

Die Regulation der Transkription proinflammatorischer Zytokine durch oxidative Basenmodifikationen und die DNA- Reparatur Glykosylase OGG1

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
Marco Seifermann
geb. in Bühl (Baden)

Mainz, 2017

“The important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own reason for existence. One cannot help but be in awe when he contemplates the mysteries of eternity, of life, of the marvelous structure of reality. It is enough if one tries merely to comprehend a little of this mystery each day.”

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung & Theoretischer Hintergrund.....	1
1.1	Immunsystem.....	2
1.1.1	Anatomie und Funktion der Milz	3
1.1.2	LPS/TLR4 Signaltransduktionsweg.....	4
1.1.3	Physiologische Funktion von TNF- α	6
1.1.4	TNF- α Signaltransduktion	7
1.1.5	Bedeutung der Zytokine TNF- α und IL6	8
1.2	Vom Gen zum Protein: Prinzipien der Transkription	10
1.2.1	Prinzipien der Transkription in Eukaryoten.....	10
1.2.2	Einfluss von Histonmodifikationen auf die Transkription	11
1.2.3	Regulierung der NF- κ B vermittelten Transkription inflammatorischer Gene.....	12
1.2.4	Funktion der Lysin-spezifischen Demethylase LSD1/2	13
1.2.5	Aktivierung und Repression der Transkription durch LSD1.....	14
1.3	Reaktive Sauerstoff Spezies und oxidativer Stress.....	16
1.3.1	Endogene Quellen von ROS und deren Katabolismus	16
1.4	Oxidative DNA-Schäden & die Basenexzisionsreparatur.....	19
1.4.1	Oxidative DNA-Schäden.....	19
1.4.2	8-oxoGuanin.....	20
1.4.3	Basenexzisionsreparatur	22
1.4.4	8-oxoGuanin Glykosylase (OGG1)	24
1.5	Auswirkungen eines OGG1 Knockouts in Mäusen	25
1.6	Oxidative DNA-Schäden als epigenetische Faktoren	27
2	Zielsetzung der Arbeit.....	28

3	Methoden	29
3.1	Handling der Versuchstiere.....	29
3.2	Arbeiten mit primären, murinen Zellen.....	31
3.3	qPCR basierte Quantifizierung der Genexpression	32
3.4	Durchflußzytometrische Analyse der Milzzellen	39
3.5	Generierung & Charakterisierung von Knochenmarks-Makrophagen (BMDM).....	41
3.6	Zellkultur	43
3.7	Alkalische Elution.....	45
3.8	Western Blot.....	48
3.9	PM2-Assay / FPG Cleavage	51
3.10	qPCR basierte Methode zur Detektion oxidativer Läsionen im hIL6-Promotor	53
3.11	Statistik	55
4	Ergebnisse	56
4.1	Maus-Modell: „ex-vivo“	56
4.1.1	Charakterisierung der Versuchstiere.....	56
4.1.2	Zytokin-Expression in Milzzellen nach LPS-Behandlung	57
4.1.3	Zytokin Expression in Milzzellen von <i>Nakabeppu</i> - und <i>Lindahl</i> - Mäusen.....	61
4.1.4	Zelluläre Komposition der Milz in <i>Wildtyp</i> - und <i>Ogg1^{-/-}</i> -Mäusen.....	62
4.1.5	TNF- α Expressionsanalyse auf Proteinebene.....	63
4.1.6	Expression von TNF- α in Bone-marrow-derived-macrophages	67
4.1.7	Einfluss einer LSD1-Inhibition auf die Zytokin-Expression in Maus-Zellen.....	69
4.1.8	Einfluss von MAPK-Inhibitoren auf die Zytokin-Expression in Maus-Zellen.....	70
4.1.9	Einfluss einer APE1-Inhibition auf die Zytokin-Expression in Maus-Zellen.....	72
4.1.10	Einfluss einer 8-oxoGua Vorbehandlung auf die Zytokin Expression in Maus-Zellen....	73
4.2	Humane Zelllinie: HeLa	75
4.2.1	Verifizierung des OGG1 Knockdowns durch Westernblot und qPCR	75
4.2.2	Zytokin Expression in HeLa Zellen nach TNF- α Behandlung.....	76
4.2.3	Einfluss einer LSD1-Inhibition auf die Zytokin-Expression in HeLa-Zellen	77
4.2.4	Einfluss von MAPK Inhibitoren auf die Zytokin-Expression in HeLa-Zellen.....	79
4.2.5	Einfluss einer APE1-Inhibition auf die Zytokin Expression in HeLa-Zellen	80

4.2.6	Einfluss einer 8oxoGua Vorbehandlung auf die Zytokin Expression in Hela-Zellen.....	81
4.2.7	Steady-state Level der oxidativen Läsionen in HeLa Zellen.....	82
4.2.8	Nachweis oxidativer Läsionen in der Promoter-Region des IL6 Gens.....	84
4.3	Mauszelllinie: J774.2.....	86
4.3.1	Konzentrations- und Zeitabhängige TNF- α Expression.....	86
4.3.2	Einfluss von LSD1-Inhibitoren auf die TNF- α Expression	87
4.3.3	Einfluss von MAPK-Inhibitoren auf die TNF- α Expression.....	88
4.3.4	Einfluss eines APE1-Redox-Inhibitor auf die TNF- α Expression.....	89
4.3.5	Inhibition der TNF- α Expression durch Dexamethason	90
5	Diskussion.....	92
5.1	Allgemeine Effekte des OGG1 Knockouts in Mäusen	92
5.2	Auswirkungen eines OGG1 KO oder KD auf die Transkription inflammatorischer Zytokine	93
5.3	Die Bedeutung von LSD1 & APE1 für den Einfluss von OGG1 auf die Transkription proinflammatorischer Gene	96
5.4	Detektion oxidativer Läsionen im IL6-Promotor TNF- α behandelter HeLa-Zellen	100
5.5	Die Bedeutung der MAPK p38, JNK und ERK für die OGG1 vermittelte Transkription inflammatorischer Gene.....	101
5.6	Behandlung von HeLa- und Milzzellen mit 8-oxoGua hat keinen Einfluss auf die Expression der Zielgene	102
5.7	Zusammenfassung zum potentiellen Mechanismus der OGG1 vermittelten Aktivierung der Transkription.....	103
6	Zusammenfassung.....	105
7	Materialien	107
8	Literaturverzeichnis	123
9	Curriculum vitae	132

I. Abkürzungsverzeichnis

8-oxoG	7,8-dihydro-8-oxoguanin
AK	Antikörper
AO	Aminooxidase
AP-1	Activator protein 1
APE1	apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease
AP-Läsion	Apurinische/aprimidinische Läsion
BER	Base excision repair
BMDM	Bonemarrow-derived macrophages
BSA	bovine serum albumin
CD	Cluster of Differentiation
Ct	Cycle of threshold
DD	Death domain
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSB	Doppelstrangbruch (DNA)
ERK	Extracellular-signal Regulated Kinase
FACS	fluorescence-activated cell scanning
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAPY	Formamidopyrimidin
FCS	fetal calv serum
FPG	formamidopyrimidine [fapy]-DNA glycosylase
FSC	Forward scatter
GEF	Guanine exchange factor
GLP	G9a-like protein
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HIF1 α	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
HRP	Horseradish peroxidase
IKK	I κ B kinase
IL	Interleukin
IRAK	IL1 receptor associated kinase
IRF	Interferon regulatory factor
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KD	Knockdown
KMT	Lysinmethyltransferase
KO	Knockout
LBP	LPS binding protein
LIG	Ligase
LPS	Lipopolysaccharide
LSD	Lysin-specific demethylase
MAO	Monoaminoxidase
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MBD	methyl-CpG binding domain

MCP1	Monocyte chemotactic protein 1
MHC	Major Histocompatibility Komplex
MIP1- α	Macrophage Inflammatory Protein
MLDS	multiple low dose of streptozotocin
mRNA	messenger RNA
MTH1	(NUDT1) 7,8-dihydro-8-oxoguanine triphosphatase
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NEIL	Nei Like DNA Glycosylase
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
NIK	NF- κ B inducin kinase
NTC	Non-template Control
NTHL	Endonuclease III-like protein
OGG1	8-Oxoguanine glycosylase
PAMPS	Pathogen associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline
PBSCMF	phosphate buffered saline (calcium magnesium free)
PCNA	Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PEG	Polythallenglykol
PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
POLB	DNA Polymerase Beta
PP	Phosphat Puffer
qPCR	quantitative PCR
RA	Rheumatoide Arthritis
RHD	Rel homology domain
RIP	Receptor interacting protein
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-QPCR	Real-time qPCR
SDS	sodium dodecyl sulfate
SETD6	SET domain containing
shRNA	short hairpin RNA
SMUG	Single-Strand-Selective Monofunctional Uracil-DNA Glycosylase
SOD	Superoxiddismutase
SODD	Silencer of death domain
SSB	Einzelstrangbruch (DNA)
SSC	sidward scatter
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAB	TAK binding protein
TACE	TNF- α converting enzyme
TAK	Transforming growth factor β activated kinase
Tann	Annealingtemperatur
Taq	Aquisitionstemperatur
TDG	Thymine-DNA glycosylase
TF	Transcriptionsfaktor
TIR	Zoll/ IL1-Receptor Domain

TIRAP	TIR domain containing adaptor protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-R	TNF-Receptor
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
TRADD	TNF-R associated DD
TRAF	TNF receptor associated factor
TRAM	TRIF related adaptor molecule
TRIF	TIR domain containing adaptor inducing IFN γ
UNG	uracil-DNA glycosylase
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WB	Western Blot
XRCC1	X-ray repair cross-complementing protein 1
ZVTE	Zentrale Versuchstiereinrichtung

1 Einleitung & Theoretischer Hintergrund

Chronisch entzündliche Erkrankungen stellen in der heutigen Gesellschaft ein immer größer werdendes Problem dar. So litten in Deutschland im Jahr 2015 circa 1,5 Millionen Menschen unter einer entzündlichen rheumatischen Erkrankung (DGRH 2016). Hinzu kommen Betroffene von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und von „Volkskrankheiten“ wie zum Beispiel Diabetes, welche mit einer chronischen Entzündung assoziiert werden, sowie Betroffene von Asthma bronchiale. Als mögliche Behandlungsstrategie dieser Erkrankungen wurde unter anderem eine Erniedrigung der oftmals erhöhten proinflammatorischen Zytokine, wie zum Beispiel Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), ausgemacht, welcher eine Schlüsselrolle in der Entstehung vieler chronisch entzündlicher Erkrankungen einnimmt. Die Mechanismen, welche die Produktion von TNF- α regulieren sind daher von großem Interesse aber noch immer nicht gänzlich verstanden. Der Befund, dass Mäuse mit einer Defizienz der 8-Oxo-guanin-DNA-Glykosylase (OGG1) eine weniger stark ausgeprägte Immunantwort in verschiedenen Versuchsmodellen zeigen (Mabley et al. 2005), könnte neue Erkenntnisse über die Mechanismen dieser Regulation liefern.

In der vorliegenden Arbeit werde ich eine relativ neue Theorie zur Regulation der Transkription von Genen vorstellen, in welcher die oxidative Basenmodifikation 8-oxoG nicht mehr nur als potenziell mutagene DNA-Schädigung angesehen wird. Vielmehr könnte 8-oxoG auch ein epigenetisches Merkmal darstellen, welches gezielt in Regulationsbereichen von Genen erzeugt wird, wodurch in Zusammenspiel mit OGG1 die Feinregulation der Transkription von Genen erfolgt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zu überprüfen ob eine solche Regulation für die Transkription proinflammatorischer Zytokine vorliegt und den zugrundeliegenden Mechanismus aufzuzeigen. Hierfür werde ich im theoretischen Teil zunächst die Grundlagen zur Immunantwort über Toll-like Rezeptoren sowie die dadurch ausgelöste Transkription proinflammatorischer Zytokine darlegen. Nach einer kurzen Einführung in die Bedeutung reaktiver Sauerstoffspezies werde ich weiterhin die Prinzipien der Basenexzisionsreparatur im Allgemeinen, sowie die Bedeutung von OGG1 bei der Erkennung und Reparatur oxidativer DNA-Schäden im Speziellen erläutern. Anschließend fasse ich kurz zusammen, welche Auswirkungen der Verlust von OGG1 im Mausmodell hat und stelle abschließend das eingangs erwähnte Modell der Transkriptionsregulation vor.

Anhand eines Maus- und eines humanen Zellkulturmodells werde ich im experimentellen Teil unter anderem die Beteiligung von OGG1, der Histondemethylase LSD1 als Quelle reaktiver Sauerstoffspezies sowie von AP-Endonuklease 1 in der Transkription proinflammatorischer Zytokine untersuchen. Die gewonnenen Erkenntnisse werde ich im Diskussionsteil abschließend zu einem erweiterten Modell der OGG1 und LSD1 regulierten Transkription proinflammatorischer Zytokine zusammenfassen und erörtern.

1.1 Immunsystem

Für die Abwehr von Pathogenen stehen dem humanen sowie dem murinen Organismus eine unspezifische (angeborene) und eine spezifische (erworbene) Immunabwehr zur Verfügung. Beide können nochmals in humorale und zelluläre Abwehrmechanismen unterschieden werden. Prinzipiell funktionieren beide Systeme unabhängig voneinander, sind in Kooperation allerdings effizienter in der Immunabwehr.

Für eine unspezifische Immunabwehr bedarf es keinem vorrangegangenen Kontakt mit einem Fremdstoff um diesen unschädlich zu machen. Die humorale Abwehr erfolgt durch Aktivierung des Komplementsystems (aktivierbare Glykoproteine, die durch Antigen-Antikörper-Komplexe oder Oberflächenstrukturen von Bakterien aktiviert werden), Lysozym, Zytokine und Akute-Phase-Proteine. Die unspezifische zelluläre Abwehr erfolgt vor allem durch neutrophile und eosinophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. Diese Zellen sind zur amöboiden Migration und Phagozytose von Pathogenen befähigt und können teilweise auch außerhalb der Blutgefäße, insbesondere in der Leber und in der Milz angetroffen werden. Nach der Phagozytose verschmelzen Phagosomen mit Lysosomen zu Phagolysosomen, wo die endgültige Eliminierung des phagozytierten Pathogens durch reaktive Sauerstoffspezies aus lysosomalen Enzymen stattfindet. Eine wichtige Rolle bei der unspezifischen Immunabwehr spielen auch sogenannte Toll-like-Rezeptoren (TLR). TLRs werden auf der Zelloberfläche und in Endosomen von vor allem Makrophagen und Granulozyten exprimiert und erkennen spezifische Bestandteile von Bakterien und Viren, wodurch eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst wird, welche die unspezifische Immunabwehr stimuliert (Janeway, JR, Medzhitov 2002).

Für eine spezifische Immunabwehr reagiert der Organismus nach Eindringen und Erkennen eines Fremdstoffs mit der Produktion von spezifischen Antikörpern (humoral) und der Aktivierung spezifischer T-Lymphozyten (zellulär). Die Antikörper-Produktion erfolgt dabei durch Plasmazellen, welche aus B-Lymphozyten nach Kontakt des Antigens mit einem spezifischen Antigenrezeptor (B-Zell-Rezeptor) entstehen. Durch Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes wird das Antigen zunächst immobilisiert. Im Fall von Bakterien oder Parasiten wird anschließend deren Auflösung, bei anderen Pathogenen deren Abbau, eingeleitet. Die zelluläre Abwehr erfolgt durch T-Lymphozyten. Nachdem ein Pathogen in den Organismus eingedrungen ist kann es durch Antigen-präsentierende Zellen (vor allem Makrophagen und Dendritische Zellen) aufgenommen werden. Nach enzymatischer Spaltung werden pathogenspezifische Peptidfragmente auf MHC- Molekülen (Major Histocompatibility Complex; MHC I oder MHC II) präsentiert. Diese präsentierten Antigene können durch strukturspezifische T-Zell-Rezeptoren im Zusammenspiel mit passenden Co-Rezeptoren (Cluster of Differentiation; CD4 oder CD8) erkannt werden. Dies führt zur Aktivierung und Differenzierung zytotoxischer T-Zellen (CD8-positiv), welche infizierte Zielzellen lysieren oder zur Apoptose zwingen können. Durch verschiedene Stimuli können alternativ auch T-

Helferzellen (CD4-positiv) aktiviert werden. Diese wiederum können durch sezernierte Zytokine sich selbst aber auch andere T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen aktivieren und so die spezifische, aber auch die unspezifische Immunabwehr stimulieren. Im Laufe der spezifischen Immunabwehr gebildete T- und B-lymphozytäre Gedächtniszellen ermöglichen eine schnelle Reaktion bei einer erneuten Antigenexposition, und stellen somit ein immunologisches Gedächtnis dar (Dempsey et al. 2003).

1.1.1 Anatomie und Funktion der Milz

Die Milz liegt im linken Oberbauch unter dem Zwerchfell und stellt das größte sekundäre lymphatische Organ dar (Cesta 2006). Sie ist von einer derben Kapsel umgeben, von welcher Bindegewebsbalken ins Organinnere einstrahlen. Die dadurch gebildeten Hohlräume werden von dem eigentlichen Milzgewebe (Pulpa) ausgefüllt. Dabei unterscheidet man zwei unterschiedliche Gewebe, die rote und weiße Pulpa. Die rote Pulpa, bestehend aus großen Bluträumen (Sinus) und einem retikulären Maschenwerk, setzt sich aus Retikulumzellen und Retikulinfasern zusammen und bildet ein schwammartiges Gerüst. Dieses Gerüst beherbergt wiederum eine Vielzahl von Zellen (vor allem Makrophagen) und dient vorwiegend als Blutfilter. Durch diese Filtration werden überalterte oder durch Membranschäden in ihrer Verformbarkeit veränderte Erythrozyten und Thrombozyten, mit Antikörper beladene Zellen, Mikroorganismen, Immunkomplexe oder andere Partikel phagozytiert und abgebaut. Außerdem fungiert die rote Pulpa auch als Speicherort für Eisen, Erythrozyten und Thrombozyten.

Die makroskopisch weißlich erscheinenden Lymphfollikel werden in ihrer Gesamtheit als weiße Pulpa bezeichnet. Diese bestehen aus lymphatischem Gewebe und B-Zellen. Außerdem wird der weißen Pulpa auch das lymphatische Gewebe, welches um die arteriellen Gefäße angeordnet ist und vor allem T-Lymphozyten enthält, zugeordnet. In der weißen Pulpa findet somit vor allem eine antigeninduzierte Differenzierung und Proliferation von B- und T-Lymphozyten statt.

1.1.2 LPS/TLR4 Signaltransduktionsweg

Toll-like-Rezeptoren werden auf der Zelloberfläche oder in Endosomen von Zellen der unspezifischen Immunabwehr exprimiert und durch charakteristische Struktur motive, sogenannte PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) (Janeway, JR, Medzhitov 2002), stimuliert. Die durch diese Stimulation eingeleitete Signaltransduktion löst eine verstärkte Expression proinflammatorischer Zytokine sowie die Ausreifung Antigen-präsentierender Zellen aus (Akira et al. 2006). In der Familie der TLRs werden derzeit 10 Rezeptoren unterschieden, welche spezifisch Strukturen von Bakterien (Lipoteichonsäure, Peptidoglykan, Lipopolysaccharid), Viren (DNA mit nichtmethylierten CpG-Motiven, doppelsträngige RNA) oder Pilzen erkennen (Takeda, Akira 2004). TLRs stellen somit Sensoren dar, mit deren Hilfe ein eingedrungenes Pathogen erkannt, klassifiziert und eine Pathogen-spezifische Immunabwehr eingeleitet wird.

Lipopolysaccharide (LPS) sind wichtige Bestandteile der äußeren Membran gram-negativer Bakterien und werden häufig eingesetzt um eine TLR4 abhängige Entzündungsreaktion bis hin zu einer Sepsis auszulösen (Beutler, Rietschel 2003).

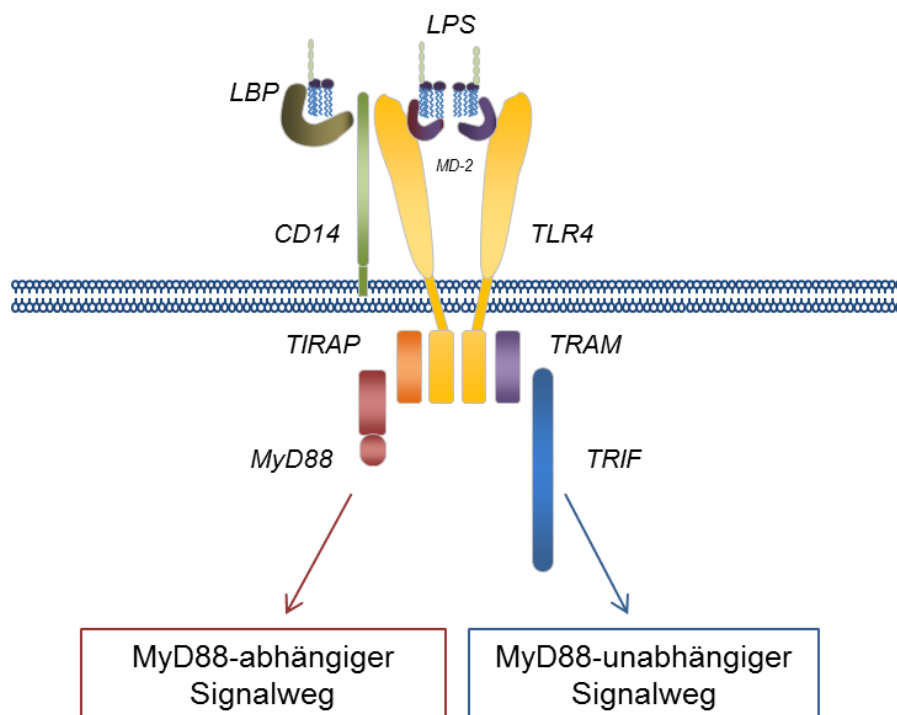


Abbildung 1.1: Übersicht des LPS/TLR4 Signalwegs. LBP und CD14 erleichtern die LPS Erkennung, welche durch den TLR4/MD-2 Rezeptor Komplex erfolgt. Der LPS/TLR4 Signalweg kann in einen MyD88-abhängigen und einen MyD88-unabhängigen Weg unterschieden werden, welche die Transkription proinflammatorischer Zytokine und Typ 1 Interferone vermitteln.

Die LPS Erkennung erfolgt durch Interaktion verschiedener Proteine. LBP (LPS binding protein) ist ein lösliches Protein, bindet direkt an LPS und erleichtert die Bindung von LPS an CD14 (Wright et al. 1989). CD14 wiederum ist beteiligt an der LPS-Erkennung indem es den Transfer von LPS an den TLR4/MD-2 Rezeptorkomplex erleichtert (Wright et al. 1990). Zu Beginn der Signaltransduktion steht nach der LPS Erkennung eine zytoplasmatische TIR-domain (Toll/IL-1 Receptor domain) welche mit weiteren TIR-domain enthaltenden Adaptorproteinen interagieren kann. Hierzu zählen MyD88 (Myeloid Differentiation primary response gene 88), TIRAP (TIR domain containing adaptor protein), TRAM (TRIF related adaptor molecule) und TRIF (TIR domain containing adaptor inducing IFN- γ) (O'Neill, Bowie 2007). Von hier an trennt sich der Signaltransduktionsweg in 2 Arme, die durch die Beteiligung des Adaptor-Proteins MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88) unterschieden werden.

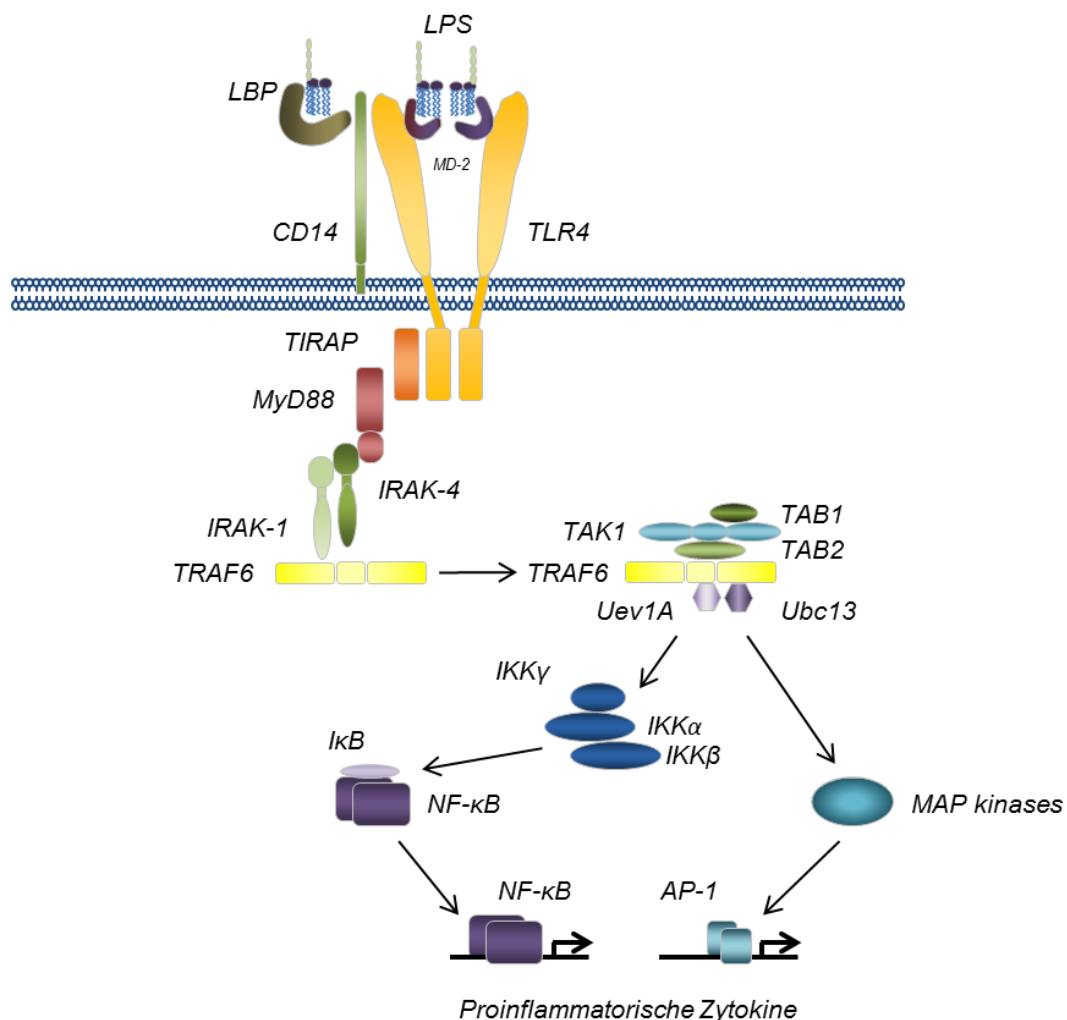


Abbildung 1.2: Der MyD88 abhängige Signalweg von TLR4. MyD88 bindet den zytoplasmatischen Teil von TLR4 durch Interaktion mit der TIR Domäne. Nach Stimulation wird IRAK-4 zum Rezeptor rekrutiert und assoziiert mit diesem über die Death Domäne. IRAK-4 phosphoryliert IRAK-1. IRAK-1 und das ebenfalls rekrutierte TRAF6 dissoziieren vom Rezeptor. Der gebildete Komplex aus TRAF6, TAK1, TAB1 und TAB2, zusammen mit Ubc13 und Uev1A, induziert die Aktivierung von TAK1. TAK1 phosphoryliert den IKK-Komplex und MAP-Kinasen, wodurch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 aktiviert werden.

Zusätzlich zu einer TIR-Domäne besitzt MyD88 auch eine Death-Domäne (DD), über welche weitere Proteine die ebenfalls eine DD besitzen rekrutiert werden können. MyD88 interagiert auf diese Weise mit IRAK-4 (IL-1 Receptor Associated Kinase 4) welches upstream von IRAK-1 liegt und dieses durch eine Kinase Domäne nach erfolgter Stimulation durch Phosphorylierung aktiviert, was zur Rekrutierung und Komplexierung von TRAF6 (TNF receptor associated factor 6) führt (Arch et al. 1998). Der IRAK1/TRAF6-Komplex dissoziiert nun vom Rezeptor und interagiert mit TAK1 (transforming growth factor- β activated kinase 1) sowie den TAK1 bindenden Proteinen TAB1 und TAB2 in der Nähe der Zellmembran. Während IRAK1 dort verbleibt und degradiert wird, wandert der TRAF6/TAK1/TAB1/TAB2-Komplex ins Zytoplasma und rekrutiert die Enzyme Ubc13 und Uev1A wodurch eine TRAF6 vermittelte Aktivierung von TAK1 erreicht wird (Deng et al. 2000). TAK1 wiederum aktiviert IKK (I κ B Kinase) und MAPK (Mitogen activated Protein Kinase) (Sato et al. 2005). IKK α , IKK β und IKK γ bilden einen Komplex welcher I κ B phosphoryliert und somit dessen Degradation einleitet. Dadurch kann der Transkriptionsfaktor NF- κ B in den Zellkern translozieren wodurch die Expression zahlreicher proinflammatorischer Zytokine gesteigert wird. Durch Aktivierung der MAPK Signalwege wird AP-1, ein weiterer Transkriptionsfaktor beteiligt in der Regulation der Expression proinflammatorischer Zytokine, aktiviert (Chang, Karin 2001).

Die TLR4 vermittelte Signaltransduktion kann jedoch auch auf einem MyD88-unabhängigen Weg erfolgen kann. Auf diesem Wege wird vor allem die Expression von Typ 1 Interferonen reguliert, welche eine wichtige Rolle in der antiviralen und antibakteriellen Immunabwehr spielen.

1.1.3 Physiologische Funktion von TNF- α

Im Jahre 1975 wurde erstmals ein Endotoxin-induziertes Glycoprotein identifiziert, welches im Mausmodell die Nekrose einiger Tumorarten auslösen konnte und daher den Namen Tumor Nekrose Faktor erhielt (Carswell et al. 1975). Eine der bedeutendsten Rollen kommt TNF- α als zentralem Regulator des Immunsystems in der Abwehr bakterieller sowie parasitärer Infektionen zu. Eine exzessive Produktion kann aber auch schädlich für den Organismus sein. TNF- α wurde als wesentlicher Faktor in der durch LPS ausgelösten Kachexie in der Maus identifiziert, einem Symptom welches auch häufig bei Tumorerkrankungen, chronischen Infektionen und Entzündungen auftritt und durch den Abbau der Speicherfettdepots und Muskulatur sowie dem schrittweisen Funktionsausfall der Organe gekennzeichnet ist (Cerami et al. 1985). Die Bedeutung von TNF- α in Reaktion auf eine Infektion konnte durch Studien in TNF- α -Rezeptor defizienten Mäusen weiterhin bestätigt werden, welche sich resistent gegenüber tödlichen Dosen von LPS zeigten (Pfeffer et al. 1993). Die Existenz von TNF- α bindenden Proteinen in einigen Viren legt außerdem eine Bedeutung von TNF- α bei der Immunabwehr von Viruserkrankungen nahe (Smith et al. 1990).

1.1.4 TNF- α Signaltransduktion

TNF- α wird zunächst als transmembranäres pro-TNF, welches stabile Homotrimere bildet, exprimiert. Durch die Metalloprotease TACE (TNF alpha converting enzyme) kann es in seine lösliche, trimere Form gespalten werden, wobei beide Formen an die Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 binden können (Black et al. 1997). Ebenso wie TNF- α selbst können aber auch die extrazellulären Domänen der Rezeptoren durch Proteolyse gespalten werden. Diese löslichen Rezeptoren können keine Signaltransduktion mehr auslösen und dienen als antiinflammatorische Gegenspieler indem sie TNF- α abfangen (Wallach et al. 1991).

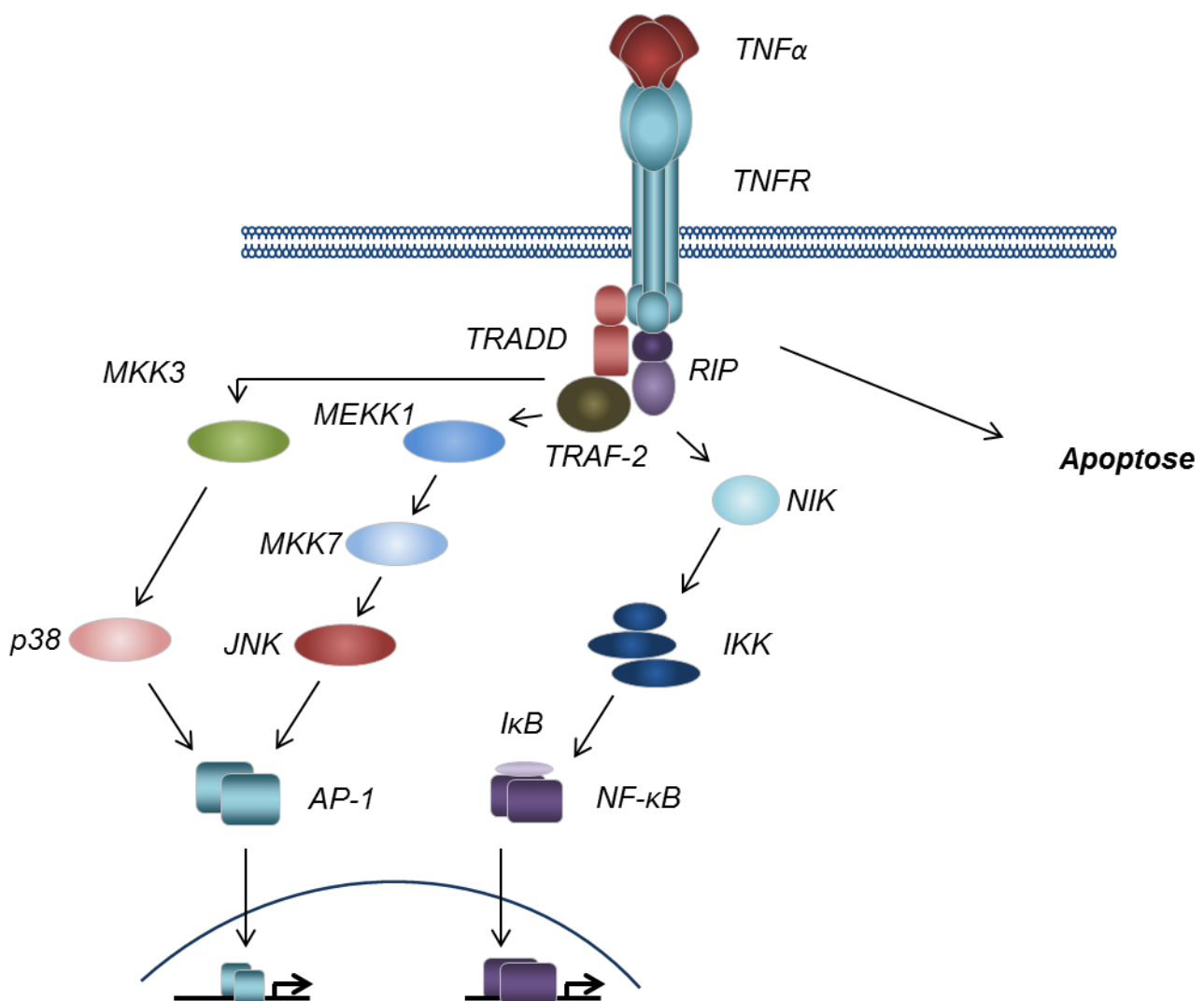


Abbildung 1.3: Signaltransduktionsweg des TNF- α -Rezeptors. TNF- α bindet an die TNF-Rezeptoren vom Typ 1 und 2. Die dadurch ausgelöste Kaskade führt abhängig vom Zelltyp zur Aktivierung von Signalwegen der Apoptose, oder der Transkriptionsfaktoren NF- κ B, AP-1 und verschiedenen MAP-Kinasen.

Von TNF- α induzierte proinflammatorische und apoptotische Signalwege werden größtenteils durch TNF-R1 vermittelt, wohingegen TNF-R2 eine Rolle bei der Angiogenese spielt

(Bradley 2008). Um eine konstitutive Aktivierung der Signalwege zu unterbinden liegt die zytosolische DD (Death Domain) des Rezeptors mit SODD (Silencer of Death Domain) assoziiert vor (Jiang et al. 1999). Nachdem TNF- α an den Rezeptor bindet dissoziiert SODD ab und ermöglicht so die Rekrutierung des DD enthaltenen Proteins TRADD (TNF-R associated DD protein), welches wiederum die Proteine RIP-1 (receptor interacting protein 1) und TRAF2 (TNF-R associated factor 2) rekrutiert. Der TRADD-RIP1-TRAF2-Komplex dissoziiert vom Rezeptor und aktiviert verschiedene Signalwege (Natoli et al. 1997). RIP-1 rekrutiert unter anderem NIK (NF- κ B inducing kinase) welche wiederum die β -Untereinheit des IKK-Komplexes (Inhibitor of κ B Kinase) aktiviert (Devin et al. 2000). I κ B Proteine werden dadurch phosphoryliert und durch anschließende Ubiquitinylierung zur Degradation freigegeben. Dadurch wird die Kernlokalisierungssequenz von NF- κ B freigelegt, was somit in den Zellkern translozieren kann und die Genexpression proinflammatorischer Zytokine initiiert. Außerdem kann TRAF2 aber auch über MAP3K wie MEKK1 und die nachgeschalteten MAP2K wie MKK3/7 zu einer Phosphorylierung und somit Aktivierung der MAP Kinasen JNK (c-Jun N-terminal kinase) und p38 führen (Bradley 2008). Beide Kinasen aktivieren den Transkriptionsfaktor AP-1, welcher in Interaktion mit CBP/p300 unter anderem die Transkription proinflammatorischer Zytokine reguliert.

Zusätzlich zu den proinflammatorischen Signalen durch NF- κ B und AP-1, initiiert TNF-R1 wie bereits erwähnt auch apoptotische Signalwege, welche an dieser Stelle aber nicht weiter ausgeführt werden.

1.1.5 Bedeutung der Zytokine TNF- α und IL6

In der Pathogenese chronisch-entzündlicher Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis (RA), Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und Psoriasis stimulieren, durch persistierende Antigene oder auch Autoantigene, permanent aktivierte T-Lymphozyten die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren aus Makrophagen.

Neben Interleukin 6 (IL 6) und Interleukin 1 (IL1) ist TNF- α einer dieser zentralen Entzündungsmediatoren. Auf Endothelzellen erhöht TNF- α die Expression chemotaktischer, permeabilitätssteigernder Adhäsionsmoleküle und somit den Durchtritt von Leukozyten und Monozyten ins Gewebe. Im Bindegewebe werden dorthin eingewanderte Monozyten zur Phagozytose stimuliert. In Fibroblasten wird die Synthese von Prostaglandinen durch eine Induktion von Cyclooxygenase-2 erhöht, welche an der Entstehung von Schmerzen und Schwellungen beteiligt sind. Außerdem kommt es durch Matrixmetalloproteasen zu Gewebeschäden in Folge eines proteolytischen Abbaus der extrazellulären Matrix.

In der Therapie der genannten Erkrankungen spielen deshalb neben den klassischen Immunsuppressiva auch direkt gegen TNF- α gerichtete Biologicals eine wichtige Rolle. Mit Infliximab (chimär) und Adalimumab (human) stehen zwei TNF- α -Antikörper zur Therapie

von sowohl RA als auch Psoriasis, Colitis ulcerosa und Morbus Crohn zur Verfügung (Wilhelm et al. 2008; Nahar et al. 2003). Zur Behandlung von RA ist weiterhin Golimumab (human) und Certolizumab (humanisiertes Fab-Fragment, konjugiert mit PEG) zugelassen. Das Fusionsprotein Etanercept besteht aus der Ligandenbindungsdomäne des TNF-R2 und der Fc-Domäne eines humanen IgG-Antikörpers und simuliert somit den löslichen TNF-Rezeptor. Etanercept ist neben RA auch für Psoriasis und die juvenile idiopathische Arthritis zugelassen (Nanda, Bathon 2004).

IL6 wird sehr schnell als Antwort auf Infektionen oder Gewebeverletzungen ausgeschüttet. Über eine Aktivierung von STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) sowie des MAPK Signalwegs aktiviert IL6 Abwehrmechanismen des Organismus. Eine Fehlregulation der IL6 Expression kann daher die Entstehung diverser Krankheiten begünstigen (Hunter, Jones 2015). So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass die Ausschüttung von IL6 in Synovialzellen bei rheumatoider Arthritis erhöht ist (Hirano et al. 1988). Aufgrund dieser Erkenntnisse ist mit Tocilizumab ein humaner IL6-Rezeptor Antagonist zur Behandlung von rheumatoider Arthritis zugelassen und befindet sich weiterhin in einer Reihe von Studien zur Behandlung anderer Erkrankungen an deren Entstehung Interleukin 6 beteiligt ist (Jones, Ding 2010).

1.2 Vom Gen zum Protein: Prinzipien der Transkription

1.2.1 Prinzipien der Transkription in Eukaryoten

Der Prozess, bei welchem DNA in RNA umgeschrieben wird, wird als Transkription bezeichnet. Die Transkription beginnt mit der Öffnung und Entwirrung eines kleinen Abschnitts der DNA-Helix, wodurch die Basen der beiden Stränge an diesen Stellen freigelegt werden. Anschließend dient einer der beiden Stränge als Vorlage für die Synthese eines komplementären RNA Moleküls. Die Enzyme, welche diese Synthese katalysieren werden RNA Polymerasen genannt. Messenger RNA (mRNA), also für Proteine kodierende RNA, wird in Eukaryoten durch die RNA Polymerase II synthetisiert, welche hierfür die Hilfe der „Generellen Transkriptionsfaktoren (TFIIA, TFIIB, etc.)“ benötigt. Diese helfen unter anderem bei der Positionierung der RNA Polymerase am Promotor (durch Bindung von TFIID an die TATA-Box), unterstützen bei der Entwirrung der DNA am Transkriptions-Startpunkt (durch die Helicase von THIIH) und lösen die Polymerase vom Promotor damit diese in die Elongationsphase der Transkription übergehen kann.

Die DNA liegt in Eukaryoten allerdings als Nukleosom verpackt und zum Chromatin kondensiert vor. In dieser Konformation ist die DNA schwer zugänglich für die Transkriptionsmaschinerie und die Transkription daher erschwert. Neben den generellen Transkriptionsfaktoren werden daher eine Reihe weiterer Enzyme benötigt. Zunächst binden Transkriptions-Aktivatoren an sogenannte *cis*-regulatorische Sequenzen der DNA („Enhancer“), wodurch die RNA Polymerase leichter an den Transkriptionsstartpunkt rekrutiert wird. Dabei ist es nicht unüblich, dass ein einzelnes Gen durch dutzende dieser Aktivatoren/Repressoren reguliert wird und ebenso viele *cis*-regulatorische Sequenzen enthält. Obwohl diese Aktivatoren teilweise mehrere Tausend Basenpaare voneinander entfernt liegen treten diese häufig durch Ausbildung von „DNA-Loops“, also Schleifen, miteinander in Kontakt und regulieren gemeinsam die Transkription durch Rekrutierung weiterer Enzyme.

Die generellen Transkriptionsfaktoren können allerdings nicht an Promotoren nukleosomaler DNA binden. Die Transkriptions-Aktivatoren koordinieren daher nicht nur den Zusammenbau der Transkriptionsmaschinerie, sondern können durch die Rekrutierung Chromatin-modifizierender Enzyme (Histon-modifizierende Enzyme und Chromatin-remodeling Komplexe) die Chromatinstruktur des Promotors verändern, und die DNA somit leichter zugänglich machen.

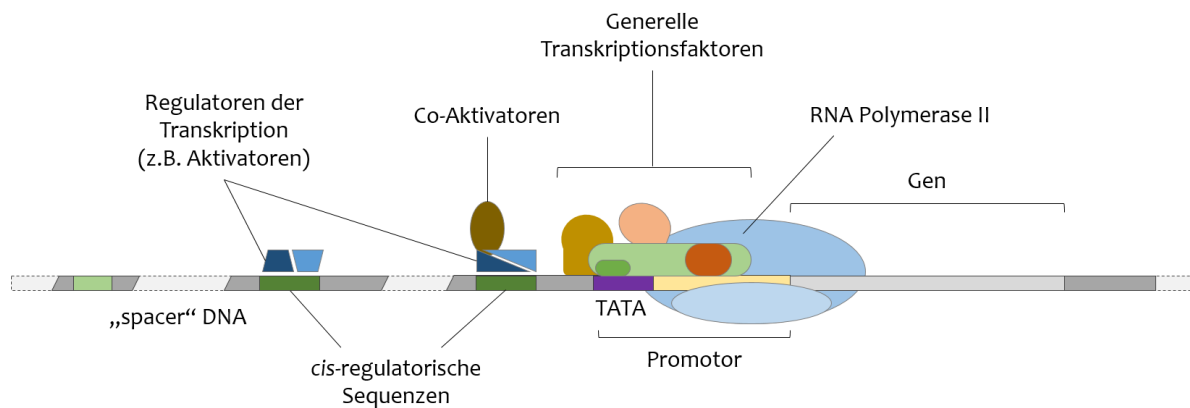


Abbildung 1.4: Prinzipien der Transkription in Eukaryoten: Die generellen Transkriptionsfaktoren (TFIIA, B, etc.), sowie die RNA-Polymerase II binden an die Promotor-Sequenz bzw. setzen sich an dieser zusammen. Die TATA-Box ist die Erkennungssequenz für den Transkriptionsfaktor TFIID. Transkriptions-Regulatoren (Aktivatoren/Repressoren) binden an cis-regulatorische Sequenzen („Enhancer“) und können durch Ausbildung von „DNA-Loops“ auch mit Proteinen am Promotor interagieren, selbst wenn sie weit entfernt von diesem lokalisiert sind. Außerdem werden durch Transkriptions-Regulatoren weitere Proteine rekrutiert, welche die Chromatin-Struktur des Promotors verändern und ihn somit für die Transkriptionsmaschinerie leichter zugänglich machen.

1.2.2 Einfluss von Histonmodifikationen auf die Transkription

Nukleosome sind die kleinste Verpackungseinheit des Chromatins und bezeichnen die Einheit von DNA und einem Histonkomplex. Die DNA ist exakt 1,65-mal um ein Histonoktamer mit je zwei Kopien der Histone H2a, H2b, H3 und H4 gewickelt. Die flexiblen, endständigen Arme der Histone (histone tails) enthalten viele basische, also positiv geladene, Aminosäuren. Diese Histon-Ausläufer unterliegen einer Vielzahl post-translationaler Modifikationen über welche das Chromatin-Remodeling und damit die Regulation der Transkription, DNA-Replikation und DNA-Reparatur gesteuert werden. Acetylierungen und Methylierungen stellen die häufigsten Modifikationen dar. Einige typische Modifikationen sind z.B. die Methylierung der Aminosäure Lysin (mit K abgekürzt) an Stelle 4, 9 oder 27 des Histons 3 (z.B. H3K9me2). Durch Acetylierung entsteht am betroffenen Lysin-Rest des Histons eine negative Ladung, was zu einer verminderten Interaktion zwischen Histon und DNA führt. Dies ist üblicherweise mit einer gesteigerten Transkription assoziiert. Methylierung eines Lysin-Rests verändert hingegen nichts an der Ladung der DNA und hat somit zunächst keinen Einfluss auf die Histon-DNA Interaktion. Vielmehr werden durch das Methylierungsmuster verschiedene Effektor-Proteine rekrutiert, wodurch es zu einer Aktivierung oder Repression der Transkription des betroffenen Gens kommen kann. Lysin-Reste können unmethyliert, mono-, di- und trimethyliert vorliegen, was sich in Abhängigkeit des betroffenen Lysin-Rests auf die up- oder down-Regulation der Transkription auswirkt. Hatte man zunächst Histonmethylierungen noch als irreversible, permanente Modifikationen angesehen,

konnte mittlerweile eine Vielzahl an Enzymen identifiziert werden (e.g. Lysin specific demethylase, LSD1), welche in der Lage sind Lysin-Reste zu demethylieren (Berger 2007; Kouzarides 2007).

1.2.3 Regulierung der NF- κ B vermittelten Transkription inflammatorischer Gene

Proinflammatorische Gene befinden sich normalerweise im Ruhezustand, können aber durch einen entsprechenden Stimulus schnell induziert werden. Diese Induktion erfolgt durch das konzertierte Zusammenspiel induzierbarer Transkriptionsfaktoren (Aktivatoren) und der Modulation des Chromatins in der Umgebung regulatorischer Elemente der Gene (Bhatt, Ghosh 2014). Zu diesen Transkriptionsfaktoren gehört die Familie der NF- κ B Transkriptionsfaktoren. Alle Mitglieder dieser Familie besitzen ein DNA-Bindungsmotiv, auch als „Rel homology domain (RHD)“ bekannt. In Säugetieren sind 5 solcher Proteine bekannt: p65 (RelA), c-Rel, RelB, p100/p52 und p105/p50. Diese Proteine können alle untereinander Homo- beziehungsweise Heterodimere bilden und stellen so die Familie der NF- κ B Transkriptionsfaktoren dar. Üblicherweise wird mit NF- κ B das am häufigsten vorkommende Dimer p50/RelA bezeichnet (Hoffmann, Baltimore 2006). Unstimuliert wird NF- κ B durch seinen Inhibitor I κ B im Zytoplasma zurückgehalten. Nach einem proinflammatorischen Stimulus wird I κ B durch den I κ B Kinase Komplex (IKK) phosphoryliert und somit zur Ubiquitinylierung und anschließenden Degradation freigegeben (siehe Kapitel 1.1.2) (Hayden, Ghosh 2008). NF- κ B kann in den Zellkern translozieren und bindet dort an spezifische, Guaninreiche Bindungssequenzen in der Promotor/Enhancer-Region der Zielgene (5'-GGGRNWYYCC-3'; R=A/G, N=A/G/C/T, W=A/T, Y=C/T) (Chen et al. 1998).

Eine Zelltyp-spezifische Antwort auf einen Stimulus ist aber nicht nur auf die Aktivität eines einzelnen Transkriptionsfaktors zurückzuführen, vielmehr konnte für Makrophagen gezeigt werden, dass die Transkriptionsfaktoren PU.1 und AP-1 ebenfalls an Enhancer Elemente der Zielgene binden und das Chromatin epigenetisch „aktivieren“, wodurch die Promotorsequenz letztendlich für NF- κ B leichter zugänglich ist (Heinz et al. 2010; Ghisletti et al. 2010). Außerdem kann NF- κ B über seine transaktivierende Domäne mit weiteren transkriptionellen Kofaktoren wie den Chromatin Modulatoren interagieren, wodurch die Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie zum Promotor und damit die Transkription erleichtert wird (O'Shea, Perkins 2008). Einer dieser Kofaktoren, vor allem der RelA Untereinheit, ist der p300/CBP Histon Acetyltransferase Komplex (Bhatt, Ghosh 2014). Aber nicht nur Acetylierungen, sondern auch Methylierungen der Histone regulieren die Aktivität der Transkriptionsfaktoren. Bereits im Ruhezustand befindet sich ein kleiner Anteil der RelA Proteine im Nukleus, wo sie gebunden an NF- κ B Bindungssequenzen von SETD6 monomethyliert werden. Diese Methylierung legt eine Bindestelle für die Histonmethyltransferase GLP frei, welche H3K9 methyliert, was sich wiederum repressiv auf die Expression der NF- κ B Zielgene auswirkt. Durch Stimulation mit z.B. TNF- α oder auch LPS, wird RelA in der Nähe der Methylierungsstelle durch die Proteinkinase C ζ phosphoryliert. Dies unterbindet

die GLP Bindung, beziehungsweise ermöglicht nun die Demethylierung von H₃K₉, was sich aktivierend auf die Transkription der Zielgene auswirkt (Levy et al. 2011).

1.2.4 Funktion der Lysin-spezifischen Demethylase LSD1/2

LSD1, so wie das Homolog LSD2, besitzen beide eine Aminooxidase Domäne, welche sich aus zwei Subdomänen zusammensetzt (AO-N und AO-C) und eine Bindestelle für den Kofaktor FAD am C-terminalen Ende besitzt. Dieser vorausgehend befindet sich jeweils eine SWIRM-Domäne, über welche spezifische Protein-Protein Interaktionen im Kontext eines Chromatin-Protein-Komplexes vermittelt werden. Der Hauptunterschied der beiden Homologen ist am N-terminalen Ende lokalisiert, wo LSD2 eine CW-Typ Zinkfinger Domäne besitzt, was wiederum die Möglichkeit eröffnet mit nukleosomaler DNA zu interagieren (Karytinos et al. 2009). LSD1 besitzt zusätzlich noch eine TOWER-Domäne zwischen AO-N und AO-C. Diese wiederum vermittelt die Bindung des Co-Repressors CoREST, ein integraler Bestandteil eines Histondeacetylase Komplexes. Durch Interaktion von LSD1 mit CoREST wird die Substratspezifität von LSD1 beeinflusst und LSD1 ist nunmehr in der Lage auch nukleosomale Substrate zu demethylieren (Forneris et al. 2008). LSD2 besitzt hingegen keine TOWER-Domäne, sondern einen Linker über welchen ebenfalls Protein-Interaktionen vermittelt werden können.

