSH reduziert wird (C). Das GSH kann nun erneut mit DTNB reagieren.



**Formel 3: Reaktionsgleichungen zur Bestimmung von Gesamtglutathion nach Griffith**

Bei der enzymatischen Glutathion-Bestimmung sind die Konzentrationen von DTNB, NADPH und GR so gewählt, dass die Geschwindigkeit der gesamten Reaktion proportional zur Konzentration des Glutathiongehaltes verläuft. Die Bildung von TNB lässt sich spektralphotometrisch als zeitabhängige Zunahme der Absorption bei 412 nm verfolgen und die Menge des Gesamt-GSH im Vergleich mit einer GSH-Kalibriergerade bestimmt werden.

Zum Vergleich von unterschiedlichen Zelllinien bzw. Mäusegenotypen wird der Glutathiongehalt auf die Proteinmenge bezogen. Die Proteinmenge wird mit dem Bradford-Assay photometrisch bestimmt.

#### 4.2.5.2 Durchführung

Bei adhärenenten Zellen in Kultur werden 10 Mio. Zellen abgelöst (vgl. 4.2.1.1) und in 10 ml Medium resuspendiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 1200 *g* und 4 °C wird der Überstand verworfen und das Pellet mit 5 ml PBSCMF gewaschen. Danach wird erneut zentrifugiert und die Zellen in genau 5 ml PBSCMF resuspendiert. Anschließend wird die Zellzahl bestimmt und wiederum abzentrifugiert. Die Zellen werden mit eisgekühltem TCA-Puffer auf eine Konzentration von 10 Mio. Zellen / ml eingestellt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Bei primären Hepatozyten (vgl. 4.2.2.3) werden 5 Mio Zellen mit Suspensionspuffer gewaschen, 10 min bei 500 *g* und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wird mit TCA-Puffer auf eine Konzentration von 5 Mio. Zellen / ml eingestellt. Die Zellen werden nun mit einem Ultraschall-Homogenisator (35 W, 3 x 20 Impulse, 10kHz) aufgeschlossen und die festen Zellbestandteile durch einen Zentrifugationsschritt (10 min, 10000 *g*, 4 °C) abgetrennt. Je nach erwarteter Glutathion-Konzentration werden 10-40 µl des Überstandes photometrisch vermessen. Hierzu werden 700 µl Phosphat/NADPH-Lösung, 100 µl DTNB-Reagenz und 10-40 µl des Überstandes in eine Einmalküvette pipetiert und mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> auf 1000 µl aufgefüllt. Nun wird gemischt und anschließend 4 µl Glutathionreduktase-Lösung hinzupipetiert. Dann wird für 2 min, alle 30 s die Absorption bei 412 nm bestimmt und daraus eine Gerade berechnet. Aus der Steigung dieser Gerade kann man durch den Vergleich mit einer Kalibriergerade den Gesamt-GSH-Gehalt bestimmen. Die Kalibriergerade wird mit 5-60 µl einer frisch zubereiteten 0,1 mM GSH-Lösung erstellt.

#### 4.2.5.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Verwendet wird das gleiche Zellysate wie zur GSH-Bestimmung. (vgl. 4.2.5.2) Es werden 798  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  mit 2  $\mu\text{l}$  der Proteinprobe gemischt und dann mit 200  $\mu\text{l}$  Biorad-Farbstoffreagenz (enthält Coomassie-Brilliantblau) versetzt. Daraufhin wird die Probe für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Direkt im Anschluss wird sie spektralphotometrisch bei 595 nm vermessen. Es wird parallel eine Kalibriergerade mit einer BSA-Lösung im Konzentrationsbereich von 0 – 20  $\mu\text{g} / \text{ml}$  erstellt. Anhand dieser kann die Gesamtproteinmenge der Probe berechnet werden.

#### 4.2.6 Mutations-Assay mit transgenen Big Blue<sup>®</sup>-Mäusen

##### 4.2.6.1 Prinzip

Der Big Blue<sup>®</sup> Mutations-Assay ist eine, von der Firma Stratagene entwickelte, Methode zur Testung von spontanen und induzierten Mutationen *in vivo* in unterschiedlichen Organen der so genannten Big Blue<sup>®</sup> Mäuse (Kohler et al., 1990). Die Analyse von endogenen oder exogenen Einflüssen auf die Mutationsrate im gesamten Organismus hat den Vorteil, dass auch Faktoren wie Stress, Verteilung im Körper, Metabolismus von Substanzen oder DNA-Reparaturmechanismen berücksichtigt werden.

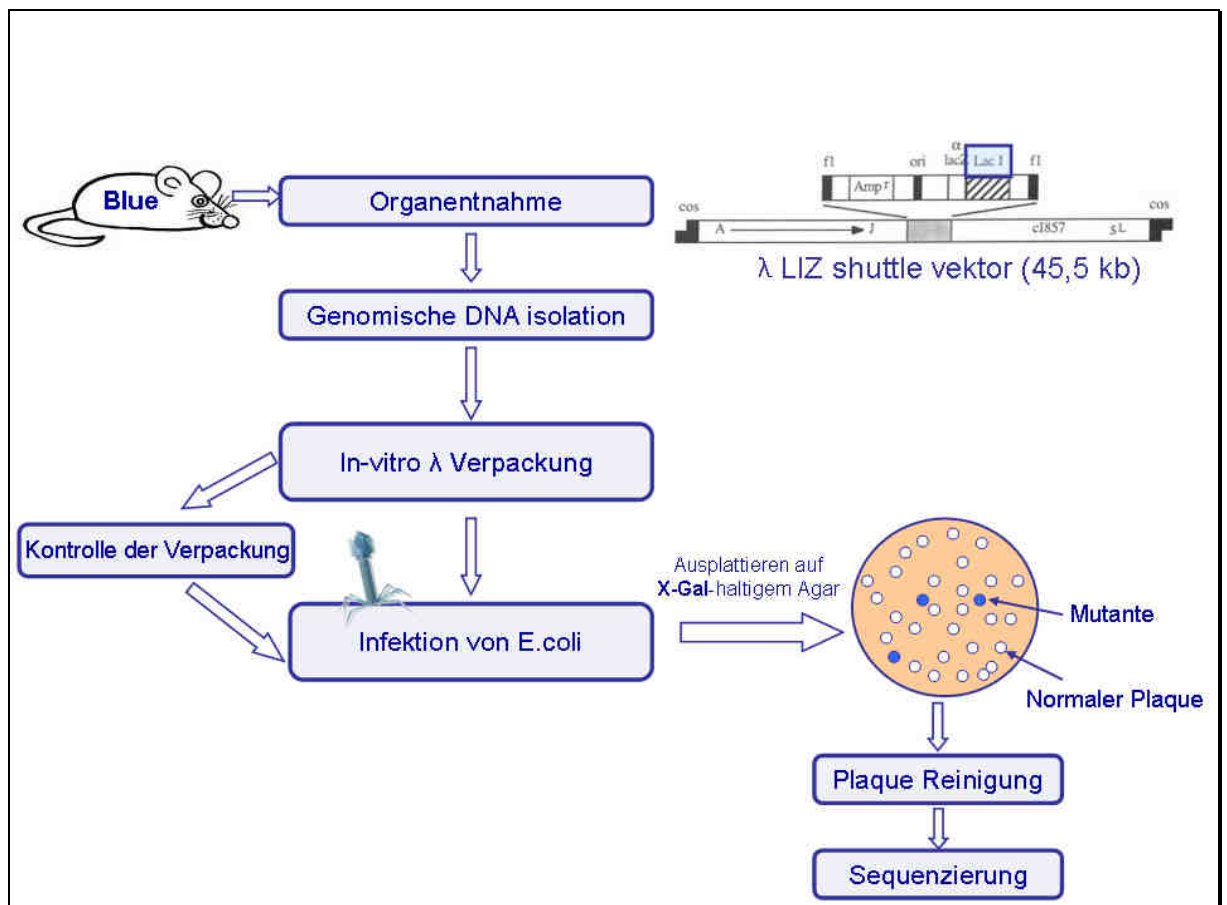
Der 45,5 kb lange Big Blue<sup>®</sup>  $\lambda$ LIZ Shuttle-Vektor (siehe **Abbildung 13**) ist die Basis für diese Testmethode. Er enthält die genetische Information für das bakterielle *lacI* Gen (im Folgenden als *lacI* bezeichnet) und den  $\alpha$ -Teil des bakteriellen *lacZ* Gens ( $\alpha$ /*lacZ*). Der Shuttle-Vektor ist als Transgen mit ungefähr 40 Kopien an einer einzigen Stelle in das Chromosom 4 des Mäusegenoms integriert. (Dycaico et al., 1994)

Das bakterielle, in der Maus nicht transkribierte, *lacI* Gen, welches für den Lac-Repressor codiert, ist hierbei das Targetgen für die Mutagenese. Das  $\alpha$ /*lacZ* Gen ist das Reporter-gen. Liegt der Lac-Repressor funktionsfähig vor, verhindert er in Bakterien die Transkription des  $\alpha$ /*lacZ* Gens. Kommt es allerdings zu einer Inaktivierung des Lac-Repressors durch Mutationen im *lacI* Gen, kann die Transkription des  $\alpha$ /*lacZ* Gens stattfinden und das Reporterprotein, der  $\alpha$ -Teil der



$\beta$ -Galaktosidase, wird gebildet. Bei der Fusion des  $\alpha$ - und des  $\beta$ -Teils der  $\beta$ -Galaktosidase in bestimmten Bakterienstämmen, kann auf X-Gal haltigem Agar eine Mutation sichtbar gemacht werden. Die funktionelle  $\beta$ -Galaktosidase wandelt das X-Gal zu einem blauen Indigofarbstoff um. Die Mutationsfrequenz kann durch das Verhältnis von blauen Plaques (Mutationen) zur Gesamtzahl der Plaques bestimmt werden. Durch Sequenzierung des 1080 bp langen *LacI*-Gens in den mutierten Plaques kann man zusätzlich das Mutationsspektrum bestimmen. Daraus können wertvolle Informationen zum Mechanismus der Schädigung gewonnen werden.

Die mehrstufige Versuchsdurchführung, wie in **Abbildung 13** schematisch dargestellt, wird im Folgenden näher beschrieben.



**Abbildung 13** Schematische Darstellung des Big Blue<sup>®</sup> Mutations Assays und des Shuttle Vektors

#### 4.2.6.2 Isolation genomischer DNA

Die DNA-Isolation aus den Mäuselebern wird mit dem RecoverEase™-DNA-Isolations Kit der Firma Stratagene durchgeführt.

Zuerst wird 5 ml eisgekühlter Lysepuffer I in einen sterilen *Wheaton Dounce* Gewebehomogenisator gegeben und 50-80 mg des bei -80 °C gelagerten Lebergewebes hinzugegeben. Durch zehnmaliges Auf- und Abbewegen mit dem groberen Pistill A, wird das Gewebe homogenisiert. Zur Freisetzung der Zellkerne aus dem Homogenisat wird der Arbeitsschritt achtmal mit dem engeren Pistill B wiederholt, es ist darauf zu achten, dass keine zu großen Scherkräfte durch eine Drehbewegung des Pistills ausgeübt werden. Um eventuell noch vorhandene Gewebeteile abzutrennen, wird die Suspension durch eine Zellsieb (Porengröße 100 µm) in ein steriles 50 ml Zentrifugen-Röhrchen gegeben. Gewebehomogenisator und Zellsieb werden anschließend mit 3 ml Lysepuffer gespült. Anschließend wird die Suspension für 12 min bei 1100 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig dekantiert, die restliche Flüssigkeit mit einem sterilen Tupfer entfernt und das Gefäß offen für 5 min getrocknet. Zur Lyse der Zellkerne werden pro Ansatz 70 µl der Lyselösung II gegeben und durch leichtes Schwenken das Pellet von der Wand abgelöst. Anschließend wird die Probe in ein auf 50 °C temperiertes Wasserbad gegeben und vorgewärmte 70 µl Proteinase K-Lösung zugesetzt. Das Röhrchen wird für 45 min bei 50 °C im Wasserbad inkubiert und ungefähr alle 10 min leicht geschwenkt. Nach der Inkubation wird die hoch viskose DNA mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze auf eine Dialysemembran überführt, die auf einem Liter sterilen TE-Puffer schwimmt. Nach 16-24 h mit sehr leichtem Rühren wird die vollständig hydratisierte DNA in ein Eppendorfgefäß überführt und kann entweder direkt weiterverwendet oder für bis zu vier Wochen bei 4 °C gelagert werden.

#### 4.2.6.3 Verpackung der DNA in $\lambda$ Phagen

Zur Gewinnung des  $\lambda$ LIZ Shuttle-Vektors aus der genomischen DNA und der anschließende Verpackung in  $\lambda$ -Phagen wird das Transpack<sup>®</sup> Packaging Extract der Firma Stratagene verwendet.

Zuerst wird eine SCS-8 Kultur durch Ausstreichen auf LB-Tetrazyklin-Agarplatten hergestellt. Am nächsten Tag wird zur weiteren Vorbereitung eine E. coli SCS-8 Flüssigkultur benötigt, welche später bei der Verpackung des  $\lambda$ LIZ Shuttle-Vektors notwendig wird. Dazu überführt man wenige Kolonien der SCS-8 Kultur (auf LB-Tetracyclin-Agarplatte) mit einer sterilen Impföse in ein 50 ml Inkubationsgefäß, welches 20 ml NZY broth Flüssigmedium und 250  $\mu$ l Maltose/MgSO<sub>4</sub>-Lösung enthält. Diese SCS-8 Flüssigkultur wird nun für 6 bis 8 h unter Schütteln (250 – 300 U/min) bei 37 °C inkubiert. Danach werden die Bakterien bei 1000 x g für 10 min pelletiert und in 10 ml MgSO<sub>4</sub> (10 mM) resuspendiert. Nach Vermessen der optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>), werden die Bakterien auf eine OD<sub>600</sub> von 3-5 mit sterilem MgSO<sub>4</sub> (10 mM) verdünnt. Diese so genannte SCS-8 Ausplattierungskultur wird auf Eis gelagert und am selben Tag verwendet. Die abzentrifugierten Bakterienpellets können bei 4 °C für einige Tage gelagert werden.

Für die eigentliche Verpackungsreaktion wird ein Röhrchen „Verpackungsmix Rot“ des Herstellers (Die Verpackungsmixe sind sehr temperaturempfindlich, deshalb müssen sie immer auf Trockeneis transportiert werden.) fast vollständig aufgetaut und mit 10  $\mu$ l der hochmolekularen genomischen DNA aus Kapitel 4.2.6.2 versetzt, eventuell kann mit einer Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert werden. Mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze werden die Lösungen durch Auf- und Abpipettieren gemischt und anschließend im Wasserbad für 90 min bei 30 °C inkubiert. Pro Tier werden 5 Parallelansätze durchgeführt. Dann wird zu jeder Probe 12  $\mu$ l „Verpackungsmix Blau“ gegeben, durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und die Probe für weitere 90 min bei 30 °C inkubiert. Danach werden die Proben mit 968  $\mu$ l sterilem SM-Puffer versetzt, für 10 s bei höchster Stufe mittels eines Vortexers gemischt und anschließend auf Eis gelagert. Wenn die so gewonnene verpackte DNA-Probe nicht am selben Tag weiterverarbeitet wird, kann sie durch Zugabe von 50  $\mu$ l Chloroform für eine Lagerung für mehrere Wochen bei 4 °C konserviert werden.

#### 4.2.6.4 Kontrolle der Verpackungsreaktion

Die Effizienz der Verpackungsreaktion muss überprüft werden, bevor die in Phagen verpackte DNA mit *E. coli* Bakterien für den endgültigen Versuch ausplattiert werden kann. Dazu werden 200 µl der SCS-8 Ausplattierungskultur aus Punkt 4.2.6.3 in ein steriles Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 1 µl der verpackten DNA-Probe versetzt, dies wird pro Probe zweimal durchgeführt. Diese Mischung wird für 15 min bei 37 °C inkubiert, damit sich die Phagen an die Bakterien adsorbieren können. Anschließend werden 4 ml geschmolzene BigBlue<sup>®</sup>-Topagarose zugegeben und die Mischung auf eine vorbereitete BigBlue<sup>®</sup>-Bottom-Agarplatte ausplattiert. Die Platten werden anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert und am nächsten Morgen die Anzahl der Plaque bildenden Einheiten (pfu = plaque forming units) bestimmt. Daraus lässt sich die Anzahl der pfu errechnen, die pro Verpackungsreaktion erhalten wurden. Idealerweise werden pro Reaktion bis zu 100000 pfu erhalten.

#### 4.2.6.5 Ausplattierung der verpackten DNA Proben

Typischerweise werden für einen Ausplattiervorgang 12 Screeningplatten (500 cm<sup>2</sup>) mit je 250 ml BigBlue<sup>®</sup>-Bottom-Agar benötigt. Die Platten werden mindestens 2 Tage vor der Verwendung hergestellt, bei RT gelagert und kurz vor dem Ausplattieren auf 37 °C temperiert. Es werden verwendet: 2 Verdünnungsplatten (V1 + V2) und 10 Platten zur Ausplattierung (A1–A10). Zur Zeit- und Kosteneinsparung können ohne Sensitivitätsverluste abweichend vom Herstellerprotokoll bis zu 30000 pfu pro Screeningplatte (Heinmoller et al., 2000) ausplattiert werden. Dazu wird aus den parallelen Verpackungsreaktionen (vgl. Punkt 4.2.6.3) das Volumen entnommen, das theoretisch 300000 pfu beinhaltet, mit 2 ml SCS-8 Ausplattierungskultur pro Screeningplatte aus Punkt 4.2.6.3 versetzt und für 15 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert, damit sich die Phagen an die Bakterien adsorbieren. In der Zwischenzeit werden für die Ansätze V1 + V2 jeweils 2 ml SCS-8 Ausplattierungskultur in ein steriles 50 ml Röhrchen gegeben. Ist die Inkubationszeit beendet, werden die Röhrchen aus dem Wasserbad entnommen und 2 x 25 µl davon in die, für die Verdünnungsplatten vorbereitete, Kultur gegeben. Der

Phagen/Bakterienmix wird nun auf die Röhrrchen A1–A10 gleichmäßig aufgeteilt. Zur Ausplattierung wird jedes Röhrrchen mit 35 ml X-Gal haltigem (1,5 mg/ml) 50 °C warmen BigBlue<sup>®</sup>-Topagar versetzt und jede Probe zügig auf eine Screeningplatte gegeben. Damit der Topagar aushärten kann, werden die Deckel im 45° Winkel aufgelegt und die Platten für 2 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend werden die Screeningplatten verschlossen und für 16 – 20 Stunden bei 37 °C inkubiert werden.

#### 4.2.6.6 Mutantenscreening

Die Mutanten sind als blaue *pfu* in verschiedenen Farbintensitäten zu erkennen. Auf den Platten V1 + V2 werden alle *pfu* ausgezählt. Daraus lässt sich die Anzahl der total ausplattierten *pfu* berechnen. Zur Zählung werden alle *pfu* auf den Platten sorgfältig von zwei Personen gesichtet. Auf den Platten A1–A10 werden alle blauen, d.h. „mutierten“ *pfu* identifiziert, mit einem sterilen Skalpell aus dem Agar herausgelöst und in 500 µl SM-Puffer überführt. Um Bakterienwachstum in diesen Ansätzen zu verhindern, wird in jedes Reaktionsgefäß 50 µl Chloroform gegeben und kurz mit einem Vortex-Gerät gemischt. Die Proben werden über Nacht bei 4 °C gelagert, damit die Phagen aus dem Agar diffundieren können.

Zur Berechnung der Mutationsfrequenz wird der Quotient aus der Anzahl der „mutierten“ *pfu* und der Anzahl der total ausplattierten *pfu* (aus den Verdünnungsplatten berechneten) gebildet.

Da die Screeningplatten sehr dicht bewachsen sind, ist es selten möglich Plaques rein herauszulösen. Um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen und die Mutation zu bestätigen, werden die Phagen aus den mutierten *pfu* analog zu 4.2.6.4 erneut verdünnt (SCS-8 Ausplattierungskultur mit OD<sub>600</sub> 2) ausplattiert und gepickt.

#### 4.2.6.7 Amplifizierung des *lacI*-Gens der Mutanten

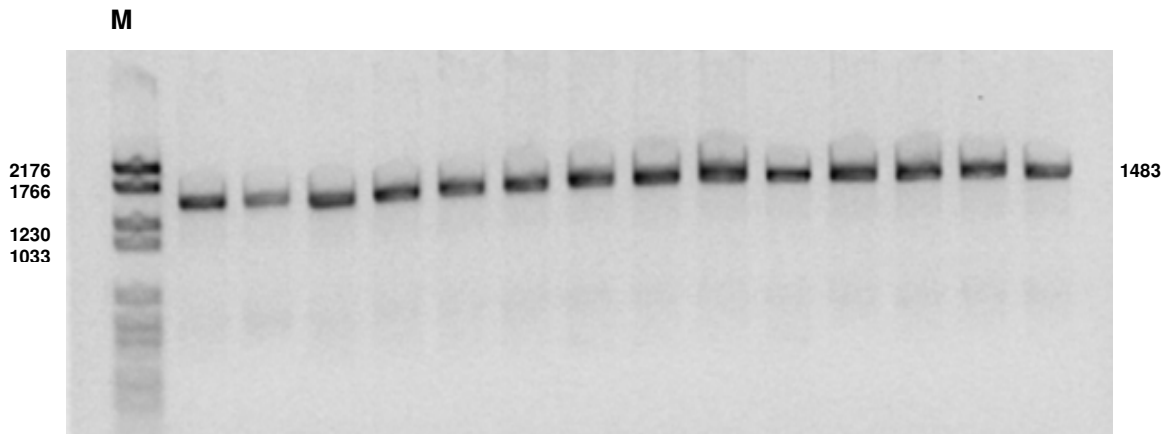
Zur Amplifikation der mutierten DNA-Sequenz mittels PCR werden die Phagen zuerst lysiert. Dazu wird eine Mischung aus 11 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>, 2,5 µl PCR-Puffer (10x), 1,5 µl Proteinase K-Lösung (1 mg/ml) und 10 µl Plaques hergestellt. Dieser Mix wird für 60 min bei 52 °C im Thermocycler und anschließend zur Inaktivierung der Proteinase K für 15 min bei 95 °C inkubiert.

Anschließend wird ein Mastermix hergestellt und eine PCR mit folgenden Bedingungen durchgeführt.

	[µl]	Programm		
		[°C]	[s]	
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	14,8	93	180	1x
10x PCR-Puffer	1,7	93	35	34x
dNTP-Mix 2,5 mM	2	54	35	
LacI Primer 1	2	72	120	
LacI Primer 12	2	72	600	1x
PfuTurbo Polymerase	0,5			
<b>Mastermix</b>	23			
lysierter Phage	2			
<b>Summe</b>	25			

**Tabelle 9 Mastermix-Zusammensetzung und PCR-Programm zur Amplifikation des kompletten *LacI* Gens**

Ein Teil des erhaltenen PCR-Produkts wird in einem Agarosegel auf seine Reinheit und Länge hin überprüft.



**Abbildung 14: PCR-Produkte verschiedener Mutanten.** Es wurde das komplette bakterielle *lacI*-Gen mittels PCR amplifiziert (1483 bp) und in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. M = DNA-Marker Roche VI.

Die Reste der PCR-Produkte werden anschließend mit einem GFX™ PCR DNA and Gel Purification Kit nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt, um überflüssige Primer und Nukleotide zu entfernen.

#### 4.2.6.8 Sequenzierung der Mutationen

Die Sequenzierung erfolgte durch die Sequenziereinheit des Center for Molecular Biology and Neuroscience, Rikshospitalet, Oslo, Norwegen.

Um die Sequenzierung vorzubereiten wird das gereinigte PCR-Produkt mit 8 verschiedenen, das komplette *LacI* Gen umspannenden, Primern vervielfältigt. Dazu wird eine Mischung aus 1 µl gereinigtes PCR-Produkt, 1 µl Primer (3,5 µM), 13 µl H<sub>2</sub>O und 5 µl Komplett-Sequenzier-Mix (enthält Primer, Polymerase und Puffer) hergestellt. Anschließend wird das PCR-Programm mit den Bedingungen wie in 4.2.6.7 gestartet. Danach wird das Produkt mit dem AB 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems) sequenziert. Das Zusammenfügen der überlappenden Sequenzen und der Vergleich mit dem bakteriellen *LacI*-Gen (Farabaugh, 1978) erfolgt mit den Open Source Programmen des Staden Package®.

## 4.2.7 Genexpressionsbestimmung mit quantitativer RT-PCR

### 4.2.7.1 Prinzip

Mit der quantitativen reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) lässt sich die Genexpression einer Zelle zum Zeitpunkt der jeweiligen RNA-Isolierung nachweisen. Zuerst wird die gesamte RNA isoliert und dann mit Hilfe einer Reversen Transkriptase (eine RNA-abhängige DNA-Polymerase) in cDNA umgeschrieben. Die so erhaltene cDNA kann als Vorlage in einer anschließenden qPCR, mit für verschiedene Gene spezifischen Primern, verwendet werden. Die quantitative RT-PCR (auch *real-time* PCR genannt) erlaubt eine quantitative Analyse der PCR in Echtzeit über die Messung von Fluoreszenzsignalen. Neben den Primern wird dem PCR-Ansatz auch ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff (SYBR-Green<sup>®</sup>) gegeben, welcher nur angeregt werden kann, wenn er in doppelsträngiger DNA gebunden ist.

Im Folgenden werden die Einzelschritte der Genexpressionsbestimmung näher beschrieben.

### 4.2.7.2 RNA Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgt mit dem Trizol<sup>®</sup> Reagenz, einem Phenol-Guanidiniumisothiocyanat-Gemisch, analog zu (Chomczynski und Sacchi, 1987). Diese Methode ist sehr gut zur Verwendung bei kleinen Gewebeproben (50-100 mg) geeignet. Da RNA im Gegensatz zu DNA sehr instabil ist und leicht von den stabilen RNAsen gespalten werden kann, ist vor dem Versuchsbeginn die Arbeitsfläche und alle Materialien sorgfältig mit Ethanol und DEPC-Wasser zu reinigen. Während der Durchführung müssen ständig Einmalhandschuhe getragen werden, welche in regelmäßigen Abständen gewechselt werden sollen.

Die verwendete Leberprobe wird schnell aufgetaut und mit einem Einmalskalpell in ein Stück von 50-100 mg geschnitten. Das Lebergewebe wird in ein mit 500 µl Trizol gefülltem 1,5 ml-Eppendorfcap gegeben und mit dem kleinen Gewebehomogenisator für 1,5 ml-Caps sorgfältig homogenisiert. Nach der Zugabe



von weiteren 500 µl Trizol wird mit der Pipette gemischt und anschließend für 5 min bei 4 °C und 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues 2,0 ml-Eppendorfcap überführt, 200 µl Chloroform zugegeben und gut durchmischt. Nach einer 2-5 minütigen Inkubationszeit, wird für 10 min bei 4 °C und 10000 g zentrifugiert. Das Gemisch trennt sich in 3 Phasen auf. Die RNA ist ausschließlich in der oberen wässrigen Phase gelöst. Genomische DNA ist in der organischen Phase bzw. in der Interphase und Proteine befinden sich auch in der organischen Phase. Die wässrige Phase wird in ein neues 1,5 ml-Eppendorfcap überführt und mit dem gleichen Volumen (0,5 ml) Isopropanol versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Präzipitieren wird dieses Gemisch 10 min bei 4 °C und 10000 g zentrifugiert. Eventuelle Salz- und Isopropanolreste werden durch waschen mit 75% Ethanol entfernt. Die RNA wird in Ethanol (75%) aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

#### 4.2.7.3 Kontrolle der RNA-Integrität

Die RNA-Qualität ist für die Präzision der mRNA-Genexpressionsanalyse von entscheidender Bedeutung (Fleige und Pfaffl, 2006), deshalb wird die RNA auf ihre Reinheit und Integrität hin überprüft.

Man kann die Reinheit der RNA photometrisch bestimmen, indem die Absorption bei 260 nm und 280 nm gemessen wird. Ist der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  kleiner als 1,8 so ist die Präparation mit Protein, genomischer DNA oder Phenol kontaminiert. In diesem Fall sollte die RNA erneut mit Ethanol gereinigt werden. Die RNA-Konzentration einer Probe kann mit der folgenden Formel berechnet werden.

$$RNA - \text{Konzentration} [ng / \mu l] = A_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40$$

#### Formel 4: Berechnung der RNA-Konzentration

Die Integrität der RNA-Präparation wird mit Hilfe eines denaturierenden Agarose-Gels überprüft. Die RNA-Lösung wird durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 10000 g) gefällt und in 100 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Von dieser Lösung werden 8 µl für das Agarose-Gel verwendet und der Rest mit  $\text{EtOH}_{\text{abs}}$  versetzt und wieder eingefroren. Die 8 µl werden mit dem gleichen Volumen RNA-Loading Dye versetzt und für 15 min bei 65-70 °C im Wasserbad inkubiert.

Für ein Gel wird 1 g Agarose in 10 ml MOPS-Puffer (10x) und 72 ml H<sub>2</sub>O gegeben und in der Mikrowelle vollständig gelöst. Das verdampfte Wasser wird ergänzt und unter dem Abzug 18 g Formaldehyd (36%) hinzugefügt. Nachdem Abkühlen wird das Gel in eine mit DEPC-Wasser gereinigte Gelkammer gegossen, gehärtet und mit 1x MOPS-Puffer überschichtet.

Das Gel wird für 35 min bei 120 V laufen gelassen und anschließend in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg / ml) geschüttelt. Danach wird auf einem UV-Tisch ein Bild gemacht und die Qualität visuell kontrolliert.

#### 4.2.7.4 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription wird mit dem RevertAid First Strand cDNA Kit<sup>®</sup> (Fermentas) durchgeführt. Die gelöste RNA wird abzentrifugiert und in DEPC-Wasser gelöst um eine Konzentration von 1 µg/µl zu erhalten. Es wird anschließend folgender Mix pro Reaktion hergestellt:

RNA	2 µl
Random Hexamer Primer	1 µl
DEPC-Wasser	9 µl
Gesamt	12 µl

Dieser Mix wird im Heizblock für 5 min bei 70 °C und darauf folgend bei 0 °C inkubiert. Danach werden weitere Komponenten hinzugefügt.

Reaktionspuffer (5x)	4 µl
Ribolock RNAse Inhibitor (200 U/µl)	1 µl
dNTP (10 mM)	2 µl
Gesamt	19 µl

Es wird vorsichtig gemischt und für 10 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wird 1 µl Reverse Transkriptase hinzugefügt, parallel werden immer auch Ansätze ohne das Enzym (noRT-Kontrolle) angefertigt. Es wird für 60 min bei 42 °C inkubiert und die Reaktion durch Temperaturerhöhung auf 70 °C (10 min) gestoppt. Die so erhaltene cDNA wird mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> verdünnt und kann bei -20 °C gelagert werden.

#### 4.2.7.5 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR)

Zur Durchführung der quantitativen Real-time PCR wird folgender Mastermix an der Sterilbank hergestellt.

H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	2,44 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,36 µl
Primer Forward (2 µM)	3 µl
Primer Reverse (2 µM)	3 µl
SYBR-Green <sup>PLUS</sup> Mix (10x)	1,2 µl
Mastermix	10 µl
+ cDNA	2 µl
Gesamtvolumen	12 µl

Zu beachten ist, dass SYBR-Green als fluoreszierender Farbstoff lichtempfindlich ist.

Dieser Mix wird auf die Kapillaren verteilt, die cDNA bzw. die noRT-Kontrollen zugegeben und zur Durchmischung abzentrifugiert (30 s bei maximal 100 g).

Dann wird der LightCycler beladen und die qPCR mit folgenden Bedingungen gestartet.

1x	95 °C	600 s
28-32x	95 °C	10 s
	65 °C	10 s
	72 C	Elongation
	T <sub>acq</sub>	5 s
1x	95 °C bis 65 °C in	60 s
	40 °C	Pause

Die optimale Temperatur, bei der die Fluoreszenz gemessen wird (T<sub>acq</sub>), ist für jedes Primerpaar individuell einzustellen. In der folgenden Tabelle sind die T<sub>acq</sub> und die Elongations-Zeit der einzelnen Primerpaare aufgeführt.

	<b>T<sub>acq</sub></b> <b>[°C]</b>	<b>Elongation</b> <b>[s]</b>
GAPDH89	84	20
GAPDH242	83	25
ACTb	85	20
18S	82	20
36B4	84	20
SOD1	80	20
SOD2	80	20
SOD3	82	20
HO1	81	20
GPX1	82	20
CAT	84	22
NRF2	81	20
SIRT1	80	25

**Tabelle 10: Bedingungen der qRT-PCR**

Nach erfolgter qRT-PCR wird das pro Primerpaar erhaltene Produkt noch in einem 1,2%igen Agarose-Gel (siehe 4.2.2.1) auf seine Länge und Spezifität hin kontrolliert.

