

**Untersuchung der Rolle  
reaktiver Sauerstoffspezies und DNA-Schäden  
bei Hypertonie und Arteriosklerose**

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  
Daniela Krimm (geb. Warken)  
geboren in Aschaffenburg

Mainz, 2014

Tag der Prüfung: 28.07.2014

Dekan:

Erster Gutachter:

Zweiter Gutachter:

Danksagung:

# Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Theoretischer Hintergrund und Zielsetzung .....	3
2.1	Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies .....	4
2.2	Generierung reaktiver Sauerstoffspezies durch NADPH-Oxidasen.....	6
2.3	Enzymatische antioxidative Schutzmechanismen .....	8
2.4	DNA-Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies und ihre biologische Bedeutung .....	9
2.5	Möglichkeiten der DNA-Reparatur.....	11
2.5.1	Basenexzisionsreparatur .....	12
2.5.2	Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen.....	16
2.6	Rolle reaktiver Sauerstoffspezies und DNA-Schäden bei Hypertonie und Arteriosklerose.....	18
2.6.1	Hypertonie.....	18
2.6.2	Arteriosklerose .....	20
2.7	Zielsetzung .....	23
3	Material und Methoden .....	24
3.1	Material.....	24
3.1.1	Geräte .....	24
3.1.2	Chemikalien .....	25
3.1.3	Material und Geräte für den Tierversuch .....	27
3.1.4	Arbeiten mit Zellkultur, DNA und RNA .....	28
3.1.5	Durchführung der Alkalischen Elution .....	29
3.1.6	Durchführung des BigBlue® Assays .....	29
3.1.7	Isolation von RNA und Durchführung qPCR .....	29
3.1.8	Agarose-Gelelektrophorese .....	29

3.1.9	Western Blot .....	29
3.1.10	Puffer und Lösungen .....	30
3.1.10.1	Tierversuch .....	30
3.1.10.2	Isolation primärer Zellen aus Mäusen .....	30
3.1.10.3	Zellkultur .....	33
3.1.10.4	Alkalische ELution .....	33
3.1.10.5	BigBlue® Assay .....	34
3.1.10.6	Western Blot .....	35
3.1.11	Maus-Stämme .....	36
3.1.12	Zellkulturlinien .....	37
3.1.13	Antikörper .....	37
3.2	Methoden .....	38
3.2.1	Arbeiten mit Mäusen .....	38
3.2.1.1	Haltung der Tiere .....	38
3.2.1.2	Genotypisierung .....	39
3.2.1.3	Angiotensin II-Behandlung .....	40
3.2.1.4	Organisation .....	41
3.2.2	Arbeiten mit Zellkultur .....	43
3.2.3	Alkalische Elution .....	43
3.2.3.1	Prinzip der Alkalischen Elution .....	43
3.2.3.2	Versuchsaufbau .....	44
3.2.3.3	Durchführung .....	46
3.2.4	BigBlue®-Assay .....	48
3.2.4.1	Prinzip des BigBlue® Mutations-Assays .....	48
3.2.4.2	Isolation der genomischen DNA .....	49
3.2.4.3	Verpackung der genomischen DNA in Phagen .....	50
3.2.4.4	Kontrolle der Verpackungsreaktion .....	50
3.2.4.5	Screening .....	50

3.2.5	Messung der Genexpression .....	52
3.2.5.1	RNA-Isolation aus der Niere .....	52
3.2.5.2	RNA Isolation aus der Aorta .....	52
3.2.5.3	Reverse Transkription.....	53
3.2.5.4	Quantitative PCR.....	54
3.2.6	Western Blot .....	57
3.2.6.1	Herstellung des Proteinextraktes .....	57
3.2.6.2	Westernblot .....	57
3.2.7	Mikrokerne .....	58
3.2.8	Statistik .....	59
4	Ergebnisse .....	60
4.1	Untersuchung der Genotoxizität von Angiotensin II <i>in vivo</i> .....	60
4.1.1	Überprüfung physiologischer Parameter.....	60
4.1.2	Angiotensin II führt in der Niere zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies.. .....	64
4.1.3	Untersuchung der DNA-Schäden durch Angiotensin II in der Niere.....	65
4.1.3.1	Fpg-sensitive Läsionen und DNA-Einzelstrangbrüche in der Niere ...	65
4.1.3.2	DNA-Doppelstrangbrüche in der Niere .....	67
4.1.4	Untersuchung der DNA-Schäden durch Angiotensin II in Hepatozyten und Lymphozyten aus der Milz .....	68
4.1.5	Bestimmung der Mutationsfrequenzen im <i>lacI</i> -Gen in der Niere.....	70
4.1.6	Untersuchung der Mikrokern-Häufigkeit in peripheren Erythrozyten.....	73
4.1.7	Untersuchung der Genexpression in der Niere .....	74
4.1.7.1	Untersuchung der Expression von Genen der Redoxhomöostase ....	74
4.1.7.2	Untersuchung der Expression von immun-sensitiven Genen .....	75
4.2	Untersuchung der Genotoxizität von Angiotensin II <i>in vitro</i> .....	77
4.3	Arteriosklerose.....	83

4.3.1	Untersuchung der Endothelfunktion in unbehandelten Wildtyp- und <i>Ogg1</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	83
4.3.2	Untersuchung der Endothelfunktion von Wildtyp- und <i>Ogg1</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen nach Angiotensin II-Behandlung .....	85
4.3.3	Untersuchung der Genexpression in der Aorta .....	86
5	Diskussion.....	90
5.1	Ist Angiotensin II in Wildtyp- und <i>Ogg1</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen genotoxisch? .....	90
5.2	Ist eine <i>in vitro</i> -Behandlung mit Angiotensin II genotoxisch?.....	94
5.3	Welche Rolle spielen durch Angiotensin II generierte reaktive Sauerstoffspezies? .....	96
5.4	Hat OGG1 eine weitere Funktion neben seiner Rolle in der Basenexzisionsreparatur? .....	98
5.5	Wie beeinflusst die Behandlung mit Angiotensin II die Endothelfunktion der Wildtyp- und <i>Ogg1</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	102
5.6	Ausblick .....	103
6	Literaturverzeichnis .....	105
7	Lebenslauf .....	118

## Abkürzungsverzeichnis

8-oxoG	7,8-Dihydro-8-oxoguanin
ACE	Angiotensin II converting Enzym
AP-Läsion	apurinische/apyrimidinische Läsion
ATII	Angiotensin II
AT1R / AT2R	Angiotensin II Rezeptor 1 / 2
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CAT	Katalase
DEPC	Diethylpyrolcarbonat
dest	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
eNOS	endotheliale NO-Synthase
Fen1	Flap-Endonuclease1
FCS	fötale Kälberserum
Fpg	Formamidopyrimidin-Glycosylase
GPX	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GTPCH1	GTP-Cyclohydrolase1
HO-1	Hämoxigenase
ICAM	intracellular adhesion molecule
IL6	Interleukin 6
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
MW	Mittelwert
Nox	NADPH Oxidase
PARP1/2	Poly-ADP-Ribosyl-Transferase 1/2
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
rcf	Relative Zentripetalbeschleunigung
PCNA	proliferating cell nuclear factor
rpm	Umdrehungen pro Minute



SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natrium-dodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
SSB	DNA-Einzelstrangbruch (single-strand break)
TEAH	Triethylammoniumhydroxid
TNF $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
Tris	2-Amino-2hydroxymethylpropan-1,3-diol
VCAM	vascular cell adhesion molecule
XRCC1	X-ray repair cross complementing group1

# 1 Zusammenfassung

Zahlreiche Krankheiten korrelieren mit erhöhten Spiegeln reaktiver Sauerstoffspezies. So ist bekannt, dass Angiotensin II, das zentrale Hormon zur Regulation des Blutdrucks, die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies induziert. Reaktive Sauerstoffspezies können DNA-Schäden erzeugen. 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG) ist die dabei mengenmäßig am häufigsten entstehende DNA-Basenmodifikation. Eine mögliche Basenfehlpaarung mit Adenin macht diese DNA-Modifikation zu einer mutagenen und somit Krebs-induzierenden Läsion. Es konnte gezeigt werden, dass hypertensive Personen mit einer größeren Wahrscheinlichkeit an Krebs, im Speziellen an Nierenkrebs, erkranken. Um die Hypothese zu prüfen, dass durch Angiotensin II induzierte DNA-Schäden für die erhöhte Krebsinzidenz verantwortlich sind, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob eine vierwöchige Behandlung von Mäusen mit Angiotensin II (0,6µg / kg / min) DNA-Schäden und daraus resultierende Mutationen induziert. Für die Versuche wurden Wildtyp-Mäuse und reparaturdefiziente *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse verwendet. Die 8-oxoG-Glykosylase OGG1 ist für die Reparatur von 8-oxoG verantwortlich.

Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies konnte durch Färbung mit dem redoxsensitiven Farbstoff Dihydroethidium in Nierenschnitten der behandelten Tiere nachgewiesen werden. Mit Hilfe der Alkalischen Elution wurden in Einzelzell-Suspensionen aus der Niere sowie aus der Leber und von Lymphozyten aus der Milz der Mäuse die Menge an DNA-Einzelstrangbrüchen und oxidativen DNA-Modifikationen bestimmt. Letztere werden dabei durch die bakterielle Formamidopyrimidin-DNA Glykosylase als Fpg-sentive Läsionen nachgewiesen. Es konnte in keinem der untersuchten Organe eine Erhöhung dieser DNA-Schäden detektiert werden. In der Niere wurde außerdem mit dem BigBlue® Mutations-Assay die Entstehung von Mutationen in dem *lacI*-Transgen analysiert. Es konnte jedoch keine Erhöhung der Mutationsfrequenzen in der Niere durch die Angiotensin II-Behandlung nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Expression von Genen der Redoxhomöostase kann außerdem Rückschlüsse auf genotoxische Ereignisse geben. Jedoch konnte auch auf Ebene der Genexpression in der Niere keine Auswirkung von Angiotensin II beobachtet werden.

Zusätzlich zu den *in vivo*-Untersuchungen wurde in Zellkulturversuchen eine Kurzzeit-Behandlung mit dem Gewebshormon durchgeführt. In den Nieren-Zelllinien HEK und LLC-PK1 konnte kein Einfluss der Angiotensin II-Behandlung auf die Entstehung von DNA-Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Läsionen gezeigt werden. In den LLC-PK1 Zellen wurde zudem die Entstehung von Mikrokernen durch Angiotensin II untersucht. Auch bei diesem Endpunkt konnte kein Einfluss der Angiotensin II-Behandlung nachgewiesen werden. Erneut wurden außerdem primäre Zellen aus Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen für die Versuche der akuten Angiotensin II-Behandlung verwendet. In den primären Hepatozyten und Lymphozyten aus der Milz konnte, wie auch schon im Tierversuch, kein Einfluss der Angiotensin II-Behandlung auf die Entstehung von DNA-Schäden gezeigt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die durchgeführten Untersuchungen keinen Hinweis auf eine DNA-schädigende und mutagene Wirkung von Angiotensin II geben.

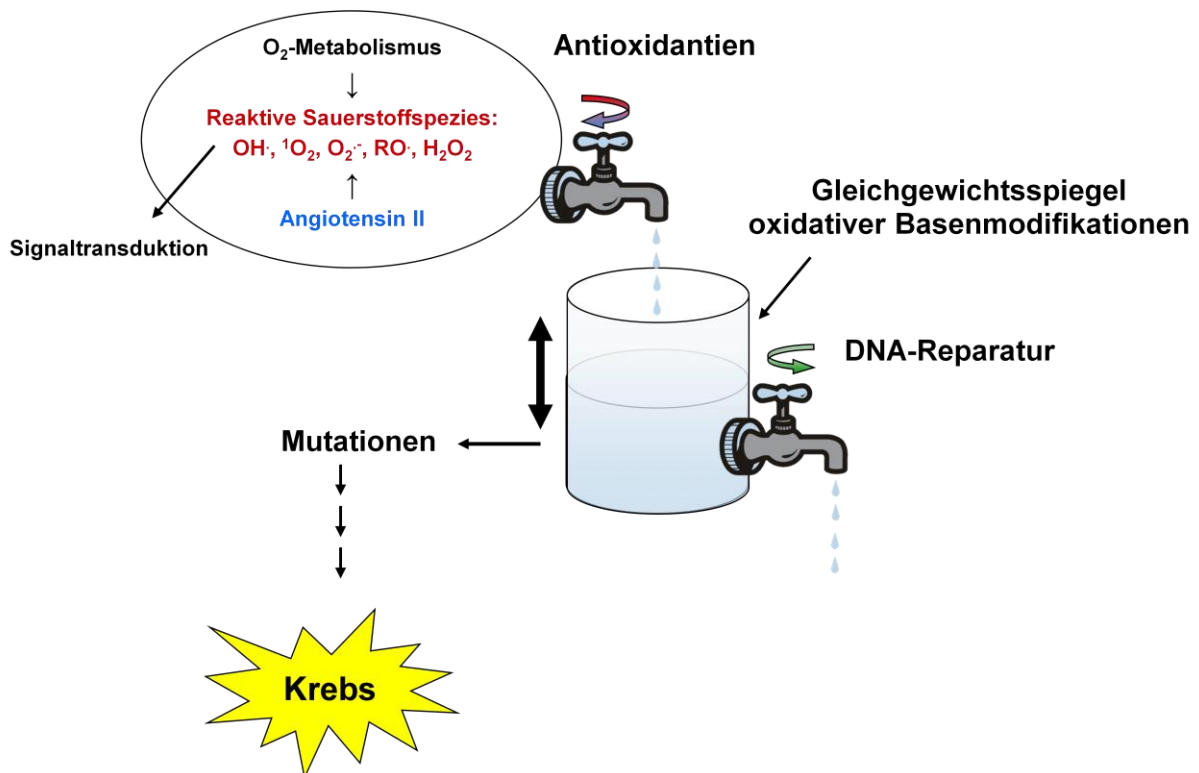
Eine weitere Krankheit, bei der reaktive Sauerstoffspezies eine Rolle spielen, ist die Arteriosklerose. Bei dieser Krankheit sind reaktive Sauerstoffspezies an der Entstehung und dem Verlauf der Krankheit beteiligt. Zur Klärung der Frage, ob DNA-Schäden die Entstehung der Arteriosklerose begünstigen, wurde die Endothelfunktion von Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht. Entgegen der Vermutung, dass oxidative DNA-Modifikationen die Endothelfunktion verschlechtern, zeigen die Untersuchungen, dass *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse, die höhere Spiegel an oxidativen DNA-Modifikationen in ihrem Genom haben, eine signifikant bessere Endothelfunktion besitzen als Wildtypiere. Durch eine Behandlung der Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Angiotensin II (0,6 µg / kg / min) wurde dieser Effekt jedoch nicht verstärkt. Zur Klärung der molekularen Ursache der besseren Endothelfunktion wurde die Genexpression in der Aorta untersucht. Bei der Quantifizierung verschiedener mRNAs, die verantwortlich für die endotheliale NO-Synthase, den Redox-Status sowie Entzündungsmarker sind, konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse gefunden werden. Ebenso konnte zwischen den beiden Maus-Stämmen kein Unterschied auf Ebene der Phosphorylierung der endothelialen NO-Synthase nachgewiesen werden, der die bessere Endothelfunktion der reparaturdefizienten Tiere erklärt hätte.

## 2 Theoretischer Hintergrund und Zielsetzung

In Deutschland stellt Krebs mit einem Anteil von 26% die zweithäufigste Todesursache dar (Statistisches Bundesamt, 2011), weswegen die Erforschung der molekularen Ursachen und Risikofaktoren der Krebsentstehung von großem Interesse ist. Die häufigste Todesursache, mit einem Anteil von 40% der Todesfälle, sind Herzkreislauferkrankungen. Dazu gehören Hypertonie und Arteriosklerose sowie deren Folgeerkrankungen Herzinfarkt, Herzinsuffizienz, Koronare Herzkrankheit (KHK), Nierenversagen und Schlaganfall. In Studien konnte gezeigt werden, dass hypertensive Menschen eine höhere Krebsmortalität haben (Grossman et al. 2002). Angiotensin II ist Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, welches für die Aufrechterhaltung des Blutdrucks verantwortlich ist. Es hat neben seiner gefäßkontrahierenden Wirkung die Eigenschaft NADPH-Oxidasen zu aktivieren und so die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies zu erhöhen (siehe 2.2).

Reaktive Sauerstoffspezies spielen vermutlich bei der Entstehung von Krebs eine große Rolle. Reaktive Sauerstoffspezies entstehen endogen und exogen und können alle Strukturen der Zelle schädigen (Aruoma et al. 1991). Für die Kanzerogenese hat die Schädigung der DNA durch reaktive Sauerstoffspezies die größte Bedeutung. 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG) ist wahrscheinlich die mengenmäßig am häufigsten vorkommende oxidativ generierte DNA-Modifikation. Bezüglich der DNA-Modifikationen herrscht in einer gesunden Zelle ein Gleichgewicht, welches sich aus der Bildung der Modifikationen und der Reparatur der Modifikationen über verschiedene Reparatursysteme (siehe 2.4) ergibt. Wird dieses Gleichgewicht gestört, durch vermehrte Bildung reaktiven Sauerstoffspezies, was als oxidativer Stress bezeichnet wird, oder aber durch eine fehlerhafte Reparatur der DNA-Schäden, steigt das Mutationsrisiko. Entstehen die Mutationen in Tumorsupressorgenen, wie p53, oder in Proto-Onkogenen, wie ras, kann es in einem mehrstufigen Prozess zur malignen Entartung und so zum Krebs kommen.

**Abbildung 2-1** zeigt schematisch das Zustandekommen eines Gleichgewichtsspiegels an oxidativen Basenmodifikationen in der Zelle. Erhöhte Spiegel an DNA-Modifikationen können deshalb als „Bio-Marker“ für oxidativen Stress oder schlechtere DNA-Reparatur dienen.



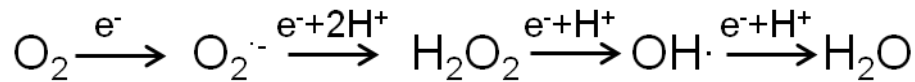
**Abb. 2-1: Gleichgewichtsspiegel oxidativer Basenmodifikationen** modifiziert nach Fusser (2010), Epe (2002)

Reaktive Sauerstoffspezies und durch reaktive Sauerstoffspezies entstehenden DNA-Modifikationen spielen nicht nur bei der Kanzerogenese, sondern auch bei chronischen Entzündungs- und Krankheitsprozessen eine Rolle. Auf diesem Weg lassen sich Kanzerogenese und chronische Entzündungsprozesse miteinander verbinden (Weitzmann und Gordon 1990).