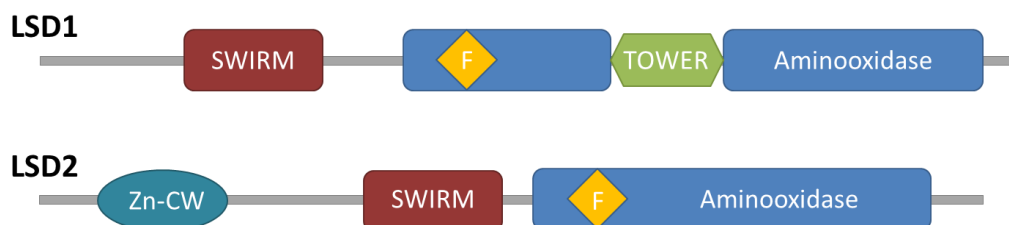


Abbildung 1.5: Unterschiede der Flavin-abhängigen Histon Demethylasen LSD1 und LSD2. Beide Enzyme besitzen eine Aminooxidase Domäne mit einer Bindestelle für FAD (F), sowie eine SWIRM-Domäne. LSD2 besitzt zusätzlich eine Zinkfinger-Domäne.

Sowohl LSD1 als auch LSD2 ist in der Literatur als Demethylase mit Substratspezifität für H3K4me2/1, und H3K9me2/1 beschrieben (Zhang et al. 2013; Rotili, Mai 2011). Die Demethylierungsreaktion beginnt mit einer Oxidation der Aminogruppe des methylierten Lysinrestes durch LSD1. Das dabei entstehende intermediäre Iminiumkation hydrolysiert zum entsprechenden Carbinolamin, welches wiederum spontan zu Formaldehyd und dem jetzt demethylierten Lysinrest zerfällt.

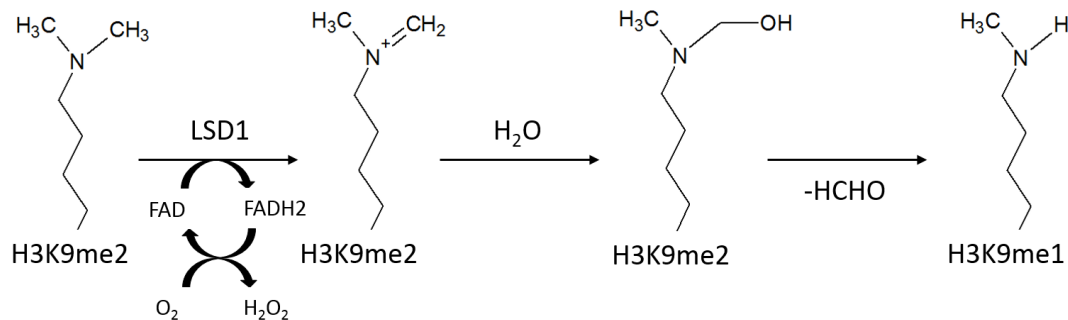


Abbildung 1.6: Mechanismus der LSD1 katalysierten Demethylierung. LSD1 katalysierte Demethylierung erfolgt über eine Aminooxidase Reaktion, wobei FAD als Kofaktor benötigt wird. Als Nebenprodukt der Reoxidation von FADH₂ zu FAD entsteht Wasserstoffperoxid.

Da dieser Reaktionsmechanismus die Bildung eines protonierten Stickstoffs voraussetzt, ist diese Art der Demethylierung auf mono- und dimethylierte Lysinreste beschränkt. Der Kofaktor FAD wird während der Demethylierung zu FADH₂ reduziert und in einer Folgereaktion durch Sauerstoff reoxidiert, was zu einer stöchiometrischen Produktion von Wasserstoffperoxid führt (Culhane, Cole 2007).

1.2.5 Aktivierung und Repression der Transkription durch LSD1

LSD1 demethyliert spezifisch die Lysinreste H3K4me2/1, wodurch LSD1 eine Funktion als Ko-Repressor einnimmt, sowie an H3K9me2/1, wodurch es als Co-Aktivator fungiert (Rotili, Mai 2011). Die genaueren Mechanismen über welche die Substratspezifität von LSD1 koordiniert wird, werden an dieser Stelle nicht weiter erörtert. Es gibt jedoch Hinweise, dass die Proteinkinase C β 1 durch Phosphorylierung eines Threoninrests an Histon 3 an der Steuerung beteiligt ist, und die Substratspezifität zu H3K9me2/1 verschiebt (Metzger et al. 2010).

Histondemethylasen werden auch als wichtiger Bestandteil des Signalings nukleärer Rezeptoren, also Transkriptionsfaktoren (Aktivatoren/Repressoren), angesehen (Garcia-Basets et al. 2007). Diese Rezeptoren translozieren nach Bindung eines entsprechenden Liganden in den Zellkern und steigern die Transkription spezifischer Zielgene (siehe Kapitel 1.2.3). So konnte gezeigt werden, dass LSD1 im Zusammenspiel mit den Histondemethylasen (H3K9me2/3) JMJD1A und JMJD2C als spezifischer Demethylierungskomplex an der Transkription Androgen-Rezeptor spezifischer Zielgene beteiligt ist (Wissmann et al. 2007).

Damit einhergehend konnte gezeigt werden, dass LSD1 in der Promotorregion Estrogen responsiver Zielgene lokalisiert ist und dies mit dem Auftreten von H3K9 Dimethylierungen invers korreliert. Umgekehrt führte eine Depletion verschiedener Lysinmethyltransferasen (KMT) sogar in Abwesenheit eines Liganden durch die Bindung von Estrogenrezeptoren an die entsprechenden Promotorregionen zur Aktivierung der Transkription (Garcia-Bassets et al. 2007).

Im von Garcia-Bassets vorgeschlagenen Modell agieren daher repressive Methylierungen wie H3K9me₃ als Wächter, welche durch Lysinmethyltransferasen erzeugt werden und eine Transkription von Zielgenen durch nicht-ligandengebundene Rezeptoren verhindern. Die Rekrutierung von LSD1 und weiteren Demethylasen in Anwesenheit eines Liganden hingegen führt zu einer Aktivierung der Transkription, in dem die repressiven Methylierungen wieder rückgängig gemacht werden (Garcia-Bassets et al. 2007).

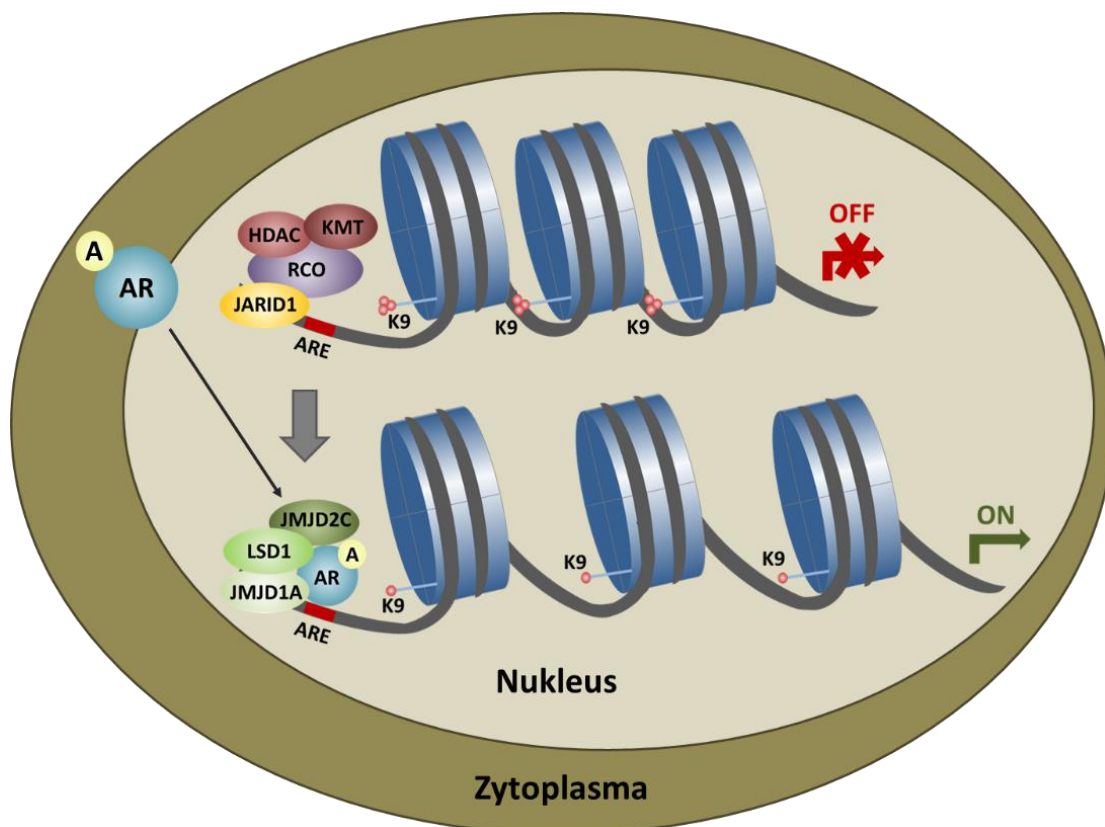


Abbildung 1.7: Einfluss der Demethylasen auf die Transkription von Zielgenen nukleärer Rezeptoren. Nach Bindung des Liganden Androgen (A), an den Androgen Rezeptor (AR), transloziert dieser in den Zellkern. Dort interagiert dieser in der Nähe Androgen-responsiver Elemente spezifischer Zielgene mit Histondemethylasen. Durch diese Interaktion mit LSD1, JMJD2C oder JMJD1A werden repressive H3K9 Methylierungen aufgehoben. Repressive Komplexe (RCO), an denen beispielsweise H3K9-Methyltransferasen (KMT), Histondeacetylasen (HDAC) oder H3K4-Demethylasen beteiligt sein können, verhindern eine Liganden-unabhängige Aktivierung.

1.3 Reaktive Sauerstoff Spezies und oxidativer Stress

Unter dem Begriff „Reaktive Sauerstoffspezies“ (ROS) werden verschiedene Sauerstoff enthaltende, reaktive Moleküle zusammengefasst, welche endogen im Zuge des aeroben Metabolismus und der zellulären Immunabwehr, oder exogen zum Beispiel durch den Metabolismus von Xenobiotika oder durch Absorption von UV-Strahlung entstehen (Ray et al. 2012). Die wichtigsten ROS sind in Tabelle 1.1 aufgelistet (Sies 1993). Obwohl ROS eine relativ geringe Halbwertszeit besitzen können sie potenziell mit Makromolekülen wie Lipiden, Proteinen und den Nukleinsäuren in RNA und DNA reagieren und sind daher an der Entstehung zahlreicher Entzündungskrankheiten, der Kanzerogenese (Trachootham et al. 2009) und Seneszenzvorgängen (Colavitti, Finkel 2005) beteiligt. Andererseits dienen ROS aber auch als wichtige Signalmoleküle und sind in der Steuerung zahlreicher biologischer Prozesse involviert (Ray et al. 2012). Für den Organismus ist es daher essentiell die durch endogene und exogene Prozesse entstandenen ROS durch zelluläre Schutzmechanismen auszugleichen und so die Zellhomöostase aufrecht zu erhalten. Eine Dysbalance zugunsten der ROS-Produktion wird üblicherweise als „oxidativer Stress“ bezeichnet (Sies 1991).

Tabelle 1.1: reaktive Sauerstoffspezies.

Reaktive Sauerstoffspezies	
HO [•]	Hydroxylradikal
O ₂	Singulett-Sauerstoff
O ₂ ^{•-}	Superoxidanion-Radikal
RO [•]	Alkoxyl-Radikal
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

1.3.1 Endogene Quellen von ROS und deren Katabolismus

Wie bereits erwähnt verbindet man ROS nicht mehr nur mit pathophysiologischen Prozessen. ROS aus endogenen Quellen (Tabelle 1.2) sind vielmehr bei einer Vielzahl biologischer Prozesse beteiligt. Die Bildung freier Sauerstoff-Radikale erfolgt durch eine sequenzielle monovalente Reduktion aus molekularem Sauerstoff über das Superoxidanion-Radikal, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikale bis hin zu Wasser. Das Superoxidanion-Radikal ist in nahezu allen aeroben Zellen präsent und wird als intermediärer Metabolit im Zuge intrazellulärer Oxidationsreaktionen und der mitochondrialen Atmungskette gebildet. In wässriger Lösung und physiologischem pH unterliegt das Superoxidanion-Radikal einer spontanen Dismutation zu Wasserstoffperoxid und molekularem Sauerstoff. Diese Umset-

zung wird durch die spezialisierte Superoxid-Dismutase (SOD1 & 2) nochmals erheblich beschleunigt (Fridovich 1995). SOD1 ist vor allem im Zytosol und im mitochondrialen Inter-membranraum, SOD2 vorrangig in der mitochondrialen Matrix lokalisiert.

Wasserstoffperoxid ist kein Radikal und aufgrund seiner höheren Stabilität und Apolarität in der Lage Zellmembranen zu permeieren (Bienert et al. 2006). Obwohl es ein vergleichsweise geringes Oxidationspotenzial aufweist kann es durch Oxidation von SH-Gruppen Molekülmodifikationen verursachen. Wasserstoffperoxid kann durch enzymatische Konversion mit Hilfe der Katalase abgefangen werden. Ein anderer Weg besteht in der Glutathion-abhängigen Umsetzung mit Hilfe der Glutathion-Peroxidase (Gaetani et al. 1989). Beide Mechanismen spielen eine wichtige Rolle in der Reduktion oxidativen Stresses.

Zur schädlichen Wirkung von Wasserstoffperoxid trägt weiterhin die Metall-katalysierte Haber-Weiss-Reaktion bei:

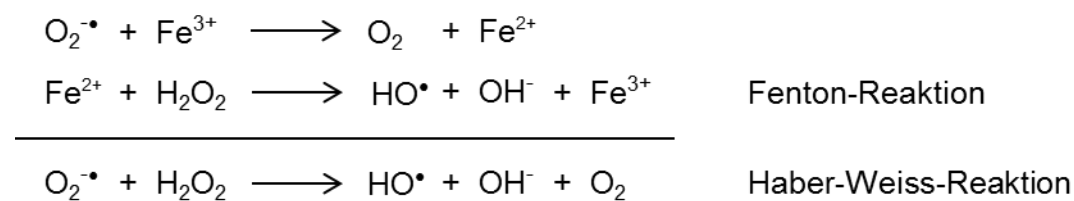


Abbildung 1.8: Metall-katalysierte Bildung von Hydroxyl-Radikalen

Im zweiten Schritt dieser Reaktion, auch Fenton-Reaktion genannt, entsteht das hochreaktive Hydroxylradikal durch die Reaktion des Superoxidanion-Radikals mit Wasserstoffperoxid (Halliwell 1996). Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit erfolgt die Oxidation von biologischen Molekülen (z.B. Lipide, Proteine, Nukleinsäuren, Kohlenhydrate) durch das Hydroxylradikal vor allem in der Nähe des Entstehungsortes. Konsequenzen für die DNA aus einem Kontakt mit Hydroxylradikalen sind typischerweise Einzel- und Doppelstrangbrüche, Verlust oder Modifikationen von DNA-Basen und DNA-Protein-Quervernetzungen (Halliwell, Aruoma 1991). Während das Superoxidanion-Radikal und Wasserstoffperoxid durch endogene Antioxidantien katabolisiert werden können, kann das erheblich reaktivere Hydroxylradikal nicht enzymatisch detoxifiziert werden. Da die Fenton-Reaktion jedoch durch freie Eisen- oder auch Kupfer-Ionen katalysiert werden muss, verfügt der Organismus über verschiedene Mechanismen um den Eisen/Kupfer-Haushalt streng zu regulieren und der Bildung von ROS auf dieser Ebene zu entgegenen.

Tabelle 1.2: Endogene Quellen und Katabolismus von ROS.

Endogene Quellen	enzymatische Antioxidantien	nicht-enzymatische Antioxidantien
NADPH-Oxidasen	Superoxid-Dismutase	Pyruvat
mitochondriale Atmungskette	Katalase	Ascorbinsäure
CyP450 Enzyme	Glutathion-Peroxidase	α -Ketoglutarat
Flavin-abh. Demethylasen	Glutathion-Reduktase	
Cyclooxygenasen		

1.4 Oxidative DNA-Schäden & die Basenexzisionsreparatur

1.4.1 Oxidative DNA-Schäden

Unabhängig von ihrer Herkunft, können reaktive Sauerstoffspezies mit zellulären Strukturen wie Proteinen oder Lipiden aber auch der DNA reagieren. Im letzteren Falle können sowohl die einzelnen Basen als auch das Zucker-Phosphat Rückgrat Ziel einer Oxidation sein. Durch diese Oxidationen entstehen somit verschiedene Basenmodifikationen, AP-Läsionen sowie Einzel- und Doppelstrangbrüche von denen einige in Abbildung 1.9 dargestellt sind (Halliwell, Aruoma 1991).

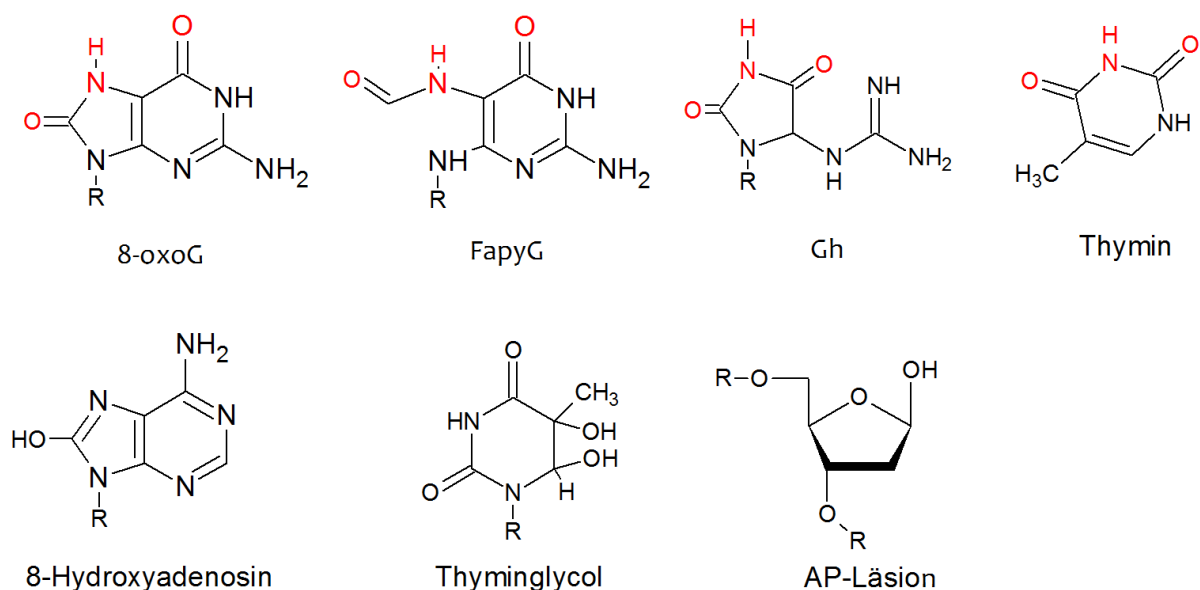


Abbildung 1.9: Einige der häufigsten oxidativen DNA Schäden. Einige der häufigsten oxidativen DNA-Schäden, u.a. 8-oxoGuanin, Formamidopyrimidine (z.B. FapyG) und auch das Hydantoin Gh, imitieren das Potenzial zur Bildung von Wasserstoffbrücken (rot) von Thymin.

Wenngleich 8-oxoG eine der häufigsten oxidativen Läsionen darstellt (Fortini et al. 2003) konnte gezeigt werden, dass diese Läsion sehr empfindlich gegenüber weitergehenden Oxidationsreaktionen ist. Unter anderem entstehen die Hydantoin-Läsionen Gh und Sp. Diese Läsionen weisen das gleiche Wasserstoffbrückenbindungs-Potential wie 8-oxoG und FapyG auf und können somit wie diese Läsionen ebenfalls das Basenpaarungspotential von Thymin imitieren (David et al. 2007). Auch für andere oxidative Läsionen wird aufgrund ihres niedrigen Redoxpotentials angenommen, dass sie unter oxidativen Bedingungen lediglich reaktive Intermediate darstellen könnten.

1.4.2 8-oxoGuanin

Wie bereits erwähnt sind DNA-Basen empfindlich gegenüber einer Oxidation durch ROS. Das niedrige Redoxpotenzial von Guanin macht gerade diese Base besonders angreifbar, was zu einer Vielzahl an Oxidationsprodukten von Guanin führt. Das am besten untersuchte Oxidationsprodukt stellt 7,8-dihydro-8-oxoguanin, auch bekannt als 8-oxoGuanin (8-oxoG), dar. Dessen Präsenz wird oftmals als Indikator für oxidativen Stress herangezogen. Diese Läsion ist deshalb von besonderem Interesse, da bei der Oxidation zu 8-oxoG nicht nur eine oxo-Gruppe an der C8 Position, sondern gleichzeitig auch ein H-Atom an Position N7 eingefügt wird. Durch diese Veränderung kann 8-oxoG nicht mehr nur in seiner *anti*-Konformation die reguläre Basenpaarung mit Cytosin eingehen, sondern in *syn*-Konformation auch das Basenpaarungspotenzial von Thymin imitieren. Dies ermöglicht somit die Bildung einer stabilen 8-oxoG (*syn*)•A (*anti*) Paarung (Shibutani et al. 1991).

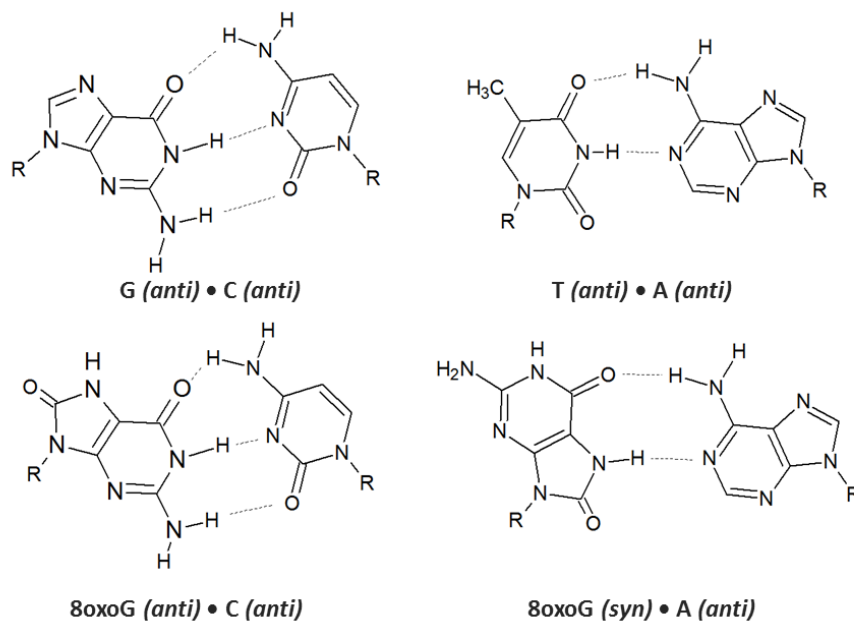


Abbildung 1.10: Basenfehlpaarung von 8-oxoGuanin. Vergleich der Strukturen der Basenpaarungen von G•C und T•A mit denen der Paarungen von 8-oxoG•C und 8-oxoG•A. Obwohl sich 8-oxoG von G nur durch eine zusätzliche oxo-Gruppe an C8 sowie NH an N7 unterscheidet, erlauben diese Veränderungen, dass 8-oxoG sowohl mit C als auch mit A paaren kann.

Im Gegensatz zu vielen anderen Arten von DNA-Schäden erlauben gerade diese Eigenschaften von 8-oxoG, dass replikative DNA-Polymerasen diese Läsion passieren können. Der Vergleich von Röntgenstrukturanalysen verschiedener Läsionen verdeutlicht, welche Konsequenzen eine 8-oxoG Läsion im Template Strang vor und nach Einbau von entweder dAMP oder dCMP durch eine DNA Polymerase hat. Die 8-oxoG (*syn*)•A (*anti*) Paarung imitiert eine normale Basenpaarung und kann dadurch nur ineffizient durch die DNA-Polymerase als Fehlpaarung erkannt werden. Weiterhin führt die 8-oxoG (*anti*)•C (*anti*) Basenpaarung während der Replikation zu Distorsionen der DNA-Matrize und der Polymerase. Diese Distorsionen haben Ähnlichkeit mit denen, die hervorgerufen werden sobald eine

DNA-Polymerase auf ein Mismatch, also eine Fehlpaarung wie z.B. G•T oder A•C, aufläuft (Hsu et al. 2004). Somit wird an der gegenüber liegenden Stelle einer 8-oxoG Läsion Adenin nicht nur leichter eingebaut als Cytosin, sondern durch replikative DNA-Polymerasen auch noch als weniger störend empfunden.

8-oxoG kann aber nicht nur durch direkte Oxidation der DNA entstehen. Auch dGTP im Nucleotid-Pool kann durch reaktive Sauerstoffspezies zu 8-oxo-dGTP oxidiert werden. So konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von 8-oxo-dGTP in einigen Rattenorganen unter normalen Bedingungen im Bereich zwischen 0,2 – 2 μM liegt (Pursell et al. 2008). 8-oxo-dGTP wird dann während der Replikation durch menschliche und auch bakterielle DNA-Polymerasen sowohl gegenüber Adenin als auch Cytosin fehleingebaut (Katafuchi, Nohmi 2010). In welchem Ausmaß einerseits die direkte Oxidation von Guanin in der DNA und andererseits der Fehleinbau von 8-oxo-dGTP zum basalen Spiegel von 8-oxoG in der DNA beitragen wird kontrovers diskutiert.

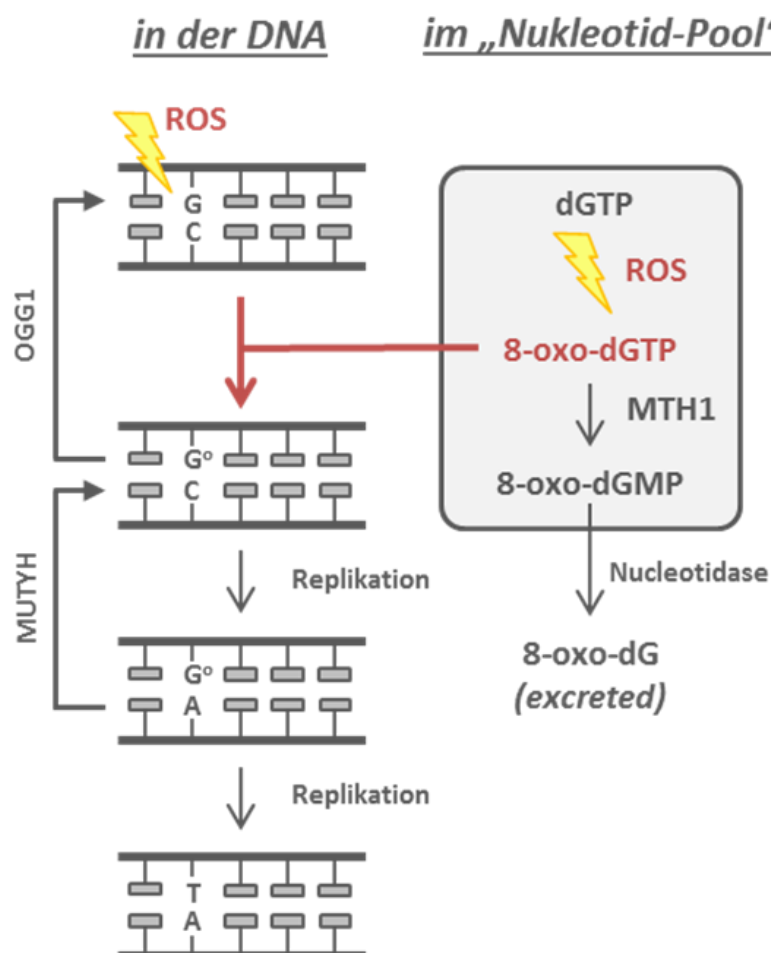


Abbildung 1.11: Mutagenese durch oxidative DNA-Läsionen. 8-oxoGuanin akkumuliert in der DNA entweder durch Fehleinbau von 8-oxo-dGTP aus dem oxidierten Nukleotidpool, oder durch direkte Oxidation der DNA. Insofern diese Läsionen nicht repariert werden entstehen nach Replikation an diesen Stellen Transversionsmutationen.

Eine fehlerhafte Beseitigung von 8-oxoG vor der Replikation führt zu G nach T Transversionsmutationen. Daher gibt es in allen Organismen spezialisierte Reparaturwege, die darauf ausgerichtet sind das mutagene Potenzial von 8-oxoG abzuschwächen. Die Basenexzisionsreparatur mit den Glycosylasen OGG1 und MUTYH, sowie MTH1 bildet als einer dieser Wege einen Schutz vor Mutationen durch 8-oxoG Läsionen. MTH1 hydrolysiert 8-oxo-dGTP zu 8-oxo-dGMP, entzieht es somit dem Nucleotid-Pool und verhindert so den Fehleinbau von 8-oxo-dGTP. Die Glycosylase OGG1 entfernt 8-oxoG aus einer 8-oxoG • C Basenpaarung und macht das Substrat zugänglich für den weiteren Reparaturweg (siehe Kapitel 1.4.3). Sollte dies jedoch ausbleiben kann die DNA Glycosylase MUTYH die nach der Replikation resultierende 8-oxoG • A Paarung abfangen und Adenin als „falsche“ Base entfernen. An der entstandenen AP-Stelle kann nach einer weiteren Replikation eine 8-oxoG • C Paarung entstehen, die dann wiederum über OGG1 repariert werden kann (David et al. 2007).

1.4.3 Basenexzisionsreparatur

DNA Schäden können durch eine Vielzahl schädlicher Agenzien entstehen. Dabei handelt es sich nicht nur um oxidative Schäden, sondern auch um Schäden die durch Alkylierungen und Desaminierungen verursacht wurden. Auch diese Läsionen zeigen teilweise ein verändertes Basenpaarungs-Verhalten, was während der Replikation zu Mutationen durch Fehleinbau von DNA-Bausteinen führen kann. Um die Integrität der DNA zu bewahren ist es also notwendig, dass diese Basenmodifikationen effizient erkannt und repariert werden. Dies geschieht durch das exakte Zusammenspiel verschiedener Enzyme. Die Gesamtheit der dabei ablaufenden Prozesse wird als Basenexzisionsreparatur bezeichnet (Robertson et al. 2009).

Insgesamt wird die Funktion von vier Enzymen benötigt um eine beschädigte Base zu erkennen, zu entfernen und durch die korrekte Base zu ersetzen (Kubota et al. 1996). Im ersten Schritt muss die beschädigte Base durch eine geeignete DNA-Glycosylase (Tabelle 1.3) erkannt werden. Diese Glycosylase sucht und erkennt spezifische Schäden der DNA, wie anhand der 8-oxo-Guanin-Glycosylase (OGG1) in Kapitel 1.4.4 näher beschrieben. Diese Glycosylasen katalysieren die Öffnung einer N-glycosidischen Bindung, wodurch die beschädigte Base entfernt wird und an deren Stelle sich jetzt eine apurinische/apyrimidinische Stelle befindet. Das Rückgrat der DNA kann daraufhin durch die Aktivität der AP-Endonuklease 1 (APE1) aufgebrochen werden, was zur Entstehung eines Einzelstrangbruchs 5' der AP-Site mit einem 5'-Zuckerrest führt. Alternativ können bifunktionelle Glycosylasen wie OGG1 die AP-Stelle durch eine DNA-Lyase schneiden, was zu einem Strangbruch mit einem 3'-Zuckerrest führt, welcher durch eine DNA-Polymerase weiter verarbeitet werden muss um ein passendes Substrat für die DNA-Ligase bereit zu stellen. Anschließend werden durch die DNA Polymerase beta (POLB) zwei Reaktionen katalysiert. Durch die Polymerase-Aktivität wird die Nukleotid-Lücke mit dem passenden Nukleotid aufgefüllt. Weiterhin muss durch die 5'-Deoxyribosephosphatase-Aktivität der 5'-Phosphatrest entfernt werden

bevor dieser Weg der Basenexzisionsreparatur, welcher auch als „shortpatch BER“ bezeichnet wird, durch Ligation mittels DNA Ligase III (LIG3) abgeschlossen wird. Wenngleich noch keine enzymatische Aktivität für XRCC1 beschrieben wurde, so konnte dennoch gezeigt werden, dass dieses Enzym als Verbindungsprotein sowohl mit POLB, als auch mit LIG3 interagiert und somit in der Koordination der shortpatch BER eine wichtige Rolle spielt (Robertson et al. 2009). Auch in der „longpatch BER“ wird durch die Aktivität von APE1 ein Strangbruch 5' der AP-Site erzeugt, was zur Rekrutierung der DNA Polymerasen beta und delta (POLB und POLD), PCNA, FEN1 und wahrscheinlich LIG1 führt. In Abhängigkeit von PCNA trennt POLB die beiden DNA Stränge und polymerisiert einen Teil der DNA (> 1 Base). Der dabei zur Seite gedrängte, ursprüngliche Strang steht jedoch der weiteren Ligation der Stränge im Weg und muss zunächst durch FEN1 entfernt werden bevor LIG1 die beiden Enden des DNA Strangs wieder ligiert (Robertson et al. 2009). Die Prozesse, welche die Entscheidung lenken ob eine Läsion über den short- oder longpatch Weg repariert werden, sind allerdings noch immer schlecht verstanden.

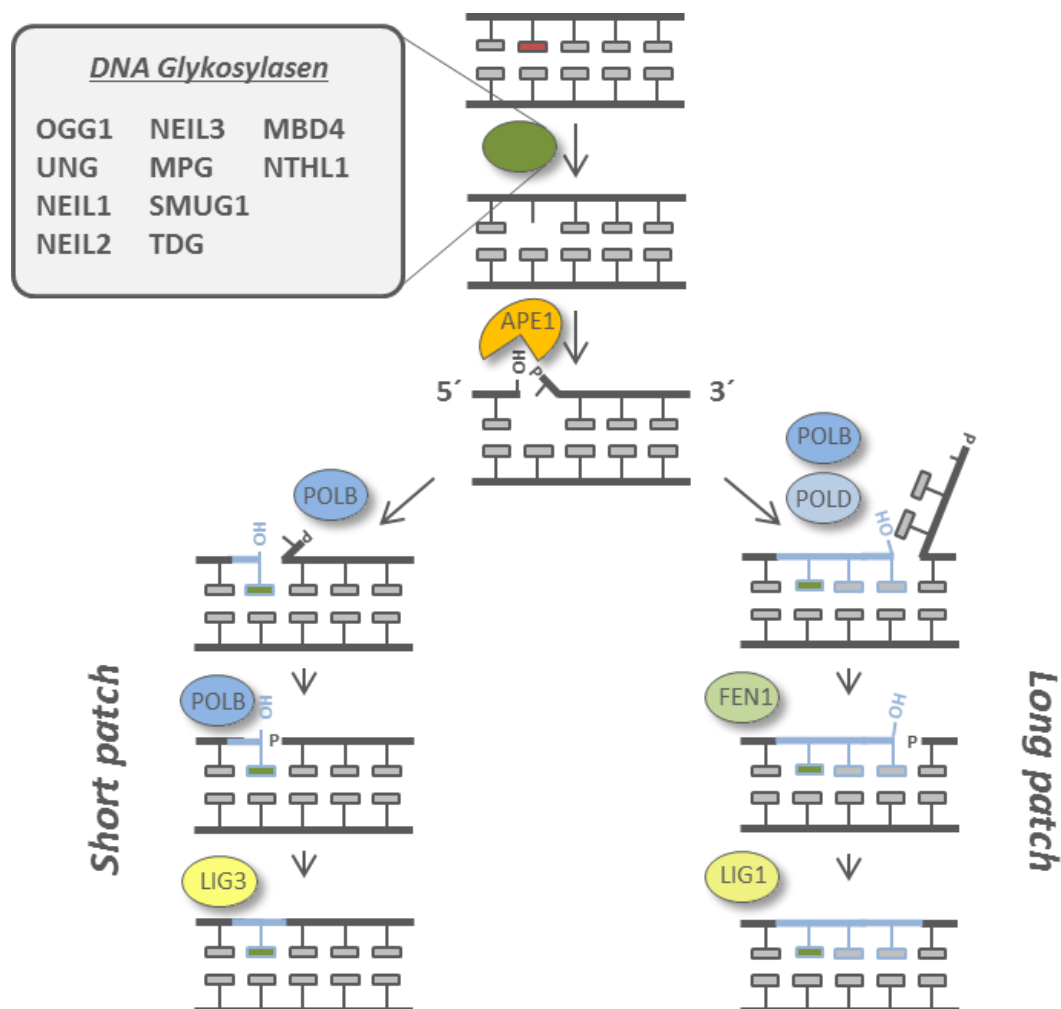


Abbildung 1.12: short- und longpatch Mechanismus der Basenexzisionsreparatur. Weitergehende Erklärungen zum Ablauf der Reparatur im Text.

Tabelle 1.3: DNA-Glykosylasen und ihre Substrate nach Robertson et al. (2009)

Enzym	Substrate
OGG1	8-oxoG, FapyG
UNG	Uracil
SMUG1	Uracil, 5-OH-meU
TDG	T, U und ethenoC (CpG Stellen)
MBD4	T und U gegenüber G (CpG Stellen)
MUTYH	A gegenüber 8-oxoG
NTHL1	Tg, FapyG, DHU, 5-OH-U, 5-OH-C
NEIL1	wie NTHL1 + FapyA, 8-oxoG
NEIL2	wie NTHL1/NEIL1
NEIL3	unbekannt
MPG	3-meA, hypoxanthine, ethenoA

1.4.4 8-oxoGuanin Glykosylase (OGG1)

Die effektive Reparatur oxidativer DNA-Schäden stellt eine große Herausforderung für alle Organismen dar. Von daher ist es wenig verwunderlich, dass die zur Reparatur benötigten Glykosylasen von einfachen Eukaryoten wie *S.cerevisiae* bis hin zu Säugerzellen eine hohe Homologie aufweisen. In menschlichen Zellen befindet sich das OGG1 Gen auf Chromosom 3, während es in Nagerzellen auf Chromosom 6 lokalisiert ist. In Humanzellen entstehen durch alternatives splicing einer einzigen mRNA zwei Formen von OGG1 (α OGG1 und β Ogg1). Die Sequenzen beider Formen weisen am N-terminalen Ende ein Signal zur mitochondrialen Lokalisierung auf. Das C-terminale Ende hingegen unterscheidet sich erheblich, indem nur die α -Form eine nukleäre Lokalisierungs Sequenz besitzt. Zudem ist auch die für die Glykosylase Aktivität essentielle α -Helix Struktur am C-terminalen Ende lokalisiert und nur in α OGG1 präsent. Das vor allem in den Mitochondrien lokalisierte β OGG1 weist daher keine Glykosylase Aktivität auf (Hashiguchi et al. 2004). In Nagerzellen konnte bislang nur die α -Form von OGG1 nachgewiesen werden, die zu 84 % mit der menschlichen Variante übereinstimmt. OGG1 gehört zur Gruppe der bifunktionellen Glykosylasen, das heißt es besitzt neben der Glykosylase- auch noch eine Lyase-Funktion. Zum Erkennungsspektrum von OGG1 gehören neben 8oxoG auch FapyG und Methyl-Fapy-Guanin, jedoch nur solange diese modifizierten Basen mit Cytosin gepaart sind (Boiteux, Radicella 2000).

In der nukleären DNA von Eukaryoten sind ca. 2-3 8-oxoG Läsionen pro 10^6 Guaninbasen detektierbar (Ohno et al. 2006). Die geringe Anzahl, zusammen mit der strukturellen Ähnlichkeit von 8-oxoG zu G stellt eine große Herausforderung für OGG1 dar diese Läsionen unter der großen Anzahl unbeschädigter Basen in quantitativem Maßstab zu detektieren. Strukturelle und biophysikalische Analysen konnten zeigen, dass viele DNA Glykosylasen Gemeinsamkeiten hinsichtlich der Mechanismen zur Läsions-Erkennung, der Enzym induzierten Biegung der DNA, dem Aufbrechen der Basenpaarung, dem Herausdrehen des beschädigten Nukleotids aus dem Inneren der DNA Helix und der Platzierung der Zielbase im aktiven Zentrum der Glycosylase zeigen (Hitomi et al. 2007). Die verschiedenen Vorgänge können mit den Begriffen „pinch-push-plug-pull“ umschrieben werden. Als „pinch“ wird dabei das Biegen und Verdrehen der DNA Doppelhelix bezeichnet, hervorgerufen nachdem eine DNA Glycosylase wie z.B. OGG1 eine spezifische Läsion entdeckt hat. Durch Interkalation einer Aminosäureseitenkette von OGG1 in die DNA Doppelhelix wird die beschädigte Base aus der Helix herausgedreht, was als „push“ oder auch „nucleotide flipping“ bezeichnet wird. Wahrscheinlich dient die gleiche Aminosäure auch als „plug“, also Pfropfen, um an Stelle der herausgedrehten Base die DNA Doppelhelix zu stabilisieren. „Pull“ beschreibt ein Hereinziehen der Zielbase ins aktive Zentrum von OGG1 wo letztendlich die Unterscheidung zwischen unbeschädigt und beschädigt erfolgt und sie gegebenenfalls herausgeschnitten wird (Stivers 2004; Huffman et al. 2005).

Da sich die Bindungsstabilität einer 8-oxoG • C Paarung nur leicht von der einer regulären G • C Paarung unterscheidet, ist der Suchprozess durch OGG1 nicht sonderlich präzise. Dieser Mangel an Präzision wird dadurch kompensiert, dass OGG1 die DNA extrem schnell nach Läsionen absucht (Banerjee et al. 2006). Studien durch Blainey et al. (2006) zeigten, dass OGG1 mehrere Millionen Basenpaare pro Sekunde überprüft, in dem das Enzym sehr schnell an der DNA entlang „rutscht“. Zwar werden durch diese schnelle Überprüfung einige beschädigte Basen zunächst übersehen, allerdings können diese in einem weiteren Suchprozess entdeckt werden. Von Vorteil bei einer solchen Vorgehensweise ist, dass weniger Zeit während der Untersuchung unbeschädigter DNA verloren geht.

1.5 Auswirkungen eines OGG1 Knockouts in Mäusen

Erstaunlicherweise weisen OGG1 defiziente Mäuse trotz des mutagenen Potenzials einer unreparierten 8-oxoG-Läsion keine stark erhöhte Tumorzinzidenz auf (Klungland et al. 1999a; Osterod et al. 2002). In Hepatozyten von OGG1 defizienten Mäusen konnte jedoch eine Akkumulation von 8-oxoG in der nukleären DNA gezeigt werden. Mit der Steigerung der basalen Spiegel von 8-oxoG einher ging auch ein 2 bis 3 facher Anstieg der Spontanmutationsrate in diesen Zellen. Aufgrund des postulierten Mutagenitätspotenzials von 8-oxoG

ist es wenig verwunderlich, dass nahezu alle zusätzlichen Mutationen GC nach TA Transversionen sind. Eine erhöhte Tumorzinzidenz war jedoch erst durch einen gleichzeitigen Knock-out von sowohl OGG1 als auch MUTY zu beobachten.

Die Tiere wiesen ansonsten jedoch keine pathologischen Auffälligkeiten und Erkrankungen auf. Die von Mabley et al dokumentierten Befunde waren daher überraschend. In drei unterschiedlichen Entzündungsmodellen konnte von den Autoren gezeigt werden, dass die Versuchsmäuse durch Verlust von OGG1 vor einer Entzündungsreaktion geschützt sind, beziehungsweise diese weniger stark auftritt als in den OGG1 profizienten Vergleichstieren (Mabley et al. 2005):

Eine durch intraperitoneale Applikation von LPS ausgelöste systemische Entzündung führte in beiden Versuchsgruppen zu einem signifikanten Anstieg der Zytokine MIP1- α und TNF- α , wobei der Anstieg in OGG1 defizienten Tieren deutlich schwächer ausfiel. Außerdem wiesen diese Tiere eine deutlich verzögerte Mortalität im Vergleich zu den OGG1 profizienten Tieren auf. Mittels eines MLDS Behandlungsschemas (multiple low-dose streptozotocin) wurde außerdem die Induktion von Diabetes Typ I als Beispiel für eine entzündliche Autoimmunerkrankung untersucht. Nach der Behandlung wiesen die OGG1 defizienten Mäuse im Verlauf einer 21-tägigen Beobachtungsperiode signifikant niedrigere Blutglukosewerte und somit eine niedrigere Diabetesinzidenz auf als die profizienten Vergleichstiere. Weiterhin war der Insulingehalt im Pankreas von *Ogg1*^{-/-}-Mäusen höher als bei den *Ogg1*^{+/-}-Mäusen. Auch in diesem Entzündungsmodellmodell war das proinflammatorische Zytokin TNF- α im Pankreas der OGG1^{-/-} Mäuse erniedrigt. In einem Allergie-Modell wurde durch Oxazolone eine Kontakthypersensitivität ausgelöst. Dadurch kam es im behandelten Ohr Gewebe der OGG1 profizienten Mäuse zur gesteigerten Akkumulation von Granulozyten im Zusammenspiel mit erhöhten Spiegeln der Zytokine TNF- α , IL1 β sowie MIP1- α . Diese Effekte waren bei den *Ogg1*^{-/-}-Mäusen deutlich weniger stark ausgeprägt. Mabley et al. lieferten damit die ersten Hinweise, dass OGG1, neben der bekannten Rolle in der Reparatur oxidativer DNA-Schäden, auch eine wichtige Rolle bei der Regulation entzündlicher Prozesse spielt. Diese Befunde wurden durch nachfolgende Veröffentlichungen unter Verwendung weiterer Entzündungsmodelle bestätigt (Li et al. 2012; Bacsı et al. 2013).

Diese Veröffentlichungen schlugen unterschiedliche Mechanismen vor, über welche OGG1 an der Regulation entzündlicher Prozesse beteiligt sein könnte. Auf diese Mechanismen wird in Kapitel 1.6 sowie in der Diskussion näher eingegangen.

1.6 Oxidative DNA-Schäden als epigenetische Faktoren

Lange Zeit galten reaktive Sauerstoffspezies als bloße Abfallprodukte die durch den aeroben Metabolismus entstehen und vor deren schädlichen Auswirkungen in Bezug auf Alterungsprozesse und potenzielle Mutagenität es sich durch geeignete Mechanismen zu schützen galt. Erst später etablierte sich die Theorie, dass ROS z.B. durch Redoxreaktionen auch eine Signaling Funktion in der Zelle einnehmen können. Perillo et al. (2008) postulierten erstmals einen neuartigen Mechanismus, wonach ROS und die durch sie ausgelösten oxidativen DNA-Schäden auch als epigenetische Faktoren an der Regulation der Transkription von Genen beteiligt sein könnten.

So konnte zunächst erneut gezeigt werden, dass die Estrogen induzierte Transkription von Zielgenen durch spezifische Methylierungen und Demethylierungen gesteuert wird (Vergleich Kapitel 1.2.5). LSD1 lokalisiert hierbei an Promotor- und Enhancersequenzen von Estrogen-responsiver Zielgenen und demethyliert dort die repressiven Methylierungen an H3K9. Das im Zuge der Demethylierung als Nebenprodukt entstehende Wasserstoffperoxid induziert lokal die Bildung einer 8-oxoG Läsion. Diese Läsion kann durch OGG1 erkannt werden, und in der Tat konnte OGG1 in der Promotor/Enhancer-Sequenz dieser Zielgene lokalisiert werden. Im von den Autoren vorgeschlagenen Modell entstehen nach Initiierung der Reparatur von 8-oxoG durch OGG1 Einzelstrangbrüche, welche wiederum von Topoisomerase II β erkannt werden. An diesen Stellen werden die DNA-Stränge relaxiert, was das Aufladen des Transkriptionskomplexes auf die DNA erleichtert.

Für die Transkription von Myc-Zielgenen konnte ein ähnliches Modell vorgestellt werden (Amente et al. 2010). Auch hier bindet der Transkriptionsfaktor (Myc) an die Bindungssequenz (E-Box) im Chromatin, woraufhin LSD1 vorübergehend H3K4 demethyliert. Dies induziert die lokale Produktion von Wasserstoffperoxid und somit die Oxidation von Guanin-Basen was wiederum die Rekrutierung von OGG1 nach sich zieht. Des Weiteren konnte auch die LSD1-abhängige Rekrutierung von APE1 an E-Box Sequenzen nachgewiesen werden. Umgekehrt, sank die Transkription der Myc-Zielgene signifikant durch Inhibition der Oxidation, beziehungsweise durch „silencing“ von LSD1, OGG1 und APE1.

Dieses Prinzip der LSD1 und OGG1 vermittelten Regulation konnte ebenfalls für die NF- κ B vermittelte Transkription inflammatorischer Zytokine gezeigt werden (Pan et al. 2016) Die Ergebnisse dieser Studie werden an dieser Stelle nicht weiter aufgeführt werden, sondern im Abschnitt Diskussion näher betrachtet.

2 Zielsetzung der Arbeit

In der Entstehung und Behandlung chronisch entzündlicher Erkrankungen nehmen proinflammatorische Zytokine eine Schlüsselrolle ein. Der Befund, dass Mäuse mit einer Defizienz der DNA-Glykosylase OGG1 eine supprimierte Immunantwort auf unterschiedliche Stimuli aufweisen ist zunächst nicht erklärbar. Das Wissen über den zugrunde liegenden Mechanismus könnte daher neue Möglichkeiten in der Therapie solcher Erkrankungen offenlegen, beziehungsweise neue Erkenntnisse zur Funktion von OGG1 in der Genregulation liefern.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst die Immundefizienz der *Ogg1*^{-/-}-Mäuse in einem ex-vivo Mausmodell zu verifizieren. In diesem Modell galt es sodann, die zugrunde liegenden Mechanismen aufzudecken. Weiterhin galt es aufzuzeigen, ob auch andere an der Basenexzisionsreparatur beteiligte Enzyme in diese Genregulation eingreifen. Die aus diesen Experimenten gewonnen Erkenntnisse sollten daraufhin auf ein weiteres Versuchsmodell in OGG1 defizienten HeLa-Zellen zu übertragen werden.

Eine besondere Herausforderung dieser Arbeit bestand darin, oxidative Basenmodifikationen nachzuweisen, die der Theorie nach im Bereich der Bindungssequenz des Transkriptionsfaktors NF- κ B innerhalb des Promotors der Zielgene generiert werden könnten. Aufgrund der Seltenheit und Spezifität dieser Läsionen kann die Detektion nicht über die in unserem Labor standardmäßig durchgeführte Alkalische Elution erfolgen. Ziel dieser Arbeit war es daher weiterhin durch eine qPCR basierte Methode zur Detektion dieser Läsionen zu etablieren und diese innerhalb des Promotors zu lokalisieren.

Die aus diesen Versuchsmodellen gewonnenen Erkenntnisse galt es abschließend zu einem Mechanismus zusammenzufügen, der die Beteiligung der DNA-Reparaturglycosylase bei der Transkription proinflammatorischer Zytokine erklären kann.

3 Methoden

3.1 Handling der Versuchstiere

3.1.1 Haltung und Zucht der Versuchstiere

Haltung und Zucht der Wildtyp und *Ogg1*^{-/-} Mäuse fanden in den Räumen der zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universitätsmedizin Mainz nach den Auflagen des deutschen Tierschutzgesetzes statt. In den Räumlichkeiten herrscht ein 12 Stunden andauernder Tag/Nacht-Rhythmus bei ca. 22,5 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-70 %. Das routinemäßige Umsetzen der Tiere erfolgte durch die Tierpfleger der ZVTE.

3.1.2 Maus-Genotypisierung

Zur Überprüfung des Genotyps der Wildtyp und *Ogg1*-Knockout Mäuse wird das betroffene Gen in genomischer DNA, isoliert aus Ohrbiopsien welche bei der Markierung der Tiere anfallen, analysiert. Für die Isolierung genomischer DNA wird DirectPCR®-Lysis Reagenz mit Proteinase K komplettiert (Endkonzentration 0,3 mg/mL; peqGOLD Proteinase K Lösung) und je 200 µL zu den Biopsieproben pipettiert. Die Proben werden anschließend über Nacht bei 55 °C im Schüttelinkubator lysiert. Zur vollständigen Inaktivierung der Proteinase werden die Proben am nächsten Tag auf 85 °C erhitzt und nach Beendigung der 45 minütigen Inkubationszeit kurz zentrifugiert. Die Proben können nun direkt weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert werden.