#### **4.2.7.6 Auswertung**

Die Menge an genspezifischer cDNA wird anhand eines internen Standards, welcher in jeder Reaktion in verschiedenen Verdünnungen mitläuft, von der LightCycler<sup>®</sup> Software quantifiziert. Diese Menge wird auf den jeweiligen Wert des Referenzgens (GAPDH) einer Probe normiert. Es wird aus den unterschiedlichen Mäusen diese relativen Werte gebildet und diese pro Tier auf den Mittelwert der Kontrollen bezogen. Dadurch erhält man den Unterschied der Genexpression (x-fach) zwischen Kontrolle und Resveratrol-Behandlung.

#### 4.2.8 Statistik

Die statistischen Auswertungen in dieser Arbeit wurden mit der Software GraphPad Prism 5.0<sup>®</sup> berechnet.

Zum Vergleich zwischen zwei Mittelwerten wurde der Student's T-Test durchgeführt. Die Analyse erfolgte jeweils mit einem ungepaarten, zweiseitigen Test, mit einer Welch-Korrektur für die Annahme von ungleichen Varianzen. Für den Vergleich von mehreren Faktoren / Gruppen wurde der zwei-faktorielle ANOVA-Test angewendet.

Die statistischen Auswertungen der Mutationsfrequenzen wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests durchgeführt, wobei eine Normalverteilung zwischen den Genotypen bzw. Behandlungsgruppen angenommen wird.

Es wurden folgende Stufen der Signifikanz verwendet:

- (\*)  $p < 0,05$  statistisch signifikant
- (\*\*)  $p < 0,01$  statistisch sehr signifikant
- (\*\*\*)  $p < 0,001$  statistisch hoch signifikant

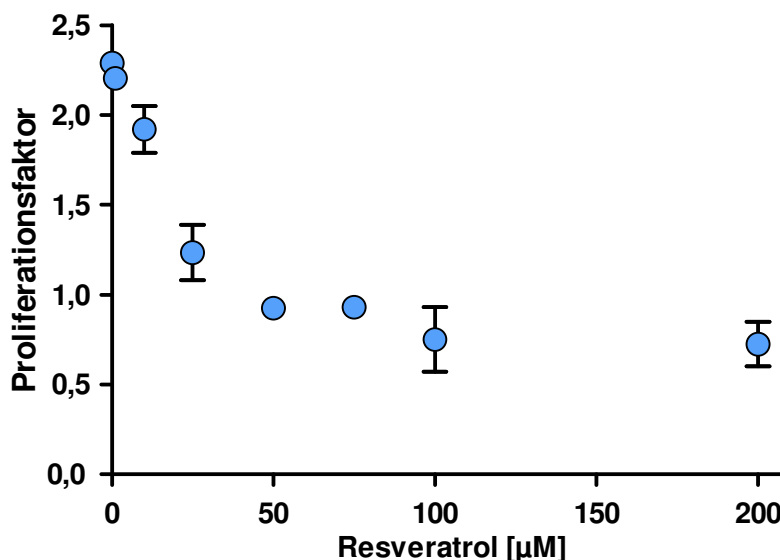
## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Zelluläre und *in vitro* Effekte von Resveratrol

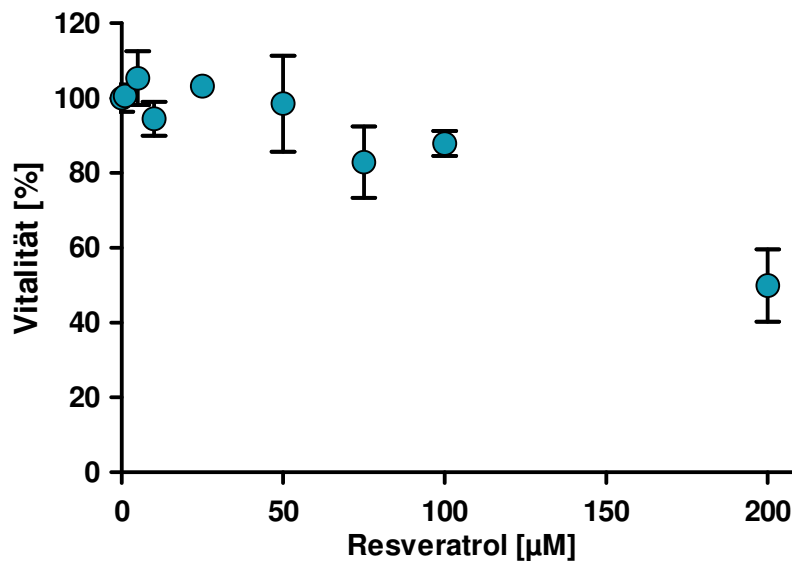
Mit den nachfolgend beschriebenen Experimenten in kultivierten Mausembryofibroblasten (MEFs) sollten zunächst in Zellkultur einige Wirkungen von Resveratrol (siehe Kapitel 2.6) untersucht werden, die einen Einfluss auf die Spiegel an oxidativen DNA-Schäden zur Folge haben könnten.

#### 5.1.1 Toxizität von Resveratrol in Wildtyp-Mausembryofibroblasten

In Vorbereitung auf die folgenden Reparatur-Versuche sollte zuerst der Konzentrationsbereich gefunden werden, in dem Resveratrol noch nicht zytotoxisch ist. Dazu wurde die Toxizität von Resveratrol in Wildtyp-MEFs (F11.1) mit dem Proliferationstest (siehe 4.2.1.3) und dem WST-1-Toxizitäts-Assay (siehe 4.2.1.4) überprüft. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 15** und **Abbildung 16** dargestellt.



**Abbildung 15: Proliferation von Wildtyp-Mausembryofibroblasten nach Resveratrol.** Die Zellen (F11.1) wurden 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen Resveratrol inkubiert und danach der Proliferationsfaktor bestimmt (siehe 4.2.1.3).  $n = 2$ . Mittelwerte  $\pm$ SD.



**Abbildung 16: Toxizität von Resveratrol in Wildtyp-Mausembryofibroblasten.** Die Zellen (F11.1) wurden 4h mit unterschiedlichen Resveratrol-Konzentrationen inkubiert und danach die Toxizität im WST1-Test überprüft (siehe 4.2.1.4). n = 2-6. Mittelwerte  $\pm$ SD.

Man erkennt in **Abbildung 15**, dass die Proliferation schon ab einer Konzentration von 25  $\mu$ M Resveratrol im Kulturmedium zurückgeht und ab 50  $\mu$ M komplett stoppt. Bei der Toxizität (**Abbildung 16**) ist ein starker Abfall der Vitalität erst ab einer Konzentration von 200  $\mu$ M zu erkennen, dieser Unterschied könnte an den unterschiedlichen Inkubationszeiten (24h bzw. 4h) liegen. Resveratrol hat nur in Konzentrationen von ungefähr 10  $\mu$ M sicher keinen Einfluss auf die Proliferation bzw. Vitalität der Zellen.

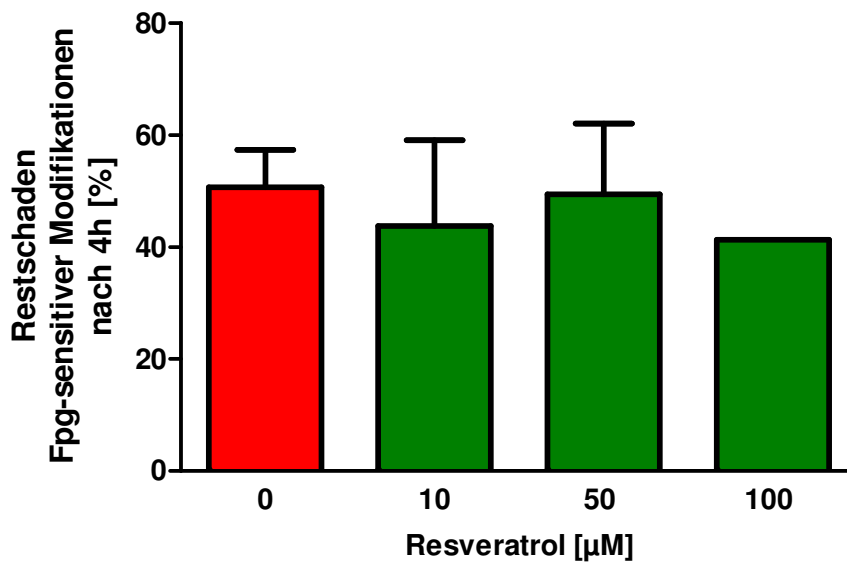
Für die Messung der Reparatur oxidativer DNA-Schäden können aufgrund dieser Ergebnisse Resveratrol-Konzentrationen bis ungefähr 100  $\mu$ M problemlos eingesetzt werden.

### 5.1.2 Einfluss von Resveratrol auf die Reparatur oxidativer DNA-Schäden in Zellen

Der Einfluss von Resveratrol auf die zelluläre Reparatur von 8-oxoG, einer der wichtigsten oxidativen DNA-Basenmodifikationen, ist bisher noch nicht bekannt. Denkbar ist eine Verschlechterung der Reparaturkapazität durch eine mögliche Kompaktierung der Chromatinstruktur, die durch die Stimulation von Histondeacetylasen (Howitz et al., 2003) erwartet werden kann. Eine Beeinflussung der Reparatur durch die ebenfalls gut belegten antioxidativen Eigenschaften von Resveratrol ist auch möglich. Die BER hat sich als sehr empfindlich gegenüber oxidativem Stress gezeigt (Eiberger et al., 2008) und einige Schlüsselenzyme dieses Reparaturweges, wie APE1 und OGG1, hängen sehr stark vom Redoxstatus der Zelle ab (Bravard et al., 2006; Mitra et al., 2007).

Um diese Fragestellung zu adressieren, wurden MEFs mit dem Photosensibilisator Ro19-8022 plus sichtbares Licht geschädigt (siehe 4.2.3.6) und während der Reparaturzeit (4h) dem Kulturmedium Resveratrol in nicht zytotoxischen Konzentrationen zugesetzt. Die DNA-Schäden wurden mit Hilfe der Alkalischen Elution quantifiziert (siehe 4.2.3). Als Sonde wurde dabei die bakterielle Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase (Fpg) verwendet, da dieses Enzym oxidative DNA-Schäden (u.a. 8-oxoG) erkennt und die DNA einschneidet (siehe 2.5.2 und **Tabelle 7**).



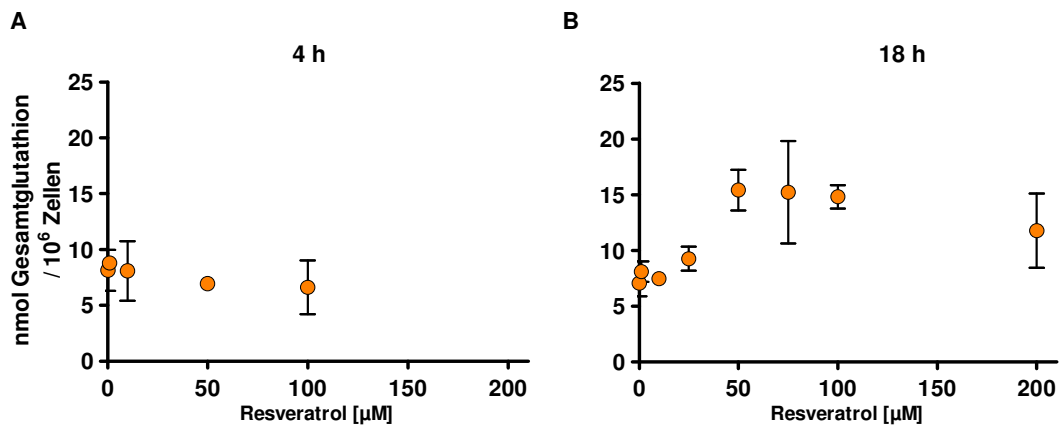


**Abbildung 17: Reparatur Fpg-sensitiver Modifikationen in Anwesenheit von Resveratrol.** Die DNA-Schäden wurden induziert durch 50 nm Ro19-8022 und die Bestrahlung mit sichtbarem Licht (10 min, 166 KJ/m<sup>2</sup>, 0°C). Resveratrol wurde in den angegebenen Konzentrationen für die Reparaturzeit (4h) zugegeben. Die DMSO-Endkonzentration war jeweils 0,1% im Medium. n = 1-8, Mittelwerte ±SD.

Man kann in **Abbildung 17** sehen, dass die Reparatur Fpg-sensitiver Modifikationen, welche hauptsächlich 8-oxoG darstellen, durch die direkte Anwesenheit von Resveratrol während der Reparaturzeit (4 h) nicht beeinflusst wird. Der durch die angewendete Schädigung induzierte Schaden lag bei ca. 0,45 Fpg-sensitiven Modifikationen / 10<sup>6</sup> bp. Aufgrund der Zytotoxizität von Resveratrol (siehe 5.1.1) erschien es nicht sinnvoll, höhere Dosen zu wählen.

### 5.1.3 Einfluss von Resveratrol auf die Glutathion-Spiegel in MEFs

Ein möglicher Einfluss von Resveratrol auf Spiegel von Glutathion (GSH) in MEFs sollte nach einer Inkubation für 4 h bzw. 18 h im Zellkulturmedium untersucht werden. Die Gesamt-GSH-Spiegel wurden mit der Methode nach Griffith (Griffith, 1985) gemessen (siehe 4.2.5).

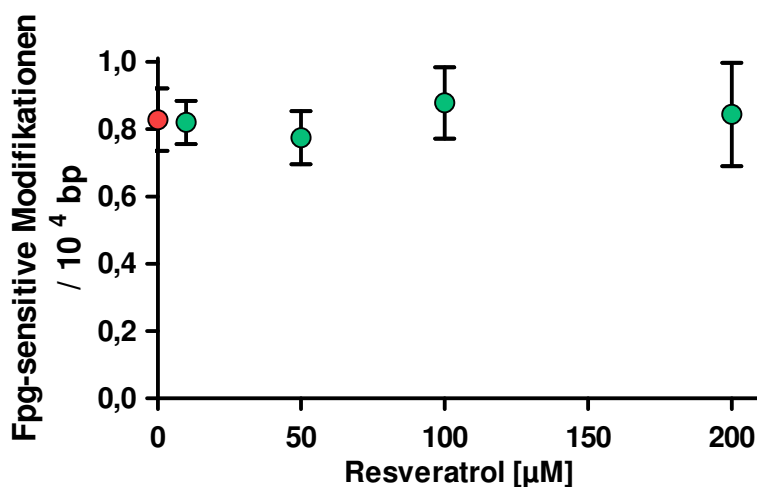


**Abbildung 18: Gesamtglutathiongehalt in Wildtyp-MEFs nach Inkubation mit Resveratrol.** Die Zellen (F11.1) wurden für 4 h (A) oder für 18 h (B) mit unterschiedlichen Konzentrationen Resveratrol inkubiert und danach der Glutathiongehalt (siehe 4.2.5) bestimmt.  $n = 2 - 4$ . Mittelwerte  $\pm$ SD.

Es ist in **Abbildung 18** zu erkennen, dass Resveratrol bis zu einer Konzentration von 100  $\mu$ M die Gesamt-GSH-Spiegel pro Zelle nach 4 h nicht beeinflusst. Die Spiegel von GSH werden aber durch eine Inkubation für 18 h mit Konzentrationen ab 50  $\mu$ M Resveratrol stark erhöht (ca. 2,5 fach). Dies könnte durch eine verstärkte Neusynthese von Glutathion erklärt werden oder durch einen möglichen Zellzyklusarrest, da Zellen dadurch durchschnittlich größer sind und dementsprechend auch mehr Glutathion enthalten.

#### 5.1.4 Beeinflussung der Erkennung oxidativer Basenmodifikationen in PM2-DNA von Fpg und OGG1 durch Resveratrol

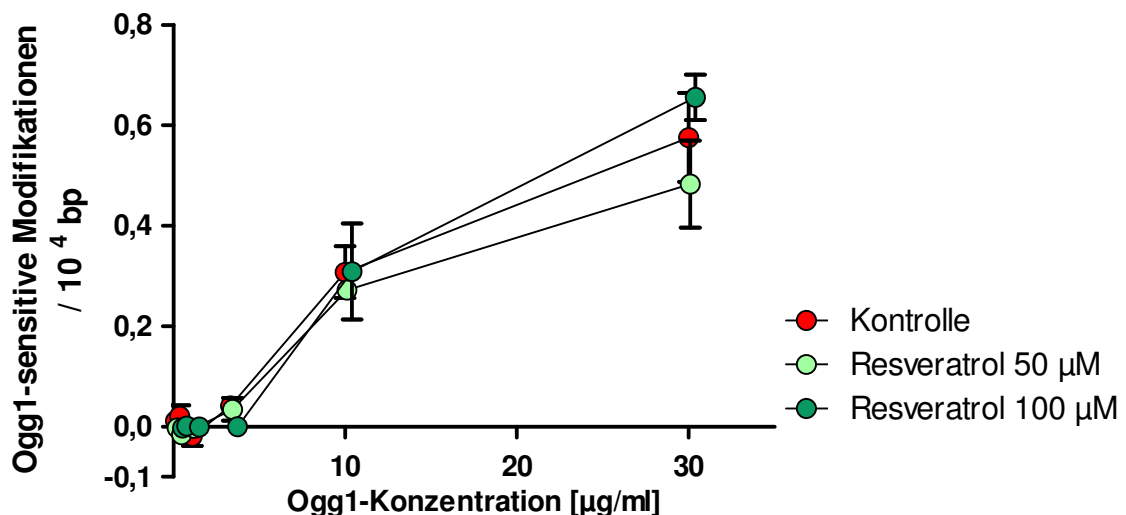
Die Reparatur in Zellen wird, wie in Kapitel 5.1.2 gezeigt wurde, durch die Anwesenheit von Resveratrol nicht beeinflusst (siehe **Abbildung 17**). Es sollte nun ergänzend untersucht werden, ob Resveratrol *in vitro* die Erkennung oder das Einschneiden von Basenmodifikationen durch die Reparaturenendonukleasen beeinflusst. Dazu wurde gereinigte DNA des Bakteriophagen PM2 mit Ro19-8022 und sichtbarem Licht geschädigt (siehe 4.2.4) und danach mit dem bakteriellen Fpg-Protein (für das Erkennungsspektrum siehe **Tabelle 7**) in Anwesenheit von mehreren Konzentrationen Resveratrol inkubiert. Anschließend werden die unterschiedlichen Konformationen der PM2-DNA in einem Agarose-Gel aufgetrennt und quantifiziert (siehe 4.2.4).



**Abbildung 19: Einfluss von Resveratrol auf die Erkennung von Fpg-sensitive Modifikationen in PM2-DNA.** Die DNA-Schäden wurden mit dem PM2-Relaxationsassay quantifiziert. Die PM2-DNA wurde mit Ro19-8022 + sichtbares Licht (0,5 µM, 20 min, 0°C, 1000W, 47 cm Abstand) geschädigt, während der Erkennung der DNA-Modifikationen durch Fpg (1 µg/ml) war Resveratrol in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Als Lösungsmittelkontrolle wurde 0,2% DMSO verwendet. n = 3. Mittelwerte ±SD.

In **Abbildung 19** kann man sehen, dass in der Anwesenheit von Konzentrationen bis zu 200 µM Resveratrol die Erkennung von oxidativen Basenmodifikationen durch das Enzym Fpg nicht beeinflusst wird.

OGG1 ist das menschliche, homologe Enzym zu Fpg aus *E. coli*. Es sollte untersucht werden, ob durch Resveratrol eventuell die Erkennung von oxidativen Modifikationen durch OGG1 beeinflusst wird. Hierfür wurden 2 verschiedene Resveratrol-Konzentrationen (50 u. 100  $\mu\text{M}$ ) bei unterschiedlichen OGG1-Konzentrationen getestet.



**Abbildung 20: Einfluss von Resveratrol auf die Erkennung von OGG1-sensitive Modifikationen in PM2-DNA.** Die DNA-Schäden wurden mit dem PM2-Relaxationsassay in Abhängigkeit von der Enzymkonzentration quantifiziert. Die PM2-DNA wurde mit RO19-8022 (0,5  $\mu\text{M}$ , 20 min, 0°C, 1000W, 47 cm Abstand) geschädigt, während der Erkennung der DNA-Modifikationen durch OGG1 war Resveratrol in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt. Als Lösungsmittelkontrolle diente 0,2% DMSO.  $n = 2-4$ . Mittelwerte  $\pm$ SD. Zur besseren Übersichtlichkeit sind die Datenpunkte bei den einzelnen OGG1-Konzentrationen um 0,4 X-Einheiten verschoben.

Es ist in **Abbildung 20** klar zu erkennen, dass Resveratrol in den verwendeten Konzentrationen keinen Einfluss auf die Erkennung oder das Einschneiden der Basenmodifikationen durch das humane OGG1 hat. Die OGG1-Konzentration ist noch nicht in einem Sättigungsbereich.

Die Ergebnisse in **Abbildung 19** und **Abbildung 20** zeigen weiterhin, dass durch eine Inkubation mit Resveratrol keine zusätzlichen OGG1- bzw. Fpg-sensitiven Basenmodifikationen in nackter PM2-DNA generiert werden.

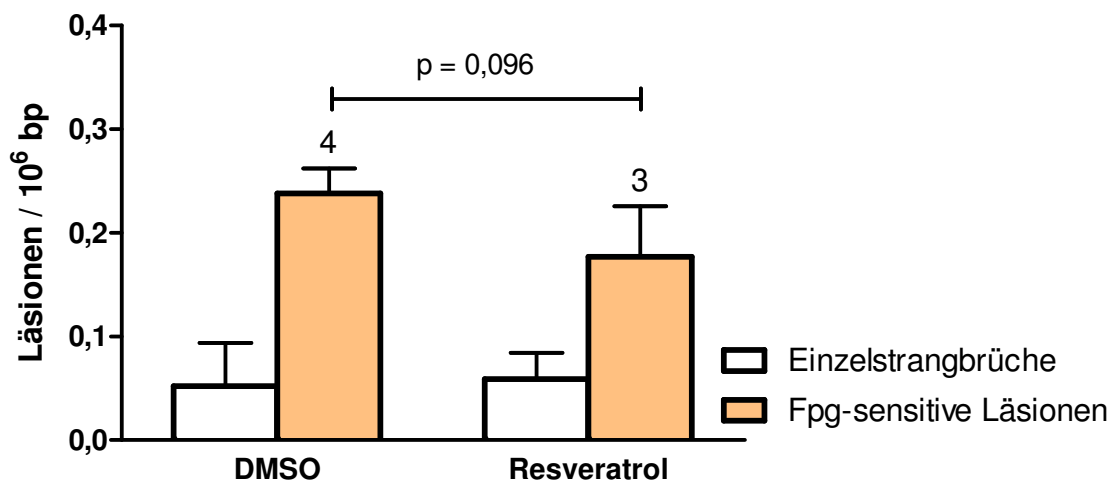
## 5.2 Effekte einer Kurzzeit-Behandlung von Mäusen mit Resveratrol

### 5.2.1 Beeinflussung der basalen Spiegel oxidativer DNA-Basenmodifikationen und Einzelstrangbrüchen durch eine Kurzzeit-Behandlung mit Resveratrol

Trotz der vielfach belegten antioxidativen Eigenschaften von Resveratrol, ist bisher noch unbekannt, wie sich eine Gabe von Resveratrol *in vivo* auf endogene DNA-Schäden auswirkt. In den nachfolgenden Versuchen sollte nun untersucht werden, wie sich die basalen Spiegel (Steady-State) an oxidativen DNA-Basenmodifikationen in den Lebern von Mäusen, durch eine kurzzeitige, orale Gabe von Resveratrol modulieren lassen.

Hierzu wurde Mäusen mit verschiedenen Genotypen 7 Tage lang einmal am Tag Resveratrol mit einer Konzentration von 100 mg/kg Körpergewicht per Schlundsondierung (Gavage) verabreicht. Den jeweiligen Kontrolltieren wurde die gleiche Menge Lösungsmittel (DMSO) als Vehikelkontrolle appliziert. Die Behandlung wurde von allen Tieren gut vertragen, es gab keine Anzeichen für toxische Effekte. Die primären Hepatozyten wurden am Tag nach der letzten Behandlung isoliert (siehe 4.2.2.3) und anschließend die Steady-State-Spiegel der oxidativen DNA-Basenmodifikationen und Einzelstrangbrüche mit der Alkalischen Elution analysiert (siehe 4.2.3).

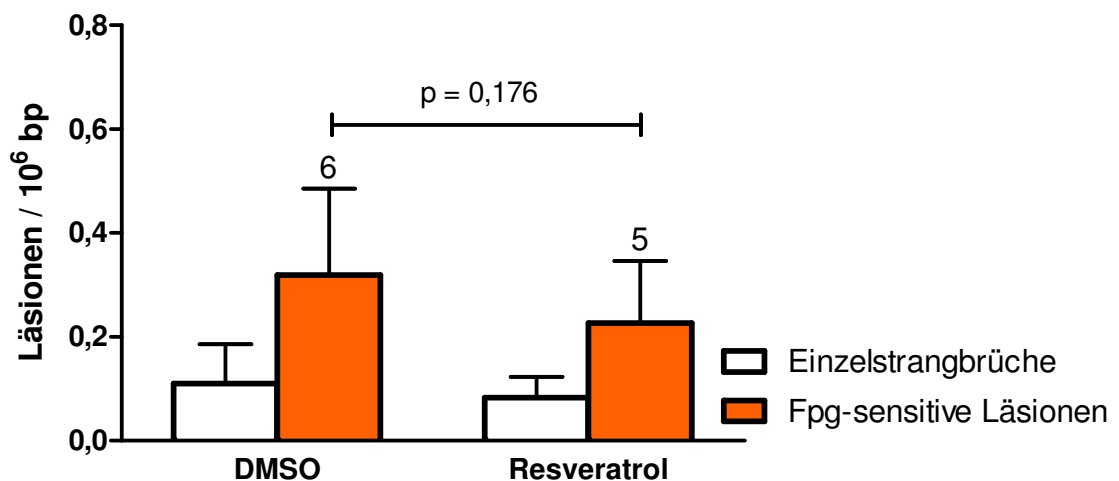
In **Abbildung 21** sind die Werte für die Wildtyp-Tiere dargestellt.



**Abbildung 21 DNA-Schäden in primären Hepatozyten von Wildtyp-Mäusen nach einer Kurzzeit-Behandlung mit Resveratrol:** Die Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitiven Basenmodifikationen wurden mit Hilfe der Alkalischen Elution quantifiziert. Die Behandlung erfolgte 1x täglich für 7 Tage mit 100 mg/kg Körpergewicht Resveratrol bzw. DMSO als Kontrolle per Gavage. Die Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der Mäuse der jeweiligen Gruppe an. Alter der Tiere: 7-8 Monate. Mittelwerte  $\pm$  SD. Die statistische Signifikanz (p-Wert) eines zweiseitigen T-Tests mit Welch-Korrektur ist angegeben.

Die Spiegel der Fpg-sensitiven Läsionen in den mit Resveratrol behandelten Wildtyp Mäusen sind tendenziell niedriger ( $p = 0,096$ ), als in den Kontrollen. Die Zahl der Einzelstrangbrüche in den frisch isolierten Hepatozyten bleibt unverändert.

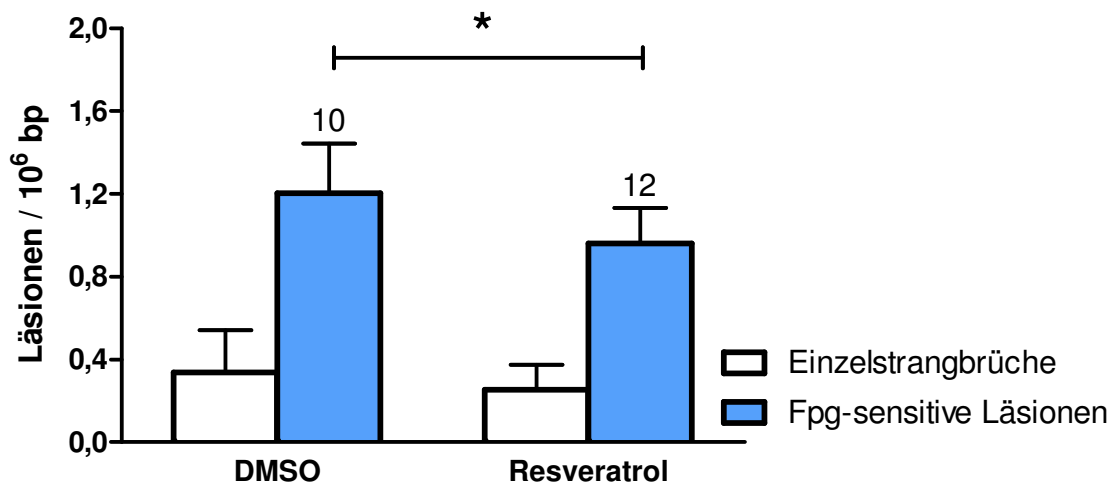
Um diesen Effekt auf die endogenen oxidativen Purinmodifikationen zu bestätigen, wurden für weitere Versuche Mäuse verwendet, bei denen das Gen für das Apolipoprotein E (APOE) ausgeschaltet ist. APOE spielt eine Rolle bei der Verstoffwechslung von Lipoproteinbestandteilen speziell an der Leber und ist nicht an der DNA-Reparatur oder an den antioxidativen Schutzmechanismen der Zelle beteiligt, trotzdem wurde in diesen Mäusen schon leicht erhöhte Spiegel oxidativer DNA-Schäden in Lebern bestimmt (Folkmann et al., 2007).



**Abbildung 22 DNA-Schäden in primären Hepatozyten von *Apoe*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach einer Kurzzeit-Behandlung mit Resveratrol:** Die Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitiven Basenmodifikationen wurden mit Hilfe der Alkalischen Elution quantifiziert. Die Behandlung erfolgte 1x täglich für 7 Tage mit 100 mg/kg Körpergewicht Resveratrol bzw. DMSO als Kontrolle per Gavage. Die Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der Mäuse der jeweiligen Gruppe an. Alter der Tiere: 4-8 Monate. Mittelwerte  $\pm$  SD. Die statistische Signifikanz (p-Wert) eines zweiseitigen T-Tests mit Welch-Korrektur ist angegeben.

Bei den *Apoe*<sup>-/-</sup>-Mäusen ist, wie bei den Wildtyp-Mäusen, eine leichte, statistisch nicht signifikante Reduktion der Fpg-sensitiven Modifikationen nach der Resveratrol-Behandlung zu erkennen. In *Apoe*<sup>-/-</sup> Mäusen sind die Steady-State-Spiegel der Kontrolltiere im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen nicht wesentlich verändert. In beiden Genotypen (Wildtyp u. *Apoe*<sup>-/-</sup>) sind die basalen Spiegel an oxidativen Basenmodifikationen sehr niedrig, deshalb erschien es sinnvoll, die DNA-Schäden zusätzlich in den reparaturdefizienten *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup> Mäusen zu bestimmen, welche erhöhte endogene Fpg-sensitive Modifikationen in der Leber und anderen Organen haben. (Osterod et al., 2002) Die Sensitivität bei der Bestimmung eines Einflusses von Resveratrol wird dadurch verbessert.

Die Mittelwerte der Messungen sind in **Abbildung 23** dargestellt. Die basalen Spiegel in den reparaturdefizienten Tieren sind etwa vierfach höher als in den Wildtyp-Tieren, dies ist im Einklang mit früheren Ergebnissen (Osterod et al., 2002; Trapp et al., 2007b).



**Abbildung 23 DNA-Schäden in primären Hepatozyten von *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen nach einer Kurzzeit-Behandlung mit Resveratrol:** Die Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitiven Basenmodifikationen wurden mit Hilfe der schnellen Alkalischen Elution quantifiziert. Die Behandlung erfolgte 1x täglich für 7 Tage mit 100 mg/kg Körpergewicht Resveratrol bzw. DMSO als Kontrolle per Gavage. Die Zahlen über den Balken zeigen die Anzahl der Mäuse der jeweiligen Gruppe an. Alter der Tiere: 18 Monate. Mittelwerte  $\pm$  SD. Die statistische Signifikanz (\*  $p < 0,05$ ) eines zweiseitigen T-Tests mit Welch-Korrektur ist angegeben.

Man kann als Folge der Resveratrol-Behandlung eine statistisch signifikante ( $p < 0,05$ ) Reduktion der basalen Spiegel oxidativer Basenmodifikationen erkennen. Weibliche und männliche Mäuse sind in **Abbildung 21**, **Abbildung 22** und **Abbildung 23** jeweils zusammen aufgetragen, da kein Unterschied in den basalen Spiegeln oxidativer DNA Schäden bezüglich des Geschlechts zu erkennen ist (Daten nicht gezeigt).