## 2.1 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies

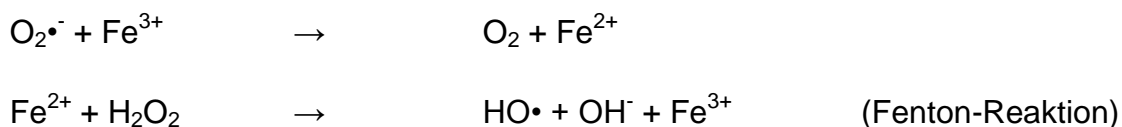
In den meisten Zellen ist die Hauptquelle für reaktive Sauerstoffspezies die Atmungskette. Sauerstoff wird über mehrere Redoxreaktionen von Sauerstoff zu Wasser reduziert, es entstehen als Zwischenprodukte das Superoxidradikalanion, Wasserstoffperoxid und das Hydroxylradikal (**Abbildung 2-2**). Als weitere Quellen für endogen entstehende reaktive Sauerstoffspezies sind die NADPH-Oxidasen, Xanthin-Oxidase und endotheliale NO-Synthase (eNOS) (Cai und Harrison 2000) zu nennen. Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit sind die NADPH-Oxidasen, welche Sauerstoff zu Superoxid reduzieren und im Zuge dessen NAD(P)<sup>+</sup> generieren. Die NADPH-Oxidasen werden in Abschnitt 2.2 gesondert behandelt.

Ebenso wird auf die eNOS, welche ebenfalls reaktive Sauerstoffspezies bilden kann, in Abschnitt 4.3.2 genauer eingegangen.



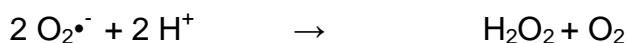
**Abb. 2-2: Sequentielle Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser**

Das Hydroxylradikal hat eine Halbwertszeit von  $10^{-9}$ s (Sies 1993) und ist sehr reaktiv, es reagiert am Ort seiner Entstehung. Wasserstoffperoxid und Superoxidradikalanion sind verhältnismäßig reaktionsträge. Wasserstoffperoxid kann durch Zellmembranen diffundieren und auf diesem Weg in den Zellkern gelangen. In Anwesenheit von Übergangsmetallen wie Eisen und Kupfer können die Fenton-Reaktion und die Haber-Weiss-Reaktion (**Abbildung 2-3**) stattfinden, wodurch Hydroxylradikale entstehen (Aruoma et al. 1991).



**Abb. 2-3: Metall-katalysierte Haber-Weiss-Reaktion**

Das Superoxidradikalanion kann zu Wasserstoffperoxid dismutieren, dabei entstehen aus zwei Molekülen  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ein Molekül  $\text{H}_2\text{O}_2$  und ein Molekül  $\text{O}_2$  (**Abbildung 2-4**). Diese Reaktion kann auch enzymatisch durch die Superoxid-Dismutase katalysiert werden (McCord und Fridovich 1969).



**Abb. 2-4: Dismutation von Superoxidanion-Radikalen**

Neben endogenen Quellen kann auch durch exogene Quellen intrazellulärer oxidativer Stress entstehen. So kann UV- und ionisierende Strahlung zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen (Sedelnikova et al. 2010). Ebenso können Chemikalien wie Photosensibilisatoren (zum Beispiel Acridinorange und Ro19-8022)

in Kombination mit sichtbarem Licht (Epe et al. 1993; Will et al. 1999) oder Chemotherapeutika wie Anthrazykline (Sinha et al. 1987) zur intrazellulären Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen.

Reaktive Sauerstoffspezies haben in der Zelle verschiedene Angriffspunkte. Sie können radikalisch oder oxidativ die DNA und Proteine schädigen, zu Lipidperoxidationen führen und Glutathion depletieren (Aruoma et al. 1991). Gleichzeitig sind reaktive Sauerstoffspezies über die eben genannten Mechanismen an der Alterung auf zellulärer Ebene beteiligt (Harman 1956).

## 2.2 Generierung reaktiver Sauerstoffspezies durch NADPH-Oxidasen

Für diese Arbeit von besonderer Bedeutung sind die, reaktive Sauerstoffspezies-erzeugenden, NADPH-Oxidasen. Bisher konnten 5 verschiedene NADPH-Oxidasen (Nox) nachgewiesen werden. Sie bestehen jeweils aus zwei membran-gebundenen Untereinheiten, nämlich dem eigentlichen NOX-Protein (NOX1-5) und  $p22^{\text{phox}}$ , sowie aus verschiedenen cytosolischen Untereinheiten ( $p40^{\text{phox}}$ ,  $p47^{\text{phox}}$ ,  $p67^{\text{phox}}$ , Rac) (Katsuyama 2010). Wie ihr Name schon zeigt, oxidieren NADPH-Oxidasen NADPH zu  $\text{NADP}^+$  wobei Sauerstoff zu Superoxid reduziert wird.

Die in Phagozyten vorkommende Nox2, auch als  $pg91^{\text{phox}}$  bezeichnet, wurde als erste der NADPH-Oxidasen entdeckt und ist für den „Respiratory Burst“ von phagozytotischen Zellen bei der Infektabwehr verantwortlich. Die Nox2 ist in der Membran von Vesikeln lokalisiert. Wird sie aktiviert, verschmilzt der Vesikel mit der Zellmembran, im Zytosol werden Elektronen von NAD(P)H aus der Elektronen-Transportkette übertragen. Der Elektronen-Transport läuft über die Zellmembran, extrazellulär werden die Elektronen auf Sauerstoff übertragen und es entsteht dort Superoxid (Bedard und Krause 2007).

Die Nox4 ist konstitutiv aktiv und wird in vielen Organen exprimiert. Eine besonders hohe Expression hat die Nox4 in der Niere, dort wurde sie auch als erstes entdeckt und zu dieser Zeit als Renox bezeichnet (Geiszt et al. 2000). Im Gegensatz zu den anderen NADPH-Oxidasen produziert die Nox4 hauptsächlich Wasserstoffperoxid. Außerdem benötigt die Nox4, außer der membrangebundenen Untereinheit  $p22^{\text{phox}}$ ,

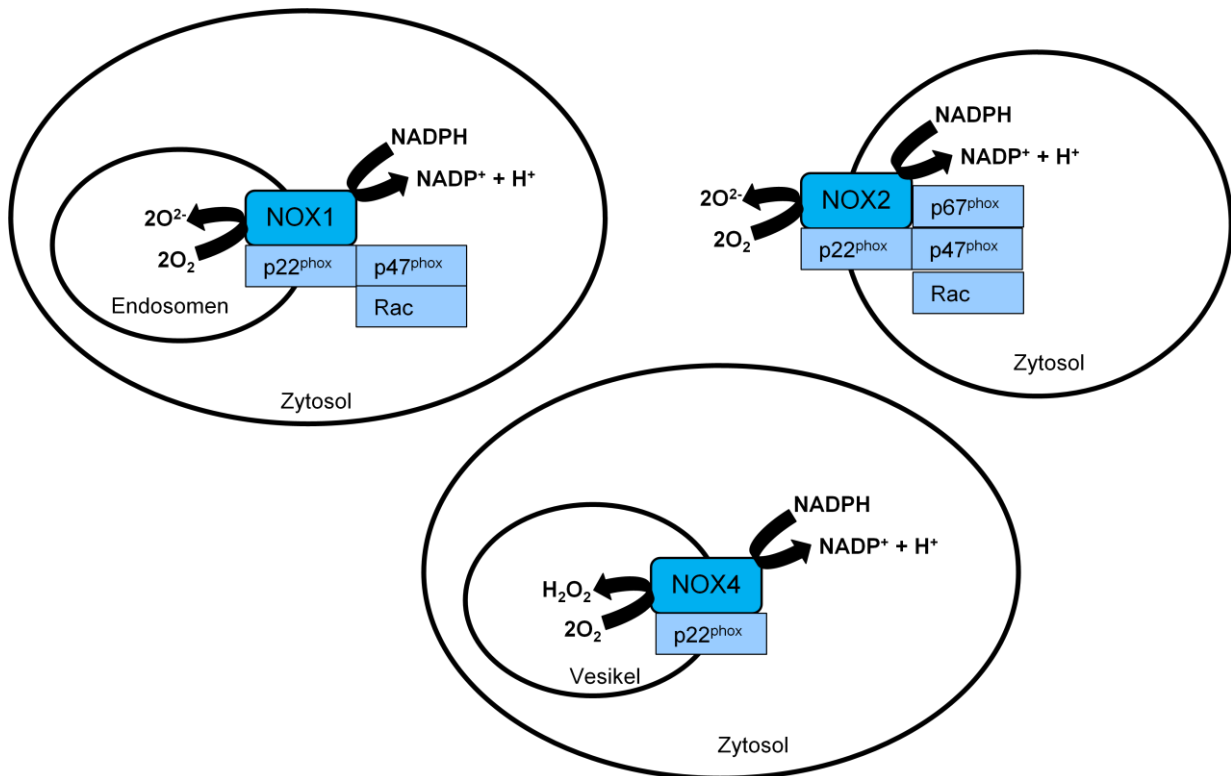
keine der cytosolischen Untereinheiten (Martyn et al. 2006). Ob Nox4 die kleine GTPase Rac zur Aktivierung benötigt ist noch nicht vollständig geklärt, es existieren jedoch Hinweise (Gorin et al. 2001). Mit Hilfe von grün-fluoreszierendem Protein, das an Nox4 gebunden ist, konnte eine starke Lokalisation im Endoplasmatischen Retikulum bestimmt werden (Van Buul et al. 2005). Die von der Nox4 produzierten reaktive Sauerstoffspezies entstehen somit intrazellulär und es besteht die Möglichkeit, dass auf diesem Weg direkt vor Ort verschiedene Zell-Bestandteile geschädigt werden.

Die Nox1 wird sehr stark im Dickdarm exprimiert, aber auch in der glatten Gefäßmuskulatur, in Endothelzellen, sowie in der Placenta, im Uterus, in der Prostata, in Osteoklasten und retinalen Perizyten (Bedard und Krause 2007). Nox3 ist hauptsächlich im Innenohr lokalisiert, Nox5 in Milz, Lymphknoten und Hoden, wird jedoch in Nagern nicht exprimiert (Katsuyama 2010).

Angiotensin II, welches für die Aufrechterhaltung des Blutdrucks und Wasserhaushalts zuständig ist, aktiviert NADPH-Oxidasen, insbesondere die Nox4, und führt so zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (siehe 2.5.1).

Der Aufbau der NADPH-Oxidasen 1,2 und 4 ist in **Abbildung 2-5** schematisch dargestellt.





**Abb. 2-5: Schematischer Aufbau der NADPH-Oxidase 1, 2 und 4** modifiziert nach Lassegue und Griendling (2010).

### 2.3 Enzymatische antioxidative Schutzmechanismen

Antioxidantien sind Radikalfänger, die die Zelle vor Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies schützen. Sie lassen sich in enzymatische und nicht enzymatische Antioxidantien unterteilen. Die wichtigsten antioxidativen Enzyme sind die Superoxid-Dismutase, Katalase und Glutathion-Peroxidase.

Das Superoxidradikalanion kann durch die Superoxid-Dismutase (SOD) in Wasserstoffperoxid und Sauerstoff umgewandelt werden. In Säugern existieren drei Isoformen der Superoxid-Dismutase, die cytosolische Cu/Zn-SOD (SOD1), die mitochondriale Mn-SOD (SOD2) und die extrazelluläre SOD3 (Mates et al. 1999). In der Zelle entstehendes Wasserstoffperoxid kann durch die Katalase (CAT) zu Wasser und Sauerstoff detoxifiziert werden. Ein weiteres Enzym zur Detoxifikation von Wasserstoffperoxid ist die Glutathionperoxidase (GPX). Über die Glutathionperoxidase können Wasserstoffperoxid und organische Peroxide zu Wasser bzw. Alkoholen reduziert werden, wobei Glutathion oxidiert wird (Mates et al. 1999).

Ein weiteres wichtiges antioxidatives Enzym ist die Hämoxxygenase (HO). Ihre Funktion ist es das Häm zu Eisen, Biliverdin und Kohlenstoffmonoxid abzubauen. In Menschen existieren zwei Isoformen, die konstitutiv aktive Isoform HO-2 und die induzierbare HO-1 (Ryter und Choi 2009). Besondere Bedeutung kommt der induzierbaren HO-1 zu, da von ihr gezeigt werden konnte, dass sie als Defensiv-Mechanismus gegen zellulären oxidativen Stress induziert werden kann (Applegate et al. 1991).

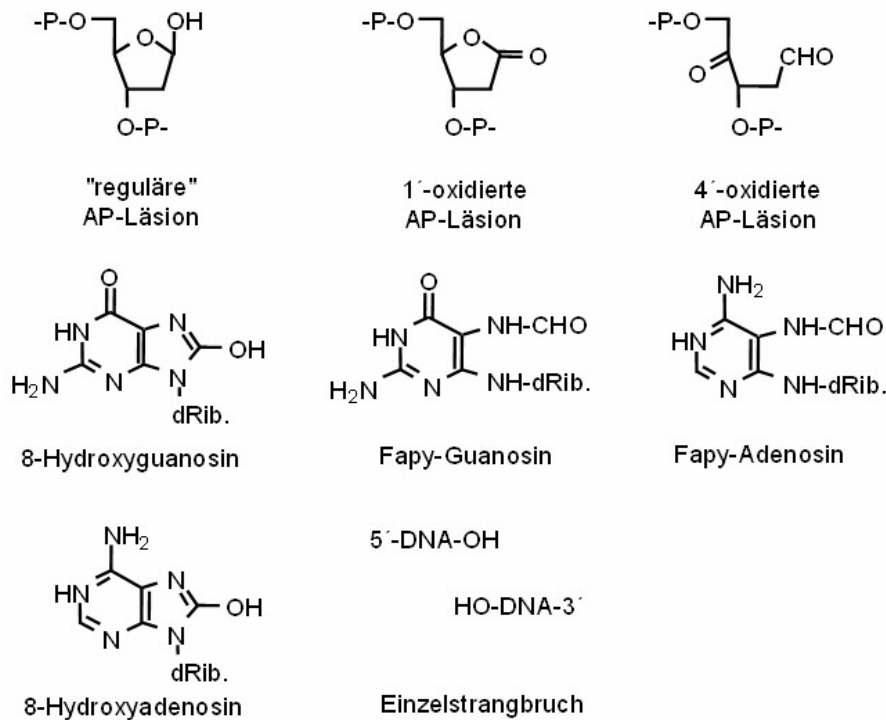
Nrf2 (Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) ist ein Transkriptionsfaktor der als antioxidative Antwort aktiviert wird. Er translokiert in den Zellkern und ist dann für die Expression aller zuvor beschrieben antioxidativ wirkenden Enzyme verantwortlich (Kensler et al. 2007).

In der Literatur sind Zusammenhänge zwischen dem vasoaktiven Gewebshormon Angiotensin II und antioxidativen Enzymen zu finden. So konnte in Fibroblasten der Adventitia gezeigt werden, dass Angiotensin II die Expression von Katalase bewirkt, jedoch die Expression von Superoxid-Dismutase und Gluthathionperoxidase nicht verändert (Yang et al. 2011). In Ratten konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von Katalase vor Hypertonie und einer tubulären Nierenfunktionsstörung durch Angiotensin II schützt (Shi et al. 2013).

## 2.4 DNA-Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies und ihre biologische Bedeutung

Reaktive Sauerstoffspezies können über radikalische oder oxidative Mechanismen zu verschiedenen Schäden in der Zelle führen.

Das Hydroxylradikal kann durch Abstraktion eines H-Atomes der Desoxyribose ein Zuckerradikal generieren. Dieses Zuckerradikal kann zum einen zum Bruch des Zucker-Phosphat-Rückgrats oder aber zur Freisetzung einer Nukleobase führen. Letzteres führt so zu einer apurinische/apyrimidinische Läsionen (AP-Stelle). Außerdem kann das Hydroxylradikal an zahlreichen Positionen der verschiedene Purine und Pyrimidine angreifen und so zu oxidierten und reduzierten Basenmodifikationen führen (Aruoma et al. 1991; Halliwell und Aruoma 1991). **Abbildung 2-6** zeigt die Strukturen einiger gebildeter DNA-Modifikationen.



**Abb. 2-6: Chemische Struktur einiger wichtiger DNA-Modifikationen**

Im Folgenden soll auf die biologischen Konsequenzen verschiedener DNA Modifikationen eingegangen werden.

### DNA-Einzelstrangbrüche

Das hochreaktive Hydroxylradikal kann direkt zu DNA-Einzelstrangbrüchen (SSB) und DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) führen, wobei etwa 2000mal mehr SSB als DSB gebildet werden (Bradley und Kohn 1979). Nicht reparierte SSB können fatale Folgen für die Zelle haben. Bei einer zu großen Anzahl von SSB können diese in DSB konvertiert werden. Zwar besteht die Möglichkeit, dass DSB über die Reparaturwege Homologe Rekombination und Nicht-homologes End-Joining repariert werden, nicht reparierte DSB jedoch können zu genetischer Instabilität oder auch zum Zelltod führen. Zudem werden RNA-Polymerasen durch SSB blockiert (Zhou und Doetsch 1993). Eine weitere Möglichkeit wie SSB zum Zelltod führen können, ist eine Überaktivierung des SSB-Detektor-Proteins PARP1 (Heeres und Hergenrother 2007).

### **AP-Läsionen**

AP-Läsionen können zum Block und zu Fehlpaarungen während der Replikation führen (Epe 1996). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Transkription stattfindet, jedoch wird fast ausschließlich Adenin komplementär zur AP-Stelle eingebaut (Zhou und Doetsch 1993). AP-Läsionen können enzymatisch, aber auch spontan in SSB umgewandelt werden.