Tabelle 3.1: Maus Genotypisierung

		# Zyklen	[C°]	[min]
Reaktionspuffer Y	5 µL	35	94	45 s
Enhancer Lösung P	10 µL			
dNTP-Mix	1 µL			
Upstream primer (25 pmol/µL)	2 µL			
downstreamprimer KO	2 µL			
downstreamprimer WT	2 µL	1	72	10
Taq polymerase	0.25 µL			
H ₂ O steril	26.75 µL			
	49 µL			
+ template DNA	1 µL			
	50 µL			

Die Analyse des Genotyps erfolgt mittels PCR unter Verwendung des peqGOLD Taq-DNA-Polymerase „all inclusive“ Kits, wobei zur Unterscheidung der Genotypen unterschiedliche reverse primer verwendet werden. Zunächst wird für alle Proben ein gemeinsamer Mix bestehend aus Reaktionspuffer, Enhancer Lösung, dNTP-Mix, allen Primern, Wasser sowie der Taq-Polymerase erstellt, zu je 49 μL dieses Mixes 1 μL DNA template pipettiert und die PCR nach dem Programm in Tabelle 3.1 gestartet.

Nach Beendigung des PCR Programms werden je 25 μL der Proben mit 5 μL 6fach Loading-dye versetzt und mittels Elektrophorese in einem 1,8 % Agarosegel aufgetrennt. Zur Unterscheidung der beiden Genotypen wird ebenfalls der GeneRuler-100-bp-DNA-Marker von Thermo Scientific aufgetragen. Dabei macht man sich zu Nutze, dass das Amplifikat des *Ogg1*-Knockouts 300 Basenpaare groß ist, das des Wildtyps jedoch nur 250 Basenpaare.

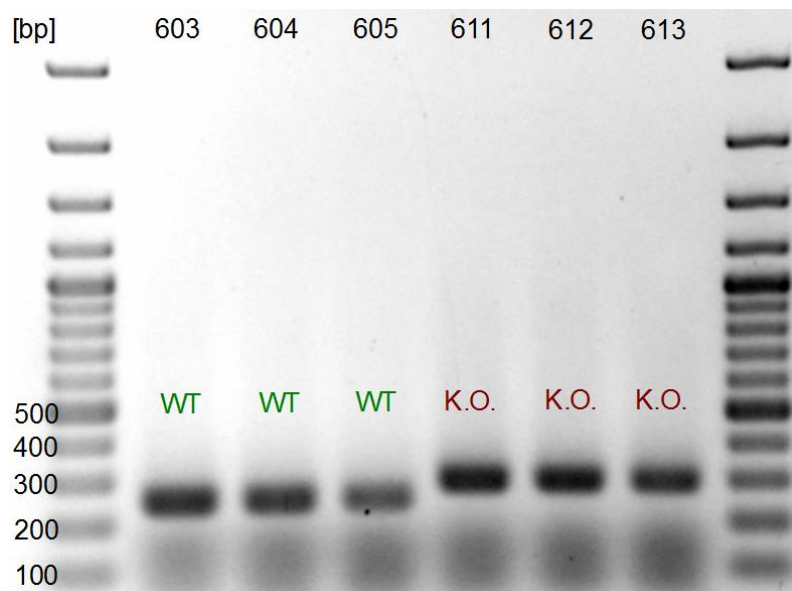


Abbildung 3.1: Gelbild der Genotypisierung

3.2 Arbeiten mit primären, murinen Zellen

3.2.1 Isolation der Milzzellen

Vorbereitend zur Sektion wird das Sektionsbesteck im Heißluftsterilisator sterilisiert und alle Arbeitsflächen gründlich mit 70 % Ethanol gereinigt. Die Tiere werden mittels Isofluran narkotisiert, durch anschließende zervikale Dislokation getötet und mit 70 % Ethanol desinfiziert.

Zur Entnahme der Milz wird ein circa 2 cm langer Schnitt auf der linken Seite des Abdomens gemacht. Nach Eröffnung des Bauchraums wird die Milz entwendet und auf einer kleinen Zellkulturplatte platziert. Eventuell anhaftende Haare werden mit sterilem PBSCMF abgewaschen. Die Milz wird mit 2 mL PBSCMF unter Zuhilfenahme einer 25 G Kanüle ausgespült und die Zellsuspension durch ein 100 µm Zellsieb in ein 50 mL Tube filtriert. Der Rest der Milz wird auf dem Zellsieb platziert und mit einem sterilen Stempel einer Spritze vorsichtig durch das Zellsieb gerieben bis nur noch die farblose Hülle der Milz auf dem Zellsieb zurückbleibt. Anschließend wird das Zellsieb zweimal mit 2 mL PBSCMF gespült. Die Zellsuspension wird 10 min bei 600 x g und 4 °C zentrifugiert. Zur Entfernung der Erythrozyten wird der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 mL Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Suspension wird nach der Erythrozytenlyse mit 20 mL PBSCMF verdünnt und durch ein 40 µm Zellsieb in ein neues 50 mL Tube filtriert um alle restlichen groben Verunreinigungen zu entfernen. Das Filtrat wird erneut bei 600 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das so erhaltene Zellpellet wird in 10 mL RPMI Vollmedium aufgenommen und unter Zuhilfenahme des Coulter-Counter auf die gewünschte Zellkonzentration eingestellt. Die isolierten Milzzellen werden unmittelbar für die geplanten Experimente weiterverwendet oder noch für kurze Zeit auf Eis gelagert.

3.2.2 Behandlung der Milzzellen

Die isolierten und gezählten Milzzellen werden in 6-well-Platten zu je 10^7 Zellen/1,8 mL RPMI Medium ausgestreut und ruhen im Brutschrank optimaler Weise für mindestens 1 Stunde. Da die Milzzellen sehr heterogen, teilweise adhärente und Suspensionszellen sind, kann das Medium für Vorinkubation und Induktion der Genexpression nicht einfach ausgetauscht werden. Für die Vorinkubation mit den unterschiedlichen Inhibitoren werden diese (bzw. DMSO in der Kontrolle) daher zunächst in einer 20fach höheren Konzentration in RPMI angesetzt und davon je 100 µL in das entsprechende well zupipettiert. Zur Induktion der Genexpression wird eine LPS-Lösung ebenfalls in einer 20fachen Konzentration der Zielkonzentration hergestellt und nach Ablauf der Vorinkubation zupipettiert. Der sich dabei zwangsläufig ergebende Konzentrationsfehler, gerade für die Vorinkubation mit den Inhibitoren wird dabei vernachlässigt.

3.3 qPCR basierte Quantifizierung der Genexpression

3.3.1 RNA-Isolation mittels TRIzol®

Bei dieser Methode handelt es sich um eine Weiterentwicklung des als „single-step method“ bekannten Verfahrens zur RNA-Isolation nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski, Sacchi 1987). TRIzol® ist ein gebrauchsfertiges Reagenz mit dessen Hilfe qualitativ hochwertige „total RNA“ (aber auch DNA sowie Proteine) isoliert werden kann. „Total RNA“ bezeichnet dabei ribosomale, transfer und messenger RNA (rRNA, tRNA, mRNA), wobei der Anteil an mRNA, welche zur Messung der Genexpression entscheidend ist, circa 5 % ausmacht. Die einphasige Lösung enthält neben Phenol auch Guanidinthiocyanat um die Zellen zu lysieren sowie anwesende RNasen zu inaktivieren. Da RNA äußerst empfindlich für die Degradation durch RNasen ist, ist es zudem wichtig vor Beginn der Isolation sämtliche Arbeitsflächen mit Ethanol sowie DEPC-Wasser zu säubern. Weiterhin werden während allen Arbeitsschritten Latex-Handschuhe getragen, welche in regelmäßigen Abständen gewechselt werden sollten. Im ersten Schritt werden die Proben homogenisiert. Bei der Isolation der RNA aus adherenten Zellen (z.B. Hela oder J774.2) wird das Medium abgenommen und verworfen. Anschließend werden pro well einer 6-well-Platte 1 mL TRIzol® zugegeben und durch mehrfaches auf- und abpipettieren die Zellen vollständig lysiert. Das Reagenz wird daraufhin in ein 2 mL Tube überführt. Bei Milzzellen, welche zum Teil auch nicht-adherente Zellen enthalten, wird der Überstand mit den nicht-adherenten Zellen in ein 2 mL Tube überführt und 1 min bei 300 x g zentrifugiert. Mit dem Anteil der adherenten Zellen wird währenddessen wie üblich verfahren. Nach Beendigung der Zentrifugation wird das Reagenz von der 6-well Platte in das Tube überführt und die abzentrifugierten Zellen durch mehrfaches auf- und abpipettieren lysiert. Die Proben werden zur vollständigen Auftrennung bei Raumtemperatur für 5 min inkubiert und können anschließend direkt weiterverarbeitet werden oder bei -70 °C gelagert werden. Alle weiteren Arbeitsschritte unterscheiden sich nicht zwischen adherenten und nicht-adherenten Zellen. Zur Phasentrennung wird den Proben 200 µL Chloroform zupipettiert, für 15 s gevortext und für weitere 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur vollständigen Phasentrennung werden die Proben anschließend 15 min bei 4 °C mit 12000 x g zentrifugiert. Proteine sammeln sich dabei in der organischen Phase (unten, rot), DNA in der Interphase, während die RNA sich in der wässrigen Phase befindet (oben, farblos). 400 µL der oberen Phase werden in ein neues 2 mL Tube überführt, wobei darauf zu achten ist keine Spuren der organischen und der Interphase zu verschleppen. Zur RNA-Präzipitation werden 500 µL Isopropanol zugefügt, bei Raumtemperatur 10 min inkubiert und anschließend bei 12000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und es bleibt die RNA über, welche nun als milchig-weißes Pellet zu erkennen ist. Das RNA-Pellet wird mit 1 mL eiskaltem Ethanol (75% in DEPC-Wasser) gewaschen und bei 4 °C und 7500 x g für 10 min abzentrifugiert.

Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das RNA-Pellet bei Raumtemperatur für circa 5 min getrocknet. Das getrocknete RNA-Pellet wird in 20 µL RNase freiem Wasser aufgenommen. Die gelöste RNA kann nun für die folgenden Arbeitsschritte verwendet, oder bei -70 °C gelagert werden.

3.3.2 Quantifizierung und Qualitätskontrolle der isolierten RNA

Die mit TRIzol® isolierte RNA wird hinsichtlich Quantität, Reinheit und Integrität überprüft. Nukleinsäuren können anhand der UV-Absorption quantifiziert werden, wobei RNA ein Absorptionsmaximum bei 260 nm aufweist. Von je 2 µL der isolierten RNA wird mit Hilfe des Nanodrop2000 ein Absorptionsspektrum zwischen 220 und 350 nm aufgenommen. Die Quantifizierung erfolgt anhand des Lambert-Beerschen Gesetzes:

$$C = (A_{260} \times \epsilon) / b$$

c = RNA-Konzentration [ng/µL]

ε = Extinktionskoeffizient für RNA [40 ng/µL]

b = Schichtdicke [1 cm]

Phenol besitzt je ein Absorptionsmaximum bei 230 und 270 nm, das in TRIzol® ebenfalls enthaltene Guanidinthiocyanat hat ein Absorptionsmaximum bei 230 nm. Beide Reagenzien können als Verunreinigungen die nachfolgenden enzymatischen Reaktionen beeinträchtigen. Als Maß für die Reinheit der isolierten RNA errechnet man daher den Quotienten aus der Absorptionen bei 260 und 280 nm, sowie bei 260 und 230 nm. Die RNA wird dabei als rein angesehen wenn beide Quotienten bei circa 2,0 liegen. Liegt der Quotient unterhalb dieses Wertes muss die gelöste RNA erneut mit Isopropanol präzipitiert und mit Ethanol gewaschen werden.

Da RNA sehr empfindlich gegenüber einer Degradation durch RNasen ist, wird die isolierte RNA vor allen weiteren Arbeitsschritten durch Agarose-Gelelektrophorese auf ihre Integrität überprüft. Vorbereitend hierfür werden zunächst alle Arbeitsflächen und Geräte mit DEPC-Wasser gereinigt. Zur Herstellung des Gels wird 1 g Agarose in 100 mL TAE-Puffer (aus 50-fach TAE und DEPC-Wasser herzustellen) in der Mikrowelle vollständig aufgeschmolzen und in eine vorbereitete Gelkammer gegossen. Nach Erkalten des Gels wird die Kammer mit Laufpuffer (ebenfalls TAE-Puffer) aufgefüllt bis das Gel ca. 1 cm mit Puffer bedeckt ist. Von jeder Probe wird 1 µg RNA in ein neues Tube überführt und mit dem gleichen Volumen an 2-fach RNA-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 65 °C auf einem Heizblock erhitzt. Nach dem Auftragen der Proben wird das Gel bei 80 V für 60 min laufen gelassen. Da im RNA-Ladepuffer bereits Ethidiumbromid enthalten ist muss die RNA anschließend nicht mehr in einem Färbebad angefärbt werden, sondern kann direkt analysiert werden. Ein Großteil der isolierten RNA machen rRNA Spezies 28S und 18S aus. Beide entstehen durch Teilung eines gemeinsamen Vorläufermoleküls. Daher sollte die Anzahl beider Spezies in etwa gleich

sein. Aufgrund der unterschiedlichen Molekülgröße zeigt die 28S rRNA aber eine deutliche stärkere Bandenintensität nach Ethidiumbromidfärbung. Als Maß für die Integrität der RNA wird daher der Quotient aus der Bandenintensität von 28S zu 18S rRNA errechnet, wobei der Quotient bei ca. 2,5 liegen sollte.

3.3.3 Reverse Transkription

Zur Ermittlung der Genexpression muss die zuvor isolierte und quantifizierte RNA mit einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Um unter identischen Bedingungen zu arbeiten werden alle Proben zuvor auf eine definierte Konzentration mit DEPC-Wasser eingestellt (Hela: 1 µg/µL; Milzzellen: 250 ng/µL). Die Synthese der cDNA erfolgt unter Zuhilfenahme des „RevertAid first strand cDNA synthesis“-Kits. Im ersten Schritt werden für jede Probe 2 µL RNA in einem 200 µL PCR-Tube vorgelegt. Somit verwendet man für jede Reaktion eine definierte Menge RNA (Hela: 2 µg; Milzzellen: 500 ng). Im nächsten Schritt wird zunächst ein gemeinsamer Mix A, bestehend aus „random hexamer primer“ und RNase freiem Wasser, für alle Proben hergestellt.

Tabelle 3.2: Mix A der cDNA Synthese

Mix A (1 Reaktion)	
random hexamer primer	1 µL
RNase freies Wasser	9 µL
	10 µL

Von Mix A werden jeder Probe 10 µL zupipettiert, anschließend die RNA zusammen mit den Primern auf 70 °C erhitzt und nach fünf minütiger Inkubationszeit auf 4°C abgekühlt. In der Zwischenzeit wird Mix B aus Reaktionspuffer, RNase-Inhibitor und dNTP-Mix für alle Proben erstellt.

Tabelle 3.3: Mix B der cDNA Synthese

Mix B (1 Reaktion)	
Reaktionspuffer, 5fach	4 µL
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µL)	1 µL
dNTP-Mix (10 mM)	2 µL
	7 µL

Von Mix B werden jeder Probe 7 µL zupipettiert und für weitere 10 min bei 25 °C inkubiert. Nach Beendigung der Inkubationszeit wird die Probe auf 4 °C gekühlt, 1 µL der reversen Transkriptase zugegeben und für 60 min bei 42 °C inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion

wird die Temperatur auf 70 °C erhöht und für 10 min gehalten. Die Proben können anschließend bis zur Weiterverwendung bei -20 °C gelagert werden. Außer den RNA Proben werden für jeden Reaktionsansatz zwei Kontrollen angefertigt. Die noRT-Kontrolle enthält alle Komponenten außer der reversen Transkriptase und gibt Aufschluss über Verunreinigungen mit genomischer DNA, die noRNA-Kontrolle enthält keine RNA und gibt somit Aufschluss über Verunreinigungen der Reagenzien.

3.3.4 Primer-Design und Optimierung der PCR-Bedingungen

Für eine möglichst exakte Genexpressionsanalyse ist es notwendig spezifische Primer zu entwerfen und die optimalen Reaktionsbedingungen empirisch zu ermitteln. Das Primer-Design erfolgt durch die online-Plattform „Primer-Blast“ des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI). Soweit möglich werden die Primer so entworfen, dass das Amplifikat eine Größe von 150-250 Basenpaaren hat und die Primer jeweils auf unterschiedlichen Exons liegen. Hierdurch wird gewährleistet, dass nur mRNA bzw. cDNA, jedoch keine genomische DNA amplifiziert wird. Entscheidend für eine hohe Spezifität der Bindung der Primer an ihre Zielsequenz ist die gewählte Annealing-Temperatur (T_{ann}) der PCR. Durch Erhöhung dieser Temperatur wird die Spezifität zunächst gesteigert, da die Hybridisierung der Primer an falsche Sequenzen erschwert wird. Bei Überschreiten der Schmelztemperatur schmelzen die Primer allerdings auch von ihrer Zielsequenz ab und die Effizienz der PCR nimmt stark ab. Zur Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur werden die Primer in einer nicht-quantitativen PCR bei unterschiedlichen Temperaturen in einem Gradienten getestet. Standardmäßig erfolgt dieser Test bei 3 Temperaturen (55, 60 und 65 °C). Hierzu wird zunächst Mix 1 wie nachfolgend für eine Probe beschrieben hergestellt. Für die 3 Temperaturen sollte ein gemeinsamer Mix hergestellt werden, wobei alle Arbeitsschritte auf Eis erfolgen:

Tabelle 3.4: Mix 1 der PCR

5x Platinum Tfi Reaction buffer	5,0 µL
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µL
dNTP Mix (10 mM each)	0,5 µL
H ₂ O (PCR grade)	11,25 µL
Mix 1	17,5 µL

Zu diesem Mix werden anschließend die beiden Primer sowie die Polymerase pipettiert:

Tabelle 3.5: Mix 2 der PCR

Mix 1	17,5 μL
Primer forward (2 μM)	2,5 μL
Primer reverse (2 μM)	2,5 μL
Tfi DNA Polymerase (5 U/mL)	0,5 μL
Mix 2	23,0 μL

Zuletzt werden 2 μL des Templates, also der cDNA, zupipettiert. Für jedes Primer-Paar werden 2 verschiedene Verdünnungen des Templates sowie eine negativ Kontrolle (Wasser) getestet. Die so vorbereiteten Proben werden im Thermocycler platziert und die Reaktion nach folgendem Programm gestartet:

Tabelle 3.6: Temperaturprogramm der PCR

94 °C	2	min	29 Zyklen
94 °C	30	sec	
Temp.-Gradient	1	min	
70 °C	1	min	
70 °C	10	min	

Die Spezifität der Primer wird durch Auftrennung des Amplifikats in einem 1,8 % Agarosegel und Anlegen von 80 V Gleichspannung überprüft. Zudem gibt das Gel Aufschluss über die optimale Annealing-Temperatur (zur Herstellung des Gels siehe Kapitel 3.3.2). Die so ermittelte Annealing-Temperatur wird nun in einer quantitativen PCR überprüft (Kapitel 3.3.5).

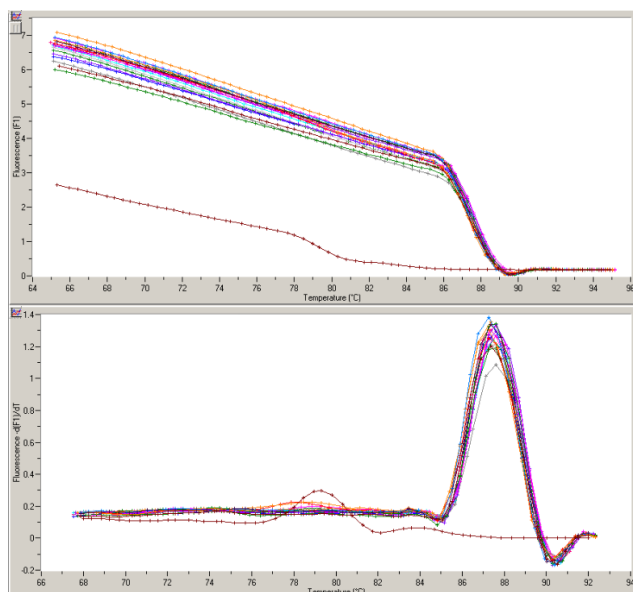


Abbildung 3.2: Schmelzkurve zur Verifizierung der Primer-Spezifität

Durch Analyse der Schmelzkurve nach Beendigung der Reaktionszyklen wird zum einen die Spezifität der Primer nochmals überprüft. Falls Primer-Dimere oder unspezifische Produkte entstehen kann dies durch schrittweise Erhöhung der Annealing-Temperatur behoben werden. Zum anderen kann anhand der Schmelzkurve die optimale Akquisition-Temperatur (T_{aq}), also die Temperatur bei der während eines Zyklus der qPCR die Fluoreszenzmessung stattfindet, bestimmt werden. Diese ist so zu wählen, dass bei Erreichen der T_{aq} alle unspezifischen Produkte bereits geschmolzen sind und nur das Zielprodukt gemessen wird. Abermals werden die Amplifikate in einem 1,8 % Agarosegel zur Kontrolle der Spezifität nach ihrer Größe aufgetrennt und mit der theoretischen Amplifikat-Größe verglichen.

3.3.5 Real-Time quantitative PCR

Die Quantifizierung der Genexpression erfolgt anhand des im verwendeten Kit enthaltenen SYBR Green I. Dabei handelt es sich um einen in DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, wobei die am Ende eines Zyklus gemessene Fluoreszenzintensität proportional zur Menge des gebildeten PCR-Produkts zunimmt. Zur Quantifizierung der Expression der in Tabelle 3.9 aufgeführten Gene werden die unterschiedlichen Proben zunächst in PCR-Wasser verdünnt. Außerdem wird für die Expressions-Analyse eine Standardkurve hergestellt (1:10, 1:100, 1:1000). Die vom Hersteller empfohlenen Reaktionsbedingungen wurden leicht abgeändert, und die einzelnen Komponenten nach folgendem Schema zusammen pipettiert.

Tabelle 3.7: Mix der qPCR

SYBR green PLUS Mix	1,2	µL
MgCl ₂ (25 mM)	0,36	µL
H ₂ O (PCR grade)	2,44	µL
Primer, forward (2 µM)	3,0	µL
Primer, reverse (2 µM)	3,0	µL
	10,0	µL
+ 2 µL template cDNA	12,0	µL

Die Kapillaren werden mit Hilfe einer Pinzette aus dem Vorratsgefäß in den hierfür vorgesehenen, gekühlten Aluminiumblock überführt und pro Kapillare 10 µL des Mixes vorgelegt. Anschließend werden je 2 µL der Proben bzw. der Verdünnungen der Standardkurve und der Kontrollen (NTC=Non-template control und noRT) zupipettiert. Die Analyse der Proben erfolgt dabei immer in Form einer Doppelbestimmung. Die Kapillaren werden verschlossen und für 1 Minute bei 600 x g zentrifugiert. Anschließend werden die Kapillaren vorsichtig in das LightCycler Karussell überführt und nach optischer Kontrolle des Volumens in den Kapillaren die PCR unter den Bedingungen in Tabelle 3.9 gestartet.

Um die Spezifität der qPCR zu gewährleisten wird nach Beendigung der Quantifizierung standardmäßig eine Schmelzkurv-Analyse durchgeführt.

Tabelle 3.8: Temperaturprogramm der qPCR

95 °C	10	min	Vor-Inkubation
95 °C	5	sec	28-40 Zyklen
T _{ann}	10	sec	
72 °C	15	sec	
T _{aq}	5	sec	
65 -> 95 °C	0,1	°C/s	Schmelzkurve
40 °C	3	min	Kühlphase

Tabelle 3.9: T_{ann} und T_{aq} der Primer

murin	T_{ann}	T_{aq}
β-Actin	65	84
HPRT1	65	72
TNF-α	65	84
IL6	55	72
MCP1	65	80
MIP1α	65	78
human	T_{ann}	T_{aq}
18S	60	76
IL6	66	72
OGG1	61	86

3.3.6 Berechnung der Genexpression

Die Berechnung der Genexpression eines Zielgens erfolgt anhand der durch Lightcycler Software (Version 3.5) ermittelten C_t-Werte (cycle of threshold) der Zielgene/Referenzgene in den gemessenen Proben. Durch die für jeden Lauf erstellte Standardkurve wird zunächst die Effizienz der Reaktion bestimmt. Durch diese Standardkurve kann die Amplifikationsrate bei einer unterschiedlichen Ausgangskonzentration des Zielstrangs berücksichtigt werden, was insbesondere für Quantifizierung schwach exprimierter Gene wichtig ist. Die Effizienz E lässt sich über die Steigung m der Standardkurve errechnen ($E = 10^{-1/m}$).

Für jede Probe werden die C_t-Werte der Zielgene sowie der Referenzgene in Duplikaten ermittelt. Das Referenzgen muss unter der Behandlung in allen Zellen stabil exprimiert sein und dient anschließend zur Normalisierung der Expression des Zielgens. Die Veränderung der Expression wird durch die Effizienz-korrigierte ΔΔC_t-Methode als „Induktionsfaktor“ der behandelten Proben (+ der unbehandelten Probe des zu vergleichenden Knock-outs/Knockdowns) über der unbehandelten Kontrolle ausgedrückt. Die Berechnung des Induktionsfaktors erfolgt nach folgender Formel:

$$\text{Induktionsfaktor} = \frac{E_{\text{Zielgen}}^{\Delta C_t(\text{Zielgen})} [\text{Kontrolle-Behandlung}]}{E_{\text{Referenzgen}}^{\Delta C_t(\text{Referenzgen})} [\text{Kontrolle-Behandlung}]}$$

3.4 Durchflußzytometrische Analyse der Milzzellen

3.4.1 Prinzip

Mit Hilfe der Durchflußzytometrie (FACS-Analyse, Fluorescence activated cell sorting) können Zellpopulationen innerhalb einer heterogenen Zellsuspension identifiziert und quantifiziert werden. Hierzu werden die Parameter Zellgröße, Granularität sowie die Färbung spezifischer Oberflächen-Marker oder auch intrazellulärer Proteine herangezogen. Die zur Detektion vereinzelteten Zellen werden durch eine Kapillare eingesaugt, somit voneinander getrennt und passieren nun einzeln einen ersten Laserstrahl. Dieser Lichtstrahl wird von den Zellen gestreut, durch verschiedene Sensoren detektiert und dient der Bestimmung von Zellgröße und Granularität. Durch Detektion des vorwärts gestreuten Lichts (FSC, forward scatter) kann die Größe der Zelle bestimmt werden. Dabei gilt, dass mit zunehmender Zellgröße das Licht stärker gestreut wird. Die Granularität wird anhand des Seitwärtsstreulichts (SSC, side scatter) bestimmt. Auch hier gilt, je mehr Seitwärtsstreulicht detektiert wird, desto stärker ist die Granularität der Zelle. Darüber hinaus werden aber auch spezifische Oberflächenmarker zur Identifizierung der Zellen anhand gegen sie gerichteter Antikörper, welche mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind, herangezogen. Diese Farbstoffe unterscheiden sich ihrem im Absorptions- und Emissionsspektrum. Das bedeutet sie können durch unterschiedliche Laser angeregt werden und emittieren ihrerseits Licht in unterschiedlichen Wellenlängen. Dieses Licht kann durch geeignete Sensoren detektiert und die Zellen so auf Oberflächenmarker bzw. intrazelluläre Zielstrukturen überprüft und quantifiziert werden.

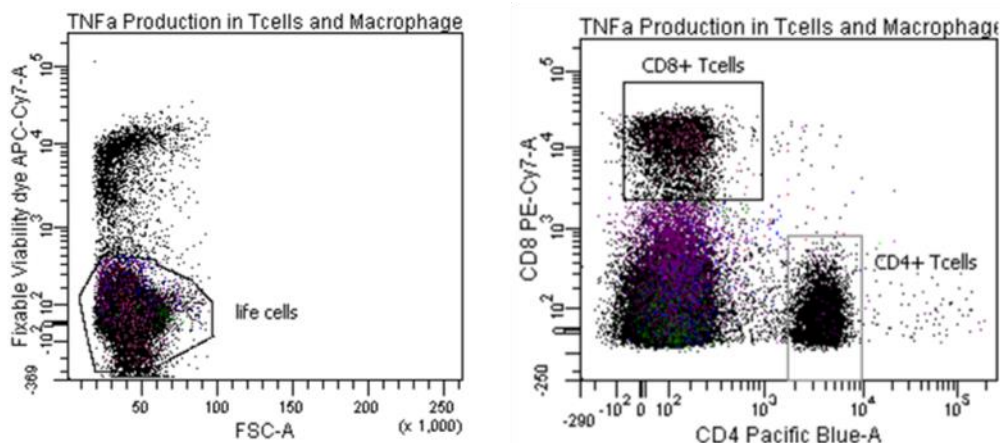


Abbildung 3.3: Gating der Zellen im Durchflußzytometer. In der linken Grafik erfolgt zunächst das gating der Zellen über einen Viabilitätsmarker. Somit wird sichergestellt, dass nur lebende Zellen im weiteren Verlauf untersucht werden. Auf der linken Grafik werden die lebenden Zellen in CD8- und CD4-positive Zellen aufgetrennt und können im nächsten Schritt auf ihre intrazelluläre TNF- α -Produktion untersucht werden.

Durch geschickte Kombination von Fluoreszenzfarbstoffen und Antikörpern und gegen Oberflächenmarker können somit Subpopulationen einer heterogenen Zellpopulation identifiziert und quantifiziert werden.

3.4.2 Färbung der Milzzellen

Nach der Isolation der Milzzellen (s.o.) werden die Zellen mit der angegebenen Konzentration von LPS oder PMA/Ionomycin in RPMI 1640 Vollmedium behandelt. Zusätzlich wird den Ansätzen noch Monensin (eBioscience®) zugesetzt, wodurch der Golgi-Apparat inhibiert und die Sekretion von TNF- α unterbunden wird. Zur Färbung werden die Zellen zunächst auf einer 96-well-Spitzbodenplatte zu je 100 μ L bei einer Konzentration von 10^7 Zellen / mL ausplattiert und gewaschen. Hierfür werden die Zellen für 2 Minuten bei 600 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 50 μ L PBSCMF (4 °C) resuspendiert. Dieser Waschschrift wird noch einmal wiederholt. Für die Oberflächenfärbung werden zunächst die entsprechenden Antikörper sowie der Viabilitätsmarker gemäß Tabelle 3.10 in PBSCMF verdünnt. Die Zellen werden zunächst abzentrifugiert (s.o.) und in 50 μ L der Oberflächenfärbelösung resuspendiert. Nach 30 minütiger Inkubationszeit bei 4 °C werden die Zellen 2 mal in PBSCMF gewaschen (s.o.) Vor der intrazellulären Färbung müssen die Zellen zunächst fixiert und permeabilisiert werden. Dies erfolgt durch resuspendieren der Zellen in 50 μ L des Fix/Perm-Puffers der Firma eBioscience und 30 minütige Inkubation bei 4 °C. Die folgenden 2 Waschschriffe erfolgen mit 50 μ L Permeabilisierungspuffer. Zur intrazellulären Färbung wird der TNF- α - oder der Isotyp-Antikörper mit Permeabilisierungspuffer verdünnt und je 45 μ L zupipettiert und resuspendiert. Nach 30 minütiger Inkubationszeit werden die Zellen je einmal mit Permeabilisierungspuffer und GM-Puffer gewaschen. Zuletzt werden die Zellpellets in 100 μ L GM-Puffer resuspendiert und zur weiteren Analyse in ein FACS-Röhrchen überführt.

Tabelle 3.10: Verdünnungen der Antikörper

Epitop	Fluorochrom	Verdünnung
Fixable viability	BV510	1:1000
Oberflächenfärbung		
MHCII	APC-Cy7	1:1000
CD11c	BV605	1:400
B220	FITC	1:400
CD8	PE-Cy7	1:400
CD4	BV785	1:500
F4/80	APC	1:400
CD11b	BV421	1:400
Intrazelluläre Färbung		
TNF- α	PE	1:100
Isotyp	PE	1:100

3.5 Generierung & Charakterisierung von Knochenmarks-Makrophagen (BMDM)

3.5.1 Generierung der BMDM

Vorbereitend zur Sektion wird das Sektionsbesteck im Heißluftsterilisator sterilisiert sowie alle Arbeitsflächen gründlich mit 70 % Ethanol gereinigt. Die Tiere werden mittels Isofluran narkotisiert, durch anschließende zervikale Dislokation getötet und mit 70 % Ethanol desinfiziert.

Zunächst wird mit einer Schere oder einem Skalpell das Fell von der Hüfte bis zum Fuß am Hinterbein entlang aufgeschnitten, sodass das Fell nun abgezogen werden kann und das Hinterbein freiliegt. Mit einem Skalpell kann nun der Oberschenkel (Femur) aus der Hüftpfanne gelöst und die Sehnen durchtrennt werden. Der Oberschenkelknochen kann jetzt aus dem Muskel geschoben werden. Nachdem man die Sehnen auch am Fuß durchtrennt hat vollzieht man das Gleiche auch am Schienbein (Tibia). Der Fuß wird mit einer Schere abgetrennt. Die freiliegenden Knochen werden mit einem in Ethanol getränkten Mull von restlichem Muskelgewebe gesäubert.

Die Epiphysen werden mit einer Knochenschere abgetrennt, Femur und Tibia in einer Petrischale platziert und das Knochenmark mit 5 mL sterilem PBSCMF (5 mL Spritze mit 23G Kanüle) vorsichtig herausgespült bis sie ganz weiß sind. Die Zellsuspension wird dann mit einer 1 mL Pipette vorsichtig resuspendiert und über ein 70 µm Zellsieb in ein steriles 50 mL Tube überführt. Die Petrischale wird nochmals mit 5 mL PBSCMF ausgespült, welche ebenfalls in das 50 mL Tube überführt werden. Die Zellen werden abzentrifugiert (10 min, 200 x g, 4 °C), und das Zellpellet daraufhin in 1 mL Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert. Nach 5 Minuten sind alle Erythrozyten lysiert und die Suspension wird auf 20 mL mit PBSCMF aufgefüllt und erneut abzentrifugiert (10 min, 200 x g, 4 °C). Die Zellen werden in frischem BM-Mac-Medium resuspendiert, gezählt und auf Eis gelagert. Pro Zellkulturflasche werden 10^7 Knochenmarkszellen in 20 mL BM-Mac-Medium suspendiert und bei 37 °C für drei Tage inkubiert. Nach 3 Tagen werden weitere 10 mL BM-Mac-Medium zugegeben. Nach 6 Tagen sind die Makrophagen ausdifferenziert. Zur Gewinnung der BMDM wird zunächst das Medium abgenommen, 10 mL PBSCMF (4 °C) zugegeben und die Zellkulturflaschen auf Eis für ca. 10 Minuten inkubiert. Mit Hilfe eines Zellschabers lassen sich die Zellen dadurch leichter ablösen. Die BMDM werden abzentrifugiert (5 min, 200 x g, 4 °C), gezählt und stehen dann für die Charakterisierung und weitere Versuche zur Verfügung.

3.5.2 Charakterisierung der BMDM

Zur Charakterisierung werden je $0,5 \times 10^6$ der ausdifferenzierten BMDM (oder zur Kontrolle der Antikörper die Makrophagen-Zelllinie J774.2) abzentrifugiert und 2-mal mit 1 mL PBSCMF gewaschen. Zur Fixierung der Zellen werden diese nach dem letzten Waschschrift zunächst in 450 μ L PBSCMF resuspendiert, zusätzlich mit 500 μ L Formaldehyd (2% in PBSCMF) versetzt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Im ersten Teil der Färbung werden die fixierten Zellen zunächst 2 mal mit PBS gewaschen und anschließend mit 400 μ L Fc-Block-Lösung resuspendiert und für 10 Minuten bei 4 °C inkubiert um eine unspezifische Bindung der weiteren Antikörper zu vermeiden. Die eigentliche Färbung erfolgt mit Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern gegen die Makrophagen-spezifischen Oberflächenmarker F4/80 und CD11b. Hierfür werden zunächst die Verdünnungen der Antikörper wie in Tabelle 3.11 angegeben angesetzt und je 10 μ L dieser Lösungen zu den Proben zupipettiert und für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Abschließend werden die gefärbten Zellen erneut 2-mal mit PBSCMF gewaschen, in 1 mL PBSCMF resuspendiert und können dann mittels Durchflußzytometrie analysiert werden. Zellen, welche beide Oberflächenmarker tragen werden dabei als ausdifferenzierte BMDM angesehen.

Tabelle 3.11: Antikörper Verdünnung der BMDM-Färbung

Antikörper	Verdünnung	μ g/Test
Fc-Block	1:400	0,5
CD11b-PE	1:10	0,125
F4/80-FITC	1:10	0,5

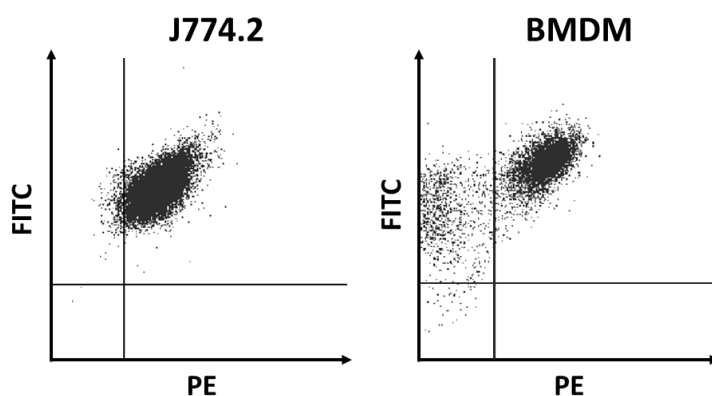


Abbildung 3.4: Charakterisierung der BMDM. Die Differenzierung der Knochenmarkszellen zu BMDM wurde anhand der spezifischen Makrophagen-Oberflächenmarker CD11b und F4/80 überprüft. Auf der linken Seite ist die Positivkontrolle der verwendeten Antikörper in der Makrophagen Zelllinie J774.2 zu sehen. Rechts erfolgte analog die Charakterisierung der differenzierten BMDM.

3.6 Zellkultur

3.6.1 Kultur adherenter Zellen

Die Kultivierung aller verwendeten Zellen erfolgt stets unter sterilen Bedingungen in einer Laminar-Air-Flow-Box. Inkubation im Zellkulturbrutschrank erfolgt unter konstanten Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂; 99% Luftfeuchtigkeit). Zum Passagieren von adhärenenten Zelllinien wird zunächst das Medium vollständig abgenommen und die Zellen mit PBSCMF vorsichtig gewaschen. Nach Entfernen des PBSCMF werden die Zellen abgelöst. Hierfür werden circa 30 µL pro Wachstumsfläche (cm²) einer auf 37 °C vorgewärmten Trypsin/EDTA-Lösung (0,025 % / 0,01 %) in die Zellkulturflasche zupipettiert, die Flasche verschlossen und kurz geschwenkt bis die gesamte Fläche mit Trypsin bedeckt ist. Nach circa dreiminütiger Inkubation im Brutschrank beginnen sich die Zellen abzulösen, was im Mikroskop zu überprüfen ist. Anschließend werden die Zellen in mindestens dem doppelten Volumen Kulturmedium aufgenommen. Um eine unbeabsichtigte Selektion schwach adherenter Zellen zu vermeiden ist darauf zu achten, dass alle Zellen abgelöst werden. Das im Medium enthaltene Serum kann zwar Trypsin inaktivieren sowie das verwendete EDTA teilweise binden, dennoch wird die Zellsuspension bei 4° C und 380 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wird in 5 mL Kulturmedium aufgenommen und sorgfältig durch auf und ab pipettieren vereinzelt. Die Zellen können anschließend im Verhältnis 1 zu 10 in einer neuen Zellkulturflasche, oder nach Zellzahlbestimmung für nachfolgende Versuche in entsprechenden Flaschen oder Platten ausgesät werden.

3.6.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Um Zellkulturzellen langfristig zu lagern und dabei ihre Vitalität vollständig aufrecht zu erhalten, werden die Zellen in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Hierfür werden subkonfluente, adhärenente Zellen mittels Trypsin abgelöst und in frischem Medium resuspendiert. Unter Zuhilfenahme des Coulter-Counters erfolgt eine Zellzahlbestimmung der Suspension. Die Zellen werden anschließend bei 4 °C und 380 x g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in Einfriermedium (FCS mit 10 % DMSO) zu einer Zelldichte von 2×10^6 Zellen / mL resuspendiert. Diese Zellsuspension wird nun zügig zu je einem Milliliter auf vorbereitete Kryoröhrchen aufgeteilt und stufenweise eingefroren. Hierfür werden die Zellen zunächst bei -20 °C für circa 2 Stunden gelagert und anschließend über Nacht bei -80 °C eingefroren. Zur endgültigen Lagerung werden die Zellen am nächsten Tag in einen Tank mit flüssigem Stickstoff transferiert.

Zum Auftauen der konservierten Zellen wird das Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und im Wasserbad bei 37 °C angetaut. Die noch nicht vollständig aufgetaute Zell-

suspension wird in ein vorbereitetes Tube überführt in welches 9 mL Kulturmedium vorgelegt wurden. Um das zur Kryokonservierung notwendige, jedoch zytotoxische, DMSO zu entfernen werden die Zellen bei 4 °C und 380 x g für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird anschließend in 5 mL Kulturmedium resuspendiert und die Zellsuspension in eine kleine Zellkulturflasche überführt. Am darauffolgenden Tag wird das Medium gewechselt um alle nicht adherenten Zellen zu entfernen. Die erste Passage erfolgt in der Regel am dritten Tag nach dem Auftauen.

3.6.3 Behandlung adhärenter Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Hela- und J774.2-Zellen sind adhärent, das bedeutet, dass sie am Boden der Zellkulturflaschen bzw. der Platten anwachsen. Zur Behandlung der Zellen werden diese am Vorabend des Versuchstages in 6-well-Platten ausgestreut (Hela: $0,8 \times 10^6$ Zellen; J774.2: 10^7 Zellen) und im Brutschrank über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wird das Medium durch unterschiedliche Vorinkubationsmedien ersetzt. In diesen Medien wird zuvor die gewünschte Konzentration eines eventuell eingesetzten Inhibitors (oder DMSO als Kontrolle) eingestellt und die Zellen für 1 Stunde vorinkubiert. Zur Induktion der Genexpression wird zunächst ein gemeinsamer Ansatz eines TNF- α oder LPS enthaltenden Mediums in entsprechender Konzentration angesetzt. Dieses wird entsprechend der Vorinkubation aufgeteilt und wiederum auf die zuvor definierte Konzentration eines Inhibitors eingestellt. Die Induktion der Genexpression erfolgt dann durch Inkubation der Zellen mit diesen Medien im Brutschrank für die angegebenen Zeiträume.

Die HeLa-Zelllinie mit dem stabilen OGG1 Knockdown sowie die Leervektor-Kontrollen wurden von der Arbeitsgruppe PD Dr. Khobta zur Verfügung gestellt. Zur Vereinfachung werden die Zellen im Folgenden als Kontrolle bzw. OGG1 KD bezeichnet.

3.7 Alkalische Elution

3.7.1 Versuchsprinzip der Alkalischen Elution

Die Alkalische Elution ist eine äußerst sensitive Methode zur Detektion intrazellulärer DNA-Einzelstrangbrüche. Das Prinzip hinter dieser Methode ist, dass einzelsträngige DNA (singlestranded DNA, ssDNA) in Abhängigkeit ihrer Länge unterschiedlich schnell von einem Polycarbonatfilter eluiert wird. Je mehr Einzelstrangbrüche (singlestrand breaks, SSB) in der DNA, desto kleiner die DNA-Fragmente und desto schneller die Eluierung vom Filter. Die Modifizierung dieser Methode durch zusätzlichen Einsatz geeigneter Reparaturenukleasen erlaubt es außer SSB's auch diverse andere DNA-Schäden zu detektieren. Diese sind in der Lage weitere DNA-Basenmodifikationen zu detektieren und auszuschneiden wodurch an deren Stelle ein SSB entsteht, welcher dann wiederum durch die Alkalische Elution quantifiziert werden kann.

3.7.2 Versuchsaufbau & Vorbereitungen

Insgesamt stehen in der Apparatur 20 Einwegspritzen (25 mL), welche in ein temperierbares Wasserbad absenkbar sind, als Vorratsgefäße zur Verfügung. Am Ende jeder Spritze ist ein Frittenboden befestigt auf welchem die Polycarbonatfilter aufgelegt werden. Die Zellsuspensionen und Puffer werden von oben in die diese Vorratsgefäße pipettiert und mit Hilfe einer Mehrkanalpumpe durch angeschlossene Dialyseschläuche über den Filter bis zu einem Abfallgefäß gepumpt. Während der Eluierung der DNA wird dieses durch einen Fraktionssammler ausgetauscht, um das Eluat in Reagenzgläsern aufzufangen. Vor Versuchsbeginn werden die angefeuchteten Polycarbonatfilter (Porendurchmesser 2 µm) blasenfrei auf die Frittenböden im Frittenhalter eingelegt und die Frittenhalter mit Aqua dest. aufgefüllt. Nachdem 2 mal 2,5 mL kaltes PBSCMF durch die Filter gepumpt wurde, werden die Fritten im Wasserbad bei 4 °C temperiert, um eine Reparatur der DNA-Schäden in den Zellen während des Auftragevorgangs zu vermeiden.

3.7.3 Durchführung

Pro Filter werden 10^6 Zellen aufgetragen, um so im Falle der Hela-Zellen auf eine DNA-Menge von ca. 10 µg DNA/Filter zu kommen. Dabei werden für jede „Behandlung“ drei Spuren benötigt. Die erste Spur dient zur Detektion von Einzelstrangbrüchen und wird später nicht mit Reparaturenukleasen behandelt, die beiden weiteren Spuren dienen zur Detektion Reparaturenuklease-sensitiver DNA-Modifikationen und werden später gemittelt. Die Zellen werden gezählt und die auf Eis gelagerte Zellsuspension anschließend auf

die bei 4 °C temperierten Filter durch Abpumpen aufgetragen. Durch zweimaliges Waschen mit je 3 mL kaltem PBSCMF werden alle Reste des Zellkulturmediums entfernt. Nach dem zweiten Waschschrift wird das Wasserbad auf 25 °C erwärmt. Zur Lyse der Zellen werden zunächst je 2 mL Lysepuffer bei maximaler Pumpleistung durch die Filter gepumpt. Zur vollständigen Entfernung aller Proteine werden dann pro Filter 5 mL mit Proteinase K versetztem Lysepuffer (400 mg/L) über 90 Minuten langsam durch den Filter gepumpt. Anschließend werden die Filter 7-mal mit je 5 mL PBSCMF gewaschen um alle Reste des Lysepuffers und der Proteinase zu entfernen. Während dieser Waschschrift kann das Wasserbad auf eine für die Reparaturenendonukleasen optimale Temperatur von 37 °C erwärmt werden. Pro Filter werden nun 2 mL der frisch angesetzten Enzymlösung in die Vorratsgefäße pipettiert. Davon wird der erste Milliliter mit maximaler Geschwindigkeit, der zweite Milliliter über einen Zeitraum von 50 Minuten durch den Filter gepumpt. Nach der Enzyminkubation werden eventuelle Reste der Enzymlösung vorsichtig aus den Vorratsgefäßen abpipettiert, die Temperatur des Wasserbads auf 25 °C gesenkt und 2-mal mit je 5 mL BE1 gewaschen, bevor nochmals mit 5 mL Waschpuffer gewaschen wird. Anstelle des Abfallgefäßes wird nun der Fraktionssammler mit jeweils 6 Reagenzgläsern pro Filter bestückt und eingesetzt. Die Vorratsgefäße werden mit 30 mL Elutionspuffer gefüllt und über einen Zeitraum von 11 Stunden langsam durch die Filter gepumpt. Der Fraktionssammler schaltet dabei alle 120 Minuten, sodass insgesamt 6 Fraktionen entstehen. Nach Ablauf dieser Zeit wird der sich noch in den Vorratsgefäßen befindende restliche Elutionspuffer in die letzte Fraktion gepumpt. Die

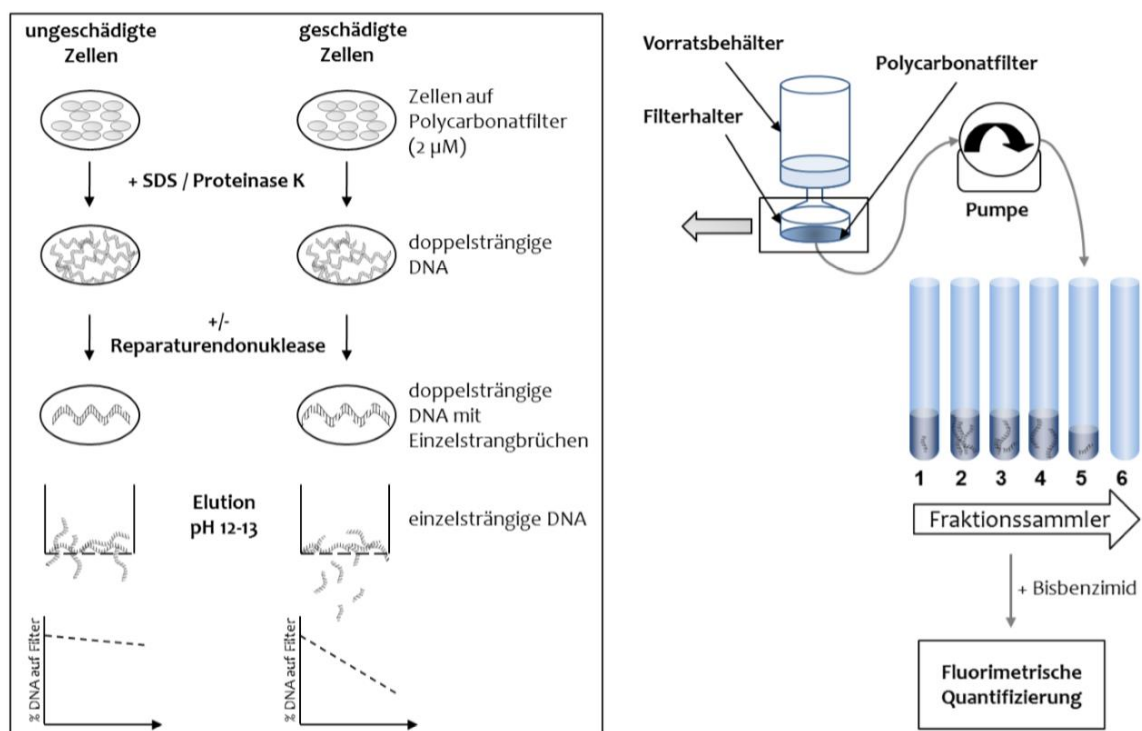


Abbildung 3.5: Prinzip und Durchführung der Alkalischen Elution in schematischer Darstellung. (entnommen der Dissertation von der Lippen, 2013)

3.7.4 Auswertung der Alkalischen Elution

Das Volumen der letzten Fraktion wird gemessen und zusammen mit dem zugehörigen Filter samt Frittenboden für 2 Stunden bei 60 °C im Wasserbad geschüttelt, um auf dem Filter verbliebene DNA abzulösen. Zur Auswertung wird das Volumen der anderen Fraktionen stichprobenartig gemessen und gemittelt (Fraktionsvolumen). Nach Ablauf der 2 stündigen Inkubationszeit wird dieses Volumen der Fraktion 6 (Filterwert) entnommen.

Um die in alkalischer Lösung einzelsträngige DNA wieder in doppelsträngige DNA zu überführen, werden die Fraktionen durch Zugabe des Fraktionsvolumen von Phosphatpuffer (PP pH6) neutralisiert (15 Minuten Inkubation). Anschließend wird ein entsprechendes Volumen neutralen Phosphatpuffers (PP pH7,2) mit Bisbenzimid versetzt (1,5 µM) und davon das Fraktionsvolumen zu den Fraktionen zupipettiert. Während einer 15 minütigen Inkubationszeit kann der Farbstoff in die DNA interkalieren. Da Bisbenzimid lichtempfindlich ist erfolgt dieser Schritt in einer abgedunkelten Kammer. Zu Beginn der Quantifizierung wird das Fluorimeter zunächst mittels einer Blindprobe (gleiche Anteile Elutionspuffer/PP pH6/PP pH7,2 mit Bisbenzimid) auf einen Nullwert eingestellt. Zusätzlich wird die Fluoreszenz der Fraktionen einer zellfreien Spur gemessen, welche später von den zugehörigen Fraktionen DNA enthaltender Spuren abgezogen werden kann. Danach werden die Fluoreszenzintensitäten aller Fraktionen gemessen (Extinktion: 360 nm; Emission: 450 nm). Da die Summe der Fluoreszenzintensitäten einer Spur (Fraktionen 1-6) proportional zur DNA-Menge ist, ist es möglich in jeder einzelnen Fraktion (also Zeitpunkt) den relativen Anteil der DNA zur Gesamt-DNA (Fraktionen 1-6) zu ermitteln. Die absolute DNA-Menge kann durch einen Vergleich mit einem Standard (4 µg Kalbsthymus-DNA in Elutionspuffer) berechnet werden. Eine zufällige Verteilung der Einzelstrangbrüche in der DNA vorausgesetzt, ergibt die halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragene relative DNA-Menge eine Gerade, deren Anstieg proportional zu den enthaltenen Einzelstrangbrüchen ist. Die Berechnung der absoluten Einzelstrangbrüche sowie der Reparaturrendonuklease-sensitiven DNA-Schäden berechnet sich nach folgender Formel:

$$SSB + RE = m * (-2,24 * 10^6)$$

Formel 1: Berechnung der DNA-Schäden in der Alkalischen Elution.