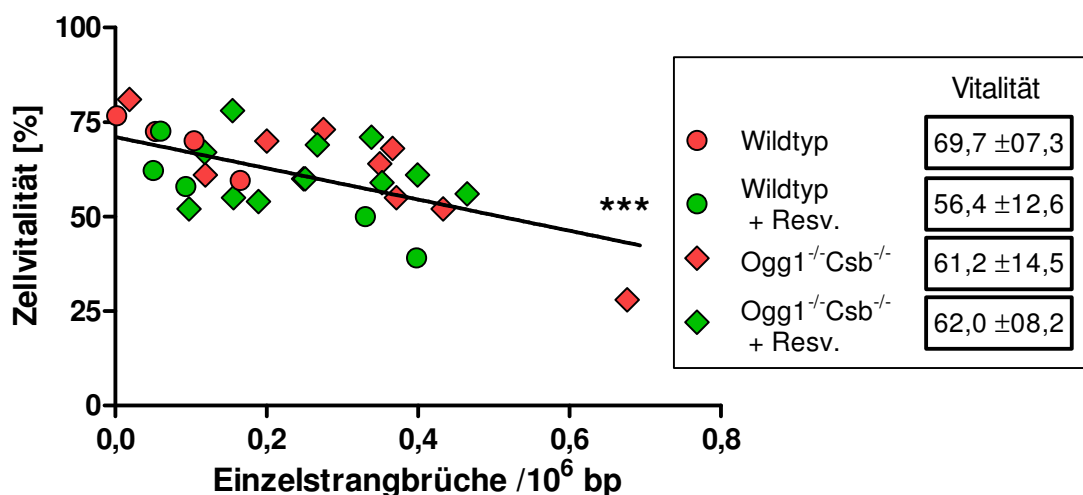
Ein protektiver Einfluss von einer Kurzzeit-Behandlung mit Resveratrol kann in allen verwendeten Genotypen gesehen werden. Dies zeigt, dass der Schutzmechanismus nicht auf einer Beeinflussung der OGG1 und CSB abhängigen Schadenserkennung beruht.



## 5.2.2 Korrelation der Zellvitalität der primären Hepatozyten mit den gemessenen DNA-Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Modifikationen

Ein Unterschied in den gemessenen DNA-Einzelstrangbrüchen (SSB) nach Resveratrol ist nicht zu erkennen. (siehe 5.2.1) Es konnte aber ein weiterer Parameter identifiziert werden, welcher großen Einfluss auf die SSB hat, nämlich die Vitalität der Hepatozyten nach der Isolation.

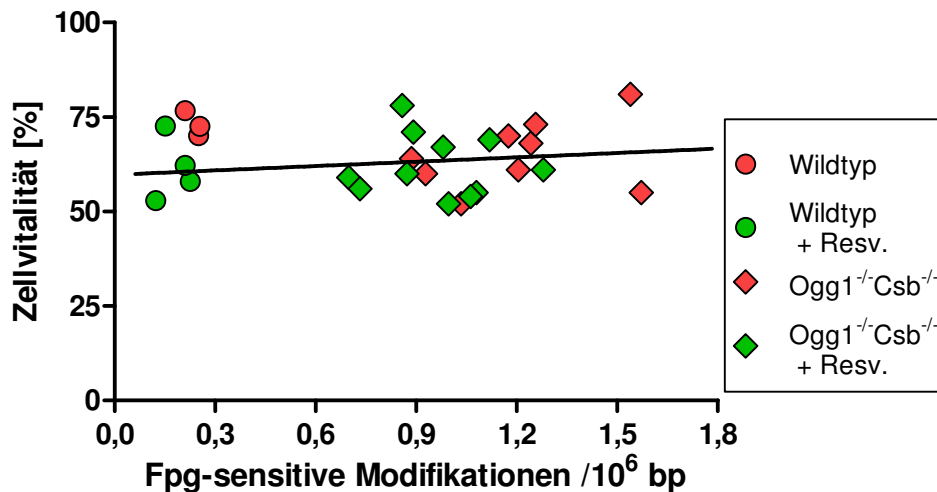
In **Abbildung 24** ist zu erkennen, dass wenn die Vitalität (bestimmt mit Trypanblau-Ausschluss siehe 4.2.2.5) sinkt, die SSB ansteigen.



**Abbildung 24: DNA-Einzelstrangbrüche in Abhängigkeit von der Zellvitalität primärer Hepatozyten in verschiedenen Maus-Genotypen mit und ohne Resveratrol-Behandlung.** Die Einzelstrangbrüche wurden mit Hilfe der Alkalischen Elution quantifiziert und die Zellvitalität mit Trypan-Ausschluss bestimmt. Die Behandlung mit Resveratrol erfolgte 1x täglich für 7 Tage mit 100 mg/kg Körpergewicht bzw. DMSO als Kontrolle per Gavage. Jeder Datenpunkt entspricht einer Maus. Alter der Tiere: Wildtyp: 8 Mon., *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*: 18 Mon. Die Lineare Regression und deren statistische Signifikanz ( $p < 0,001$ ) sind für alle Tiere zusammen eingezeichnet. Die durchschnittliche Vitalität  $\pm$ SD ist bei den jeweiligen Gruppen angegeben.

Die Abhängigkeit der SSB von der Vitalität ist hoch signifikant (berechnet mit der linearen Regression). Es gibt keinen Unterschied zwischen mit Resveratrol behandelten Mäusen und den Kontrollen. Das Ergebnis zeigt, dass die gemessenen SSB in primären Hepatozyten teilweise Artefakte darstellen, die bei der Isolation (z.B. durch Zelltod während der Aufarbeitung), entstehen.

Um auszuschließen, dass die ermittelten Fpg-sensitiven Modifikationen ebenfalls abhängig von dem jeweiligen Isolationsprozess sind, ist in **Abbildung 25** deren Abhängigkeit von der Vitalität dargestellt.



**Abbildung 25: Fpg-sensitive Modifikationen in Abhängigkeit von der Zellvitalität primäre Hepatozyten in verschiedenen Maus-Genotypen nach Behandlung mit Resveratrol.** Für die Bedingungen siehe Abbildung 24

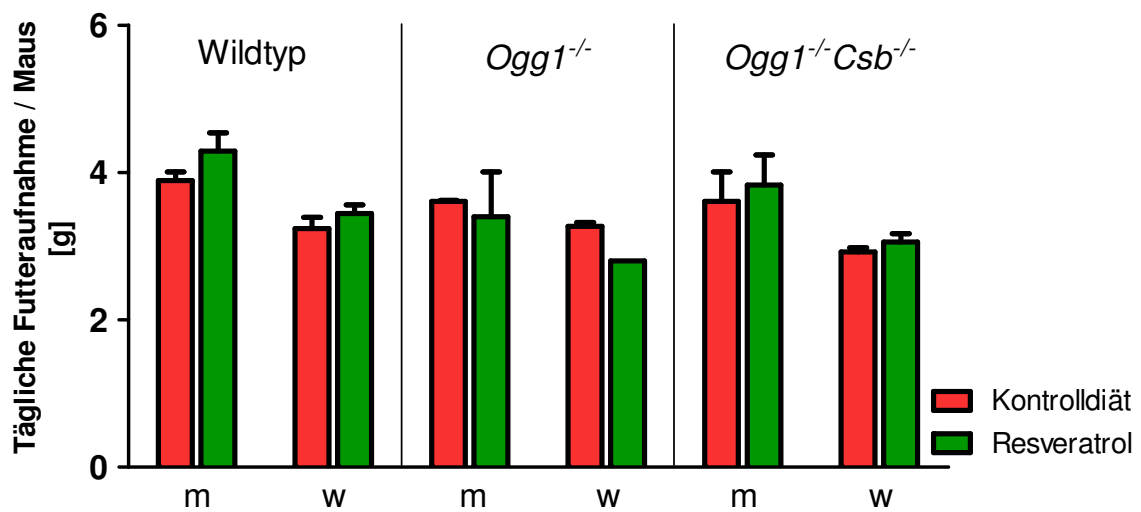
Es ist keine Korrelation zu erkennen. Dies zeigt, dass der Unterschied zwischen den Genotypen sowie zwischen den Behandlungsarten, nicht durch die Aufarbeitung der Hepatozyten generiert wurde.

### 5.3 Einfluss einer Langzeit-Behandlung mit Resveratrol

Nachdem eine kurzzeitige Behandlung (7 Tage) mit oral verabreichtem Resveratrol (100 mg/kg) zu einer leichten Reduktion der Steady-State-Spiegel oxidativer DNA-Basenmodifikationen in Mäusen geführt hat. Soll nun untersucht werden, inwieweit es möglich ist, die Spiegel durch eine dauerhafte Gabe von Resveratrol im Futter zu modulieren. Dazu wird in eine Standarddiät 0,04% Resveratrol beigemischt und den Mäusen, nach dem Trennen von den Eltern (Alter: 3-4 Wochen) dauerhaft zur Verfügung gestellt (*ad libitum*). Die Dosis wurde analog der Studie von *Baur et al.* gewählt (Baur et al., 2006). Es wurden 3 verschiedene Genotypen mit der Resveratrol-Diät gefüttert: Wildtyp, *Ogg1*<sup>-/-</sup> und *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup> und die endogenen Spiegel oxidativer Basenmodifikationen nach 3, 6 und 9 Monaten bestimmt.

#### 5.3.1 Futteraufnahme während der Resveratrol-Fütterung

Die Fütterung führte zu keinem offensichtlichen Phänotyp, die behandelten Mäuse verhielten sich unauffällig. Die Futteraufnahme wurde wöchentlich über mehrere Monate gemessen (siehe 4.2.2.7), um einen eventuellen Einfluss von Resveratrol erkennen zu können. Die berechnete, durchschnittliche, tägliche Futteraufnahme ist in **Abbildung 26** dargestellt.



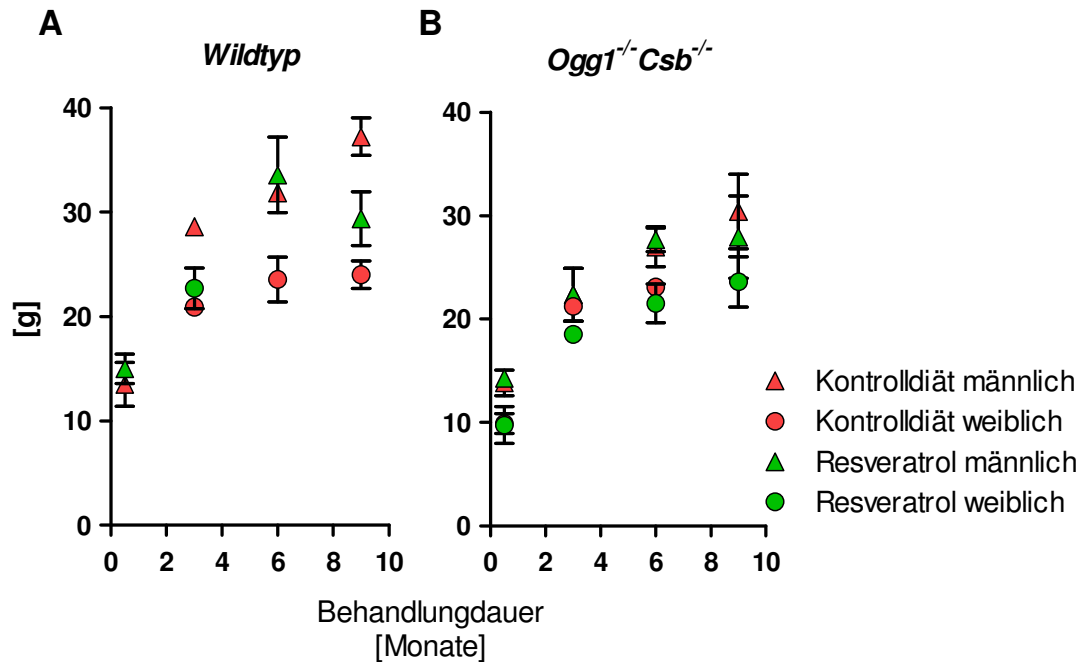
**Abbildung 26: Futteraufnahme während der Fütterung mit 0,04% *ad libitum* Resveratrol:** Der Futterverbrauch pro Käfig wurde mehrere Monate überwacht, anhand der Tieranzahl pro Käfig wurde die Futteraufnahme pro Maus berechnet. m = männlich, w = weiblich. Die Anzahl der jeweiligen Käfige pro Gruppe war: Wildtyp n= 2-4; *Ogg1*<sup>-/-</sup> n= 1-3; *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup> n= 2-6. Mittelwerte ± SD.

Resveratrol in der Diät hat keinen Einfluss auf die eingenommene Gesamtmenge an Futter, dies gibt den Hinweis darauf, dass Resveratrol geschmacksneutral ist bzw. Appetit und Grundumsatz nicht merklich beeinflusst. Die Futteraufnahme wird auch durch den Genotyp nicht stark beeinflusst. Wildtyp-Mäuse fressen pro Tag leicht mehr als die reparaturdefizienten Knockout-Tiere. Es ist aber ein klarer Geschlechtsunterschied bei der Futteraufnahme zu erkennen, Männchen nehmen in allen Gruppen mehr als die entsprechenden Weibchen zu sich.

### 5.3.2 Körpergewicht von Mäusen während der Resveratrol-Fütterung

Ein weiterer sehr sensibler Parameter, um toxische Effekte erkennen zu können, ist das Körpergewicht. Mäuse, die einem Stress ausgesetzt sind, nehmen im Allgemeinen weniger oder gar kein Futter zu sich, dies führt zu einer raschen Gewichtsabnahme innerhalb von Stunden (AALAS, 2006).

In **Abbildung 27** ist das Körpergewicht der einzelnen Behandlungsgruppen und Genotypen nach Geschlecht getrennt gegen die Dauer der Fütterung aufgetragen.



**Abbildung 27: Körpergewicht in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer mit 0,04% Resveratrol *ad libitum*.** Gewicht der einzelnen Behandlungszeitpunkte jeweils pro Geschlecht und Behandlungsart in (A) Wildtyp und (B) *Ogg1<sup>-/-</sup> Csb<sup>-/-</sup>* Mäusen. Mittelwerte  $\pm$  SD.

Es ist, zu erkennen, dass die Männchen schwerer als die Weibchen sind, dieser Unterschied ist analog zu der geschlechtsabhängigen Futteraufnahme (siehe **Abbildung 26**). Man sieht, wenn man Wildtyp und *Ogg1<sup>-/-</sup> Csb<sup>-/-</sup>* Mäusen vergleicht, dass die Wildtyp-Mäuse etwas schwerer sind. Die Resveratrol-Behandlung hat jedoch keinen signifikanten Einfluss auf das Körpergewicht. Nur bei den Wildtyp-Tieren und 9 Monaten Behandlungsdauer ist eine Differenz zwischen den beiden Männchen-Gruppen zu erkennen, diese ist aber wahrscheinlich zufällig, da dieser Unterschied in keiner anderen Gruppe auftaucht.

Kalkuliert man nun aus den Körpergewichten und den Futteraufnahmen die Resveratrol-Dosis, so ergibt sich bei 6 Monaten Behandlung eine tägliche Aufnahme von  $52 \pm 3$  mg/kg Körpergewicht pro Tag. Diese Aufnahme ist unabhängig vom Geschlecht oder dem Genotyp der Mäuse.

### 5.3.3 Klinische Serumparameter mit Resveratrol behandelte Mäuse

Um Hinweise auf eine eventuelle Toxizität zu erhalten oder die Beeinflussung der Leberfunktionen zu überprüfen, wurden verschiedene Serumparameter in Mäusen nach 5-6 Monaten Behandlung mit Resveratrol bestimmt. Dazu wurden den Tieren nach Dekapitation Blut entnommen und das Serum gewonnen (siehe 4.2.2.9), dieses wurde dann von der Firma Biocontrol (Ingelheim) analysiert.

**Tabelle 11: Einfluss von Resveratrol auf klinische Serumparameter in männlichen Wildtyp- und *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen.** Dosis: 0,04% *ad libitum* für 5-6 Monate. Die Normwerte für männliche C57Bl/6 Mäuse sind aus (AALAS, 2006) übernommen. GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase, ALT = Alanin-Amino-Transferase, GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, AST = Aspartat-Amino-Transferase, GLDH = Glutamatdehydrogenase. Mittelwerte  $\pm$  SD

			Wildtyp		<i>Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup></i>	
			Kontrolle	Resveratrol	Kontrolle	Resveratrol
		Norm. ♂ C57Bl/6	n = 2	n = 3	n = 2	n = 2
GPT (ALT)	[U/l]	41 $\pm$ 15	31 $\pm$ 8	29 $\pm$ 6	35 $\pm$ 8	28 $\pm$ 3
GOT (AST)	[U/l]	100 $\pm$ 33	101 $\pm$ 22	135 $\pm$ 57	134 $\pm$ 117	103 $\pm$ 53
Alkal. Phosphatase	[U/l]	59 $\pm$ 11	96 $\pm$ 28	55 $\pm$ 8	63 $\pm$ 13	54 $\pm$ 8
GLDH	[U/l]	-	7,1 $\pm$ 1,6	9,2 $\pm$ 0,5	9,2 $\pm$ 3,9	7,5 $\pm$ 0,2
Bilirubin	[mg/dl]	-	0,2 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	0,17 $\pm$ 0,1	0,1 $\pm$ 0,0
Gesamtprotein	[g/l]	-	56 $\pm$ 2	50 $\pm$ 2	53 $\pm$ 2	55 $\pm$ 4
Albumin	[g/l]	37 $\pm$ 11	38 $\pm$ 1	32 $\pm$ 2	32 $\pm$ 6	35 $\pm$ 1
Cholesterol, gesamt	[mg/dl]	95 $\pm$ 16	75 $\pm$ 4	98 $\pm$ 10	85 $\pm$ 5	96 $\pm$ 1

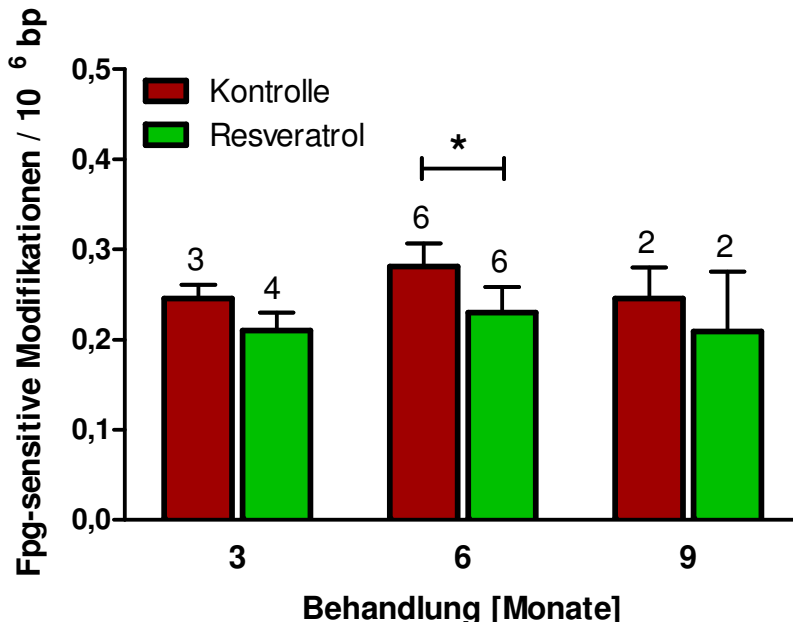
Die in **Tabelle 11** dargestellten klinischen Parameter zeigen, dass Resveratrol keine Veränderung der Leberparameter bewirkt. Auch der Genotyp hat keinen signifikanten Einfluss auf die Leberwerte. Alle ermittelten Werte liegen im für C57Bl/6-Mäuse bekannten Normbereich (AALAS, 2006) bzw. bei der GOT im Grenzbereich. Es gibt bei dem Gesamtcholesterol eine Tendenz zu leicht erhöhten Spiegel bei den Resveratrol behandelten Tieren, diese ist aber nicht sehr stark ausgeprägt und liegt auch hier noch im Normbereich.

### 5.3.4 Beeinflussung der endogenen DNA-Basenmodifikationen durch eine Langzeit-Behandlung mit Resveratrol

Die primären Hepatozyten der Mäuse wurden durch Leberperfusion (siehe 4.2.2.3) isoliert und anschließend die basalen Spiegel an Fpg-sensitiven Modifikationen mit der Alkalischen Elution (siehe 4.2.3) bestimmt. Die Mäuse wurden für mehrere Monate mit Resveratrol 0,04% *ad libitum* behandelt, zur vereinfachten Darstellung sind die Tiere in ihre jeweiligen Altersgruppen (3, 6 und 9 Monate) zusammengefasst. Die Werte von Männchen und Weibchen wurden auch hier, wie in Kapitel 5.2.1 zusammengefasst, da es keinen geschlechtsspezifischen Unterschied gibt (Daten nicht gezeigt).

#### 5.3.4.1 Langzeit-Behandlung von Wildtyp-Mäusen

In **Abbildung 28** sind die Hintergrundspiegel Fpg-sensitiver Modifikationen in Wildtyp-Mäusen gegen die Behandlungsdauer aufgetragen.



**Abbildung 28: Fpg-sensitive Basenmodifikationen in primären Hepatozyten von Wildtyp-Mäusen nach einer Langzeit-Behandlung mit Resveratrol.** Die Fpg-sensitiven Basenmodifikationen wurden mit Hilfe der Alkalischen Elution quantifiziert. Die Behandlung erfolgte *ad libitum* mit 0,04% Resveratrol bzw. einer Kontrolldiät für den angegebenen Zeitraum. Die Zahlen über den Balken zeigen die Mausanzahl der jeweiligen Gruppe an. Mittelwerte  $\pm$  SD. Die statistische Signifikanz (\*  $p < 0,05$ ) eines zweiseitigen T-Tests mit Welch-Korrektur für den Vergleich von zwei Gruppen ist angegeben.

Man kann erkennen, dass die Behandlung mit Resveratrol in allen drei Gruppen eine leichte Reduktion der basalen Spiegel mit sich bringt. Dieser Unterschied ist aber nur bei einer Gruppe (6 Monate) signifikant, da hier die Stichprobenzahl am höchsten ist.

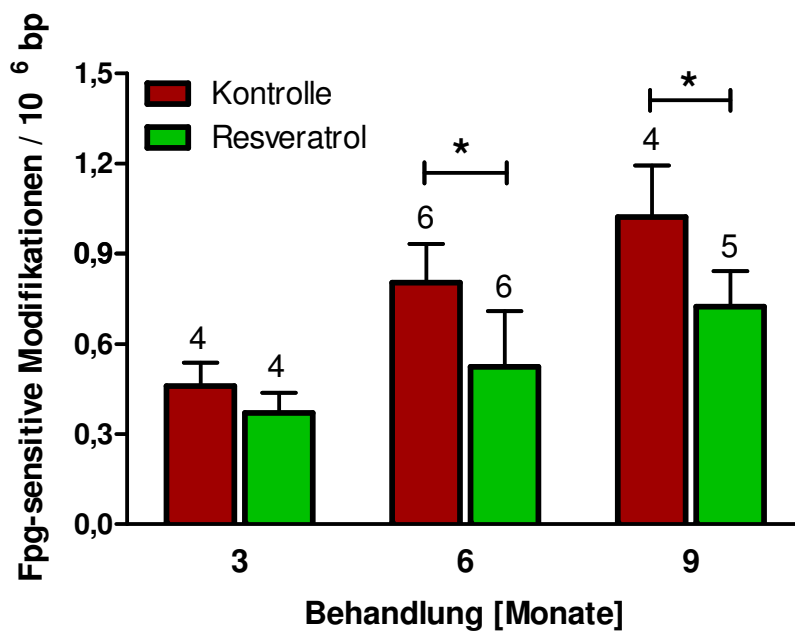
Vergleicht man die Behandlungsgruppen mit dem 2-Faktor-ANOVA-Test (auf Behandlungsgruppe u. -dauer), so ergibt sich ein sehr signifikanter Unterschied (\*\*  $p < 0,01$ ) zwischen der Kontrollgruppe und den mit Resveratrol behandelten Tieren, jedoch gibt es keinen Unterschied zwischen der unterschiedlichen Behandlungsdauer.

#### 5.3.4.2 Langzeit-Behandlung von *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen

Wie bereits bei der Kurzzeit-Behandlung mit Resveratrol in Kapitel 5.2.1, wurden auch hier zusätzlich zu den Wildtyp-Mäusen reparaturdefiziente *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäuse verwendet. Aufgrund ihrer erhöhten Spiegel an oxidativen DNA-Basenmodifikationen (Osterod et al., 2002), sind sie sehr gut geeignet den Effekt von Resveratrol besonders empfindlich messen zu können.

In **Abbildung 29** sind die basalen Spiegel Fpg-sensitiver Modifikationen in *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen gegen die Behandlungsdauer dargestellt.



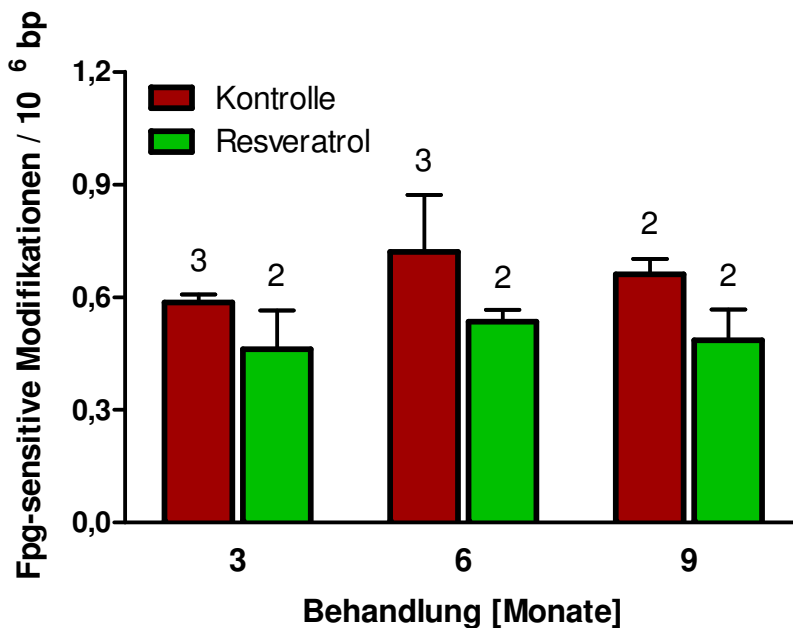


**Abbildung 29: Fpg-sensitive Basenmodifikationen in primären Hepatozyten von *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen nach einer Langzeit-Behandlung mit Resveratrol.** Die Fpg-sensitiven Basenmodifikationen wurden mit Hilfe der schnellen Alkalischen Elution quantifiziert. Die Behandlung erfolgte *ad libitum* mit 0,04% Resveratrol bzw. einer Kontrolldiät für den angegebenen Zeitraum. Die Zahlen über den Balken zeigen die Mausanzahl der jeweiligen Gruppe an. Mittelwerte  $\pm$  SD. Die statistische Signifikanz (\*  $p < 0,05$ ) eines zweiseitigen T-Tests mit Welch-Korrektur für den Vergleich von zwei Mittelwerten ist angegeben.

Man kann erkennen, dass Resveratrol die basalen Spiegel an Fpg-sensitiven Modifikationen in *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen senkt. Der Unterschied ist in jeder einzelnen Gruppe vorhanden und in zwei Gruppen ist er auch statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ). Der bereits beschriebene altersabhängige Anstieg der DNA-Basenmodifikationen ist ebenfalls gut zu erkennen. Dieser Anstieg ist in der mit Resveratrol behandelten Gruppe zwar auch zu sehen, aber er ist deutlich abgeschwächt. Vergleicht man nun die beiden Gruppen mit einem 2-Faktor-ANOVA-Test auf Behandlungsart und -dauer, so ist der Unterschied zwischen Resveratrol und Kontrolle hoch signifikant (\*\*\*) ( $p < 0,001$ ). Auch der Anstieg mit der Dauer der Behandlung (bzw. Alter) ist signifikant ( $p < 0,05$ ) für beide Gruppen.

### 5.3.4.3 Langzeit-Behandlung von *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen

Zusätzlich wurden auch *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse, welche 8-oxoG in ihren Lebern weniger stark als *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>-Mäuse akkumulieren (Osterod et al., 2002), mit Resveratrol *ad libitum* gefüttert. Aus diesen wurden nach mehreren Monaten primäre Hepatozyten isoliert (siehe 4.2.2.3) und auf ihre endogenen oxidativen DNA-Basenmodifikationen (Fpg-sensitive Modifikationen) hin untersucht. Die Ergebnisse für die *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Tiere sind in **Abbildung 30** zusammengefasst.

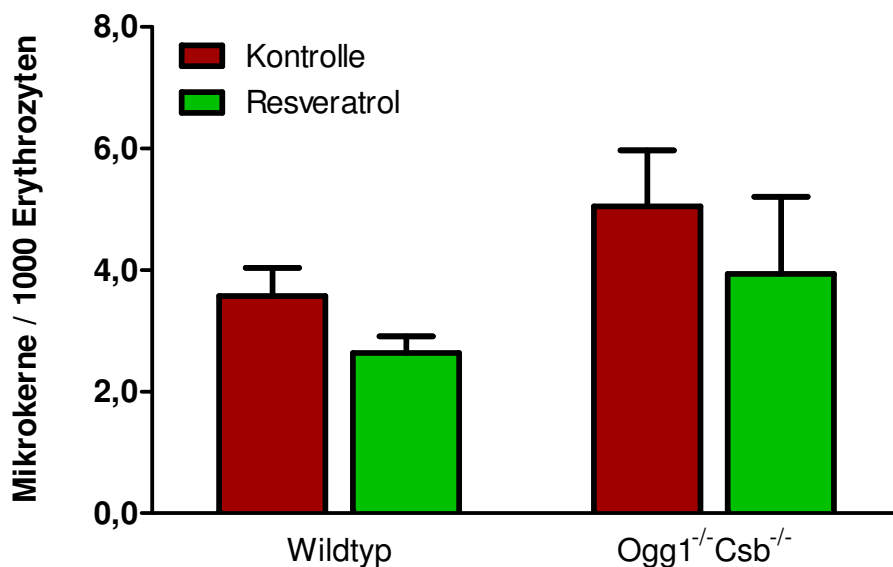


**Abbildung 30: Fpg-sensitive Basenmodifikationen in primären Hepatozyten von *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach einer Langzeit-Behandlung mit Resveratrol.** Die Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Basenmodifikationen wurden mit Hilfe der Alkalischen Elution quantifiziert. Die Behandlung erfolgte *ad libitum* mit 0,04% Resveratrol bzw. einer Kontrolldiät für den angegebenen Zeitraum. Die Zahlen über den Balken zeigen die Mausanzahl der jeweiligen Gruppe an. Mittelwerte  $\pm$  SD.

Auch in diesen Mäusen ist, wie bereits in den Wildtyp- (**Abbildung 28**) und *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>-Mäusen (**Abbildung 29**), eine Reduktion von endogenem 8-oxoG in der Leber zu erkennen. Statistische Analyse mit einem 2-Faktor-ANOVA-Test gegen Dauer und Art der Behandlung zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Resveratrol und Kontrolle ( $p < 0,05$ ). Der altersabhängige Anstieg, welcher in den *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen in Lebern beobachtet wurde (Klungland et al., 1999), ist nicht zu erkennen (nicht signifikant). Dies ist wahrscheinlich in dem noch recht jungen Alter der Mäuse begründet.

### 5.3.5 Mikrokerne im Blut von mit Resveratrol behandelten Mäusen

Ein weiterer sensitiver Marker für Genotoxizität ist der Mikrokerntest in peripherem Blut, dieser Test gehört auch in der Entwicklung neuer Substanzen zu den Standardverfahren (OECD, 1997) um das genotoxische Potential zu beurteilen. Das Blut wurde direkt bei der Leberperfusion gewonnen, indem der erste Tropfen Blut nach dem Öffnen der Aorta mit einer Pipette aufgenommen und auf einem Objekträger ausgestrichen wurde. Die Analyse erfolgte nach dem „Verblinden“ und Anfärben der Proben am Mikroskop (siehe 4.2.2.11).



**Abbildung 31: Mikrokernrate in peripherem Blut von Mäusen mit Resveratrol-Behandlung.** Die Mikrokerne wurden pro Maus auf 2 Objekträgern mit jeweils mind. 2000 Erythrozyten (vgl. 4.2.2.11) ausgezählt. Behandlungsdauer: 9 Monate mit 0,04% Resveratrol *ad libitum*. Anzahl der Tiere: Wildtyp n=2; Wildtyp +Resveratrol n=3; Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup> n=2; Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup> +Resveratrol n=4. Mittelwerte ± SD.

Es ist ein Trend zu erkennen, dass eine Resveratrol Behandlung (0,04% *ad libitum*) für 9 Monate in beiden Genotypen die Mikrokernrate leicht reduzieren kann. Dieser Unterschied ist allerdings nicht statistisch signifikant. Auch kann man sehen, dass die Mikrokernrate in den Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>-Mäusen gegenüber dem Wildtyp erhöht ist, dies ist aber aufgrund des geringen Probenumfangs ebenfalls statistisch nicht abgesichert.