### **8-oxoG**

8-oxoG ist die am häufigsten vorkommende oxidative DNA-Modifikation und wird durch alle Sorten reaktiver Sauerstoffspezies in großem Maße gebildet (Epe 1996). Durch die 8-oxoG-Glykosylase OGG1 wird diese Modifikation sehr effizient repariert, 8-oxoG ist eine prämutagene Modifikation, die zu GC-TA Transversionen führt (Cheng et al. 1992). In der doppelsträngigen DNA liegen dG und 8-oxodG in der *anti*-Konformation vor. In der einzelsträngigen DNA jedoch geht 8-oxodG in die energetisch günstigere *syn*-Konformation über, in welcher 8-oxodG anstatt mit dC mit dA paart (Cooke et al. 2003). Im Gegensatz zu SSB welche die RNA-Polymerase blockieren, konnte gezeigt werden, dass 8-oxoG nicht die RNA Polymerase blockiert (Kathe et al. 2004). Zu demselben Ergebnis kamen auch Kitsera et al. 2011. Sie zeigen, dass 8-oxoG selbst nicht die Transkription blockiert.

### **Formamidopyrimidine (FapyA und FapyG)**

Durch radikalischen Angriff können aus Purinen unter Ringöffnung die Formamidopyrimidine FapyA und FapyG entstehen. Die biologischen Auswirkungen von FapyA und FapyG sind noch nicht ausführlich geklärt. Graziewicz et al. (2000) konnten jedoch zeigen, dass die beiden DNA-Modifikationen sequenzabhängig die DNA-Polymerase blockieren.

## **2.5 Möglichkeiten der DNA-Reparatur**

Für die unterschiedlichen DNA-Schäden existieren in den Zellen unterschiedliche Reparaturwege (Tabelle 2-1). Die große Bedeutung der unterschiedlichen DNA-Reparaturwege wird anhand der Tatsache ersichtlich, dass Mutationen in spezifischen Reparatur-Proteinen zu schwerwiegenden Erbkrankheiten wie einer erhöhten Anfälligkeit für Krebs (zum Beispiel Ataxia Teleangasia (Hoeijmakers 2001), neurologischen Defekten (zum Beispiel Cockayne Syndrom (Rass et al. 2007) oder

vorzeitigem Altern (zum Beispiel Werner Syndrom (Brosh und Bohr 2007) führen können.

**Tabelle 2-1 : DNA-Reparaturwege und zugehörige DNA-Schäden als Substrate**

<b>DNA-Reparaturweg</b>	<b>Substrate</b>
Direkte Schadensreversion	DNA-Schäden durch Alkylierung, zum Beispiel O <sup>6</sup> -Alkyl-Guanin
Basen Exzisions-Reparatur	DNA-Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies, Alkylierung, Desaminierung
DNA-Einzelstrangbruch Reparatur	DNA-Einzelstrangbrüche durch reaktive Sauerstoffspezies, Strahlung
Nukleotid Exzisions-Reparatur	Sperrige DNA-Schäden wie Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere
Mismatch-Reparatur	DNA-Fehlpaarungen, zum Beispiel G:U
DNA-Doppelstrangbruch Reparatur	DNA-Doppelstrangbrüche durch Strahlung, DNA-Quervernetzende Substanzen

Der DNA-Reparatur-Weg der Basen-Exzision, sowie der DNA-Einzelstrangbruch-Reparatur soll im Folgenden genauer erläutert werden.

### 2.5.1 Basenexzisionsreparatur

Oxidative DNA-Modifikationen wie 8-oxoG werden mit einem Reparaturmechanismus repariert, welcher als Basenexzisions-Reparatur bezeichnet wird. Generell kann die Basenexzisionsreparatur in vier Schritte eingeteilt werden: das Erkennen und Herausschneiden der modifizierten Base durch eine DNA-Glycosylase, das Einschneiden der entstandenen apurinischen/apyrimidinischen Stelle (AP-Stelle) durch eine AP-Endonuklease, das Ausfüllen der entstandenen Nukleotid-Leerstelle durch eine DNA-Polymerase und die abschließende Ligation des Zuckerphosphatgerüsts.

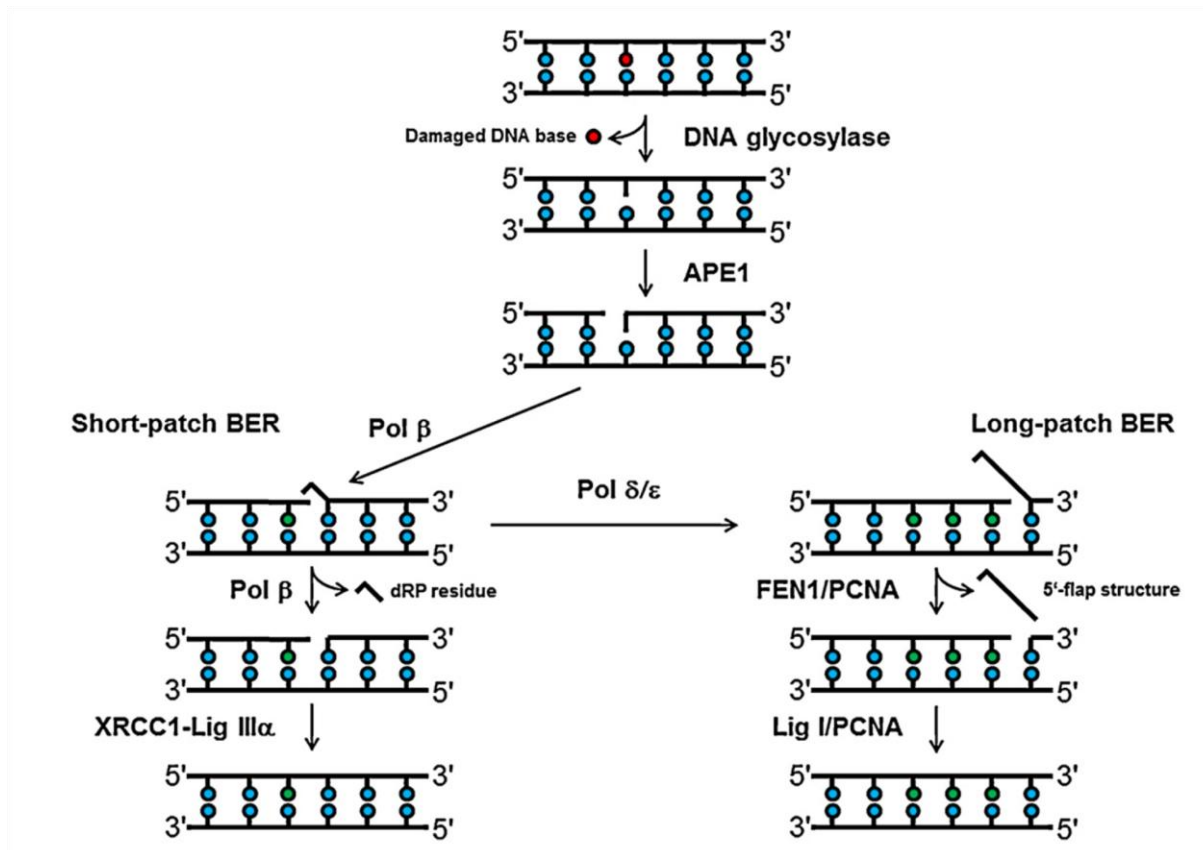


Abb. 2-7: Schematische Darstellung der Basenexzisionsreparatur (Parsons und Dianov 2013)

Die modifizierte Base wird durch eine DNA-Glykosylase erkannt und aus dem DNA-Grundgerüst herausgeschnitten indem die Glykosylase die N-Glykosidische Bindung zwischen der Nukleobase und der Desoxyribose hydrolysiert. Bisher wurden mindestens 11 verschiedene DNA-Glykosylasen identifiziert, die jeweils eine hohe Substratspezifität aufweisen (Tabelle 2-2).

**Tabelle 2-2: Humane DNA-Glykosylasen und ihr Substrate** nach (Barnes und Lindahl 2004; Robertson et al. 2009)

DNA-Glycosylase	Substrat
OGG1	8-oxoG, FaPyG
MUTYH	Adenin gepaart mit 8-oxoG
NTH1	Thyminglycol, FaPyG, DHU, 5-OHU, 5-OHC
NEIL1	wie NTH1, und FaPyA, 8-oxoG
NEIL2	wie NTH1 und NEIL1
NEIL3	Unbekannt
MBD4	T und U gepaart mit G (CpG-sites)
MPG	3-meA, Hypoxanthin, ethenoA
SMUG1	Uracil, 5-OH-meU
TDG	T, U und ethenoC (CpG-sites)
UNG	Uracil

MUTHY = mutY Homolog ; NTH = Endonuklease III like Glykosylase; NEIL = Endonuklease VIII like Glykosylase; MBD4 = Methyl-CpG-Bindedomäne 4 Protein; MPG = DNA-3-methyladenin-Glykosylase; SMUG = Single-strand selektive monofunktionelle DNA-Glykosylase; TDG = Thymin-DNA-Glykosylase; UNG = Uracil-N-Glykosylase ; T = Thymin; U = Uracil; G = Guanin; A = Adenin; DHU = Dihydroxy-uracil; 5-OHU = 5-Hydroxy-uracil; 5-OHC= 5-Hydroxy-cytosin; 3-meA = 3-Methyl-adenin; 5-OH-meU = 5-Hydroxy-methyl-uracil

Durch das Herausschneiden der modifizierten Base entsteht eine AP-Stelle. OGG1 ist eine sogenannte bifunktionelle Glykosylase (Pascucci et al. 2002). Diese besitzt eine zusätzliche Lyaseaktivität, über die sie das Zuckerphosphatrückgrat am 3'-Ende der AP-Stelle öffnet, so dass am 5'-Ende der AP-Stelle ein Phosphatrest resultiert (McCullough et al. 2001). Nach Generierung einer AP-Stelle durch eine monofunktionelle Glykosylase (zum Beispiel: Uracil-DNA-Glycosylase) wird das Zuckerphosphat-Rückgrat am 5'-Ende der AP-Stelle von einer AP-Endonuklease hydrolisiert (Izumi et al. 2000). Es entsteht so am 3'-Ende der AP-Stelle ein Hydroxylrest und am 5'-Ende ein Desoxyribolaktolrest. Der 5'-Desoxyribolaktolrest kann von der Lyaseaktivität der DNA-Polymerase  $\beta$  entfernt werden, so dass ein 5'-Phosphatrest entsteht (Matsumoto und Kim 1995; Sobol et al. 2000). An dieser Stelle teilt sich der Mechanismus der BER in zwei Wege: den „Short-Patch“ und den „Long-Patch“-Reparaturweg.

Bei der „Short-Patch“-BER wird nun die entstandene Nukleotid-Lücke durch die DNA-Polymerase  $\beta$  gefüllt und nach der Ligation des Zuckerphosphat-Rückgrats durch die Ligase III ist die Reparatur abgeschlossen.

Im Falle der „Long-Patch“-Reparatur wird durch DNA-Polymerase  $\beta$ ,  $\delta$  oder  $\epsilon$  die Nukleotid-Leerstelle gefüllt, danach kommt zu einem weiteren Einbau von bis zu 7 Nukleotiden, wobei es zur Verdrängung des ursprünglichen DNA-Strangs kommt und ein sogenannter 5'-Flap entsteht. Der Flap wird von der Flap-Endonuklease (FEN1) erkannt und hydrolytisch abgetrennt. Notwendig für die Aktivität von FEN1 ist das ringförmige, DNA-umschließende Protein PCNA (proliferating cell nuclear antigen). Durch das Abtrennen des Flaps entsteht ein DNA-Strangbruch mit 3'-Hydrxyl und 5'-Phosphatrest entsteht, welcher durch die Ligase I oder III geschlossen wird und so die Reparatur abgeschlossen wird (Frosina et al. 1996; Klungland und Lindahl 1997).

Die Entscheidung, welche DNA-Schäden über den Short-Patch und welche über den Long-Patch-Mechanismus repariert werden, ist noch nicht grundlegend geklärt. Es gibt Hinweise, dass die chemische Struktur des 5'-Endes der AP-Stelle entscheidet welcher Reparaturweg eingeschlagen wird. Ist das 5'-Ende der AP-Läsion oxidiert oder reduziert, kann die  $\beta$ -Lyaseaktivität von DNA Pol  $\beta$  diese blockierende Gruppe nicht abtrennen. Durch die Strang-Verdrängungssynthese bei der LP-BER wird dieser Endgruppenprozessierungsschritt umgangen (Klungland und Lindahl 1997). Oxidierte und reduzierte 5'-Ende der AP-Stelle können durch radikalischen Angriff von reaktiven Sauerstoffspezies resultieren. Außerdem erzeugen auch Mono- und Bifunktionelle Glycosylasen unterschiedliche 3'- und 5'-Enden an der AP-Stelle, so dass auch die Glycosylase entscheidet, welcher Reparatur-Weg eingeschlagen wird (Fortini et al. 1999).

### **OGG1**

Für die Reparatur von 8-oxoG ist die 8-oxoG-DNA-Glycosylase 1 (OGG1) die Reparatur initiiierende DNA-Glycosylase. OGG1 gehört zu den bifunktionellen Glycosylasen, welche neben der Glycosylase-Aktivität noch eine Lyaseaktivität besitzen, durch die sie das Zuckerphosphatrückgrat AP-Stelle schneidet (Pascucci et al. 2002). Neben 8-oxoG erkennt OGG1 FapyG und AP-Stellen (Dherin et al. 1999),



wobei bevorzugt AP-Stellen gegenüber dC und weniger effizient AP-Stellen gegenüber dG geschnitten werden (Bjoras et al. 1997). Die Reparatureffizienz von OGG1 wird durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung und Acetylierung modifiziert (Dantzer et al. 2002; Bhakat et al. 2006).

8-OxoG ist eine mutagene DNA-Modifikation, da es in einzelsträngiger DNA in die energetisch günstigere syn-Konformation übergeht. In dieser geht es anstelle von dC eine Paarung mit dA ein. Die Paarung von 8-oxoG mit dA kann jedoch von der DNA-Glykosylase MutY Homolog (MYH) erkannt werden. dA wird aus dem Zucker-Phosphatrückgrat herausgeschnitten (McGoldrick et al. 1995) und OGG1 bekommt erneut die Möglichkeit 8-oxoG zu reparieren.

Das bakterielle Homolog von OGG1 ist die Formamidopyrimidin-Glycosylase (Fpg) (Boiteux et al. 1990). Fpg erkennt neben 8-oxoG auch Fapy A und Fapy G sowie AP-Läsionen. In Bakterien mit einer Mutation konnte das Fehlen von Fpg durch Klonierung von OGG1 ersetzt werden. Die Erkennung von DNA-Modifikationen durch das Protein Fpg und die Eigenschaft, den modifizierten DNA-Schaden in einen DNA-Einzelstrangbruch umzuwandeln, macht man sich bei der modifizierten alkalischen Elution zur Quantifikation oxidativer Basen-Modifikationen zunutze (siehe 3.2.3).

Mäuse, welchen das *Ogg1*-Gen fehlt, sind lebensfähig und zeigen kaum pathologischen Veränderungen. Es ist jedoch eine altersabhängige Akkumulation von DNA-Schäden in verschiedenen Organen zu erkennen (Klungland et al. 1999; Osterod et al. 2001). In Leber und Hoden konnte außerdem eine erhöhte Frequenz an Spontanmutationen nachgewiesen werden (Klungland et al. 1999). Auch Mäuse in denen das *Mutyh*-Gen ausgeschaltet ist sind lebensfähig (Russo et al. 2004). Im Alter von 18 Monaten jedoch entwickelten die reparaturdefizienten Tiere mit einer höheren Wahrscheinlichkeit Tumore (Sakamoto et al. 2007).

### 2.5.2 Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen

DNA-Einzelstrangbrüche stellen eine besondere Art von Läsion dar, die von einem der BER ähnlichen Mechanismus repariert werden. SSB entstehen zum einen indirekt als Intermediate der BER, durch enzymatische Hydrolyse des Zucker-Phosphat-Rückgrats durch AP-Endonukleasen, zum anderen können sie direkt durch

radikalischen Angriff reaktiver Sauerstoffspezies auf das Zuckerphosphat-Rückgrat entstehen. Aber auch Enzyme wie Topoisomerasen können SSB erzeugen. Unabhängig von direkt und indirekt entstandenem SSB sind bei der Reparatur dieselben Proteine beteiligt, so dass der Reparaturmechanismus als Einzelstrandbruch-Reparatur bezeichnet wird (Caldecott 2004; Caldecott 2008).

Der Reparaturmechanismus der SSB (Single-strand break repair SSBR) lässt sich auch hier in vier Schritte einteilen: das Erkennen des DNA-Einzelstrangbruchs, das Prozessieren der DNA-Enden, das Füllen der eventuell entstandenen Nukleotid-Leerstelle und schließlich die Ligation des Zucker-Phosphat-Rückgrats.

Ein entstandener DNA-Einzelstrangbruch wird durch PARP1 oder PARP2 erkannt. Dies ist vor allem bei spontan radikalisch gebildeten SSB notwendig, da diese im Gegensatz zu den indirekt, im Zuge der BER entstehenden SSB, nicht in eine Folge enzymatischer Reaktionen eingebunden ist. PARP1/2 erkennt den SSB, bindet diesen und wird aktiviert. Durch seine Aktivierung modifiziert PARP1 sich selbst und andere Proteine mit Ketten von mehreren hundert ADP-Riboseresten (D'Amours et al. 1999). Poly-(ADP-ribosyliertes) PARP1 dissoziiert von der DNA und durch das Enzym Poly-(ADP-Ribose) Glykohydrolase werden die ADP-Ribosereste wieder abgebaut und PARP1/2 wieder in seinen Ausgangszustand versetzt (Davidovic et al. 2001). Die Poly-ADP-Ribosylierung spielt also nur indirekt eine Rolle bei der SSBR. Es existieren Hinweise, dass sie zur Rekrutierung und Stimulation anderer Reparaturenzyme wie X-ray complementing factor 1 (XRCC1) beiträgt (Okano et al. 2003), außerdem wird ATP für die Ligation generiert (Oei und Ziegler 2000) und die Chromatin-Struktur wird moduliert (Poirier et al. 1982). Zudem kann durch die Poly-ADP-Ribosylierung der nicht erwünschte Mechanismus der Rekombination verhindert werden (Lindahl et al. 1995).

Nach der Erkennung des SSB erfolgt die Prozessierung der DNA-Enden. Durch radikalischen Angriff des Zucker-Phosphat-Rückgrats entstehen häufig modifizierte 3'- und 5'-Enden an dem SSB, welche zu einem 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphat-Reste prozessiert werden müssen. Die für diesen Schritt benötigten Enzyme hängen von der Natur der 3'- und 5'-Enden ab. Ein 5'-Desoxyribolaktol-Rest wird durch Lyase-Aktivität der DNA Polymerase  $\beta$  entfernt (Matsumoto und Kim 1995; Sobol et al.