SSB=Anzahl der Einzelstrangbrüche; RE=Anzahl der Reparaturrendonuklease-sensitiven Läsionen;
m=mittlere Steigung der Geraden; Der Faktor für die hier beschriebene langsame Elution beträgt -2,24.

Zur Quantifizierung der Reparaturrendonuklease-sensitiven Modifikationen, werden die bereits vorliegenden Einzelstrangbrüche (Spur ohne Enzyminkubation) von diesen Werten abgezogen.

3.8 Western Blot

3.8.1 Prinzip

Der Western Blot ist eine Standardmethode zum Nachweis von Proteinen. Hierfür müssen die Proteine eines Zell-Lysats zunächst über eine SDS-Page nach Größe aufgetrennt werden. Als „blotting“ bezeichnet man den anschließenden Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulose Membran durch Anlegen einer Spannung. Die durch hydrophobe Wechselwirkungen auf dieser Membran anhaftenden Proteine werden daraufhin mit Hilfe spezifischer Antikörper detektiert.

3.8.2 Durchführung des Western Blots

3.8.2.1 Herstellung des Zelllysats

Zur Herstellung des Zell-Lysats werden 10^7 Zellen verwendet. Nach dem Zählen der Zellen wird das entsprechende Volumen der Zellsuspension in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen pipettiert und bei 380xg für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen, das Zellpellet in 10 mL PBSCMF resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wird nochmals wiederholt. Nachdem der Überstand abgenommen wurde wird das Zellpellet in 200 µL RIPA-Puffer, welcher kurz zuvor mit PMSF versetzt wurde, aufgenommen. Die Zellsuspension wird zunächst 15 Minuten auf Eis geschüttelt und danach weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Suspension wird in ein 2 mL Eppendorf-Cap transferiert und für 10 Minuten bei 4 °C mit 10000xg zentrifugiert. Der Überstand kann nun zu je 30 µL aliquotiert werden (+ je 3µL cComplete®, Mini Protease Inhibitor Cocktail, 10fach) und wird bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Ein Aliquot ohne den Protease Inhibitor wird direkt zur Proteinquantifizierung nach Bradford weiterverwendet.

3.8.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zu Beginn der Quantifizierung wird zunächst eine BSA-Kalibrierkurve erstellt. Da die Konzentration des Zell-Lysats zu hoch ist wird dieser 1:10 mit Wasser verdünnt. Für die Messung werden je 800 µL Kalibrierlösung oder 780 µL Wasser in einem 2 mL Cap vorgelegt und 200 µL BioRad-Lösung langsam dazu pipettiert. Im Falle der Messprobe werden nun 20 µL der verdünnten Probe dazu gegeben und gut gevortext. Nach 10 Minuten kann die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen und die Proteinmenge anhand der Kalibriergeraden errechnet werden.

3.8.2.3 SDS-Page und Protein-Blotting

Zur Auftrennung der Proteine im Zell-Lysat wird zunächst ein 10 %iges Acrylamidgel in einer Dicke von 0,75 mm gegossen und mit einem Sammelgel überschichtet. Zur Analyse werden 20 µg Gesamtprotein sowie 7 µL des Proteinmarkers aufgetragen und die Elektrophorese bei 80 V gestartet. Sobald die Proben das Trenngel erreicht haben, wird die Auftrennung bei 100 V für ca. 2 Stunden gefahren. Anschließend wird das Gel vorsichtig in entionisiertem Wasser gewaschen und zusammen mit 2 Filterpapieren, der Nitrocellulosemembran und zwei Faserpads für 30 Minuten im Kühlschrank in Transferpuffer inkubiert. Das Transfer-„Sandwich“ in der Zusammensetzung Faserpad – Filterpapier – Gel – Nitrocellulosemembran – Filterpapier – Faserpad wird anschließend blasenfrei in die Transferkassette eingespannt, wobei die Membran der Anode zugewandt sein muss. Bestückt mit einem Kühlakku und komplett mit Transferpuffer befüllt wird der Proteintransfer durch Anlegen einer Spannung von 100 V für 60 Minuten gestartet. Durch kurzzeitiges Anfärben der Proteine mit Ponceau-Rot kann der Proteintransfer überprüft werden. Vor der Antikörperinkubation wird die Ponceau-Färbung durch mehrmaliges Waschen mit entionisiertem Wasser wieder entfernt.

3.8.2.4 Antikörperinkubation

Um eine unspezifische Bindung der Antikörper (AK) zu verhindern, wird die Membran bei 4 °C über Nacht auf einem Schüttler in einer 5 %igen BSA-Blocking-Lösung inkubiert. Am folgenden Tag wird die Membran mehrmals kurz in TBST 0,1 % geschwenkt und nach folgendem Schema dreimal gewaschen: 15 min TBST 0,1 %, 10 min TBST 0,5 % und 5 min TBST 0,1 %. Die folgende AK-Inkubation erfolgt im gleichen Gefäß wie das Blocking. Pro Membran werden circa 10 mL der AK-Lösungen verwendet. Hierfür wird der anti-hOGG1 AK 1:20.000, der anti-β-Actin AK 1:2.000 in TBST 0,1 % (1 % BSA) verdünnt, und die Membran über Nacht bei 4 °C auf mit dieser Lösung inkubiert. Anschließend wird die Membran erneut dreimal nach obigem Schema gewaschen. Die Inkubation mit den sekundär-AK erfolgt allerdings getrennt. Zunächst erfolgt die Inkubation mit dem goat-anti rabbit-IgG-HRP Antikörper (1:2.000 in 0,1 % TBST mit 1 % BSA) für 2 Stunden bei Raumtemperatur zur Detektion von OGG1. Danach wird die Membran zur Detektion von β-Actin mit dem goat-anti mouse- IgG HRP Antikörper (1:2000) inkubiert.

3.8.2.5 Immundetektion

Nach der Inkubation mit den sekundären Antikörpern wird die Membran dreimal mit TBST gewaschen, mit circa 2 mL Chemilumineszenz-Lösung vollständig bedeckt für 2 Minuten inkubiert und anschließend blasenfrei in Klarsichtfolie verpackt. Ein entsprechend der Größe der Membran zugeschnittenes Stück Blotting-Film wird nun zusammen mit dieser in einer Autoradiographie-Kassette fixiert und diese fest verschlossen. Das Luminol in der Chemilumineszenz-Lösung kann nun, durch die sich am sekundären AK befindende HRP (horse raddish peroxidase), in seine oxidierte Form umgewandelt werden und beleuchtet somit den Blotting-Film nur an den Stellen, an denen sich auch HRP befindet. Daher müssen alle Schritte der Immundetektion in einer Dunkelkammer durchgeführt werden. Nach der Belichtungszeit (0,5 – 5 Minuten) wird der Blotting-Film in Entwickler-Lösung entwickelt bis die Banden zu sehen sind und abschließend für 1 Minute in Fixierlösung eingelegt.

Zur Quantifizierung werden die Blotting-Filme unter Nutzung des BioRad Gel Doc 1000 dokumentiert. Die densitometrische Messung erfolgt durch die Software Image Lab™.

3.9 PM2-Assay / FPG Cleavage

3.9.1 Prinzip

Der PM2-Assay ermöglicht es, die DNA-schädigende Wirkung chemischer Substanzen und/oder Strahlung in zellfreier Umgebung zu untersuchen. Dabei macht man sich zu Nutze, dass die in ungeschädigtem Zustand in superhelikaler Konformation vorliegende PM2-DNA durch einen SSB in die offenzirkuläre Konformation relaxiert. Um mit diesem Assay Basenmodifikation zu detektieren, müssen diese jedoch zunächst von einer für sie spezifischen Reparaturenuklease erkannt werden, welche an dieser Stelle einen SSB erzeugen. Die verschiedenen Konformationen der PM2-DNA lassen sich im Agarosegel einfach auftrennen, da sie aufgrund ihrer unterschiedlichen Kompaktheit im Agarosegel unterschiedlich weit laufen. In dieser Arbeit wird dieser Assay allerdings nicht verwendet um die schädliche Wirkung einer Substanz auf die DNA zu untersuchen, sondern, um den vollständigen cleavage isolierter DNA durch FPG zu überprüfen. Die verwendete DNA enthält eine definierte Anzahl oxidativer Läsionen und wird im Zuge der qPCR-basierten Detektion oxidativer Läsionen als Positiv-Kontrolle für einen erfolgreichen Cleavage eingesetzt.

3.9.2 Durchführung des PM2-Assays / FPG Cleavage

3.9.2.1 Pipettierschema

Für die Durchführung des PM2-Assays wurde die oxidative Läsionen enthaltende DNA zunächst mit dem Nanodrop quantifiziert (siehe Kapitel 3.3.2) und auf eine Konzentration von 50 ng/μL eingestellt, wobei hier mit einem Faktor von 0,05 für DNA (anstatt 0,04 für RNA) gerechnet wird. Das FPG-Enzym der Firma NEB wird vor Versuchsbeginn auf eine Konzentration von 1,33 U/μL verdünnt (BEH/BSA-Puffer). Auf jede Spur des Gels sollen später 200 ng DNA aufgetragen werden, daher ergibt sich für die Durchführung das Pipettierschema in Kapitel 3.10.2.1.

Nach Inkubation der DNA mit FPG für 60 Minuten bei 37 °C wird das Enzym anschließend durch eine 20 minütige Inkubation bei 60 °C inaktiviert. Nach Zugabe von 10 μL Auftragepuffer werden die Proben in die Geltaschen des vorbereiteten Agarosegels pipettiert.

	Volumen	Menge/Konz.
DNA	4 μL	200 ng
+ FPG-Enzym	6 μL	8 U
+ BEH-BSA	ad 40 μL	
Inkubation: 1 Stunde bei 37 °C		
Hitzeinaktivierung: 20 Minuten bei 60 °C		

Agarosegelelektrophorese

Zur Detektion der DNA wird ein 0,8 %iges Agarosegel gegossen. Hierzu werden 0,8 g Agarose in 100 mL TAE-Puffer durch Erhitzen in der Mikrowelle vollständig geschmolzen. Durch Siedeverzug verlorenes Volumen wird anschließend mit TAE-Puffer aufgefüllt. Die flüssige Agarose-Lösung wird blasenfrei in eine mit Gelkämme bestückte Gelkammer gegossen und muss dort zunächst erkalten. Das gesamte Probenvolumen wird anschließend in die Geltasche pipettiert, und die DNA bei 80 V für 60 Minuten aufgetrennt.

3.9.2.2 Auswertung

Anhand der Fluoreszenzintensitäten der beiden DNA-Konformationen kann anschließend die Anzahl der bereits vorliegenden SSB beziehungsweise die Anzahl der durch FPG erzeugten SSB errechnet werden. Hierfür wird die DNA im Agarosegel nach der Auftrennung im Ethidiumbromidbad angefärbt, und die Fluoreszenzintensitäten mit Hilfe des BioRad Gel Doc 1000 gemessen. Die densitometrische Auswertung des Gelbilds erfolgte mit der Software Image Lab®. Die Anzahl der FPG-sensitiven Läsionen kann dann durch folgende Gleichung errechnet werden:

$$SSB + ESS = -\ln \frac{-1,4 * S}{1,4 * S + R}$$

Formel 2: Berechnung der SSB und Endonuklease-sensitiven Läsionen

SSB	Einzelstrangbrüche pro PM2 Molekül (pro 10 ⁴ Basenpaaren)
ESS	Endonuklease-sensitive Läsionen pro PM2 Molekül
S	Fluoreszenzintensität der superhelikalen Form
R	Fluoreszenzintensität der relaxierten (offenzirkulären) Form
1,4	Korrekturfaktor, welcher die geringere Interkalation von Ethidiumbromid in die superhelikale Form berücksichtigt

3.10 qPCR basierte Methode zur Detektion oxidativer Läsionen im hIL6-Promotor

3.10.1 Prinzip

Anhand einer Reihe etablierter Methoden können die globalen Level oxidativer Basenläsionen detektiert werden, beispielsweise über die Alkalische Elution, HPLC oder spezifische Antikörper. Die Erfassung von Basenschäden in spezifischen DNA-Sequenzen, z.B. der Promotor-Region oder in den Telomeren, stellt jedoch eine große Herausforderung dar, da diese Sequenzen nur einen Bruchteil des Genoms ausmachen. Eine relativ neue Methode bedient sich der quantitativen PCR (O'Callaghan et al. 2011). Das Prinzip beruht hierbei darauf, dass die DNA-Polymerase Progression durch eine Läsion im Template verhindert wird, was zu einer verringerten Amplifikationseffizienz der Reaktion führt (Sikorsky et al. 2004). Dies erfordert jedoch den Einsatz läsionsspezifischer Glycosylasen, welche die Basenschäden in AP-Stellen beziehungsweise Einzelstrangbrüche überführen.

3.10.2 Durchführung

In dieser Arbeit erfolgte die Detektion von 8-oxoG in der Promotorsequenz des humanen Interleukin 6 Gens, genauer gesagt im Bereich einer NF- κ B Bindungssequenz. Nach der Behandlung der Zellen mit TNF- α (3.6.3) erfolgte die Isolierung der DNA mit dem QIAamp DNA Mini Kit. Die isolierte DNA wurde mit dem Nanodrop 2000 quantifiziert und anschließend einem FPG-cleavage unterzogen.

3.10.2.1 FPG-cleavage

Für den FPG-cleavage wurden 200 ng der isolierten DNA mit und ohne 8 Units des zuvor verdünnten FPG-Proteins für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert (Kapitel 3.9.2). Die Inaktivierung erfolgte durch Erhitzen auf 60 °C für weitere 20 Minuten. Zur Kontrolle des Cleavage wird parallel dazu eine Probe mit PM2 DNA angesetzt, welche eine definierte Menge FPG-sensitiver Läsionen enthält. Nach dem Temperaturprogramm werden diese Proben in einem Agarosegel aufgetrennt und das Schadensausmaß, hier also die Effizienz des FPG-Cleavage, wie in (3.9.2.2) beschrieben quantifiziert.

3.10.2.2 Primer-Design & qPCR

Die Primer wurden so konstruiert, dass sie eine Sequenz innerhalb des IL6-Promotors amplifizieren, welche eine Bindungssequenz für den Transkriptionsfaktor NF- κ B enthält. In der Nähe dieser Bindungsstelle befinden sich noch eine Reihe weiterer Bindungsstellen, unter anderem für den Glucocorticoid Rezeptor (GR) sowie für die Transkriptionsfaktor AP-1.

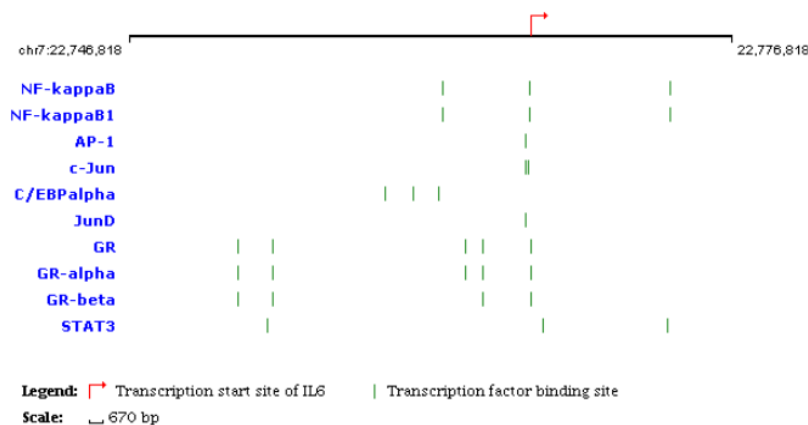


Abbildung 3.6: Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren im IL6 Promotor. Entnommen von www.sabiosciences.com

Abbildung 3.7 zeigt in Rot die Sequenzen der Primer für den IL6-Promotor-Abschnitt. Als Referenz wurde ein Bereich eines IL6 Introns amplifiziert (Kapitel 7.9). Die Primer wurden zuvor wie in Kapitel 3.3.4 beschrieben getestet.

```

AAAAACATAGCTTTAGCTTATTTTTTCTCTTTGTAAACTTCGTGCATGACTTCAGCTTTACTCTTTGTCAAG
ACATGCCAAAGTGCTGAGTCACTAAATAAAAGAAAAAGAAAGTAAAGGAAGAGTGGTTCTGCTTCTTAGCG
CTAGCCTCAATGACGACCTAAGGCTGCACTTTCCCCCTAGTGTGTCTTGCCATGCTAAAGGACGTCACATTGCA
CAATCTTAATAAGGTTTCCAATCAGCCCCACCCGCTCTGGCCCCACCCTCACCTCCAACAAAGATTTATCAAAT
GTGGGATTTTCCCATGAGTCTCAATATTAGAGTCTCAACCCCAATAAATATAGGACTGGAGATGTCTGAGGCT
CATTCTGCCCTCGAGCCCCACCGGGAACGAAAGAGAAGCTCTATCTCCCTCCAGGAGCCAGCTATGAACTCCT
TCTCCACAAGTAAGTGCAGGAAATCCTTAGCCCTGGAAGTCCAGCGCGGTCGAGCCCTGTGTGAGGGAGG

```

NF- κ B-binding sequence **AP-1 binding sequence** **Primer 1 (reverse complement)**

Abbildung 3.7: Promotorsequenz des IL6 Gens. in Rot die Bindungsstellen der Primer

Nach dem FPG-Cleavage werden die Proben auf eine Konzentration von 10 ng/μL verdünnt und direkt für die qPCR eingesetzt. Als Referenz zum Zielgen wurde eine Sequenz in einem IL6 Intron gewählt. Die Berechnung der Amplifikationseffizienz und dadurch die relative Detektion oxidativer Läsionen erfolgt durch folgende Formel:

$$\text{Amplifikationseffizienz} = \frac{\left(\frac{E_{\text{Promotor}}^{\Delta\text{Ct(Promotor)}}(\text{Kontrolle-Behandlung})}{E_{\text{Intron}}^{\Delta\text{Ct(Intron)}}(\text{Kontrolle-Behandlung})} \right)^{+ \text{FPG}}}{\left(\frac{E_{\text{Promotor}}^{\Delta\text{Ct(Promotor)}}(\text{Kontrolle-Behandlung})}{E_{\text{Intron}}^{\Delta\text{Ct(Intron)}}(\text{Kontrolle-Behandlung})} \right)^{- \text{FPG}}}$$

Ein Quotient von 1,0 gibt somit an, dass die relative Expression des Exons vor und nach FPG-Verdau gleich ist. Ein Quotient <1 gibt hingegen an, dass die relative Expression nach FPG-Verdau verringert ist und stellt somit einen indirekten Nachweis für mindestens eine FPG-Läsion in der amplifizierten Promotor-Sequenz dar.

3.11 Statistik

Alle statistischen Berechnungen für diese Arbeit wurden mit Microsoft Excel 2013 durchgeführt. Für den Vergleich von zwei Mittelwerten wurde der Student's T-Test eingesetzt. Hierbei wurde ein ungepaarter, zweiseitiger T-Test mit Welch-Korrektur zur Berücksichtigung der Annahme einer unterschiedlichen Varianz durchgeführt. Zur Angabe der Signifikanz wurde eine Einteilung nach den folgenden Wahrscheinlichkeiten (p-Wert) vorgenommen:

- * p < 0,05 statistisch signifikant
- ** p < 0,005 statistisch sehr signifikant
- *** p < 0,0005 statistisch hoch signifikant

Zur Berechnung des Signifikanzniveaus wurde weiterhin vereinzelt ein ANOVA-Test durchgeführt. Die Berechnungen erfolgten durch die Software SPSS (Ver. 23). Die Einteilung des Signifikanz-Niveaus erfolgte analog zum Student's T-Test.

4 Ergebnisse

4.1 Maus-Modell: „ex-vivo“

4.1.1 Charakterisierung der Versuchstiere

Zur Charakterisierung der Versuchstiere wurden die Mäuse im Alter von 2, 4,5 und 12 Monaten seziert und hinsichtlich ihres Körpergewichts und dem Organgewicht von Leber, Niere, Lunge, Herz und Milz untersucht. Wie in Abbildung 4.1D zu erkennen ist, nehmen die Wildtyp Tiere im Laufe eines Jahres stärker an Gewicht zu als die *Ogg1*^{-/-}-Tiere. Die Abhängigkeit des Gewichts vom Genotyp weist dabei eine Signifikanz von $p=0,059$ auf (ANOVA-Analyse) und der Unterschied beträgt nach einem Jahr ca. 12 %.

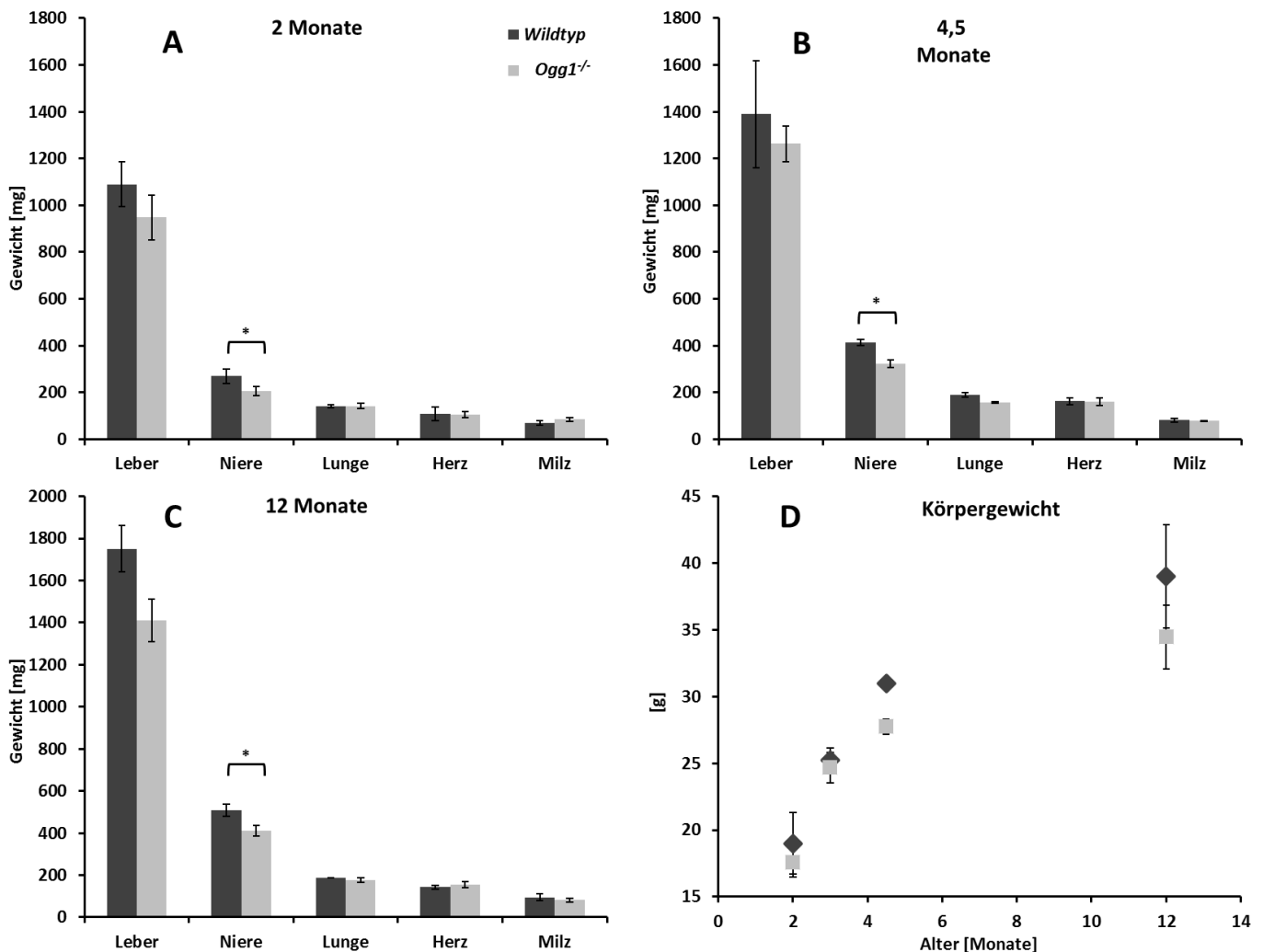


Abbildung 4.1: Charakterisierung der Versuchstiere. Vergleich der Organ- und Körpergewichte von Wildtyp- und *Ogg1*^{-/-}-Tieren im Alter von 2 Monaten (A, n=4), 4,5 Monaten (B, n=3) und 12 Monaten (C, n=4); MW $\pm$ SD.

Die Organgewichte unterscheiden sich mit Ausnahme der Niere hingegen nicht signifikant, wenngleich beim Gewicht der Leber in jeder Altersstufe eine Tendenz zu einem höheren

Gewicht bei den Wildtyp Tieren auszumachen ist. Das Gewicht der Niere der OGG1 defizienten Tiere ist in jeder Altersstufe signifikant reduziert, wie den Abbildung 4.1 A, B und C zu entnehmen ist. Der Unterschied beträgt dabei in jeder Altersstufe zwischen 22 und 25 %. In Bezug auf Fertilität, Mortalität und das Verhalten konnte über den gesamten Zeitraum der Zucht und Haltung kein offensichtlicher Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden.

4.1.2 Zytokin-Expression in Milzzellen nach LPS-Behandlung

Eine klassische und gut untersuchte Methode eine Immunreaktion auszulösen, ist die Aktivierung des TLR4 Signaltransduktionswegs durch LPS. Wie in Abbildung 1.2 dargestellt, werden dadurch Signalwege ausgelöst, welche in einer Aktivierung von NF- κ B und anderen Transkriptionsfaktoren münden und dadurch zu einer veränderten Expression proinflammatorischer Zytokine führen. Um ein neues Versuchsmodell zu etablieren und in diesem die Abhängigkeit der Immunreaktionen von OGG1 zu überprüfen, wurden in den folgenden Experimenten die Milzzellen von Wildtyp und OGG1 defizienten Mäusen für unterschiedliche Zeiträume sowie in steigenden Konzentrationen (Abbildung 4.3 & Abbildung 4.4) mit LPS behandelt und anschließend die Expression verschiedener Zytokine gemessen.

In Anlehnung an frühere Befunde (Mabley et al. 2005) Bestand der erste Schritt zur Etablierung eines neuen Versuchsmodells in der Untersuchung der Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL6, MIP1- α und MCP1 (Abbildung 4.2). Nach der Isolierung der Milzzellen wurden diese für 3 Stunden bei 37 °C mit 30 ng/mL LPS inkubiert und anschließend die Genexpression als Quotient zu β -Actin berechnet und zur unbehandelten Probe der Wildtyp-Mäuse normalisiert. Während in den unbehandelten Zellen die basalen Spiegel von MCP1 und IL6 durch den *Ogg1* knockout unbeeinflusst bleiben, sind bereits die basalen Expressionsspiegel von TNF- α und MIP1- α in den OGG1 defizienten Zellen signifikant um ca. 50 bzw. 60 % reduziert. Nach Exposition mit LPS zeigen alle untersuchten Zytokine eine gesteigerte Expression, wobei diese im Falle von MCP1 jedoch sehr gering ausfällt. Während sich die Expression von MIP1- α und MCP1 nach LPS Exposition nicht signifikant zwischen den Genotypen unterscheidet, ist die Expressionsstärke von IL6 und TNF- α von der Expression von OGG1 abhängig. Hierbei zeigen OGG1 defiziente Zellen eine signifikant verringerte Expression der Zytokine TNF- α und IL6, welche nach Exposition mit LPS nur noch einen Induktionsfaktor von $4,1 \pm 1,0$ bzw. $2,9 \pm 0,6$ aufweisen, im Vergleich zu *Ogg1*^{+/+}-Zellen mit einem Induktionsfaktor von $7,5 \pm 1,1$ respektive $8,5 \pm 2,9$.

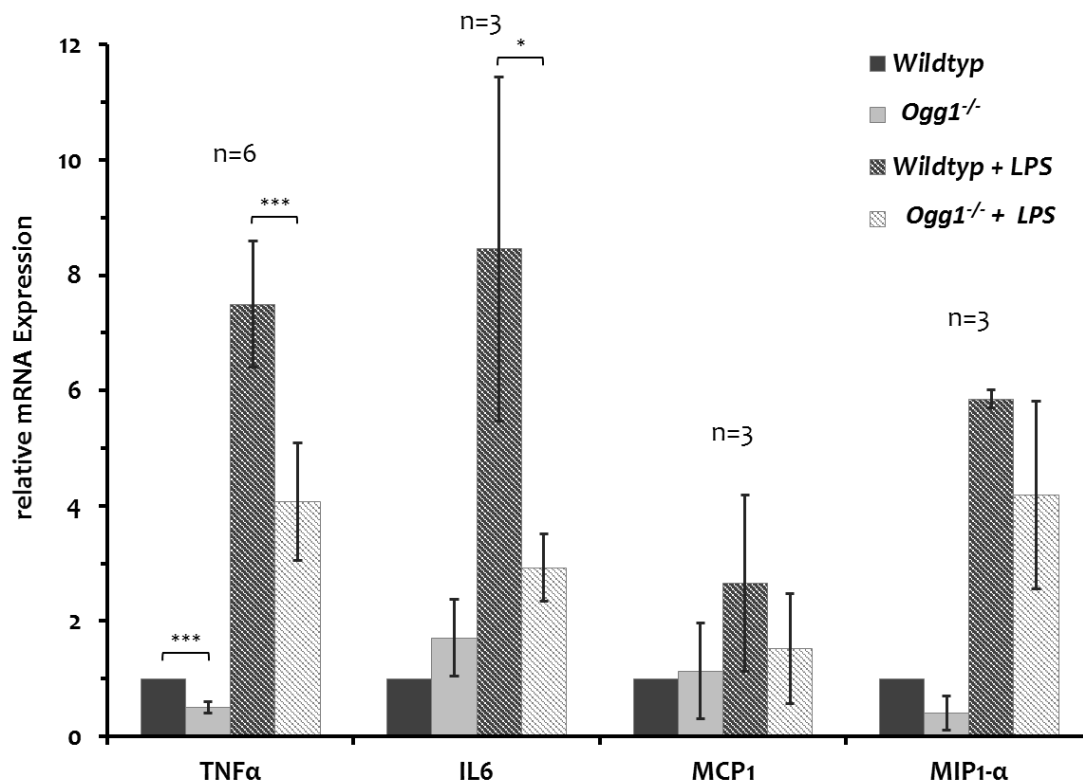


Abbildung 4.2: Expression verschiedener Zytokine in Milzzellen. Relative mRNA Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF- α (Tumor necrosis factor α), IL6 (Interleukin 6), MIP1- α (Macrophage inflammatory protein α) und MCP1 (Monocyte chemotactic protein 1) in *Wildtyp* und *Ogg1*^{-/-} Milzzellen nach LPS Behandlung (30 ng/mL LPS; 3h; 37°C). Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte *Wildtyp*-Probe. MW $\pm$ SD. Für die TNF- α Expression der Kontrollen sowie der Konzentration von 30 ng/mL LPS konnten die Werte aus Abbildung 4.3 übernommen werden.

Nachdem somit mit TNF- α ein passendes Zielgen gefunden wurde, galt es durch Analyse der Expressionsunterschiede in Abhängigkeit der LPS-Konzentration sowie der Inkubationszeit ein passendes Behandlungsschema für weiterführende Experimente zu entwickeln. Zunächst wurden die Milzzellen über einen Zeitraum von 3 Stunden im Inkubator bei 37 °C mit LPS unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert und die Expression als Induktionsfaktor über den unbehandelten Kontrollzellen berechnet (Abbildung 4.3). Die Expression steigt in den *Wildtyp* Zellen nach Behandlung mit 10 ng/mL LPS auf einen Induktionsfaktor von $6,7 \pm 1,0$ kann aber auch durch Erhöhung der Konzentration auf 30 bzw. 50 ng/mL nicht signifikant gesteigert werden. In den *OGG1* defizienten Zellen ist die Expression im Vergleich zu den *Wildtyp*-Zellen nicht nur in den basalen Spiegeln signifikant verringert, sondern auch nach Behandlung mit LPS in allen untersuchten Konzentrationen.

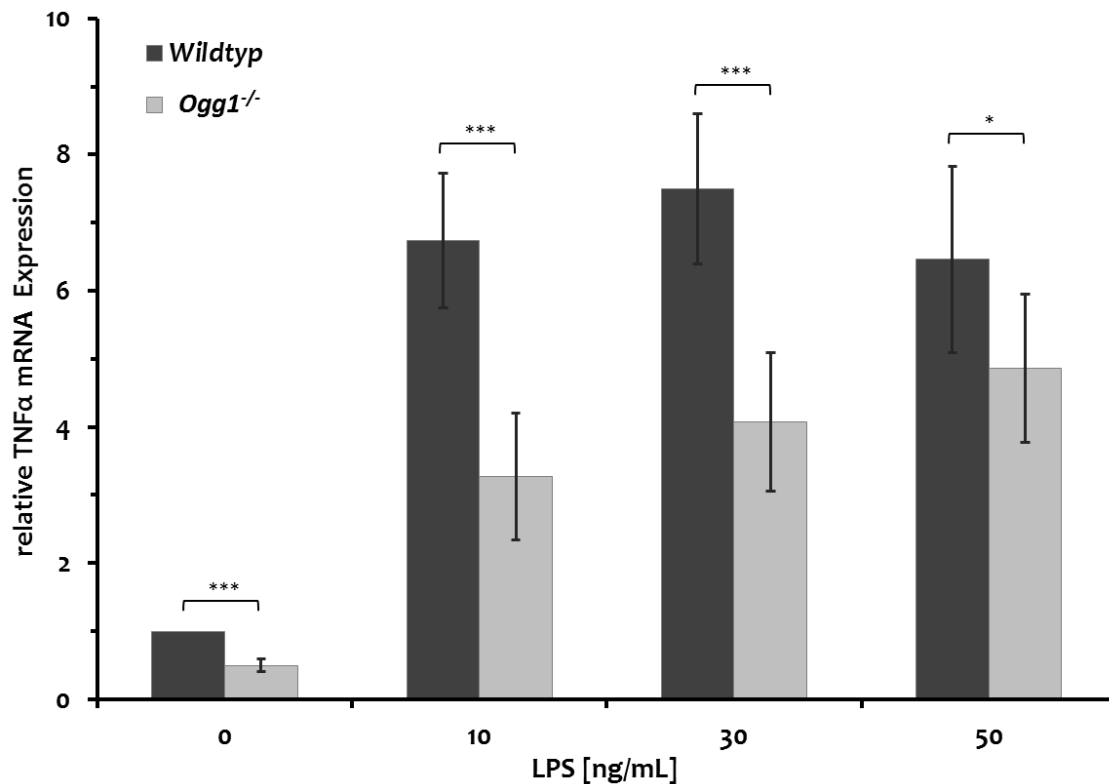


Abbildung 4.3: Konzentrationsabhängige TNF- α Expression. Relative mRNA Expression von TNF- α über der Expression von β -Actin in Milz-Zellen von Wildtyp und Ogg1^{-/-}-Mäusen nach Behandlung mit LPS in den angegebenen Konzentrationen für 3 h bei 37 °C. n=6. MW $\pm$ SD. Für die Kontrollen sowie die Konzentration von 30 ng/mL LPS konnten die Expressionswerten aus Abbildung 4.2 übernommen werden.

In den OGG1 defizienten Zellen beträgt der Induktionsfaktor der TNF- α Expression in Bezug auf die basalen Werte der Wildtyp Zellen $3,3 \pm 0,9$ bei einer LPS-Konzentration von 10 ng/mL, steigt über $4,1 \pm 1,0$ bei 30 ng/mL auf einen Induktionsfaktor von $4,9 \pm 1,1$ bei 50 ng/mL kontinuierlich an und nähert sich somit immer weiter den Expressionswerten der Wildtyp Zellen. Die LPS Konzentration, mit welcher die Zellen behandelt werden, wurde für die folgenden Experimente auf 10 ng/mL festgelegt, da bei dieser Konzentration die maximale TNF- α Expression in den Wildtyp Zellen nahezu erreicht und der Unterschied zu Ogg1^{-/-}-Zellen im Vergleich mit höheren Konzentrationen mit nahezu 50 % am größten ist. Die Analyse der TNF- α Expression in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit 10 ng/mL LPS bestätigte weiterhin die vorangegangenen Ergebnisse (Abbildung 4.4). In den Wildtyp Zellen erreicht die Expression nach einer Stunde ein Maximum bei einem Induktionsfaktor von $16,6 \pm 6,2$. Auch nach zweistündiger Behandlung ist die Expression nicht weiter zu steigern und fällt vielmehr nach einer weiteren Stunde Inkubationszeit bereits wieder ab. In den OGG1 defizienten Zellen erreicht die Expression ebenfalls nach einstündiger Behandlung ein Maximum. Auch in diesen Zellen kann durch eine darüber hinausgehende Expositionsdauer die Expression nicht weiter gesteigert werden. Beim Vergleich der beiden Genotypen ist jedoch auffällig, dass die OGG1 defizienten Zellen zu jedem Zeitpunkt eine nahezu um die Hälfte reduzierte Expressionsstärke aufweisen.

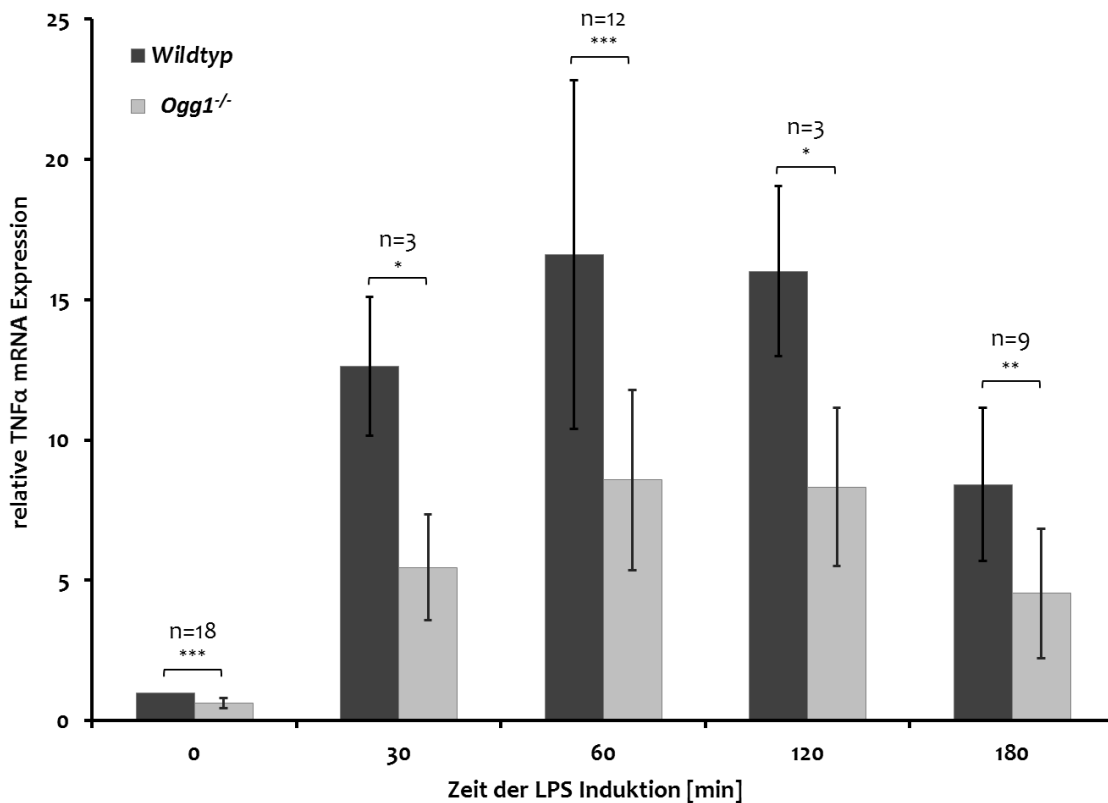


Abbildung 4.4: Zeitabhängige TNF- α Expression. Relative mRNA Expression von TNF- α über der Expression von β -Actin in Milz-Zellen von Wildtyp und Ogg1^{-/-}-Mäusen nach Behandlung mit LPS (10 ng/mL) über den angegebenen Zeitraum bei 37 °C; (für diese Abbildung wurden nach Abschluss aller Experimente die Ergebnisse für die angegebenen Zeitpunkte zusammengefasst). MW $\pm$ SD.

In Ogg1^{-/-}-Zellen Milzzellen konnte somit eine verminderte Expression von TNF- α durch Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen sowie nach unterschiedlicher Expositionsdauer mit LPS beobachtet werden.

4.1.3 Zytokin Expression in Milzzellen von *Nakabeppu*- und *Lindahl*- Mäusen

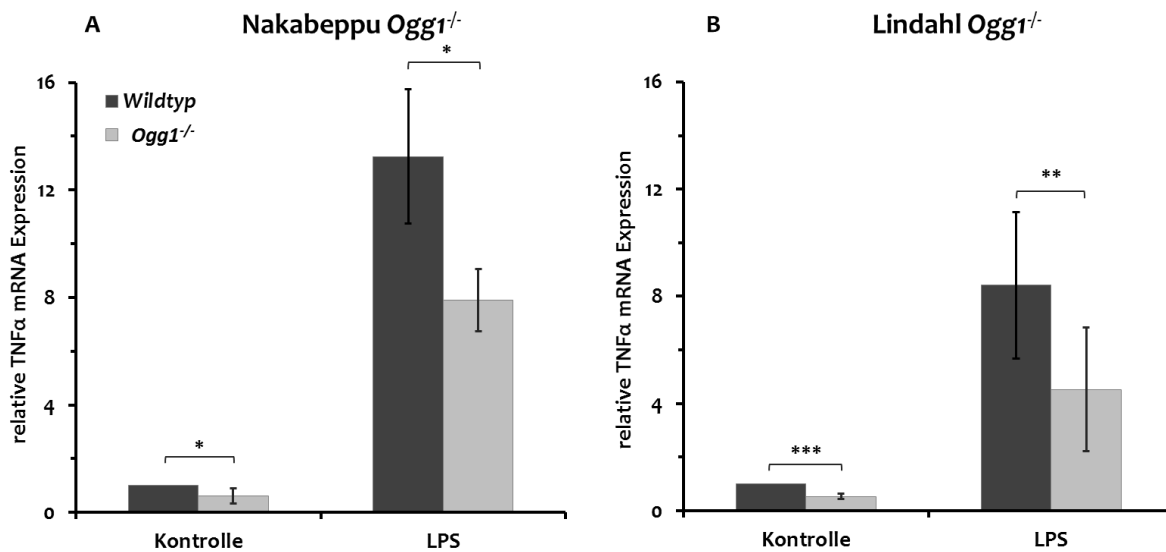


Abbildung 4.5: Zytokin Expression in Milzzellen von *Nakabeppu*- und *Lindahl*-Mäusen. Vergleich der relativen mRNA Expression von TNF-α über der Expression von β-Actin in Milz-Zellen von *Wildtyp* und *Ogg1^{-/-}*-Mäusen mit Knockouts nach (A, n=3) *Nakabeppu* und (B, n=9) *Lindahl* und Behandlung mit LPS (10 ng/mL) über einen Zeitraum von 3 h bei 37 °C. Normalisierung erfolgte jeweils auf die unbehandelte *Wildtyp*-Probe. MW ± SD. Die Daten für die Expression in „*Lindahl*“-Milzzellen wurden aus vorrangegangenen Experimenten übernommen.

Die katalytische Domäne von OGG1 ist auf dem 4. Exon des zugehörigen Gens codiert. Die in dieser Arbeit verwendeten OGG1 knockout Mäuse wurden durch gezielte Elimination dieses Exons im Arbeitskreis von T.Lindahl generiert. Die ersten 3 Exons sind jedoch noch intakt, wodurch ein verkürztes OGG1 Protein entstehen könnte. In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Christoph Niehrs konnte dies durch die Detektion von Transkripten mit intakten Exons 1-3 in „Mouse embryonic fibroblasts“ (MEF) bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Um die Notwendigkeit eines katalytisch aktiven OGG1 für die Beteiligung an der beobachteten Immunreaktion in Milzzellen zu ermitteln, untersuchten wir die Immunreaktion in einem weiteren *Ogg1^{-/-}*-Mausstamm. In diesem, durch die Nakabeppu-Gruppe generierten Stamm, sind auch die Exons 1-3 eliminiert, was ebenfalls in der qPCR durch Fehlen jeglicher Transkripte bestätigt werden konnte (Daten nicht gezeigt). Die Analyse der Expression von TNF-α erfolgte nach Exposition mit 10 ng/mL LPS über einen Zeitraum von 3 Stunden (Abbildung 4.5).

Auch in diesem Mausstamm sind bereits die Basalspiegel von TNF-α in den OGG1 defizienten Zellen um ca. 50 % signifikant reduziert. Nach LPS Behandlung steigt die Expression im Falle der „*Nakabeppu*“-Zellen auf einen Induktionsfaktor von $13,3 \pm 2,5$ in den *Wildtyp*-Zellen, hingegen nur auf das $7,9 \pm 1,2$ fache in den *Ogg1^{-/-}*-Zellen und ist somit signifikant verringert (Abbildung 4.5A). Wie bereits in Kapitel 4.1.2 gezeigt, ist nach Zusammenfassung aller

Expressionsdaten in „Lindahl“-Milzzellen der Induktionsfaktor nach LPS Behandlung in *Ogg1*^{-/-}-Zellen im Vergleich zu den zugehörigen *Wildtyp*-Zellen signifikant verringert. Der beobachtete Effekt der OGG1-abhängigen Immunreaktion in Milzzellen konnte somit in zwei unterschiedlichen Mausstämmen beobachtet werden, wodurch eventuelle „off-target“-Effekte durch die Generierung des Knockouts ausgeschlossen werden können.

4.1.4 Zelluläre Komposition der Milz in *Wildtyp*- und *Ogg1*^{-/-}-Mäusen

In den vorangegangenen Experimenten wurde die Analyse der Zytokinexpression immer mit sämtlichen Milzzellen einer präparierten Milz durchgeführt und dabei vernachlässigt, dass die Milz, als äußerst heterogenes Organ, aus diversen Subpopulation von Immunzellen besteht (siehe Kapitel 1.1.1). Um auszuschließen, dass der beobachtete Unterschied zwischen den beiden Genotypen bezüglich der Zytokin Expression nach LPS Exposition auf einer veränderte Komposition der Milzzell-Subpopulationen beruht, wurde im Folgenden die zelluläre Komposition der Milz von *Wildtyp*- und *Ogg1*^{-/-}-Mäusen durchflußzytometrisch analysiert (Abbildung 4.6).

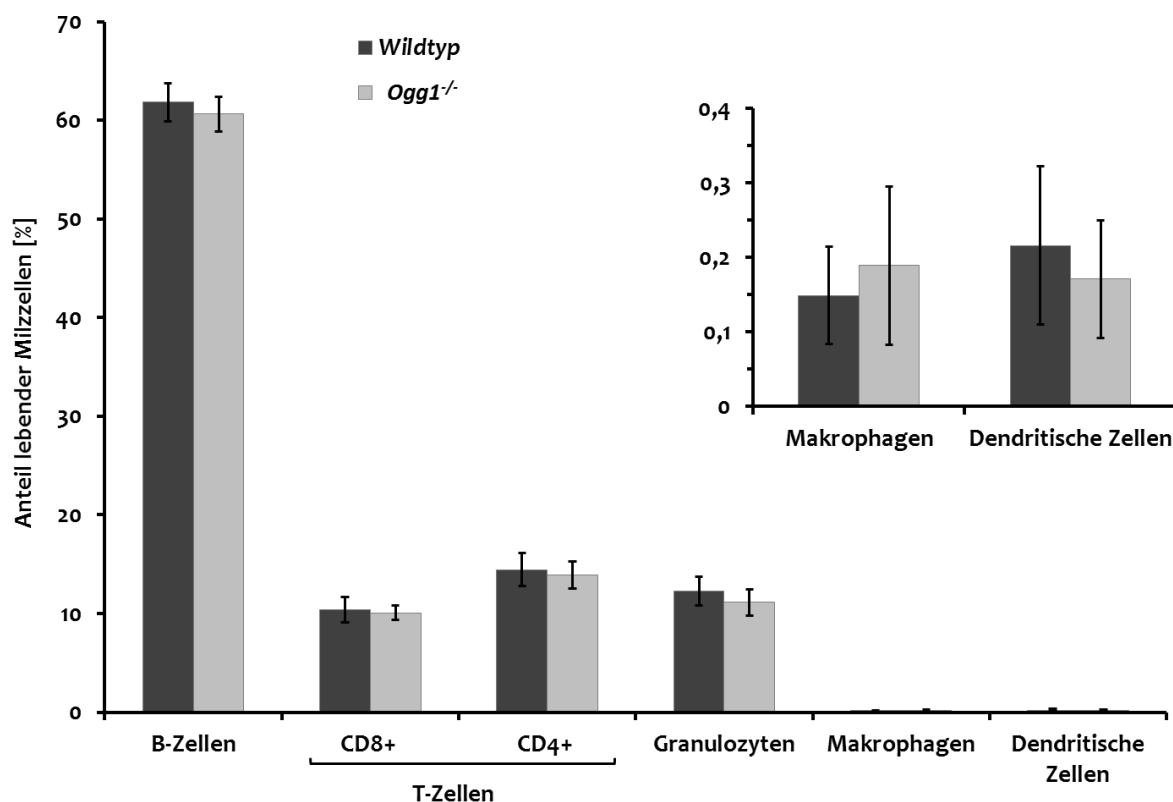


Abbildung 4.6: Zelluläre Komposition der Milz. Anteil unterschiedlicher Immunzellen in der Milz von *Wildtyp*- und *Ogg1*^{-/-}-Tieren, mittels Durchflußzytometrie gemessen. *Wildtyp*: n=9, *OGG1* KO n=10. MW ± SD.

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben, wurden zunächst alle lebenden Zellen mittels eines Viabilitätsmarkers vorsortiert und anschließend anhand spezifischer Oberflächenmarker der Anteil an B-Zellen, CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen, Granulozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen ermittelt. Mit ca. 60 % stellen die B-Zellen sowohl in den Wildtyp-Zellen als auch in den Ogg1^{-/-} defizienten Zellen die größte Subpopulation dar und unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. Die T-Zellen wurden nochmals grob in CD8⁺- (zytotoxische T-Zellen), und CD4⁺-Zellen (T-Helferzellen) unterschieden. Auch hier ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen auszumachen. Eine weitere untersuchte Gruppe von Immunzellen sind die Granulozyten, welche vor allem der angeborenen Immunantwort zugeordnet werden. Sie machen in der Wildtyp-Milz 12,3 % aus und unterscheiden sich somit auch nicht signifikant vom Anteil der Granulozyten in der Ogg1^{-/-}-Milz mit 11,5 %. Zwei insbesondere für die Phagozytose und Antigenpräsentation wichtige Zellenarten der angeborenen Immunantwort sind dendritische Zellen und Makrophagen. Sie stellen, mit 0,22 zu 0,17 % im Falle der Dendritischen Zellen und 0,15 zu 0,19 % im Falle der Makrophagen, die kleinsten Subpopulationen der Milzzellen dar. Auch bei diesen Zellen ist kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Genotypen auszumachen.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass sich die zelluläre Komposition für die berücksichtigten Zelltypen in den untersuchten Mäusen nicht voneinander unterscheidet.

4.1.5 TNF- α Expressionsanalyse auf Proteinebene

Zum Nachweis der Immunantwort in Milzzellen von Wildtyp und Ogg1^{-/-}-Zellen auf Proteinebene wurde die Expression von intrazellulärem TNF- α nach 6-stündiger Behandlung der Zellen mit 100 ng/mL LPS durchflußzytometrisch gemessen (Abbildung 4.7). Da TNF- α als Zytokin normalerweise über den Golgi-Apparat sezerniert wird, wurde dieser durch Monensin inhibiert, TNF- α somit intrazellulär angereichert und für eine Messung mit dem Durchflußzytometer zugänglich gemacht (siehe Kapitel 3.4).

Wie aus Abbildung 4.7 zu entnehmen ist, produzieren weder B- noch die T-Zellen TNF- α als Antwort auf eine vorherige LPS Stimulation. Auch Granulozyten und Dendritische Zellen produzieren nur wenig TNF- α und scheinen somit kaum zur beobachteten Immundefizienz beizutragen. In beiden Genotypen ist die stärkste TNF- α Produktion bei den Makrophagen zu beobachten. Die mittlere gemessene, zur Expression proportionale, Fluoreszenzstärke (MFI) nach TNF- α -Fluoreszenzmarkierung beträgt in den Wildtyp Zellen 2406 ± 694 , in den Milzzellen der Ogg1^{-/-}-Mäusen jedoch nur 1621 ± 429 . Aufgrund der Messungenauigkeit und der geringen Tierzahl erreicht der Unterschied statistisch allerdings nur ein Signifikanzniveau von $p=0,07$.