### 5.3.6 Mutationsrate in Lebern von Mäusen nach einer Resveratrol Behandlung

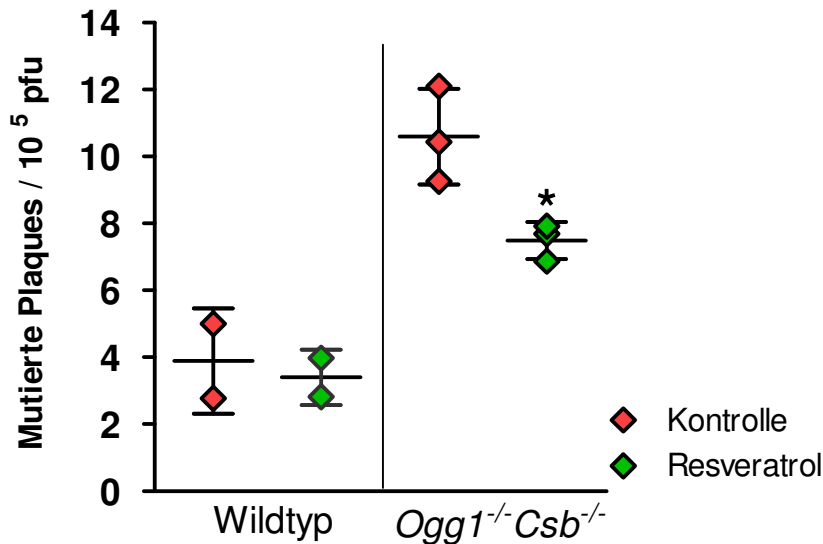
Es konnte in den bisherigen Experimenten gezeigt werden, dass die Hintergrundspiegel oxidativer DNA Schäden wie 8-oxoG in Mäusen durch die Gabe von Resveratrol gesenkt werden können. In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass schon gering erhöhte Hintergrundspiegel zu einer erhöhten Mutationsrate in transgenen reparaturdefizienten Mäusen führt. (Trapp et al., 2007a). Nun ist es von starkem Interesse, ob die Reduktion der basalen Spiegel an oxidativen Basenmodifikationen durch Resveratrol auch zu einer reduzierten Mutationsfrequenz führt. Diese wurde mit dem BigBlue®-Mutations Assay detektiert (siehe 4.2.6).

Um diesen durchführen zu können wurden zunächst durch mehrere Kreuzungsschritte, diverse homozygote BigBlue®-Mausgenotypen generiert. (siehe 4.2.2.2) und auf ihren Genotyp mit PCR hin überprüft. (siehe 4.2.2.1) Die erhaltenen Tiere tragen alle das bakterielle *lacI*-Gen als Transgen, welches für den bakteriellen lac-Repressor codiert und als Ziel für die Mutationsanalyse *in vivo* dient.

Die spontanen Mutationsfrequenzen wurden in den Lebern von Wildtyp und *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen jeweils mit und ohne Resveratrol-Behandlung (5-6 Monate, 0,04% *ad libitum*) gemessen. Es wurden für die Wildtyp-Tiere 2 Mäuse und für die *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Tiere jeweils 3 Mäuse pro Behandlungsgruppe analysiert.

Um die jeweiligen X-Gal-positiven Plaques zu bestätigen, wurden die gefundenen blauen Plaques mit einer geringeren Dichte neu ausplattiert und der mutierte Phänotyp verifiziert.

In **Abbildung 32** sind die Mutationsfrequenzen in Lebern von *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>* und Wildtyp-Mäusen nach Resveratrol-Diät oder Kontrolle dargestellt.



**Abbildung 32: BigBlue<sup>®</sup>-Mutationsfrequenz in Lebern von Wildtyp und *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen nach Resveratrol-Fütterung.** Die Mutationen wurden durch den BigBlue<sup>®</sup>-Mutations-Assay (siehe 4.2.6) im transgenen *lacI*-Gen bestimmt und überprüft. Behandlung: 5-6 Monate, 0,04% *ad libitum*. Die eingezeichneten Balken sind der Mittelwert  $\pm$ SD pro Gruppe. \* =  $p < 0,05$  zweiseitiger T-Test mit Welch-Korrektur. pfu = Plaque formende units.

Die Ergebnisse zeigen, dass oral verabreichtes Resveratrol die spontane Mutationsfrequenz in Lebern von reparaturdefizienten Mäusen um 30-35% signifikant ( $p < 0,05$ ) senken kann. In Wildtyp-Tieren ist keine Effekt zu erkennen.

Man kann ebenfalls erkennen, dass in den *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen gegenüber den Wildtyp-Mäusen ungefähr 2,5fach erhöhte Mutationsfrequenzen vorliegen ( $p < 0,01$ ). Dieses Ergebnis und die gemessenen Werte (10,1 Mutanten / 10<sup>5</sup> pfu) sind in guter Übereinstimmung mit denen einer bereits publizierten Studie (Trapp et al., 2007a). Die Mutationsrate der Kontrollen (WT) sind ebenfalls im Bereich der für den BigBlue<sup>®</sup>-Assay zuvor gemessenen Mutationsfrequenzen ( $\approx 4$  Mutanten / 10<sup>5</sup> pfu) (de Boer et al., 1997; Trapp et al., 2007a)

### 5.3.7 Sequenzierung der Mutationen

Da für einige Mutationsarten bekannt ist, aus welchen DNA-Schäden sie überwiegend entstehen, sollte die Art der durch Resveratrol verhinderten Mutationen eventuell Rückschlüsse auf den Mechanismus der Schutzwirkung von Resveratrol erlauben. Deshalb wurde anschließend an das Screening die DNA der Plaques mit einer PCR vervielfältigt und das *lacI*-Gen vollständig sequenziert (siehe 4.2.6.8).

Die Arten der sequenzierten Mutationen und die Veränderung der Basenfolge bzw. Proteinsequenz sind in **Tabelle 12** aufgelistet. Fast alle der detektierten Mutationen ergeben eine veränderte Proteinstruktur des Lac-Repressors, nur bei einer Probe liegt die Mutation im Promoter des *lacI*-Gens.

**Tabelle 12: Spontane Mutationen im *lacI* Gen von Wildtyp- u. *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen nach einer Behandlung mit Kontroll- oder Resveratrol-Diät für 5-6 Monate, 0,04% *ad libitum*. Es wurden pro Gruppe 284000-478000 Plaques ausplattiert. Die Mutationen sind nach ihrer Position im *lacI*-Gen (Farabaugh, 1978) sortiert. Pfu = plaque forming units, nt = Nukleotide, CpG = Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-Sequenz, wt AS = normale Aminosäure, mut AS = mutierte Aminosäure.**

<u>Wildtyp + Kontrolle</u>						
Position	Sequenz (5'→3')			CpG	wt AS	mut AS
<b>Maus 1</b>						
123	GCG	→	GTG	+	ala	val
628	Deletion				- 2 nt	
869	TGT	→	CGT		cys	arg
901	Deletion				- 66 nt	
<b>Maus 2</b>						
92	CGC	→	TGC	+	arg	cys
92	CGC	→	TGC	+	arg	cys
98	Deletion				- 1 nt	
140	GTG	→	ATG		val	met
153	Deletion				- 65 nt	
185	GCA	→	ACA		ala	thr
698	TCC	→	CCC		ser	pro

<u>Wildtyp + Resveratrol</u>						
Position	Sequenz (5'→3')			CpG	wt AS	mut AS
<b>Maus 1</b>						
56	GCA	→	ACA	+	ala	thr
98	Deletion				- 1 nt	
183	GTG	→	GAG		val	glu
198	GCG		GTG	+	ala	val
206	CAG	→	TAG		gln	STOP
282	TCT	→	TTT		ser	phe
329	CGA	→	TGA	+	arg	STOP
833	TCG	→	CCG		ser	pro
919	Deletion				- 1 nt	
1011	ACC	→	ATC		thr	ile
<b>Maus 2</b>						
185	GCA	→	ACA	+	ser	pro
484	GAC CAG	→	GAA AAG		asp, gln	glu, lys

<u>Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup> + Kontrolle</u>						
Position	Sequenz (5'→3')			CpG	wt AS	mut AS
<b>Maus 1</b>						
484	GAC CAG	→	GAA AAG		asp, gln	glu, lys
621	Deletion				- 4 nt	
702	Deletion				- 1 nt	
980	CCC ACT	→	CAT AGC AA		complex double + insertion (+4)	
<b>Maus 2</b>						
-12	GCA	→	ACA		promoter	
178	AAC	→	AAA		asn	lys
190	Insertion				+ 1 nt	
210	TCG	→	TAG		ser	STOP
221	GGC	→	TTC		gly	phe
237	Deletion				- 16 nt	
354	GCG	→	GTG	+	ala	val
377	CAA	→	TAA		gln	STOP
377	CAA	→	TAA		gln	STOP
389	Deletion				- 1 nt	
624	Deletion				- 2 nt	
626	Deletion				- 2 nt	
629	Deletion				- 4 nt	
743	Insertion				+ 4 nt	
743	Insertion				+ 4 nt	
976	Deletion				- 1 nt	
989	GTC	→	ATC	+	val	ile
<b>Maus 3</b>						
42	ACG	→	ATG	+	thr	met
42	ACG	→	ATG	+	thr	met
134	GAA	→	TAA	+	glu	STOP
140	GTG	→	ATG		val	met
168	TAC	→	TCC		tyr	ser
210	TCG	→	TAG		ser	STOP
484	GAC CAG	→	GAA TAG		asp, gln	glu, STOP
624	Deletion				- 2 nt	
698	TCC	→	CCC		ser	pro
911	CTG	→	ATG		leu	met
1004	AGA	→	TGA		arg	STOP
1011	ACC	→	ATC		thr	ile



<u>Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup> + Resveratrol</u>						
Position	Sequenz (5'→3')			CpG	wt AS	mut AS
<b>Maus 1</b>						
64	TAT		TAA		tyr	STOP
73	GTC		GGC		val	gly
93	CGC		CTC		arg	leu
184	GTG GCA		GTA ACA		val, ala	val, thr
185	GCA		ACA		ala	thr
215	CTG ATT + Del		TGG GTT		Komplex	
215	Deletion				- 5 nt	
218	Deletion				- 1 nt	
238	Deletion				- 22 nt	
381	CGC		CAC	+	arg	his
465	TTA		TAA		leu	STOP
485	CAG		TAG	+	gln	STOP
613	Deletion				- 6 nt	- arg, - cys
833	TCG		CCG	+	ser	pro
833	TCG		CCG	+	ser	pro
867	TCA		TTA		ser	leu
964	Deletion				- 1 nt	
<b>Maus 2</b>						
42	ACG		ATG	+	thr	met
42	ACG		ATG	+	thr	met
42	ACG		ATG	+	thr	met
92	CGC		AGC	+	arg	ser
158	Deletion				- 60 nt	
185	GCA		ACA	+	ala	thr
395	Deletion				- 3 nt	- ile
401	Deletion				- 1 nt	
<b>Maus 3</b>						
100	Deletion				- 16 nt	
169	TAC		TAA		tyr	STOP
200	GGC		TGC		gly	cys
270	GCG		GTG	+	ala	val
270	GCG		GTG	+	ala	val
698	TCC		CCC		ser	pro
919	Deletion				- 1 nt	

Die Mutationsarten und -frequenzen für die beiden Genotypen mit und ohne Resveratrol sind in **Tabelle 13** zur besseren Übersichtlichkeit noch einmal zusammengefasst.

**Tabelle 13: Spektrum der spontanen Mutationen im *lacI*-Gen von Wildtyp und *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen mit und ohne Resveratrol-Behandlung. (0,04% *ad libitum*, 5-6 Monate) In Klammern sind die Anzahl der unabhängigen Mutationen (korrigiert für klonale Expansion) angegeben. Pfu = plaque forming units. Tandem = zwei Basenmutationen direkt nebeneinander, Komplex = mehrere Basenmutationen und/oder Deletionen im *lacI* Gen, in den Fußnoten <sup>1,2,3</sup> sind die entsprechenden Mutationen bei den Tandem-Mutationen und die jeweilige Zuordnung für Abbildung 33 angegeben.**

pfu	<i>Wildtyp</i>				<i>Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup></i>			
	Kontrolle		Resveratrol		Kontrolle		Resveratrol	
	Anzahl	*10 <sup>-5</sup>	Anzahl	*10 <sup>-5</sup>	Anzahl	*10 <sup>-5</sup>	Anzahl	*10 <sup>-5</sup>
	284000		322000		326000		479000	
<b>Transition</b>								
AT→GC	2	0,7	1	0,3	2	0,6	3	0,6
GC→AT	5 (4)	1,8	7	2,2	8 (6)	2,4	10 (7)	2,1
<b>Transversion</b>								
AT→CG	0	0,0	0	0,0	1	0,3	1	0,2
AT→TA	0	0,0	1	0,3	1	0,3	2	0,4
GC→CG	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0
GC→TA	0	0,0	0	0,0	5	1,5	4 (3)	0,8
<b>Deletionen</b>	4	1,4	2	0,6	9	2,8	10	2,1
<b>Insertionen</b>	0	0,0	0	0,0	3 (2)	0,9	0	0,0
<b>Tandem</b>	0	0,0	1 <sup>1</sup>	0,3	3 <sup>2</sup>	0,9	1 <sup>3</sup>	0,2
<b>Komplex</b>	0	0,0	0	0,0	1	0,3	1	0,2
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>3,9</b>	<b>12</b>	<b>3,7</b>	<b>33</b>	<b>10,1</b>	<b>32</b>	<b>6,7</b>
	<b>(10)</b>	<b>(3,5)</b>			<b>(30)</b>	<b>(9,2)</b>	<b>(28)</b>	<b>(5,8)</b>

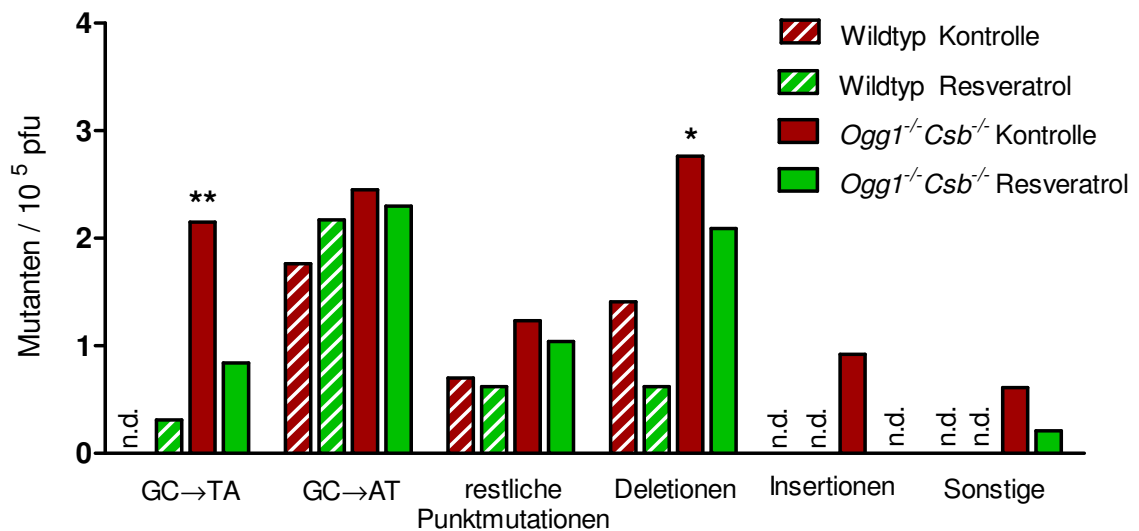
<sup>1</sup> 5'-GG →5'-TT - Transversion

<sup>2</sup> 5'-GG →5'-TT – Transversion; 5'-GG→5'-TT - Transversion; 5'-CC→5'-AT Sonstige;

<sup>3</sup> 5'-GG →5'-AA - Transition

Durch eine molekulare Analyse der mutierten Plaques (Sequenzierung) kann man eine Aussage darüber machen, wie viele unabhängige Mutationen im bakteriellen *lacI*-Gen sind oder ob die Mutationen möglicherweise bei einer klonalen Expansion entstanden sind. Der Großteil der erkannten Mutationen ist unabhängig, d.h. es gab keine sogenannten „Jackpot“-Mutationen. (siehe **Tabelle 13**)

Um die Ergebnisse besser vergleichen zu können, sind sie in **Abbildung 33** noch einmal graphisch dargestellt. Dafür wurden die Tandem-Mutationen (2 Basenmutationen direkt nebeneinander) den entsprechend passenden Mutationen (siehe **Tabelle 13**) zugeordnet. Die Punktmutationen wurden in drei Gruppen aufgeteilt: GC→AT-Transitionen, die spontan durch Desaminierung von Cytosin, vor allem an CpG-Sequenzen entstehen; GC→TA-Transversionen, die eine für 8-oxoG charakteristische Mutation sind (siehe 2.4) und alle restlichen Punktmutationen.



**Abbildung 33: Mutationsspektrum der spontanen Mutationen im *LacI*-Gen von Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup> *Csb*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Behandlung mit Resveratrol.** Behandlung: Resveratrol 0,04% für 5-6 Monate. Pfu = plaque forming units, n.d. = nicht detektiert. Die Statistische Signifikanz (\*  $p < 0,05$  / \*\*  $p < 0,01$ ) des Chi-Quadrat-Tests im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle ist angegeben.

In **Abbildung 33** ist zu erkennen, dass der Anstieg in der Mutationsrate (siehe **Abbildung 32**) in den *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>* Mäusen in allen Arten zu finden ist, aber am Stärksten bei den GC→TA Transversionen und Deletionen ausgeprägt ist. Dies ist ähnlich zu den Ergebnissen von Trapp et al. (Trapp et al., 2007a). Die Deletionen sind 1 bis 66 Nukleotide und die Insertionen sind 1 bis 4 Nukleotide lang.

Eine Reduktion der Mutationen durch Resveratrol ist bei den GC→TA Transversionen in den *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>* Mäusen am ausgeprägtesten zu erkennen, aber auch die restlichen Arten der Mutationen werden leicht gesenkt. Den geringsten Einfluss hat Resveratrol auf die GC→AT Transitionen, welche in Wildtyp-Mäusen die häufigste Mutationsart ist und durch spontane Desaminierung von Cytosin entstehen können. Da GC→TA Transversionen durch den Fehleinbau von Adenin gegenüber 8-oxoG bei der Replikation entstehen können (Bjelland und Seeberg, 2003) und sich dann nach einer weiteren Replikation manifestieren, ist diese Reduktion möglicherweise eine Folge der Reduktion der oxidativen DNA-Basenmodifikationen (siehe 5.3.4). Bei den Wildtyp-Tieren ist aufgrund der geringen Anzahl an Mutanten (11 bzw.12) schwer eine valide Aussage zu treffen. Am Ehesten kann man einen Unterschied in den Wildtyp-Tieren bei den Deletionen sehen.

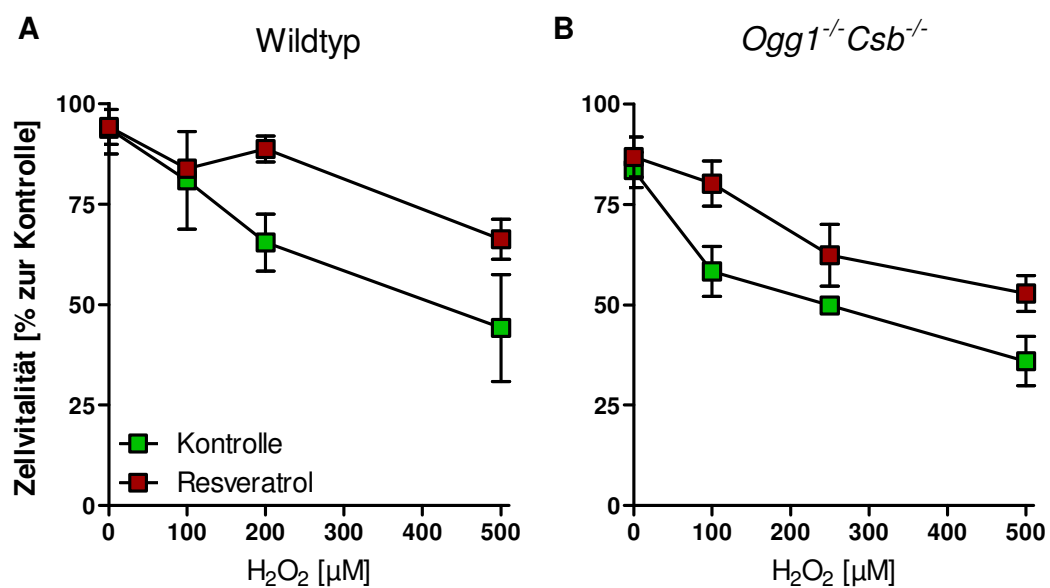
Die Verabreichung von Resveratrol schützt also Mäuse vor Mutationen, wobei die oxidativen Markermutationen (GC→TA Transversionen) am stärksten reduziert werden. Dies gibt Hinweise auf den möglichen Schutzmechanismus durch Resveratrol.

## 5.4 Untersuchungen zur mechanistischen Erklärung des Schutzes durch Resveratrol

Resveratrol schützt *in vivo* vor oxidativen DNA Schäden und vor oxidativer Mutagenese. Dieser Befund sollte nun in weitergehenden Experimenten mechanistisch untersucht werden.

### 5.4.1 Vitalität von primären Hepatozyten nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Um zu bestimmen, wie die frisch isolierten Hepatozyten sich gegenüber einem exogenen Stress verhalten, wurden die Zellen direkt im Anschluss an die Leberperfusion (siehe 4.2.2.3) mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Die Vitalität wurde durch Trypanblau-Ausschluss bestimmt (siehe 4.2.2.4), welcher die Membranintegrität als Endpunkt erfasst.

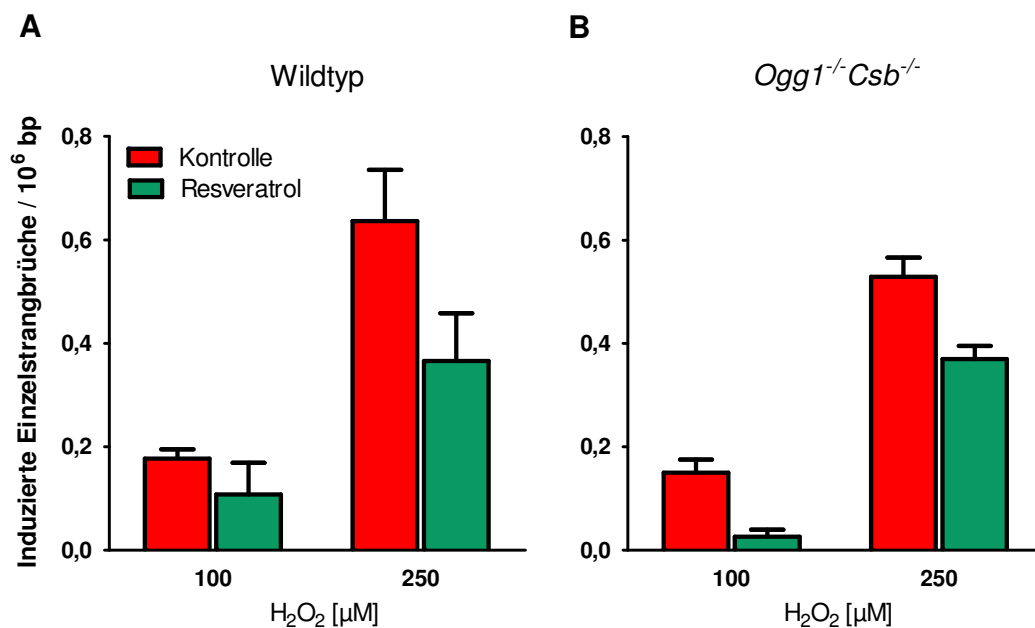


**Abbildung 34: Zellvitalität in primären Hepatozyten von mit Resveratrol oder Kontrolldiät gefütterten Mäusen nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Die Hepatozyten von (A) Wildtyp- und (B) *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>-Mäusen (Behandlung: 9 Monate, 0,04% Resveratrol *ad libitum* bzw. Kontrolldiät) wurden mit den angegebenen Konzentrationen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 15 min bei 37°C geschädigt. Die Vitalität wurde mit Trypanblau-Ausschluss getestet. 100% entspricht der Vitalität direkt nach der Isolation. n = 2; Mittelwerte ± SD.

Die in **Abbildung 34** dargestellte Toxizitätsbestimmung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in primären Hepatozyten zeigt, dass Hepatozyten aus Tieren, welche mit Resveratrol gefüttert wurden resistenter gegen oxidativen Stress sind. Dieser Unterschied ist in beiden Genotypen vorhanden und ungefähr gleich stark ausgeprägt.

#### 5.4.2 Induzierte DNA-Einzelstrangbrüche in primären Hepatozyten

Als weiterer Marker, wie sich Hepatozyten aus mit Resveratrol gefütterten Mäusen gegen einen exogenen oxidativen Stress verhalten, wurde die Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen nach Inkubation mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  untersucht (siehe 4.2.2.4). In **Abbildung 35** sind die Ergebnisse dargestellt.



**Abbildung 35:  $\text{H}_2\text{O}_2$  induzierte DNA-Einzelstrangbrüche in primären Hepatozyten von mit Resveratrol behandelten Mäusen.** Die Hepatozyten von (A) Wildtyp und (B)  $Ogg1^{-/-}Csb^{-/-}$ -Mäusen (Behandlung: 9 Monate, 0,04% Resveratrol *ad libitum* bzw. Kontrolldiät) wurden mit den angegebenen Konzentrationen  $\text{H}_2\text{O}_2$  für 15 min bei  $37^\circ\text{C}$  geschädigt. Die induzierten Einzelstrangbrüche wurden mit der Alkalischen Elution quantifiziert.  $n = 2$ ; Mittelwerte  $\pm$  SD.

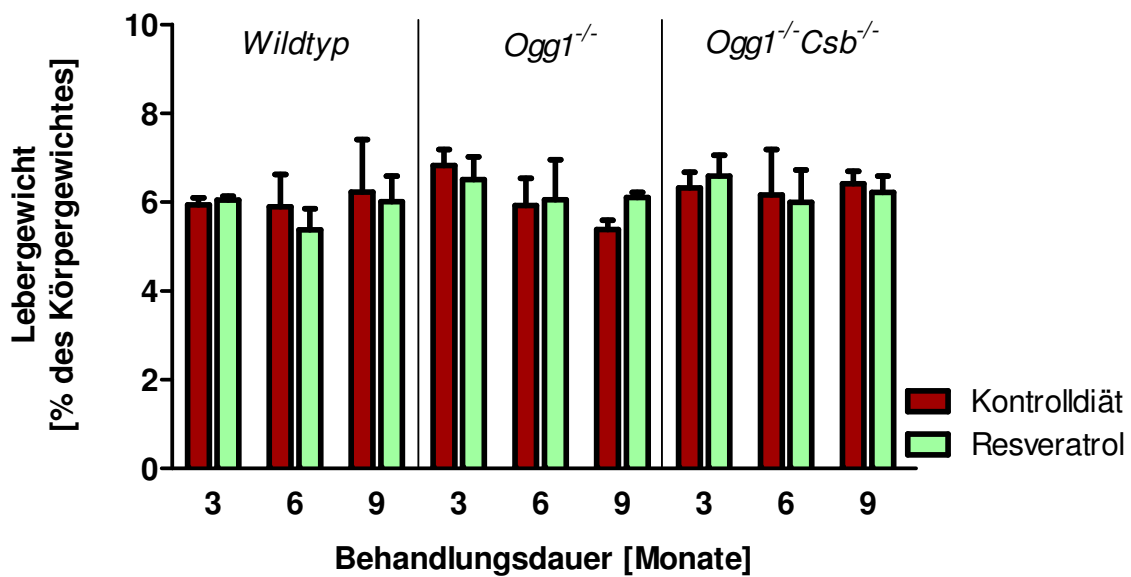
Es ist zu erkennen, dass Resveratrol Behandlung der Mäuse die Zellen vor der Bildung von DNA-Einzelstrangbrüchen schützt. Vergleicht man die beiden Gruppen mit einem 2-Faktor-ANOVA-Test (auf Fütterung und Dosis H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), so ergibt sich für beide untersuchten Genotypen ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsarten ( $p < 0,05$ ). Ebenfalls ist der Anstieg der Induzierten SSB mit höherer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration sehr signifikant ( $p < 0,01$ ) bei beiden Genotypen.

### 5.4.3 Bestimmung der Zellproliferation nach Resveratrol

Eine Möglichkeit, wodurch die basalen Spiegel an oxidativen DNA Basenmodifikationen gesenkt werden können, ist eine Stimulation der Leberzellproliferation, vermutlich da der akkumulierte Schaden bei der Replikation verdünnt. Dieser Effekt wurde von Trapp et al. (Trapp et al., 2007b) nach der Gabe eines Peroxisomenproliferators (WY-14,643) an *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>-Mäusen gezeigt. Deshalb sollte nun überprüft werden, ob Resveratrol ebenfalls die Proliferation anregt und es dadurch zu einer Senkung des endogenen gemessenen oxidativen DNA Schadens kommt.

#### 5.4.3.1 Messung des Lebergewichts

Ein erster sehr sensibler Marker für eine Stimulation der Leberproliferation ist das Lebergewicht. In **Abbildung 36** ist das relative Lebergewicht von verschiedenen Genotypen nach mehreren Monaten Fütterung mit Resveratrol *ad libitum* dargestellt.

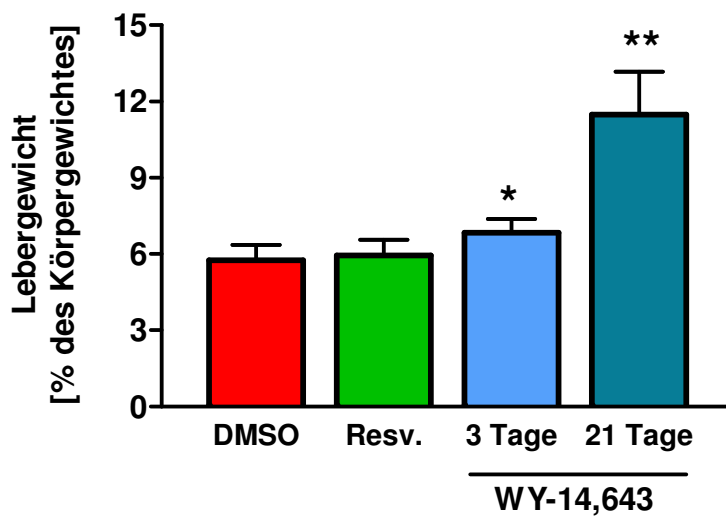


**Abbildung 36:** Lebergewicht im Verhältnis zum Körpergewicht von Wildtyp-, *Ogg1*<sup>-/-</sup>- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>- Mäusen nach Langzeit-Behandlung mit Resveratrol. Die Behandlung erfolgte mit Resveratrol 0,04% *ad libitum* für den angegebenen Zeitraum. n = 2-7, Mittelwerte ± SD.

Man erkennt, dass sich das relative Lebergewicht durch eine Resveratrol diät nicht verändert und in allen drei analysierten Genotypen mit ungefähr 6% des Körpergewichtes ungefähr gleich ist. Obwohl das Körpergewicht mit dem Alter zunimmt (siehe **Abbildung 27**), bleibt das relative Lebergewicht auch mit zunehmender Lebensdauer konstant.

Wie sich die Kurzzeit-Behandlung mit Resveratrol per Gavage (7 Tage, 100 mg/kg) auf das Lebergewicht in *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>-Mäusen auswirkt ist in **Abbildung 37** dargestellt. Zusätzlich wurde einigen Tieren als Positivkontrolle eine Futtermischung mit 0,025% WY-14,643 für mehrere Tage *ad libitum* verabreicht.





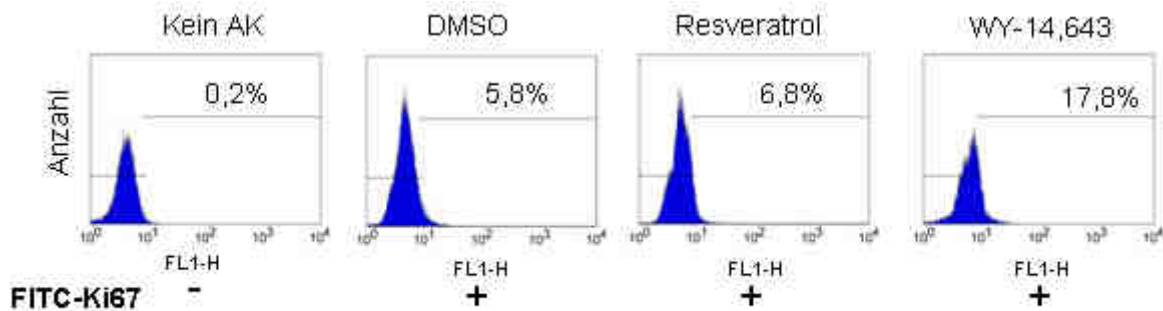
**Abbildung 37: Lebergewicht im Verhältnis zum Körpergewicht von *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen nach Kurzzeit-Behandlung mit Resveratrol bzw. WY-14,643.** Die Behandlung erfolgte 1x täglich für 7 Tage mit Resveratrol (bzw. DMSO als Kontrolle) 100 mg/kg Körpergewicht per Gavage. WY-14,643 wurde den Tieren mit 0,025% *ad libitum* für den angegebenen Zeitraum verabreicht. Alter der Tiere: 12-18 Monate, Anzahl der Tiere: DMSO = 11, Resveratrol = 11, WY-14,643 3 Tage = 4, WY-14,643 21 Tage = 4; Die Statistische Signifikanz eines zweiseitigen T-Tests im Vergleich zur Kontrolle ist angegeben (\*  $p < 0,05$  / \*\*  $p < 0,01$ ). Mittelwerte  $\pm$  SD.