2000). PARP1/2 rekrutiert XRCC1 an den SSB, welcher wiederum die Polynukleotid-Kinase (PNK) aktiviert. PNK besitzt eine 3'-Phosphate- und eine 5'-Kinase-Aktivität (Whitehouse et al. 2001).

Der dritte und vierte Schritt der SSBR laufen entsprechend der BER. Falls notwendig werden ein oder mehrere Nukleotide in den DNA-Strang eingebaut. Abschließend wird das Zucker-Phosphat-Rückgrat durch Ligase I oder III religiert.

## 2.6 Rolle reaktiver Sauerstoffspezies und DNA-Schäden bei Hypertonie und Arteriosklerose

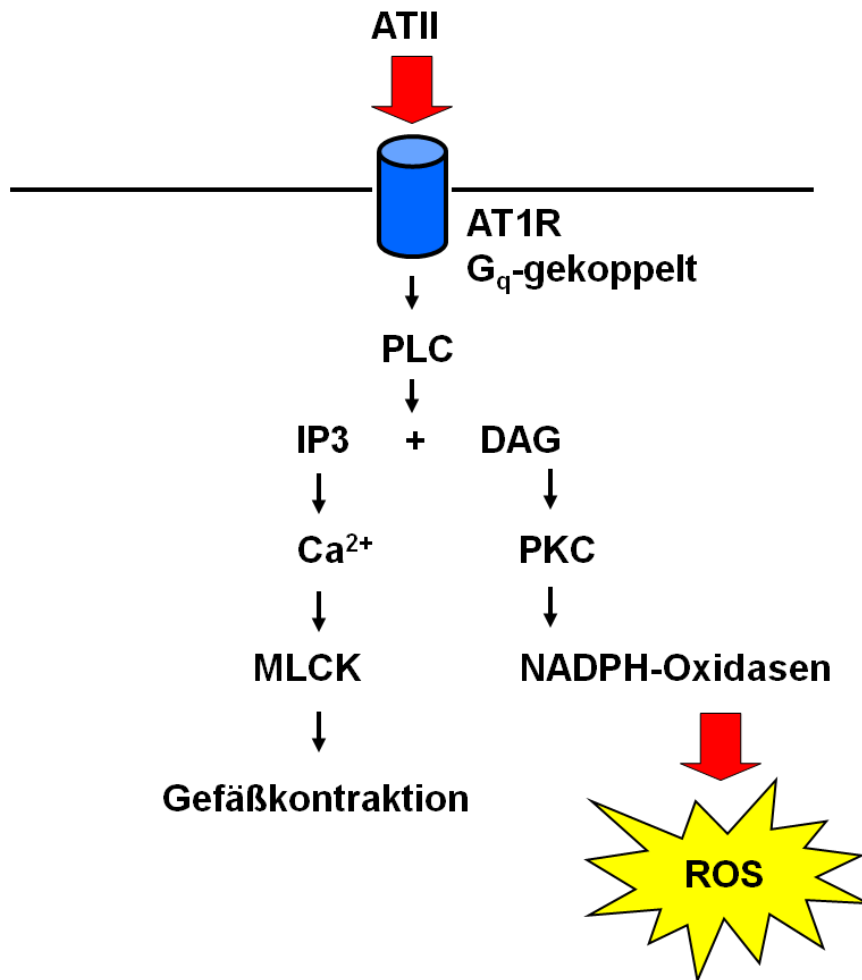
In vielen entzündlichen Krankheiten spielen reaktive Sauerstoffspezies eine zentrale Rolle oder resultieren sogar durch sie. Im Folgenden soll die Rolle reaktiver Sauerstoffspezies und oxidativer DNA-Schäden bei den Krankheiten Hypertonie und Arteriosklerose genauer erläutert werden.

### 2.6.1 Hypertonie

Angiotensin II ist ein Gewebshormon, welches aus 8 Aminosäuren besteht. Es ist ein wichtiger Bestandteil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS), welches für die Aufrechterhaltung des Blutdrucks und des Wasserhaushalts verantwortlich ist. Es existieren zwei Rezeptoren für Angiotensin II, der Angiotensin II-Rezeptor 1 (AT1R) und der Angiotensin II-Rezeptor 2 (AT2R), wobei die eben genannten physiologischen Angiotensin-Wirkungen dem AT1R zugesprochen werden. Der AT2R ist hauptsächlich im fötalen Gewebe zu finden (Steckelings et al. 2005). Über Aktivierung seines  $G_q$ -gekoppelten Rezeptors AT1R wirkt Angiotensin II zum einen kontrahierend auf die Gefäßmuskulatur. Dies führt zu der Erhöhung des Blutdrucks. Zum anderen wird über die Signalkaskade des  $G_q$ -gekoppelten Rezeptors die Proteinlipase C und folgend die Protein-Kinase C aktiviert. Die aktivierte Proteinkinase C führt anschließend zur Aktivierung von NADPH-Oxidasen. Die Beteiligung der einzelnen Proteine an der Signaltransduktion bis zur Entstehung der reaktiven Sauerstoffspezies wurde bereits gezeigt (Fazeli et al. 2012). **Abbildung 2-8** zeigt schematisch die molekularen Wirkungen des Angiotensin II-Rezeptor 1.

Die physiologische Rolle der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies durch Angiotensin II ist noch nicht geklärt. Über die Erhöhung der reaktiven

Sauerstoffspezies und folgend einer Erhöhung von DNA-Schäden kann sich eventuell das erhöhte Krebsrisiko von hypertensiven Menschen erklären lassen.



**Abb. 2-8: Molekulare Wirkungen des Angiotensin II-Rezeptors 1** (PLC: Phospholipase C; IP<sub>3</sub>: Inositoltriphosphat; DAG: Diacylglycerol; PKC: Proteinkinase C; MLCK: Myosin-leichte-Ketten-Kinase)

Die Arbeitsgruppe Schupp konnte in Zellkultur zeigen, dass über Aktivierung von Proteinlipase C und Proteinkinase C die Nox4 für DNA-Schäden durch Angiotensin II verantwortlich ist (Fazeli et al. 2012). Ebenso konnten gezeigt werden, dass in Nierentubulus-Zellen die mitochondriale Nox 4 die Hauptquelle für oxidativen Stress durch Angiotensin II ist (Kim et al. 2012).

Der Zusammenhang zwischen Angiotensin II, NADPH-Oxidase und oxidativem Stress kann in verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden. Ein Knockout von p47<sup>phox</sup>, einem Bestandteil der Nox1 und Nox2, sowie Knockout der NOX1 vermindert nach Behandlung mit Angiotensin II die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und die Ausbildung einer Hypertension (Matsumoto und Kim 1995; Landmesser et al.

2002). In Mäusen, die die NOX1 überexprimieren, führt eine Behandlung mit Angiotensin II zu einer verstärkten Bildung an Superoxid sowie zu vaskulärer Hypertrophie und erhöhtem systolischem Blutdruck (Dikalova et al. 2005). In spontan hypertensiven Ratten konnte eine erhöhte NADPH-Oxidase-Aktivität in der Aorta gezeigt werden, außerdem wird die Untereinheit p22<sup>phox</sup> in den spontan hypertensiven Ratten stärker exprimiert als in Kontroll-Tieren (Zalba et al. 2000). Aber auch konkret für die Niere konnte erhöhter oxidativer Stress durch Angiotensin II gezeigt werden (Sachse und Wolf 2007).

*In vitro* und *ex vivo* konnte von der Arbeitsgruppe Schupp bereits DNA-Einzelstrangbrüche und auch Fpg-sensitive Läsionen durch Angiotensin II in der Niere gezeigt werden (Schupp et al. 2007; Schmid et al. 2008). Ebenso konnten sie *in vivo* die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies mit Hilfe von DHE-Färbung und DNA-Doppelstrangbrüche mit immunhistologischer Färbung mit  $\gamma$ H2AX-Antikörpern zeigen (Brand et al. 2013). Die Entstehung von Mutationen und Krebs durch eine Behandlung mit Angiotensin II oder durch erhöhten Blutdruck konnte bisher noch nicht im Tierversuch nachgewiesen werden.

Weitere Forschungsergebnisse zeigen, dass die Aktivierung des Angiotensin II-Rezeptors mit vielen Signaltransduktionswegen wie Protein Tyrosin-Phosphorylierung und Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs assoziiert ist. Dies sind Prozesse die generell mit Wachstumsfaktoren und Cytokinen in Zusammenhang gebracht werden und darauf hindeuten, dass Angiotensin II mitogen und inflammatorisch wirkt (Touyz und Berry 2002).

### 2.6.2 Arteriosklerose

Eine weitere Krankheit, welche mit erhöhten Spiegeln reaktiven Sauerstoffspezies assoziiert ist, ist die Arteriosklerose. Arteriosklerose ist eine entzündliche Krankheit der Gefäße, die durch reaktive Sauerstoffspezies initiiert und verstärkt wird (Alexander 1995). Erhöhte Spiegel an reaktiven Sauerstoffspezies sind in allen Schichten der arteriosklerotischen Arterienwand sowie im arteriosklerotischen Plaque zu finden (Warnholtz et al. 1999). Bestätigt wird die Tatsache, dass reaktive Sauerstoffspezies an der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt sind durch den Befund, dass ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse, denen zusätzlich das Gen für p47<sup>phox</sup>-Untereinheit der

NADPH-Oxidase fehlt, deutlich weniger Arteriosklerose entwickeln als p47<sup>phox</sup>-profiziente ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse (Barry-Lane et al. 2001).

Es mehren sich die Hinweise, dass nicht nur reaktive Sauerstoffspezies sondern auch durch sie entstehende DNA-Schäden in der Arteriosklerose eine Rolle spielen. In peripheren Lymphozyten aus dem Blut von Patienten mit koronarer Herzkrankheit konnten im Comet-Assay DNA-Schäden nachgewiesen werden (Botto et al. 2002). In allen in arteriosklerotischen Plaques vorkommenden Zelltypen (Makrophagen, glatte Muskelzellen und Endothelzellen) können erhöhte Spiegel an SSB und 8-oxoG nachgewiesen werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass auch die DNA Reparatur-Mechanismen verstärkt eingeschaltet sind (Martinet et al. 2002).

Es stellt sich jedoch die Frage ob die DNA-Schäden nur Resultat erhöhter reaktiver Sauerstoffspezies-Spiegel sind oder kausal selbst zur Entstehung der Arteriosklerose beitragen. DNA-Schäden können zu Mutationen führen, welche für die Zelle einen Funktionsverlust bedeuten.

Neben der bekannten „Response to injury“-Hypothese existiert noch eine weitere Theorie zur Entstehung der Arteriosklerose. Diese wird als „somatic mutation theory“ bezeichnet. Diese Theorie ist ähnlich dem Modell der Kanzerogenese, dass Mutationen in somatischen Zellen die Krankheit initiieren. Im Fall der Arteriosklerose handelt es sich um Mutationen in glatten Muskellzellen (Trosko und Chang 1980). Wie auch im Modell der Kanzerogenese, konnte früh gezeigt werden, dass die Zellen innerhalb eines Plaques von klonalem Ursprung sind (Benditt und Benditt 1973). Jedoch sind auch die glatten Muskel-Zellen der gesunden Arterienwand zu einem großen Anteil monoklonalem Ursprung (Chung et al. 1998).

Unterstützt wird die Hypothese, dass DNA-Schäden kausal mit der Entstehung der Arteriosklerose zusammenhängen durch die Beobachtung, dass das Ausfallen von Reparatur-Proteinen die Entstehung der Arteriosklerose begünstigen kann.

Die Protein-Kinase ATM ist ein Schadens-Sensor-Protein. Bei der Krankheit Ataxia-Telangiectasia handelt es sich um eine autosomal rezessiv vererbte Mutation im ATM-Gen. Heterozygote Träger der Mutation haben eine höhere Wahrscheinlichkeit an Krebs zu erkranken, es konnte außerdem jedoch gezeigt werden, dass diese Patienten mit höherer Wahrscheinlichkeit an kardiovaskulären Krankheiten erkranken

(Su und Swift 2000). An  $ATM^{+/-}/ApoE^{-/-}$ -Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese schneller Arteriosklerose entwickeln als die  $ATM^{+/+}/ApoE^{-/-}$ -Mäuse der Kontrollgruppe. Der Zusammenhang zwischen dem DNA-Schaden-Sensor-Protein und Arteriosklerose konnte durch die Beobachtung verdeutlicht werden, dass Transplantation von Knochenmark der  $ATM^{+/+}/ApoE^{-/-}$ -Mäuse den Krankheitsverlauf der  $ATM^{+/-}/ApoE^{-/-}$ -Tiere verlangsamte (Mercer et al. 2010).

## 2.7 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit soll die Hypothese untersucht werden, dass durch reaktive Sauerstoffspezies gebildete DNA-Modifikationen für das höhere Krebsrisiko bei Hypertonie verantwortlich sind. Zusätzlich soll die Hypothese untersucht werden, dass DNA-Schäden bei der Entstehung von Arteriosklerose eine Rolle spielen.

Bezogen auf die Krankheit Hypertonie soll das DNA-schädigende und mutagene Potential von Angiotensin II *in vivo* bestimmt werden. Bisher konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II reaktive Sauerstoffspezies erzeugt, die in Zellkultur und *ex vivo* DNA-Schäden induzieren. Mit Hilfe der Alkalischen Elution, mit der DNA-Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Schäden bis zu einer Detektionsgrenze von 0,1 pro 1.000.000 Basenpaare nachgewiesen werden können, soll in Mäusen, welche 4 Wochen mit 0,6 mg/kg/min Angiotensin II behandelt werden, in der Niere, sowie in der Leber und der Milz die DNA-schädigende Wirkung von Angiotensin II gezeigt werden. Für den Tierversuch werden B6 Wildtyp-Tiere verwendet und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse. Letztere sind reparaturdefizient für 8-oxoG, einer prämutagenen DNA-Modifikation, die durch oxidativen Stress generiert wird. Die Defizienz, diese DNA-Modifikation zu reparieren, soll als Verstärkungsfaktor dienen. Die in dem Versuch verwendeten Mäuse besitzen zusätzlich das bakterielle *lacI*-Gen als Mutationsmarker in ihrem Genom, an dem mit Hilfe des BigBlue® Plaque-Color-Screening-Assays, das mutagene Potential von Angiotensin II untersucht werden soll.

Eine weitere Krankheit, an deren Entstehung reaktive Sauerstoffspezies vermutlich ursächlich beteiligt sind, ist die Arteriosklerose. Auch DNA Schäden wurde bereits in Zellen von arteriosklerotischen Plaques nachgewiesen. Es soll untersucht werden ob diese DNA-Schäden kausal mit der Entstehung der Krankheit zusammenhängen. Hierzu wird wiederum das Modell der reparaturdefizienten *Ogg1*<sup>-/-</sup> Mäuse genutzt. In diesen Mäusen, die in ihrem Genom höhere Spiegel an oxidativen DNA-Modifikationen haben, soll untersucht werden, ob sich die Endothelfunktion der *Ogg1*<sup>-/-</sup> Mäuse von der Endothelfunktion von Wildtyp-Mäusen unterscheidet.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Autoradiographiekassette Typ G	Rego, Augsburg
Biowave S2100 Spectrophotometer	WPA; Cambridge, UK
Eppendorf Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Fluorimeter SFM 25	Kontron Instruments, Rossdorf
Fraktionssammler Ultrorac 2070 II mit Zeitnehmer SM 999	Pharmacia / LKB, Uppsala, Schweden Neolab, Heidelberg
Gel-Elektrophorese-Kammer (Agarosegel)	Bio-Rad Laboratories, USA
Gelelektrophoresekammer MGV-202 (SDS-Page)	C.B.S. Scientific, Kalifornien, USA
Gel Doc 1000 Geldokumentationssystem	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gel-Analysesoftware Image Lab™, 3.0	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Heraeus Labofuge 400R	Thermo Scientific GmbH, Dreieich
Lichtmikroskop Teval 31	Zeiss, Oberkochen
Light Cycler 1.3	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Light Cycler® Software 3.5.3	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
NanoDrop 2000	Thermo Scientific GmbH, Dreieich
Nicon Eclipse 400	Nicon Japan
Peristaltikpumpe ISM 939	Ismatec Laboratoriumstechnik, Schweiz
Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Progene Thermocycler	Techne; Cambridge, UK
Shandon Cytospin 3	Woodley Equipment Company
TGradient Thermocycler	Biometra®; Göttingen
Telaval 31 Lichtmikroskop	Zeiss; Oberkochen
Tischzentrifuge Galaxy Mini	VWR™ International, Darmstadt

Transferkammer Mini-PROTEAN®	Tetra System Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Universal 320R Zentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Universal K25 Zentrifuge	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Vortex Genie 2™	Bender & Hohbein AG, Zürich, Schweiz
PB3002 Delta Range® Waage	Mettler Toledo GmbH, Gießen
Z2 Coulter Counter®	Beckmann Coulter Inc.; Fullerton, USA

### 3.1.2 Chemikalien

Acid Orange 10 (Orange G)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
30% Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlsg.	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	
Aktivkohle	Merck KGaA; Darmstadt
Ampicillin	Sigma-Aldrich
Angiotensin II	Calbiochem, Merck KGaA; Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth, Karlsruhe
Bakto-Agar	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Bakto-Trypton	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
BIORAD Protein Assay	Bio-Rad, Hercules, USA
Bisbenzimid (Hoechst 33258)	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
Calciumchlorid x 2 H <sub>2</sub> O	Merck KGaA; Darmstadt
Casein-Pepton	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Chloroform	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
D-Glucose x 1 H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
di-Kaliumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat x 3 H <sub>2</sub> O	Merck KGaA; Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H <sub>2</sub> O	Merck KGaA; Darmstadt
Dinatriummethyldiamintetraessigsäure	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
EGTA (Ethylenglycol-bis(β-amino-ethylether)-	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze

N,N,N',N'-tetraessigsäure)	
Eichlösungen Puffer (pH 7, 8, 9, 10)	Merck KGaA; Darmstadt
Eindeckmittel EDL-2	Linias, Bettingen am Main
Eisessig	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Ethanol absolut	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Formaldehyd (37%)	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
Glycerol	VWR™ International, Darmstadt
Glycin	Merck KGaA; Darmstadt
Glycin	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
Glycerol	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
Hefeextrakt	Life Technologies; Paisley, UK
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
Insulin	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
Isopropanol	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Isofluran (Forene®)	Baxter, München
Isoton II-Lösung	Beckmann Coulter, Krefeld
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA; Darmstadt
Kohlendioxid (CO <sub>2</sub> )	Linde, Höllkriegskreuth
L-Alanin	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
L-Asparaginsäure	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
L-Asparagin	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
L-Citrullin	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
L-Cystein	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
L-Histidin	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
L-Glutaminsäure	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
L-Isoleucin	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
L-Leucin	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
L-Lysin	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
L-Methionin	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
L-Ornithin	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze

L-Phenylalanin	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
L-Prolin	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
L-Serin	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
L-Threonin	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
L-Tryptophan	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
L-Tyrosin	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
L-Valin	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
Magnesiumchlorid x 6 H <sub>2</sub> O	Merck KGaA; Darmstadt
Magnesiumsulfat x 7 H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Maltose	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
Natriumacetat	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Merck KGaA; Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
Tetraethylenammoniumhydroxid (TEAH)	Merck KGaA; Darmstadt
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Trypton	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Tryptanblau-Lösung 0,4%	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
X-Gal	Agilent GmbH, Böblingen

### 3.1.3 Material und Geräte für den Tierversuch

Alzet® Osmotische Pumpen Modell 1004	Charles River Laboratory Germany GmbH, Sulzfeld
BP 2000 Blutdruckmessgerät mit Tierplattform und Analyssoftware	Vistech Systems, Apex, USA
Forene	Forene GmbH & Co. KG
Leukosilk	BSN Medical GmbH, Hamburg
Lochzange für Ohrmarkierung	E. Becker & Co GmbH, Catrop-Rauxel
Mikroskopierscheren, Mikroskopierscheren, Splitterpizetten, Chirurgische Pinzetten	Hartenstein GmbH, Würzburg

Stoffwechselkäfige mit Urinsammelgefäß	AG Schupp, Würzburg
3.1.4 Arbeiten mit Zellkultur, DNA und RNA	
Agarose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Cell-Counter Gefäße	Hartenstein GmbH, Würzburg
Kryoröhrchen	Thermo Fischer Scientific GmbH, Dreieich
DirectPCR Tail	PEQLAB GmbH, Erlangen
Eppendorfgefäße (0,2ml; 0,5ml; 1,5ml; 2ml)	Sarstedt Ag & Co, Nürnberg
Einwegkanülen	DispomedWittoHG, Gelnhausen
Einwegspritzen	BD GmbH, Heidelberg
Filter-Pipettenspitzen	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Greinerröhrchen (15ml; 50ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Haemocytometer Deckgläser	Hartenstein GmbH, Würzburg
Leukosilk	BSN Medical GmbH, Hamburg
Light Cycler® Kappilaren	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Messpipetten aus Glas (1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 20ml)	Hartenstein GmbH, Würzburg
Pasteurpipetten	Hartenstein GmbH, Würzburg
Pipettenspitzen	Sarstedt Ag & Co, Nürnberg
Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig
Saftey Multifly® Set	Sarstedt Ag & Co, Nürnberg
Sterilfilter (0,2 µm, Spritzenaufsatz)	Sartorius AG, Göttingen
Sterilfilter (0,2 µm, Flaschenaufsatz)	Nalgene, Thermo Fischer Scientific GmbH Dreieich
Taq all inclusive Kit	PEQLAB GmbH, Erlangen
Zählkammer nach Neubauer	Hartenstein GmbH, Würzburg
Zellkulturflaschen Nunc™ (25cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup> ; 6-Well-Platten)	Thermo Fischer Scientific GmbH, Dreieich
Zellsieb (Cell Strainer)	BD GmbH, Heidelberg
Zyto-Filterkarten	Hartenstein GmbH, Würzburg

## 3.1.5 Durchführung der Alkalischen Elution

Filterhalter	Swinnex SX2500, Millipore, Merck KGaA; Darmstadt
Polycarbonatfilter (2µm, 25mm)	Isopore™, Milipore, Irland
Eppendorf UVette®	Eppendorf AG, Hamburg
Proteinase K (lyophilisiert)	Carl Roth GmbH; Karlsruhe
Fpg (Rohextrakt)	aus E.coli, hergestellt von D. Krimm, nach Boiteux et al. 1990

## 3.1.6 Durchführung des BigBlue® Assays

BigBlue® Media	Agilent GmbH, Böblingen
Biotestschalen 500cm <sup>2</sup> (245x245mm)	VWR GmbH, Darmstadt
Plaque Color controls	Agilent GmbH, Böblingen
X-Gal	Agilent GmbH, Böblingen
RecoverEase™ DNA isolation Kit	Agilent GmbH, Böblingen
Transpack® Packaging Extract	Agilent GmbH, Böblingen

## 3.1.7 Isolation von RNA und Durchführung qPCR

Trizol	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt
RevertAid H Minus first strand cDNA synthesis kit	Thermo Scientific Germany GmbH, Schwerte
LightCycler® fast start	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DNA master SYBr greenI	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

## 3.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose Ultrapure™	Invitrogen™, Life Technologies GmbH, Darmstadt
GeneRuler 100 bp und 1kbp	Fermentas, Thermo Scientific Germany GmbH, Schwerte
Gelkammer Wide Mini-Sub Cell GT Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

## 3.1.9 Western Blot

Blotting-Film Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare Europe
--------------------------------------	----------------------

Nitrocellulosemembran Hybond<sup>TM</sup>-C Extra Amersham Biosciences

### 3.1.10 Puffer und Lösungen

#### 3.1.10.1 Tierversuch

PSB	pH 7,4	NaCl	137mM
		KCl	2,7 mM
		NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	6,5 mM
		KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
		CaCl <sub>2</sub>	0,9 mM
		MgSO <sub>4</sub>	0,9 mM

Angiotensin II in PBS gelöst	1. Versuchsdurchlauf	9,9 mg/ml
	2. Versuchsdurchlauf	9,1 mg/ml
	3. Versuchsdurchlauf	10,1 mg/ml

#### 3.1.10.2 Isolation primärer Zellen aus Mäusen

Zur Isolation primärer Hepatozyten und Nierenzellen werden EGTA-Puffer, Kollagenase-Puffer und Suspensions-Puffer benötigt, diese werden aus den folgenden Stammlösungen hergestellt. Die Lösungen werden falls nicht anders beschrieben autoklaviert und bei 4°C gelagert.

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

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

Die Aminosäuren werden in 90% des Volumens an H<sub>2</sub>O dest. aufgenommen und durch Zugabe von 10 N NaOH gelöst. Anschließend wird der pH auf 7,6 eingestellt (2 N HCl). Die Lösung wird sterilfiltriert und kann bei 4°C gelagert werden.

L-Glutamin-Lösung L-Glutamin 48 mM

Die Glutamin-Lösung wird durch Verdünnen einer 200 mM Glutamin-Lösung (PAA, Pasching) mit H<sub>2</sub>O dest. hergestellt.

Insulin-Lösung 2 mg/ml

Die Insulin-Lösung wird durch Verdünnen einer Insulin-Lösung mit 10 mg/ml (Sigma-Aldrich, GmbH; Seelze) mit H<sub>2</sub>O dest. hergestellt.



EGTA-Lösung EGTA 125 mM

Das EGTA wird in H<sub>2</sub>O dest. aufgenommen und durch Zugabe von 1N NaOH gelöst. Anschließend wird der pH auf 7,6 eingestellt (2 N HCl). Die Lösung wird sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

CaCl<sub>2</sub>-Lösung CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O 129 mM

MgSO<sub>4</sub>-Lösung MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 100 mM

Aus den vorbereiteten Lösungen werden am Tag vor dem Versuch EGTA-Puffer, Kollagenase-Puffer und Suspensions-Puffer unter sterilen Bedingungen hergestellt. Pro Tier werden für die Isolation der primären Hepatozyten 50 ml EGTA-Puffer, 30 ml Kollagenase-Puffer und 120 ml Suspensions-Puffer; für die Niere 10 ml Kollagenase-Puffer und 50 ml Suspensions-Puffer benötigt. **Tabelle 3-1** gibt die Zusammensetzung der benötigten Puffer aus den Stammlösungen an.

**Tabelle 3-1:** Ansätze für EGTA-, Kollagenase- und Suspensions-Puffer

Lösung	EGTA-Puffer	Kollagenase-Puffer	Suspensions-Puffer
Glucose-Lsg.	62,5	60	62,5
KH-Puffer	10	9,6	10
Hepes pH 8,5	10	9,6	
Hepes pH 7,6			10
Aminosäure-Lsg.	15	14,4	15
Glutamin-Lsg.	1	1	1
Insulin-Lsg.	0,5	0,5	0,5
CaCl <sub>2</sub>		3,8	0,8
MgSO <sub>4</sub>			0,4
EGTA	0,4		
BSA [g]			0,2
Kollagenase		50	
<b>gesamt</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>

EGTA- und Kollagenase-Puffer müssen vor Nutzung auf 37°C erwärmt und mit CO<sub>2</sub> begast werden.

Das CaCl<sub>2</sub> des Kollagenase-Puffers wird ebenfalls erwärmt und dem Kollagenase-Puffer nach dem Begasen zugegeben. Die Kollagenase wird erst vor der Nutzung dem Kollagenase-Puffer Zugegeben.

Das BSA wird in einem kleinen Volumen an Suspensions-Puffer aufgeschlemmt und dann dem restliche Puffer zugegeben. Der Suspensions-Puffer wird auf Eis gehalten.

Erythrozyten-Lysepuffer	pH 7,4	155 mM NH <sub>4</sub> Cl
		10 mM KHCO <sub>3</sub>
		1 mM EDTA

### 3.1.10.3 Zellkultur

DMEM high Glucose	PAA, Pasching
DMEM ohne Phenolrot	Sigma-Aldrich GmbH; Seelze
L-Glutamin 200mM (100x)	PAA, Pasching
Fötale Rinder Serum Gold	PAA, Pasching

<u>1x PBSCMF</u>	pH 7,4	137 mM NaCl
(autoklaviert)		2,7 mM KCl
		8,3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Trypsin-EDTA in PBS (1x)	PAA, Pasching
Sodium Pyruvat 100 mM	PAA, Pasching
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Pasching

### 3.1.10.4 Alkalische ELution

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

Elutionspuffer	pH 12,1	20 mM H <sub>2</sub> EDTA pH Wert mit TEAH eingestellt
Lysepuffer	pH 10,0	100 mM Glycin 20 mM Na <sub>2</sub> EDTA 2% SDS pH Wert mit 2 N NaOH eingestellt
Lysepuffer (mit Proteinase K)	pH 10,0	100 mM Glycin 20 mM Na <sub>2</sub> EDTA 2% SDS pH Wert mit 2 N NaOH eingestellt 400 mg/l Proteinase K
1x PBSCMF (autoklaviert)	pH 7,4	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Phosphatpuffer (autoklaviert)	pH 6,0	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Phosphatpuffer (autoklaviert)	pH 7,2	100 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Waschpuffer	pH 10	20 mM Na <sub>2</sub> EDTA pH Wert mit 2 N NaOH eingestellt
3.1.10.5 BigBlue® Assay		
TE-Puffer		10 mM Tris (pH7,5) 1 mM EDTA

LB-Tetrazyklin-Agarplatten (autoklaviert, pro 1l)	pH 7,0	10 g NaCl 10 g Bactotrypton 5 g Hefe-Extrakt 20 g Agar 12,5 mg Tetracyclin in 50% EtOH (sterilfiltriert)
NZY-Medium (autoklaviert, pro 1 l)	pH 7,0	5 g NaCl 2 g MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O 5 g Hefe-Extrakt 10 g Casein-Pepton
NZY Agar (autoklaviert, pro 1 l)	pH 7,0	NZY-Medium 15 g Agar
NZY Top Agar (autoklaviert, pro 1 l)	pH 7,0	NZY-Medium 7 g Agarose
MgSO <sub>4</sub> -Lösung		10 mM Mg SO <sub>4</sub>
MgSO <sub>4</sub> -Maltose Lösung		1M Mg SO <sub>4</sub> 20% (w/v) Maltose
SM-Puffer (autoklaviert)	pH 7,5	5,8 g NaCl 2 g MgSO <sub>4</sub> * 7 H <sub>2</sub> O 50ml 1M Tris-HCl (pH 7,5) 5ml Gelatine-Lösung (2% (w/v)) ad 1 l Aqua dest
3.1.10.6 Western Blot		
5x Elektrophorese-Puffer (autoklaviert)		15,1 g Tris 94 g Glycin 25 ml 20%ige SDS-Lösung ad 1 l Aqua dest.

10x Ponceaurot	2 g Ponceau S 30 g Trichloressigsäure 30 g Sulfosalicylsäure ad 1 l Aqua dest.
Sammelgel SDS-PAGE 8%	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
10x TBS (autoklaviert)	12,1 g Tris 87,8 g NaCl ad 1 l Aqua dest.
Trenngel SDS-Page	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

### 3.1.11 Maus-Stämme

Die verwendeten Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden von Dr. Markus Fusser durch die Kreuzung von BigBlue®-Mäusen und *Csb*<sup>-/-</sup>*Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen in drei Schritten generiert und besitzen somit den selben genetischen Hintergrund.

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

Homozygot transgene Tiere wurden von Dr. Arne Klungland (Institute of Medical Microbiology, Rikshospitalet und Universität Oslo, Norwegen) zur Verfügung gestellt. Das Gen für OGG1 liegt auf Chromosom 6, das Gen für CSB liegt auf Chromosom 14.

## 3.1.12 Zellkulturlinien

### F11.1

Spontan immortalisierte Mausembryo-Fibroblasten von Wildtyp-Mäusen, erhalten von D. Barnes (Imperial Cancer Research Fund, Clare Hall Laboratories, South Mimms, Hertfordshire, UK).

### *Ogg1*<sup>-/-</sup>-MEF

Spontan immortalisierte Mausembryo-Fibroblasten von *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen, erhalten von D. Barnes (Imperial Cancer Research Fund, Clare Hall Laboratories, South Mimms, Hertfordshire, UK).

### HEK

Humane embryonale Nierenzellen, erhalten von AK Helm (Institut für Pharmazie und Biochemie, Universität Mainz).

### LLC-PK1

Nierenepithelzellen des Schweins, erhalten von AG Schupp (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg).

## 3.1.13 Antikörper

### β-Aktin C4

Maus monoklonaler Antikörper  
(sc 47778; Lot 3012)

Santa Cruz Biotechnology, Inc.  
Heidelberg

eNOS/NOS Typ III Maus monoklonaler Antikörper (Cat 610297; Lot 2244736)	BD Bioscience GmbH Heidelberg
p-eNOS (S1177) Kaninchen monoklonaler Antikörper (9570BC; Lot 4)	Cell Signaling; NEB GmbH Frankfurt
Ziege-Anti_maus IgG-HRP (sc 2005; Lot F2612)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg
Ziege-Anti.Kaninchen IgG-HRP (sc 2004; Lot F2612)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg
Eahy 926 Lysat (Positivkontrolle)	Cell Signaling; NEB GmbH
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (26616)	Thermo Scientific, Dreieich

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Arbeiten mit Mäusen

#### 3.2.1.1 Haltung der Tiere

Die Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse werden in der zentralen Versuchstiereinrichtung der Universitätsklinik Mainz gehalten. In den Tierräumen herrscht ein 12 Stunden dauernder Hell-/Dunkelrhythmus bei 22,5 ± 2,5 °C und 50-70% Luftfeuchtigkeit. Die routinemäßige Pflege der Tiere erfolgte durch die Tierpfleger der ZVTE der Universität Mainz. Die Zucht, Haltung und der durchgeführten Tierversuche erfolgten nach den Bestimmungen des Deutschen Tierschutzgesetzes.

### 3.2.1.2 Genotypisierung

Die Überprüfung des Genotyps der Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse wird mittels Polymerase Ketten-Reaktion (PCR) aus genomischer DNA des Tiers kontrolliert. Die genomische DNA wird mit dem Peqlap DirectPCR® Lysis Reagent Tail isoliert, anschließend wird mit Hilfe spezifischer Primer die PCR durchgeführt. Die spezifischen Primer für Wildtyp und *Ogg1*<sup>-/-</sup> liefern unterschiedliche große Genprodukte, welche dann in der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und analysiert werden können. Außerdem muss das Vorhandensein des *lacI* -Gens kontrolliert werden

Für die Schwanzbiopsie wird der Maus ein Stück der Schwanzspitze (0,2-0,5 cm) mit Hilfe einer desinfizierten Schere abgeschnitten. Die Schwanzbiopsien werden aus Tierschutzgründen nur bis zur 4. Woche nach der Geburt entnommen. Zur Unterscheidung der Tiere werden diese mit einer speziellen Nager-Ohrlochzange markiert.

Zu der Schwanzbiopsie werden 200 µl Proteinase K-haltiger Lysepuffers (0,4 mg/ml) gegeben, und für 3-16 h bei 55°C im Wasserbad inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K werden die Proben anschließend für 45 min bei 85°C inkubiert. Die Proben können nach der Hitze-Inaktivierung direkt verwendet werden oder bei -20°C gefroren werden.

Primer für die Genotypisierung:

*Ogg1*:

for: ATGAGGACCAAGCTAGGTGAC

rev wt: GCCTCACAATCAACTTATCCC

rev ko: ATCTGCGTGTTCTGAATTCGCCAAT

Produktgröße: ko: 300 bp wt: 250 bp

*LacI*

for: Aus Lizenzgründen darf die Sequenz nicht veröffentlicht werden

rev: Aus Lizenzgründen darf die Sequenz nicht veröffentlicht werden

Produktgröße: 1340 bp



Die PCR Reaktion wird mit dem PeqlapGold *Taq*-DNA-Polymerase “all inclusive” und folgenden Reaktionsansätzen durchgeführt.