Eine gleichzeitige Behandlung von Zellen mit Phorbolmyristatacetat (PMA; 20 ng/mL) und Ionomycin (1 μ M) über einen Zeitraum von 6 Stunden wird standardmäßig zur Induktion

der Zytokinexpression durchgeführt. PMA aktiviert die Proteinkinase C direkt und kann im Zusammenspiel mit Ionomycin, welches als Ionophor Calciumionen freizusetzen vermag, die Expression von unter anderem TNF- α in T-Zellen und weiteren Immunzellen induzieren.

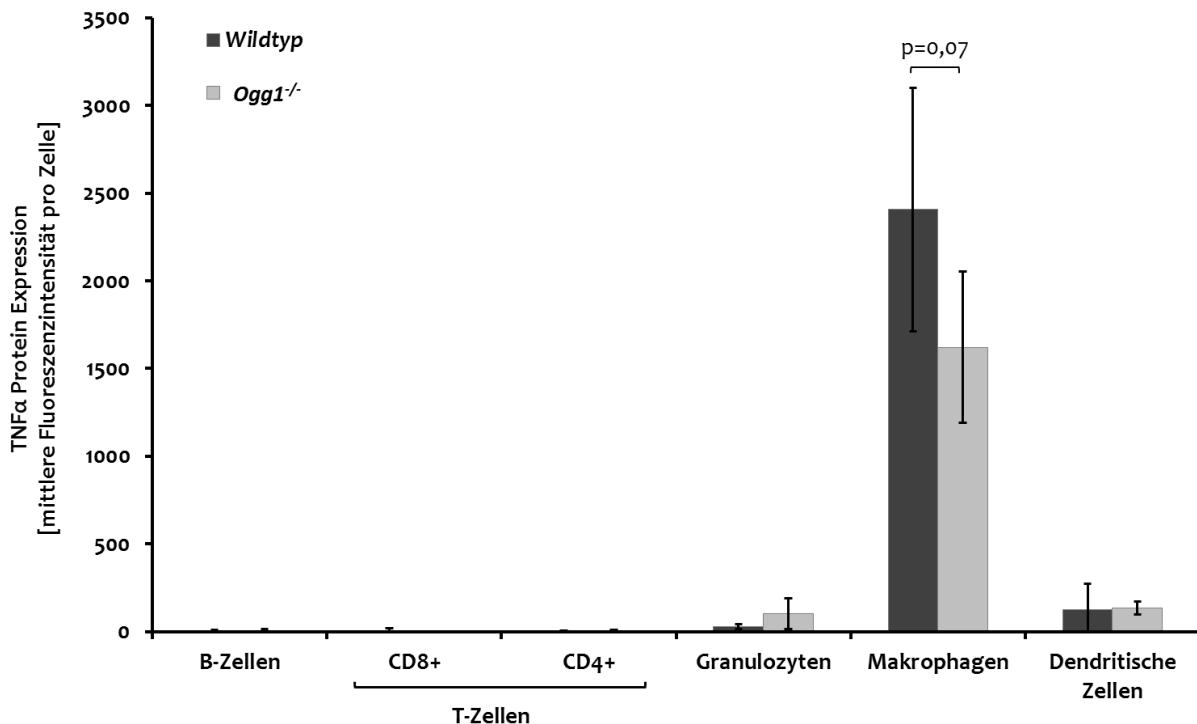


Abbildung 4.7: TNF- α Protein Expression in Milzzellen nach LPS Exposition. Intrazelluläres TNF- α nach Behandlung der Milzzellen von Wildtyp und *Ogg1*^{-/-}-Mäusen mit LPS (100 ng/mL, 6h, 37°C). Die Exkretion von TNF- α wurde durch gleichzeitige Inkubation mit 1x Monensin unterbunden. Wildtyp: n=4, *Ogg1*^{-/-} n=5. MW $\pm$ SD.

In Abbildung 4.8 ist die Expression von TNF- α nach Stimulation der Milzzellen mit PMA und Ionomycin in den untersuchten Zellpopulationen aufgetragen. Durch die unspezifische Aktivierung sind nunmehr nicht nur die Makrophagen in der Lage dieses Zytokin zu produzieren, sondern vielmehr alle Zelltypen mit Ausnahme der B-Zellen. In beiden Genotypen produzieren die CD4-positiven T-Helferzellen am meisten TNF- α , wobei die Wildtyp-Zellen bei einer mittleren Fluoreszenzintensität von 4866 ± 548 eine höhere Expression zeigen als die OGG1 defizienten Zellen mit 3800 ± 762 ($p=0,052$). Dieses Ergebnis zeigt sich ebenfalls in den CD8-positiven, zytotoxischen T-Zellen, wobei die Expression bei einer MFI von 2386 ± 207 (Wildtyp) zu 1496 ± 216 (*Ogg1*^{-/-}) signifikant geringer als in den T-Helferzellen ausfällt. Auch in den Granulozyten ist die Produktion von TNF- α als Antwort auf eine PMA/Ionomycin Behandlung festzustellen. Auch hier produzieren die Wildtyp Zellen mit 2580 ± 523 signifikant mehr Zytokin als die OGG1 defizienten Zellen mit 1623 ± 457 . Die zur Antigenpräsentation spezialisierten dendritischen Zellen reagieren, wie schon bei LPS, kaum auf eine Behandlung mit PMA/Ionomycin und unterscheiden sich nicht in der TNF- α Expression.

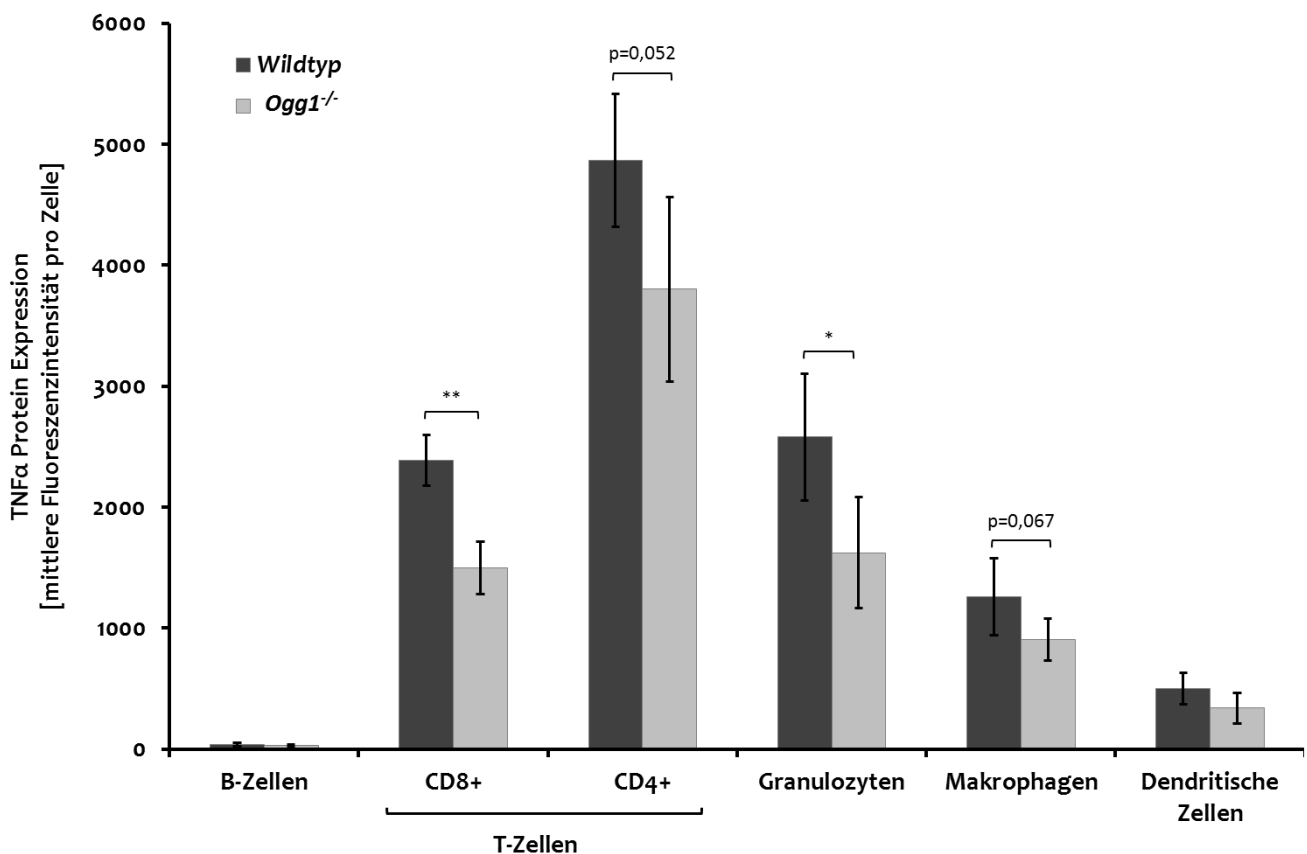


Abbildung 4.8: TNF- α Protein Expression in Milzzellen nach PMA/Ionomycin Exposition. Intrazelluläres TNF- α nach Behandlung der Milzzellen von Wildtyp und Ogg1^{-/-}-Tieren mit PMA (20 ng/mL)/Ionomycin (1 μ M) für 6 h.). Die Exkretion von TNF- α wurde durch gleichzeitige Inkubation mit 1x Monensin unterbunden. Wildtyp: n=4, Ogg1^{-/-} n=5. MW $\pm$ SD.

Da, wie in Abbildung 4.7 gezeigt, durch LPS Behandlung vornehmlich Makrophagen aktiviert werden, ist auch die Expression von TNF- α nach PMA/Ionomycin Behandlung in diesem Zelltypus von besonderem Interesse. Wie bereits in allen anderen untersuchten Subpopulationen, produzieren die Wildtyp-Zellen mehr Zytokin als die OGG1 defizienten, jedoch ist die Expression deutlich geringer als zum Beispiel in den T-Zellen und unterscheidet sich zudem nicht statistisch signifikant ($p=0,067$).

In Abbildung 4.9 sind die Expressionsdaten von TNF- α in Milz-Makrophagen nach LPS- und PMA/Ionomycin-Behandlung zusammengefasst. Zusätzlich wurde nochmals die Zytokin-Expression bei einer niedrigeren Konzentration von LPS analysiert. Betrachtet man die zwei Genotypen isoliert voneinander, so kann man eine deutliche Abhängigkeit der Expressionsstärke von der Behandlungsdosis erkennen. Im direkten Vergleich der Genotypen produzieren die Makrophagen der Wildtyp-Mäuse auch bei einer Behandlung mit nur 30 ng/mL LPS mit einer mittleren Fluoreszenzintensität von 1721 ± 506 mehr Zytokine als die korres-

pondierenden OGG1 defizienten Zellen mit 1421 ± 667 . Eine zusätzliche durchgeführte A-NOVA Signifikanz-Analyse ergibt, dass sich die Expression von TNF- α in Wildtyp und OGG1 defizienten Milzzellen unter Behandlung mit LPS oder PMA/Ionomycin signifikant unterscheidet ($p=0,029$).

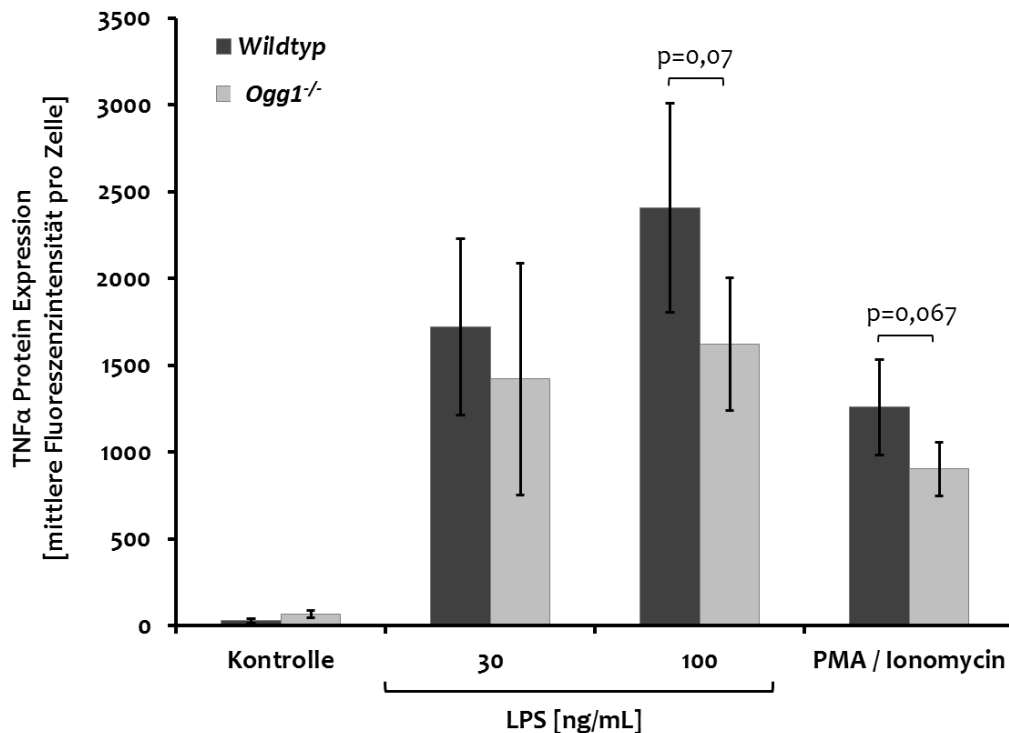


Abbildung 4.9: TNF- α Protein Expression in Milz-Makrophagen. Intrazelluläres TNF- α in Makrophagen nach Behandlung der Milzzellen von Wildtyp und Ogg1^{-/-}-Mäusen mit LPS (30 bzw. 100 ng/mL) und PMA/Ionomycin (20 ng/mL PMA und 1 μ M Ionomycin). Die Sekretion von TNF- α wurde durch gleichzeitige Inkubation mit 1x Monensin unterbunden. WT: n=4, Ogg1^{-/-} n=5. MW $\pm$ SD. (Die Daten zur Erstellung dieser Abbildung wurden teilweise aus den Abb. 4.7 und 4.8 übernommen)

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass Milzzellen der Wildtyp-Mäuse sowohl nach Exposition mit LPS, als auch PMA/Ionomycin auch auf Proteinebene eine höhere TNF- α Produktion aufweisen als die korrespondierenden OGG1 defizienten Milzzellen. Nach PMA/Ionomycin Behandlung ist dieser Effekt in allen Subpopulationen zu beobachten. Nach spezifischer Aktivierung des TLR4-Signaltransduktionswegs durch LPS allerdings nur in Makrophagen, da sich alle anderen untersuchten Subpopulationen gegenüber LPS unempfindlich zeigen.

4.1.6 Expression von TNF- α in Bone-marrow-derived-macrophages

In den Versuchen unter Kapitel 4.1.5 konnte gezeigt werden, dass im Falle der Immunantwort nach LPS Behandlung nicht alle Milzzellen, sondern nur Makrophagen mit einer Produktion von TNF- α reagieren. Makrophagen machen allerdings, wie in Kapitel 4.1.4 gezeigt nur einen Bruchteil der Milzzellen aus, was weiterführende Experimente erschwert. Daher wurden im Folgenden pluripotente Knochenmarkszellen mit Hilfe geeigneter Wachstumsfaktoren zu Makrophagen (sogenannten bone-marrow-derived-macrophages; BMDM) differenziert und zunächst im Durchflußzytometer charakterisiert.

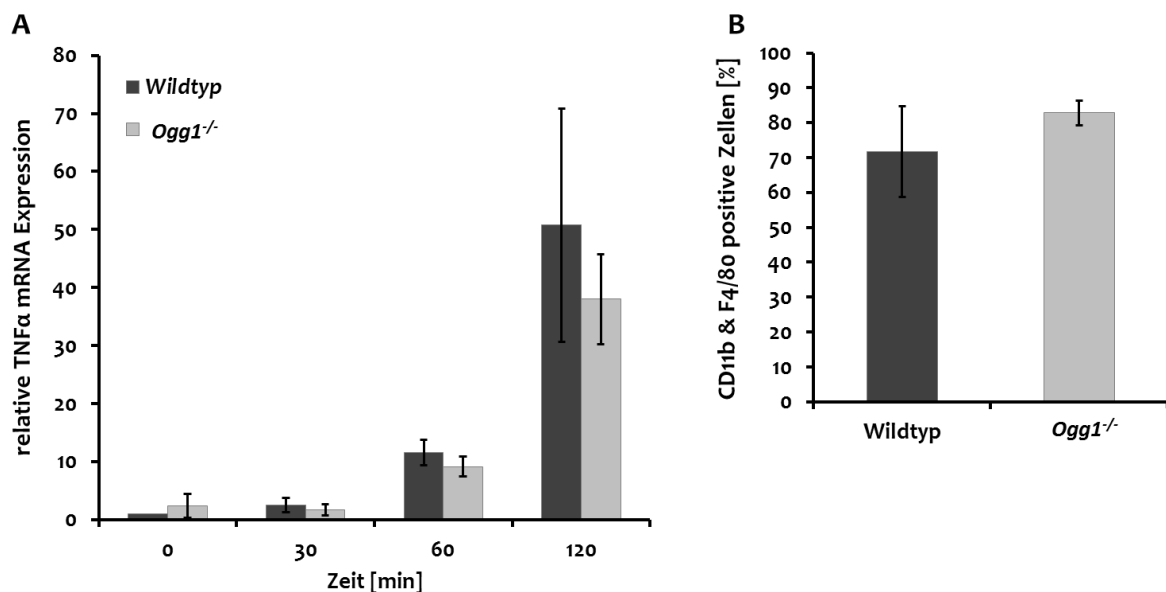


Abbildung 4.10: Expression von TNF- α in Bone-marrow-derived-macrophages. (A) relative mRNA Expression von TNF- α über der Expression von β -Actin in Abhängigkeit der Inkubationszeit von WT und *Ogg1*^{-/-}-BMDM mit 10 ng/mL LPS bei 37 °C. (B) Effizienz der BMDM Differenzierung aus pluripotenten Knochenmarkszellen als Anteil der CD11b und F4/80 doppelt positiven Zellen. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Wildtyp-Probe. n=3. MW $\pm$ SD.

Um die erfolgreiche Differenzierung zu Makrophagen zu kontrollieren und um auszuschließen, dass die OGG1 Defizienz einen Einfluss auf die Differenzierungsfähigkeit der Knochenmarkszellen hat, wurden die Makrophagen mit Hilfe von Antikörpern gegen die spezifischen Oberflächenmarker CD11b und F4/80 charakterisiert.

Abbildung 4.10B zeigt den Anteil aller CD11b und F4/80 doppelt positiven Zellen nach erfolgter Differenzierung. Die beiden Genotypen zeigen eine mittlere Differenzierungseffizienz von 71,8 % bei den Wildtyp Zellen, beziehungsweise 82,8 % bei den OGG1 defizienten Zellen. Statistisch unterscheiden sich die Genotypen nicht signifikant voneinander. Es konnten somit keine Anzeichen festgestellt werden, dass die Differenzierung von Knochenmarkszellen zu Makrophagen durch OGG1 beeinflusst wird.

Abbildung 4.10.A zeigt die TNF- α mRNA Expression der BMDM nach LPS Behandlung. Hierfür wurden die aus Knochenmarkszellen von *Wildtyp*- und *Ogg1*^{-/-}-Mäusen differenzierten Makrophagen mit 10 ng/mL LPS über verschiedene Zeiträume hinweg behandelt. Bei beiden Genotypen ist eine zeitabhängige Expression von TNF- α zu erkennen, welche im betrachteten Zeitraum stark ansteigt. Beide Genotypen zeigen nach 30 Minuten noch keine wesentliche Steigerung der TNF- α Expression. Erst nach 60 minütiger beziehungsweise 120 minütiger Behandlung steigt diese stark an. Eine Signifikanz-Analyse mittels Students T-Test sowie einer ANOVA-Analyse zeigt jedoch, dass sich die Expression von TNF- α nach LPS Behandlung in BMDM der beiden Genotypen nicht signifikant unterscheidet. Aufgrund des hohen Aufwands bei der Isolation des Knochenmarks und der Differenzierung, sowie durch die hohe Varianz der Expressionsänderung, wurden keine weiteren Experimente mit BMDM durchgeführt.

4.1.7 Einfluss einer LSD1-Inhibition auf die Zytokin-Expression in Maus-Zellen

Wie bereits erwähnt (siehe Kapitel 1.2.5), deutet die Arbeit von Garcia-Bassets et al. (2007) darauf hin, dass die Regulation der Expression von Genen, die über bestimmte nukleäre Rezeptoren wie dem Androgen-Rezeptor transkribiert werden, durch die Aktivität der Lysin-spezifischen Demethylase LSD1 beeinflusst wird. Perillo et al. (2008) konnten erstmals zeigen, dass dies zumindest teilweise über oxidative Läsionen, welche im Zuge der Histon-demethylierung entstehen, und die dadurch rekrutierten Reparaturenzyme (u.a. OGG1, APE1) geschieht. Daher liegt die Frage nahe, wie sich eine Inhibition von LSD1 auf die LPS induzierte Expression des proinflammatorischen Zytokins TNF- α auswirkt, dessen Expression wie bereits gezeigt in Abwesenheit von OGG1 verringert ist (Abbildung 4.2). LSD1 besitzt eine Monoaminoxidase-Funktion. Daher wurden in früheren Arbeiten unspezifische, ursprünglich als Arzneistoffe entwickelte MAO-Hemmer wie Tranylcypromin zur Inhibition von LSD1 angewendet (Mimasu et al. 2008). Mit OG-Lo02 ist aber auch eine Substanz kommerziell erhältlich, welche als spezifischer Inhibitor von LSD1 beschrieben ist (Liang et al. 2013). Für die folgenden Untersuchungen wurde dieser Inhibitor daher unter verschiedenen Bedingungen der LPS induzierten Genexpression eingesetzt.

In Abbildung 4.11 wurde die Genexpressionsänderung von TNF- α in Abhängigkeit von LSD1 unter einem minimalen sowie maximalen LPS-Stimulus analysiert (A und B). Zusätzlich wurde die Genexpression auch nach einem maximalen Stimulus über einen längeren Zeitraum gemessen (C). Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Kapitel 4.1.2 exprimieren sowohl die unstimulierten als auch die LPS behandelten OGG1 defizienten Zellen signifikant weniger TNF- α mRNA. Unter allen Bedingungen wird die Expression durch Inhibition von LSD1 (50 μ M OG-Lo02) signifikant reduziert, wobei das Ausmaß der Reduktion zwischen 13 und 46 % der maximalen Expression beträgt. Dieser Effekt ist allerdings nur in OGG1 profizienten Zellen zu beobachten. In OGG1 defizienten Zellen hingegen bleibt die TNF- α Expression nach LSD1 Inhibition unverändert. Der zuvor beobachtete, statistisch signifikante Expressionsunterschied wird dadurch unter allen Bedingungen nivelliert.

Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt somit, dass die TLR4-abhängige Expression von TNF- α zusätzlich einer LSD1-abhängigen Regulation unterliegt, welche epistatisch durch LSD1 und OGG1 erfolgt.

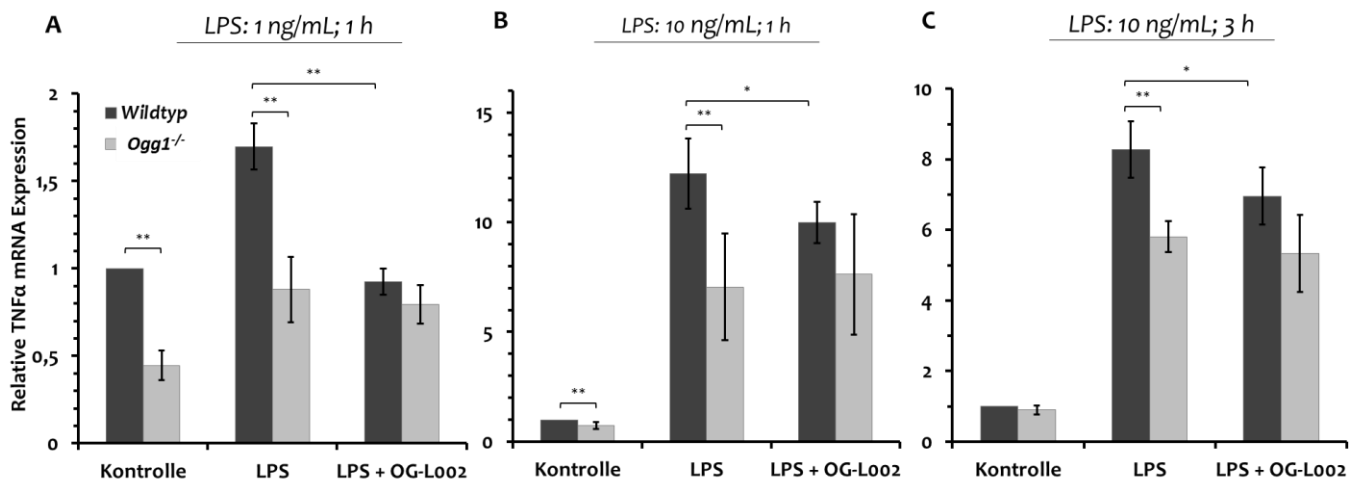


Abbildung 4.11: LSD1 abhängige Genexpression von TNF- α . Relative TNF- α mRNA Expression über der Expression von β -Actin nach Inkubation der Milzzellen von Wildtyp- und *Ogg1*^{-/-}-Mäusen mit unterschiedlichen Konzentrationen von LPS und Inhibition von LSD1 mit 50 μ M OG-L002. Inkubation mit 1 ng/mL LPS für 1 h (A, n=3), 10 ng/mL LPS für 1 h (B, n=5) und 10 ng/mL LPS für 3 h (C, n=5 (WT) und n=3 (*Ogg1*^{-/-})) bei 37 °C. Unter allen Bedingungen wurden die Zellen 1 h mit 50 μ M OG-L002 vorinkubiert. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Wildtyp-Probe. 0,05 % DMSO unter allen Bedingungen. MW $\pm$ SD.

4.1.8 Einfluss von MAPK-Inhibitoren auf die Zytokin-Expression in Maus-Zellen

Wie bereits in Kapitel 1.1.2 veranschaulicht und mehrfach erwähnt, werden durch LPS unterschiedliche TLR4-abhängige Signalkaskaden aktiviert. Neben der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B werden auch die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) p38, JNK und ERK durch komplexe Phosphorylierungskaskaden aktiviert, was letztlich zur Aktivierung eines weiteren Transkriptionsfaktors (AP-1), führt. Inwieweit diese beiden Transkriptionsfaktoren eventuell miteinander interagieren wird in Kapitel 5 diskutiert.

Um den Einfluss der MAPK auf die LPS induzierte Genexpression von TNF- α zu ermitteln, wurden Milzzellen der Wildtyp und *Ogg1*^{-/-}-Mäuse zunächst mit den jeweiligen Inhibitoren für 1 Stunde vorinkubiert und anschließend die Genexpression durch Inkubation mit 10 ng/mL LPS für eine weitere Stunde induziert. Durch Inhibition von p38 und JNK verringert sich die LPS induzierte relative mRNA Expression signifikant (Abbildung 4.12). Dies steht im Einklang mit dem eingangs vorgestellten TLR4-Signaltransduktionsweg (Kapitel 1.1.2). Auffällig ist, dass diese Verringerung in beiden Genotypen im gleichen Ausmaß beobachtet werden kann. Das wiederum bedeutet, dass die Expressionsreduktion in den LPS behandelten Zellen nach Inhibition der MAPK p38 und JNK unabhängig von OGG1 verläuft. Auch statistisch lässt sich diese Aussage untermauern, da der anfängliche signifikante Unterschied der Expression auch nach Inhibierung dieser beiden MAPK erhalten bleibt. Durch kombinierte Inhibition beider MAPK zeigt sich zusätzlich, dass diese Effekte additiv sind

und die relative mRNA Expression nunmehr in beiden Genotypen sehr stark reduziert ist. ERK hat hingegen keinen Einfluss auf die TLR4-abhängige Expression von TNF- α . Das Ergebnis zeigt somit, dass sowohl p38 als auch JNK an der TLR4-abhängigen Transkription von TNF- α beteiligt sind. Der Mechanismus dieser Transkriptionsregulation verläuft allerdings unabhängig von OGG1. Die Frage, in wie weit sich eine Inhibition von p38 beziehungsweise JNK dennoch auf die NF- κ B vermittelte Genexpression auswirken kann, beziehungsweise inwieweit downstream von JNK und p38 gelegene Transkriptionsfaktoren wie AP1 mit NF- κ B und möglicherweise OGG1 interagieren, wird in Kapitel 5 aufgegriffen.

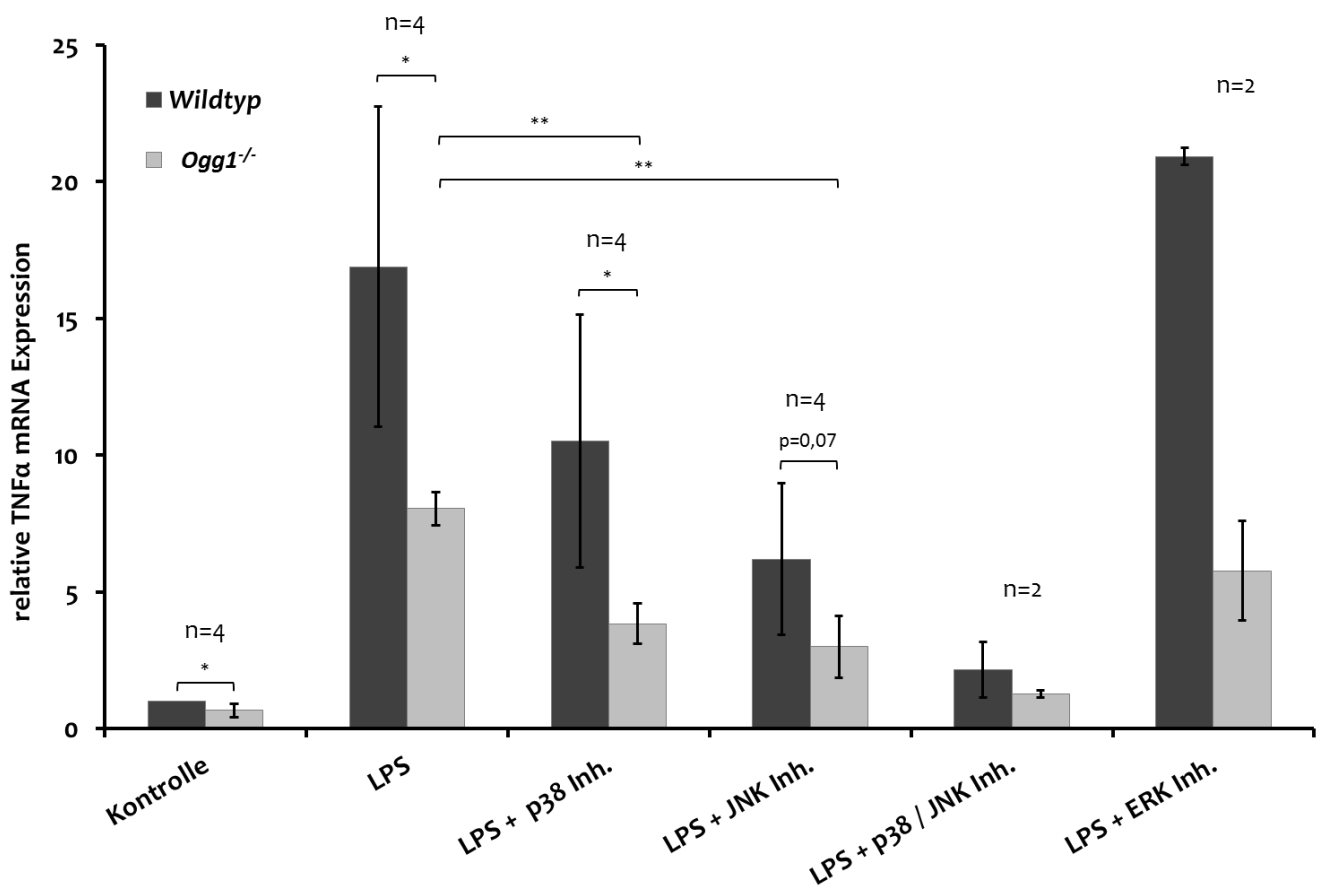


Abbildung 4.12: Einfluss der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK auf die LPS induzierte TNF- α Expression. Relative TNF- α mRNA Expression über der Expression von β -Actin nach Inkubation der Milzzellen von Wildtyp- und Ogg1^{-/-}-Mäusen für 1 h mit 10 ng/mL LPS unter Inhibition von p38, JNK und ERK. Die Milzzellen wurden mit Inhibitoren für 1 h bei 37 °C im Brutschrank vorinkubiert. (p38: PD169316, 10 μ M; JNK: SP600125, 30 μ M; ERK: U-0126, 10 μ M). Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Wildtyp-Probe. 0,1 % DMSO unter allen Bedingungen. MW $\pm$ SD.

4.1.9 Einfluss einer APE1-Inhibition auf die Zytokin-Expression in Maus-Zellen

Wie bereits unter Kapitel 1.4.3 beschrieben, stellt APE1 ein Schlüsselenzym in der Basenexzisionsreparatur und somit der Reparatur oxidativer DNA-Schäden dar. An dieser Stelle stellt sich die Frage, ob neben OGG1 auch APE1 an der Regulation der LPS induzierten TNF- α Transkription durch Inzision der zuvor von OGG1 prozessierten Stelle im regulatorischen Bereich des TNF- α Gens beteiligt ist. In den folgenden Versuchen wurde dieses Enzym durch CRT0044786 inhibiert. Diese Verbindung ist als Inhibitor der AP Endonuklease-, 3'-Phosphodiesterase- und der 3'-Phosphatase-Aktivität von APE1 beschrieben (Madhusudan et al. 2005).

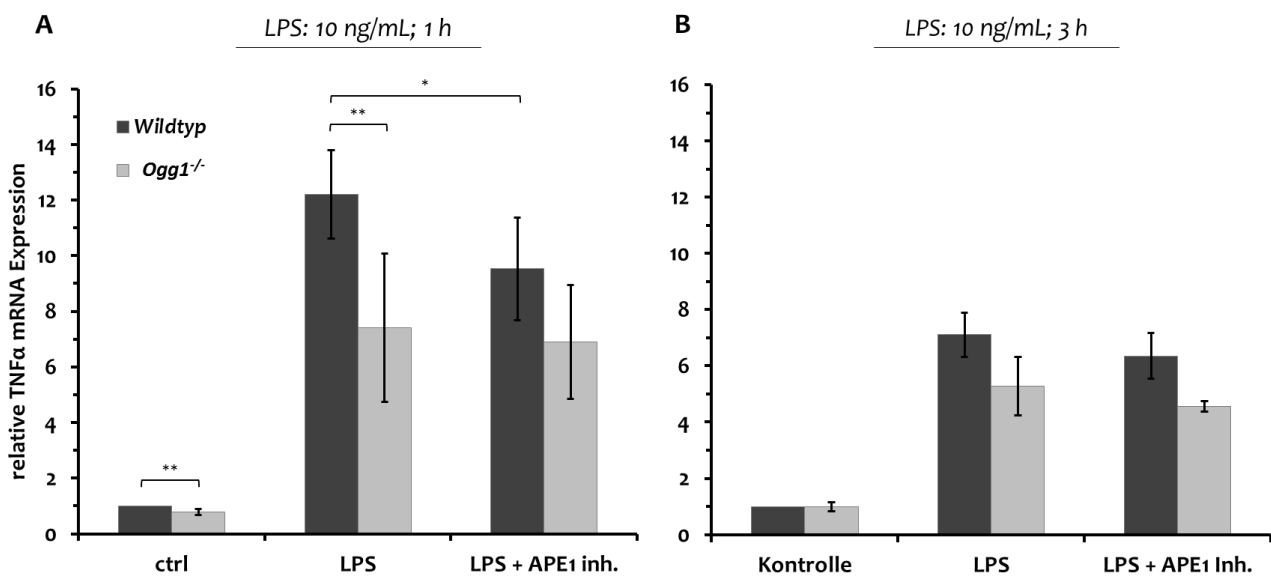


Abbildung 4.13: Einfluss von APE1 auf die LPS induzierte TNF- α Expression. Relative TNF- α mRNA Expression über der Expression von β -Actin nach Inkubation der Milzzellen von Wildtyp- und Ogg1^{-/-}-Mäusen für (A, n=5) 1 h und (B, n=2) 3 h mit 10 ng/mL LPS bei 37 °C unter Inhibition der Endonukleasefunktion von APE1 durch den Inhibitor CRT0044876. Hierfür wurden die isolierten Zellen zuvor für 1 h mit 200 μ M des Inhibitors vorinkubiert. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Wildtyp-Probe. 0,05 % DMSO unter allen Bedingungen. MW $\pm$ SD.

Abbildung 4.13A zeigt die relative mRNA Expression von TNF- α nach Vorinkubation mit dem APE1-Inhibitor CRT0044876 und Inkubation mit 10 ng/mL LPS für 1 Stunde. Wie zuvor bereits beobachtet (Abbildung 4.3) ist der Induktionsfaktor der Expression nach LPS Behandlung bei OGG1 Defizienz von $12,2 \pm 1,6$ auf $9,5 \pm 1,8$ signifikant reduziert. Durch Vorinkubation mit dem APE1-Inhibitor wird die Expression in den Wildtypzellen um ca. 25 % reduziert, während sie in den OGG1 defizienten Zellen nahezu konstant bleibt. Im Falle der längeren LPS-Inkubationszeit von 3 Stunden (Abbildung 4.13B) ist der Einfluss des APE1-Inhibitors allerdings weder in den OGG1 defizienten, noch in den profizienten Zellen festzustellen.

Zusammengefasst bleibt festzuhalten, dass auch APE1 an der Regulation der Genexpression von TNF- α nach kurzer Inkubationszeit beteiligt ist. Diese Regulation ist weiterhin abhängig von OGG1, wodurch eine Inhibition von APE1 in OGG1 defizienten Zellen keine Auswirkung auf den Induktionsfaktor der Genexpression hat. Dies liefert weitere Hinweise auf den Mechanismus wie die Genexpression durch OGG1 beeinflusst wird, wenngleich weiterführende Untersuchungen zum Effekt der APE1-Inhibition bzw. die Rolle von APE1 in der Genregulation, z.B. durch Messung der TNF- α Expression auf Proteinebene, noch ausstehen.

4.1.10 Einfluss einer 8-oxoGua Vorbehandlung auf die Zytokin Expression in Maus-Zellen

In den bisher vorgestellten Modellen, wie OGG1 in die Regulation der Genexpression eingreift, fungiert OGG1 wie auch in der Basenexzisionsreparatur als Sensor von 8-oxoG-Läsionen und erleichtert daraufhin durch die nachgeschalteten Prozesse (z.B. Inzision durch APE1) die Transkription. Boldogh et al. postulierten in ihren Arbeiten mit Lungenzellen einen alternativen Signalweg, bei welchem die durch OGG1 ausgeschnittene, nun freie Base (8-oxoGua) an OGG1 zurückbindet, und OGG1 so als Guanin-Austauschfaktor (GEF) fungiert (Boldogh et al. 2012). Als GEF interagiert OGG1 mit Proteinen der Ras-GTPasen Familie und katalysiert den Austausch von GDP mit GTP, wodurch diese aktiviert werden. Ras aktiviert daraufhin seinerseits die ERK1/2 Signalkaskade und die nachgeschaltete Genexpression.

Zur Überprüfung, ob ein solcher Mechanismus auch der in dieser Arbeit beobachteten Immundefizienz OGG1 defizienter Mäuse zugrunde liegt, wurden Milzzellen beider Genotypen bei einer Konzentration mit 1 μ M 8-oxoGua für eine Stunde vorbehandelt und anschließend die Genexpression von TNF- α durch einen Stimulus von 2,5 ng/mL LPS für eine weitere Stunde induziert (Abbildung 4.14). Dieser LPS Stimulus löst nicht die maximale Expression von TNF- α aus, welche daher im Falle einer Vorinkubation mit 8-oxoGua und damit einer Aktivierung von Ras noch gesteigert werden könnte. Wie Abbildung 4.14 zu entnehmen ist, steigt die Expression von TNF- α nach LPS-Behandlung in den OGG1 profizienten Zellen auf einen Induktionsfaktor von $5,6 \pm 0,3$, was ca. 40 % des maximalen Effektes einer LPS Behandlung entspricht. In den OGG1 defizienten Zellen steigt die Expression hingegen nur auf einen Induktionsfaktor von $4,7 \pm 1,4$. Alleinige Vorinkubation mit 8-oxoGua hat zunächst weder in Wildtyp, noch in OGG1 defizienten Zellen Einfluss auf die basalen Spiegel der TNF- α Expression (Daten nicht gezeigt). Auch auf die LPS induzierte Genexpression zeigt eine Vorinkubation mit 8-oxoGua in keiner der beiden Genotypen einen Effekt. Aufgrund der kleinen Wiederholungszahl der Versuche wurden keine Berechnungen zur Signifikanz der Datenreihen durchgeführt. Der von Boldogh postulierte Mechanismus konnte für das hier untersuchte System mit Milzzellen somit nicht bestätigt werden.

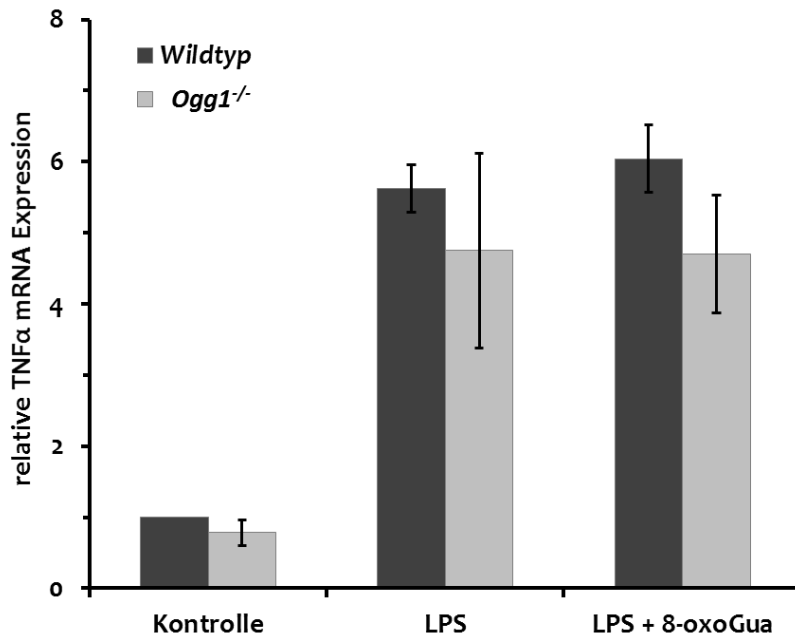


Abbildung 4.14: Einfluss einer 8oxoGua Vorbehandlung auf die LPS induzierte TNF- α Expression. Relative TNF- α mRNA Expression über der Expression von β -Actin nach Inkubation der Milzzellen von *Wildtyp*- und *Ogg1*^{-/-}-Mäusen mit 2,5 ng/mL LPS für 1 h bei 37 °C. Zuvor wurden die Zellen bei einer Konzentration von 1 μ M mit 8-oxoGua für 1 h vorbehandelt. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte *Wildtyp*-Probe. MW $\pm$ SD.

4.2 Humane Zelllinie: HeLa

Zusätzlich zu dem Modell der LPS behandelten Maus-Milzzellen wurde auch ein Modell mit einer humanen Zelllinie etabliert. Die hierfür verwendeten HeLa-Zellen wurden von Dr. Andriy Khobta zur Verfügung gestellt und enthielten einen stabilen shRNA Knockdown von OGG1 (Allgayer et al. 2013).

4.2.1 Verifizierung des OGG1 Knockdowns durch Westernblot und qPCR

Die stabil transfizierten Zellen wurden zunächst auf ihren OGG1 Gehalt getestet (Abbildung 4.15).

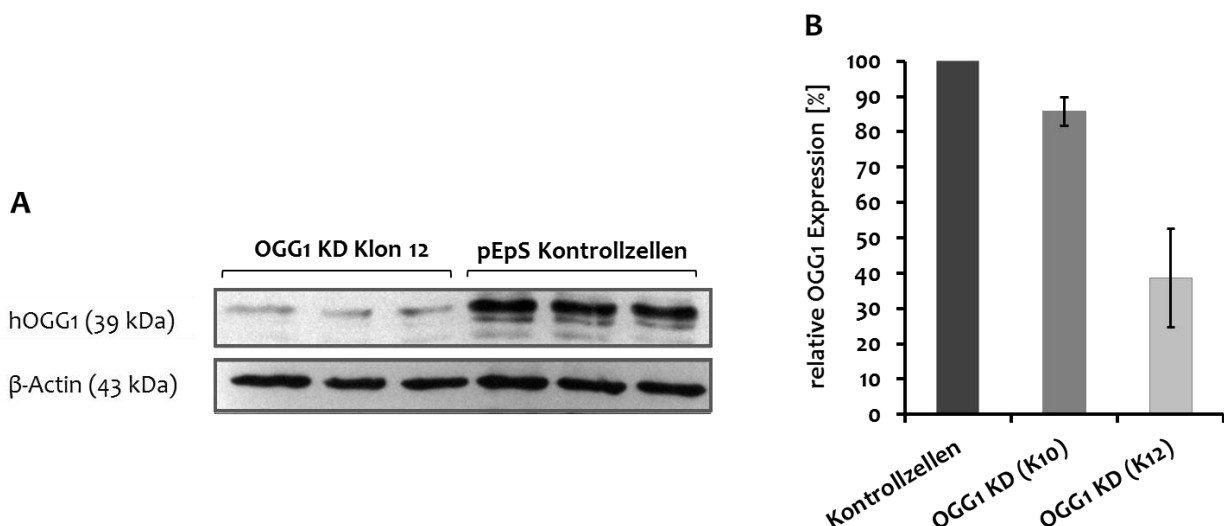


Abbildung 4.15: Verifizierung des OGG1 Knockdowns mittels Western Blot und qPCR. Protein (A) und mRNA (B, n=3) von OGG1 wurden durch Western Blot beziehungsweise quantitativer PCR in Kontrollzellen sowie OGG1 KD Klon 10 und 12 nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde β-Actin gewählt (A), als Referenzgen die Expression von 18S (B). Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontroll-Probe. MW ± SD.

Im Western Blot ist deutlich zu erkennen, dass die Protein-Expression von OGG1 in den Zellen des Klon 12 im Vergleich zu den leer-transfizierten Kontrollzellen deutlich verringert ist (Abbildung 4.15A). Als Ladekontrolle wurde β-Actin verwendet und die Expression in Triplikaten gemessen. Zur Quantifizierung des OGG1 Knockdowns wurde zusätzlich ein weiterer Klon (K10) verwendet und die relative mRNA Expression von OGG1 über 18S gemessen (Abbildung 4.15B). Der Knockdown von OGG1 beträgt im Klon 12 ca. 65 %. Dieser wurde für die weiteren Genexpressionsanalysen verwendet. Zur Vereinfachung wird dieser Klon in den folgenden Abschnitten nur noch als OGG1 KD bezeichnet. Zum Vergleich wurde jeweils ein mit pENTR/pSuper+ leer-transfizierter Klon verwendet der im Folgenden nur noch als Kontrollzelle bezeichnet wird.

4.2.2 Zytokin Expression in HeLa Zellen nach TNF- α Behandlung

Für ex-vivo Milzzellen konnte bereits gezeigt werden, dass Zellen mit fehlendem OGG1 weniger stark auf eine LPS Behandlung reagieren als *Wildtyp* Zellen. Um herauszufinden, ob dieser Befund auch auf andere Zellarten übertragbar ist und die dieser Immundefizienz zugrundeliegenden Mechanismen genauer zu untersuchen, wurden im Folgenden HeLa Zellen verwendet. Die Behandlung erfolgte mit TNF- α , da HeLa Zellen nur eine schwache Genexpression nach LPS-Behandlung zeigten (Daten nicht gezeigt). Der über den TNF- α -Rezeptor aktivierte Signaltransduktionsweg unterscheidet sich zwar vom TLR4 abhängigen Signalweg, allerdings steht auch an dessen Ende eine unter anderem durch die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 induzierte Transkription proinflammatorischer Zytokine.

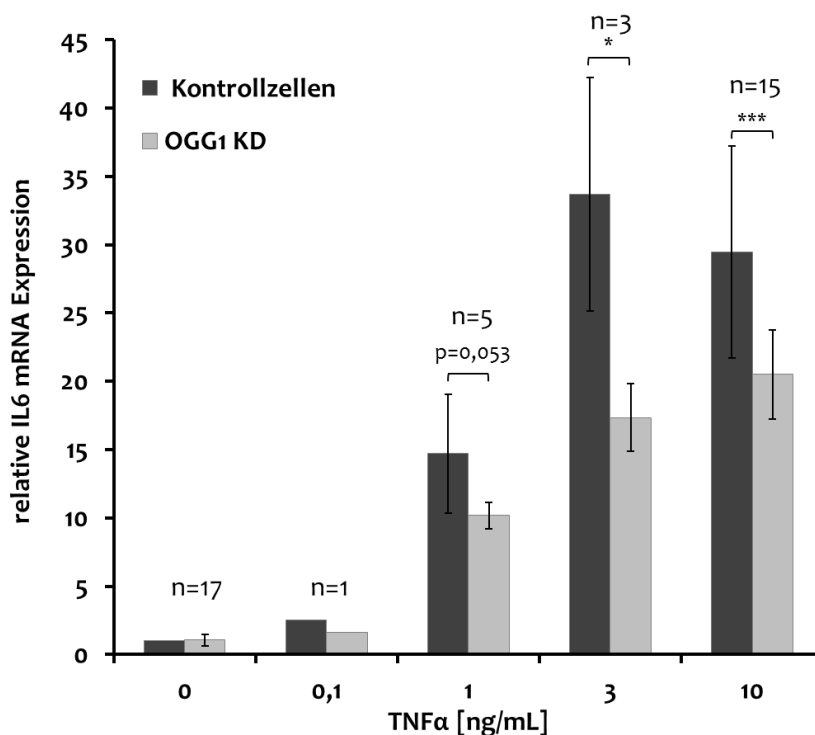


Abbildung 4.16: Konzentrationsabhängige Expression von Interleukin 6 in HeLa Zellen. relative mRNA Expression von IL6 über der Expression von 18S in HeLa Zellen nach Behandlung mit TNF- α in den angegebenen Konzentrationen für 1 h bei 37 °C. Die Ergebnisse aller Versuche wurden für diese Abbildung zusammengefasst. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontroll-Probe. MW $\pm$ SD.

Zunächst galt es auch hier ein passendes Behandlungsschema sowie ein adäquates Zielgen zu etablieren. Bei der Suche nach einem passenden Zielgen dienten die Untersuchungen von Zhou et al. (2003). Die Autoren beschrieben mit Interleukin 6 ein Gen, dessen Transkription bereits 30 min nach TNF- α -Behandlung erhöht ist. Außerdem befinden sich in der Promotorsequenz des IL6-Gens unter anderem Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1. Die Behandlungsdauer wurde aufgrund der Befunde von Iwasaki et al. (2011) auf eine Stunde festgelegt, welche zeigen konnten, dass die mRNA Expression

von IL6 nach TNF- α Behandlung schnell ansteigt und nach 1 Stunde ihr Maximum erreicht, bevor sie dann wiederum schnell abfällt.

In Abbildung 4.16 ist die relative IL6 mRNA Expression in Abhängigkeit der verwendeten TNF- α Konzentration aufgetragen. Im Gegensatz zu der relativen Expression von TNF- α in murinen Milzzellen sind die basalen Spiegel von Interleukin 6 in HeLa Zellen gleich. Nachdem mit einer Konzentration von 0,1 ng/mL nur eine sehr geringe Expressionsänderung festzustellen ist, steigt die Expression nach Erhöhung auf 1 ng/mL schnell auf einen Induktionsfaktor von $17,8 \pm 5,6$ in den Kontrollzellen, wobei die Expression in den OGG1 KD Zellen nur einen Induktionsfaktor von $10,0 \pm 1,3$ aufweist. Bei 3 ng/mL TNF- α erreicht die Expression ihr Maximum und steigt auch nach Erhöhung auf 10 ng/mL nicht weiter an. Auch bei diesen Konzentrationen bleibt die relative Expression in den OGG1 KD Zellen signifikant geringer als in den Kontrollzellen. Das Ergebnis dieses Versuchs zeigt somit, dass OGG1, ähnlich zur Regulation der Transkription von TNF- α in Milzzellen, auch an der Transkriptionsregulation des proinflammatorischen Zytokins IL6 nach TNF- α Behandlung von HeLa-Zellen beteiligt ist.

4.2.3 Einfluss einer LSD1-Inhibition auf die Zytokin-Expression in HeLa-Zellen

Nachdem somit gezeigt werden konnte, dass OGG1 auch im Zellkulturmodell ein Regulator der Transkription proinflammatorischer Zytokine ist, stellt sich nun die Frage, wie sich die Inhibition von LSD1 auf die Genexpression von IL6 in HeLa-Zellen auswirkt.