Man sieht deutlich, dass die Kurzzeit-Behandlung mit Resveratrol die Proliferation der Leber nicht stimuliert. Auch die Gabe von DMSO als Lösungsmittelkontrolle wirkt sich nicht auf das relative Lebergewicht aus, denn es ist wie bei den Kontrollen in **Abbildung 36** bei ungefähr 6% des Körpergewichtes. Durch die Fütterung des Peroxisomenproliferators WY-14,643 kommt es schon nach einer mehrtägigen Behandlung zu einer starken Erhöhung des Lebergewichtes, bis sich das Lebergewicht nach drei Wochen sogar fast verdoppelt. Dieser Befund ist in Einstimmung mit den Befunden von Trapp *et al.* (Trapp *et al.*, 2007b)

### 5.4.3.2 Expression des Proliferationsmarkers Ki-67

Zur zusätzlichen Kontrolle, ob Resveratrol die Zellproliferation anregt, wurde die Expression des Ki-67-Antigens in Zellen gemessen (siehe 4.2.2.10). Ki-67 ist ein nukleäres Antigen, welches auf der Kernmembran in allen aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird, aber nicht in der G<sub>0</sub>-Phase. (Kubbutat et al., 1994) Seine genaue Funktion ist bisher noch nicht bekannt, das Protein wird aber als Marker für Proliferation benutzt.

Um die Expression von Ki-67 zu überprüfen, wurden Mäuse mit Resveratrol (7 Tage, 100 mg/kg Körpergewicht), Kontrolle (DMSO) oder einer WY-14,643-Diät (3 Tage, 0,025% *ad libitum*) behandelt, die primären Hepatozyten isoliert und diese anschließend mit EtOH fixiert. Diese fixierten Zellen wurden mit einem Fluoreszenzmarkiertem Ki-67 Antikörper (FITC-Ki67) inkubiert und die Fluoreszenz durchflusszytometrisch im FACS quantifiziert.



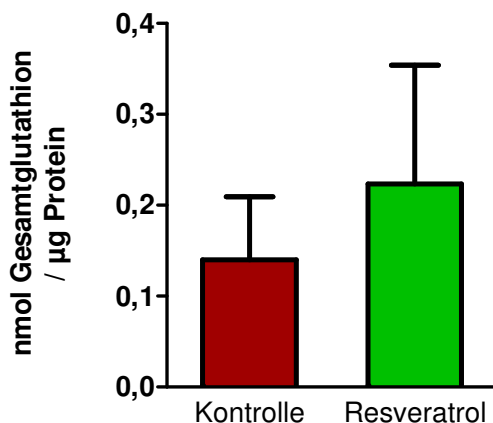
**Abbildung 38: Histogramme der mit FITC-Ki67 markierten Hepatozyten.** AK = Antikörper. Mäuse wurden für 1x täglich für 7 Tage mit Resveratrol 100 mg/kg (bzw. DMSO als Kontrolle) *per gavage* oder 3 Tage mit 0,025% WY-14,643 *ad libitum* behandelt. Der Prozentuale Anteil der Zellen, welche zu einer Fluoreszenz höher als die der Kontrolle verschoben sind, ist angegeben.

Es ist zu erkennen, dass die Hepatozyten aus Resveratrol behandelten Mäusen, nur unwesentlich stärker Ki-67 exprimieren als die Lösungsmittelkontrolle. Es kommt schon bei den mit DMSO behandelten Tieren zu einer leicht höheren Fluoreszenz,

was zum einen durch unspezifische Bindung des Antikörpers oder auch durch eine leichte Schädigung des Lebergewebes durch das Lösungsmittel (DMSO) begründet sein kann. Schon nach einer dreitägigen Fütterung mit WY-14,643 kommt es dagegen zu einer starken Rechtsverschiebung im Histogramm, d.h. ungefähr 10% der Leberzellen sind in aktive Phasen des Zellzyklus eingetreten und exprimieren das Ki-67-Antigen.

#### 5.4.4 Glutathionspiegel in Hepatozyten von Resveratrol behandelten Mäusen

Da bereits gezeigt wurde, dass Resveratrol in kultivierten immortalisierten Zellen den Glutathiongehalt erhöhen kann (siehe 5.1.3), ist es möglich, dass dies auch ein möglicher Mechanismus des Schutzes in der Maus darstellt.



**Abbildung 39: Einfluss von Resveratrol auf die Glutathionspiegel in Hepatozyten von *Ogg1*<sup>-/-</sup> *Csb*<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Der Gesamtglutathiongehalt (GSH+GSSG) und die Proteinmenge wurden direkt nach der Isolation der Hepatozyten (vgl. 4.2.5) gemessen. Behandlung: 1x pro Tag 100 mg/kg Körpergewicht Resveratrol bzw. DMSO als Kontrolle für 7 Tage, Alter: 18 Monate. n=3, Mittelwerte ± SD.

In **Abbildung 39** kann man sehen, dass nach einer Kurzzeit-Behandlung von reparaturdefizienten Mäusen mit Resveratrol (100 mg/kg per Gavage), der Gesamtglutathiongehalt in den Hepatozyten ansteigt. Allerdings sind die interindividuellen Schwankungen sehr hoch, so dass dies nur als ein Trend gewertet werden kann.

#### 5.4.5 Genexpressionsveränderungen durch Resveratrol

Die reduzierte Zahl insbesondere der oxidativen Mutationen (GC→TA) (siehe 5.3.7) und die verbesserte Resistenz von Hepatozyten gegen oxidativen Stress (siehe 5.4.2) nach einer Fütterung von Resveratrol an Mäuse, führt zu der Vermutung, dass es sich bei dem Schutz um ein generelle Induktion antioxidativer Systeme handelt. Die enzymatischen und auch die nicht-enzymatischen Schutzmechanismen der Zelle gegen oxidativen Stress unterliegen schnellen Regulationsmechanismen, z.B. über NRF2 (siehe 2.2.2). Es sollte deshalb untersucht werden, ob Resveratrol Behandlung in den Mäuselebern die Genexpression bestimmter Enzyme und Transkriptionsfaktoren beeinflusst.

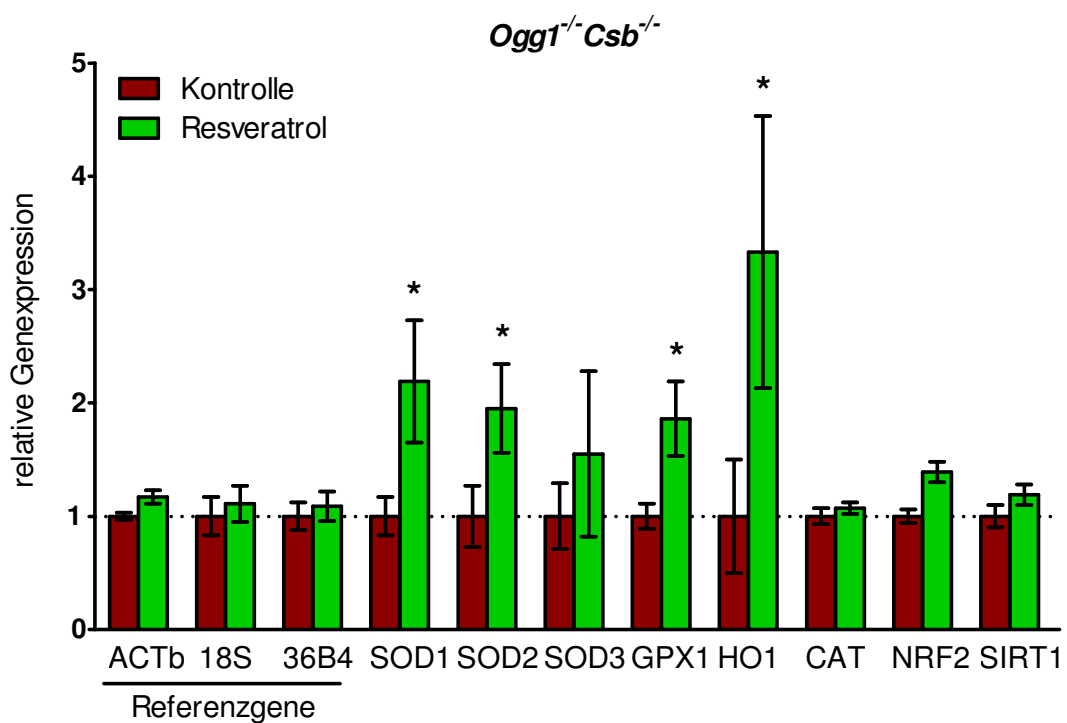
Dazu wurden den Mäusen die Lebern entnommen (siehe 4.2.2.8), die Gesamt-RNA isoliert (siehe 4.2.7.2) und diese mit einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. (siehe 4.2.7.4) Diese wurde anschließend mit spezifischen Primern für die zu untersuchenden Genorte mit Hilfe einer realtime-PCR quantifiziert. (siehe 4.2.7.5) Durch Normalisierung auf ein Referenzgen, welches in Zellen nicht (stark) reguliert, sondern konstitutiv exprimiert ist, kann man Veränderungen in der Genexpression erkennen.

Als Zielgene wurden verschiedene Enzyme gewählt, welche in dem antioxidativen System eine wichtige Rolle bei der Verteidigung gegen oxidativen Stress spielen. (siehe 2.2.2) Die „Entgiftung“ von Superoxid-Radikalen wird hauptsächlich von SOD1, SOD2 und SOD3 durchgeführt. GPX1 und CAT sind wichtig bei der Entfernung von zuviel H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. HO1 baut prooxidatives Häm zu den Bestandteilen Biliverdin, Eisen und Kohlenstoffmonoxid ab. Zusätzlich die Expression von NRF2 und SIRT1 bestimmt. NRF2 ist einer der wichtigsten antioxidativen Transkriptionsfaktoren (siehe 2.2) und Sirtuin 1 (SIRT1) ist als ein mögliches, direktes Target von Resveratrol beschrieben (Howitz et al., 2003).

Es wurden jeweils 3 unterschiedliche Mäuse pro Gruppe analysiert. Zusätzlich wurden auch parallel 2 Proben einer Maus komplett von Anfang bis Ende prozessiert. Die Schwankung bei den beiden Proben war klein (Daten nicht gezeigt), so dass die interindividuellen Unterschiede den Großteil der Varianz erklären.

Als Referenzgene wurden Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH),  $\beta$ -Actin (ACTb) ribosomale 18S-RNA (18S) und das saure ribosomale Phosphoprotein P0 (36B4) gewählt, um eventuelle Veränderungen in diesen durch Resveratrol erkennen zu können.

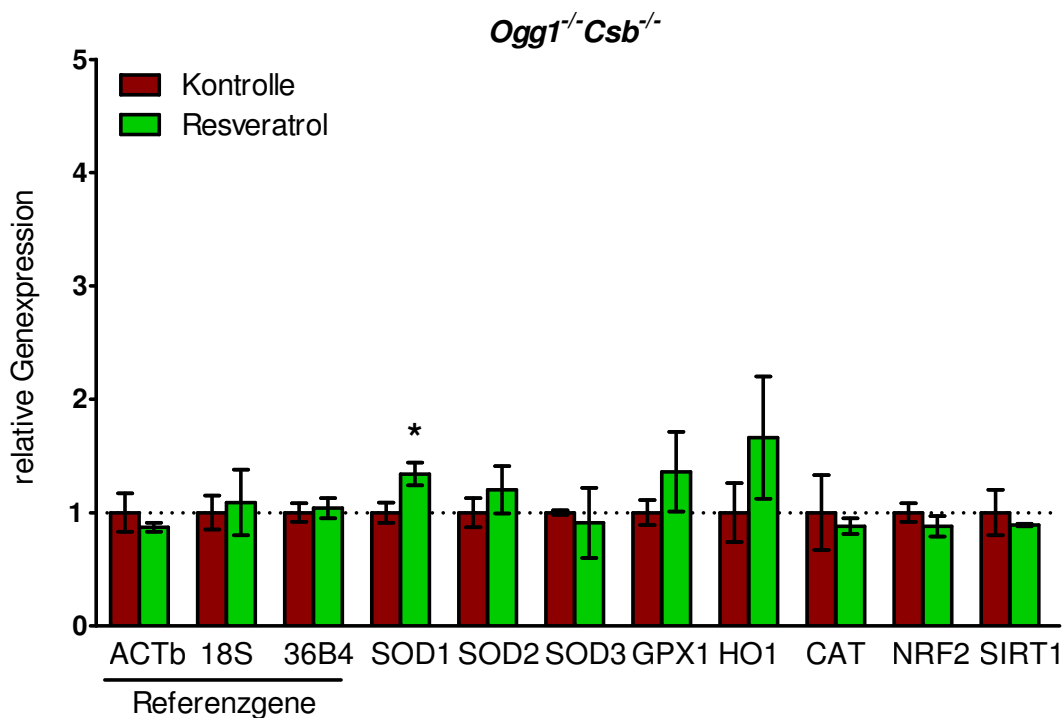
Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse von *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen nach einer Behandlung mit 100 mg/kg Körpergewicht Resveratrol für 7 Tage ist in **Abbildung 40** dargestellt.



**Abbildung 40: Genexpression in Lebern von *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen nach einer Kurzzeit-Behandlung mit Resveratrol.** Administration von 100 mg/kg für 7 Tage *per Gavage*. Alter: 18 Monate. Pro Maus wurde die Expression jedes Gens relativ zu GAPDH bestimmt und anschließend pro Gen auf den Mittelwert der Kontrolltiere normiert. Mittelwert  $\pm$ SD. n = 3 Mäuse. Die Signifikanz (\* $p < 0,05$ ) eines zweiseitigen T-Tests mit Welch-Korrektur ist angegeben. Referenzgene: GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; ACTb =  $\beta$ -Actin; 18S = ribosomale 18S-RNA; 36B4 = Saures ribosomales Phosphoprotein P0; Antioxidative Gene: SOD1-3 = Superoxiddismutase 1-3; GPX1 = Glutathionperoxidase 1; HO1 = Hämoxigenase 1; CAT = Katalase; NRF2 = Nukleärer Factor (erythroid-derived 2)-like 2, SIRT1 = Sirtuin 1

Eine kurzzeitige Gabe von Resveratrol führt in *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen zu einer signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöhten Genexpression bei den antioxidativen Enzymen SOD1, SOD2, GPX1 und HO1. Eine signifikante Änderung der Expression ist nur angegeben, wenn die Normalisierung auf die anderen drei Referenzgene (ACTb, 18S, 36B4) ebenfalls einen signifikanten Unterschied ergeben hat. Die Daten zeigen, dass die Expression der bekannten „Housekeeping“-Gene durch Resveratrol nicht oder nur marginal beeinflusst wurden. Ebenfalls zu keiner veränderten Expression kommt es bei Katalase und Sirtuin 1. Bei NRF2 ist zwar eine leichte Erhöhung der Expression zu erkennen (ca. 1,3-fach), diese ist aber bei einer Normalisierung auf ein anders Referenzgen nicht mehr erkennbar. Die Änderung der Expression von HO1 ist am ausgeprägtesten (ca. 3,2-fach), wobei dort allerdings die interindividuellen Schwankungen sehr groß sind. Bei der SOD3 kommt es ebenfalls zu einer Hochregulation, welche aber nicht statistisch signifikant ist.

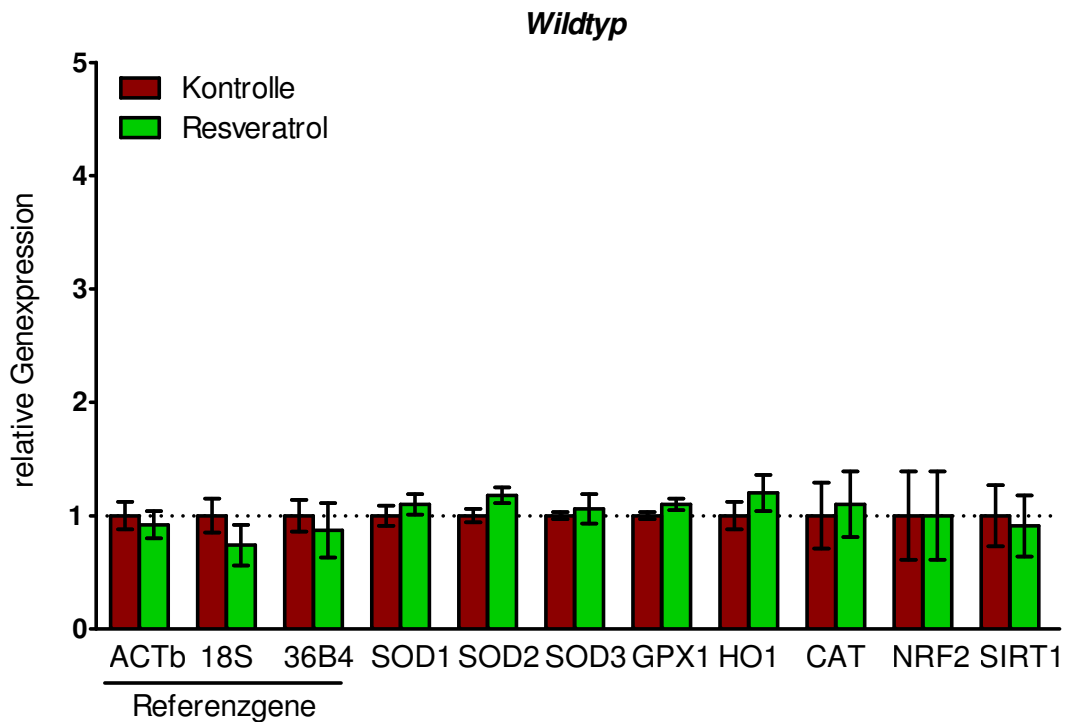
Nun sollte weiterhin untersucht werden, wie sich die Expression der unterschiedlichen Gene nach einer mehrmonatigen (6 Monate) Behandlung mit Resveratrol (0,04% *ad libitum*) verändert, da zu diesem Zeitpunkt der Schutz vor oxidativen DNA Schäden und Mutationen erkennbar war (siehe 5.3.4.2).



**Abbildung 41: Genexpression in Lebern von *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen nach einer Langzeit-Behandlung mit Resveratrol.** Behandlung 6 Monate mit 0,04% *ad libitum*. Alter: 7 Monate. Pro Maus wurde die Expression jedes Gens relativ zu GAPDH bestimmt und anschließend pro Gen auf den Mittelwert der Kontrolltiere normiert. Mittelwert  $\pm$ SD. n = 3 Mäuse. Die Signifikanz ( $p < 0,05$ ) eines zweiseitigen T-Tests mit Welch-Korrektur ist angegeben. Für die Abkürzungen siehe **Abbildung 40**.

Nach einer Langzeit-Behandlung mit Resveratrol im Futter kommt es in *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen zu einer leichten Expressionserhöhung der Gene für SOD1, SOD2, GPX1 und HO1. Dieser Unterschied ist schwächer als bei der kurzzeitigen Gabe (siehe **Abbildung 40**) der Substanz, aber weiterhin erkennbar. Eine statistisch signifikante Änderung ist nur für die SOD1 zu sehen, bei den restlichen Genen sind die interindividuellen Schwankungen zu groß. Die Expression der weiteren Referenzgene, sowie von CAT, NRF2 und SIRT1 wird auch nach dieser Behandlungsform nicht beeinflusst.

Bei den Wildtyp-Mäusen konnte eine leichte Reduktion der oxidativen DNA-Schäden (**Abbildung 28**) und auch ein antioxidativer Schutzmechanismus in den primären Hepatozyten (**Abbildung 35**) detektiert werden. Deshalb wurde auch bei diesen Tieren die Änderung der Genexpression nach 6 Monaten Behandlung mit Resveratrol (0,04% *ad libitum*) bestimmt.



**Abbildung 42: Genexpression in Lebern von Wildtyp-Mäusen nach einer Langzeit-Behandlung mit Resveratrol.** Behandlung 6 Monate mit 0,04% *ad libitum*. Alter: 7 Monate. Pro Maus wurde die Expression jedes Genes relativ zu GAPDH bestimmt und anschließend pro Gen auf den Mittelwert der Kontrolltiere normiert. Mittelwert  $\pm$ SD. n = 3 Mäuse. Für die Abkürzungen siehe **Abbildung 40**

Bei den Wildtyp-Mäusen kann man nur marginale Veränderungen in der Genexpression erkennen. Eventuell ist die SOD2 leicht erhöht, aber dies ist statistisch nicht aussagekräftig.

Zusammenfassend kann man sagen, dass Resveratrol die Expression von bestimmten antioxidativen Genen erhöht. Dies ist bei der kurzzeitigen Gabe stärker ausgeprägt als bei der chronischen Behandlung, was durch die niedrigere Dosis oder durch eventuelle adaptive Veränderungen erklärt werden kann.



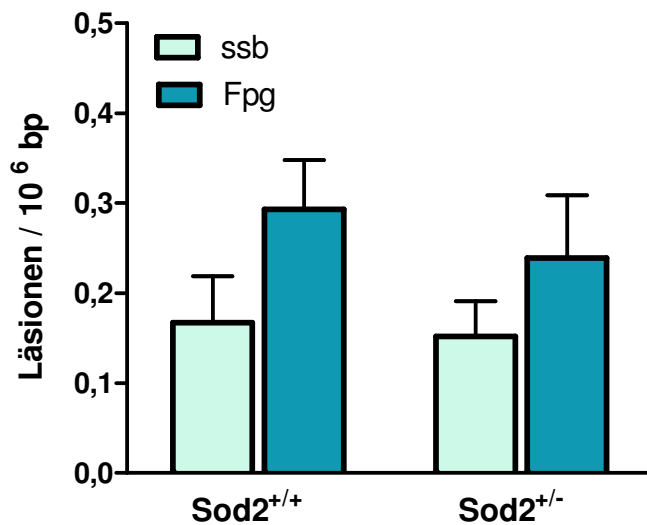
## 5.5 Einfluss einzelner Antioxidativer Schutzmechanismen auf die Spiegel oxidativer DNA-Basenmodifikationen

Nach den bisherigen Ergebnissen kommt es nach einer oralen Gabe von Resveratrol kommt es zu einer Reduktion der basalen oxidativen DNA Schäden und Mutagenese, wahrscheinlich durch eine Hochregulation des zellulären antioxidativen Systems. Nun sollte untersucht werden, ob der Ausfall einzelner Komponenten dieses Schutzmechanismus zu erhöhten Spiegeln oxidativer DNA-Basenmodifikationen führen können.

### 5.5.1 Basale Spiegel von oxidativen DNA-Basenmodifikationen in Knochenmarkszellen von SOD2 hemizygoten Mäusen

SOD2 ist durch die Gabe von Resveratrol in der Expression hochreguliert, deshalb war es interessant, ob in hemizygoten *Sod2*<sup>+/-</sup>-Mäusen die endogenen oxidativen DNA Schäden erhöht sind. *Sod2*<sup>-/-</sup>-Mäuse sind nicht überlebensfähig, deshalb stehen sie nicht zur Verfügung. In den *Sod2*<sup>+/-</sup>-Mäusen ist die Proteinmenge an SOD2 ungefähr auf die Hälfte reduziert. (Guachalla et al., 2009)

Für die Untersuchungen wurde aus Mäusen das Knochenmark frisch isoliert und direkt danach in flüssigem Stickstoff eingefroren (siehe 4.2.1.2). Diese Zellen wurden dann später aufgetaut und direkt mit der Alkalische Elution auf ihre Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Modifikationen hin untersucht (siehe 4.2.3).

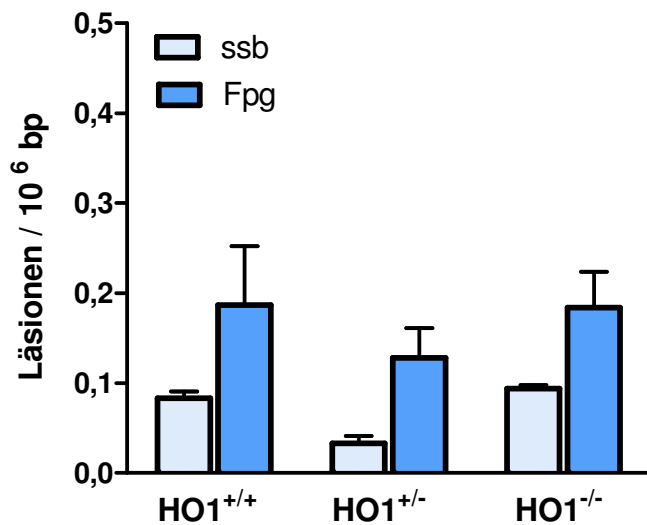


**Abbildung 43: Einzelstrangbrüche (ssb) und Fpg-sensitive Modifikationen (Fpg) in primären Knochenmarkszellen von  $SOD2^{+/-}$ -Mäusen.** Die Schäden wurden mit Hilfe der Alkalischen Elution quantifiziert. n = 5-6. Mittelwerte  $\pm$  SD.

In **Abbildung 43** kann man erkennen, dass es durch den Ausfall eines Allels im *Sod2*-Gen es nicht zu erhöhten basalen Spiegeln oxidativer DNA-Schäden in Knochemarkszellen von Mäusen kommt.

### 5.5.2 Basale Spiegel von oxidativen DNA-Basenmodifikationen in primären Hepatozyten von HO1-knockout-Mäusen

Die Hämoxxygenase 1 (HO1) ist ein Enzym, welches durch den Abbau von prooxidativem Häm zur Stabilisierung des Redox-Gleichgewichtes der Zelle beiträgt und nach Gabe von Resveratrol stark in der Expression gesteigert wurde (siehe 5.4.5). Es sollte im weiterem untersucht werden, ob der Verlust eines oder beider Allele für HO1 zu erhöhten oxidativen DNA-Schäden führt. Dazu wurden zuerst die Hepatozyten von  $HO1^{+/+}$ -,  $HO1^{+/-}$ - und  $HO1^{-/-}$ -Mäusen isoliert (siehe 4.2.2.3) und diese anschließend mit der Alkalischen Elution (siehe 4.2.3) die Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitiven Basenmodifikationen quantifiziert.



**Abbildung 44: Einzelstrangbrüche (ssb) und Fpg-sensitive Modifikationen (Fpg) in primären Hepatozyten von  $HO1^{+/+}$ ,  $HO1^{+/-}$  und  $HO1^{-/-}$  - Mäusen.** Alter: 4-6 Monate. Die Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Basenmodifikationen wurden mit Hilfe der Alkalischen Elution quantifiziert. n = 3. Mittelwerte  $\pm$  SD.

In **Abbildung 44** sieht man, dass das Fehlen eines oder beider Allele der HO1 nicht zu erhöhten oxidativen DNA-Schäden in primären Hepatozyten führt. Die Spiegel sind in allen drei Genotypen niedrig. Bei den hemizygoten  $HO1^{+/-}$ -Mäuse ist sogar die Tendenz zu einer leichten Reduktion zu erkennen, diese ist allerdings nicht signifikant und aufgrund der niedrigen Spiegel schwer zu quantifizieren. Die Werte liegen alle im Bereich der in **Abbildung 21** und **Abbildung 28** beschriebenen Wildtyp-Kontrolltiere.

## 6 DISKUSSION

### 6.1 Beeinflusst eine orale Gabe von Resveratrol die oxidativen DNA-Schäden *in vivo*?

Die wesentliche Frage, welche im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden sollte, ist, ob es möglich ist die endogene Bildung oxidativer DNA-Schäden *in vivo* durch die orale Gabe von Resveratrol zu beeinflussen.

Zuerst wurde verschiedenen Mausstämmen Resveratrol in einer Konzentration von 100 mg/kg Körpergewicht bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle für 7 Tage per Gavage verabreicht (siehe 4.2.2.6) und am Tag nach der letzten Gabe die primären Hepatozyten mit Hilfe der Alkalischen Elution (siehe 4.2.3) auf die basalen oxidativen DNA-Basenmodifikationen (Fpg-sensitive Läsionen) hin untersucht. Diese Kurzzeit-Behandlung wurde bei Wildtyp-, *ApoE*<sup>-/-</sup>- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit jeweils unterschiedlichem Alter durchgeführt.

In allen drei Genotypen konnte eine Reduktion der endogenen oxidativen DNA-Schäden beobachtet werden (siehe **Abbildung 21**, **Abbildung 22** und **Abbildung 23**). Bei den Wildtyp- und den *ApoE*<sup>-/-</sup>-Tieren sind die basalen Spiegel der oxidativen Basenmodifikationen eher niedrig (**Abbildung 21** und **Abbildung 22**), deshalb ist eine Reduktion schwerer zu erkennen und besonders bei den *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäusen sind die individuellen Schwankungen sehr groß, so dass der Unterschied nicht signifikant war (**Abbildung 22**). Die Spiegel der Wildtyp-Mäuse liegen im Bereich der mit der Alkalischen Elution bereits gemessenen Spiegel (Osterod et al., 2001; Trapp et al., 2007b). Die *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäuse haben im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren nur ganz leicht erhöhte Spiegel an oxidativen Basenmodifikationen, dies ist im Einklang mit einer publizierten Studie, bei der in Lebern von *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäusen eine moderate altersabhängige Akkumulation von Fpg-sensitiven Modifikationen gefunden wurde (Folkmann et al., 2007) und der Unterschied zu den Wildtyp-Mäusen erst nach ungefähr 17 Monaten erkennbar war. In der vorliegenden Arbeit wurden *ApoE*<sup>-/-</sup>-Mäuse bis zum Alter von 8 Monaten verwendet, dies erklärt den nur tendenziellen Unterschied (**Abbildung 21** und **Abbildung 22**).

Zusätzlich wurde das Resveratrol *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>-Mäusen als drittem Mausstamm verabreicht. Es konnte bereits in einer vorangegangenen Arbeit gezeigt werden,

dass *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäuse eine altersabhängige Anreicherung von 8-oxoG (bzw. Fpg-sensitive Modifikationen) in ihrer Leber zeigen (Osterod et al., 2002). Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse an ungefähr 18 Monate alten Mäusen bestätigen deutlich diese erhöhten Werte, und auch die Absenkung der basalen oxidativen DNA-Schäden in der Leber durch die kurzzeitige Resveratrol-Gabe ist klar zu erkennen (**Abbildung 23**). Die kurzzeitige Behandlung mit Resveratrol (100 mg/kg) per Gavage schützt also vor endogen gebildeten oxidativen DNA-Schäden. Die Einzelstrangbrüche (SSB) in den Leberzellen werden hingegen durch Resveratrol nicht beeinflusst (**Abbildung 21**, **Abbildung 22** und **Abbildung 23**), allerdings ist die Anzahl der SSB stark von der Qualität der Hepatozyten-Präparation abhängig (**Abbildung 24**). Dies ist in ebenfalls in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen einer vorangegangenen Arbeit (Trapp, 2006).

Nachdem eine kurzzeitige Behandlung mit relativ hohen Dosen von Resveratrol zu einer Reduktion der oxidativen DNA-Basenmodifikationen in Lebern führte, sollte im Weiteren untersucht werden, wie sich eine Langzeit-Gabe von Resveratrol über das Futter auf die basalen Spiegel auswirkt. Es wurde Wildtyp-, *Ogg1<sup>-/-</sup>*- und *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen eine Diät mit 0,04% Resveratrol *ad libitum* zur Verfügung gestellt. Die Fütterung der Tiere wurde direkt nach dem Trennen von den Elterntieren (Alter: 3-4 Wochen) gestartet und dauerte bis zu 9 Monate (siehe 4.2.2.7).

Wie in bereits publizierten Studien (Baur et al., 2006; Pearson, K. J. et al., 2008), hatte die Behandlung mit der Resveratrol-Diät (0,04%) keinen Einfluss auf das Körpergewicht (**Abbildung 27**) und die Futteraufnahme (**Abbildung 26**) der einzelnen Gruppen. Da diese Parameter sehr sensitive Marker für eventuellen Stress oder nicht angemessene Haltungsbedingungen sind (AALAS, 2006), kann man von einer sehr guten Verträglichkeit der eingesetzten Resveratrol-Dosis ausgehen. Auch lagen die Serumwerte der klassischen Leberenzymparameter im Normbereich und es gab keine behandlungsbedingten Unterschiede (**Tabelle 11**). Dies steht im Einklang mit Toxizitätsstudien von Resveratrol in Mäusen, nach denen bis zu einer Dosis von 1000 mg/kg/Tag keine toxischen Effekte auftreten und es bis zu 4000 mg/kg/Tag nicht zu einer erhöhten Mortalität in *p53<sup>-/-</sup>*-Mäusen kommt (Horn et al., 2007).

Die Langzeit-Fütterung mit Resveratrol führte in allen drei verwendeten Genotypen (Wildtyp, *Ogg1<sup>-/-</sup>* und *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*) zu einer signifikanten Reduktion der basalen Spiegel an oxidativen DNA-Schäden (**Abbildung 28**, **Abbildung 29** und

**Abbildung 30**). Bei den Wildtyp-Mäusen ist die Reduktion jedoch gering (**Abbildung 28**). Wie oben bereits beschrieben, kommt es auch hier in Wildtyp-Mäusen nicht zu einem altersabhängigen Anstieg der Steady-State-Spiegel, dies ist im Einklang mit früheren Studien (Osterod et al., 2001; Osterod et al., 2002; Trapp, 2006).