**Tabelle 3-2:** Ansatz für Mastermix der PCR zur Genotypisierung

	<b><i>Ogg1</i></b>	<b><i>LacI</i></b>
Reaktionspuffer Y	5 µl	5 µl
Enhancer Lösung P	10 µl	
dNTP- Mix (10mM)	1 µl	1,5 µl
Upstream Primer (25pM)	2 µl	1 µl
Downstream Primer ko (25pmol/µl)	2 µl	1 µl
Downstream Primer wt (25 pmol/µl)	2 µl	
Taq Polymerase	0,25 µl	0,25 µl
H <sub>2</sub> O steril	26,75 µl	40,25 µl
Template	1 µl	1 µl
<b>Volumen gesamt</b>	<b>50 µl</b>	<b>50 µl</b>

Nach Zugabe des DNA-Templates wird die PCR mit folgendem Programm gestartet:

<i>Ogg1:</i>		<i>LacI:</i>	
1 Zyklus	94°C 3 min	1 Zyklus	95°C 3 min
35 Zyklen	94°C 45 s	38 Zyklen	95°C 30 s
	59°C 1 min		53°C 45 s
	72°C 2 min		72°C 75 s
1 Zyklus	72°C 10 min	1 Zyklus	72°C 10 min

Die entstandenen PCR-Produkte werden in einer Agarose-Elektrophorese analysiert.

### 3.2.1.3 Angiotensin II-Behandlung

Angiotensin II wird den Mäusen durch osmotische Minipumpen der Firma Alzet® zugeführt. Die Pumpen müssen zum Equilibrieren 48 h vor der Transplantation befüllt werden. Das Angiotensin II wird in PBS gelöst, sterilfiltriert und dann mittels mitgelieferter Kanülen in die Pumpen gefüllt. Die vollständige Befüllung wurde über

das Gewicht der Pumpe kontrolliert. Die Pumpen beinhalten ein Volumen von etwa 100  $\mu\text{l}$  (entsprechend der Beschriftung), es werden 0,1  $\mu\text{l}$  der Lösung pro Stunde abgegeben. Durch das mittlere Gewicht der Mäuse und die gewünschte Dosis von 0,6  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$  ergibt sich eine Angiotensinkonzentration von 9,9 mg/ml im ersten, 9,1 mg/ml im zweiten und 10,0 mg/ml im dritten Versuchsdurchlauf.

Mit Hilfe der „Tail-Cuff“ Methode, eines nicht-invasiven Messsystems, wird der systolische und diastolische Blutdruck sowie die Herzfrequenz der Tiere bestimmt. Bei dieser Methode wird am wachen Tier mit einer Druckmanschette am Schwanz und einem optischen Pulssensors distal der Blutdruck ermittelt. Zur Gewöhnung der Tiere werden vor dem Versuch mindestens 3 Messungen unternommen. Zur eigentlichen Blutdruck-Messung werden nach 3 Vormessungen, 10 Messungen durchgeführt und der systolische und diastolische Wert gemittelt.

Zur Transplantation der osmotischen Minipumpen werden die Tiere mit Isofluran betäubt und dann mit Xylazin/Ketamin narkotisiert. Nach Entfernen des Fells im Nackenbereich wird mit einem Schnitt das Fell geöffnet, die Pumpe eingesetzt und mit Hilfe von Klammern wieder verschlossen. Die Pumpe bleibt bis zum Ende des Versuchs transplantiert. 2 Tage nach der Operation kann die erste Blutdruckmessung stattfinden.

#### 3.2.1.4 Organisation

Die Tiere werden durch eine Überdosis Isofluran getötet. Mit einem Y-Schnitt wird das Abdomen geöffnet.

#### Niere

Aus den Nieren muss zum einen, für die Messung der DNA-Schäden mit der Alkalischen Elution, eine Einzelzell-Suspension von Nierenzellen hergestellt werden. Aus weiteren Tieren werden nur die Nieren entnommen, halbiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die gefrorenen Nieren werden für Messung der *lacI*-Mutationen, der Genexpression und in Würzburg, für die DHE-Färbung, die  $\gamma\text{H2AX}$ -Färbung und eine histologische Auswertung, verwendet.

Für die Gewinnung der Einzelzell-Suspension wird die Niere entnommen, gewogen und mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten. Anschließend werden die

Nierenfragmente in 10 ml Kollagenasepuffer in einem Schüttelinkubator bei 60 Umdrehungen pro Minute bei 37°C für 45 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wird durch ein 100µm Zellsieb filtriert, bei 4°C und 1200 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Zum Entfernen der Erythrozyten wird das Pellet in 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dieser Inkubation wird der Lysepuffer mit Suspensionspuffer auf 20 ml verdünnt, erneut bei 4°C und 1200 x g für 10 Minuten zentrifugiert und danach in 10 ml Suspensionsmedium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellmenge werden die Zellen mit Trypanblau gefärbt und unter dem Mikroskop gezählt.

#### Leber

Die Isolation primärer Hepatozyten wird mit einer 2-Schritt-EGTA/Kollagenase Perfusions-Technik durchgeführt (Hengstler et al. 2000). Die Pfortader wird freigelegt und mit einem Faden wird eine Schlinge um die Pfortader gelegt. Anschließend wird die Pfortader mit einer Gefäßschere punktiert und eine Kanüle, welche über einen Schlauch mit dem EGTA-Puffer verbunden ist, in das eröffnete Gefäß eingeführt. Mit dem Faden wird die Kanüle in der Pfortader fixiert. Mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe werden nun 15 ml EGTA-Puffer in 15 min und anschließend 30 ml Kollagenasepuffer in 30 Minuten durch die Leber gepumpt. Anschließend wird die Leber entnommen und in 20 ml kaltem Suspensionspuffer in einer Petrischale durch schwenken resuspendiert. Nach Filtration durch ein 100 µm Zellsieb wird die Zellsuspension bei 4°C und 100 x g für 10 Minuten zentrifugiert, in 20 ml Suspensionspuffer gewaschen und nach erneuter Zentrifugation bei 4°C und 100 x g für 10 Minuten in 20 ml Suspensionspuffer resuspendiert. Die Hepatozyten werden mit Trypanblau gefärbt zur Bestimmung der Vitalität und Zellmenge. Für die Alkalische Elution wurden 0,5 Millionen Zellen pro Spur verwendet.

#### Lymphozyten aus der Milz

Zur Gewinnung der Lymphozyten aus der Milz wird diese entnommen und gewogen. Um die Lymphozyten aus der Milz zu spülen wird mit einer Kanüle (0,4 mm) mit mehreren Stichen etwa 1 ml PBS in die Milz gespritzt. Anschließend wird die Zellsuspension durch ein 100µm Zellsieb filtriert und bei 4°C und 1500 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Zum Entfernen der Erythrozyten wird das Pellet in 1 ml Erythrozyten-Lysepuffer resuspendiert und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach dieser

Inkubation wird der Lysepuffer mit Suspensionpuffer auf 20 ml verdünnt, erneut bei 4°C und 1200 x g für 10 Minuten zentrifugiert und danach in 40 ml RPMI-Vollmedium resuspendiert. Die Zellzahl wird mit dem Coulter Counter bestimmt. Für die Alkalische Elution werden 1,5 Millionen Zellen pro Spur verwendet.

### Mikrokerne

Von jedem Tier des Tierversuchs wird ein Blutausschlag angefertigt zur Bestimmung der Mikrokerne in den Erythrozyten (siehe 3.2.6).

### 3.2.2 Arbeiten mit Zellkultur

Zellen werden in einem Inkubator mit 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle Arbeiten werden an einer Sterilbank unternommen. Die Zellen werden maximal 4 Wochen in Kultur gehalten. Zum Auftauen werden die Zellen schnell in einem 37°C Wasserbad getaut, anschließend in 8 ml kaltem Vollmedium resuspendiert und abzentrifugiert. Danach werden sie in Vollmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt.

Zum Passagieren werden die Zellen zweimal mit warmen PBSCMF gewaschen, anschließend werden 0,5 – 1,5 ml Trypsin, abhängig der Größe der Zellkulturflasche, zugegeben und die Zellen für etwa 3 min im Brutschrank inkubiert. Die Zellen werden danach mit Vollmedium resuspendiert und in einer frischen Zellkulturflasche ausgestreut.

Zum Einfrieren werden die Zellen bis zum Ablösen wie beim Passagieren behandelt, nach der Trypsinbehandlung jedoch in kaltem 10% v/v DMSO resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Die Zellen werden langsam gefroren, für etwa 2 Stunden bei -20°C, über Nacht bei -80°C und letztendlich in flüssigen Stickstoff gelagert.

### 3.2.3 Alkalische Elution

#### 3.2.3.1 Prinzip der Alkalischen Elution

Die Alkalische Elution ist eine hochempfindliche Methode zur Detektion von chromosomalen DNA-Einzelstrangbrüchen. Das Verfahren geht auf (Kohn et al. 1976) zurück. Durch eine Modifikation ist es außerdem möglich weitere DNA Schäden wie Fpg-sensitive Läsionen und DNA-Fotoprodukte zu quantifizieren (Epe und Hegler 1994).

Das Prinzip der Alkalischen Elution beruht auf der Tatsache, dass DNA-Fragmente abhängig ihrer Größe einen Polycarbonatfilter passieren. Die zu analysierenden Zellen werden auf einen Polycarbonatfilter aufgetragen. Mit einem Proteinase K- und SDS-haltigen Puffer werden die Zellen lysiert und alle Zellbestandteile außer der DNA von dem Filter heruntergewaschen. Anschließend wird die DNA durch einen Puffer mit einem alkalischen pH-Wert (pH 12) denaturiert und durch den Polycarbonatfilter eluiert. Es werden 6 Fraktionen gesammelt. Nicht eluierte, sehr lange DNA-Fragmente werden vom Filter in die 6. Fraktion gewaschen. Mit Hilfe eines fluoreszenten DNA-interkallierenden Farbstoffes wird der DNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen quantifiziert. Aus dem DNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen kann ein Elutionsprofil erstellt werden, welches proportional zur Menge an DNA-Einzelstrangbrüchen ist.

Durch eine Modifikation der Methode können neben DNA-Einzelstrangbrüche auch Fpg-sensitive Läsionen nachgewiesen werden. Nach der Lyse der Zellen wird in diesem Fall die DNA mit der Endonuklease Fpg inkubiert. Fpg-sensitive Läsionen werden von dem Enzym erkannt, das Enzym schneidet die modifizierte Base aus dem Zucker-Phosphatrückgrat heraus. Durch die Lyase-Aktivität des Enzyms wird das Zucker-Phosphatrückgrat aufgebrochen und es entsteht ein DNA-Einzelstrangbruch. Subtraktion der Fpg-sensitiven Läsionen minus der DNA-Einzelstrangbrüche liefert die Menge an vorhandenen Fpg-sensitiven Läsionen.

Es wird zwischen der langsamen und der schnellen Elution unterschieden, in der Langsamen Elution können DNA Läsionen bis etwa 0,9 Läsionen pro  $10^6$  Basenpaare detektiert werden. In der schnellen Elution können Läsionen bis etwa 3 pro  $10^6$  Läsionen bestimmt werden.

### 3.2.3.2 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau der Alkalischen Elution besteht aus einem Spritzenhalter in den 20 25ml-Einwegspritzen ohne Kolben eingespannt sind. Die 25ml-Einwegspritzen sind mit der Spritzenspitze nach unten angeordnet, alle Zellsuspensionen und verwendeten Lösungen und Puffer werden von oben in die Spritze gefüllt.

An die 25ml-Einwegspritzen ist ein Fritthalter angeschraubt. Die Fritthalter tauchen während des Versuchs in ein temperierbares, höhenverstellbares

Wasserbad. Von jedem Frittenhalter führt ein Schlauch weiter durch eine peristaltische Pumpe. Anschließend enden die Schläuche an einem Fraktionssammler mit einem Reagensglasständer in welchem pro Spur mindestens sechs Fraktionen gesammelt werden können.

Zur Vorbereitung der Alkalischen Elution müssen die Polycarbonatfilter mit einer Porengröße von 2  $\mu\text{m}$  in die Fritten gebaut werden. Hierzu wird der Frittenboden von dem Frittenhalter geschraubt, und eine Fritte wird in den Frittenboden gepasst. Über den zum Frittenboden führenden Schlauch wird mit Hilfe einer Einwegspritze  $\text{H}_2\text{O}$  dest. blasenfrei durch die Fritte gedrückt und ein Polycarbonatfilter passend auf die Fritte gelegt. Der Frittenboden wird auf den Frittenhalter geschraubt, welcher auf das Gewinde der 25ml-Einwegspritze geschraubt ist. Es wird etwa 2ml  $\text{H}_2\text{O}$  dest durch den Filter in die 25ml-Einwegspritze gespritzt. Anschließend wird das  $\text{H}_2\text{O}$  dest durch die Anlage gepumpt. Es ist darauf zu achten, dass die Polycarbonatfilter niemals trocken laufen. Überstehende Flüssigkeiten werden mit einer Pasteur-Pipette aus den 25ml-Einwegspritzen entfernt. Anschließend wird das System zweimal mit 3ml PBSCMF-Puffer gespült. Das Wasserbad wird auf 4°C eingestellt und die Fritten in das Wasserbad getaucht.

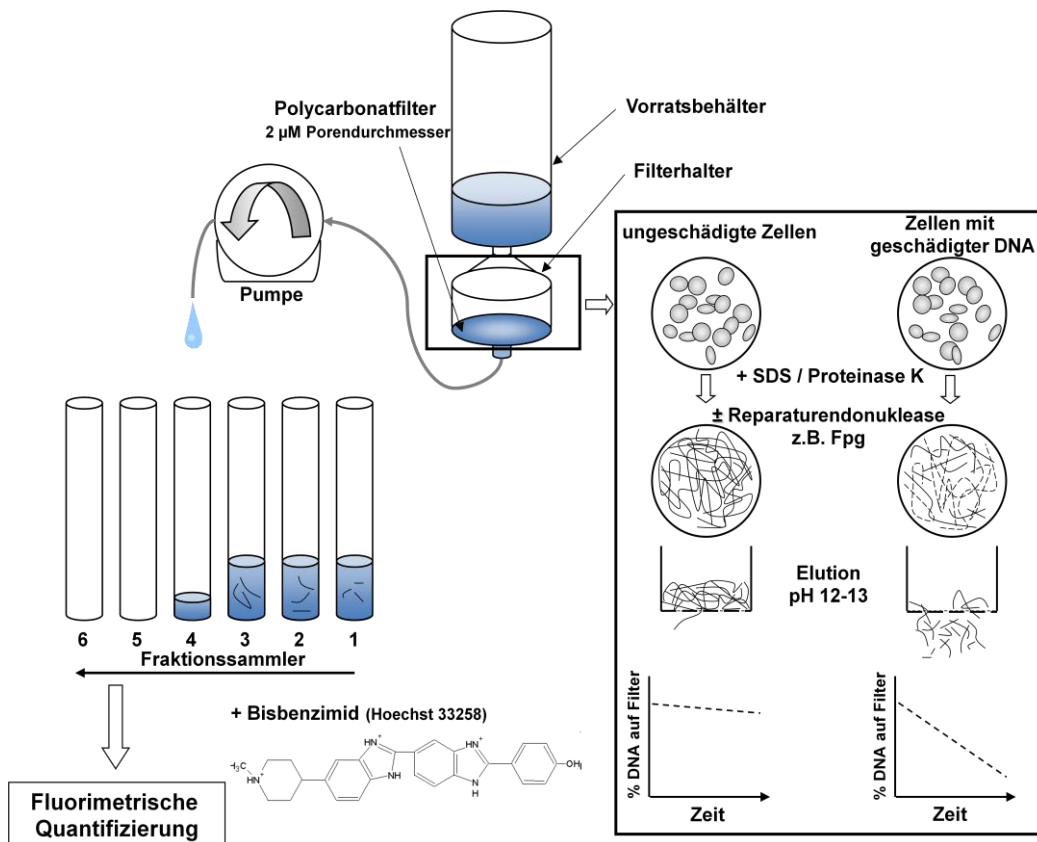


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung der Alkalischen Elution (modifiziert nach Fußer, 2010)

### 3.2.3.3 Durchführung

Für die Alkalische Elution werden Einzelzellsuspensionen der zu analysierenden Zellen benötigt. Zur Bestimmung der DNA-Einzelstrangbrüche wird pro Ansatz eine Spure vorbereitet, zur Bestimmung der Fpg-sensitiven Läsionen werden zwei Spuren als Duplikate vorbereitet. Je Filter muss eine Million Zellen aufgetragen werden um eine DNA Menge von 10 µg DNA zu erhalten. Nach dem Auftragen werden die Zellen zweimal mit 3ml kaltem PBSCMF-Puffer gewaschen, in dieser Zeit sollte das Wasserbad auf 25°C erwärmt werden. Sobald das Wasserbad 15°C überschritten hat müssen die Zellen einmal mit 2 ml Lysepuffer gewaschen werden, danach werden 5 ml Proteinase K-haltiger Lysepuffer (0,04mg/ml Proteinase K) aufgetragen und in 90 Minuten durch die Filter gepumpt. Nach der Proteinase K Behandlung werden die Filter sieben Mal mit 5 ml BE1-Puffer gewaschen. In dieser Zeit muss das Wasserbad auf 37°C erwärmt werden. Die Spuren ohne Fpg-Behandlung werden mit 2 ml BE1-Puffer befüllt. Die Spuren mit Fpg-Behandlung werden mit 2 ml Fpg-haltiger BE1-Puffers (3 µg/ml Fpg-Rohextrakt) befüllt. Der erste 1 ml des aufgetragenen Fpg-haltigen oder -freien Puffers wird schnell durch den Filter gepumpt, der zweite 1 ml wird in 50 Minuten durch die Filter gepumpt. Anschließend wird das Wasserbad auf 25°C abgekühlt, die Filter werden zweimal mit 5 ml BE1-Puffer und einmal mit 4 ml Waschpuffer gewaschen. Danach wird jedes Röhrchen mit 23 ml Elutionspuffer befüllt und dieses Volumen in 52 Minuten (schnelle Elution) oder 660 Minuten (langsame Elution) in 6 Fraktionen eluiert. Bei der langsamen Elution wird je Fraktion 2 Stunden eluiert, bei der schnellen Elution je Fraktion 9 Minuten.

Nach der Elution werden die Filter und Fritten aus den Frittenböden gebaut und im Volumen der 6. Fraktion der Elution für 2 Stunden bei 60°C geschüttelt. Das Volumen der Fraktionen 1-5 entsprechen in der Regel 3,6 bis 3,8 ml. Ein entsprechendes Volumen wird nach dem 2 stündigen Schütteln der 6. Fraktion in ein Reagensglas überführt.

### 3.2.3.4 Auswertung und Berechnung des Schadens

Zur Vorbereitung der DNA-Quantifikation wird jede Fraktion mit demselben Volumen (3,6 - 3,8 ml) Phosphatpuffer versetzt und zur Neutralisation 15 Minuten inkubiert.