Daher wurden die Zellen zunächst für eine Stunde bei einer Konzentration von 50 μ M mit dem LSD1 Inhibitor OG-L002 vorinkubiert. Anschließend wurde die Genexpression mit 10 ng/mL TNF- α induziert und die RNA nach 1 Stunde isoliert. LSD1-Inhibition wirkt sich, im Gegensatz zu den Milzzellen, in beiden Genotypen auf die Genexpression aus: In den Kontrollzellen fällt die relative mRNA Expression von IL6 durch Inkubation mit OG-L002 um circa 40 % auf einen Induktionsfaktor von $19,2 \pm 4,5$. In OGG1 KD Zellen fällt die relative Expression auf einen Induktionsfaktor von $13,6 \pm 2,7$ was einer Reduktion von circa 39 % zur maximal beobachteten Expression in diesen Zellen entspricht. In beiden Genotypen ist dieser Rückgang statistisch signifikant. Der vormals signifikante Unterschied der IL6 Expression zwischen den Genotypen ist nun aber aufgehoben.

Das Ergebnis bedeutet, dass der Einfluss von LSD1 auf die TNF- α induzierte IL6 Expression in HeLa-Zellen weitestgehend auf einem OGG1 unabhängigen Weg erfolgt und die OGG1 abhängige Expression in diesem Modell nur einen geringen Anteil ausmacht. Der Einfluss von LSD1 auf die LPS induzierte TNF- α Expression in Milzzellen erfolgt hingegen ausschließlich auf einem OGG1-abhängigen Weg (Abbildung 4.11).

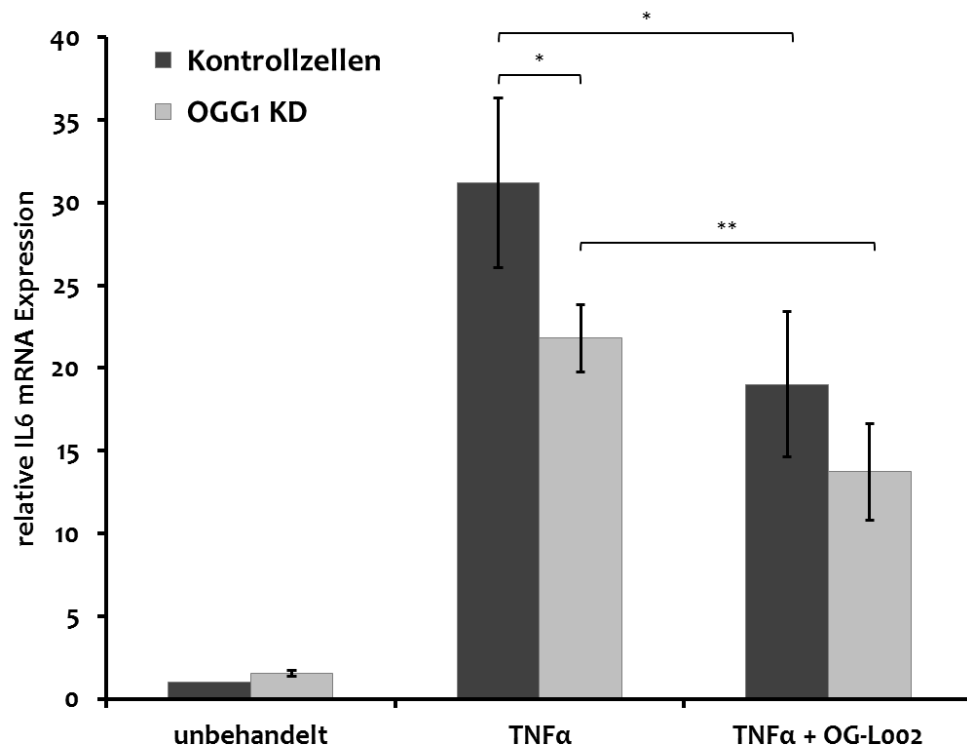


Abbildung 4.17: Einfluss des LSD1 Inhibitors OG-L002 auf die TNF- α induzierte IL6 Expression in HeLa Zellen. Relative mRNA Expression von IL6 über der Expression von 18S in HeLa Zellen nach Behandlung mit TNF- α (10 ng/mL, 1 h, 37 °C) unter Vorbehandlung mit dem LSD1-Inhibitoren OG-L002 bei einer Konzentration von 50 μ M für 1 h bei 37 °C. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontroll-Probe. 0,05 % DMSO unter allen Bedingungen. n=5. MW $\pm$ SD.

4.2.4 Einfluss von MAPK Inhibitoren auf die Zytokin-Expression in HeLa-Zellen

Die allgemeine Bedeutung der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK in der TNF- α induzierten Expression proinflammatorischer Gene durch den Transkriptionsfaktor AP-1 wurde bereits im theoretischen Teil erläutert (Kapitel 1.1.4). Nachdem in Milzzellen gezeigt werden konnte, dass p38 und JNK die LPS induzierte Transkription von TNF- α in einem OGG1 unabhängigen Weg regulieren und somit nicht für die Expressionsunterschiede zwischen den Mäusestämmen verantwortlich sind, stellt sich nun die Frage, welche Rolle diese MAPK in der TNF- α induzierten Expression von IL6 in HeLa Zellen spielen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen vor der TNF- α Behandlung zunächst mit den entsprechenden Inhibitoren für 1 Stunde vorinkubiert und nach Isolierung der RNA und cDNA Synthese die relative Genexpression in einer realtime qPCR gemessen.

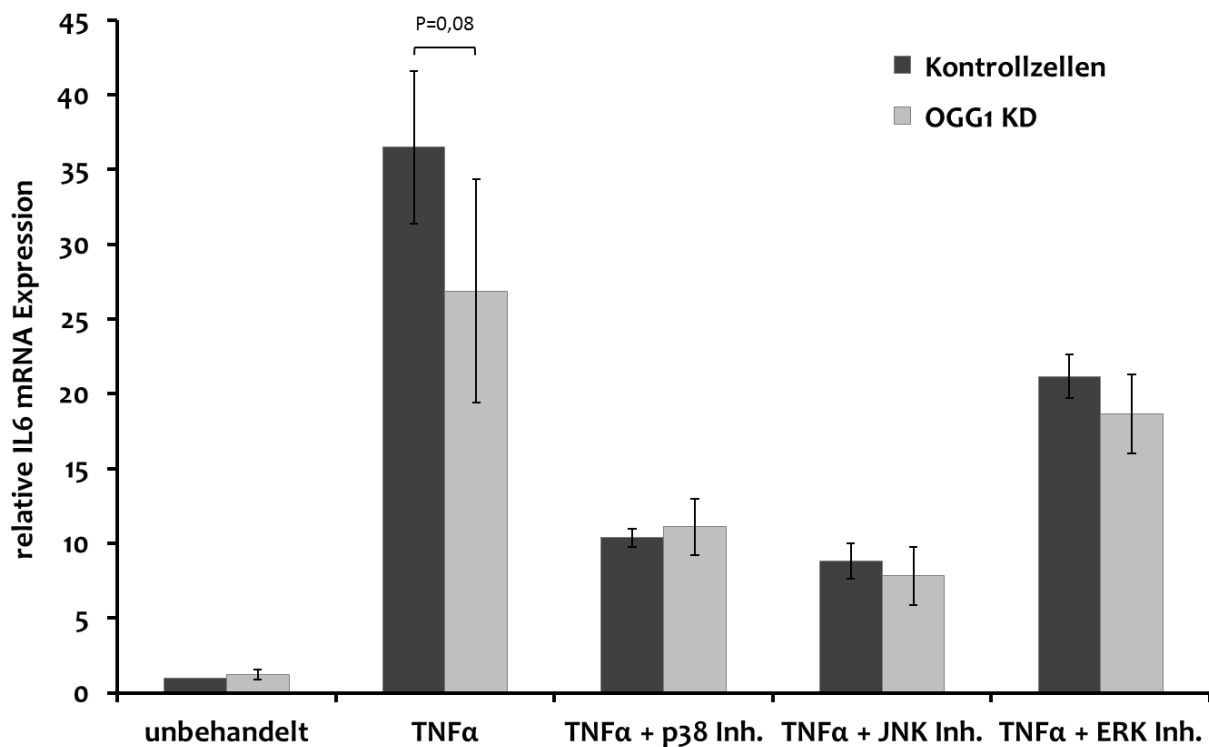


Abbildung 4.18: Einfluss der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK auf die TNF- α induzierte IL6 Expression in HeLa Zellen. Relative IL6 mRNA Expression über der Expression von 18S nach Inkubation von HeLa Zellen für 1 h mit 10 ng/mL TNF- α unter Inhibition von p38, JNK und ERK. Die Zellen wurden mit den Inhibitoren für 1 h bei 37 °C im Brutschrank vorinkubiert. (p38: PD169316, 10 μ M; JNK: SP600125, 30 μ M; ERK: U-0126, 10 μ M). Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontroll-Probe. 0,05 % DMSO unter allen Bedingungen. n=3. MW $\pm$ SD.

In Abbildung 4.18 ist zunächst wieder der Unterschied der IL6 Expression zwischen den Genotypen nach TNF- α Behandlung zu erkennen, welcher ca. 27 % der maximalen Expression in den Kontrollzellen entspricht. Auffällig und in völligem Gegensatz zu den Expressionsanalysen von TNF- α in murinen Milzzellen ist jedoch, dass nach Inhibition von sowohl p38, JNK als auch ERK die Unterschiede in der Expression vollständig aufgehoben werden. Durch p38 Inhibition sinkt die relative Expression in beiden Genotypen auf einen Induktionsfaktor von ca. 10,5, durch Inhibition von JNK auf ca. 8. Auch durch Inhibition von ERK sinkt die Expression sowohl in Kontrollzellen als auch in KD Zellen. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass sich die Inhibition der MAPK in Abhängigkeit der Präsenz von OGG1 unterschiedlich stark auf die Expression von IL6 auswirkt, was eine Interaktion der MAPK und/oder der durch die MAPK regulierten Transkriptionsfaktoren mit OGG1 in diesem Modell nahelegt.

Wie bereits erwähnt steht dies im Gegensatz zu den Expressionsanalysen in den murinen Milzzellen, in denen die MAPK vermittelte Transkription von TNF- α unabhängig von OGG1 verläuft. Dieser Punkt wird in Kapitel 5 weiter diskutiert.

4.2.5 Einfluss einer APE1-Inhibition auf die Zytokin Expression in HeLa-Zellen

In OGG1 profizienten Milzzellen wurde bereits beobachtet, dass eine Inhibition von APE1 zu einer verminderten Expression von TNF- α führt (siehe Abbildung 4.13). In den OGG1 defizienten Zellen war dieser Effekt allerdings nicht zu beobachten, was zu dem Schluss führt, dass APE1 nur im Zusammenspiel mit OGG1 an der Regulation der TNF- α Transkription beteiligt ist. Als nächstes galt es daher festzustellen, ob APE1 auch an der TNF- α induzierten IL6 Expression beteiligt ist. Hierfür wurden die HeLa Zellen zunächst für eine Stunde bei einer Konzentration von 200 μ M mit dem APE1 Inhibitor CRT0044876 vorinkubiert, anschließend mit 10 ng/mL TNF- α für eine Stunde behandelt und die Genexpression in einer realtime qPCR analysiert.

In den unbehandelten Zellen ist zunächst kein Unterschied in der basalen Expression von IL6 festzustellen. Auch nach APE1 Inhibition bleiben die basalen Spiegel nahezu konstant. Nach Induktion der IL6 Expression durch TNF- α Behandlung steigt diese stark an, und erneut ist ein Unterschied von ca. 29% zwischen den Genotypen zu erkennen. Allerdings verändern sich die relativen Expressionswerte auch nach gleichzeitiger Inhibition von APE1 in beiden Genotypen nicht. Im Unterschied zu den Ergebnissen in den Milzzellen bedeutet dies, dass der in Abwesenheit von OGG1 beobachtete Unterschied in der relativen IL6 Expression somit unabhängig von APE1 ist. Die sich daraus ergebende Hypothese, wie OGG1 in die Regulation der Transkription von IL6 in HeLa-Zellen eingreift, wird in Kapitel 5 diskutiert.

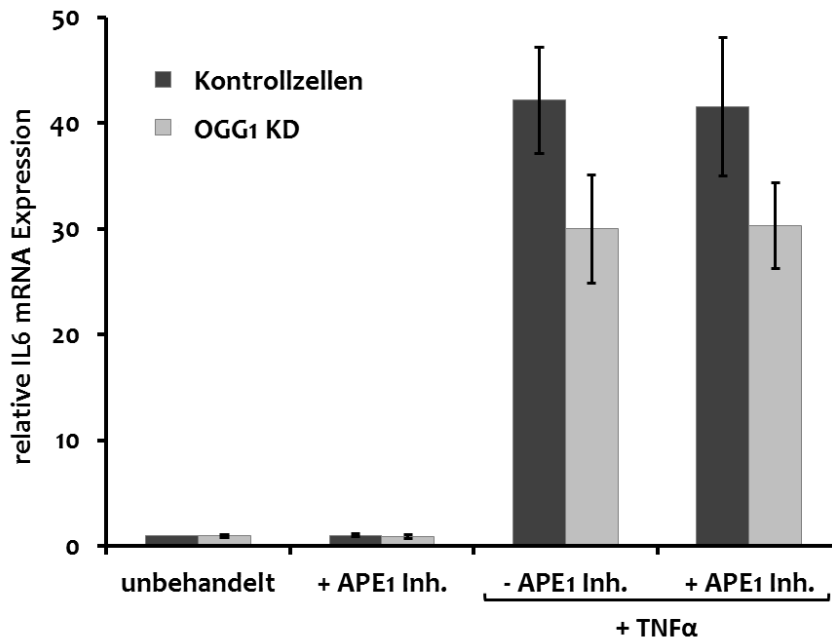


Abbildung 4.19: Einfluss von APE1 auf die TNF- α induzierte IL6 Expression in HeLa Zellen. Relative IL6 mRNA Expression über der Expression von 18S nach Inkubation von HeLa Zellen für 1 h mit 10 ng/mL TNF- α unter Inhibition der Endonukleasefunktion von APE1 durch den Inhibitor CRT0044876. Hierfür wurden die Zellen zuvor für 1 h bei 200 μ M des Inhibitors bei 37 °C vorinkubiert. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontroll-Probe. 0,05 % DMSO unter allen Bedingungen. MW $\pm$ SD.

4.2.6 Einfluss einer 8oxoGua Vorbehandlung auf die Zytokin Expression in HeLa-Zellen

In Kapitel 4.1.10 wurde bereits ein LSD1 unabhängiger Mechanismus zur Regulierung der Genexpression erwähnt, bei welchem die freie 8-oxoGua Base an OGG1 zurückbindet und OGG1 somit als Guanin-Austauschfaktor fungiert. Zwar konnte in Milzzellen kein Effekt von exogen zugeführtem 8-oxoGua festgestellt werden (Abbildung 4.14), nichts desto weniger galt es als nächstes diesen möglichen Effekt auch in HeLa-Zellen zu überprüfen. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit 8-oxoGua bei einer Konzentration von 1 μ M für eine Stunde bei 37 °C vorinkubiert und anschließend die IL6 Expression mit einer niedrigen TNF- α Konzentration induziert (Abbildung 4.20). Hierdurch wird nicht die maximale Genexpression erreicht, welche somit durch 8-oxoGua bzw. eine gesteigerte Ras Aktivität noch erhöht werden könnte.

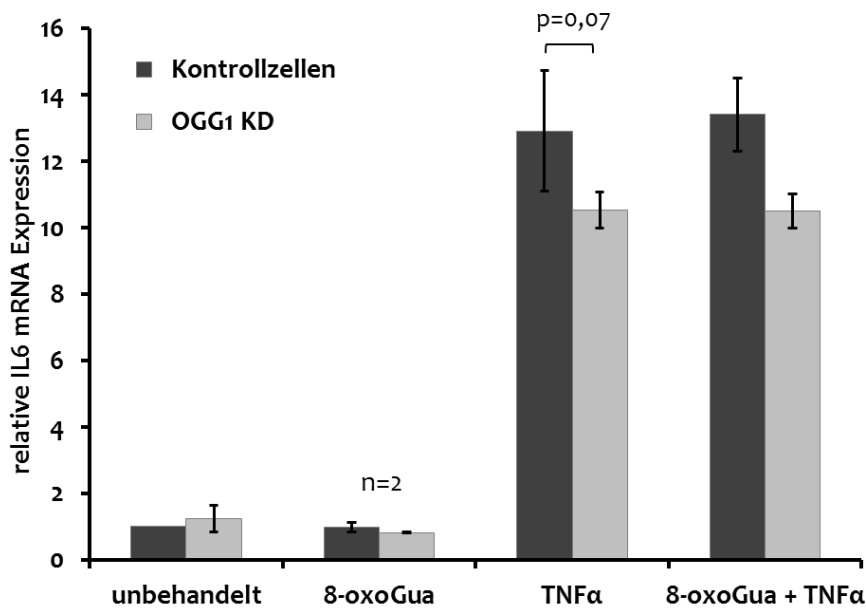


Abbildung 4.20: Einfluss einer 8-oxoGua Vorbehandlung auf die TNF- α induzierte IL6 Expression in HeLa Zellen. Relative IL6 mRNA Expression über der Expression von 18S nach Inkubation von HeLa Zellen für 1 h mit 1 ng/mL TNF- α nach Vorinkubation mit 8-oxoGua bei einer Konzentration von 1 μ M für 1 h bei 37 °C im Brutschrank (n=4). Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontroll-Probe. MW $\pm$ SD.

Durch alleinige 8-oxoGua-Vorinkubation ohne nachfolgende Stimulation mit TNF- α ändert sich die basale Expression von IL6 zunächst nicht. Auch bei einer Stimulation mit 1 ng/mL TNF- α ist der Unterschied der relativen IL6 Expression zwischen Kontrollzellen und OGG1 defizienten Zellen zu beobachten. In beiden Genotypen wird durch Vorinkubation mit 8-oxoGua jedoch keine Expressionssteigerung erreicht. Somit konnte durch eine Vorinkubation mit 8-oxoGua weder in Milzzellen, noch in HeLa-Zellen eine Steigerung der Transkription proinflammatorischer Gene festgestellt werden.

4.2.7 Steady-state Level der oxidativen Läsionen in HeLa Zellen

In Kapitel 1.1 wurde bereits ein Modell vorgestellt, in welchem im Zuge der Demethylierung von H3K9 durch LSD1 Wasserstoffperoxid als Nebenprodukt anfällt, welches wiederum gezielt 8-oxoG Läsionen in der Promotor-Sequenz Estrogen-responsiver Gene erzeugt. Um zu untersuchen, ob nach TNF- α Behandlung 8-oxoG Läsionen in der Promoter-Sequenz des IL6 Gens entstehen und dieser Mechanismus somit zumindest teilweise für den beobachteten Unterschied in der IL6 Expression zwischen Kontroll- und OGG1-KD-Zellen verantwortlich ist, wurden zunächst die globalen Spiegel der Einzelstrangbrüche und FPG-sensitiven Läsion vor und nach TNF- α Behandlung gemessen. FPG ist das bakterielle, funktio-

nelle Analogon zu OGG1 und erkennt als solches neben 8-oxoG und FapyG auch AP-Läsionen (Radicella et al. 1997) und wird daher in der Alkalischen Elution zur Detektion oxidativer DNA-Schäden verwendet.

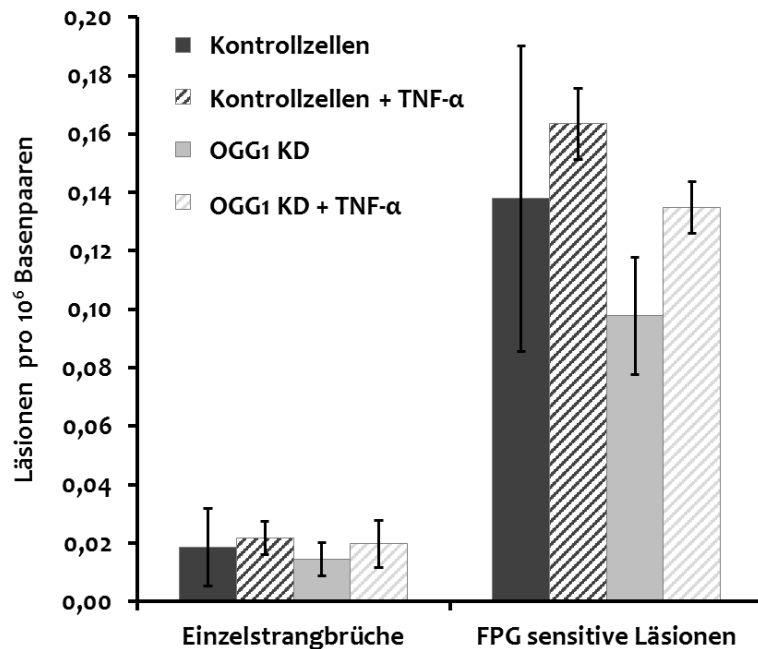


Abbildung 4.21: Quantifizierung von Einzelstrangbrüchen und FPG-sensitiven Läsionen in HeLa-Zellen. Kontroll- und OGG1 KD-Zellen wurden unbehandelt oder nach TNF-α Behandlung bei einer Konzentration von 10 ng/mL über eine Stunde bei 37 °C auf Einzelstrangbrüche und FPG-sensitive Läsionen mittels Alkalischer Elution untersucht (n=4). MW ± SD.

In Abbildung 4.21 sind jeweils die basalen sowie die durch TNF-α Behandlung induzierten Einzelstrangbrüche und FPG-sensitiven Läsionen in Kontroll- und OGG1 KD-Zellen als Läsion pro 10⁶ Basenpaaren aufgetragen. Die Ergebnisse zeigen, dass sich die basalen Spiegel der Einzelstrangbrüche und oxidativen Läsionen zwischen beiden Genotypen nicht unterscheiden. Auch nach Behandlung mit TNF-α werden in keinem der beiden Genotypen weitere Läsionen in einem Ausmaß induziert, der durch die angewandte Methode zu detektieren wäre.

4.2.8 Nachweis oxidativer Läsionen in der Promoter-Region des IL6 Gens

In Abbildung 4.21 konnte somit gezeigt werden, dass der basale Spiegel oxidativer Läsionen durch Behandlung mit TNF- α nicht ansteigt. Zur Überprüfung des vorgeschlagenen Mechanismus der OGG1 modulierten Genexpression galt es als nächstes, 8-oxoG Läsionen nachzuweisen, welche im Zuge der Demethylierung von H₃K₉ in der Promotorsequenz von IL6 entstehen. Aufgrund ihrer Beschränkung auf einige Promotorregionen liegt die Quantität dieser Läsionen unterhalb der Nachweisgrenze der Alkalischen Elution. Zur Detektion dieser Läsionen wurde daher die in Kapitel 3.9 vorgestellte Methode angewendet. Dabei werden oxidative Läsionen indirekt durch eine verminderte Effizienz der Amplifikation eines Einzelstrangbruch enthaltenden Templates mittels quantitativer realtime PCR detektiert. Die Primer für das Zielgen IL6 wurden zunächst wie in Kapitel 3.10 beschrieben um eine bekannte NF- κ B Bindungssequenz konstruiert. Als Referenz-Sequenz wurde ein Abschnitt innerhalb eines Introns im IL6 Gen verwendet für welches ebenfalls passende Primer konstruiert wurden. Da oxidative Läsionen an sich nicht die Progression der RNA- und DNA-Polymerase inhibieren (Kathe et al. 2004, Tolentino et al. 2008), wurde die isolierte genomische DNA zunächst einem FPG-Cleavage unterzogen, durch welchen 8-oxoG-Läsionen in Einzelstrangbrüche überführt werden. Für den indirekten Nachweis wurde nach der qPCR zunächst die relative Amplifikation der NF- κ B Bindungssequenz gegenüber der Referenz-Sequenz als Korrektur für Variationen der eingesetzten DNA-Menge errechnet und anschließend der Quotient der relativen Expression der FPG-verdauten mit der jeweils korrespondierenden unverdauten Probe errechnet. Einzelstrangbrüche hingegen können aufgrund dieser Rechenoperation nicht nachgewiesen werden.

In Abbildung 4.22A sind die Quotienten der relativen Expression des Exon der +FPG und – FPG Proben in unbehandelten und TNF- α behandelten Zellen aufgetragen. In den Kontrollzellen beträgt der Quotient zunächst $0,94 \pm 0,06$ und fällt nach Behandlung mit TNF- α auf einen Wert von $0,84 \pm 0,08$ ($p=0,06$). Auch in den OGG1 KD Zellen liegt der Quotient zunächst bei $1,02 \pm 0,1$ in den unbehandelten Zellen und fällt mit der Behandlung auf einen Wert von $0,92 \pm 0,1$ ab ($p=0,07$). Das bedeutet, dass in beiden Genotypen nach der Behandlung mit TNF- α FPG-sensitive Läsionen in der zuamplifizierenden Exon-Sequenz generiert wurden. In Kapitel 1.6 wurde bereits beschrieben, wie durch LSD1-generierte oxidative Läsionen in der Promotor-Sequenz eines Gens dessen Transkription nach Rekrutierung von OGG1 moduliert wird. Um zu überprüfen, ob die detektierten FPG-sensitiven Läsionen auch in diesem Modell durch die Aktivität von LSD1 entstehen, wurden die Kontroll-Zellen zusätzlich zur TNF- α Behandlung zuvor noch mit dem LSD1 Inhibitor OG-Lo02 vorinkubiert. In Abbildung 4.22B ist zu erkennen, dass der durch TNF- α Behandlung induzierte Effekt auf den Quotienten durch Inhibierung von LSD1 vollständig aufgehoben wird und wieder bei $0,97 \pm 0,04$ liegt.

Das bedeutet, dass die detektierten FPG-sensitiven Läsionen in der Tat durch LSD1 generiert wurden. Aufgrund der durch die Methode bedingten minimalen Änderungen im Quotienten und der kleinen Versuchszahl sind die beschriebenen Effekte allerdings nicht statistisch signifikant ($p=0,07$).

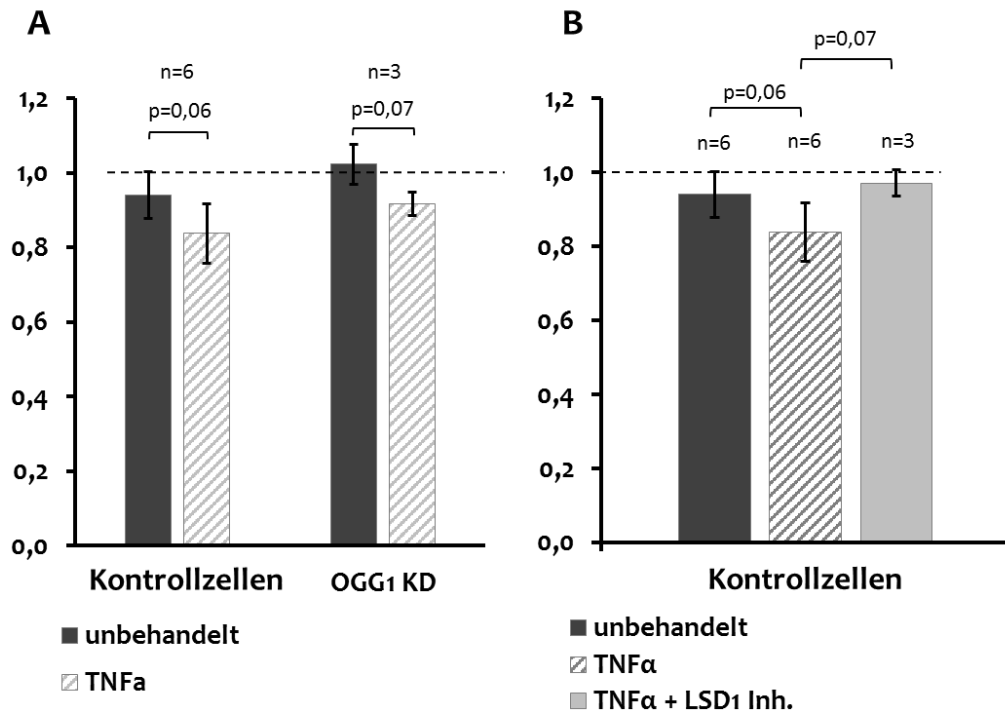


Abbildung 4.22: Detektion FPG-sensitiver Läsionen in der Promotorsequenz von IL6. (A) Die DNA unbehandelter und TNF- α behandelter (10 ng/mL, 1 h) Kontroll- und OGG1 KD-Zellen wurden zunächst mit dem QIAamp® DNA mini kit isoliert und anschließender mit FPG inkubiert. In (B) wurden die Kontroll-Zellen zusätzlich zur TNF- α Behandlung (s.o.) mit dem LSD1 Inhibitor OG-L002 (50 μ M) für eine Stunde vorinkubiert. Anschließend wurde in einer realtime qPCR die „relative Expression“ der Exon- über der Intron-Sequenz errechnet. Zur Berechnung FPG-sensitiver Läsionen werden die Daten als $[\text{Exon/Intron (+Fpg)}] / [\text{Exon/Intron (-Fpg)}]$ angegeben. (Die Daten der Versuchsreihen zur Erstellung der Abb. A und B wurden zusammengefasst und sind daher in den Kontroll-Zellen identisch). MW $\pm$ SD.

4.3 Mauszelllinie: J774.2

In Kapitel 4.1.5 konnte gezeigt werden, dass Makrophagen die Hauptproduzenten von TNF- α nach LPS Behandlung sind, jedoch nur einen geringen Bruchteil der Milzzellen ausmachen. An einer Makrophagenzelllinie wurden daher weiterführende mechanistische Untersuchungen durchgeführt. Für diese Versuche wurde die murine Makrophagenzelllinie J774.2 verwendet*.

4.3.1 Konzentrations- und Zeitabhängige TNF- α Expression

Wie für die Milzzellen, wurden auch für die Zelllinie zunächst anhand einer Konzentrations- und Zeitreihe die optimalen Inkubationsbedingungen ermittelt. In Abbildung 4.23A ist die relative TNF- α mRNA Expression über der Expression von β -Actin für einen Konzentrationsbereich bis 100 ng/mL aufgetragen, wobei die Zellen jeweils für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert wurden. Nach Inkubation mit 10 ng/mL LPS steigt die Expression auf einen Induktionsfaktor von 3,7 und erreicht danach ab einer Konzentration von 50 ng/mL ein Plateau bei einem Induktionsfaktor von circa 8,0, welcher auch nach Erhöhung der Konzentration nicht weiter steigt. Für die weiteren Versuche wurde die Konzentration auf 20 ng/mL festgelegt, da hier die maximale Expression noch nicht erreicht ist.

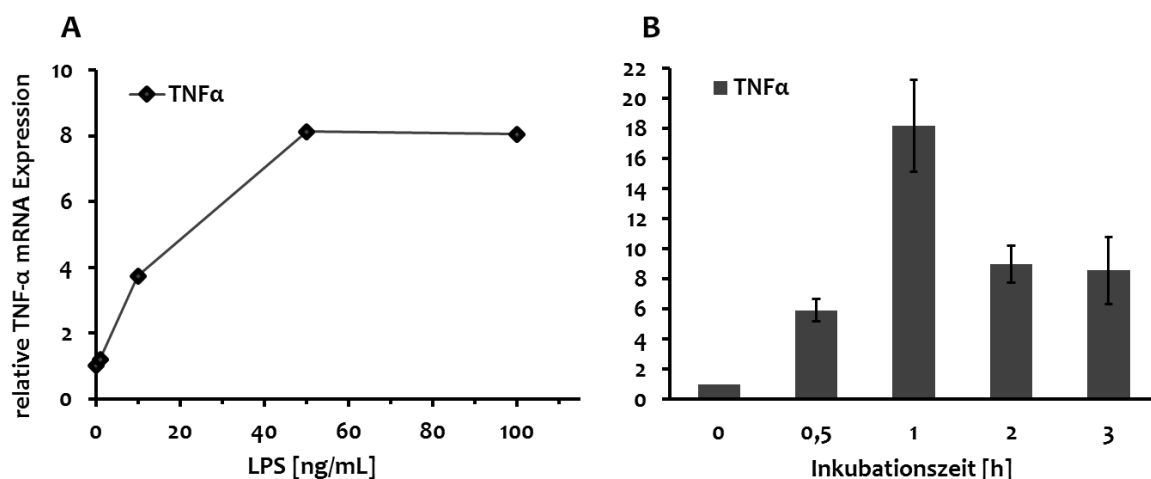


Abbildung 4.23: Konzentrations- und Zeitabhängige TNF- α mRNA Expression in J774.2 Zellen. Relative mRNA Expression von TNF- α über der Expression von β -Actin in J774.2 Zellen nach Behandlung mit LPS. (A, n=1) Behandlung der Zellen mit LPS bis zu einer Konzentration von 100 ng/mL für 30 min bei 37 °C. (B, n=3) Expression von TNF- α in Abhängigkeit der Inkubationszeit nach Inkubation mit 20 ng/mL LPS bei 37 °C. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Probe. MW $\pm$ SD.

* Die in Kapitel 4.3 gezeigten Experimente wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von P. Klingler unter meiner Anweisung durchgeführt.

Die zeitabhängige Expression von TNF- α nach Inkubation mit 20 ng/mL LPS ist in Abbildung 4.23B dargestellt. Dabei zeigt sich, dass die Expression nach 30 minütiger Inkubation noch nicht maximal ausgeprägt ist. Erst nach einer Inkubationszeit von 1 Stunde erreicht die TNF- α Expression ihr Maximum bei einem Induktionsfaktor von circa $18,2 \pm 3,1$. Längere Inkubation dagegen resultiert nicht in einer höheren Expression, vielmehr sinkt die Expression der TNF- α mRNA bereits wieder nach 2, respektive 3 Stunden Inkubationszeit. Für alle weiterführenden Versuche wurden die Versuchsbedingungen somit auf eine Konzentration von 20 ng/mL LPS und eine Inkubationszeit von 1 Stunde festgelegt.

4.3.2 Einfluss von LSD1-Inhibitoren auf die TNF- α Expression

Auf die Bedeutung der Lysin-spezifischen Demethylase 1 (LSD1) im Zusammenspiel mit OGG1 für die Transkription Estrogen-responsiver Gene wurde an anderer Stelle bereits näher eingegangen (siehe Kapitel 1.6). Da LSD1 eine Monoaminoxidase-Funktion besitzt, wurden als erste Inhibitoren für dieses Enzym bekannte MAO-Inhibitoren verwendet. Pargyline ist ein irreversibler MAO-B Inhibitor (Murphy et al. 1979) welcher heute auch als LSD1-Inhibitor Verwendung findet (Metzger et al. 2005). Der zweite getestete LSD1 Inhibitor OG-L002 wurde bereits in Kapitel 4.1.7 vorgestellt. Um die optimalen Konzentrationen der LSD1-Inhibitoren für die Experimente festzulegen, wurde die TNF- α mRNA Expression nach LPS Stimulation in J774.2 Zellen unter dem Einfluss unterschiedlicher Konzentration von OG-L002 und Pargyline bestimmt.

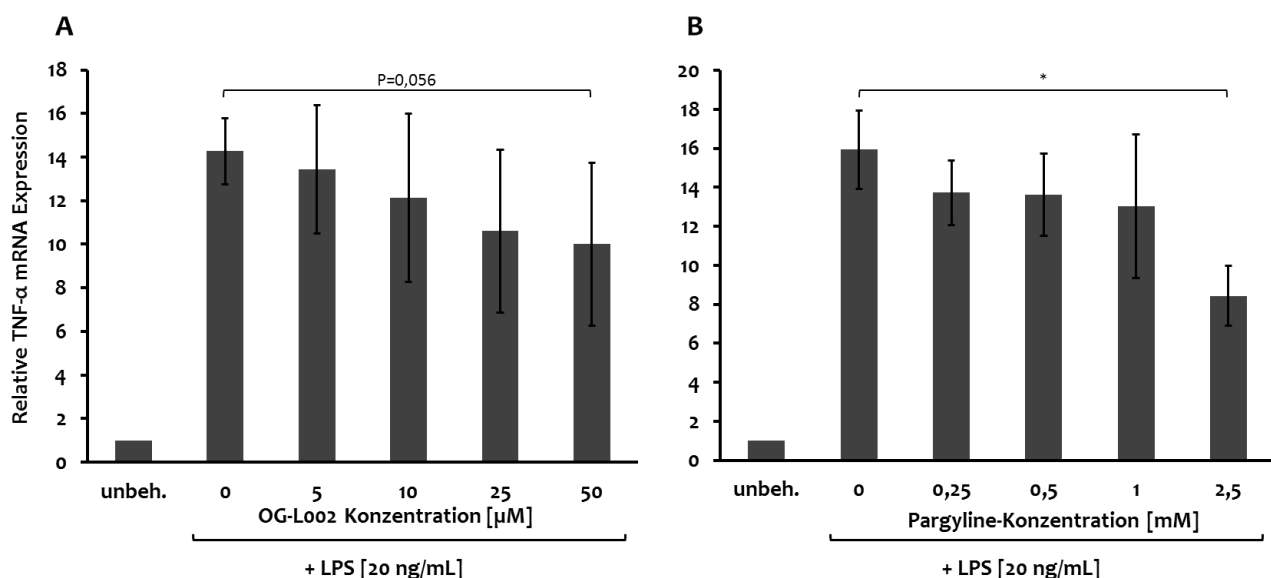


Abbildung 4.24: LSD1 abhängige Genexpression von TNF- α in J774.2 Zellen. Relative mRNA Expression von TNF- α über der Expression von β -Actin in J774.2 Zellen nach Behandlung mit LPS (20 ng/mL, 1 h, 37 °C) unter Vorbehandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen der LSD1-Inhibitoren OG-L002 (A, n=4) und Pargyline (B, n=3) für 1 h bei 37 °C. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Probe. Das eingesetzte Inkubationsmedium enthielt unter allen Bedingungen 0,05 % DMSO. MW $\pm$ SD.

Die maximal beobachtete Reduktion der LPS-induzierten TNF- α mRNA Expression durch Inhibition von LSD1 mit OG-L002 und Pargyline beträgt 33 % bzw. 47 %, wie in Abbildung 4.24 zu sehen ist. Die Expression von TNF- α in der Makrophagenzelllinie J774.2 wird durch Inhibition von LSD1 signifikant reduziert ($p=0,056$ bzw. $p=0,028$). Dieses Ergebnis bestätigt somit die bereits in Milz- und HeLa-Zellen vorgestellte Modulation der Zytokin-Expression durch LSD1.

4.3.3 Einfluss von MAPK-Inhibitoren auf die TNF- α Expression

Zusätzlich zu den Untersuchungen in primären Milzzellen (siehe Kapitel 4.1.8) wurde die Beteiligung der MAPK p38, JNK und ERK in der LPS induzierten Expression von TNF- α in der murinen Makrophagenzelllinie J774.2 analysiert. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit Inhibitoren der MAP-Kinasen vorinkubiert und die Expression von TNF- α anschließend durch LPS induziert.

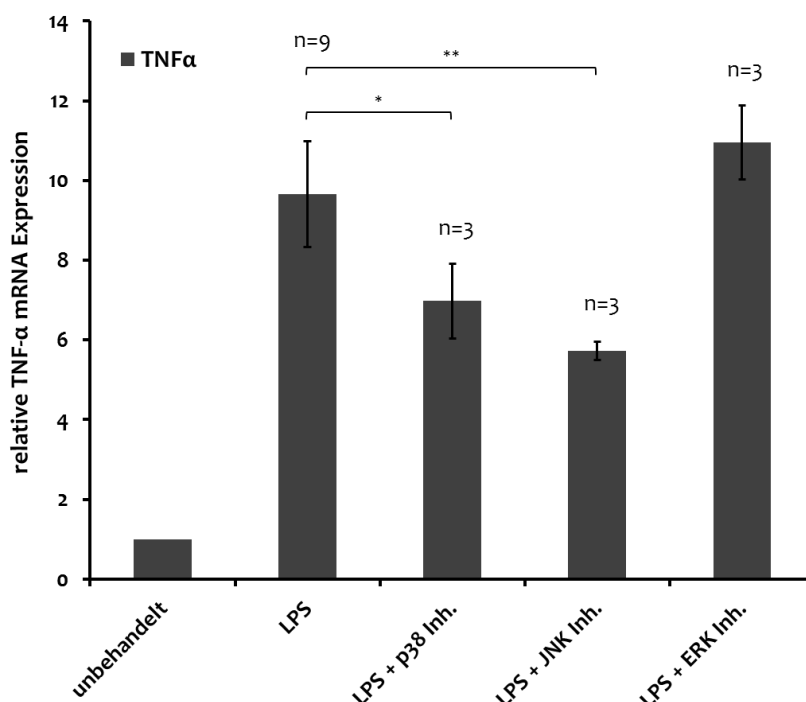


Abbildung 4.25: Einfluss der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK auf die LPS induzierte TNF- α Expression in J774.2 Zellen. Relative TNF- α mRNA Expression über der Expression von β -Actin nach Inkubation von J774.2 Zellen für 1 h mit 20 ng/mL LPS unter Inhibition von p38, JNK und ERK. Die Zellen wurden mit den Inhibitoren für 1 h bei 37 °C im Brutschrank vorinkubiert. (p38: PD169316, 10 μ M; JNK: SP600125, 30 μ M; ERK: U-0126, 10 μ M). Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Probe. Das eingesetzte Inkubationsmedium enthielt unter allen Bedingungen 0,1 % DMSO. MW $\pm$ SD.

Wie Abbildung 4.25 zu entnehmen ist, ist die relative mRNA Expression von TNF- α durch Inhibition von p38 und JNK signifikant verringert. Der ERK-Inhibitor U-0126 hat hingegen keinen Einfluss auf die Expression von TNF- α und der Induktionsfaktor bleibt nach Inhibition unverändert. Somit konnte die Beteiligung von p38 und JNK in der LPS induzierten mRNA Expression von TNF- α zunächst im ex-vivo Modell der Milzzellen gezeigt (siehe Kapitel 4.1.8), und anschließend in einem in-vitro Modell in J774.2 Zellen bestätigt werden.

4.3.4 Einfluss eines APE1-Redox-Inhibitor auf die TNF- α Expression

Die AP-Endonuklease-1 (APE1) wurde bereits als wichtiger Bestandteil der Basenexzisionsreparatur an erwähnt (siehe Kapitel 1.4.3). Zusätzlich dazu ist APE1 aber auch ein Redox-Signaling Faktor und hält als solcher Transkriptionsfaktoren in einem reduzierten und damit aktivierten Zustand. So stimuliert APE1 beispielsweise die DNA-Bindung von unter anderem NF- κ B, HIF1 α und CREB (Fishel, Kelley 2007). Um den Einfluss der Redox-Funktion von APE1 auf die LPS induzierte TNF- α Expression zu untersuchen, wurde der Inhibitor dieser Funktion E3330 zunächst in der Zelllinie J774.2 getestet.

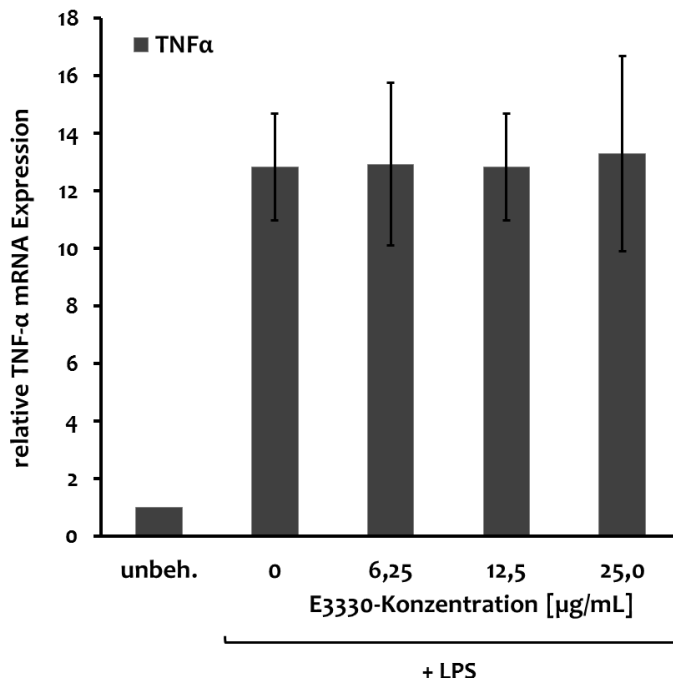


Abbildung 4.26: Einfluss der APE1-Redox-Funktion auf die LPS induzierte TNF- α Expression in J774.2 Zellen. Relative TNF- α mRNA Expression über der Expression von β -Actin nach Inkubation von J774.2 Zellen für 1 h mit 20 ng/mL LPS unter Inhibition der Redox-Funktion von APE1 durch den Inhibitor E3330. Die Zellen wurden mit dem Inhibitor für 1 h bei 37 °C im Brutschrank vorinkubiert. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Probe. Das eingesetzte Inkubationsmedium enthielt unter allen Bedingungen 0,1 % DMSO. n=3. MW $\pm$ SD

Wie in Abbildung 4.26 zu sehen ist, hat der Inhibitor der Redox-Funktion von APE1 (E3330) über den getesteten Konzentrationsbereich von 0 bis 25 μM keinen Einfluss auf die relative mRNA Expression von TNF- α . Obwohl NF- κB als Redox-sensitiver Transkriptionsfaktor beschrieben ist (Flohe et al. 1997) und sich auch in der Literatur Hinweise auf eine Transkriptionsregulation über die Redoxfunktion von APE1 finden (Cesaratto et al. 2013), scheint diese Funktion auf die Expression von TNF- α unter den getesteten Bedingungen keinen Einfluss zu haben.

4.3.5 Inhibition der TNF- α Expression durch Dexamethason

NF- κB wurde als wichtiger Transkriptionsfaktor für die Expression proinflammatorischer Gene nach LPS Behandlung bereits vorgestellt (siehe Kapitel 1.2.3) und stellt in der Behandlung vieler entzündlicher Erkrankungen ein wichtiges Target dar. So konnte gezeigt werden, dass Dexamethason die durch LPS induzierte Translokation von NF- κB in den Zellkern unter anderem durch direkte Interaktion mit dem Glucocorticoid-Rezeptor inhibiert (Barnes 1998). Darüber hinaus steigert Dexamethason die Expression des endogenen NF- κB Inhibitors I κB - α (Scheinman et al. 1995).

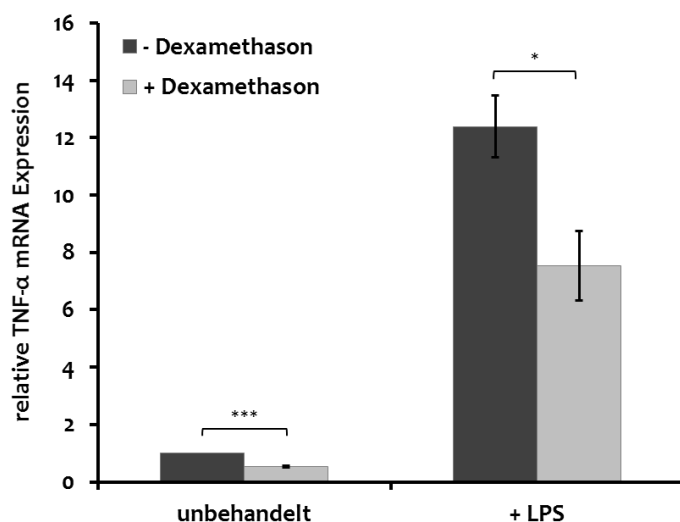


Abbildung 4.27: Einfluss von Dexamethason auf die LPS induzierte TNF- α Expression in J774.2 Zellen Relative TNF- α mRNA Expression über der Expression von β -Actin nach Inkubation von J774.2 Zellen für 1 h mit 20 ng/mL LPS unter Inhibition von NF- κB durch 2,5 μM Dexamethason. Die Zellen wurden mit Dexamethason für 0,5 h bei 37 °C im Brutschrank vorinkubiert. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Probe. n=3. MW $\pm$ SD.

Daher stellt sich die Frage, ob und in welchem Ausmaß die NF- κ B vermittelte Transkription von TNF- α in der Makrophagen Zelllinie J774.2 nach LPS Stimulation durch Dexamethason inhibiert werden kann. Wie in Abbildung 4.27 zu sehen ist, wird die LPS induzierte Expression durch einstündige Vorinkubation mit 2,5 μ M Dexamethason um circa 40 % reduziert. Dies ist im Einklang mit dem zuvor beschriebenen TLR4 Signalweg (siehe Kapitel 1.1.2), nach welchem durch LPS neben NF- κ B auch weitere Transkriptionsfaktoren aktiviert werden können, über welche die Expression von TNF- α weiterhin gesteuert wird.

5 Diskussion

5.1 Allgemeine Effekte des OGG1 Knockouts in Mäusen

In der Literatur gibt es eine Reihe von Publikationen, welche die Funktionen von OGG1 in der Basenexzisionsreparatur und die Folgen dessen Verlusts in Bezug auf die Akkumulation von 8-oxoG behandeln (Moller et al. 2010). Ein Nebenfund der vorliegenden Arbeit bei der Charakterisierung der Versuchstiere war jedoch, dass die OGG1 defizienten Tiere in Abhängigkeit des Alters ein ca. 10 % niedrigeres Gewicht aufweisen (siehe Abbildung 4.1). Darüber hinaus ist auch das Gewicht der Niere (ca. 20 %) in OGG1 defizienten Tieren signifikant erniedrigt. Ein Vergleich mit den Ergebnissen der Dissertation von D. Warken (2013) zeigt, dass auch dort sowohl das Körpergewicht als auch das Gewicht der Niere in *Ogg1*^{-/-}-Mäusen erniedrigt war. Einen komplett gegenteiligen Phänotyp beschrieben Sampath et al. (2012), nach denen OGG1 defiziente Mäuse unter „high fat diet“-Ernährung zu einer erhöhten Inzidenz von Fettleibigkeit mit erhöhten viszeralen und subkutanen Fetteinlagerungen neigten. Weitergehende Studien zur Aufklärung der Ursachen des unterschiedlichen Organ- und Körpergewichts stehen allerdings noch aus.

5.2 Auswirkungen eines OGG1 KO oder KD auf die Transkription inflammatorischer Zytokine

Milzzellen von OGG1 KO-Mäusen exprimieren weniger proinflammatorische Zytokine nach LPS Stimulation

Um die mechanistischen Ursachen der in Kapitel 1.5 vorgestellten Immundefizienz OGG1 defizienter Mäuse aufzuklären, wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst Milzzellen der beiden Genotypen mit LPS behandelt und die Genexpression einiger proinflammatorischer Zytokine mittels qPCR gemessen. In diesem ex-vivo Modell zeigt sich, dass die Expression der proinflammatorischen Zytokine IL6 und TNF- α nach LPS Behandlung OGG1 defizienter Milzzellen signifikant reduziert ist (Abbildung 4.2). Auffällig bei der Analyse der konzentrations- und zeitabhängigen Induktion der TNF- α Expression ist, dass nicht nur die LPS-induzierte, sondern auch die basale Expression in den OGG1 defizienten Zellen verringert ist. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass durch die Gewebeaufbereitung bereits eine schwache immunologische Aktivierung der Milzzellen ausgelöst wird, welche eine Expressionsänderung nach sich zieht. Zwar wurde dieser Überlegung durch eine Ruhephase der Zellen nach Isolation Rechnung getragen, allerdings können diese Effekte nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Des Weiteren fällt auf, dass auch in OGG1 defizienten Zellen die Steigerung der Expression der Zytokine durch LPS nicht vollkommen aufgehoben, sondern nur gedrosselt wird. Das lässt die Schlussfolgerung zu, dass OGG1 nur als Modulator der Expression fungiert und somit nicht essentiell für diese ist. Eine solche modulatorische Funktion von OGG1 wird in der Literatur auch in anderen Studien beschrieben. Li et al. (2012) lösten in einem Mausmodell eine allergische Atemwegsentzündung durch Ovalbumin-Behandlung aus. Im Lungengewebe der OGG1 defizienten Tiere waren daraufhin niedrigere Proteinspiegel der Zytokine TNF- α , IL6, IL2, IL4 sowie IFN γ gemessen worden als in den Vergleichstieren. Bacsí et al. (2013) fanden nach OGG1-Knockdown in Atemwegsepithelien von BALB/c-Mäusen und anschließender Atemwegsentzündung durch *Ambrosia artemisiifolia* Extrakt ebenfalls erniedrigte Proteinspiegel der Zytokine IL13, IL5 und IL4. Somit konnte in unterschiedlichen Entzündungsmodellen die entzündungsmodulierende Wirkung von OGG1 gezeigt werden.