Der Einfluss von Resveratrol bei den *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Tieren ist gut zu sehen und signifikant ( $p < 0,05$ ) (**Abbildung 30**). Aber der von *Klungland et al.* (Klungland et al., 1999) detektierte Anstieg der basalen oxidativen DNA-Schäden im Laufe des Lebens, ist nicht klar erkennbar, dies könnte an dem noch recht jungen Alter oder an der geringen Anzahl der Tiere liegen.

Der Schutz vor den endogenen oxidativen DNA-Schäden durch Resveratrol ist bei den *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>-Mäusen am deutlichsten erkennbar ( $p < 0,001$ ) und sowohl nach 6 bzw. 9 Monaten signifikant. Vergleicht man die Kontrollen der *Ogg1*<sup>-/-</sup> und der *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>-Mäuse in **Abbildung 29** und **Abbildung 30**, so kann man erkennen, dass der zusätzliche Ausfall des CSB-Proteins im Alter von mehreren Monaten zu einer verstärkten Akkumulation der Fpg-sensitiven Modifikationen führt. Dieser Befund ist eine Bestätigung der Studie von *Osterod et al.* (Osterod et al., 2002).

Es kann ausgeschlossen werden, dass der Schutz durch Resveratrol erst *ex vivo* während der Leberperfusion entsteht. Da ein solcher Effekt, solange die Blut- und Gewebespiegel an Resveratrol unabhängig vom Mausstamm sind, in allen Genotypen gleich stark ausgeprägt sein müsste. Aber der Befund in der vorliegenden Arbeit zeigt, dass der Schutz durch Resveratrol am stärksten in den *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>-Mäusen ist (**Abbildung 29**), dadurch können *ex vivo* Effekte die Reduktion nicht erklären.

Aus methodischer Sicht zeigen die Ergebnisse, dass reparaturdefiziente *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>-Mäuse ein nützliches Werkzeug zur Analyse endogener oxidativer DNA-Schäden und eventueller protektiver Mechanismen sind.

In verschiedenen Zellkulturmodellen konnte bereits ein Schutz vor oxidativen DNA-Schäden gezeigt werden. So schützt Resveratrol in Konzentrationen von 10-100  $\mu\text{M}$  zum Beispiel vor mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  (De Salvia et al., 2002; Quincozes-Santos et al., 2007; Sgambato et al., 2001; Ungvari et al., 2007) oder durch andere Oxidantien induzierten Schäden (Chen, M. L. et al., 2006; Ungvari et al., 2007). *In vitro* wurde hingegen gezeigt, dass Resveratrol in Anwesenheit von Kupfer zu DNA-Strangbrüchen führen kann (Win et al., 2002). Ohne die Anwesenheit von Metallen

kommt es zu keinen Einzelstrangbrüchen oder zusätzlichen Fpg-sensitiven Modifikationen in PM2-DNA (siehe **Abbildung 20**).

Neben den zahlreichen Befunden, dass Resveratrol die Krebsentstehung bzw. das Fortschreiten der Tumorgenese verhindern kann (siehe 2.6.2), schützt Resveratrol auch *in vivo* vor exogen herbeigeführtem oxidativem Stress. So konnte gezeigt werden, dass Resveratrol den Stress durch Naphtalen (Sehirli et al., 2008), und Ethanol (Kasdallah-Grissa et al., 2007) abschwächen kann. Gegen die Induktion von Mikrokernen durch Kaliumbromat, welches als Oxidants hauptsächlich 8-oxoG induziert (Ballmaier und Epe, 2006), schützt eine mehrmonatige Fütterung mit 0,002% Resveratrol jedoch nicht (Matsuoka et al., 2008).

*Barger et al.* (Barger, Jamie L. et al., 2008b) berichten, dass eine Behandlung mit 0,005% Resveratrol *ad libitum* bei Mäusen keinen Einfluss auf die Spiegel von 8-oxoG in Herz, Muskel und Gehirn hat. Die im Vergleich zu den eigenen Untersuchungen 8-mal niedrigere Dosis könnte das abweichende Ergebnis erklären. Außerdem kann ein Schutzeffekt eventuell besonders gut in der Leber detektiert werden, da die endogenen Spiegel an oxidativen DNA-Schäden hier besonders hoch sind (Osterod et al., 2001) und dadurch besser gemessen werden können. Resveratrol hat nach der Resorption im Magen-Darm-Trakt einen hohen First-Pass-Effekt (Marier et al., 2002), deshalb kommt es in der Leber zu einer gewissen Anreicherung (Vitrac et al., 2003). Vor kurzem wurde eine Studie von *Wong et al.* veröffentlicht, bei der im Einklang mit denen in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnissen ein Schutz vor oxidativen DNA-Schäden in Lebern von Mäusen gefunden wurde (Wong et al., 2009). Dabei wurde Resveratrol einer heterogenen Auszuchtpopulation verabreicht und die Spiegel an 8-oxoG mit Hilfe von Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC) detektiert. Bei dieser Studie konnte eine Reduktion der 8-oxoG-Spiegel in 12 und 18 Monate alten Mäusen nach einer 6-monatigen Behandlung mit Resveratrol (14 mg/l im Trinkwasser) gefunden werden. Allerdings sind die gemessenen Spiegel ungefähr 25-mal so hoch (ungefähr 30 8-oxoG/10<sup>6</sup> bp), wie in der vorliegenden Arbeit (maximal 1,2 Fpg-sensitive Modifikationen/10<sup>6</sup> bp). Dieser methodenabhängige Unterschied in den endogenen Spiegeln ist seit langem bekannt (Collins et al., 2004) und ist wahrscheinlich auf die die artifizielle Bildung von 8-oxoG während der Vorbereitung der DNA für die Chromatographie (ESCODD, 2002; ESCODD, 2003).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass es möglich ist die in Mäuselebern endogen entstehenden oxidativen DNA-Basenmodifikation durch die orale Gabe von Resveratrol zu reduzieren.

## 6.2 Schützt Resveratrol vor endogenen Mutationen in der Maus?

Um zu überprüfen, ob durch Resveratrol in der Nahrung die basale Mutationsrate in Mäusen beeinflusst werden kann, wurden durch mehrere Kreuzungsschritte Wildtyp BigBlue<sup>®</sup> und *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup> BigBlue<sup>®</sup> Mäuse generiert (siehe 4.2.2.2). Diese Tiere haben in ihr Genom das bakterielle, nicht transkribierte *lacI*-Gen integriert, welches als Marker für Mutationen *in vivo* dient (siehe 4.2.6). Die *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>-Mäuse haben zusätzlich zu ihren vermehrten endogen oxidativen DNA-Schäden (Osterod et al., 2002), auch eine erhöhte spontane Mutationsrate (Trapp et al., 2007a). Der in dieser Arbeit beschriebene Unterschied zu den Wildtyp-Mäusen (ca. 2,5-fach erhöht) und die absolute Mutationsrate von ungefähr  $10^{-4}$  in *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>-Mäusen (**Abbildung 32**) sind sehr ähnlich der bereits veröffentlichten Ergebnisse (Trapp et al., 2007a). Der gefundene Anstieg in der Mutationsrate beruht hauptsächlich auf vermehrten GC→TA-Transversionen und kleinen Deletionen (**Tabelle 13** und **Abbildung 33**), dies ist gleichfalls eine Bestätigung der von Trapp et al. veröffentlichten Ergebnisse (Trapp et al., 2007a). Die in **Abbildung 32** beschriebene Mutationsfrequenz der Wildtyp Kontrollen (ca.  $4 \times 10^{-5}$ ) ist ebenfalls in guter Übereinstimmung mit den Literaturwerten (de Boer et al., 1997; Klungland et al., 1999; Trapp et al., 2007a).

Der Effekt von Resveratrol auf die spontane Mutationsrate wurde in Mäusen nach 5-6 Monaten Behandlung mit der Resveratrol-Diät (0,04%) *ad libitum* analysiert. In den *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>-Mäusen sind die endogenen Mutationen um ca. 30% gesenkt ( $p < 0,05$ ) (**Abbildung 32**), der Anstieg von Wildtyp zu *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>, welcher vor allem auf vermehrten „oxidativen“ Mutationen, wie GC→TA-Transversionen, zurückzuführen ist, wird um die Hälfte reduziert.



Dies ist der erste Nachweis, dass die spontane Mutationsrate in der Leber durch den Zusatz eines Xenobiotikums gesenkt werden kann. In den Wildtyp-Mäusen ist diese Reduktion nicht zu beobachten, da die spontane Mutationsrate zu niedrig ist und insbesondere die „oxidativen“ Mutationen zu selten sind, um eine aussagekräftige Statistik durchzuführen (**Tabelle 13**). Eine leichte Reduktion der Mutationsrate im Fettgewebe von BigBlue<sup>®</sup> Mäusen wurde in einer früheren Arbeit durch Vitamin E-Supplementation (1000 IE/Tag) erreicht, dies konnte allerdings in keinem anderen Organ reproduziert werden (Moore et al., 1999). Im Kolon von transgenen Mäusen, mit dem lacZ-Gen als Mutationsmarker, konnten keine Reduktion der Mutationsraten durch andere diätische Supplemente, wie z.B. Karotten, Broccoli, Orangen, Pfeffer oder Erdbeeren erreicht werden (Trentin et al., 2004).

Den Schutz durch Resveratrol (**Abbildung 32**) sieht man bei den *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen am deutlichsten bei den Mutationsarten, welche durch die Reparaturdefizienz vermehrt entstehen (**Abbildung 33**). So sind die GC→TA-Transversionen, welche eine Art Markermutation für 8-oxoG darstellen (Bjelland und Seeberg, 2003), viel stärker reduziert als, die GC→AT-Transitionen, die häufig durch spontane Desaminierung von 5-Methylcytosin an CpG-Stellen entstehenden (Lindahl, 1993). Die bevorzugte Reduktion von „oxidativen“ Mutationen spricht für einen antioxidativen Effekt von Resveratrol *in vivo*. In den Wildtyp-Mäusen kann man durch die Resveratrol-Behandlung am ehesten eine Reduktion der Mutationsfrequenz der Deletionen erkennen, allerdings ist dieser Befund aufgrund der geringen Anzahl an Mutationen unsicher (**Tabelle 13**). Der Großteil (>85%) der analysierten Mutationen ist sicher unabhängig (**Tabelle 13**), d. h. es kam nicht stark zu klonalen Expansionen, welche entstehen, wenn eine Zelle, die eine Mutation im *lacI*-Gen trägt sich anschließend oft bzw. bevorzugt teilt (sogenannte „Jackpot“-Mutationen) (de Boer et al., 1997). Die in den 4 Gruppen vorkommenden Mikrodeletionen (Verluste von 2-66 Nukleotide) sind vorwiegend nicht an bekannten Hotspots lokalisiert (Halangoda et al., 2001).

Ist es denkbar, dass die nachgewiesenen Mutationen nicht schon in den BigBlue<sup>®</sup>-Mäusen vorliegen, sondern erst in den Bakterien entstehen? Dies könnte passieren, wenn während der Verpackung der genomischen DNA in den Phagen (siehe 4.2.6.3) ein DNA-Schaden (z.B. 8-oxoG) im *lacI*-Gen übertragen wird, welcher

in den *E.coli* Zellen durch die Replikation in eine Mutation umgewandelt würde, bevor er repariert werden kann. Aufgrund des unterschiedlichen Mutationsspektrum zwischen dem *lacI*-Gen in Lebern von BigBlue<sup>®</sup> Mäusen (siehe **Tabelle 13**) (de Boer et al., 1997) und in *E.coli* (Schaaper und Dunn, 1991), kann man annehmen, dass im Wildtyp die überwiegende Mehrheit der detektierten Mutationen in der Maus entstehen. Die spontanen Mutationen in reparaturprofizienten *E.coli* werden dominiert (ca. 70%) von 12 nt Insertionen bzw. Deletionen in Position 620 bis 631 (Schaaper und Dunn, 1991) und GC→AT Transitionen an den Hotspot-Positionen 104, 419 und 959 (Halliday und Glickman, 1991). Keine dieser Mutationen konnte in der vorliegenden Arbeit gefunden werden (**Tabelle 12**).

Man kann nun zusätzlich die Mutagenität von 8-oxoG in *E.coli* in dem *lacI* Gen abschätzen: Das *lacI*-Gen ist 1080 bp lang (Farabaugh, 1978) inklusive dem Promoter (18 bp) ergibt sich eine Länge von 1098 bp, in welchen potentiell Mutationen auftreten können (Kohler et al., 1990). Innerhalb dieses doppelsträngigen DNA-Abschnittes gibt es 644 Guanine, welche als die maximale Anzahl an „Targets“ für eine Oxidation zum 8-oxoG in Frage kommen, bisher konnten Punktmutationen in ungefähr 300 dieser Guanine detektiert werden (de Boer et al., 1997). In den 6 Monate alten *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen wurden maximal 2 Fpg-sensitive Modifikation pro  $10^6$  Guanine gefunden (**Abbildung 29**), dies bedeutet, das in ungefähr 0,1% ( $10^{-3}$ ) der Fälle eine Fpg-sensitive Modifikation in den Phagen verpackt wird. Fpg erkennt zusätzlich zu 8-oxoG auch noch weitere Basenmodifikationen, sowie AP-Läsionen (Dherin et al., 1999), dies soll für die weiteren Betrachtungen unberücksichtigt gelassen werden. Die GC→TA Mutationsfrequenz in *E.coli* von einem einzelnen 8-oxoG ist in einem einzelsträngigen Vektor 0,3% (Wood, M. L. et al., 1992) bzw. 1,8% (Moriya, 1993) Ist das 8-oxoG in ein doppelsträngiges Plasmid integriert, so ist die GC→TA Mutationsfrequenz ungefähr 1% (Pearson, C. G. et al., 2004). Daraus kann man schliessen, dass die durch eventuell übertragene DNA-Schäden (Fpg-sensitive Modifikationen) entstehenden Mutationen maximal 1 pro  $10^5$  betragen. Der Anstieg der Mutationsfrequenz von den Wildtyp-Mäusen ( $4 \times 10^{-5}$  Mutanten/pfu) zu den *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen ( $10 \times 10^{-5}$  Mutanten/pfu) ist also hauptsächlich durch eine erhöhte, spontane Mutationsrate in den Mäusen zu erklären.

Zusätzlich zu den spontanen Mutationen in den Mäusen werden auch die Mikrokerne in Erythrozyten durch eine mehrmonatige Resveratrol-Diät in Wildtyp und

*Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>-Mäusen leicht gesenkt (**Abbildung 31**). Mikrokerne sind ein weiterer sensibler Marker für Genotoxizität und das Ergebnis zeigt, dass Resveratrol die DNA schützen kann.

In den reparaturdefizienten knockout-Mäusen sind die spontanen Mikrokernraten im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren leicht erhöht (**Abbildung 31**). Dass ein Defekt in der Reparatur von 8-oxoG die Mikrokernrate in Zellen erhöht, wurde bereits gezeigt (Bravard et al., 2009).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine mehrmonatige Behandlung mit Resveratrol in der Diät reparaturdefiziente *Ogg1*<sup>-/-</sup>*Csb*<sup>-/-</sup>-Mäuse gegen spontan entstehende oxidative Mutationen im transgenen *lacI*-Gen schützt. Dies deutet auf einen antioxidativen Schutzmechanismus durch Resveratrol hin.

### 6.3 Welche Mechanismen vermitteln den Schutz durch Resveratrol?

Resveratrol in der Nahrung schützt *in vivo* vor endogenen oxidativen DNA-Schäden (siehe 6.1) und den vermutlich daraus resultierenden spontanen oxidativen Mutationen (siehe 6.2). Es gibt verschiedene Gründe, die für diesen Schutz verantwortlich sein könnten.

- (I) Eine verbesserte Reparatur der oxidativen DNA-Schäden
- (II) Eine kompaktere Chromatinstruktur, welche weniger Angriffsfläche für ROS gibt, z.B. durch Stimulation von Histondeacetylasen
- (III) Eine vermehrte Leberzellproliferation
- (IV) Direkte Radikalfängereigenschaften von Resveratrol
- (V) Eine Stimulation der zellulären antioxidativen Verteidigung

Im Folgenden werden die einzelnen Punkte anhand der erzielten Ergebnisse diskutiert.

(I) Eine verbesserte Reparatur als Ursache der Reduktion des Steady-State-Spiegels an oxidativen Basenmodifikationen, vorwiegend von 8-oxoG kann man nahezu ausschließen, da die Effekte auch in den reparaturdefizienten *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen beobachtet werden konnten (siehe **Abbildung 23**, **Abbildung 29** und **Abbildung 32**). OGG1 ist die Hauptglykosylase für die Erkennung von 8-oxoG gepaart mit Cytosin (David et al., 2007), und ein Ausfall dieses Proteins führt zu einer verlangsamten Reparatur von 8-oxoG (Klungland et al., 1999). Ist zusätzlich das CSB Protein abwesend, so wird die Reparatur fast vollständig abgeschaltet (Osterod et al., 2002), was auf einen CSB-abhängigen „Backup“-Reparaturweg hindeutet. Sind beide Proteine ausgeschaltet, so sind zumindest die dominierenden Reparaturmechanismen nicht mehr funktionstüchtig und dementsprechend auch nicht mehr induzierbar. Zusätzlich konnte in der vorliegenden Arbeit in Zellkulturversuchen nach Inkubation mit Resveratrol keine beschleunigte Reparatur von Fpg-sensitiven Basenmodifikation in Wildtyp-MEFs erkannt werden (**Abbildung 17**). Auch die Erkennung beziehungsweise der Einschnitt von oxidativen Purinmodifikationen durch die Glykosylasen (Fpg bzw. OGG1) ist *in vitro* nicht verbessert (siehe **Abbildung 19** und **Abbildung 20**).

(II) Die von Howitz et al. (Howitz et al., 2003) beschriebene Aktivierung der Histondeacetylase Sirtuin 1 (SIRT1) durch Resveratrol, könnte zu einer kompakteren Chromatinstruktur führen, dadurch stünde weniger Angriffsfläche für ROS zur Verfügung, um die DNA zu schädigen. SIRT1 deacetyliert auch noch viele andere wichtige Proteine (Finkel et al., 2009). Durch die Acetylierung von basischen Resten der Histonproteine, um die die DNA gewunden ist, kommt es zu einer Auflockerung der Gesamtchromatinstruktur (Morales et al., 2001). Die Aktivierung von SIRT1 durch Resveratrol ist allerdings sehr umstritten (Kaeberlein und Kennedy, 2007) und möglicherweise stark abhängig vom eingesetzten Substrat zur Messung der Acetylierung (Kaeberlein et al., 2005). Ein Effekt von Resveratrol auf die globale Struktur des Chromatins in einer kultivierten Zelllinie konnte erst ab 75  $\mu$ M mit Hilfe einer DNaseI-Hydrolyse gemessen werden (Anderhub, 2008). *In vivo* konnte bisher noch nicht gezeigt werden, dass die Gesamtchromatinstruktur durch Resveratrol moduliert wird.

(III) Wird die Zellproliferation in der Leber stimuliert, so wird der basale endogene oxidative DNA-Schaden gesenkt (Trapp et al., 2007b). Diese Reduktion wird darauf zurückgeführt, dass bei der DNA-Neusynthese nicht oxidierte Guanin-Moleküle in die DNA eingebaut werden und es dadurch zu einer „Verdünnung“ des oxidativen DNA-Schadens kommt. Das relative Lebergewicht ist ein sensibler Parameter für eine vermehrte Zellproliferation (Peters et al., 2005) und wird durch Resveratrol weder bei Kurzzeit-Behandlung mit 100 mg/kg Körpergewicht per Gavage (**Abbildung 37**) noch bei der Langzeit-Fütterung mit 0,04% *ad libitum* in den unterschiedlichen Genotypen (**Abbildung 36**) beeinflusst. Als Kontrolle für eine Stimulation der Proliferation von Leberzellen wird der Peroxisomenproliferator WY-14,463 verwendet. WY-14,643, wurde ursprünglich als Arzneistoff zur Behandlung von Hypertriglyceridämien entwickelt (Reddy et al., 1977), dient aber heute nur noch als Modellsubstanz, da es ein sehr potenter Agonist am Peroxisomenproliferator aktivierter Rezeptor  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ) ist (Issemann und Green, 1990). Nach der Gabe von WY-14,643 für 3 bzw. 21 Tage mit 0,025% *ad libitum* ist eine deutliche Zunahme bis hin zu einer Verdopplung des relativen Lebergewichtes zu beobachten (**Abbildung 37**). Als ein weiterer Parameter zur Kontrolle der Zellproliferation in Lebern von mit Resveratrol behandelten Mäusen wurde die Expression von Ki-67 durch Bindung eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers und anschließende durchflusszytometrische Analyse der Fluoreszenz gemessen (siehe 4.2.2.10). Das Ki-67-Antigen ist ein Protein auf der Kernmembran (Schluter et al., 1993), mit bisher noch nicht genau bekannter Funktion (Zheng et al., 2006), welches nur in den aktiven Phasen des Zellzyklus exprimiert wird (Kubbutat et al., 1994). Hepatozyten sind in einer intakten Leber zum größten Teil ausdifferenziert und somit in der G<sub>0</sub>-Phase (Ruhephase) des Zellzyklus. Sie können aber durch einen Schaden im Lebergewebe oder durch sonstige Stimulation wieder zur Replikation angeregt werden. Durch den Peroxisomenproliferator (WY-14,643) kommt es schon nach 3 Tagen zu einer Aktivierung von ungefähr 10% der Leberzellen (**Abbildung 38**). Bei den Hepatozyten aus mit Resveratrol behandelten Mäusen ist die Menge an Ki-67 nur unwesentlich höher (**Abbildung 38**), als in Zellen aus unbehandelten Tieren, es kommt also nicht zu einer Stimulation der Proliferation.

Eine vermehrte Leberzellproliferation kann die Reduktion der endogenen, oxidativen DNA-Basenmodifikationen nach Resveratrol nicht erklären.

(IV) Um Hinweise darauf zu erhalten, ob die protektiven Effekte von Resveratrol durch dessen antioxidative Wirkung vermittelt werden, wurden primäre Hepatozyten, die aus für mehrere Monate behandelten Wildtyp- und *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen gewonnen wurden, einem exogenen oxidativen Stress ( $H_2O_2$ ) ausgesetzt (siehe 4.2.2.4). Direkt im Anschluß wurde die Vitalität der Hepatozyten mit Trypanausschuß (siehe 4.2.2.5) bestimmt und die induzierten SSB mit der Alkalischen Elution quantifiziert (siehe 4.2.3). Bei beiden analysierten Endpunkten führte die Resveratrol-Fütterung zu einer erhöhten Resistenz gegen das exogene Oxidants  $H_2O_2$  (**Abbildung 34** und **Abbildung 35**). Dies war der erste Befund, dass Resveratrol als Antioxidants in Hepatozyten wirkt.

Resveratrol kann *in vitro* ROS direkt abfangen, speziell Hydroxyl-, Superoxidation- und metallkatalysierte Radikale werden dabei inaktiviert (Leonard et al., 2003). Allerdings sind die dafür benötigten Konzentrationen wesentlich höher als vermutlich *in vivo* erreicht werden. Nach der Administration von Resveratrol mit 100 mg/kg per Gavage kommt es ungefähr zu einer maximalen Plasmakonzentration von 9  $\mu M$  (Baur und Sinclair, 2006). Durch die Fütterung mit 0,04% Resveratrol *ad libitum* werden am Tag ungefähr 50 mg/kg aufgenommen (siehe 5.3.1), dies führt wahrscheinlich zu viel niedrigeren, aber konstanteren Blutspiegeln. Die direkten Radikalfängereigenschaften werden aber erst ab Konzentrationen von 75-100  $\mu M$  erreicht und auch in Zellkulturversuchen kann die direkte Anwesenheit von Resveratrol (75  $\mu M$ ) den oxidativen DNA-Schaden durch Photosensibilisatoren nicht verhindern (persönliche Mitteilung Fr.Bettina Stein). *In vivo* sind intrazellulär die Konzentrationen von GSH um mindestens den Faktor 1000 höher (Klotz, 2007), deshalb ist es unwahrscheinlich, dass eine Pflanzeninhaltsstoff wie Resveratrol seine protektiven Effekte als direkter Radikalfänger entfaltet.

(V) Die antioxidativen Schutzmechanismen der Zelle bestehen aus einem komplexen Netzwerk von endogen gebildeten Antioxidantien oder Enzymen (siehe 2.2 und **Abbildung 2**). Um den Einfluss von Resveratrol auf diese Systeme zu charakterisieren, wurde die Genexpression von verschiedenen enzymatischen Antioxidantien in Mäuselebern mit Hilfe einer quantitativen Reverse Transkriptase-PCR (qRT-PCR) bestimmt (siehe 4.2.7).

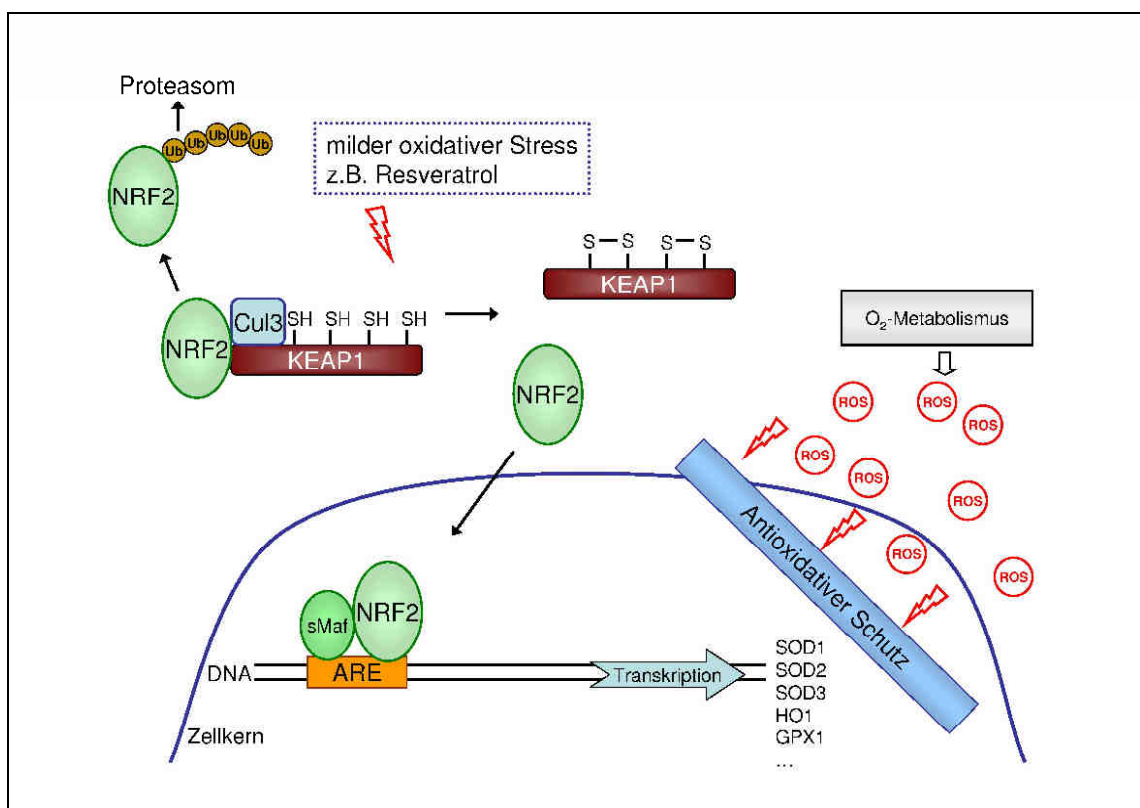
Es wurden *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäuse nach der Kurzzeit-Behandlung (7 Tage) mit 100 mg/kg Körpergewicht und nach der Langzeit-Behandlung (6 Monate) mit 0,04% *ad libitum* Resveratrol analysiert.

In den Lebern aus denen für 7 Tage behandelten *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen kommt es zu einer Hochregulation der mRNA-Level für SOD1, SOD2, SOD3, GPX1 und HO1 (**Abbildung 40**). Die Expression von CAT, NRF2 und SIRT1 wird durch die Resveratrol-Behandlung nicht bzw. nur marginal beeinflusst. Die Expression von SOD1, SOD2 und GPX wird ungefähr verdoppelt und die von HO1 erhöht sich auf den dreifachen Wert im Vergleich zu den Kontrollen (**Abbildung 40**). Bei den *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen, welche für 6 Monate mit 0,04% Resveratrol *ad libitum* gefüttert wurden, sind die selben Gene in ihrer Expression verändert, allerdings ist das Ausmaß der Hochregulation wesentlich moderater (**Abbildung 41**). Dies kann entweder an der niedrigeren, eingenommenen Resveratrol-Dosis (von ca. 50 mg/kg/Tag) (siehe 5.3.2) liegen, oder es kommt im Laufe der Zeit zu adaptiven Veränderungen im Enzymnetzwerk. Diese leichten Änderungen sind aber in Hepatozyten ausreichend für einen Schutz gegen exogenen oxidativen Stress (**Abbildung 35**). Dies könnte insbesondere der Fall sein, da möglicherweise weitere antioxidative Gene durch Resveratrol ebenfalls mitbeeinflusst werden. Nach einer Langzeit-Behandlung von Wildtyp-Mäusen mit Resveratrol kommt es nur zu einer minimalen Veränderung der Genexpression (**Abbildung 42**), trotzdem sind auch die Zellen dieser Tiere vor oxidativem Stress geschützt (**Abbildung 35**). Auch hier könnte der Grund in der veränderten Expression von weiteren, hier nicht untersuchten Genen liegen. Eventuell kommt es zu synergistischen Effekten zwischen den einzelnen Schutzenzymen.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass in primären Hepatozyten aus Mäusen, welche die Kurzzeit-Behandlung mit Resveratrol erhalten haben, die Gesamtglutathionspiegel tendenziell erhöht werden (**Abbildung 39**).

Der Einfluss von Resveratrol auf die Genexpression ist in verschiedenen Zellkulturmodellen, bereits beschrieben worden, mit leichten unterschiedlichen Ergebnissen. Es konnte eine Erhöhung der GPX, CAT und SOD in kultivierten glatten Muskelzellen gefunden werden (Li, Y. et al., 2006). In Rattenaortenzellen konnte hingegen eine Induktion von HO1, GPX1 und CAT, aber nicht der SOD-Isoformen gefunden werden (Ungvari et al., 2007). In MRC-5 Zellen kam es hingegen

zu einer Stimulation der Expression von SOD1 und SOD2 nach der Inkubation mit Resveratrol (Robb et al., 2008). Eine Induktion von SIRT1 wurde nicht gefunden (Barger, Jamie L. et al., 2008b) im Einklang mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (**Abbildung 40**). Die verstärkte Expression von HO1 wurde in Zellkulturmodellen ebenfalls nachgewiesen (Juan et al., 2005; Zhuang et al., 2003) und als NRF2-abhängig charakterisiert (Chen, C. Y. et al., 2005). In primären Rattenhepatozyten wurden sogar NRF2-mRNA-Spiegel (Rubiolo et al., 2008) durch Resveratrol erhöht, eine ähnliche Tendenz konnte nur in den *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen mit Kurzzeit-Behandlung Resveratrol entdeckt werden (**Abbildung 40**). Mit Transkriptom-Analysen in Mäuseherzen nach der Gabe von Resveratrol mit 0,001% *ad libitum* konnte ein Induktion des „Cellular response to stress“-Pathways gezeigt werden (Barger, J. L. et al., 2008a).



**Abbildung 45: Möglicher Schutzmechanismus vor ROS durch Resveratrol**



In **Abbildung 45** ist schematisch ein möglicher genereller Mechanismus des Schutzes durch Resveratrol dargestellt. Im physiologischen Zustand einer Zelle ist NRF2 im Cytosol mit KEAP1 und einer Cul3-abhängigen Ubiquitinligase in einem Komplex verbunden und wird nach einer Polyubitynylierung durch das Proteasom abgebaut (Kensler et al., 2007). Kommt es nun zu einem milden oxidativen Stress, wie zum Beispiel durch das Polyphenol Resveratrol, werden redox-sensitive Cysteinreste in KEAP1 oxidiert und dadurch wird der Transkriptionsfaktor NRF2 frei. Dieser transloziert anschließend in den Zellkern und kann nach Dimerisierung mit sMaf an das *antioxidative response element* (ARE) binden und die Transkription von antioxidativen und cytoprotektiven Enzymen einleiten (Li, W. et al., 2008). Diese bilden einen Schutzwall in Kern und Cytoplasma gegen endogen und exogen gebildete ROS, welche DNA schädigen und dadurch auch zu Mutationen führen können.

Dieser beschriebene Schutzmechanismus ist eine Erklärung für den sogenannten „Hormesis-Effekt“, welcher besagt, dass ein milder Stress zu einer Aktivierung der Stressantwort führt, welche den Organismus vor späterem Stress schützt (Calabrese, 2008; Gems und Partridge, 2008). Durch dieses Phänomen werden einige biphasischen Dosis-Wirkungs-Beziehungen auch bei der Genotoxizität und Kanzerogenese erklärt (Fukushima et al., 2005).

Abschließend kann man aus allen Ergebnissen schlussfolgern, dass oral verabreichtes Resveratrol vor oxidativen DNA-Basenmodifikationen schützt und die spontane Mutationsrate in den reparaturdefizienten *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>*-Mäusen senkt. Dies wird wahrscheinlich über eine Hochregulation der antioxidativen Schutzenzyme vermittelt.