Anschließend wird zu jeder Fraktion dasselbe Volumen (3,6 - 3,8 ml) Bisbenzimidhaltiger (1,5  $\mu\text{M}$ ) Phosphatpuffer (pH 7,2) gegeben und 15 Minuten unter Lichtausschluss inkubiert. Zusätzlich zu den Proben wird ein Blindwert mit Elutionspuffer und 2 DNA-Standards in Elutionspuffer entsprechend der Proben vorbereitet. Der DNA-Standard enthält 4  $\mu\text{g}$  Kalbsthymus-DNA. Die in jeder Spur enthaltene Menge an DNA kann durch Vergleich mit dem DNA-Standard ermittelt werden.

Die Emissionsintensität des Bisbenzimid-DNA Komplexes jeder Probe wird nach einer Anregung bei 360nm, bei 450nm im Fluorimeter detektiert. Vor der Messung wird mit dem Blindwert ein Nullwert eingestellt. Die DNA-Standards werden vermessen. Außerdem werden die 6 Fraktionen der Spur eines zellfreien Leerwerts vermessen und in jeder Spur von dem gemessenen Wert der entsprechenden Fraktion subtrahiert. Die Gesamtmenge der DNA einer Spur ist proportional zu der Summe der Fluoreszenzintensität der jeweiligen Fraktion, wodurch sich der DNA-Gehalt jeder Fraktion berechnen lässt. Wird der DNA-Gehalt im halblogarithmischen Maßstab gegen die Zeit aufgetragen, erhält man eine Gerade deren Steigung direkt proportional zu der Anzahl der DNA-Einzelstrangbrüche ist. Durch die Formel 3-1 kann die absolute Anzahl an DNA-Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Modifikationen berechnet werden. Die Faktoren -2,24 für die langsame Elution und -8,6 für die schnelle Elution wurde durch eine experimentelle Kalibrierung mit  $\gamma$ -Strahlung bestimmt (Ballmeier D, Dissertation 1997; Pflaum M, Dissertation 1996; Epe 1993).

**Formel 3-1: Berechnung der DNA-Läsionen bestimmt mit der Alkalischen Elution**

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

$$\text{Fpg} + \text{SSB} = m \times -8,6 \times 10^6 \text{ (schnelle Elution)}$$

In den Spuren, in welchen die DNA mit Fpg inkubiert wurde, setzt sich der DNA-Schaden aus Fpg-sensitiven Läsionen und DNA-Einzelstrangbrüchen zusammen, weswegen zur Berechnung der Fpg-sensitiven Läsionen die Anzahl an DNA Einzelstrangbrüchen der parallel laufenden Spur ohne Fpg-Behandlung abgezogen werden muss.



### 3.2.4 BigBlue®-Assay

#### 3.2.4.1 Prinzip des BigBlue® Mutations-Assays

Der BigBlue® Mutations-Assay oder auch Plaque Color Screening Assay mit transgenen Mäusen ist ein Versuchssystem zur Bestimmung des mutagenen Potentials von Substanzen und ist in allen Organen transgener BigBlue® Mäuse möglich. In diesem Versuch soll das mutagene Potential von Angiotensin II in der Niere überprüft werden.

Grundlage des BigBlue® Mutations-Assay ist der 45,5 kb große BigBlue®  $\lambda$ LIZ Shuttle Vektor. Dieser Vektor enthält das *αlacZ*-Gen, welches die  $\alpha$ -Untereinheit der  $\beta$ -Galactosidase codiert. Außerdem enthält der Vektor das *lacI*-Gen (*lacI<sup>q</sup>*), welches das Target der Mutagenese ist. Das *lacI*-Gen codiert den Repressor, der die Transkription des *αlacZ* Proteins unterdrückt. Kommt es zu einer Mutation im *lacI*-Gen wird der Repressor nicht gebildet und die Transkription des *αlacZ*-Gens findet statt. So wird das Reporterprotein, die  $\beta$ -Galactosidase gebildet. Der BigBlue®  $\lambda$ LIZ shuttle Vektor ist als Conctamer mit etwa 40 Kopien in das Genom der transgenen BigBlue® Mäuse auf Chromosom vier integriert.

Nach der Behandlung der BigBlue® Mäuse mit der zu testenden Substanz wird aus dem zu analysierenden Organ die DNA isoliert. Der BigBlue®  $\lambda$ LIZ Shuttle Vektor wird aus der DNA extrahiert und in Phagen-Partikel verpackt. Die Phagen werden von einer SCS-8 Bakterienkultur adsorbiert und auf großen Screeningplatten ausplattiert. Es entsteht ein Bakterienrasen, mit Phagen infizierte Bakterien werden von diesen lysiert und bilden ein Plaque. Der SCS8-Bakterienstamm bildet die  $\beta$ -Untereinheit der  $\beta$ -Galactosidase, so dass ein funktionsfähiges  $\beta$ -Galaktosidase Protein gebildet wird. Im Top-Agar vorhandenes X-Gal wird durch die  $\beta$ -Galaktosidase hydrosyliert und es entsteht Galaktose und 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol, welches an der Luft zu dem blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo oxidiert wird. Eine Mutation in einem BigBlue®  $\lambda$ LIZ shuttle Vektor resultiert nach Adsorption durch Bakterien und deren Lyse in einem blauen Plaque. Das Verhältnis von blauen Plaques zu der Anzahl an insgesamt analysierten Plaques ergibt ein Maß der Frequenz von Mutationen und somit Aufschluss über das mutagene Potential einer Substanz.

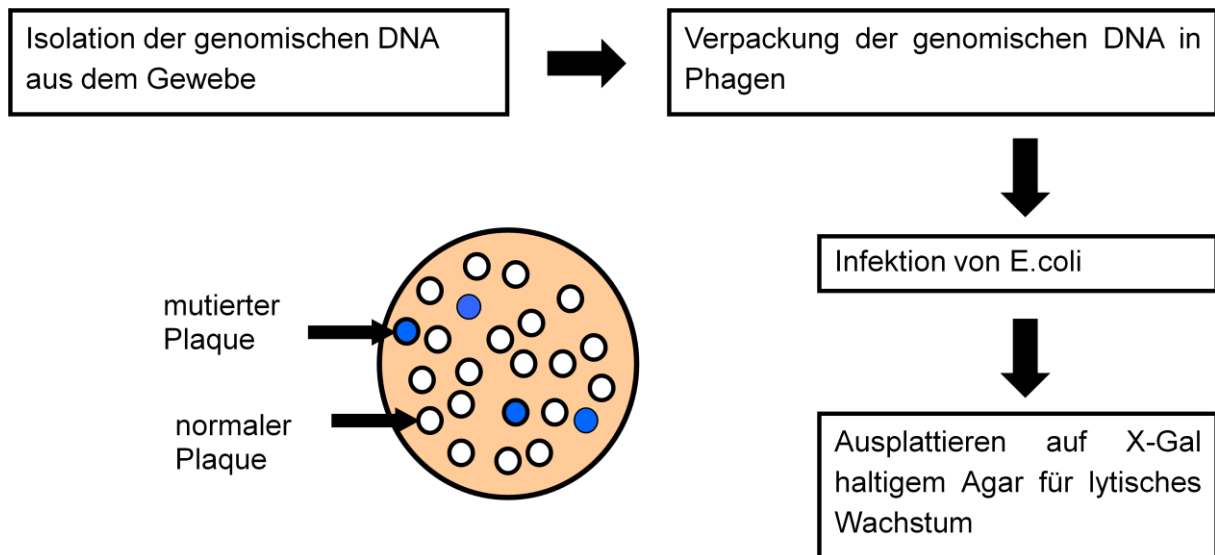


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung des BigBlue® Color Screening Assay

#### 3.2.4.2 Isolation der genomischen DNA

Die DNA wird aus in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen, halben Nieren isoliert. Das Gewicht der Gewebeproben beträgt zwischen 70 und 100 mg.

In einem auf Eis gekühlten Homogenisator-Gefäß werden 5 ml des vom Hersteller mitgelieferten Lysepuffer vorgelegt und 50 – 100 mg des bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gefrorenen Gewebes zugegeben. Mit achtmaligem Auf- und Abbewegen des Pistills „loose“ wird das Gewebe homogenisiert. Anschließend werden mit dem Pistill „tight“ und weiteren acht Auf- und Abbewegungen die Zellkerne freigesetzt. Die Suspension wird durch ein steriles Zellsieb in ein steriles 50 ml Greiner Röhrchen überführt. Mit 3 ml des Lysepuffers wird das Homogenisatorgefäß gespült und ebenfalls durch das Zellsieb in das Greiner-Rohr überführt. Zum Pelletieren der Zellbestandteile wird die Suspension bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $2000 \times g$  für 10 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird das Pellet mit 70  $\mu\text{l}$  des vom Hersteller mitgelieferten Verdauopuffer aus einer Proteinase K-Lösung und MikroRNase (20  $\mu\text{l}$  / ml) aufgenommen, und bei  $50^{\circ}\text{C}$  für 45 min inkubiert. Die DNA wird zum Reinigen über nach auf einer vom Hersteller mitgelieferten Dialyse-Membran in TE-Puffer dialysiert. Nach Reinigung der DNA wird die hochviskose DNA in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 3.2.4.3 Verpackung der genomischen DNA in Phagen

Zur Verpackung der DNA werden für jedes zu analysierende Organ 5 Verpackungsansätze durchgeführt. Für den ersten Schritte werden 5 Röhrchen der vom Hersteller mitgelieferten „Verpackungsmix rot“-Röhrchen benötigt. Der Inhalt eines jeden roten Röhrchen wird zu etwa 70% aufgetaut, durch kurze Zentrifugation gesammelt und anschließend mit 12, 14, 16, 18 und 20 µl des zu verpackenden DNA-Ansatzes vermischt. Der Reaktionsansatz wird für 90 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wird ein Röhrchen „Verpackungsmix blau“ aufgetaut, kurz zentrifugiert und jeweils 12 µl des Inhalts in jedes rote Röhrchen gegeben und ebenfalls für 90 min bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Jeder Reaktionsansatz wird letztendlich mit SM-Puffer auf 1000 µl aufgefüllt. Sollte der Ansatz der in Phagen verpackten DNA nicht sofort weiterverwendet werden kann durch Zugabe von 50 µl Chloroform der Ansatz für 4 Wochen bei 4°C gelagert werden.

#### 3.2.4.4 Kontrolle der Verpackungsreaktion

Zur Bestimmung der Effizienz der Verpackung der DNA werden 200 µl einer SCS-8 Tagkultur (OD 3-5) mit 1 µl jedes verpackten DNA-Ansatzes in Duplikaten beimpft. Zur Adsorption der (Heinmoller et al. 2000) Phagen in die Bakterien werden die Bakterienansätze für 15 min bei 37°C inkubiert. Zum Ausplattieren werden zu jedem Ansatz 4 ml geschmolzene BigBlue® Top-Agarose gegeben, gevortext und auf einer 100 mm BigBlue® Bottom-Agar Bakterienkulturschale ausplattiert. Die Platten werden über Nacht in einem Inkubator bei 37°C inkubiert und die entstandenen Plaque-bildenden Einheiten (*pfu = Plaque forming units*) werden am nächsten Morgen ausgezählt. Zur Bestimmung der absoluten Anzahl an *pfu* soll der Wert der gezählten Plaques um den Faktor 1,3 korrigiert werden.

#### 3.2.4.5 Screening

Die Screening Platten müssen 48 Stunden vor dem Versuch gegossen werden. Sie werden bei Raumtemperatur gelagert und kurz vor dem Ausplattieren auf 37°C temperiert. Pro Screeningplatte 250 ml BigBlue® Bottom-Agar benötigt. Für jede Screeningplatte werden zudem 35 ml BigBlue® Top-Agarose benötigt. Vor dem

Screening-Versuch muss der Top-Agarose noch X-Gal zugegeben werden. Pro 1 ml Top Agar werden 1,5 mg X-Gal benötigt, welche zuvor in DMF gelöst werden muss. Je 100 ml Top-Agarose werden 150 mg X-Gal in 0,525 ml DMF gelöst.

Zum Screening der Plaques sollen pro Screeningplatte 30.000 Plaques ausplattiert werden. Bestmöglich werden pro Probe 10 Screeningplatten ausplattiert, pro Platte 2ml Baktrienkultur einer Tagkultur mit einer optischen Dichte von OD 3-5 (Heinmoller et al. 2000). Die gesamte für den Versuch benötigte Menge an Bakterien wird mit dem gesamten für den Versuch benötigten Volumen an Phagensuspension gemischt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird das Volumen an Bakterien-Phagensuspension zu gleichen Teilen auf so viele 50ml Greinerröhrchen aufgeteilt wie Platten gescreent werden sollen. Zusätzlich werden für Titerplatten 2 Röhrchen mit 2 ml der Bakteriensuspension und 50 µl der inkubierten Bakterien-Phagensuspension hergestellt. Zum Ausplattieren werden zu jedem Röhrchen 35 ml Blue Top-Agarose gegeben, gevortext und ausplattiert. Die Platten werden über Nacht im Inkubator bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag werden alle Platten gründlich auf blaue *pfu* gescreent. Gefundene *pfu* werden aus dem Agar herausgeschnitten und in ein Röhrchen mit 500µl SM-Puffer und 50 µl Chloroform überführt. Die absolut ausgestreute Anzahl an *pfu* wird mit Hilfe der Titerplatten bestimmt.

Zur Überprüfung aller gepickten *pfu* werden diese erneut in 100 mm ausgestreut. Es werden 200 µl einer Tagkultur mit einer optischen Dichte von OD 2 mit 1 µl der Lösung des SM-Puffers mit dem gepickten *pfu* für 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 4 ml X-Gal-haltigem Topagar auf 100 mm Bakterienkulturschalen ausplattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert und am nächsten Tag wird das vorhanden sein blauer Plaques kontrolliert.

Zur Berechnung der Mutationsfrequenz wird der Quotient der überprüften *pfu* zu der Menge an gesamt ausplattierten und gescreenten *pfu* gebildet.

### 3.2.5 Messung der Genexpression

#### 3.2.5.1 RNA-Isolation aus der Niere

In einem 1,5 ml-Eppendorf Gefäß werden 500 µl Trizol® Reagent vorgelegt und eine halbe Niere (50-100 mg) zugegeben. Mit einem Glas-Teflon® Homogenisator wird das Gewebe homogenisiert und weitere 500 µl Trizol® Reagent zugegeben. Durch Zentrifugation bei 4°C und 12.000 x g für 10 min werden Lipide, Proteine und Polysaccharide abgetrennt. Es werden 200 µl Chloroform zugegeben, durch invertieren wird die Suspension gemischt und für 2-5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phasenseparation wird durch Zentrifugation bei 4 °C und 12.000 x g für 15 min erreicht. Die obere, wässrige Phase wird abgetrennt und in ein neues 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Das Volumen sollte etwa 500 µl betragen. Zur Präzipitation der RNA werden zu der wässrigen Phase 500 µl Isopropanol gegeben, die Lösung wird invertiert und anschließend bei 4°C und 34.000 x g für 30 min zentrifugiert. Das präzipitierte Pellet wird mit 1 ml 70% Ethanol in DEPC-H<sub>2</sub>O gewaschen und erneut bei 4°C und 34.000 x g für 20 min zentrifugiert. Das gereinigte Pellet wird in 200µl DEPC- H<sub>2</sub>O gelöst und mit dem Spektrophotometer quantifiziert.

**Formel 3-2: Berechnung der RNA-Konzentration:**

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

In einer denaturierenden Agarose-Gelelektrophorese wird kontrolliert ob die RNA intakt ist. Es werden 4 µg der RNA mit Hilfe eines Ladepuffers für 5 min bei 70°C denaturiert und anschließend auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen. Agarose-Gel und TAE-Laufpuffer werden mit DEPC-H<sub>2</sub>O angesetzt.

#### 3.2.5.2 RNA Isolation aus der Aorta

In einem 1,5ml-Eppendorf Gefäß werden 500 µl PegGOLD TriFast vorgelegt. In einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser mit Pistill muss nun eine in flüssigem Stickstoff gelagerten Aorten (etwa 20mg) fein gemörsert werden und in das 1,5ml-Eppendorf Gefäß überführt werden. Anschließend wird 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach werden 100 µl Chloroform zugegeben und die Probe wird für 15s gevortext. Anschließend wird für weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phasenseparation wird durch Zentrifugation bei 12.000 x g für 10 min erreicht. Die

wässrige Phase wird in ein neues 1,5ml-Eppendorf Gefäß überführt und es werden 250 µl Isopropanol und 1 µl GlycoBlue™ zugegeben. Die Probe wird kurz gevortext und danach zur Präzipitation etwa 1h bei -20°C gelagert. Nach Zentrifugation bei 4°C und 12.000 x g für 10 min wird der Isopropanol-Überstand abgenommen und das präzipitierte Pellet wird zweimal mit 500 µl 75%igem Ethanol in DEPC-H<sub>2</sub>O gewaschen. Das gereinigte Pellet wird in 20µl DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert und mit Nanotrop quantifiziert. Da es sich um sehr wenig Gewebe und dementsprechend wenig RNA isoliert werden kann, wurde direkt zur Reversen Transkription übergegangen.

### 3.2.5.3 Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription wird das First strand cDNA Kit von Fermentas verwendet. Es werden 0,2-5 µg RNA eingesetzt und Ansätze nach **Tabelle 3-3** hergestellt.

**Tabelle 3-3:** Mastermix für die Reverse Transkription

	<b>RT</b>	<b>no RT-Kontrolle</b>
RNA (0,2-5µg)	8 µl	8 µl
Random hexamer primer	1 µl	
DEPC-H <sub>2</sub> O	3 µl	12 µ
Inkubation bei 70°C für 5 min		
5x Reaktions-Puffer	4 µ	
RiboLock RNase Inhibitor	1 µl	
10mM dNTP mix	2 µl	
Inkubation bei 25°C für 5 min		
RevertAid M-Mul Reverse Transcriptase	1 µl	1 µl
<b>Volumen gesamt</b>	<b>20 µl</b>	<b>20 µl</b>

Nach Zugabe der RevertAid M-Mul Reverse wird folgendes Reaktions-Programm gestartet:

25°C	10 min
42°C	1 h
70°C	10 min
4°C	∞

Nach der PCR Reaktion werden die Ansätze 1:5 mit sterilem H<sub>2</sub>O verdünnt und bei -20°C gelagert.