Die Immundefizienz in Milzzellen wird nicht durch „off-target“ Effekte durch den Knock-out hervorgerufen

Die in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden ursprünglich von der Gruppe um T. Lindahl generiert (Klungland et al. 1999). In diesen Mäusen wurde das 4. Exon, welches die katalytische Domäne beherbergt, entfernt. Die Exons 1-3 bleiben jedoch unberührt, wodurch ein verkürztes OGG1-Protein entstehen könnte, welches der natürlich vorkommenden Splicing-Variante von OGG1 nicht unähnlich wäre. In der Tat konnte die Gruppe von C. Niehrs als Kooperationspartner auf mRNA-Ebene nachweisen, dass die ersten 3 Exons des OGG1 Gens

in Maus Embryo Fibroblasten (MEF) dieser Mäuse noch immer exprimiert werden (Daten nicht gezeigt). Ein weiterer Mausstamm mit einem *Ogg1* KO wurde durch die Nakabeppu-Gruppe generiert (Sakumi et al. 2003). In diesen Mäusen erstreckt sich die *polII*/Neomycin-Kassette über die Exons 1-3. In der qPCR-Analyse der MEF's dieser Mäuse konnten keine Transkripte von *OGG1* nachgewiesen werden. *OGG1* ist in diesen Zellen also vollständig eliminiert. Der Vergleich der TNF- α Expression in Milzzellen von Wildtyp und *OGG1* KO in „Nakabeppu-Mäusen“ bestätigt die Befunde in den „Lindahl-Mäusen“ (Abbildung 4.5). Auch hier ist sowohl die basale als auch die LPS-induzierte Expression von TNF- α durch fehlendes *OGG1* verringert. Das bedeutet, dass die beobachteten Unterschiede nicht zufällig, zum Beispiel aufgrund von off-Target-Effekten durch den Knockout, entstanden sind.

Die Immundefizienz ist auch auf Proteinebene detektierbar und nicht auf Veränderungen hinsichtlich der zellulären Komposition der Milz zurückzuführen.

Wie bereits in Kapitel 3.4 erwähnt, beschreibt der Begriff Milzzellen eine äußerst heterogene Zellpopulation. Um auszuschließen, dass die unterschiedliche Expression der Zytokine auf eine veränderte zelluläre Komposition der Milz in Wildtyp und *OGG1* KO Mäusen zurückzuführen ist, wurden die prozentualen Anteile der Subpopulationen durchflußzytometrisch erfasst (Abbildung 4.6). Dabei konnten in keiner der untersuchten Zellarten Unterschiede zwischen den Genotypen festgestellt werden. Dieser Befund legt nahe, dass die beobachtete Immundefizienz kein Symptom einer durch fehlendes *OGG1* ausgelösten Entwicklungsstörung ist. Vielmehr suggeriert es eine direkte Beteiligung von *OGG1* in der Signaltransduktion und/oder der Regulation der Transkription der untersuchten Gene.

Neben der Analyse der zellulären Komposition wurde auch die Protein-Expression von TNF- α mittels Durchflußzytometrie untersucht. Durch spezifische Oberflächenmarker wurden dabei die Subpopulationen isoliert voneinander auf ihren LPS-induzierten TNF- α Gehalt untersucht. Da TNF- α normalerweise von der Zelle über den Golgi-Apparat sezerniert wird, muss dieser durch gleichzeitige Behandlung mit Monensin inhibiert werden. TNF- α akkumuliert dadurch intrazellulär und kann so detektiert bzw. quantifiziert werden (Schuerwegh et al. 2001). Die Ergebnisse zeigen, dass Makrophagen, obwohl sie nur einen geringen Prozentsatz der Gesamtpopulation ausmachen, die nahezu alleinigen Produzenten von TNF- α nach LPS Stimulation sind (Abbildung 4.7). Auch auf Proteinebene ist die geringere Immunantwort in den *OGG1* defizienten Zellen zu erkennen. Neben der LPS induzierten Immunantwort wurden die Milzzellen auch durch PMA/Ionomycin stimuliert. Wie in Abbildung 4.8 zu erkennen ist, beschränkt sich die TNF- α -Produktion nun nicht mehr nur auf Makrophagen. Außer B-Zellen reagieren alle untersuchten Subpopulationen auf diese Behandlung. Zudem ist in jedem Zelltyp die TNF- α Expression in den *OGG1* defizienten Zellen erniedrigt. Somit bleibt festzuhalten, dass der Einfluss von *OGG1* nicht auf eine Zellart (z.B. Makrophagen) beschränkt ist. Außerdem legt dieser Befund nahe, dass die beobachteten Effekte nicht spezifisch für den TLR4-Signaltransduktionsweg sind. PMA ist ein Aktivator der Proteinkinase C und kann als solcher NF- κ B direkt aktivieren (Holden et al. 2008). Im

Zusammenspiel mit Ionomycin wird aber auch der Transkriptionsfaktor NF-AT direkt aktiviert. Die Vermutung liegt somit nahe, dass die OGG1-abhängige Regulation der Expression unabhängig vom Signalweg (z.B. TLR4) erfolgt, sondern vielmehr durch Beeinflussung und Veränderungen der Promotorregionen, beziehungsweise durch Modulation der Genregulation am Promotor.

Weiterhin stellt sich die Frage, ob auch andere Enzyme der Basenexzisionsreparatur zusätzliche Funktionen besitzen, wie sie bereits für OGG1 beschrieben sind. NEIL1 zum Beispiel ist das eukaryotische Homolog zu Endonuklease VIII und erkennt neben Thyminglykol auch die Hydantoine Gh und Sp (Krishnamurthy et al. 2008). Diese Derivate entstehen durch Oxidation von 8-oxoG, welches, wie in Kapitel 1.4.1 erwähnt, aufgrund des niedrigen Redoxpotentials leicht weiteroxidiert wird. Somit könnte nicht nur 8-oxoG im Zusammenspiel mit OGG1 regulatorisch auf die Transkription von Genen wirken, sondern auch Gh oder Sp im Zusammenspiel mit NEIL1. Vartanian et al. konnten zeigen, dass NEIL1 KO Mäuse im Laufe eines Jahres ein metabolisches Syndrom mit massiven Fetteinlagerungen entwickeln (Vartanian et al. 2006). Ein ähnlicher Phänotyp wurde wie in Kapitel 5.1 erwähnt von Sampath et al. (2012) auch für *Ogg1*^{-/-}-Mäuse beschrieben. Eine Immundefizienz wie nach OGG1 Depletion wurde für NEIL1 defiziente Tiere oder Zellen bis zum jetzigen Zeitpunkt jedoch nicht beschrieben. Stattdessen zeigten sich durch Lavage isolierte Bronchoalveolarzellen von NEIL2^{-/-}-Mäusen sogar verstärkt anfällig gegenüber proinflammatorischen Stimuli wie LPS und TNF-α (Chakraborty et al. 2015). Wenngleich auch kein Mechanismus für die beobachteten Effekte postuliert werden konnte, zeigt diese Publikation einmal mehr, dass Enzyme der Basenexzisionsreparatur in der Regulation der pro- und antiinflammatorischen Immunantwort beteiligt sind.

Die durch OGG1 Depletion verursachte Immundefizienz ist nicht auf murine Zellen beschränkt

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt eines OGG1 Knockdowns auf die Expression proinflammatorischer Gene zusätzlich in einer humanen Zelllinie untersucht. Bei der hierfür verwendeten HeLa-Zelllinie handelt es sich um menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms. Diese Zelllinie wurde verwendet, da in der Literatur bereits beschrieben ist, dass HeLa-Zellen durch schnelle Induktion der Transkription hohe Spiegel des proinflammatorischen Zytokins IL6 als Antwort auf eine TNF-α Behandlung produzieren (Legrand-Poels et al. 2000). Ebenso ist bekannt, dass die Transkription von IL6 in diesen Zellen vor allem durch die beiden Transkriptionsfaktoren NF-κB und AP-1 reguliert wird, und der regulatorische Bereich des IL6-Gens daher Bindungssequenzen für beide besitzt (Zhou et al. 2003). Wie TNF-α in LPS-stimulierten murinen Milzzellen so ist auch die relative mRNA Expression von IL6 in TNF-α stimulierten HeLa-Zellen nach OGG1 Depletion verringert (siehe Abbildung 4.16). Auch hier hat OGG1 nur einen modulierenden Effekt auf die Expression und durch

Knockdown des Proteins wird diese nicht gänzlich aufgehoben. Die Befunde in den HeLa-Zellen können als Beweis dafür angesehen werden, dass die OGG1 vermittelte Modulation der Transkription keineswegs nur auf murine Zellen beschränkt ist, sondern darüber hinaus in allen Säugerzellen von Bedeutung ist. Im Einklang damit konnten Ba et al. (2014) in der humanen Zelllinie HEK293 zeigen, dass die Expression von unter anderem CXCL-2 nach TNF- α Behandlung in OGG1 depletierten Zellen verringert ist.

5.3 Die Bedeutung von LSD1 & APE1 für den Einfluss von OGG1 auf die Transkription proinflammatorischer Gene

Die Stimulation der Milzzell-Aktivierung durch OGG1 ist co-abhängig von LSD1

Nachdem die Immundefizienz der Milzzellen OGG1 defizienter Mäuse nachgewiesen werden konnte, stellt sich nun die Frage, wie OGG1 beziehungsweise sein durch DNA-Oxidation mittels reaktiver Sauerstoffspezies entstandenes Substrat 8-oxoG die Transkription von Genen beeinflussen kann.

Ein Blick in die Literatur zeigt, dass bereits einige Mechanismen bekannt sind, wie ROS das Signaling von NF- κ B steuern können. Durch oxidativen Stress wird die Protein-Tyrosin-Kinase Syk aktiviert welche über verschiedene Wege NF- κ B aktiviert (Takada et al. 2003). Die Oxidation und somit Inaktivierung einer Tyrosin-Phosphatase an bestimmten Cystein-Resten führt ebenfalls zur verstärkten Tyrosin-Phosphorylierung und somit Aktivierung von NF- κ B (Kang et al. 2000). Diese Befunde belegen zwar die Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies an der Aktivierung von NF- κ B, erklären allerdings nicht den Einfluss von OGG1 auf die Transkription der durch diesen Transkriptionsfaktor regulierten Gene.

Durch Behandlung von Milzzellen mit LPS werden vor allem die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 in einem TLR4-abhängigen Signalweg aktiviert. Es stellt sich nunmehr die Frage, ob auch bei dieser Aktivierung über LSD1 generierte oxidative DNA-Modifikationen eine Rolle spielen, wie bereits in Kapitel 1.6 für andere experimentelle Modelle erläutert. Nach LSD1 Inhibition mit dem Inhibitor OG-Loos sinkt die LPS-induzierte TNF- α Expression. Diese Reduktion ist vollständig abhängig von OGG1, wird also nur in OGG1 profizienten Zellen beobachtet. Der anfängliche Unterschied in der Genexpression zwischen beiden Genotypen wird daher nach Inhibition von LSD1 nahezu nivelliert (siehe Abbildung 4.11). Das bedeutet, dass LSD1, neben der ursprünglich postulierten Regulation durch Demethylierung von Histonresten, zusätzlich noch einen zweiten, OGG1-abhängigen Mechanismus zur Transkriptionsregulation besitzt. Van Essen et al. (2010) konnten in murinen dendritischen Zellen zeigen, dass c-Rel als Untereinheit von NF- κ B in unstimulierten Zellen zunächst an Promotorregionen von *Mdc* und *Il12b* bindet. Die Bindung von NF- κ B-Dimeren wird durch

H3K9-Methylierungen blockiert und die Expression somit verhindert. Nach LPS Stimulation fungiert c-Rel als Target für LSD2 (siehe Kapitel 1.2.4). LSD2 interagiert dabei über seine Linker-Domäne mit der Rel-Homologie-Domäne von c-Rel. Durch die nachfolgende Demethylierung von H3K9 wird die Inhibition aufgehoben, NF- κ B-Dimere können zum Promotor rekrutiert werden und die Transkription der Zielgene initiieren. Der beschriebene Effekt wird allerdings spezifisch auf die Aktivität von LSD2 zurückgeführt, da nur LSD2 über seine Linker-Domäne mit der Rel-Homologie-Domäne interagieren kann. Da die Aminooxidase-Domäne jedoch hoch konserviert ist, könnte der in dieser Arbeit beobachtete Effekt des Inhibitors OG-Loo2 auf die LPS-induzierte Genexpression auch auf Inhibition von LSD2 statt LSD1 zurückzuführen sein. Entsprechende Untersuchungen zur Differenzierung beider Demethylasen stehen jedoch noch aus. Der von van Essen postulierte Mechanismus beinhaltet keine Beteiligung oxidativer DNA-Modifikationen die durch eine LSD2-abhängige Demethylierung entstehen könnten. Eine Rolle von ihnen wird dementsprechend von den Autoren nicht diskutiert.

In der Literatur finden sich aber weitere Hinweise auf den Mechanismus zur transkriptionellen Regulation von Zielgenen verschiedener Transkriptionsfaktoren unter Beteiligung von OGG1 nach Kapitel 1.6. So konnten Ruchko et al. (2009) zeigen, dass unter hypoxischen Bedingungen entstehende, mitochondriale ROS zu spezifischen Basenoxidationen im Promotorbereich des VEGF-Gens führen. Diese Modifikationen verstärken die Bindung des Transkriptionsfaktors HIF1 α an den VEGF-Promotor und somit auch dessen Transkription. In einem weiteren Beispiel der Genregulation durch DNA-Oxidation wurde die transkriptionelle Aktivität der nukleären Rezeptoren für Estrogen, Androgen, Thyroxin und Retinsäure sowie des Transkriptionsfaktors AP-1 in der humanen Zelllinie MCF-7 beschrieben. All diese Transkriptionsfaktoren benötigen spezifisch lokalisierte DNA-Strangbrüche (Ju et al. 2006). Perillo et al. (2008) gelang es daraufhin nachzuweisen, dass ROS bei der Entstehung dieser Strangbrüche eine wichtige Rolle spielen und konnte außerdem mit LSD1 die Quelle der ROS identifizieren (Kapitel 1.6). Demnach sind die während der OGG1 vermittelten Reparatur oxidativer Basenmodifikationen entstehenden Einzelstrangbrüche das Signal zur Rekrutierung von Topoisomerasell β , welche die DNA aufbiegt und so die Promotorregion nun für den Initiierungskomplex der Transkription leichter zugänglich macht. Weiterführende Untersuchungen z.B. zur OGG1 abhängigen Rekrutierung von Topoisomerasell β zu NF- κ B-Bindungssequenzen im TNF- α Promotor der in dieser Arbeit verwendeten Milzzellen stehen allerdings noch aus.

Die Stimulation der Milzzell-Aktivierung durch OGG1 ist co-abhängig von APE1

Der von Perillo et al. vorgeschlagenen Mechanismus ist zunächst nicht zu erklären, zeigen doch Untersuchungen von (Allgayer et al. 2016), dass OGG1 in Zellen nur als Glycosylase arbeitet und die entstandene AP-Stelle nachfolgend durch Inzision von APE1 prozessiert wird, welche in 5'-Richtung einen Einzelstrangbruch erzeugt. Es stellt sich somit einerseits die Frage, ob der in Abbildung 4.11 beobachtete Effekt alleine durch Aktivität von LSD1 und

der Erkennung der dabei entstehenden spezifischen Läsionen im Promotor durch OGG1 hervorgerufen wird, oder ob auch APE1, nach Erkennung der durch OGG1 entstandenen AP-Stelle und deren Prozessierung für die Regulation der Transkription essentiell ist. Die in Abbildung 4.13 dargestellten Befunde zeigen, dass sich die Inhibition der AP-Endonuklease-Aktivität von APE1 nur auf die LPS-induzierte TNF- α Expression der Wildtyp-Milzzellen auswirkt. Auch durch APE1-Inhibition wird der zuvor beobachtete Unterschied in der Genexpression zwischen den Genotypen somit aufgehoben bzw. verringert. Das legt nahe, dass die Endonuklease-Funktion von APE1 für die OGG1/NF- κ B vermittelte Regulation der Transkription von maßgeblicher Bedeutung ist. Die Befunde von Amente et al. (2010) zur Regulation Myc-transkribierter Gene bestätigen dies. So konnte diese Gruppe zeigen, dass LSD1, OGG1 und APE1 sequentiell zum Promotor rekrutiert werden und Depletion dieser Proteine in einer verminderten Transkription von Myc-Zielgenen in Ratten-Fibroblasten resultiert. Die Aktivität von APE1 würde jedoch eine Rekrutierung von Topoisomerasell β und die damit verbundene Generierung eines Einzelstrangbruchs für die gesteigerte Transkription überflüssig machen. Weiterführende Untersuchungen, insbesondere zur LSD1 und OGG1 abhängigen Rekrutierung von Topoisomerasell β sowie APE1, beziehungsweise zur Generierung spezifischer DNA-Strangbrüche stehen allerdings noch aus.

Interessanterweise besitzt APE1 außer der Endonuklease- noch eine Redoxfunktion und wird daher auch als Ref-1 bezeichnet. Durch diese Redoxfunktion kann APE1 die DNA-Bindung von unter anderem NF- κ B, AP-1, NF-YA und HIF1 α beeinflussen (Ziel et al. 2004), in dem es wichtige Cystein-Reste der Transkriptionsfaktoren im reduzierten Zustand hält. Im Falle von NF- κ B ist dies cys62 in der Rel-Homologie-Domäne der Untereinheit p50. Diese muss in der reduzierten Form vorliegen um NF- κ B seine DNA-Bindungs-Aktivität zu verleihen (Ando et al. 2008). APE1 kann somit auf unterschiedlichen Wegen die Transkription von Genen regulieren, wobei es vorstellbar ist, dass diese nicht unabhängig voneinander ablaufen. Vielmehr kann die Lokalisierung von APE1 am Promotor nicht nur die Rekrutierung von Topoisomerasell β nach den Vorstellungen von Perillo et al. bzw. die Generierung eines Einzelstrangbruchs nach sich ziehen, sondern auch direkt den Redoxstatus von NF- κ B und somit dessen Bindungsaktivität an den Promotor regulieren. Um den Einfluss der Redox-Funktion von APE1 auf die Transkription NF- κ B regulierter Gene zu überprüfen, wurde der Inhibitor E3330 verwendet. Wie in Abbildung 4.26 zu erkennen ist, hat eine Vorinkubation mit diesem allerdings keinen Effekt auf die TNF- α Expression LPS behandelter J774.2 Zellen. Dies steht im Gegensatz zu den beobachteten Effekten von E3330 in LPS behandelten humanen peripheren Monozyten, in denen die TNF- α Expression durch die Inhibition der Redoxfunktion verringert werden konnte (Goto et al. 1996). Dieser Effekt kann einerseits durch eine gesteigerte Bindung von NF- κ B an die Bindungssequenzen erklärt werden. Andererseits verringert E3330 durch Inhibierung der Degradation von I κ B den Anteil von aktiviertem NF- κ B im Zellkern.

Sprechen die bisher diskutierten Befunde für die Notwendigkeit einer APE1 induzierten Inzision zur OGG1 vermittelten Transkriptionsregulation, so gibt es interessanterweise auch Befunde die gegen diese sprechen. So konnte kürzlich in einem Reporter-gen-Assay gezeigt

werden, dass sich durch AP-Stellen oder 8-oxoG-Läsionen innerhalb von G-Quadruplex-bildenden Sequenzen das Gleichgewicht von Duplex- zu Quadruplex-Strukturen innerhalb des Promotors verschiebt (Fleming et al. 2017). G-Quadruplexe entstehen in Guanin-reichen einzelsträngigen Sequenzen der DNA durch quadratische Anordnung von Guaninmolekülen, die von Wasserstoffbrückenbindungen unter Ausbildung von Hoogsteen-Basenpaaren stabilisiert werden. APE1 bindet nach diesen Vorstellungen innerhalb der Quadruplex-Struktur an die AP-Stelle, schneidet diese jedoch nur ineffizient ein, wodurch die Transkription der Reportergene dennoch aktiviert wird.

Die Stimulation der HeLa-Aktivierung durch OGG1 ist nahezu unabhängig von LSD1 und APE1

In Kapitel 4.2.2 konnte gezeigt werden, dass auch die TNF- α induzierte IL6-Expression in HeLa-Zellen durch OGG1 moduliert wird. Auch hier stellt sich somit die Frage, ob diese Modulation über 8-oxoG-Läsionen erfolgt, welche im Zuge der LSD1 vermittelten Demethylierung repressiver Histonmodifikationen entstehen könnten. Im Gegensatz zu den Befunden in murinen Milzzellen, in denen die Inhibition von LSD1 nur die TNF- α Expression in OGG1 profizienten beeinflusst, reagieren sowohl OGG1 profiziente als auch defiziente HeLa-Zellen nahezu gleich. In beiden Genotypen führt die Inhibition von LSD1 zu einer stark verringerten IL6 Expression (siehe Abbildung 4.17). Der zuvor statistisch signifikante Unterschied zwischen beiden Genotypen ist nach Inhibition allerdings aufgehoben. Dies legt nahe, dass auch in HeLa-Zellen eine OGG1 abhängige Modulation der Transkription über LSD1 nach dem Mechanismus in Kapitel 1.6 stattfindet. Dieser spielt jedoch in dieser Zelllinie eine untergeordnete Rolle. Vielmehr kann man folgern, dass die LSD1 vermittelte Entfernung repressiver Histonmodifikationen eine größere Bedeutung für die Transkription von IL6 in HeLa-Zellen hat als die dadurch induzierte Modulation über OGG1. Auch im Hinblick auf die Beteiligung von APE1 bei der Transkription von IL6 würde dies die in Kapitel 4.2.5 dargestellten Befunde erklären. Während gezeigt werden konnte, dass die Endonukleasefunktion von APE1 in der LSD1/OGG1 vermittelten Transkriptionsregulation in Milzzellen beteiligt ist, scheint APE1 keinen Einfluss auf die IL6 Transkription in HeLa-Zellen zu haben (siehe Abbildung 4.19). Prusty et al. konnten zeigen, dass der Transkriptionsfaktor AP-1 in HeLa-Zellen von besonderer Bedeutung ist und in diesen Zellen konstitutiv aktiviert vorliegt (Prusty, 2005). Welche Auswirkungen das für die Expression von IL6 hat, und warum dies eine Erklärung für die beobachteten Effekte sein könnte, werde ich in Kapitel 5.5 erläutern.

5.4 Detektion oxidativer Läsionen im IL6-Promotor TNF- α behandelter HeLa-Zellen

Die bisher diskutierten Daten weisen darauf hin, dass spezifische Guanine innerhalb eines Promotorbereichs durch die Aktivität von LSD1, beziehungsweise durch das als stöchiometrisches Nebenprodukt der Demethylierung entstehende Wasserstoffperoxid, zu 8-oxoG oxidiert werden. Die Detektion dieser Läsionen ist allerdings nicht trivial. Zunächst einmal scheint denkbar, dass als Reaktion auf den proinflammatorischen Stimulus produzierte reaktive Sauerstoffspezies zu einem globalen Anstieg oxidativer Läsionen führen, wodurch zufällig auch Basen in Promotorregionen betroffen sein könnten. Dieser Überlegung wurde durch Messung der globalen FPG-sensitiven Läsionen (also AP-Läsionen und 8-oxoG) in HeLa-Zellen unter TNF- α Behandlung Rechnung getragen, wobei keine zusätzlich generierten Läsionen detektiert werden konnten (Abbildung 4.21). Zur Messung einzelner, spezifisch in der Promotorregion des IL6 Gens entstandener oxidativer Läsionen, wurde die unter Kapitel 3.10 vorgestellte Methode angewendet. Die Ergebnisse zeigen, dass unter TNF- α Behandlung in dem untersuchten Genabschnitt, welcher eine NF- κ B Bindestelle enthält, gezielt FPG-sensitive Läsionen entstanden sind (Abbildung 4.22B). Übereinstimmend mit der Annahme, dass LSD1 die zugrundeliegende Quelle der Läsionen ist wird die Generierung dieser durch Inhibition von LSD1 vollständig unterbunden (Abbildung 4.22B). Pan et al. (2017) gelang es ebenfalls durch eine qPCR basierte Methode 8-oxoG Läsionen in der Nähe von NF- κ B Bindungssequenzen des TNF- α Gens nach TNF- α Behandlung von MEF-Zellen zu detektieren. Zusätzlich wird in deren Modell aber auch OGG1 selbst über einen sensiblen Cysteinrest oxidiert und so enzymatisch inaktiviert. Allerdings werden keine Aussagen über die Herkunft der für diese Läsionen verantwortlichen ROS getroffen. Laut Pan wird OGG1 nach TNF- α Behandlung nahe der NF- κ B Bindungssequenz des Zielgens rekrutiert, ist unter diesen Bedingungen jedoch nicht enzymatisch aktiv und fungiert somit nicht als Glykosylase, erhöht jedoch die Bindung von NF- κ B an dessen Bindungssequenz. Perillo und Amente zeigten getrennt voneinander die Entstehung oxidativer Läsionen auf zellulärer Ebene (Perillo et al. 2008; Amente et al. 2010). Auch in ihrem Modell zeigte sich eine verringerte Expression der Zielgene nach Depletion von OGG1 (siehe Kapitel 1.6). Mittels eines Fluorescein-gekoppelten Antikörpers konnten sie 8-oxoG detektieren, welches nach Stimulierung der Zelle mit Estrogen (Estrogenrezeptor) bzw. Tamoxifen (Myc; Myc/Estrogenrezeptor Chimäre) vermehrt auftrat. Auch hier konnten die beobachteten Effekte durch Knockdown sowie Inhibition von LSD1 aufgehoben werden. Allerdings ermöglicht diese Nachweismethode keine Aussagen zur Lokalisation der Läsion. Nichts desto weniger konnten beide Autoren die Bindung von OGG1 nahe der Bindungssequenzen der entsprechenden Transkriptionsfaktoren durch ChIP-Seq nachweisen. Amente konnte zusätzlich zeigen, dass auch APE1 an diese Sequenzen des Zielgens rekrutiert wird. Auch nach Knockdown von APE1 war die Expression des Zielgens verringert. Dies spricht dafür, dass durch die Aktivität von OGG1 eine AP-Stelle entsteht, welche durch APE1 prozessiert werden muss.

Auch wenn die bisherigen Ergebnisse zur Quelle der oxidativen Läsionen im Promotorbereich auf die Aktivität von LSD1 beziehungsweise durch das als stöchiometrisches Nebenprodukt der Demethylierung entstehende Wasserstoffperoxid deuten, scheint dies allerdings zunächst einmal nicht plausibel. Wasserstoffperoxid ist relativ reaktionsträge und reagiert nicht direkt mit der DNA. Erst durch eine Metall-katalysierte Fenton-Reaktion entsteht das reaktionsfreudige Hydroxyl-Radikal. Dieses ist jedoch unselektiv, wodurch neben 8-oxoG auch weitere DNA-Modifikationen wie AP-Stellen und Einzelstrangbrüche entstehen können (siehe Kapitel 1.3). Ein solcher Mechanismus würde demnach nicht nur äußerst risikobehaftet sein, sondern auch gegen die Notwendigkeit der Rekrutierung und Aktivität von OGG1 sprechen. Eine direkte Oxidation von Guanin im Promotor durch LSD1 ist jedoch noch nicht beschrieben worden.

5.5 Die Bedeutung der MAPK p38, JNK und ERK für die OGG1 vermittelte Transkription inflammatorischer Gene

Wie in Kapitel 1.1.4 dargelegt, werden durch den TNF-Rezeptor-abhängigen Signaltransduktionsweg die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 aktiviert. AP-1 ist ein Heterodimer aus Mitgliedern der Proteinfamilien c-Fos, c-Jun, Activating Transcription Factor (ATF), Jun dimerization protein (JDP) und JunB. Die Aktivität von AP-1 wiederum wird maßgeblich durch p38 und JNK reguliert. JNK phosphoryliert c-Jun und aktiviert dieses somit, während p38 die Aktivität von AP-1 unter anderem durch Phosphorylierung von ATF steuert (Zarubin, Han 2005). Anhaltende ERK Aktivität führt zur C-terminalen Phosphorylierung und somit Stabilisierung und Aktivierung von c-Fos (Whitmarsh 2007). Durch Inhibition von p38 und JNK kann die LPS-induzierte TNF- α Expression in J774.2 Zellen deutlich verringert werden, was deren Bedeutung für die TLR4-abhängige Expression von TNF- α verdeutlicht (Abbildung 4.25). Der in Kapitel 1.1.4 dargestellte Signaltransduktionsweg zeigt die Aktivierung von AP-1 und NF- κ B zwar als voneinander separat ablaufende Vorgänge, physiologisch jedoch beeinflussen sich diese auch gegenseitig. So konnte gezeigt werden, dass c-Fos und c-Jun physikalisch über die Rel-Homologie Domäne mit der p65 Untereinheit von NF- κ B interagieren. Dieser Komplex führt zu einer höheren Bindung an die DNA-Bindungssequenzen und verstärkten biologischen Funktionen von sowohl NF- κ B als auch AP-1, welche zudem in Promotoren oftmals nahe beieinander liegen (Stein et al. 1993).

Die eigenen Untersuchungen zeigen, dass die LSD1/OGG1 vermittelte Regulation der Expression von TNF- α in den LPS behandelten Milzzellen unabhängig von den MAPK p38, JNK und ERK verläuft. Zwar sinkt die Expression durch Inhibition von p38 und JNK, der OGG1 abhängige Unterschied zwischen beiden Genotypen bleibt jedoch erhalten (Abbildung 4.12). Erst durch Kombination beider Inhibitoren wird beinahe die komplette TNF- α Expression aufgehoben. Wahrscheinlich ist dies darauf zurückzuführen, dass NF- κ B nicht mehr

durch AP-1 zusätzlich aktiviert werden kann und somit auch die NF- κ B regulierte Transkription fast vollständig zum Erliegen kommt.

Auch in HeLa-Zellen haben die Inhibitoren der MAPK einen starken Effekt auf die Expressionsstärke von IL6 (Abbildung 4.18). Erstaunlicherweise wird durch Inhibition der MAPK p38 und JNK in diesem Modell jedoch der durch OGG1 verursachte Unterschied in der Expression aufgehoben und die mRNA Spiegel von IL6 sind nahezu identisch. Auch nach ERK Inhibition ist dieser Effekt zu beobachten, ist jedoch deutlich schwächer ausgeprägt und der Unterschied zwischen den Genotypen zumindest ansatzweise noch immer zu erkennen. Es scheint jedoch unwahrscheinlich, dass diese Effekte auf eine direkte Interaktion von AP-1 mit OGG1 zurückzuführen sind, da in der Literatur, im Gegensatz zu NF- κ B, kein Fall beschrieben ist in dem ein Signaling von oxidativen DNA-Läsionen in der Bindungssequenz von AP-1 über OGG1 ausgeht. Vielmehr konnten Prusty et al. (2005) zeigen, dass die Bindungsaktivität von AP-1 in HeLa-Zellen deutlich höher ist als in normalen Zervixzellen. Die Autoren erklären dies unter anderem mit einer verstärkten Expression von c-Fos. Es scheint somit, als ob die TNF- α induzierte IL6 Transkription in HeLa-Zellen vor allem durch die Aktivität von AP-1 und somit auch der MAPK bestimmt wird. Demnach steigert NF- κ B zwar die IL6 Transkription in HeLa-Zellen in einem LSD1/OGG1-modulierten Mechanismus, dieser macht aber nur einen kleinen Teil der Expression aus. Zudem ist dieser ebenfalls auf die Aktivität von AP-1 angewiesen und wird somit indirekt durch Inhibition der MAPK ebenfalls aufgehoben. Durch Inhibition von p38 beziehungsweise JNK würde somit die komplette AP-1 abhängige, sowie die NF- κ B abhängige Transkription von IL6 aufgehoben werden. Die verbleibende Expression verläuft dann unabhängig von beiden Transkriptionsfaktoren sowie unabhängig von OGG1.

5.6 Behandlung von HeLa- und Milzzellen mit 8-oxoGua hat keinen Einfluss auf die Expression der Zielgene

Mittlerweile gibt es eine Reihe von Publikationen, welche die Immundefizienz OGG1 defizienter Zellen durch einen unterschiedlichen Mechanismus zu erklären versuchen. Aguilera-Aguirre et al. schrieben OGG1 eine weitere, bis dahin unbekannte Funktion als Guanin-exchange factor (GEF) zu (Aguilera-Aguirre et al. 2014). Nach inflammatorischem Stress bindet demnach die freie, durch BER ausgeschnittene Base 8-oxoGua an OGG1 zurück. In ihrem Versuchsaufbau konnten sie dies durch intranasale Applikation von 8-oxoGua in einem Mausmodell simulieren. In diesem Zustand verliert OGG1 seine Funktion in der BER und fungiert nunmehr als zytosolischer GEF. Durch diese Aktivität erfolgt an der kleinen GTPase Ras der Austausch von GDP mit GTP und Ras ist somit aktiv. Weiterhin beschreibt die Gruppe, dass Ras so unter anderem die MAPK und damit den NF- κ B Signalweg aktiviert. Auch für die kleinen GTPasen Rac1 (Hajas et al. 2013) und Rho (Pandita 2014) wurde ein

solcher Mechanismus beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl in murinen Milzzellen als auch in HeLa-Zellen untersucht ob die Expression der untersuchten proinflammatorischen Zytokine durch Behandlung mit 8-oxoGua beeinflusst wird. Jedoch zeigte diese Behandlung in keiner der beiden Modelle Wirkung und die Expression der Zielgene konnte weder durch Behandlung der Zellen mit 8-oxoGua alleine noch durch zusätzliche Stimulierung mit einer kleinen Konzentration von LPS beziehungsweise TNF- α im Vergleich zur zugehörigen Kontrolle weiter gesteigert werden (siehe Abbildung 4.14 & Abbildung 4.20).

5.7 Zusammenfassung zum potentiellen Mechanismus der OGG1 vermittelten Aktivierung der Transkription

In Abbildung 5.1 sind abschließend die in dieser Arbeit vorgestellten Befunde sowie die in der Literatur diskutierten Überlegungen zum Mechanismus der OGG1 vermittelten Transkription zusammengefasst. Das Zielgen befindet sich zunächst aufgrund der Aktivität repressiver Komplexe und der daran beteiligten Methyltransferasen und Histondeacetylasen (HDAC) in einem transkriptionell inaktiven Zustand. Durch proinflammatorische Stimuli wird zunächst LSD1 an die Promotorregion des Zielgens rekrutiert wo es repressive Histonmodifikationen durch Demethylierung entfernt. Die Expression des Zielgens ist dabei zumindest teilweise auf die Aktivität von LSD1 angewiesen. Als Nebenprodukt der LSD1 vermittelten Demethylierung fällt Wasserstoffperoxid an, welches spezifische Guaninbasen nahe der Bindungssequenz von NF- κ B zu 8-oxoG oxidiert. Diese Läsion führt zur Rekrutierung der Basenexzisionsreparaturenzyme OGG1 und APE1 welche diese Läsion zunächst in eine AP-Stelle bzw. einen Einzelstrangbruch überführen. Gleichzeitig führt die Interaktion von OGG1 mit NF- κ B und AP-1 zu einer stärkeren Bindung der durch den Stimulus aktivierten Transkriptionsfaktoren. Durch Rekrutierung der Topoisomerasen II wird die DNA im Bereich des Promotors aufgebogen, wodurch die generellen Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase II leichter geladen werden können und so die gesteigerte Transkription der Zielgene ermöglichen. Die Rekrutierung von Topoisomerasen II wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht untersucht, die Notwendigkeit eines durch Topoisomerasen II generierten Einzelstrangbruchs kann aber wie in Kapitel 5.3 kritisch diskutiert werden. Daher sind weitere Untersuchungen, insbesondere zur Lokalisierung oxidativer Basenmodifikationen im Promotor, der Rekrutierung von LSD1, APE1, Topoisomerasen II und der Transkriptionsmaschinerie, zur Aufklärung des exakten Mechanismus der OGG1 vermittelten Transkription nötig.

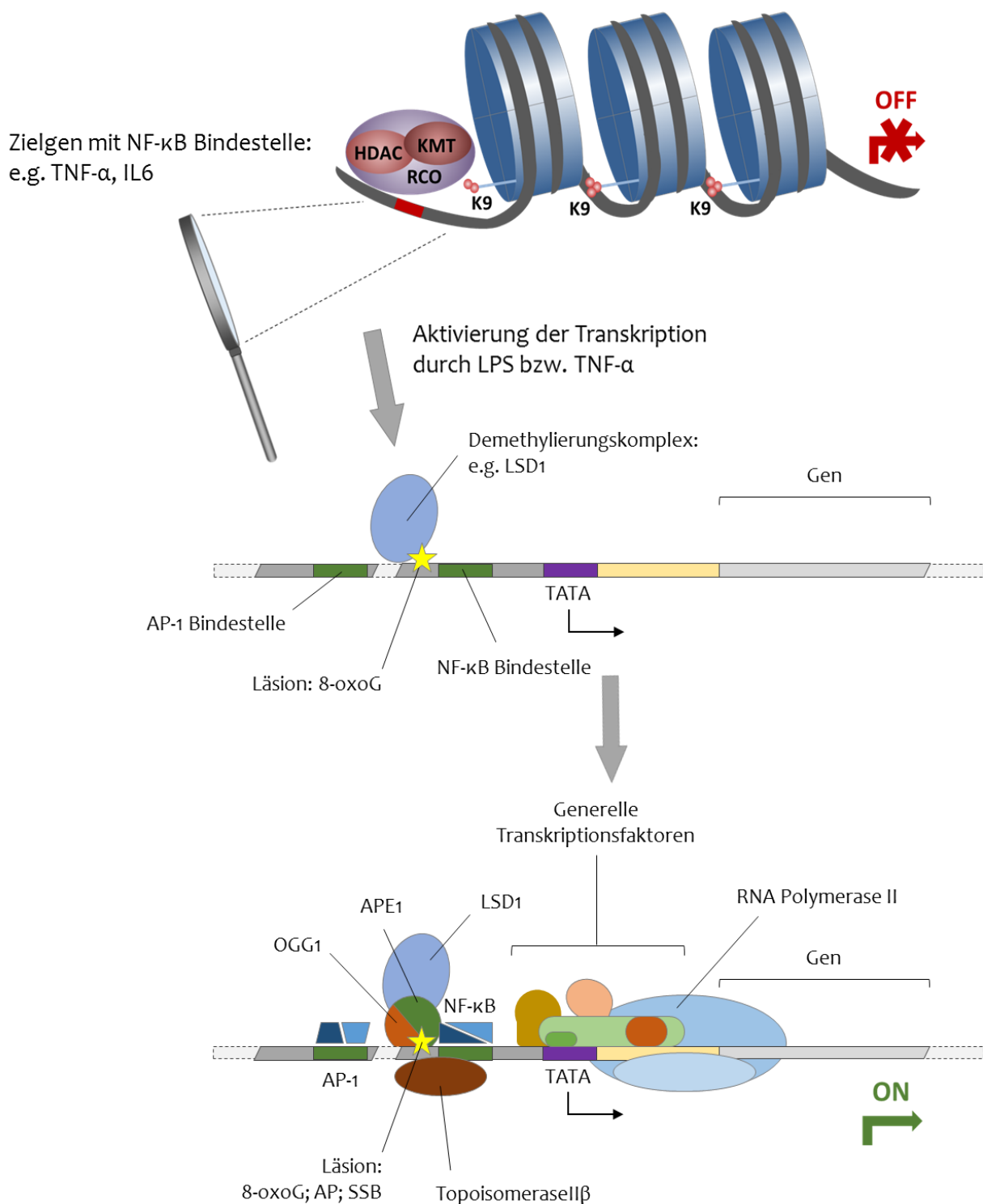


Abbildung 5.1: Potenzieller Mechanismus der LSD1/OGG1 vermittelten Genregulation. Das Zielgen befindet sich aufgrund der Aktivität repressiver Komplexe (RCO) und der daran beteiligten Methyltransferasen (KMT) und Histondeacetylasen (HDAC) in einem transkriptionell inaktiven Zustand. Nach entsprechendem Stimulus (z.B. LPS oder TNF- α) werden repressive Histonmethylierungen durch die Aktivität von LSD1 entfernt (Hierbei können auch weitere Demethylasen und Histonacetyltransferasen beteiligt sein). Als Nebenprodukt der LSD1 vermittelten Demethylierung fällt Wasserstoffperoxid an, welches spezifische Guaninbasen nahe der Bindungssequenz von NF- κ B zu 8-oxoG oxidiert. Diese Läsion führt zur Rekrutierung der Basenexzisionsreparaturenzyme OGG1 und APE1 welches diese Läsion zunächst in eine AP-Stelle bzw. einen Einzelstrangbruch überführen. Gleichzeitig führt die Interaktion von OGG1 und NF- κ B zu einer stärker Bindung des Transkriptionsfaktors. Durch Rekrutierung der Topoisomerase II β wird die DNA im Bereich des Promotors aufgebogen, wodurch die generellen Transkriptionsfaktoren und die RNA-Polymerase II leichter geladen werden können.

6 Zusammenfassung

Inflammatorische Reaktionen werden meist durch Zytokine gesteuert, welche daher mit der Entstehung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie Arthritis, Asthma, Morbus Crohn aber auch Multiple Sklerose und Diabetes sowie Alterungsprozessen und der Entstehung von Krebs assoziiert werden. Daher zielt die Behandlung dieser Erkrankungen häufig auf genau diese proinflammatorischen Zytokine ab. Der Befund von Mabley et al. (2008), dass Mäuse mit einer Defizienz der 8-Oxo-guanin-DNA-Glykosylase (OGG1) eine supprimierte Immunantwort aufweisen, war zunächst nicht erklärbar. Das Wissen über den zugrunde liegenden Mechanismus könnte somit neue Möglichkeiten in der Therapie solcher Erkrankungen offenlegen.

Ziel dieser Arbeit war es daher zunächst ein geeignetes ex-vivo-Mausmodell zu entwickeln und den erwähnten Befund zu verifizieren. In diesem Modell galt es sodann die dieser Immundefizienz zugrunde liegenden Mechanismen aufzudecken. Zu diesem Zweck wurden die Milzzellen von *Wildtyp*- und *Ogg1*^{-/-}-Mäusen mit LPS behandelt und die Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine verglichen. Dabei zeigte sich, dass OGG1 defiziente Zellen sowohl auf mRNA- als auch Protein-Ebene signifikant weniger Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) produzieren. Zudem konnte gezeigt werden, dass dieser Unterschied weder durch eine OGG1 vermittelte Störung der Zellkomposition der Milz, noch durch off-target Effekte des Knockouts hervorgerufen wird. Vielmehr wird die TNF- α Transkription durch OGG1 in einem LSD1 abhängigen Weg moduliert. LSD1 ist eine Lysin-spezifische Demethylase und produziert als stöchiometrisches Nebenprodukt der Demethylierung von Histonresten Wasserstoffperoxid. So könnten gezielt 8-oxoG Läsionen in regulatorischen Bereichen des TNF- α Gens entstehen, welche durch OGG1 erkannt und in eine AP-Läsion umgewandelt werden. AP-Läsionen wiederum werden mittels der AP-Endonuklease (APE1) in DNA-Einzelstrangbrüche überführt. In OGG1 profizienten Milzzellen konnte die TNF- α Expression sowohl durch Inhibition von LSD1, als auch von APE1 verringert werden, während die Inhibitoren in OGG1 defizienten Zellen keinen Effekt zeigten. Parallel dazu konnte die Beteiligung von OGG1 und LSD1 bei der TNF- α induzierten Transkription von Interleukin 6 (IL6) gezeigt werden. In diesem Modell gelang es durch eine qPCR basierte Methode zudem die LSD1 vermittelte Entstehung oxidativer Basenmodifikation in der NF- κ B-Bindungssequenz des IL6 Promotors nachzuweisen.

Die Funktion von OGG1 und APE1 in der Basenexzisionsreparatur sind lange bekannt, eine mögliche Beteiligung in der Genregulation über oxidative Läsionen in regulatorischen Genbereichen ist jedoch erst kürzlich postuliert worden. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern weitere Beweise für die Existenz eines solchen Mechanismus und erweitern darüber hinaus unser Wissen über die zugrundeliegenden Mechanismen der Regulation der Transkription proinflammatorischer Zytokine.

7 Materialien

7.1 Geräte

Autoklav	Technoclav 50 6.0 bzw. 2.0 (Fedegari Autoclav SPA, Albuzzo, Italien)
Autoradiographiekassette	Typ G (Rego, Augsburg)
Brutschränke	CO ₂ -Inkubator BB16, BB6060 O ₂ und Hera-Cell (Heraeus Instruments, Hanau)
Coulter Counter	Z2TM (Beckman Coulter, USA)
Destillations-Apparatur	Destamat® (Heraeus, Hanau)
Durchflusssytometer	FACScalibur FACS System (BD Biosciences, Heidelberg)
	BDTM LSR ii (BD Biosciences, Heidelberg)
Filterpapier	Gel Blot Paper, 15 x 20 cm (GE Healthcare Europe)
Fluorimeter	TKO 100, DNA Fluorimeter (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA), SFM 25 Fluorimeter (Kontron Instruments, Zürich, Schweiz)
Fraktionssammler	Ultrorac 2070 II (Pharmacia / LKB, Uppsala, Schweden) MM 10, Neolab 4 mit Zeitnehmer SM 999 (Neolab, Heidelberg)
Gefrierschrank (-20 °C)	KG 3666-23 (Liebherr)
Gefrierschrank (-80 °C)	Colora UF 85-300S (Colora, Lorch)
Geldokumentationssystem	BioRad Gel Doc 1000 (v 2.1, 1995, BioRad Laboratories, Hercules, USA)
Gelelektrophoresekammer (SDS-PAGE)	MGV-202 (C.B.S. Scientific, Kalifornien, USA)
Gelelektrophoresekammer (Agarosegel)	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Lichtmikroskop	Telaval 31 (Zeiss, Oberkochen)
Magnetrührer	Ikamag RET-G (Ika-Werk, Janke & Kunkel, Staufen i. Br.)
Mikrowelle	Micromat 175 Z (AEG) und Dimension 4 (Panasonic Service, Wiesbaden)

PCR-Cycler	TGradient Thermocycler Biometra®; (Biometra, Göttingen)
pH-Meter	PHM 62 (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark)
Pipetten	Pipetman P20, P100, P200, P1000, P5000, P10000 (Gilson, Frankreich)
Pipettierhilfe	pipetus®-akku (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)
Powersupply	PowerPac Basic (Bio-Rad Laboratories GmbH)
Realtime-PCR-Cycler	Lightcycler® 1.5 Real Time PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim)
Schüttler Orbit LS	(Labnet, Ried im Innkreis, Österreich)
Spectrophotometer	Biochrom WPA S2100 Diode Array (Whatman Biometra, Göttingen)
	NanoDrop 2000 (Fisher Scientific, Wilmington, USA)
Sterile Werkbank	Lamin Air® HB 2472 und HB 2448 (Heraeus Instruments, Hanau)
Tischschüttler	GFL 3015 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
Tischzentrifuge	Galaxy Mini (VWR International, Darmstadt)
Transferkammer	Mini-PROTEAN® Tetra System (BioRad Laboratories, Hercules, USA)
Trockenschrank	(Heraeus Instruments, Hanau)
Vortexer	Vortex Genie 2, Model G-560E (Scientific Industries, Bohemia, N.Y., USA)
Waagen	PB 3002, Delta Range, max. 3100g (Mettler Toledo, Schweiz)
	AG 245, max. 210g (Mettler Toledo, Schweiz)
Wasserbäder	Köttermann Type 3042 (Köttermann, Uetze-Hänigsen, Deutschland)
Zählkammer nach Neubauer	(Marienfeld-Superior, LaudaKönigshofen)
Zentrifugen	Hettich Micro Rapid/K, Hettich Universal/K2S (Hettich, Tuttlingen)
	Labofuge 400R mit Ausschwingrotor (Heraeus)

7.2 Software

Durchflussszytometersoftware	CellQuest™ Pro Software (BD Biosciences, Heidelberg)
	BD FACSDiva software 6.0 (BD Biosciences, Heidelberg)
Gel-Analysesoftware	Image Lab™, Version 3.0 (Bio-Rad)
PCR-Primer-Design Software	Primer Blast (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/); Primer Designer 4, Version 4.10, Scientific & Educational Software (Cary, North Carolina, USA)
Lightcycler® Software	Version 3.5.3 (Roche Diagnostics; Mannheim)

7.3 Verbrauchsmaterialien

Blotting-Film	Amersham Hyperfilm ECL GE Healthcare Europe
Coulter Counter Döschen	Beckman Coulter, USA
EDTA-Monovetten	S-Monovetten® 9 ml K3E Sarstedt, Nümbrecht
Filterhalter (Alkalische Elution)	Swinnex SX 2500 Millipore, Schwalbach
Glasgeräte	Schott Spezialglas GmbH, Mainz
Glaspipetten (Zellkultur)	Hartenstein, Würzburg
Kryo-Röhrchen, steril	Nunc Kryo, 1,5 ml Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
LightCycler Capillaries (20 µL)	Roche Diagnostics, Mannheim
Membranfilter (Alkalische Elution)	Isopore Membranfilter, 2 µM Millipore Schwalbach
Nitrocellulosemembran	Hybond™-C Extra Amersham Biosciences
Pasteurpipetten	Hartenstein, Würzburg

Plastikpipetten, steril	5, 10 und 25 ml Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	10, 200 und 1000 µl Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen	5 und 10 ml Hartenstein, Würzburg
Pipettenspitzen mit Filter	ART® Thermo Scientific, Dreieich
Safelock® Caps	Eppendorf, Hamburg
Spritzen (Alkalische Elution)	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen, Plastik	Greiner Bio-One, Frickenhausen

7.4 Chemikalien

30 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose (Typ I, low EEO)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Aktivkohle	Merck, Darmstadt
Albumin Fraktion V, proteasefrei	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth, Karlsruhe
BIORAD Protein Assay	Bio-Rad, Hercules, USA
Bisbenzimid (Hoechst No. 33258)	Sigma Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
cOmplete,	Roche Diagnostics, Mannheim
	Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets
DEPC	Carl Roth, Karlsruhe
DMSO	Sigma Aldrich, Steinheim
Eichlösungen (pH 5, 7, 8, 10, 11)	Merck, Darmstadt

EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Entwickler	Ilford, England
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, technisch	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
FCS PAA Laboratories, Cölbe	(GE Healthcare Europe GmbH)
Fixierer Rapid Fixer	Ilford, England
Formaldehyd, 36 %	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycerol	Sigma Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Isoton II-Lösung	Beckman Coulter, Krefeld
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kohlendioxid für Brutschränke	Linde, Höllriegelskreuth
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natrium-Deoxycholat	Sigma Aldrich, Steinheim
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat	Dihydrat Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid, 50 mM	Life Technologies GmbH, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAA Laboratories, Cölbe (GE Healthcare Europe GmbH)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich, Steinheim
Platinum® Tfi Reaction buffer, 5fach	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ponceau S	Sigma Aldrich, Steinheim

Propidiumjodid	Sigma Aldrich, Steinheim
Proteinase K	Carl Roth, Karlsruhe
Salzsäure, 37 %	Merck, Darmstadt
SDS-Pellets	Carl Roth, Karlsruhe
Stickstoff, flüssig	Linde, Höllriegelskreuth
Sulfosalicylsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
Tannenzäpfle	Badische Staatsbrauerei Rothaus
TEAH	Merck, Darmstadt
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim
Trizol	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Trypanblau-Lösung, 0,4 %	Sigma Aldrich, Steinheim
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe

7.5 Inhibitoren & Behandlungen

LSD1-Inhibitor OG-L002	Selleck Chem, Houston, USA (100 mM in DMSO)
LSD1-Inhibitor Pargyline-HCl	Sigma Aldrich, Steinheim (<i>frisch hergestellt in PBS</i>)
APE1-Inhibitor E3330	Sigma Aldrich, Steinheim (25 mg/mL in DMSO)
APE1-Inhibitor CRT0044876	Sigma Aldrich, Steinheim (400 mM in DMSO)
ERK-Inhibitor U-0126	Biomol, Hamburg (10 mM in DMSO)
JNK-Inhibitor SP600125	Sigma Aldrich, Steinheim (30 mM in DMSO)
p38-Inhibitor PD169316	Sigma Aldrich, Steinheim (10 mM in DMSO)
Dexamethason	Sigma Aldrich, Steinheim (<i>frisch hergestellt; in DMSO gelöst und mit PBS vor- sichtig weiter verdünnt</i>)
8-oxoGuanin-HCl	Sigma Aldrich, Steinheim (<i>frisch hergestellt; in 2M NaOH zu 1 mg/mL gelöst, in PBS weiter verdünnt</i>)

7.6 Kits

RevertAid H Minus First Strand	Thermo Scientific, Dreieich (cDNA Synthesis Kit)
Light Cycler® FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim
QIAamp® DNA Mini Kit (50)	Qiagen Sciences, Germantown, USA

7.7 Enzyme

APE1	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase	aus E. coli; hergestellt von I. Schulz (Rohextrakt) nach (BOITEUX et al. 1990)
FPG	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Proteinase K (lyophilisiert)	Carl Roth, Karlsruhe
Tfi DNA Polymerase	Life Technologies GmbH, Darmstadt

7.8 DNA, Marker & Auftragepuffer

dNTP-Mix, 10 mM each	Thermo Scientific, Dreieich
GeneRuler 100 bp DNA Ladder inclusive 6fach DNA Loading Dye (SM0241)	Thermo Scientific, Dreieich
Gene Ruler 100 bp Plus (SM0321)	Thermo Scientific, Dreieich
Kalbsthymus-DNA	Sigma Aldrich, Steinheim
PM2-Plasmid-DNA; Größe: 10000 bp	DNA des Bakteriophagen PM2; Präparation nach (SALDITT et al. 1972) von I. Schulz, Mainz
2x RNA Loading Dye (R0641)	Thermo Scientific, Dreieich

7.9 Primer

Alle eingesetzten Primer wurden mit Hilfe von Primer-BLAST designt und mit der Software Primer Designer 4 überprüft. Die Oligonukleotide wurden dann von Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) bezogen. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>)

Zunächst wird eine Stammlösung der Primer von 200 µM mit sterilem TE-Puffer (pH 8,0) hergestellt. Zur weiteren Verwendung werden die Primer mit H₂O auf eine Endkonzentration von 2 µM gebracht und bei -20 °C gelagert.