#### 6.4 Führt ein Ausfall einzelner Komponenten der antioxidativen Verteidigung einer Zelle zu erhöhten oxidativen DNA Schäden?

Eine globale Stimulation der antioxidativen Schutzmechanismen, möglicherweise über NRF2 vermittelt (siehe 6.3), durch das Polyphenol Resveratrol führt zu reduzierten Spiegeln endogener oxidativer DNA-Schäden. Nun ist es von Interesse, ob der Ausfall eines dieser Schutzenzyme direkt zu einem Anstieg der oxidativen DNA-Basenmodifikationen führt oder ob dann Kompensationsmechanismen einspringen.

Der Ausfall eines Allels des *Sod2*-Gens (*Sod2*<sup>+/-</sup>) führt in 6-8 Monate alten Mäusen nicht zu erhöhten Spiegeln an oxidativen DNA-Basenmodifikationen in primären Knochenmarkszellen (**Abbildung 43**). Möglicherweise kann man dies durch die vorwiegende Lokalisation der SOD2 in den Mitochondrien erklären (Da Cruz et al., 2003), da mit der Alkalischen Elution die Schäden in der nukleären, chromosomalen DNA quantifiziert werden (Kohn et al., 1976). Es konnte schon gezeigt werden, dass die in Mitochondrien produzierten ROS nur unwesentlich zu den Steady-State-Spiegeln von nukleären, oxidativen DNA-Modifikationen beitragen (Hoffmann et al., 2004). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist die geringere Reduktion der SOD2-Proteinmenge in Knochenmarkszellen verglichen mit anderen Geweben (Guachalla et al., 2009). In anderen Organen konnten erhöhte 8-oxoG-Spiegel in älteren *Sod2*<sup>+/-</sup>-Mäusen gefunden werden (Van Remmen et al., 2003). *Sod2*-knockout-Mäuse sterben im Alter von 3 Wochen hauptsächlich an Kardiomyopathie (Lebovitz et al., 1996; Li, Y. et al., 1995), deshalb ist es in diesen nicht möglich, eine altersabhängige Akkumulation von oxidativen Schäden zu untersuchen.

In wiefern sich der Ausfall der Hämoxygenase 1 (HO1) auf die basalen Spiegel der oxidativen DNA-Schäden in der Leber auswirkt wurde an *Ho1*-knockout-Mäusen überprüft. Nach der oralen Administration von Resveratrol war die HO1 von den untersuchten Genen am stärksten in ihrer Expression verändert (**Abbildung 40** und **Abbildung 41**). Es kommt in 6 Monate alten Tieren weder in heterozygoten (*Ho1*<sup>+/-</sup>), noch in homozygoten (*Ho1*<sup>-/-</sup>) *knockout*-Mäusen zu einem Anstieg der endogenen oxidativen Basenmodifikationen (**Abbildung 44**). Die HO1 ist der Geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Degradation von Häm, wobei

Kohlenmonoxid, Biliverdin und Eisen gebildet wird, welche alle drei mit antioxidativen Effekten assoziiert sind (Ryter und Choi, 2009). HO1 ist im physiologischen Zustand nur wenig exprimiert, wird aber bei oxidativem Stress, wie z.B. durch Pflanzenphenole, schnell und stark über den KEAP1-NRF2-ARE-Weg induziert (Applegate et al., 1991). Der Schutz vor oxidativen DNA-Schäden durch die HO1 könnte eventuell durch die hohe metabolische Aktivität der Leberzellen, bei der viele ROS entstehen, überlagert werden. Es wurde aber bereits in früheren Arbeiten gezeigt, dass Endothelzellen aus *HO1*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen empfindlicher gegenüber Prooxidantien sind und mehr ROS produzieren (Poss und Tonegawa, 1997). *Ho1*<sup>-/-</sup>-Mäuse haben eine erhöhte Mortalität nach Ischämie mit anschließender Reperfusion (Duckers et al., 2001) und entwickeln unter chronischer Hypoxie verstärkt Myokardinfarkte (Yet et al., 1999).

Die Ergebnisse zeigen, dass der Ausfall einer einzelnen Komponente des antioxidativen Schutzschildes nicht automatisch zu erhöhten oxidativen DNA-Schäden führt, sondern dies sehr von der organspezifischen Expression, der entsprechenden zytoprotektiven Funktion und intrazellulären Lokalisation der jeweiligen Enzyme abhängig ist.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- AALAS (2006). Laboratory Mouse Handbook. Memphis, TN, USA, American Association of Laboratory Animal Science.
- Aas, P.A., Otterlei, M., Falnes, P.O., Vagbo, C.B., Skorpen, F., Akbari, M., Sundheim, O., Bjoras, M., Slupphaug, G., Seeberg, E. and Krokan, H.E. (2003). "Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA." Nature 421(6925): 859-63.
- Afaq, F., Adhami, V.M. and Ahmad, N. (2003). "Prevention of short-term ultraviolet B radiation-mediated damages by resveratrol in SKH-1 hairless mice." Toxicol Appl Pharmacol 186(1): 28-37.
- Ahel, I., Rass, U., El-Khamisy, S.F., Katyal, S., Clements, P.M., McKinnon, P.J., Caldecott, K.W. and West, S.C. (2006). "The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates." Nature 443(7112): 713-6.
- Ahmad, N., Adhami, V.M., Afaq, F., Feyes, D.K. and Mukhtar, H. (2001). "Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells." Clin Cancer Res 7(5): 1466-73.
- Ames, B.N. and Gold, L.S. (2000). "Paracelsus to parascience: the environmental cancer distraction." Mutat Res 447(1): 3-13.
- Anderhub, S. (2008). "Einfluss der Chromatinstruktur auf die Genexpression " Diplomarbeit, Biomedizinische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Anekonda, T.S. (2006). "Resveratrol--a boon for treating Alzheimer's disease?" Brain Res Rev 52(2): 316-26.
- Applegate, L.A., Luscher, P. and Tyrrell, R.M. (1991). "Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells." Cancer Res 51(3): 974-8.
- Araki, M., Masutani, C., Takemura, M., Uchida, A., Sugasawa, K., Kondoh, J., Ohkuma, Y. and Hanaoka, F. (2001). "Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair." J Biol Chem 276(22): 18665-72.
- Athar, M., Back, J.H., Kopelovich, L., Bickers, D.R. and Kim, A.L. (2009). "Multiple molecular targets of resveratrol: Anti-carcinogenic mechanisms." Arch Biochem Biophys 486(2): 95-102.
- Aziz, M.H., Afaq, F. and Ahmad, N. (2005). "Prevention of ultraviolet-B radiation damage by resveratrol in mouse skin is mediated via modulation in survivin." Photochem Photobiol 81(1): 25-31.

- Ballmaier, D. (1997). "Oxidative Sauerstoffmodifikationen durch extrazellulär und intrazellulär gebildete reaktive Sauerstoffspezies." Dissertation, Pharmakologie & Toxikologie, Universität Würzburg.
- Ballmaier, D. and Epe, B. (2006). "DNA damage by bromate: mechanism and consequences." Toxicology 221(2-3): 166-71.
- Banerjee, S., Bueso-Ramos, C. and Aggarwal, B.B. (2002). "Suppression of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol: role of nuclear factor-kappaB, cyclooxygenase 2, and matrix metalloprotease 9." Cancer Res 62(17): 4945-54.
- Barbe, L., Lundberg, E., Oksvold, P., Stenius, A., Lewin, E., Bjorling, E., Asplund, A., Ponten, F., Brismar, H., Uhlen, M. and Andersson-Svahn, H. (2008). "Toward a confocal subcellular atlas of the human proteome." Mol Cell Proteomics 7(3): 499-508.
- Barger, J.L., Kayo, T., Pugh, T.D., Prolla, T.A. and Weindruch, R. (2008a). "Short-term consumption of a resveratrol-containing nutraceutical mixture mimics gene expression of long-term caloric restriction in mouse heart." Experimental Gerontology 43(9): 859-866.
- Barger, J.L., Kayo, T., Vann, J.M., Arias, E.B., Wang, J., Hacker, T.A., Wang, Y., Raederstorff, D., Morrow, J.D., Leeuwenburgh, C., Allison, D.B., Saupe, K.W., Cartee, G.D., et al. (2008b). "A Low Dose of Dietary Resveratrol Partially Mimics Caloric Restriction and Retards Aging Parameters in Mice." PLoS ONE 3(6): e2264.
- Barnes, D.E. and Lindahl, T. (2004). "Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells." Annu Rev Genet 38: 445-76.
- Bauer, J.H., Goupil, S., Garber, G.B. and Helfand, S.L. (2004). "An accelerated assay for the identification of lifespan-extending interventions in *Drosophila melanogaster*." Proc Natl Acad Sci U S A 101(35): 12980-5.
- Baur, J.A., Pearson, K.J., Price, N.L., Jamieson, H.A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V.V., Allard, J.S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P.J., Poosala, S., Becker, K.G., et al. (2006). "Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet." Nature 444(7117): 337-42.
- Baur, J.A. and Sinclair, D.A. (2006). "Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence." Nat Rev Drug Discov 5(6): 493-506.
- Beher, D., Wu, J., Cumine, S., Kim, K.W., Lu, S.C., Atangan, L. and Wang, M. (2009). "Resveratrol is Not a Direct Activator of SIRT1 Enzyme Activity." Chem Biol Drug Des.
- Bercht, M. (2006). "Generierung und Prozessierung oxidativer DNA Schäden." Dissertation, Pharmazie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

- Bhat, K.P., Lantvit, D., Christov, K., Mehta, R.G., Moon, R.C. and Pezzuto, J.M. (2001). "Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models." Cancer Res 61(20): 7456-63.
- Bishayee, A. (2009). "Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials." Cancer Prev Res (Phila Pa) 2(5): 409-18.
- Bishayee, A. and Dhir, N. (2009). "Resveratrol-mediated chemoprevention of diethylnitrosamine-initiated hepatocarcinogenesis: inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis." Chem Biol Interact 179(2-3): 131-44.
- Bjelland, S. and Seeberg, E. (2003). "Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation." Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 531(1-2): 37-80.
- Bjoras, M., Luna, L., Johnsen, B., Hoff, E., Haug, T., Rognes, T. and Seeberg, E. (1997). "Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites." Embo J 16(20): 6314-22.
- Boiteux, S., O'Connor, T.R. and Laval, J. (1987). "Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of Escherichia coli: cloning and sequencing of the fpg structural gene and overproduction of the protein." EMBO J 6(10): 3177-83.
- Boiteux, S., O'Connor, T.R., Lederer, F., Gouyette, A. and Laval, J. (1990). "Homogeneous Escherichia coli FPG protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/apyrimidinic sites." J Biol Chem 265(7): 3916-22.
- Boiteux, S. and Radicella, J.P. (2000). "The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis." Arch Biochem Biophys 377(1): 1-8.
- Boveris, A., Oshino, N. and Chance, B. (1972). "The cellular production of hydrogen peroxide." Biochem J 128(3): 617-30.
- Boveris, A., Valdez, L.B., Zaobornyj, T. and Bustamante, J. (2006). "Mitochondrial metabolic states regulate nitric oxide and hydrogen peroxide diffusion to the cytosol." Biochim Biophys Acta 1757(5-6): 535-42.
- Bravard, A., Vacher, M., Gouget, B., Coutant, A., de Boisferon, F.H., Marsin, S., Chevillard, S. and Radicella, J.P. (2006). "Redox regulation of human OGG1 activity in response to cellular oxidative stress." Mol Cell Biol 26(20): 7430-6.
- Bravard, A., Vacher, M., Moritz, E., Vaslin, L., Hall, J., Epe, B. and Radicella, J.P. (2009). "Oxidation status of human OGG1-S326C polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity." Cancer Res 69(8): 3642-9.

- Breslin, C. and Caldecott, K.W. (2009). "DNA 3'-phosphatase activity is critical for rapid global rates of single-strand break repair following oxidative stress." Mol Cell Biol 29(17): 4653-62.
- Brigelius-Flohe, R. (2006). "Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors." Biol Chem 387(10-11): 1329-35.
- Brooks, P.J. (2007). "The case for 8,5'-cyclopurine-2'-deoxynucleosides as endogenous DNA lesions that cause neurodegeneration in xeroderma pigmentosum." Neuroscience 145(4): 1407-17.
- Brosh, R.M., Jr and Bohr, V.A. (2007). "Human premature aging, DNA repair and RecQ helicases." Nucl. Acids Res. 35(22): 7527-7544.
- Bundesamt, (2009). Gesundheit - Todesursachen in Deutschland. DESTATIS. Wiesbaden, Statistisches Bundesamt.
- Burns, J., Yokota, T., Ashihara, H., Lean, M.E. and Crozier, A. (2002). "Plant foods and herbal sources of resveratrol." J Agric Food Chem 50(11): 3337-40.
- Burton, G.W. and Ingold, K.U. (1989). "Vitamin E as an in vitro and in vivo antioxidant." Ann N Y Acad Sci 570: 7-22.
- Busquets, S., Ametller, E., Fuster, G., Olivan, M., Raab, V., Argiles, J.M. and Lopez-Soriano, F.J. (2007). "Resveratrol, a natural diphenol, reduces metastatic growth in an experimental cancer model." Cancer Lett 245(1-2): 144-8.
- Calabrese, E.J. (2008). "Hormesis and medicine." British Journal of Clinical Pharmacology 66(5): 594-617.
- Caldecott, K.W. (2001). "Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair." Bioessays 23(5): 447-55.
- Carbo, N., Costelli, P., Baccino, F.M., Lopez-Soriano, F.J. and Argiles, J.M. (1999). "Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumour growth in a rat tumour model." Biochem Biophys Res Commun 254(3): 739-43.
- Careri, M., Corradini, C., Elviri, L., Nicoletti, I. and Zagnoni, I. (2004). "Liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry of cis-resveratrol and trans-resveratrol: development, validation, and application of the method to red wine, grape, and winemaking byproducts." J Agric Food Chem 52(23): 6868-74.
- Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979). "Hydroperoxide metabolism in mammalian organs." Physiol Rev 59(3): 527-605.
- Chen, C.Y., Jang, J.H., Li, M.H. and Surh, Y.J. (2005). "Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells." Biochem Biophys Res Commun 331(4): 993-1000.

- Chen, M.L., Li, J., Xiao, W.R., Sun, L., Tang, H., Wang, L., Wu, L.Y., Chen, X. and Xie, H.F. (2006). "Protective effect of resveratrol against oxidative damage of UVA irradiated HaCaT cells." Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 31(5): 635-9.
- Chen, Y., Tseng, S.H., Lai, H.S. and Chen, W.J. (2004). "Resveratrol-induced cellular apoptosis and cell cycle arrest in neuroblastoma cells and antitumor effects on neuroblastoma in mice." Surgery 136(1): 57-66.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem 162(1): 156-9.
- Coles, B.F. and Kadlubar, F.F. (2003). "Detoxification of electrophilic compounds by glutathione S-transferase catalysis: determinants of individual response to chemical carcinogens and chemotherapeutic drugs?" Biofactors 17(1-4): 115-30.
- Collins, A.R., Cadet, J., Moller, L., Poulsen, H.E. and Vina, J. (2004). "Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells?" Arch Biochem Biophys 423(1): 57-65.
- Da Cruz, S., Xenarios, I., Langridge, J., Vilbois, F., Parone, P.A. and Martinou, J.C. (2003). "Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane." J Biol Chem 278(42): 41566-71.
- Daniels, D.S., Woo, T.T., Luu, K.X., Noll, D.M., Clarke, N.D., Pegg, A.E. and Tainer, J.A. (2004). "DNA binding and nucleotide flipping by the human DNA repair protein AGT." Nat Struct Mol Biol 11(8): 714-20.
- David, S.S., O'Shea, V.L. and Kundu, S. (2007). "Base-excision repair of oxidative DNA damage." Nature 447(7147): 941-50.
- de Boer, J.G., Erfle, H., Walsh, D., Holcroft, J., Provost, J.S., Rogers, B., Tindall, K.R. and Glickman, B.W. (1997). "Spectrum of spontaneous mutations in liver tissue of lacI transgenic mice." Environ Mol Mutagen 30(3): 273-86.
- de la Lastra, C.A. and Villegas, I. (2007). "Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications." Biochem Soc Trans 35(Pt 5): 1156-60.
- De Salvia, R., Festa, F., Ricordy, R., Perticone, P. and Cozzi, R. (2002). "Resveratrol affects in a different way primary versus fixed DNA damage induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in mammalian cells in vitro." Toxicol Lett 135(1-2): 1-9.
- Delmas, D., Rebe, C., Lacour, S., Filomenko, R., Athias, A., Gambert, P., Cherkaoui-Malki, M., Jannin, B., Dubrez-Daloz, L., Latruffe, N. and Solary, E. (2003). "Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells." J Biol Chem 278(42): 41482-90.



- Delmas, D., Rebe, C., Micheau, O., Athias, A., Gambert, P., Grazide, S., Laurent, G., Latruffe, N. and Solary, E. (2004). "Redistribution of CD95, DR4 and DR5 in rafts accounts for the synergistic toxicity of resveratrol and death receptor ligands in colon carcinoma cells." Oncogene 23(55): 8979-86.
- Dherin, C., Radicella, J.P., Dizdaroglu, M. and Boiteux, S. (1999). "Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human alpha-hOgg1 protein and the polymorphic alpha-hOgg1(Ser326Cys) protein which is frequently found in human populations." Nucleic Acids Res 27(20): 4001-7.
- Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Cole, R.N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M. and Talalay, P. (2002). "Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants." Proc Natl Acad Sci U S A 99(18): 11908-13.
- Dizdaroglu, M. (1992). "Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin." Mutat Res 275(3-6): 331-42.
- Dorrie, J., Gerauer, H., Wachter, Y. and Zunino, S.J. (2001). "Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells." Cancer Res 61(12): 4731-9.
- Duckers, H.J., Boehm, M., True, A.L., Yet, S.F., San, H., Park, J.L., Clinton Webb, R., Lee, M.E., Nabel, G.J. and Nabel, E.G. (2001). "Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation." Nat Med 7(6): 693-8.
- Dycaico, M.J., Provost, G.S., Kretz, P.L., Ransom, S.L., Moores, J.C. and Short, J.M. (1994). "The use of shuttle vectors for mutation analysis in transgenic mice and rats." Mutat Res 307(2): 461-78.
- Eiberger, W., Volkmer, B., Amouroux, R., Dherin, C., Radicella, J.P. and Epe, B. (2008). "Oxidative stress impairs the repair of oxidative DNA base modifications in human skin fibroblasts and melanoma cells." DNA Repair (Amst) 7(6): 912-21.
- Eker, A.P., Quayle, C., Chaves, I. and van der Horst, G.T. (2009). "DNA repair in mammalian cells: Direct DNA damage reversal: elegant solutions for nasty problems." Cell Mol Life Sci 66(6): 968-80.
- Elchuri, S., Oberley, T.D., Qi, W., Eisenstein, R.S., Jackson Roberts, L., Van Remmen, H., Epstein, C.J. and Huang, T.-T. (2004). "CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life." Oncogene 24(3): 367-380.
- Epe, B. (1995). "DNA damage profiles induced by oxidising agents." Rev Physiol Biochem Pharmacol 127: 223-249.
- Epe, B. (2002). "Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice?" Biol Chem 383(3-4): 467-75.

- Epe, B. and Hegler, J. (1994). "Oxidative DNA damage: endonuclease fingerprinting." Methods Enzymol 234: 122-31.
- Epe, B., Mutzel, P. and Adam, W. (1988). "DNA damage by oxygen radicals and excited state species: a comparative study using enzymatic probes in vitro." Chem Biol Interact 67(1-2): 149-65.
- Epe, B., Pflaum, M. and Boiteux, S. (1993). "DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems." Mutat Res 299(3-4): 135-45.
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H. and Aykin-Burns, N. (2001). "Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage." Curr Top Med Chem 1(6): 529-39.
- ESCODD (2002). "Comparative analysis of baseline 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: an approach to consensus." Carcinogenesis 23(12): 2129-33.
- ESCODD (2003). "Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods." Free Radic Biol Med 34(8): 1089-99.
- Estrov, Z., Shishodia, S., Faderl, S., Harris, D., Van, Q., Kantarjian, H.M., Talpaz, M. and Aggarwal, B.B. (2003). "Resveratrol blocks interleukin-1beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kappaB, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells." Blood 102(3): 987-95.
- Farabaugh, P.J. (1978). "Sequence of the lacI gene." Nature 274(5673): 765-9.
- Farmer, H., McCabe, N., Lord, C.J., Tutt, A.N., Johnson, D.A., Richardson, T.B., Santarosa, M., Dillon, K.J., Hickson, I., Knights, C., Martin, N.M., Jackson, S.P., Smith, G.C., et al. (2005). "Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy." Nature 434(7035): 917-21.
- Finkel, T., Deng, C.X. and Mostoslavsky, R. (2009). "Recent progress in the biology and physiology of sirtuins." Nature 460(7255): 587-91.
- Fleige, S. and Pfaffl, M.W. (2006). "RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance." Mol Aspects Med 27(2-3): 126-39.
- Flohr, C. (2003). "Untersuchungen zur Beeinflussung der Reparatur oxidativer DNA-Schäden durch Poly(ADP-Ribose)-Polymerase, AP-Endonuklease 1 und das Xeroderma pigmentosum A Protein." Dissertation, Pharmazie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Folkmann, J.K., Loft, S. and Moller, P. (2007). "Oxidatively damaged DNA in aging dyslipidemic ApoE<sup>-/-</sup> and wild-type mice." Mutagenesis 22(2): 105-10.

- Fortini, P. and 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(4): 398-409.
- Friedberg, E.C. (2001). "How nucleotide excision repair protects against cancer." Nat Rev Cancer 1(1): 22-33.
- Friedberg, E.C. (2003). "DNA damage and repair." Nature 421(6921): 436-440.
- Frosina, G., Fortini, P., Rossi, O., Carrozzino, F., Raspaglio, G., Cox, L.S., Lane, D.P., Abbondandolo, A. and Dogliotti, E. (1996). "Two pathways for base excision repair in mammalian cells." J Biol Chem 271(16): 9573-8.
- Fukushima, S., Kinoshita, A., Puatanachokchai, R., Kushida, M., Wanibuchi, H. and Morimura, K. (2005). "Hormesis and dose-response-mediated mechanisms in carcinogenesis: evidence for a threshold in carcinogenicity of non-genotoxic carcinogens." Carcinogenesis 26(11): 1835-1845.
- Gatz, S.A. and Wiesmuller, L. (2008). "Take a break--resveratrol in action on DNA." Carcinogenesis 29(2): 321-32.
- Gems, D. and Partridge, L. (2008). "Stress-Response Hormesis and Aging: "That which Does Not Kill Us Makes Us Stronger"." Cell Metabolism 7(3): 200-203.
- Griffith, O.W. (1985). "Glutathione and glutathione disulphide." In: Bernt, E., Bergmeyer, H.U. (Ed.), Methods of enzymatic analysis: 522-529.
- Guachalla, L.M., Ju, Z., Koziel, R., von Figura, G., Song, Z., Fusser, M., Epe, B., Jansen-Dürr, P. and Rudolph, K.L. (2009). "Sod2 haploinsufficiency does not accelerate aging of telomere dysfunctional mice." Aging 1(3): 303-315.
- Halangoda, A., Still, J.G., Hill, K.A. and Sommer, S.S. (2001). "Spontaneous microdeletions and microinsertions in a transgenic mouse mutation detection system: analysis of age, tissue, and sequence specificity." Environ Mol Mutagen 37(4): 311-23.
- Halliday, J.A. and Glickman, B.W. (1991). "Mechanisms of spontaneous mutation in DNA repair-proficient Escherichia coli." Mutat Res 250(1-2): 55-71.
- Halliwell, B. (1996). "Antioxidants in human health and disease." Annu Rev Nutr 16: 33-50.
- Halliwell, B. and Aruoma, O.I. (1991). "DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems." FEBS Lett 281(1-2): 9-19.
- Hao, H.D. and He, L.R. (2004). "Mechanisms of cardiovascular protection by resveratrol." J Med Food 7(3): 290-8.
- Harikumar, K.B. and Aggarwal, B.B. (2008). "Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases." Cell Cycle 7(8): 1020-35.

- Harper, C.E., Patel, B.B., Wang, J., Arabshahi, A., Eltoum, I.A. and Lamartiniere, C.A. (2007). "Resveratrol suppresses prostate cancer progression in transgenic mice." Carcinogenesis 28(9): 1946-53.
- Heddle, J.A. (1973). "A rapid in vivo test for chromosomal damage." Mutat Res 18(2): 187-90.
- Heinmoller, P.W., Hill, K.A. and Sommer, S.S. (2000). "High plating density improves Big Blue system efficiency without loss of sensitivity." Mutat Res 453(1): 97-103.
- Helleday, T., Petermann, E., Lundin, C., Hodgson, B. and Sharma, R.A. (2008). "DNA repair pathways as targets for cancer therapy." Nat Rev Cancer 8(3): 193-204.
- Hengstler, J.G., Utesch, D., Steinberg, P., Platt, K.L., Diener, B., Ringel, M., Swales, N., Fischer, T., Biefang, K., Gerl, M., Bottger, T. and Oesch, F. (2000). "Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction." Drug Metab Rev 32(1): 81-118.
- Hoeijmakers, J.H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature 411(6835): 366-74.
- Hoffmann, S., Spitkovsky, D., Radicella, J.P., Epe, B. and Wiesner, R.J. (2004). "Reactive oxygen species derived from the mitochondrial respiratory chain are not responsible for the basal levels of oxidative base modifications observed in nuclear DNA of Mammalian cells." Free Radic Biol Med 36(6): 765-73.
- Hollenbach, S., Dhenaut, A., Eckert, I., Radicella, J.P. and Epe, B. (1999). "Overexpression of Ogg1 in mammalian cells: effects on induced and spontaneous oxidative DNA damage and mutagenesis." Carcinogenesis 20(9): 1863-8.
- Horn, T.L., Cwik, M.J., Morrissey, R.L., Kapetanovic, I., Crowell, J.A., Booth, T.D. and McCormick, D.L. (2007). "Oncogenicity evaluation of resveratrol in p53(+/-) (p53 knockout) mice." Food Chem Toxicol 45(1): 55-63.
- Howitz, K.T., Bitterman, K.J., Cohen, H.Y., Lamming, D.W., Lavu, S., Wood, J.G., Zipkin, R.E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L.L., Scherer, B. and Sinclair, D.A. (2003). "Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan." Nature 425(6954): 191-6.
- Hsieh, T.C., Juan, G., Darzynkiewicz, Z. and Wu, J.M. (1999). "Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21(WAF1/CIP1), and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G2." Cancer Res 59(11): 2596-601.

- Huang, C., Ma, W.Y., Goranson, A. and Dong, Z. (1999). "Resveratrol suppresses cell transformation and induces apoptosis through a p53-dependent pathway." Carcinogenesis 20(2): 237-42.
- Huttermann, J. (1982). "Solid-state radiation chemistry of DNA and its constituents." Ultramicroscopy 10(1-2): 25-40.
- Ingram, D.K., Zhu, M., Mamczarz, J., Zou, S., Lane, M.A., Roth, G.S. and deCabo, R. (2006). "Calorie restriction mimetics: an emerging research field." Aging Cell 5(2): 97-108.
- Issemann, I. and Green, S. (1990). "Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators." Nature 347(6294): 645-50.
- Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D. and Yamamoto, M. (1999). "Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain." Genes Dev 13(1): 76-86.
- Jackson, S.P. and Bartek, J. (2009). "The DNA-damage response in human biology and disease." Nature 461(7267): 1071-1078.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C. and Pezzuto, J.M. (1997). "Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes." Science 275(5297): 218-20.
- Jang, M. and Pezzuto, J.M. (1998). "Effects of resveratrol on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced oxidative events and gene expression in mouse skin." Cancer Lett 134(1): 81-9.
- Juan, S.H., Cheng, T.H., Lin, H.C., Chu, Y.L. and Lee, W.S. (2005). "Mechanism of concentration-dependent induction of heme oxygenase-1 by resveratrol in human aortic smooth muscle cells." Biochem Pharmacol 69(1): 41-8.
- Kaeberlein, M. and Kennedy, B.K. (2007). "Does resveratrol activate yeast Sir2 in vivo?" Aging Cell 6(4): 415-6.
- Kaeberlein, M., McDonagh, T., Heltweg, B., Hixon, J., Westman, E.A., Caldwell, S.D., Napper, A., Curtis, R., DiStefano, P.S., Fields, S., Bedalov, A. and Kennedy, B.K. (2005). "Substrate-specific activation of sirtuins by resveratrol." J Biol Chem 280(17): 17038-45.
- Kang, M.I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S.G. and Yamamoto, M. (2004). "Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes." Proc Natl Acad Sci U S A 101(7): 2046-51.
- Kapadia, G.J., Azuine, M.A., Tokuda, H., Takasaki, M., Mukainaka, T., Konoshima, T. and Nishino, H. (2002). "Chemopreventive effect of resveratrol, sesamol, sesame oil and sunflower oil in the Epstein-Barr virus early antigen activation

- assay and the mouse skin two-stage carcinogenesis." Pharmacol Res 45(6): 499-505.
- Kasdallah-Grissa, A., Mornagui, B., Aouani, E., Hammami, M., El May, M., Gharbi, N., Kamoun, A. and El-Fazaa, S. (2007). "Resveratrol, a red wine polyphenol, attenuates ethanol-induced oxidative stress in rat liver." Life Sci 80(11): 1033-9.
- Kensler, T.W., Wakabayashi, N. and Biswal, S. (2007). "Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway." Annu Rev Pharmacol Toxicol 47: 89-116.
- Keyse, S.M. and Tyrrell, R.M. (1989). "Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite." Proc Natl Acad Sci U S A 86(1): 99-103.
- Khanduja, K.L., Bhardwaj, A. and Kaushik, G. (2004). "Resveratrol inhibits N-nitrosodiethylamine-induced ornithine decarboxylase and cyclooxygenase in mice." J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 50(1): 61-5.
- Khanna, K.K. and Jackson, S.P. (2001). "DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection." Nat Genet 27(3): 247-54.
- Kimura, Y. and Okuda, H. (2001). "Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice." J Nutr 131(6): 1844-9.
- Kirkman, H.N. and Gaetani, G.F. (2007). "Mammalian catalase: a venerable enzyme with new mysteries." Trends Biochem Sci 32(1): 44-50.
- Klotz, L.O. (2007). "Reaktive Sauerstoffspezies: Mechanismen der Erzeugung und der (Zyto-)Toxizität." Vorlesungsskript zum DGPT-Kurs "Molekulare Zelltoxikologie".
- Klungland, A. and Lindahl, T. (1997). "Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1)." EMBO J 16(11): 3341-8.
- Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T. and 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(23): 13300-5.
- Kohler, S.W., Provost, G.S., Kretz, P.L., Fieck, A., Sorge, J.A. and Short, J.M. (1990). "The use of transgenic mice for short-term, in vivo mutagenicity testing." Genet Anal Tech Appl 7(8): 212-8.
- Kohn, K.W., Erickson, L.C., Ewig, R.A. and Friedman, C.A. (1976). "Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution." Biochemistry 15(21): 4629-37.

- Kojo, S. (2004). "Vitamin C: basic metabolism and its function as an index of oxidative stress." Curr Med Chem 11(8): 1041-64.
- Kovacic, P. and Osuna, J.A., Jr. (2000). "Mechanisms of anti-cancer agents: emphasis on oxidative stress and electron transfer." Curr Pharm Des 6(3): 277-309.
- Kovtun, I.V. and McMurray, C.T. (2007). "Crosstalk of DNA glycosylases with pathways other than base excision repair." DNA Repair (Amst) 6(4): 517-29.
- Kubbutat, M.H., Key, G., Duchrow, M., Schluter, C., Flad, H.D. and Gerdes, J. (1994). "Epitope analysis of antibodies recognising the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by the antibody Ki-67 (Ki-67 protein)." J Clin Pathol 47(6): 524-8.
- Kubota, Y., Nash, R.A., Klungland, A., Schar, P., Barnes, D.E. and Lindahl, T. (1996). "Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein." EMBO J 15(23): 6662-70.
- Kunau, W.H., Dommès, V. and Schulz, H. (1995). "beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress." Prog Lipid Res 34(4): 267-342.
- Kunz, C., Saito, Y. and Schar, P. (2009). "DNA Repair in mammalian cells: Mismatched repair: variations on a theme." Cell Mol Life Sci 66(6): 1021-38.
- Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P., et al. (2006). "Resveratrol Improves Mitochondrial Function and Protects against Metabolic Disease by Activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ ." Cell 127(6): 1109-1122.
- Laine, J.P. and Egly, J.M. (2006). "When transcription and repair meet: a complex system." Trends Genet.
- Langcake, P. and Pryce, R.J. (1977). "A new class of phytoalexins from grapevines." Experientia 33(2): 151-2.
- Lebovitz, R.M., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright, J., Jr., Dionne, L., Lu, N., Huang, S. and Matzuk, M.M. (1996). "Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A 93(18): 9782-7.
- Lee, E.O., Lee, H.J., Hwang, H.S., Ahn, K.S., Chae, C., Kang, K.S., Lu, J. and Kim, S.H. (2006). "Potent inhibition of Lewis lung cancer growth by heyneanol A from the roots of *Vitis amurensis* through apoptotic and anti-angiogenic activities." Carcinogenesis 27(10): 2059-69.