Primer für murine Gene

gene	for	rev
HPRT1	GAGGAGTCCTGTTGATGTTGCCAG	GGCTGGCCTATAGGCTCATAGTGC
ACTB	GTGGGCCGCTCTAGGCACCA	CGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG
TNF-α	ATGAGCACAGAAAGCATGATC	TACAGGCTTGCTCACTCGAATT
MIP1-α	CAGCGAGTACCAGTCCCTTTT	CCTCGTGCCTCCAAGA
IL6	CCGGAGAGGAGACTTCACAG	GGAAATTGGGGTAGGAAGGA
MCP1	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TTGAGGTGGTTGTGAAAAAG

Primer für humane Gene:

gene	for	rev
18S	CTTCACAGGAGGCTACAC	CTTCGGCCACACCCTTAAT
IL6	AATTCGGTACATCCTCGACGG	GGTTGTTTTCTGTCAGTGCC
OGG1	CCGAGCCATCCTGGAAGAA	AGTTTCCCAGTTCCTTGTGGT
IL6 exon	GCTGCACTTTTCCCCCTAGT	TTCTCTTTCGTTCCCGGTGG
IL6 intron	CTGACTTAGCAAGCCTCGGG	CCACTGATCCGGTGGTGTA

murin	Tann [°C]	Taq [°C]	Größe [bp]
HPRT1	65	72	173
β-Actin	65	84	245
TNF-α	65	84	276
MIP1-α	65	78	363
IL6	55	72	421
MCP1	65	80	142
human	Tann [°C]	Taq [°C]	Größe [bp]
18S	60	76	157
IL6	66	72	101
OGG1	61	86	269
IL6 exon	61	80	239
IL6 intron	62	80	182

7.10 Antikörper

Western Blot:

β-Actin (C4) (sc-4778; Lot C3012) 1:2.000 in 0,1% TBST (1% BSA)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
OGG1 (rabbit mAb), (5104-1; Lot YIO 10702C) 1:20.000 in 0,1% TBST (1% BSA)	Biomol GmbH, Hamburg
Goat anti rabbit IgG-HRP (sc-2004, Lot F1212) 1:2.000 in 0,1% TBST (1% BSA)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Goat anti mouse IgG-HRP (SC-2005, Lot A2312) 1:2.000 in 0,1% TBST (1% BSA)	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (26616)	Thermo Scientific, Dreieich

Durchflußzytometrie:

MHCII-APC/Cy7 anti-mouse (M5.114.15.2) 1:1000	BioLegend
CD11c-BV605 anti-mouse (N418) 1:1000	BioLegend
CD45R/B220-FITC anti-mouse (RA3-6B2) 1:400	BioLegend
CD8-PE-Cy7 anti-mouse (53-6.7) 1:400	eBioscience
CD4-BV785 anti-mouse (GK1.5) 1:500	BioLegend
F4/80-APC anti-mouse (BM8) 1:400	BioLegend
CD11b-BV421 anti-mouse (M1/70) 1:400	BioLegend
TNFα-PE anti-mouse (MP6-XT22) 1:100	BioLegend
ratIgG2a-PE (Isotyp) (RTK2758) 1:100	BioLegend

Fixable Viability Dye eFluor® 506	eBioscience
Anti-Mouse CD16/CD32 (Fc-Block) (93) 1:400	eBioscience
Anti-Mouse CD11b PE (M1/70) 1:400	eBioscience
Anti-Mouse F4/80 Antigen FITC (BM8) 1:400	eBioscience

7.11 Maus-Stämme & Zelllinien

Mausstämme:

Die eingesetzten *Wildtyp*- und *Ogg1^{-/-}*-Mäuse wurden von Dr. Markus Fusser durch die Kreuzung von BigBlue®-Mäusen und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen in drei Schritten generiert und besitzen somit den gleichen genetischen Hintergrund. Zu Beginn wurden *Wildtyp*- und *Ogg1^{-/-}*-Mäuse nochmals verpaart und durch Genotypisierung aus den Nachkommen *Ogg1^{+/-}*- sowie *Ogg1^{-/-}*-Mäuse welche somit nur 1 Generation voneinander entfernt sind.

BigBlue®-Mäuse: Homozygote transgene Männchen von der Firma Stratagene (Germantown, USA) haben den Stammhintergrund C57BL6 und tragen auf dem Chromosom 7 das bakterielle *lacI* -Gen als Transgen.

Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}-Mäuse: Homozygot transgene C57BL6.J Tiere wurden von Dr. Arne Klungland (Institute of Medical Microbiology, Rikshospitalet und Universität Oslo, Norwegen) zur Verfügung gestellt, und in der Arbeit als Lindahl-Mäuse bezeichnet.

Organe der *Ogg1^{-/-}*-Mäuse nach Nakabeppu wurden von Prof. Dr Niehrs vom IMB Mainz zur Verfügung gestellt.

Zelllinien:

HeLa:

Die in dieser Arbeit verwendeten HeLa-Zellen wurden von PD Dr. Andriy Khobta zur Verfügung gestellt und enthalten einen stabilen shRNA Knockdown von OGG1 (Allgayer et al. 2013). Zur Vereinfachung wird der verwendete Klon 12 nur als OGG1 KD bezeichnet. Zum Vergleich wurde jeweils ein mit pENTR/pSuper+ leer-transfizierter Klon verwendet der nur als Kontrolle bezeichnet wird.

J774.2

Die Zelllinie J774.2 wurde von Sigma Aldrich bezogen. Es handelt sich dabei um eine reklonierte Zelllinie einer der originalen Zelllinie J774.1 eines Tumors einer BALB/c-Maus.

7.12 Puffer, Lösungen & Medien

7.12.1 Zellkultur

7.12.1.1 Milzzellen

PBSCMF pH 7,5

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
6,5 mM Na₂HPO₄
1,5 mM KH₂PO₄
*in entionisiertem Wasser auf pH 7,5
eingestellt und autoklaviert*

PBS

1,4 M NaCl
0,1 M NaH₂PO₄
*in entionisiertem-Wasser auf pH 7,2
eingestellt und autoklaviert*

Erythrozyten-Lysepuffer

8,29 g/L NH₄Cl
1 g/L KHCO₃
0,037 g/L EDTA
*in entionisiertem-Wasser auf pH 7,4
eingestellt und sterilfiltriert (0,2 µm)*

Kulturmedium

RPMI 1640 (Gibco)
10 % FCS
Penicillin (100 U/ml)
Streptomycin (100 µg/ml)

Fixierung-Permeabilisierung

Foxp3/Transcription Factor Staining Set
(ebioscience Frankfurt, Deutschland)

GM-Puffer

1x PBS (s.o.)
0,5% BSA
5 mM EDTA
0,01% NaN₃

7.12.1.2 Bonemarrow-derived-macrophages (BMDM)

PBSCMF	s.o.
Erythrozyten-Lysepuffer	s.o.
BM-Mac	RPMI 1640 (Gibco) 10 % FCS 10 % L929 Kulturüberstand 1 % Pyruvat von AK Bopp, Institut für Immunologie, Universitätsmedizin Mainz

7.12.1.3 HeLa/J774.2

Kulturmedium, HeLa	DMEM (Gibco) 10 % FCS Penicillin (100 U/ml) Streptomycin (100 µg/ml)
Kulturmedium, J774.2	RPMI 1640 (Gibco) 10 % FCS Penicillin (100 U/ml) Streptomycin (100 µg/ml)
Einfriermedium zur Kryokonservierung	FCS 10 % DMSO
Trypsin-EDTA	Gibco by Life Technologies; Darmstadt

7.12.2 **Alkalische Elution**

BE1 pH 7,5	20 mM 100 mM NaCl 1 mM Na ₂ EDTA pH-Wert mit konz. HCl einstellen, autoklaviert
BE1 mit BSA	15 g BSA 30 mL BE1 pH 7,5
BE15 pH 7,5	20 mM Tris 75 mM KCl 15 mM Na ₂ EDTA pH-Wert mit konz. HCl einstellen, autoklaviert

BE15 mit BSA	15 g BSA 30 mL BE15 pH 7,5
Lysepuffer pH 10	2 % SDS 100 mM Glycin 20 mM Na ₂ EDTA 2 H ₂ O <i>pH-Wert mit 10 N NaOH einstellen</i>
Lysepuffer mit Proteinase K	40 mg Proteinase K 100 mL Lysepuffer pH 10
Waschpuffer pH 10	20 mM Na ₂ EDTA 2 H ₂ O <i>pH-Wert mit 10 N NaOH einstellen</i>
Elutionspuffer pH 12,15	20 mM H ₄ EDTA <i>pH-Wert mit TEAH einstellen</i>
Phosphatpuffer pH 6,0	87,8 mM NaH ₂ PO ₄ H ₂ O 12,2 mM Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O <i>autoklaviert</i>
Phosphatpuffer pH 7,2	28 mM NaH ₂ PO ₄ H ₂ O 72 mM Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O
mit Bisbenzimid	1 % (v/v) Bisbenzimid (0,15 mM) <i>Zugabe der Bisbenzimid-Stammlösung erst kurz vor Benutzung, in Braunglasflasche.</i>
DNA Standard	200 µg/mL Kalbsthymus DNA <i>Lagerung der Aliquots: -20 °C, kurzzeitig: 4 °C in BE1 pH 7,5</i>
Bisbenzimid-Stammlösung	0,15 mM Bisbenzimid <i>Lagerung der Aliquots: -20 °C in Aqua dest.</i>

7.12.3 PM2-Relaxationsassay

Fällungslösung F	5 mL Natriumacetat (2,5 M) 95 mL Ethanol <i>auf pH 7,2</i>
TAE-Puffer, 10fach	400 mM Tris 500 mM Natriumacetat 100 mM EDTA <i>pH-Wert mit Essigsäure einstellen auf 7,8</i>

Stopppuffer	1 mL TAE, 1fach 7 mL Glycerol 5 mg Bromphenolblau 2 mL EDTA (50 mM, pH 7) 0,5 % SDS
-------------	---

7.12.4 Western Blot

APS, 10%	100 mg Ammoniumpersulfat 1 mL Aqua dest. <i>Lagerung der Aliquots: -20 °C</i>
Blocking-Lösung	1,5 g BSA ad 30 mL 0,1 % TBST
Elektrophoresepuffer, 5-fach	15,1 g Tris 94 g Glycin 25 mL SDS 20 % ad 1 L Aqua dest.
Laemmli-Puffer, 6-fach	8 ml 1 M Tris-HCl (pH 6,8) 2 g SDS 10 mL Glycerol Spatelspitze Bromphenolblau 1,4 mL 2-Mercaptoethanol
PMSF-Stammlösung (100 mM)	175 mg PMSF 10 mL Isopropanol <i>Lagerung der Aliquots: -20 °C</i>
Ponceaurot, 10fach	2 g Ponceau S 30 g Trichloressigsäure 30 g Sulfosalicylsäure ad 1 L Aqua dest.
Protease Inhibitor Cocktail 10fach	1 Tablette cOmplete 1 mL Aqua dest. <i>Lagerung der Aliquots: -20 °C</i>
RIPA-Puffer	1,25 ml 1M Tris-HCl (pH 7,4) 3,75 ml 1M NaCl-Lösung 250 µl Triton-X100 0,125 g Natrium-Deoxycholat 125 µl 20 % SDS 250 µl 0,5 M EDTA ad 25 ml Aqua dest. <i>Lagerung: lichtgeschützt bei 4-8 °C</i>

	<i>PMSF-Lösung erst kurz vor Gebrauch zugeben (Endkonzentration 1 mM)</i>
SDS 20%	10 g SDS ad 50 ml Aqua dest.
Sammelgel	3,425 ml Aqua dest. 850 µl 30 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Lösung 650 µl 1 M Tris (pH 6,8) 25 µl SDS 20 % 50 µl APS 10 % 5 µl TEMED
TBS, 10-fach	12,1 g Tris 87,8 g NaCl ad 1 L Aqua dest. <i>autoklaviert</i>
TBST, 0,1 %	100 ml TBS, 10-fach 1 ml Tween 20 ad 1 L Aqua dest.
TBST, 0,5 %	100 ml TBS, 10-fach 5 ml Tween 20 ad 1 L Aqua dest.
Transferpuffer	5,8 g Tris 2,9g Glycin 200 ml Ethanol ad 1 L Aqua dest. <i>Lagerung: 4-8 °C</i>
Trenngel SDS-PAGE (10%)	3,85 ml Aqua dest. 3,4 ml 30 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Lösung 2,6 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) 50 µl SDS 20 % 100 µl APS 10 % 4 µl TEMED

7.12.5 Quantitative RT-PCR

DEPC-Wasser	1 ml DEPC ad 1 L Aqua dest. <i>Gut mischen durch mehrmaliges Umschütteln, über Nacht bei RT inkubieren und anschließend autoklavieren</i>
-------------	---

Ethanol, 75 % (v/v)

75 ml Ethanol abs.
ad 100 ml DEPC-Wasser

TAE-Puffer, 50fach, pH 7,8

2 M Tris
2,5 M Natriumacetat
0,5 M EDTA
pH-Wert mit Essigsäure einstellen

TE-Puffer, pH 8,0

10 mM Tris
1 mM EDTA

Ladepuffer, 6fach

60 % v/v Glycerol
40 % v/v TAE, 6fach
0,3 µg/µl Orange G

8 Literaturverzeichnis

Aguilera-Aguirre, Leopoldo; Bacsi, Attila; Radak, Zsolt; Hazra, Tapas K.; Mitra, Sankar; Sur, Sanjiv et al. (2014): Innate inflammation induced by the 8-oxoguanine DNA glycosylase-1-KRAS-NF-kappaB pathway. In *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 193 (9), pp. 4643–4653. DOI: [10.4049/jimmunol.1401625](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401625).

Akira, Shizuo; Uematsu, Satoshi; Takeuchi, Osamu (2006): Pathogen recognition and innate immunity. In *Cell* 124 (4), pp. 783–801. DOI: [10.1016/j.cell.2006.02.015](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015).

Allgayer, Julia; Kitsera, Nataliya; Lippen, Carina von der; Epe, Bernd; Khobta, Andriy (2013): Modulation of base excision repair of 8-oxoguanine by the nucleotide sequence. In *Nucleic acids research* 41 (18), pp. 8559–8571. DOI: [10.1093/nar/gkt620](https://doi.org/10.1093/nar/gkt620).

Allgayer, Julia; Kitsera, Nataliya; Bartelt, Solveig; Epe, Bernd; Khobta, Andriy (2016): Widespread transcriptional gene inactivation initiated by a repair intermediate of 8-oxoguanine. In *Nucleic acids research* 44 (15), pp. 7267–7280. DOI: [10.1093/nar/gkw473](https://doi.org/10.1093/nar/gkw473).

Amente, S.; Bertoni, A.; Morano, A.; Lania, L.; Avvedimento, E. V.; Majello, B. (2010): LSD1-mediated demethylation of histone H3 lysine 4 triggers Myc-induced transcription. In *Oncogene* 29 (25), pp. 3691–3702. DOI: [10.1038/onc.2010.120](https://doi.org/10.1038/onc.2010.120).

Ando, Kozue; Hirao, Satoshi; Kabe, Yasuaki; Ogura, Yuji; Sato, Iwao; Yamaguchi, Yuki et al. (2008): A new APE1/Ref-1-dependent pathway leading to reduction of NF-kappaB and AP-1, and activation of their DNA-binding activity. In *Nucleic acids research* 36 (13), pp. 4327–4336. DOI: [10.1093/nar/gkn416](https://doi.org/10.1093/nar/gkn416).

Arch, R. H.; Gedrich, R. W.; Thompson, C. B. (1998): Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)—a family of adapter proteins that regulates life and death. In *Genes & development* 12 (18), pp. 2821–2830.

Ba, Xueqing; Bacsi, Attila; Luo, Jixian; Aguilera-Aguirre, Leopoldo; Zeng, Xianlu; Radak, Zsolt et al. (2014): 8-oxoguanine DNA glycosylase-1 augments proinflammatory gene expression by facilitating the recruitment of site-specific transcription factors. In *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 192 (5), pp. 2384–2394. DOI: [10.4049/jimmunol.1302472](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302472).

Bacsi, Attila; Aguilera-Aguirre, Leopoldo; Szczesny, Bartosz; Radak, Zsolt; Hazra, Tapas K.; Sur, Sanjiv et al. (2013): Down-regulation of 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 expression in the airway epithelium ameliorates allergic lung inflammation. In *DNA repair* 12 (1), pp. 18–26. DOI: [10.1016/j.dnarep.2012.10.002](https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2012.10.002).

Banerjee, Anirban; Santos, Webster L.; Verdine, Gregory L. (2006): Structure of a DNA glycosylase searching for lesions. In *Science* (New York, N.Y.) 311 (5764), pp. 1153–1157. DOI: [10.1126/science.1120288](https://doi.org/10.1126/science.1120288).

Barnes, P. J. (1998): Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. In *Clinical science* (London, England : 1979) 94 (6), pp. 557–572.

Bauer, Martina; Goldstein, Michael; Christmann, Markus; Becker, Huong; Heylmann, Daniel; Kaina, Bernd (2011): Human monocytes are severely impaired in base and DNA double-strand break repair that renders them vulnerable to oxidative stress. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (52), pp. 21105–21110. DOI: [10.1073/pnas.1111919109](https://doi.org/10.1073/pnas.1111919109).

Berger, Shelley L. (2007): The complex language of chromatin regulation during transcription. In *Nature* 447 (7143), pp. 407–412. DOI: [10.1038/nature05915](https://doi.org/10.1038/nature05915).

- Beutler, Bruce; Rietschel, Ernst Th (2003):** *Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin.* In *Nature reviews. Immunology* 3 (2), pp. 169–176. DOI: 10.1038/nri1004.
- Bhatt, Dev; Ghosh, Sankar (2014):** *Regulation of the NF-kappaB-Mediated Transcription of Inflammatory Genes.* In *Frontiers in immunology* 5, p. 71. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00071.
- Bienert, Gerd P.; Schjoerring, Jan K.; Jahn, Thomas P. (2006):** *Membrane transport of hydrogen peroxide.* In *Biochimica et biophysica acta* 1758 (8), pp. 994–1003. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.02.015.
- Bjorge, Monica D.; Hildrestrand, Gunn A.; Scheffler, Katja; Suganthan, Rajikala; Rolseth, Veslemoy; Kusnierczyk, Anna et al. (2015):** *Synergistic Actions of Ogg1 and Mutyh DNA Glycosylases Modulate Anxiety-like Behavior in Mice.* In *Cell reports* 13 (12), pp. 2671–2678. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.12.001.
- Black, R. A.; Rauch, C. T.; Kozlosky, C. J.; Peschon, J. J.; Slack, J. L.; Wolfson, M. F. et al. (1997):** *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells.* In *Nature* 385 (6618), pp. 729–733. DOI: 10.1038/385729a0.
- Blainey, Paul C.; van Oijen, Antoine M.; Banerjee, Anirban; Verdine, Gregory L.; Xie, X. Sunney (2006):** *A base-excision DNA-repair protein finds intrahelical lesion bases by fast sliding in contact with DNA.* In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (15), pp. 5752–5757. DOI: 10.1073/pnas.0509723103.
- Boiteux, S.; Radicella, J. P. (2000):** *The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis.* In *Archives of biochemistry and biophysics* 377 (1), pp. 1–8. DOI: 10.1006/abbi.2000.1773.
- Boldogh, Istvan; Hajas, Gyorgy; Aguilera-Aguirre, Leopoldo; Hegde, Muralidhar L.; Radak, Zsolt; Bacsí, Attila et al. (2012):** *Activation of ras signaling pathway by 8-oxoguanine DNA glycosylase bound to its excision product, 8-oxoguanine.* In *The Journal of biological chemistry* 287 (25), pp. 20769–20773. DOI: 10.1074/jbc.C112.364620.
- Bradley, J. R. (2008):** *TNF-mediated inflammatory disease.* In *The Journal of pathology* 214 (2), pp. 149–160. DOI: 10.1002/path.2287.
- Carswell, E. A.; Old, L. J.; Kassel, R. L.; Green, S.; Fiore, N.; Williamson, B. (1975):** *An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.* In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (9), pp. 3666–3670.
- Cerami, A.; Ikeda, Y.; Le Trang, N.; Hotez, P. J.; Beutler, B. (1985):** *Weight loss associated with an endotoxin-induced mediator from peritoneal macrophages: the role of cachectin (tumor necrosis factor).* In *Immunology letters* 11 (3-4), pp. 173–177.
- Cesaratto, Laura; Codarin, Erika; Vascotto, Carlo; Leonardi, Antonio; Kelley, Mark R.; Tiribelli, Claudio; Tell, Gianluca (2013):** *Specific inhibition of the redox activity of ape1/ref-1 by e3330 blocks tnfr-alpha-induced activation of IL-8 production in liver cancer cell lines.* In *PloS one* 8 (8), e70909. DOI: 10.1371/journal.pone.0070909.
- Cesta, Mark F. (2006):** *Normal structure, function, and histology of the spleen.* In *Toxicologic pathology* 34 (5), pp. 455–465. DOI: 10.1080/01926230600867743.
- Chakraborty, Anirban; Wakamiya, Maki; Venkova-Canova, Tatiana; Pandita, Raj K.; Aguilera-Aguirre, Leopoldo; Sarker, Altaf H. et al. (2015):** *Neil2-null Mice Accumulate Oxidized DNA Bases in the Transcriptionally Active Sequences of the Genome and Are Susceptible to Innate Inflammation.* In *The Journal of biological chemistry* 290 (41), pp. 24636–24648. DOI: 10.1074/jbc.M115.658146.
- Chang, L.; Karin, M. (2001):** *Mammalian MAP kinase signalling cascades.* In *Nature* 410 (6824), pp. 37–40. DOI: 10.1038/35065000.
- Chen, F. E.; Huang, D. B.; Chen, Y. Q.; Ghosh, G. (1998):** *Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA.* In *Nature* 391 (6665), pp. 410–413. DOI: 10.1038/34956.

- Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987):** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In *Analytical biochemistry* 162 (1), pp. 156–159. DOI: 10.1006/abio.1987.9999.
- Colavitti, Renata; Finkel, Toren (2005):** Reactive oxygen species as mediators of cellular senescence. In *IUBMB life* 57 (4-5), pp. 277–281. DOI: 10.1080/15216540500091890.
- Culhane, Jeffrey C.; Cole, Philip A. (2007):** LSD1 and the chemistry of histone demethylation. In *Current opinion in chemical biology* 11 (5), pp. 561–568. DOI: 10.1016/j.cbpa.2007.07.014.
- David, Sheila S.; O'Shea, Valerie L.; Kundu, Sucharita (2007):** Base-excision repair of oxidative DNA damage. In *Nature* 447 (7147), pp. 941–950. DOI: 10.1038/nature05978.
- Dempsey, P. W.; Vaidya, S. A.; Cheng, G. (2003):** The art of war: Innate and adaptive immune responses. In *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 60 (12), pp. 2604–2621. DOI: 10.1007/s00018-003-3180-y.
- Deng, L.; Wang, C.; Spencer, E.; Yang, L.; Braun, A.; You, J. et al. (2000):** Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. In *Cell* 103 (2), pp. 351–361.
- Devin, A.; Cook, A.; Lin, Y.; Rodriguez, Y.; Kelliher, M.; Liu, Z. (2000):** The distinct roles of TRAF2 and RIP in IKK activation by TNF-R1: TRAF2 recruits IKK to TNF-R1 while RIP mediates IKK activation. In *Immunity* 12 (4), pp. 419–429.
- DGRH, Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie (2015):** Rheuma in Zahlen
- Fishel, Melissa L.; Kelley, Mark R. (2007):** The DNA base excision repair protein Ape1/Ref-1 as a therapeutic and chemopreventive target. In *Molecular aspects of medicine* 28 (3-4), pp. 375–395. DOI: 10.1016/j.mam.2007.04.005.
- Fleming, Aaron M.; Ding, Yun; Burrows, Cynthia J. (2017):** Oxidative DNA damage is epigenetic by regulating gene transcription via base excision repair. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (10), pp. 2604–2609. DOI: 10.1073/pnas.1619809114.
- Flohe, L.; Brigelius-Flohe, R.; Saliou, C.; Traber, M. G.; Packer, L. (1997):** Redox regulation of NF- κ B activation. In *Free radical biology & medicine* 22 (6), pp. 1115–1126.
- Forneris, Federico; Binda, Claudia; Battaglioli, Elena; Mattevi, Andrea (2008):** LSD1: oxidative chemistry for multifaceted functions in chromatin regulation. In *Trends in biochemical sciences* 33 (4), pp. 181–189. DOI: 10.1016/j.tibs.2008.01.003.
- Fortini, P.; Pascucci, B.; Parlanti, E.; D'Errico, M.; Simonelli, V.; Dogliotti, E. (2003):** 8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways. In *Mutation research* 531 (1-2), pp. 127–139.
- Fridovich, I. (1995):** Superoxide radical and superoxide dismutases. In *Annual review of biochemistry* 64, pp. 97–112. DOI: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000525.
- Gaetani, G. F.; Galiano, S.; Canepa, L.; Ferraris, A. M.; Kirkman, H. N. (1989):** Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. In *Blood* 73 (1), pp. 334–339.
- Garcia-Bassets, Ivan; Kwon, Young-Soo; Telese, Francesca; Prefontaine, Gratien G.; Hutt, Kasey R.; Cheng, Christine S. et al. (2007):** Histone methylation-dependent mechanisms impose ligand dependency for gene activation by nuclear receptors. In *Cell* 128 (3), pp. 505–518. DOI: 10.1016/j.cell.2006.12.038.
- Ghisletti, Serena; Barozzi, Iros; Mietton, Flore; Polletti, Sara; Santa, Francesca de; Venturini, Elisa et al. (2010):** Identification and characterization of enhancers controlling the inflammatory gene expression program in macrophages. In *Immunity* 32 (3), pp. 317–328. DOI: 10.1016/j.immuni.2010.02.008.

- Goto, M.; Yamada, K.; Katayama, K.; Tanaka, I. (1996):** Inhibitory effect of E3330, a novel quinone derivative able to suppress tumor necrosis factor- α generation, on activation of nuclear factor- κ B. In *Molecular pharmacology* 49 (5), pp. 860–873.
- Hajas, Gyorgy; Bacsi, Attila; Aguilera-Aguirre, Leopoldo; Hegde, Muralidhar L.; Tapas, K. Hazra; Sur, Sanjiv et al. (2013):** 8-Oxoguanine DNA glycosylase-1 links DNA repair to cellular signaling via the activation of the small GTPase Rac1. In *Free radical biology & medicine* 61, pp. 384–394. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.011.
- Halliwell, B. (1996):** Free radicals, proteins and DNA. Oxidative damage versus redox regulation. In *Biochem. Soc. Trans.* 24 (4), pp. 1023–1027. DOI: 10.1042/bst0241023.
- Halliwell, B.; Aruoma, O. I. (1991):** DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. In *FEBS letters* 281 (1-2), pp. 9–19.
- Hashiguchi, K.; Stuart, J. A.; Souza-Pinto, N. C. de; Bohr, V. A. (2004):** The C-terminal alphaO helix of human Ogg1 is essential for 8-oxoguanine DNA glycosylase activity: the mitochondrial beta-Ogg1 lacks this domain and does not have glycosylase activity. In *Nucleic acids research* 32 (18), pp. 5596–5608. DOI: 10.1093/nar/gkh863.
- Hayden, Matthew S.; Ghosh, Sankar (2008):** Shared principles in NF- κ B signaling. In *Cell* 132 (3), pp. 344–362. DOI: 10.1016/j.cell.2008.01.020.
- Heinz, Sven; Benner, Christopher; Spann, Nathanael; Bertolino, Eric; Lin, Yin C.; Laslo, Peter et al. (2010):** Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. In *Molecular cell* 38 (4), pp. 576–589. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.05.004.
- Hirano, T.; Matsuda, T.; Turner, M.; Miyasaka, N.; Buchan, G.; Tang, B. et al. (1988):** Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. In *European journal of immunology* 18 (11), pp. 1797–1801. DOI: 10.1002/eji.1830181122.
- Hitomi, Kenichi; Iwai, Shigenori; Tainer, John A. (2007):** The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: implications for DNA damage recognition, removal, and repair. In *DNA repair* 6 (4), pp. 410–428. DOI: 10.1016/j.dnarep.2006.10.004.
- Hoffmann, Alexander; Baltimore, David (2006):** Circuitry of nuclear factor κ B signaling. In *Immunological reviews* 210, pp. 171–186. DOI: 10.1111/j.0105-2896.2006.00375.x.
- Holden, Neil S.; Squires, Paul E.; Kaur, Manminder; Bland, Rosemary; Jones, Carol E.; Newton, Robert (2008):** Phorbol ester-stimulated NF- κ B-dependent transcription: roles for isoforms of novel protein kinase C. In *Cellular signalling* 20 (7), pp. 1338–1348. DOI: 10.1016/j.cellsig.2008.03.001.
- Hsu, Gerald W.; Ober, Matthias; Carell, Thomas; Beese, Lorena S. (2004):** Error-prone replication of oxidatively damaged DNA by a high-fidelity DNA polymerase. In *Nature* 431 (7005), pp. 217–221. DOI: 10.1038/nature02908.
- Huffman, Joy L.; Sundheim, Ottar; Tainer, John A. (2005):** DNA base damage recognition and removal: new twists and grooves. In *Mutation research* 577 (1-2), pp. 55–76. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2005.03.012.
- Hunter, Christopher A.; Jones, Simon A. (2015):** IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. In *Nature immunology* 16 (5), pp. 448–457. DOI: 10.1038/ni.3153.
- Iwasaki, Hidenori; Takeuchi, Osamu; Teraguchi, Shunsuke; Matsushita, Kazufumi; Uehata, Takuya; Kuniyoshi, Kanako et al. (2011):** The I κ B kinase complex regulates the stability of cytokine-encoding mRNA induced by TLR-IL-1R by controlling degradation of regnase-1. In *Nature immunology* 12 (12), pp. 1167–1175. DOI: 10.1038/ni.2137.
- Janeway, Charles A., JR; Medzhitov, Ruslan (2002):** Innate immune recognition. In *Annual review of immunology* 20, pp. 197–216. DOI: 10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359.

- Jiang, Y.; Woronicz, J. D.; Liu, W.; Goeddel, D. V. (1999):** Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains. In *Science (New York, N.Y.)* 283 (5401), pp. 543–546.
- Jones, Graeme; Ding, Changhai (2010):** Tocilizumab: a review of its safety and efficacy in rheumatoid arthritis. In *Clinical medicine insights. Arthritis and musculoskeletal disorders* 3, pp. 81–89. DOI: [10.4137/CMAMD.S4864](https://doi.org/10.4137/CMAMD.S4864).
- Ju, Bong-Gun; Lunyak, Victoria V.; Perissi, Valentina; Garcia-Bassets, Ivan; Rose, David W.; Glass, Christopher K.; Rosenfeld, Michael G. (2006):** A topoisomerase II β -mediated dsDNA break required for regulated transcription. In *Science (New York, N.Y.)* 312 (5781), pp. 1798–1802. DOI: [10.1126/science.1127196](https://doi.org/10.1126/science.1127196).
- Kang, J. L.; Pack, I. S.; Lee, H. S.; Castranova, V. (2000):** Enhancement of nuclear factor-kappaB activation and protein tyrosine phosphorylation by a tyrosine phosphatase inhibitor, pervanadate, involves reactive oxygen species in silica-stimulated macrophages. In *Toxicology* 151 (1-3), pp. 81–89.
- Karytinis, Aristotele; Forneris, Federico; Profumo, Antonella; Ciossani, Giuseppe; Battaglioli, Elena; Binda, Claudia; Mattevi, Andrea (2009):** A novel mammalian flavin-dependent histone demethylase. In *The Journal of biological chemistry* 284 (26), pp. 17775–17782. DOI: [10.1074/jbc.M109.003087](https://doi.org/10.1074/jbc.M109.003087).
- Katafuchi, Atsushi; Nohmi, Takehiko (2010):** DNA polymerases involved in the incorporation of oxidized nucleotides into DNA: their efficiency and template base preference. In *Mutation research* 703 (1), pp. 24–31. DOI: [10.1016/j.mrgentox.2010.06.004](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.06.004).
- Kathe, S. D., Shen, G. P. and Wallace, S. S. (2004):** Single-stranded breaks in DNA but not oxidative DNA base damages block transcriptional elongation by RNA polymerase II in HeLa cell nuclear extracts. *J. Biol. Chem.*, 279, 18511–18520
- Klungland, A.; Rosewell, I.; Hollenbach, S.; Larsen, E.; Daly, G.; Epe, B. et al. (1999a):** Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (23), pp. 13300–13305.
- Kouzarides, Tony (2007):** Chromatin modifications and their function. In *Cell* 128 (4), pp. 693–705. DOI: [10.1016/j.cell.2007.02.005](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005).
- Krishnamurthy, Nirmala; Zhao, Xiaobei; Burrows, Cynthia J.; David, Sheila S. (2008):** Superior removal of hydantoin lesions relative to other oxidized bases by the human DNA glycosylase hNEIL1. In *Biochemistry* 47 (27), pp. 7137–7146. DOI: [10.1021/bi800160s](https://doi.org/10.1021/bi800160s).
- Kubota, Y.; Nash, R. A.; Klungland, A.; Schar, P.; Barnes, D. E.; Lindahl, T. (1996):** Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. In *The EMBO journal* 15 (23), pp. 6662–6670.
- Legrand-Poels, S.; Schoonbroodt, S.; Piette, J. (2000):** Regulation of interleukin-6 gene expression by pro-inflammatory cytokines in a colon cancer cell line. In *The Biochemical journal* 349 Pt 3, pp. 765–773.
- Levy, Dan; Kuo, Alex J.; Chang, Yanqi; Schaefer, Uwe; Kitson, Christopher; Cheung, Peggie et al. (2011):** Lysine methylation of the NF-kappaB subunit RelA by SETD6 couples activity of the histone methyltransferase GLP at chromatin to tonic repression of NF-kappaB signaling. In *Nature immunology* 12 (1), pp. 29–36. DOI: [10.1038/ni.1968](https://doi.org/10.1038/ni.1968).
- Li, Guoping; Yuan, Kefei; Yan, Chunguang; Fox, John 3rd; Gaid, Madeleine; Breitwieser, Wayne et al. (2012):** 8-Oxoguanine-DNA glycosylase 1 deficiency modifies allergic airway inflammation by regulating STAT6 and IL-4 in cells and in mice. In *Free radical biology & medicine* 52 (2), pp. 392–401. DOI: [10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.490](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.490).
- Liang, Yu; Quenelle, Debra; Vogel, Jodi L.; Mascaro, Cristina; Ortega, Alberto; Kristie, Thomas M. (2013):** A novel selective LSD1/KDM1A inhibitor epigenetically blocks herpes simplex virus lytic replication and reactivation from latency. In *mBio* 4 (1), e00558-12. DOI: [10.1128/mBio.00558-12](https://doi.org/10.1128/mBio.00558-12).

- Lippen, Carina von der; Sahu, Sanjeeb; Seifermann, Marco; Tiwari, Vijay K.; Epe, Bernd (2015):** The repair of oxidized purines in the DNA of human lymphocytes requires an activation involving NF- κ B-mediated upregulation of OGG1. In *DNA repair* 25, pp. 1–8. DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.10.008.
- Mabley, Jon G.; Pacher, Pal; Deb, Amitabha; Wallace, Rebecca; Elder, Rhoderick H.; Szabo, Csaba (2005):** Potential role for 8-oxoguanine DNA glycosylase in regulating inflammation. In *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (2), pp. 290–292. DOI: 10.1096/fj.04-2278fje.
- Madhusudan, Srinivasan; Smart, Fiona; Shrimpton, Paul; Parsons, Jason L.; Gardiner, Laurence; Houlbrook, Sue et al. (2005):** Isolation of a small molecule inhibitor of DNA base excision repair. In *Nucleic acids research* 33 (15), pp. 4711–4724. DOI: 10.1093/nar/gki781.
- Metzger, Eric; Imhof, Axel; Patel, Dharmeshkumar; Kahl, Philip; Hoffmeyer, Katrin; Friedrichs, Nicolaus et al. (2010):** Phosphorylation of histone H3T6 by PKC β (I) controls demethylation at histone H3K4. In *Nature* 464 (7289), pp. 792–796. DOI: 10.1038/nature08839.
- Metzger, Eric; Wissmann, Melanie; Yin, Na; Muller, Judith M.; Schneider, Robert; Peters, Antoine H F M et al. (2005):** LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. In *Nature* 437 (7057), pp. 436–439. DOI: 10.1038/nature04020.
- Mimasu, Shinya; Sengoku, Toru; Fukuzawa, Seketsu; Umehara, Takashi; Yokoyama, Shigeyuki (2008):** Crystal structure of histone demethylase LSD1 and tranylcypromine at 2.25 Å. In *Biochemical and biophysical research communications* 366 (1), pp. 15–22. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.11.066.
- Moller, Peter; Lohr, Mille; Folkmann, Janne K.; Mikkelsen, Lone; Loft, Steffen (2010):** Aging and oxidatively damaged nuclear DNA in animal organs. In *Free radical biology & medicine* 48 (10), pp. 1275–1285. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.02.003.
- Murphy, D. L.; Lipper, S.; Slater, S.; Shiling, D. (1979):** Selectivity of clorgyline and pargyline as inhibitors of monoamine oxidases A and B in vivo in man. In *Psychopharmacology* 62 (2), pp. 129–132.
- Nahar, Ibrahim K.; Shojania, Kam; Marra, Carlo A.; Alamgir, Abul H.; Anis, Aslam H. (2003):** Infliximab treatment of rheumatoid arthritis and Crohn's disease. In *The Annals of pharmacotherapy* 37 (9), pp. 1256–1265. DOI: 10.1345/aph.1C039.
- Nanda, Shikha; Bathon, Joan M. (2004):** Etanercept: a clinical review of current and emerging indications. In *Expert opinion on pharmacotherapy* 5 (5), pp. 1175–1186. DOI: 10.1517/14656566.5.5.1175.
- Natoli, G.; Costanzo, A.; Ianni, A.; Templeton, D. J.; Woodgett, J. R.; Balsano, C.; Levrero, M. (1997):** Activation of SAPK/JNK by TNF receptor 1 through a noncytotoxic TRAF2-dependent pathway. In *Science (New York, N.Y.)* 275 (5297), pp. 200–203.
- O'Callaghan, Nathan; Baack, Natalie; Sharif, Razinah; Fenech, Michael (2011):** A qPCR-based assay to quantify oxidized guanine and other FPG-sensitive base lesions within telomeric DNA. In *BioTechniques* 51 (6), pp. 403–411. DOI: 10.2144/000113788.
- Ohno, Mizuki; Miura, Tomofumi; Furuichi, Masato; Tominaga, Yohei; Tsuchimoto, Daisuke; Sakumi, Kunihiro; Nakabeppu, Yusaku (2006):** A genome-wide distribution of 8-oxoguanine correlates with the preferred regions for recombination and single nucleotide polymorphism in the human genome. In *Genome research* 16 (5), pp. 567–575. DOI: 10.1101/gr.4769606.
- O'Neill, Luke A. J.; Bowie, Andrew G. (2007):** The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling. In *Nature reviews. Immunology* 7 (5), pp. 353–364. DOI: 10.1038/nri2079.
- O'Shea, John M.; Perkins, Neil D. (2008):** Regulation of the RelA (p65) transactivation domain. In *Biochemical Society transactions* 36 (Pt 4), pp. 603–608. DOI: 10.1042/BST0360603.

- Osterod, Marcel; Larsen, Elisabeth; Le Page, Florence; Hengstler, Jan G.; van der Horst, Gijsbertus T. J.; Boiteux, Serge et al. (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. In *Oncogene* 21 (54), pp. 8232–8239. DOI: 10.1038/sj.onc.1206027.
- Pan, Lang; Hao, Wenjing; Zheng, Xu; Zeng, Xianlu; Ahmed Abbasi, Adeel; Boldogh, Istvan; Ba, Xueqing (2017):** OGG1-DNA interactions facilitate NF-kappaB binding to DNA targets. In *Scientific reports* 7, p. 43297. DOI: 10.1038/srep43297.
- Pandita, Tej K. (2014):** Unraveling the novel function of the DNA repair enzyme 8-oxoguanine-DNA glycosylase in activating key signaling pathways. In *Free radical biology & medicine* 73, pp. 439–440. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.013.
- Perillo, Bruno; Ombra, Maria Neve; Bertoni, Alessandra; Cuozzo, Concetta; Sacchetti, Silvana; Sasso, Annarita et al. (2008):** DNA oxidation as triggered by H3K9me2 demethylation drives estrogen-induced gene expression. In *Science (New York, N.Y.)* 319 (5860), pp. 202–206. DOI: 10.1126/science.1147674.
- Pfeffer, K.; Matsuyama, T.; Kundig, T. M.; Wakeham, A.; Kishihara, K.; Shahinian, A. et al. (1993):** Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. In *Cell* 73 (3), pp. 457–467.
- Prusty, Bhupesh K.; Das, Bhudev C. (2005):** Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin. In *International journal of cancer* 113 (6), pp. 951–960. DOI: 10.1002/ijc.20668.
- Pursell, Zachary F.; McDonald, J. Tyson; Mathews, Christopher K.; Kunkel, Thomas A. (2008):** Trace amounts of 8-oxo-dGTP in mitochondrial dNTP pools reduce DNA polymerase gamma replication fidelity. In *Nucleic acids research* 36 (7), pp. 2174–2181. DOI: 10.1093/nar/gkn062.
- Radicella, J. P.; Dherin, C.; Desmaze, C.; Fox, M. S.; Boiteux, S. (1997):** Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (15), pp. 8010–8015.
- Ray, Paul D.; Huang, Bo-Wen; Tsuji, Yoshiaki (2012):** Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. In *Cellular signalling* 24 (5), pp. 981–990. DOI: 10.1016/j.cellsig.2012.01.008.
- Robertson, A. B.; Klungland, A.; Rognes, T.; Leiros, I. (2009):** DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. In *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66 (6), pp. 981–993. DOI: 10.1007/s00018-009-8736-z.
- Rotili, Dante; Mai, Antonello (2011):** Targeting Histone Demethylases: A New Avenue for the Fight against Cancer. In *Genes & cancer* 2 (6), pp. 663–679. DOI: 10.1177/1947601911417976.
- Ruchko, Mykhaylo V.; Gorodnya, Olena M.; Pastukh, Viktor M.; Swiger, Brad M.; Middleton, Natalia S.; Wilson, Glenn L.; Gillespie, Mark N. (2009):** Hypoxia-induced oxidative base modifications in the VEGF hypoxia-response element are associated with transcriptionally active nucleosomes. In *Free radical biology & medicine* 46 (3), pp. 352–359. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.038.
- Sakumi, Kunihiro; Tominaga, Yohei; Furuichi, Masato; Xu, Ping; Tsuzuki, Teruhisa; Sekiguchi, Mutsuo; Nakabeppu, Yusaku (2003):** Ogg1 knockout-associated lung tumorigenesis and its suppression by *Mth1* gene disruption. In *Cancer research* 63 (5), pp. 902–905.
- Sampath, Harini; Vartanian, Vladimir; Rollins, M. Rick; Sakumi, Kunihiro; Nakabeppu, Yusaku; Lloyd, R. Stephen (2012):** 8-Oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) deficiency increases susceptibility to obesity and metabolic dysfunction. In *PloS one* 7 (12), pp. e51697. DOI: 10.1371/journal.pone.0051697.

- Sato, Shintaro; Sanjo, Hideki; Takeda, Kiyoshi; Ninomiya-Tsuji, Jun; Yamamoto, Masahiro; Kawai, Taro et al. (2005):** Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. In *Nature immunology* 6 (11), pp. 1087–1095. DOI: 10.1038/ni1255.
- Scheinman, R. I.; Cogswell, P. C.; Lofquist, A. K.; Baldwin, A. S., JR (1995):** Role of transcriptional activation of I kappa B alpha in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. In *Science (New York, N.Y.)* 270 (5234), pp. 283–286.
- Schuerwegh, A. J.; Stevens, W. J.; Bridts, C. H.; Clerck, L. S. de (2001):** Evaluation of monensin and brefeldin A for flow cytometric determination of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in monocytes. In *Cytometry* 46 (3), pp. 172–176.
- Shibutani, S.; Takeshita, M.; Grollman, A. P. (1991):** Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. In *Nature* 349 (6308), pp. 431–434. DOI: 10.1038/349431a0.
- Sies, H. (1991):** Oxidative stress: from basic research to clinical application. In *The American journal of medicine* 91 (3C), 31S–38S.
- Sies, H. (1993):** Strategies of antioxidant defense. In *European journal of biochemistry* 215 (2), pp. 213–219.
- Sikorsky, Jan A.; Primerano, Donald A.; Fenger, Terry W.; Denvir, James (2004):** Effect of DNA damage on PCR amplification efficiency with the relative threshold cycle method. In *Biochemical and biophysical research communications* 323 (3), pp. 823–830. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.08.168.
- Smith, C. A.; Davis, T.; Anderson, D.; Solam, L.; Beckmann, M. P.; Jerzy, R. et al. (1990):** A receptor for tumor necrosis factor defines an unusual family of cellular and viral proteins. In *Science (New York, N.Y.)* 248 (4958), pp. 1019–1023.
- Stein, B.; Baldwin, A. S., JR; Ballard, D. W.; Greene, W. C.; Angel, P.; Herrlich, P. (1993):** Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function. In *The EMBO journal* 12 (10), pp. 3879–3891.
- Stivers, James T. (2004):** Site-specific DNA damage recognition by enzyme-induced base flipping. In *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 77, pp. 37–65. DOI: 10.1016/S0079-6603(04)77002-6.
- Takada, Yasunari; Mukhopadhyay, Asok; Kundu, Gopal C.; Mahabeleshwar, Ganapati H.; Singh, Sujay; Aggarwal, Bharat B. (2003):** Hydrogen peroxide activates NF-kappa B through tyrosine phosphorylation of I kappa B alpha and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I kappa B alpha kinase and Syk protein-tyrosine kinase. In *The Journal of biological chemistry* 278 (26), pp. 24233–24241. DOI: 10.1074/jbc.M212389200.
- Takeda, Kiyoshi; Akira, Shizuo (2004):** TLR signaling pathways. In *Seminars in immunology* 16 (1), pp. 3–9.
- Tolentino J. H., Burke T. J., Mukhopadhyay S., McGregor W. G., Basu A. K. (2008):** Inhibition of DNA replication fork progression and mutagenic potential of 1,N⁶-ethenoadenine and 8-oxoguanine in human cell extracts. In *Nucleic Acids Res.* 36, 1300–1308
- Trachootham, Dunyaporn; Alexandre, Jerome; Huang, Peng (2009):** Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? In *Nature reviews. Drug discovery* 8 (7), pp. 579–591. DOI: 10.1038/nrd2803.
- Von der Lippen (2013):** Untersuchung der DNA-Reparatur in humanen Lymphozyten. URN: urn:nbn:de:hebis:77-37690 (Bibliothek der Universität Mainz)
- van Essen, Dominic; Zhu, Yina; Saccani, Simona (2010):** A feed-forward circuit controlling inducible NF-kappaB target gene activation by promoter histone demethylation. In *Molecular cell* 39 (5), pp. 750–760. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.08.010.

- Vartanian, Vladimir; Lowell, Brian; Minko, Irina G.; Wood, Thomas G.; Ceci, Jeffrey D.; George, Shakeeta et al. (2006):** *The metabolic syndrome resulting from a knockout of the NEIL1 DNA glycosylase.* In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (6), pp. 1864–1869. DOI: [10.1073/pnas.0507444103](https://doi.org/10.1073/pnas.0507444103).
- Wallach, D.; Engelmann, H.; Nophar, Y.; Aderka, D.; Kemper, O.; Hornik, V. et al. (1991):** *Soluble and cell surface receptors for tumor necrosis factor.* In *Agents and actions. Supplements* 35, pp. 51–57.
- Warken, D (2013):** *Untersuchung der Rolle Reaktiver Sauerstoffspezies und DNA-Schäden bei Hypertonie und Arteriosklerose.* URN: [urn:nbn:de:hebis:77-38214](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hebis:77-38214) (Bibliothek der Universität Mainz)
- Whitmarsh, Alan J. (2007):** *Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways.* In *Biochimica et biophysica acta* 1773 (8), pp. 1285–1298. DOI: [10.1016/j.bbamcr.2006.11.011](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.11.011).
- Wilhelm, Sheila M.; McKenney, Kathleen A.; Rivait, Kelly N.; Kale-Pradhan, Pramodini B. (2008):** *A review of infliximab use in ulcerative colitis.* In *Clinical therapeutics* 30 (2), pp. 223–230. DOI: [10.1016/j.clinthera.2008.02.014](https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2008.02.014).
- Wissmann, Melanie; Yin, Na; Muller, Judith M.; Greschik, Holger; Fodor, Barna D.; Jenuwein, Thomas et al. (2007):** *Cooperative demethylation by JMJD2C and LSD1 promotes androgen receptor-dependent gene expression.* In *Nature cell biology* 9 (3), pp. 347–353. DOI: [10.1038/ncb1546](https://doi.org/10.1038/ncb1546).
- Wright, S. D.; Ramos, R. A.; Tobias, P. S.; Ulevitch, R. J.; Mathison, J. C. (1990):** *CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein.* In *Science (New York, N.Y.)* 249 (4975), pp. 1431–1433.
- Wright, S. D.; Tobias, P. S.; Ulevitch, R. J.; Ramos, R. A. (1989):** *Lipopolysaccharide (LPS) binding protein opsonizes LPS-bearing particles for recognition by a novel receptor on macrophages.* In *The Journal of experimental medicine* 170 (4), pp. 1231–1241.
- Zarubin, Tyler; Han, Jiahuai (2005):** *Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway.* In *Cell research* 15 (1), pp. 11–18. DOI: [10.1038/sj.cr.7290257](https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290257).
- Zhang, Qi; Qi, Shankang; Xu, Mingchu; Yu, Lin; Tao, Ye; Deng, Zengqin et al. (2013):** *Structure-function analysis reveals a novel mechanism for regulation of histone demethylase LSD2/AOF1/KDM1b.* In *Cell research* 23 (2), pp. 225–241. DOI: [10.1038/cr.2012.177](https://doi.org/10.1038/cr.2012.177).
- Zhou, Anwu; Scoggin, Shane; Gaynor, Richard B.; Williams, Noelle Sevilir (2003):** *Identification of NF-kappa B-regulated genes induced by TNFalpha utilizing expression profiling and RNA interference.* In *Oncogene* 22 (13), pp. 2054–2064. DOI: [10.1038/sj.onc.1206262](https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206262).
- Ziel, Kathryn A.; Campbell, Clayton C.; Wilson, Glenn L.; Gillespie, Mark N. (2004):** *Ref-1/Ape is critical for formation of the hypoxia-inducible transcriptional complex on the hypoxic response element of the rat pulmonary artery endothelial cell VEGF gene.* In *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18 (9), pp. 986–988. DOI: [10.1096/fj.03-1160fje](https://doi.org/10.1096/fj.03-1160fje).

9 Curriculum vitae

Persönlicher Daten:

Name, Vorname: Seifermann, Marco
Geburtsdatum (Ort): 20.02.1984 (Bühl)
Anschrift: Mombacherstraße 39-41, 55122 Mainz
Telefon: +49 151 16732563
Email: mseifermann@web.de
Familienstand: verheiratet
Nationalität: deutsch

Ausbildung & Beruf:

05/2012 – 06/2017 **Wissenschaftlicher Mitarbeiter** am Institut für Pharmazie und Biochemie; Johannes-Gutenberg Universität Mainz
10/2013 **Approbation** zum Apotheker
05/2012 **Gesamtnote der Pharmazeutischen Prüfung: 1,82**
05/2011 – 04/2012 **Praktisches Jahr** nach Approbationsordnung
3. Staatsexamen gemäß Approbationsordnung (1,0)
2.Teil: 11/2011 - 04/2012 Institut für Pharmazie u. Biochemie; Pharmakologie und Toxikologie, AK Prof. Epe
1.Teil: 05/2011 - 10/2011 Gartenfeldapotheke Mainz
04/2006 – 04/2011 **Studium der Pharmazie**
Johannes Gutenberg-Universität, Mainz
04/2011: 2. Staatsexamen (1,6)
03/2009: 1. Staatsexamen (3,0)
10/2004 – 02/2006 **Studium der Verfahrenstechnik**
Technische Hochschule Karlsruhe
ohne Abschluss
07/2003 – 06/2004 **Zivildienst** am Institut für Landschaftsökologie und Naturschutz Bühl
09/2000 – 06/2003 **Allgemeine Hochschulreife**
Technisches Gymnasium Bühl (Endnote 2,5)
08/1994 – 07/2000 **Mittlere Reife**
Lothar-von-Kübel Realschule Sinzheim