- Leonard, S.S., Xia, C., Jiang, B.H., Stinefelt, B., Klandorf, H., Harris, G.K. and Shi, X. (2003). "Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses." Biochem Biophys Res Commun 309(4): 1017-26.
- Li, C. and Jackson, R.M. (2002). "Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury." Am J Physiol Cell Physiol 282(2): C227-41.
- Li, W., Yu, S., Liu, T., Kim, J.H., Blank, V., Li, H. and Kong, A.N. (2008). "Heterodimerization with small Maf proteins enhances nuclear retention of Nrf2 via masking the NESzip motif." Biochim Biophys Acta 1783(10): 1847-56.
- Li, Y., Cao, Z. and Zhu, H. (2006). "Upregulation of endogenous antioxidants and phase 2 enzymes by the red wine polyphenol, resveratrol in cultured aortic smooth muscle cells leads to cytoprotection against oxidative and electrophilic stress." Pharmacol Res 53(1): 6-15.
- Li, Y., Huang, T.T., Carlson, E.J., Melov, S., Ursell, P.C., Olson, J.L., Noble, L.J., Yoshimura, M.P., Berger, C., Chan, P.H., Wallace, D.C. and Epstein, C.J. (1995). "Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase." Nat Genet 11(4): 376-81.
- Liang, Y.C., Tsai, S.H., Chen, L., Lin-Shiau, S.Y. and Lin, J.K. (2003). "Resveratrol-induced G2 arrest through the inhibition of CDK7 and p34CDC2 kinases in colon carcinoma HT29 cells." Biochem Pharmacol 65(7): 1053-60.
- Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A. and Hemminki, K. (2000). "Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland." N Engl J Med 343(2): 78-85.
- Limón-Pacheco, J. and Gonsebatt, M.E. (2009). "The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress." Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 674(1-2): 137-147.
- Lindahl, T. (1993). "Instability and decay of the primary structure of DNA." Nature 362(6422): 709-15.
- Lingg, T. (2009). "Mechanistische Untersuchungen zur Inaktivierung der Genexpression durch DNA-Einzelstrangbrüche." Diplomarbeit, Biomedizinische Chemie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Liochev, S.I. and Fridovich, I. (2007). "The effects of superoxide dismutase on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation." Free Radic Biol Med 42(10): 1465-9.
- Lloyd, R.S., Haidle, C.W. and Robberson, D.L. (1978). "Bleomycin-specific fragmentation of double-stranded DNA." Biochemistry 17(10): 1890-6.
- Loeb, L.A., Loeb, K.R. and Anderson, J.P. (2003). "Multiple mutations and cancer." Proc Natl Acad Sci U S A 100(3): 776-81.



- Loschen, G., Flohe, L. and Chance, B. (1971). "Respiratory chain linked H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in pigeon heart mitochondria." FEBS Lett 18(2): 261-264.
- MacGregor, J.T., Wehr, C.M. and Gould, D.H. (1980). "Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test." Environ Mutagen 2(4): 509-14.
- MacMillan-Crow, L.A., Crow, J.P. and Thompson, J.A. (1998). "Peroxynitrite-mediated inactivation of manganese superoxide dismutase involves nitration and oxidation of critical tyrosine residues." Biochemistry 37(6): 1613-22.
- Marier, J.F., Vachon, P., Gritsas, A., Zhang, J., Moreau, J.P. and Ducharme, M.P. (2002). "Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model." J Pharmacol Exp Ther 302(1): 369-73.
- Markus, M.A. and Morris, B.J. (2008). "Resveratrol in prevention and treatment of common clinical conditions of aging." Clin Interv Aging 3(2): 331-9.
- Marti, T.M., Kunz, C. and Fleck, O. (2002). "DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways." J Cell Physiol 191(1): 28-41.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C. and Giovannini, C. (2005). "Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes." J Nutr Biochem 16(10): 577-86.
- Mates, J.M., Perez-Gomez, C. and Nunez de Castro, I. (1999). "Antioxidant enzymes and human diseases." Clin Biochem 32(8): 595-603.
- Matsumoto, Y. and Kim, K. (1995). "Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair." Science 269(5224): 699-702.
- Matsuoka, A., Kodama, Y., Fukuhara, K., Honda, S., Hayashi, M., Sai, K., Hasebe, M. and Fujiwara, Y. (2008). "A pilot study of evaluation of the antioxidative activity of resveratrol and its analogue in a 6-month feeding test in young adult mice." Food Chem Toxicol 46(3): 1125-30.
- Maynard, S., Schurman, S.H., Harboe, C., de Souza-Pinto, N.C. and Bohr, V.A. (2009). "Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging." Carcinogenesis 30(1): 2-10.
- McCay, C.M. and Crowell, M.F. (1934). "Prolonging the life span." Sci Mon 39: 405-414.
- Michaels, M.L., Tchou, J., Grollman, A.P. and Miller, J.H. (1992). "A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine." Biochemistry 31(45): 10964-8.
- Milne, J.C., Lambert, P.D., Schenk, S., Carney, D.P., Smith, J.J., Gagne, D.J., Jin, L., Boss, O., Perni, R.B., Vu, C.B., Bemis, J.E., Xie, R., Disch, J.S., et al. (2007).

- "Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes." Nature 450(7170): 712-6.
- Mitra, S., Izumi, T., Boldogh, I., Bhakat, K.K., Chattopadhyay, R. and Szczesny, B. (2007). "Intracellular trafficking and regulation of mammalian AP-endonuclease 1 (APE1), an essential DNA repair protein." DNA Repair (Amst) 6(4): 461-9.
- Miura, D., Miura, Y. and Yagasaki, K. (2003). "Hypolipidemic action of dietary resveratrol, a phytoalexin in grapes and red wine, in hepatoma-bearing rats." Life Sci 73(11): 1393-400.
- Mizutani, K., Ikeda, K., Kawai, Y. and Yamori, Y. (2001). "Protective effect of resveratrol on oxidative damage in male and female stroke-prone spontaneously hypertensive rats." Clin Exp Pharmacol Physiol 28(1-2): 55-9.
- Moore, S.R., Hill, K.A., Heinmoller, P.W., Halangoda, A., Kunishige, M., Buettner, V.L., Graham, K.S. and Sommer, S.S. (1999). "Spontaneous mutation frequency and pattern in Big Blue mice fed a vitamin E-supplemented diet." Environ Mol Mutagen 34(2-3): 195-200.
- Morales, V., Giamarchi, C., Chailleux, C., Moro, F., Marsaud, V., Le Ricousse, S. and Richard-Foy, H. (2001). "Chromatin structure and dynamics: functional implications." Biochimie 83(11-12): 1029-39.
- Moriya, M. (1993). "Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C-->T.A transversions in simian kidney cells." Proc Natl Acad Sci U S A 90(3): 1122-6.
- Mortensen, A., Skibsted, L.H. and Truscott, T.G. (2001). "The interaction of dietary carotenoids with radical species." Arch Biochem Biophys 385(1): 13-9.
- Moser, J., Kool, H., Giakzidis, I., Caldecott, K., Mullenders, L.H. and Foustari, M.I. (2007). "Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner." Mol Cell 27(2): 311-23.
- Naderali, E.K., Doyle, P.J. and Williams, G. (2000). "Resveratrol induces vasorelaxation of mesenteric and uterine arteries from female guinea-pigs." Clin Sci (Lond) 98(5): 537-43.
- Naidu, K.A. (2003). "Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview." Nutr J 2: 7.
- Narayanan, B.A., Narayanan, N.K., Re, G.G. and Nixon, D.W. (2003). "Differential expression of genes induced by resveratrol in LNCaP cells: P53-mediated molecular targets." Int J Cancer 104(2): 204-12.
- NIH. (2009). "ClinicalTrials.gov." US National Institutes of Health. aufgerufen 27.10., 2009, from <http://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=resveratrol>.

- Nishino, T., Okamoto, K., Eger, B.T. and Pai, E.F. (2008). "Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase." FEBS J 275(13): 3278-89.
- Nouspikel, T. (2009). "DNA repair in mammalian cells : Nucleotide excision repair: variations on versatility." Cell Mol Life Sci 66(6): 994-1009.
- O'Connor, T.R., Boiteux, S. and Laval, J. (1988). "Ring-opened 7-methylguanine residues in DNA are a block to in vitro DNA synthesis." Nucleic Acids Res 16(13): 5879-94.
- OECD (1997). Mammalian erythrocytes micronucleus test. OECD guideline for the testing of chemicals. 474.
- Ookawara, T., Kizaki, T., Takayama, E., Imazeki, N., Matsubara, O., Ikeda, Y., Suzuki, K., Li Ji, L., Tadakuma, T., Taniguchi, N. and Ohno, H. (2002). "Nuclear translocation of extracellular superoxide dismutase." Biochem Biophys Res Commun 296(1): 54-61.
- Opar, A. (2009). "Novel anticancer strategy targets DNA repair." Nat Rev Drug Discov 8(6): 437-8.
- Osterod, M., Hollenbach, S., Hengstler, J.G., Barnes, D.E., Lindahl, T. and 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(9): 1459-63.
- Osterod, M., Larsen, E., Le Page, F., Hengstler, J.G., Van Der Horst, G.T., Boiteux, S., Klungland, A. and Epe, B. (2002). "A global DNA repair mechanism involving the Cockayne syndrome B (CSB) gene product can prevent the in vivo accumulation of endogenous oxidative DNA base damage." Oncogene 21(54): 8232-9.
- Palmer, H.J. and Paulson, K.E. (1997). "Reactive oxygen species and antioxidants in signal transduction and gene expression." Nutr Rev 55(10): 353-61.
- Pardo, B., Gomez-Gonzalez, B. and Aguilera, A. (2009). "DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship." Cell Mol Life Sci 66(6): 1039-56.
- Pearson, C.G., Shikazono, N., Thacker, J. and O'Neill, P. (2004). "Enhanced mutagenic potential of 8-oxo-7,8-dihydroguanine when present within a clustered DNA damage site." Nucleic Acids Res 32(1): 263-70.
- Pearson, K.J., Baur, J.A., Lewis, K.N., Peshkin, L., Price, N.L., Labinskyy, N., Swindell, W.R., Kamara, D., Minor, R.K., Perez, E., Jamieson, H.A., Zhang, Y., Dunn, S.R., et al. (2008). "Resveratrol delays age-related deterioration and mimics transcriptional aspects of dietary restriction without extending life span." Cell Metab 8(2): 157-68.

- Peltomaki, P. (2003). "Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer." J Clin Oncol 21(6): 1174-9.
- Petermann, E., Ziegler, M. and Oei, S.L. (2003). "ATP-dependent selection between single nucleotide and long patch base excision repair." DNA Repair (Amst) 2(10): 1101-14.
- Peters, J.M., Cheung, C. and Gonzalez, F.J. (2005). "Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and liver cancer: where do we stand?" J Mol Med 83(10): 774-85.
- Pflaum, M. (1996). "Oxidative DNA-Modifikationen durch langwelliges UV-Licht und sichtbares Licht." Dissertation, Pharmakologie & Toxikologie, Universität Würzburg.
- Pirola, L. and Frojdo, S. (2008). "Resveratrol: one molecule, many targets." IUBMB Life 60(5): 323-32.
- Podmore, I.D., Griffiths, H.R., Herbert, K.E., Mistry, N., Mistry, P. and Lunec, J. (1998). "Vitamin C exhibits pro-oxidant properties." Nature 392(6676): 559.
- Poli, G., Leonarduzzi, G., Biasi, F. and Chiarotto, E. (2004). "Oxidative stress and cell signalling." Curr Med Chem 11(9): 1163-82.
- Poss, K.D. and Tonegawa, S. (1997). "Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells." Proc Natl Acad Sci U S A 94(20): 10925-30.
- Pryor, W.A. (2000). "Vitamin E and heart disease: basic science to clinical intervention trials." Free Radic Biol Med 28(1): 141-64.
- Quincozes-Santos, A., Andreatza, A.C., Nardin, P., Funchal, C., Goncalves, C.A. and Gottfried, C. (2007). "Resveratrol attenuates oxidative-induced DNA damage in C6 Glioma cells." Neurotoxicology 28(4): 886-91.
- Radicella, J.P., Dherin, C., Desmaze, C., Fox, M.S. and Boiteux, S. (1997). "Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A 94(15): 8010-5.
- Ranson, M., Middleton, M.R., Bridgewater, J., Lee, S.M., Dawson, M., Jowle, D., Halbert, G., Waller, S., McGrath, H., Gumbrell, L., McElhinney, R.S., Donnelly, D., McMurry, T.B., et al. (2006). "Lomeguatrib, a potent inhibitor of O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase: phase I safety, pharmacodynamic, and pharmacokinetic trial and evaluation in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors." Clin Cancer Res 12(5): 1577-84.
- Rass, U., Ahel, I. and West, S.C. (2007). "Defective DNA repair and neurodegenerative disease." Cell 130(6): 991-1004.
- Reagan-Shaw, S., Afaq, F., Aziz, M.H. and Ahmad, N. (2004). "Modulations of critical cell cycle regulatory events during chemoprevention of ultraviolet B-mediated

- responses by resveratrol in SKH-1 hairless mouse skin." Oncogene 23(30): 5151-60.
- Reddy, J.K., Azarnoff, D.L. and Hignite, C.E. (1980). "Hypolipidaemic hepatic peroxisome proliferators form a novel class of chemical carcinogens." Nature 283(5745): 397-8.
- Reddy, J.K., Moody, D.E., Azarnoff, D.L. and Tomarelli, R.M. (1977). "Hepatic effects of some [4-chloro-6-(2,3-xylydino)-2-pyrimidinylthio] acetic acid (WY-14,643) analogs in the mouse." Arch Int Pharmacodyn Ther 225(1): 51-7.
- Renaud, S. and de Lorgeril, M. (1992). "Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease." Lancet 339(8808): 1523-6.
- Rice-Evans, C. (2001). "Flavonoid antioxidants." Curr Med Chem 8(7): 797-807.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N.J. and Paganga, G. (1996). "Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids." Free Radic Biol Med 20(7): 933-56.
- Rick, W. (1977). Klinische Chemie und Mikroskopie. New York, Heidelberg, Springer Verlag.
- Robb, E.L., Page, M.M., Wiens, B.E. and Stuart, J.A. (2008). "Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD." Biochem Biophys Res Commun 367(2): 406-12.
- Robertson, A.B., Klungland, A., Rognes, T. and Leiros, I. (2009). "DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it." Cell Mol Life Sci 66(6): 981-93.
- Roos, W.P. and Kaina, B. (2006). "DNA damage-induced cell death by apoptosis." Trends Mol Med 12(9): 440-50.
- Rubiolo, J.A., Mithieux, G. and Vega, F.V. (2008). "Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes." Eur J Pharmacol 591(1-3): 66-72.
- Russo, M.T., De Luca, G., Degan, P., Parlanti, E., Dogliotti, E., Barnes, D.E., Lindahl, T., Yang, H., Miller, J.H. and Bignami, M. (2004). "Accumulation of the oxidative base lesion 8-hydroxyguanine in DNA of tumor-prone mice defective in both the Myh and Ogg1 DNA glycosylases." Cancer Res 64(13): 4411-4.
- Ryter, S.W., Alam, J. and Choi, A.M. (2006). "Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications." Physiol Rev 86(2): 583-650.
- Ryter, S.W. and Choi, A.M. (2009). "Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy." Am J Respir Cell Mol Biol 41(3): 251-60.

- Saiko, P., Szakmary, A., Jaeger, W. and Szekeres, T. (2008). "Resveratrol and its analogs: defense against cancer, coronary disease and neurodegenerative maladies or just a fad?" Mutat Res 658(1-2): 68-94.
- Salditt, M., Braunstein, S.N., Camerini-Otero, R.D. and Franklin, R.M. (1972). "Structure and synthesis of a lipid-containing bacteriophage. X. Improved techniques for the purification of bacteriophage PM2." Virology 48(1): 259-62.
- Sale, S., Tunstall, R.G., Ruparelia, K.C., Potter, G.A., Steward, W.P. and Gescher, A.J. (2005). "Comparison of the effects of the chemopreventive agent resveratrol and its synthetic analog trans 3,4,5,4'-tetramethoxystilbene (DMU-212) on adenoma development in the Apc(Min+) mouse and cyclooxygenase-2 in human-derived colon cancer cells." Int J Cancer 115(2): 194-201.
- Sandstrom, J., Nilsson, P., Karlsson, K. and Marklund, S.L. (1994). "10-fold increase in human plasma extracellular superoxide dismutase content caused by a mutation in heparin-binding domain." J Biol Chem 269(29): 19163-6.
- Sareen, D., van Ginkel, P.R., Takach, J.C., Mohiuddin, A., Darjatmoko, S.R., Albert, D.M. and Polans, A.S. (2006). "Mitochondria as the primary target of resveratrol-induced apoptosis in human retinoblastoma cells." Invest Ophthalmol Vis Sci 47(9): 3708-16.
- Schaaper, R.M. and Dunn, R.L. (1991). "Spontaneous mutation in the Escherichia coli lacI gene." Genetics 129(2): 317-26.
- Schluter, C., Duchrow, M., Wohlenberg, C., Becker, M., Key, G., Flad, H. and Gerdes, J. (1993). "The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins." J. Cell Biol. 123(3): 513-522.
- Schneider, Y., Durantou, B., Gosse, F., Schleiffer, R., Seiler, N. and Raul, F. (2001). "Resveratrol inhibits intestinal tumorigenesis and modulates host-defense-related gene expression in an animal model of human familial adenomatous polyposis." Nutr Cancer 39(1): 102-7.
- Seglen, P.O. (1976). "Preparation of isolated rat liver cells." Methods Cell Biol 13: 29-83.
- Sehirli, Ö., Tozan, A., Omurtag, G.Z., Cetinel, S., Contuk, G., Gedik, N. and Sener, G. (2008). "Protective effect of resveratrol against naphthalene-induced oxidative stress in mice." Ecotoxicology and Environmental Safety 71(1): 301-308.
- Sengottuvelan, M., Viswanathan, P. and Nalini, N. (2006). "Chemopreventive effect of trans-resveratrol--a phytoalexin against colonic aberrant crypt foci and cell proliferation in 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis." Carcinogenesis 27(5): 1038-46.

- Sgambato, A., Ardito, R., Faraglia, B., Boninsegna, A., Wolf, F.I. and Cittadini, A. (2001). "Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage." Mutat Res 496(1-2): 171-80.
- She, Q.B., Bode, A.M., Ma, W.Y., Chen, N.Y. and Dong, Z. (2001). "Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase." Cancer Res 61(4): 1604-10.
- Shibutani, S., Takeshita, M. and Grollman, A.P. (1991). "Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG." Nature 349(6308): 431-4.
- Shigematsu, S., Ishida, S., Hara, M., Takahashi, N., Yoshimatsu, H., Sakata, T. and Korthuis, R.J. (2003). "Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, prevents superoxide-dependent inflammatory responses induced by ischemia/reperfusion, platelet-activating factor, or oxidants." Free Radic Biol Med 34(7): 810-7.
- Sies, H. (1991). "Oxidative Stress: introduction." In: Sies, H. (Ed.), Oxidative Stress, Oxidants and Antioxidants. Academic Press, San Diego, CA, pp. XV - XXII.
- Sies, H. (1993). "Strategies of antioxidant defense." Eur J Biochem 215(2): 213-9.
- Sobol, R.W., Horton, J.K., Kuhn, R., Gu, H., Singhal, R.K., Prasad, R., Rajewsky, K. and Wilson, S.H. (1996). "Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair." Nature 379(6561): 183-6.
- Soleas, G.J., Grass, L., Josephy, P.D., Goldberg, D.M. and Diamandis, E.P. (2002). "A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols." Clin Biochem 35(2): 119-24.
- Storz, P., Doppler, H. and Toker, A. (2004). "Activation loop phosphorylation controls protein kinase D-dependent activation of nuclear factor kappaB." Mol Pharmacol 66(4): 870-9.
- Szewczuk, L.M., Forti, L., Stivala, L.A. and Penning, T.M. (2004). "Resveratrol is a peroxidase-mediated inactivator of COX-1 but not COX-2: a mechanistic approach to the design of COX-1 selective agents." J Biol Chem 279(21): 22727-37.
- Takata, K.-i. and Wood, R.D. (2009). "Bypass specialists operate together." EMBO J 28(4): 313-314.
- Tappel, A.L. (1978). "Glutathione peroxidase and hydroperoxides." Methods Enzymol 52: 506-13.
- Tchou, J. and Grollman, A.P. (1993). "Repair of DNA containing the oxidatively-damaged base, 8-oxoguanine." Mutat Res 299(3-4): 277-87.
- Thoms, K.M., Kuschal, C. and Emmert, S. (2007). "Lessons learned from DNA repair defective syndromes." Exp Dermatol 16(6): 532-44.

- Tornaletti, S. (2009). "DNA repair in mammalian cells: Transcription-coupled DNA repair: directing your effort where it's most needed." Cell Mol Life Sci 66(6): 1010-20.
- Trapp, C. (2006). "Untersuchungen zur Reparatur und Mutagenität oxidativer DNA-Schäden *in vivo* und deren Bedeutung für die Kanzerogenese." Dissertation, Pharmazie, Johannes Gutenberg-Universität Mainz.
- Trapp, C., Reite, K., Klungland, A. and Epe, B. (2007a). "Deficiency of the Cockayne syndrome B (CSB) gene aggravates the genomic instability caused by endogenous oxidative DNA base damage in mice." Oncogene 26(27): 4044-8.
- Trapp, C., Schwarz, M. and Epe, B. (2007b). "The peroxisome proliferator WY-14,643 promotes hepatocarcinogenesis caused by endogenously generated oxidative DNA base modifications in repair-deficient *Csbm/m/Ogg1-/-* mice." Cancer Res 67(11): 5156-61.
- Trentin, G.A., Moody, J., Shima, N., Thompson, L.U. and Heddle, J.A. (2004). "Effect of dietary supplementation on the frequency of spontaneous lacZ mutations in the developing colon." Mutat Res 551(1-2): 223-31.
- Tseng, S.H., Lin, S.M., Chen, J.C., Su, Y.H., Huang, H.Y., Chen, C.K., Lin, P.Y. and Chen, Y. (2004). "Resveratrol suppresses the angiogenesis and tumor growth of gliomas in rats." Clin Cancer Res 10(6): 2190-202.
- Tudek, B., Boiteux, S. and Laval, J. (1992). "Biological properties of imidazole ring-opened N7-methylguanine in M13mp18 phage DNA." Nucleic Acids Res 20(12): 3079-84.
- Turrens, J.F. (2003). "Mitochondrial formation of reactive oxygen species." J Physiol 552(Pt 2): 335-44.
- Ungvari, Z., Orosz, Z., Rivera, A., Labinskyy, N., Xiangmin, Z., Olson, S., Podlutzky, A. and Csiszar, A. (2007). "Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance." Am J Physiol Heart Circ Physiol 292(5): H2417-24.
- Ura, K. and Hayes, J.J. (2002). "Nucleotide excision repair and chromatin remodeling." Eur J Biochem 269(9): 2288-93.
- Valenzano, D.R., Terzibasi, E., Genade, T., Cattaneo, A., Domenici, L. and Cellarino, A. (2006). "Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate." Curr Biol 16(3): 296-300.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. and Mazur, M. (2006). "Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer." Chem Biol Interact 160(1): 1-40.
- van den Boom, V., Jaspers, N.G. and Vermeulen, W. (2002). "When machines get stuck--obstructed RNA polymerase II: displacement, degradation or suicide." Bioessays 24(9): 780-4.



- van der Horst, G.T., van Steeg, H., Berg, R.J., van Gool, A.J., de Wit, J., Weeda, G., Morreau, H., Beems, R.B., van Kreijl, C.F., de Gruijl, F.R., Bootsma, D. and Hoeijmakers, J.H. (1997). "Defective transcription-coupled repair in Cockayne syndrome B mice is associated with skin cancer predisposition." Cell 89(3): 425-35.
- van Ginkel, P.R., Sareen, D., Subramanian, L., Walker, Q., Darjatmoko, S.R., Lindstrom, M.J., Kulkarni, A., Albert, D.M. and Polans, A.S. (2007). "Resveratrol inhibits tumor growth of human neuroblastoma and mediates apoptosis by directly targeting mitochondria." Clin Cancer Res 13(17): 5162-9.
- Van Remmen, H., Ikeno, Y., Hamilton, M., Pahlavani, M., Wolf, N., Thorpe, S.R., Alderson, N.L., Baynes, J.W., Epstein, C.J., Huang, T.T., Nelson, J., Strong, R. and Richardson, A. (2003). "Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging." Physiol Genomics 16(1): 29-37.
- Vitrac, X., Desmouliere, A., Brouillaud, B., Krisa, S., Deffieux, G., Barthe, N., Rosenbaum, J. and Merillon, J.M. (2003). "Distribution of [14C]-trans-resveratrol, a cancer chemopreventive polyphenol, in mouse tissues after oral administration." Life Sci 72(20): 2219-33.
- Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A.T., Holtzclaw, W.D., Kang, M.I., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T.W. and Talalay, P. (2004). "Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers." Proc Natl Acad Sci U S A 101(7): 2040-5.
- Walle, T., Hsieh, F., DeLegge, M.H., Oatis, J.E., Jr. and Walle, U.K. (2004). "High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans." Drug Metab Dispos 32(12): 1377-82.
- Wang, Z., Huang, Y., Zou, J., Cao, K., Xu, Y. and Wu, J.M. (2002). "Effects of red wine and wine polyphenol resveratrol on platelet aggregation in vivo and in vitro." Int J Mol Med 9(1): 77-9.
- Weinert, T.A. and Hartwell, L.H. (1988). "The RAD9 gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*." Science 241(4863): 317-22.
- Whitsett, T., Carpenter, M. and Lamartiniere, C.A. (2006). "Resveratrol, but not EGCG, in the diet suppresses DMBA-induced mammary cancer in rats." J Carcinog 5: 15.
- Will, O., Gocke, E., Eckert, I., Schulz, I., Pflaum, M., Mahler, H.C. and Epe, B. (1999). "Oxidative DNA damage and mutations induced by a polar photosensitizer, Ro19-8022." Mutat Res 435(1): 89-101.

- Win, W., Cao, Z., Peng, X., Trush, M.A. and Li, Y. (2002). "Different effects of genistein and resveratrol on oxidative DNA damage in vitro." Mutat Res 513(1-2): 113-20.
- Winkler, G.S., Sugasawa, K., Eker, A.P., de Laat, W.L. and Hoeijmakers, J.H. (2001). "Novel functional interactions between nucleotide excision DNA repair proteins influencing the enzymatic activities of TFIIH, XPG, and ERCC1-XPF." Biochemistry 40(1): 160-5.
- Wong, Y.T., Gruber, J., Jenner, A.M., Ng, M.P., Ruan, R. and Tay, F.E. (2009). "Elevation of oxidative-damage biomarkers during aging in F2 hybrid mice: protection by chronic oral intake of resveratrol." Free Radic Biol Med 46(6): 799-809.
- Woo, J.H., Lim, J.H., Kim, Y.H., Suh, S.I., Min, D.S., Chang, J.S., Lee, Y.H., Park, J.W. and Kwon, T.K. (2004). "Resveratrol inhibits phorbol myristate acetate-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting JNK and PKC delta signal transduction." Oncogene 23(10): 1845-53.
- Wood, J.G., Rogina, B., Lavu, S., Howitz, K., Helfand, S.L., Tatar, M. and Sinclair, D. (2004). "Sirtuin activators mimic caloric restriction and delay ageing in metazoans." Nature 430(7000): 686-9.
- Wood, M.L., Esteve, A., Morningstar, M.L., Kuziemko, G.M. and Essigmann, J.M. (1992). "Genetic effects of oxidative DNA damage: comparative mutagenesis of 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 7,8-dihydro-8-oxoadenine in *Escherichia coli*." Nucleic Acids Res 20(22): 6023-32.
- Xie, Y., Yang, H., Cunanan, C., Okamoto, K., Shibata, D., Pan, J., Barnes, D.E., Lindahl, T., McIlhatton, M., Fishel, R. and 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(9): 3096-102.
- Yet, S.F., Perrella, M.A., Layne, M.D., Hsieh, C.M., Maemura, K., Kobzik, L., Wiesel, P., Christou, H., Kourembanas, S. and Lee, M.E. (1999). "Hypoxia induces severe right ventricular dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice." J Clin Invest 103(8): R23-9.
- Yu, S.L., Lee, S.K., Johnson, R.E., Prakash, L. and Prakash, S. (2003). "The stalling of transcription at abasic sites is highly mutagenic." Mol Cell Biol 23(1): 382-8.
- Zelko, I.N., Mariani, T.J. and Folz, R.J. (2002). "Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression." Free Radic Biol Med 33(3): 337-49.
- Zhang, Q., Tang, X., Lu, Q.Y., Zhang, Z.F., Brown, J. and Le, A.D. (2005). "Resveratrol inhibits hypoxia-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1alpha and VEGF expression in human tongue squamous cell carcinoma and hepatoma cells." Mol Cancer Ther 4(10): 1465-74.

- 
- Zheng, J.-N., Ma, T.-X., Cao, J.-Y., Sun, X.-Q., Chen, J.-C., Li, W., Wen, R.-M., Sun, Y.-F. and Pei, D.-S. (2006). "Knockdown of Ki-67 by small interfering RNA leads to inhibition of proliferation and induction of apoptosis in human renal carcinoma cells." Life Sciences 78(7): 724-729.
- Zhuang, H., Kim, Y.S., Koehler, R.C. and Dore, S. (2003). "Potential mechanism by which resveratrol, a red wine constituent, protects neurons." Ann N Y Acad Sci 993: 276-86; discussion 287-8.
- Zini, R., Morin, C., Bertelli, A., Bertelli, A.A. and Tillement, J.P. (1999). "Effects of resveratrol on the rat brain respiratory chain." Drugs Exp Clin Res 25(2-3): 87-97.

## 8 ANHANG

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

### Publikationen

**Fusser M.**, Nesse G.J., Khobta A., Li H., Klungland A., Epe B.; Spontaneous oxidative mutagenesis in *Csb<sup>m/m</sup>Ogg1<sup>-/-</sup>* mice is attenuated by the dietary antioxidant resveratrol. Cancer Research (2010) *under revision*

Guachalla L.M., Ju Z., Koziel R., von Figura G., Song Z., **Fusser M.**, Epe B., Jansen-Dürr P., Rudolph K.L. ; Sod2 haploinsufficiency does not accelerate aging of telomere dysfunctional mice. Aging (2009) 1(3): 303-315

### Publikationen (nicht in der Arbeit enthalten)

Becherel O.J., Jakob B., Cherry A.L., Gueven N., **Fusser M.**, Kijas A.W., Peng C., Katyal S., McKinnon P.J., Chen J., Epe B., Smerdon S.J., Taucher-Scholz G. and Lavin M.F.; CK2 phosphorylation-dependent interaction between aprataxin and MDC1 in the DNA damage response Nucleic Acids Res (2009) *in press*

Suraweera A., Becherel O.J., Chen P., Rundle N., Woods R., Nakamura J., Gatei M., Criscuolo C., Filla A., Chessa L., **Fusser M.**, Epe B., Gueven N., Lavin M.F. ; Senataxin, defective in ataxia oculomotor apraxia type 2, is involved in the defense against oxidative DNA damage. J Cell Biol (2007) 177(6): 969-979

Gueven N., Becherel O.J., Howe O., Chen P., Haince J.F., Ouellet M.E., Poirier G.G., Waterhouse N., **Fusser M.**, Epe B., de Murcia J.M., de Murcia G., McGowan C.H., Parton R., Mothersill C., Grattan-Smith P., Lavin M.F. ; A novel form of ataxia oculomotor apraxia characterized by oxidative stress and apoptosis resistance. Cell Death Differ (2007) 14(6): 1149-1161

### Vortrag bei Fachtagung

50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, (März, 2009)

**Fußer M.**, Lv Q., Li H., Epe B.;

Resveratrol protects *in-vivo* against endogenous oxidative DNA damage

### Posterpräsentationen bei Fachtagungen

2<sup>nd</sup> German-French DNA Repair Meeting, Konstanz, (September, 2009)

**Fußer M.**, Nesse G.J., Khobta A., Li H., Klungland A., Epe B.;

Influence of resveratrol on endogenous oxidative DNA damage and spontaneous mutagenesis in *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>* mice

10<sup>th</sup> Biennial Meeting of the DGDR, Berlin, (September, 2008)

**Fußer M.**, Lv Q., Li H., Epe B.;

The levels of oxidative DNA damage in *Ogg1<sup>-/-</sup>/Csb<sup>-/-</sup>* double knockout mice are attenuated after treatment with resveratrol

5<sup>th</sup> DNA Repair Workshop, Smolenice Castle, Slowakei, (Mai, 2008)

**Fußer M.**, Lv Q., Li H., Epe B.;

Resveratrol treatment reduces the levels of oxidative DNA modifications in repair deficient *Ogg1<sup>-/-</sup>Csb<sup>-/-</sup>* double knockout mice