#### 3.2.5.4 Quantitative PCR

Für die Quantitative PCR wird das LightCycler® fast start DNA master SYBr greenI-Kit der Firma Roche verwendet.

Produktgrößen und Acquisition-Temperaturen sowie Primersequenzen für die Quantitative PCR sind in **Tabelle 3-5** und **3-6** angegeben. Für die PCR wurden Reaktionsansätze nach **Tabelle 3-4** hergestellt.

**Tabelle 3-4:** Mastermix für die Quantitative PCR

PLUS mix 10x	1,2 µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	0,36 µl
Primer forward (2 µM)	3 µl
Primer reverse (2 µM)	3 µl
DEPC H <sub>2</sub> O	2,44 µl
Template	2 µl
<b>Volumen gesamt</b>	12 µl

Nach Zusammenmischen der Reaktionsansätze wurde folgendes Reaktionsprogramm gestartet:

1 Zyklus	94°C	2 min
30 Zyklen	94°C	30 s
	55°C	1 min
	70°C	1 min
1 Zyklus	70°C	70 min

Jede Probe wird in Duplikaten vermessen, außerdem wird von jeder Probe eine „no RT“-Kontrolle (ohne Reverse Transkriptase) durchgeführt. Die Temperatur bei der die Fluoreszenz eines entstandenen Genprodukts detektiert wird, wurde für jedes Primerpaar individuell bestimmt (**Tabelle 3.5**). Zur Quantifikation der Menge an Gen-

spezifischer cDNA wird in jedem Versuch ein interner Standard in zwei Verdünnungen angesetzt, aus denen mit Hilfe der Lightcycler® Software eine Standardkurve bestimmt wird. Durch Normalisierung auf die in der Zelle konstitutiv exprimierten Gene b-Akt und GAPDH können Veränderungen in der Genexpression nachgewiesen werden. Bei der Analyse der Niere wurde aufgrund der Probenmenge die no RT Kontrollen nur mit den Primern der Referenzgene b-Akt und GAPDH analysiert.

**Tabelle 3-5: Produktgröße und Temperatur zur Fluoreszenz-Messung ( $T_{ACQ}$ )**

Gen	Produktgröße / bp	$T_{ACQ}$ / °C
18s	71	82
Akt b	245	86
AT1R	149	87
CAT	237	84
GAPDH	242	84
GPX	66	82
HO-1	71	81
ICAM	269	84
IL6	187	79
MCP1	152	79
MIP1	363	85
Nrf2	224	81
Nox2	184	81
Nox4	361	78
SOD1	76	80
TNF $\alpha$	276	85
VCAM	304	80



**Tabelle 3-6: Nukleotidsequenzen der eingesetzten Primerpaare**

18s	for: TAAGTCCCTGCCCTTTGTACACA rev: GATCCGAGGGCCTCACTAAAC
Akt b	for: GTGGGCCGCTCTAGGCACCA rev: CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG
AT1R	for: AGTTGGGAGGGACTGGATGA rev: GTTAAGTCCGGGAGAGCAGC
CAT	for: ATTGCGTTCTTAGGCTTCTC rev: ACGCTTCAACAGTGCTAATG
GAPDH	for: TGCACCACCAACTGCTTAGC rev: ATGGCATGGACTGTGGTCAT
GPX	for: CCTTGCCAACACCCAGTGA rev: CCGGAGACCAAATGATGTACTTG
HO-1	for: GGTGATGCTGACAGAGGAACAC rev: TAGCAGGCCTCTGACGAAGTG
ICAM	for: GCCTCCGGACTTTTCGATCTT rev: CTGGTCCGCTAGCTCCAAAA
IL6	for: CTACCCCAATTTCCAATGCT rev: ACCACAGTGAGGAATGTCCA
MCP1	for: TGTTACTCATTACCAGCAA rev: GTCTGGACCCATTCTTCTT
MIP1	for: CAGCGAGTACCAGTCCCTTTT rev: CCTCGCTGCCTCCAAGA
Nrf2	for: CTACAGTCCCAGCAGGACAT rev: GGGAGGAATTCTCCTGTTTC
Nox2	for: CTGCACACCGCCATCCACACA rev: CGGCCACATACAGGCCCCCT
Nox4	for: TGGGCGTCCTCGGTGGAAA rev: GGCCCCTTTGGCTCGCAGAT
SOD1	for: CCAGTGCAGGACCTCATTTTAAT rev: TCTCCAACATGCCTCTTTCATC
TNF $\alpha$	for: ATGAGCACAGAAAGCATGATC rev: TACAGGCTTGTCACTCGAATT
VCAM	for: GTGGGCCACTTGTGCATGGGA rev: TCCTTGGGGGCAACGTTGACATA

### 3.2.6 Western Blot

#### 3.2.6.1 Herstellung des Proteinextraktes

In einem 0,5ml-Eppendorf Gefäß werden 120 µl Lysepuffer vorgelegt. In einem mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser mit Pistill müssen nun drei in flüssigem Stickstoff gelagerte Aorten eines Maus-Genotyps fein gemörsert werden und in das 0,5ml-Eppendorf Gefäß überführt werden. Der Lysepuffer mit dem Gewebe wird für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird bei 4°C und 13.000xg für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf Gefäß überführt und der Proteingehalt wird nach Bradford (Bradford 1976) bestimmt.

#### 3.2.6.2 Westernblot

Die Elektrophorese des Proteinextrakts erfolgt mit einem 8%-igen Acrylamid-Gels. Die Elektrophorese wird mit einer Spannung von 200V durchgeführt. Anschließend erfolgt das Überführen der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran bei 100V für eine 1 Stunde in kaltem Transferpuffer. Der Transfer wird mittels Ponceau-Färbung der Membran sowie Comassie-Färbung des Acrylamid-Gels überprüft.

Die Membran wird bei Raumtemperatur mit eine 5%-igen Milchsäure-Lösung in 0,1% TBST-Puffer blockiert. Die Inkubation mit den Primär-Antikörpern gegen eNOS, phosphorylierte eNOS und  $\beta$ -Aktin erfolgt bei 4°C über Nacht. Die Inkubation mit den Sekundär-Antikörpern Ziege Anti-Maus und Ziege Anti-Kaninchen erfolgt bei Raumtemperatur für eine Stunde. Die Antikörper werden alle in 5%-igen BSA-Lösung in 0,1% TBST-Puffer verdünnt, die Verdünnungen sind Tabelle 3.7 zu entnehmen.

**Tabelle 3-7: Verdünnung der Antikörper**

Antikörper	Verdünnung
Anti-eNOS	1:2000
Anti-eNOS S1177	1:1000
Anti- $\beta$ -Aktin	1:1000
Ziege Anti-Maus	1:2000
Ziege Anti-Kaninchen	1:2000

Der Nachweis der Proteine verläuft über Immunodetektion mittels Luminol-Chemilumineszenz. Die Membran wird mit Chemilumineszenz-Lösung für 8 Minuten

inkubiert. An den Sekundärantikörper ist das Enzym Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase HRP) gekoppelt. Die HRP katalysiert die Oxidation des in der Chemilumineszenz-Lösung vorhandenen Luminols. Der Fotofilm wird für 20 min exponiert und anschließend entwickelt und fixiert.

### 3.2.7 Mikrokerne

Mikrokerne sind sehr sensitive Marker für Genotoxizität. Sie entstehen durch Chromosomenschäden oder Schäden des Spindelapparates. Bei der Mitose können diese DNA-Fragmente nicht in eine der Tochterzellen integriert werden und bleiben als Mikrokern bestehen (Fenech 2000). Mikrokerne können *in vivo* unter anderem in Erythrozyten und *in vitro* in Zellkultur bestimmt werden.

In Erythrozyten nachgewiesene Mikrokerne sind in ihren Vorläuferzellen, den Erythroblasten, entstanden. Im Gegensatz zu dem Zellkern, welcher bei der Entstehung des Erythrozyten ausgestoßen wird bleibt der Mikrokern erhalten.

#### *In vivo*

Mit einer Pipette werden einige Tropfen Blut aus der eröffneten Aorta entnommen. Das Blut wird auf einem Objektträger ausgestrichen und über einige Stunden getrocknet. Anschließend werden die Präparate mit dem Tauchverfahren gefärbt. Die Präparate werden für 5 min in eine May-Grünwald-Lösung getaucht. Danach werden sie mit H<sub>2</sub>O dest. abgespült und für 5 min in H<sub>2</sub>O dest. getaucht. Danach findet die Färbung mit GIEMSA-Gebrauchslösung für 15-20 min statt. Nach zweimalig Waschen mit H<sub>2</sub>O dest. für jeweils 5 min sind unter dem Mikroskop die Erythrozyten rosa-rot, die Zellkerne blau-violett, Lymphozyten hellblau-blau und Thrombozyten rot-violett zu erkennen. Es werden verblindet, pro Maus in mindestens 2000 Erythrozyten, in Duplikaten mikrokernhaltige Erythrozyten gezählt (12,5x100-fache Vergrößerung).

#### *In vitro*: in Zellkultur nach Angiotensin II

Zur Analyse von Mikrokernen werden die Zellen wie für die Alkalische Elution vorbereitet. Nach der Inkubation mit Angiotensin II wird dieses jedoch entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Die Zellen werden für 24 Stunden kultiviert, es ist notwendig, dass die Zellen mindestens eine Zellteilung durchlaufen haben.

Anschließend werden die Zellen nach 2fachem Waschen mit PBSCMF mit Trypsin abgelöst und in einem kleinen Volumen PBS resuspendiert. Es werden 1-3 Tropfen der Zellsuspension in die im Vorfeld vorbereiteten Objektträger-Trichter Gespanne getropft und mit der Cytospin-Zentrifuge auf die Objektträger aufgeschleudert. Die Objektträger werden nach der Zentrifugation an der Luft getrocknet und danach zum Fixieren der Zellen in Methanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Die DNA-Färbung wird mit Bisbenzimid-haltigen PBSCMF-Lösung ( $5\mu\text{g/ml}$ ) für 1 Minute. Anschließend werden die Präparate mit  $8\mu\text{l}$  der Eindecklösung eingedeckt und ein Deckgläschen blasenfrei aufgelegt. Die Auszählung der Mikrokerne erfolgt mit dem Fluoreszenzmikroskop und einer  $12,5\times 100$ fachen Auflösung. Es werden verblindet, pro Ansatz in mindestens 1000 Zellen, in Duplikaten die Mikrokerne in Kernen bestimmt.

### 3.2.8 Statistik

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Berechnungen wurden mit Microsoft Excel 2003 durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben sind Fehlerindikatoren geben, falls nicht anders angegeben, die Standardabweichung (SD) vom Mittelwert (MW) an. Zum Vergleich zweier Mittelwerte wurde ein ungepaarter zweiseitiger Student's T-Test mit einer Welch-Korrektur für die Annahme ungleicher Varianzen durchgeführt.

Es wurden folgende Stufen der Signifikanz verwendet:

- (\*)  $p \leq 0,05$
- (\*\*)  $p \leq 0,01$
- (\*\*\*)  $p \leq 0,001$

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchung der Genotoxizität von Angiotensin II *in vivo*

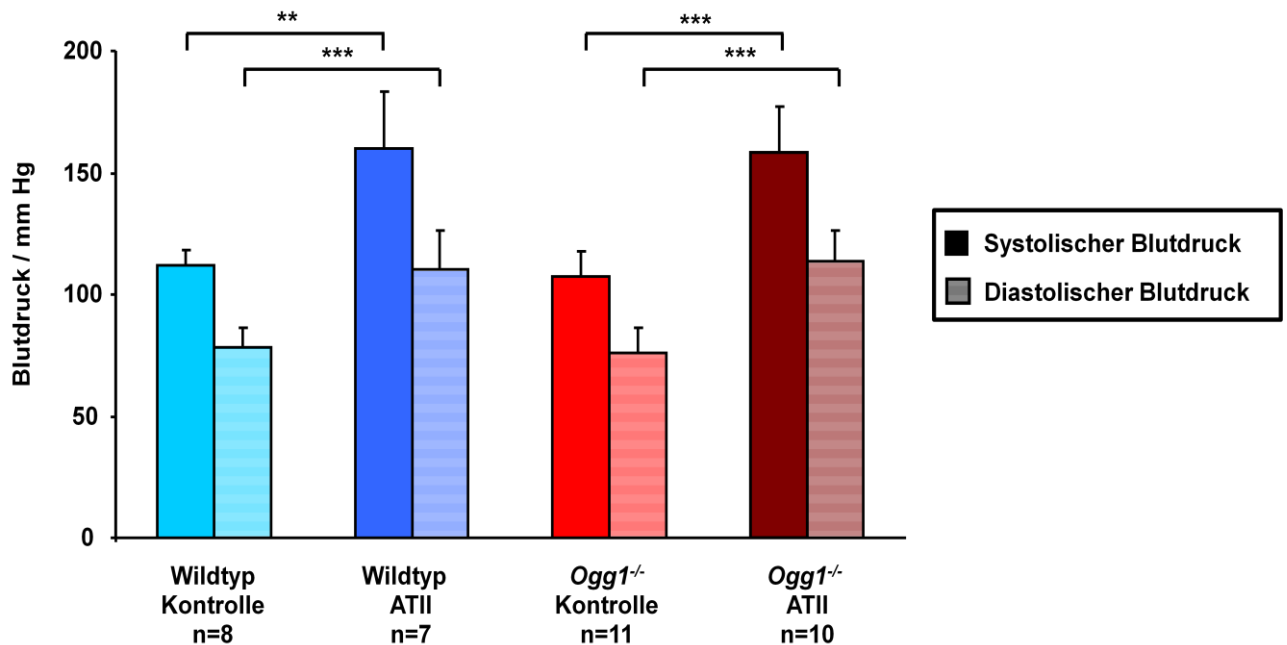
Mit den nachfolgend beschriebenen Experimenten soll *in vivo* die Hypothese überprüft werden, dass Angiotensin II eine DNA-schädigende und mutagene Wirkung besitzt. Wie in Kapitel 2.2 bereits beschrieben aktiviert Angiotensin II über seine Bindung an den Angiotensin II-Rezeptor 1 NADPH-Oxidasen, welche reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxidradikalanion und Wasserstoffperoxid bilden. Reaktive Sauerstoffspezies können zu DNA-Schäden führen. Durch Radikale wie dem Hydroxylradikal, welches über die Fenton-Reaktion aus Wasserstoffperoxid entsteht, kann es zu DNA-Einzelstrangbrüchen kommen. Durch das Superoxidradikal-Anion können oxidative DNA-Schäden wie 8-oxoG gebildet werden. In einem Tierversuch wurden Wildtyp-Mäuse und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse, die defizient in der Reparatur oxidativer DNA-Schäden wie 8-oxoG sind, über vier Wochen mit 0,6 µg/kg/min Angiotensin II behandelt. Von 15 Wildtyp-Tieren wurden 7 mit Angiotensin II behandelt, von 21 *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Tieren wurden 10 mit Angiotensin II behandelt.

#### 4.1.1 Überprüfung physiologischer Parameter

Unter Narkose wurde den Mäusen eine osmotische Mini-Pumpe implantiert, die über 4 Wochen eine Angiotensin II-Lösung mit einer Konzentration von 0,6 µg/kg/min oder als Kontrolle eine sterile PBS-Lösung abgab. Vor dem Tierversuch wurden die Tiere an die nicht-invasive „Tail-Cuff“-Methode zur Blutdruckmessung gewöhnt (siehe 3.2.1.3). Ab dem zweiten Tag nach der Implantation der osmotischen Pumpen konnte der Blutdruck überprüft werden. Im weiteren Verlauf der vierwöchigen Behandlung mit dem vasoaktiven Gewebshormon wurde alle zwei bis drei Tage der Blutdruck kontrolliert.

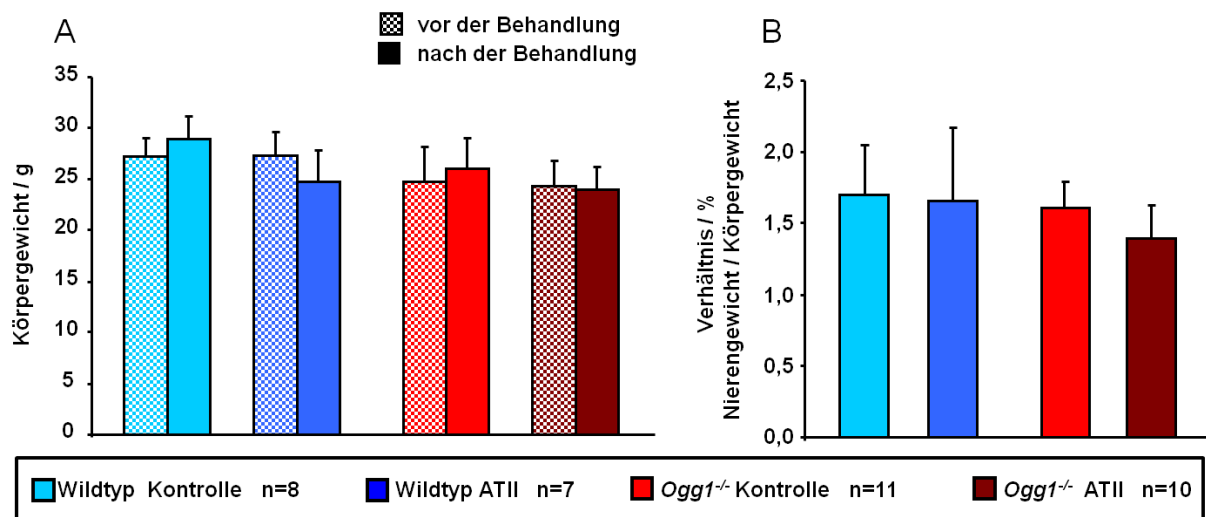
Es ist bei allen mit Angiotensin II behandelten Mäusen ein Anstieg des systolischen sowie des diastolischen Blutdrucks zu erkennen. **Abbildung 4-1** zeigt die gemittelten Blutdruckwerte der mit Angiotensin II oder mit Kontroll-Lösung behandelten Tiere. Angiotensin II bewirkt in Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Tieren einen signifikanten Anstieg des systolischen sowie des diastolische Blutdrucks. Bei den Tieren der Kontrollgruppen

ist kein Unterschied des systolischen und diastolischen Blutdrucks zwischen Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Tieren zu erkennen.



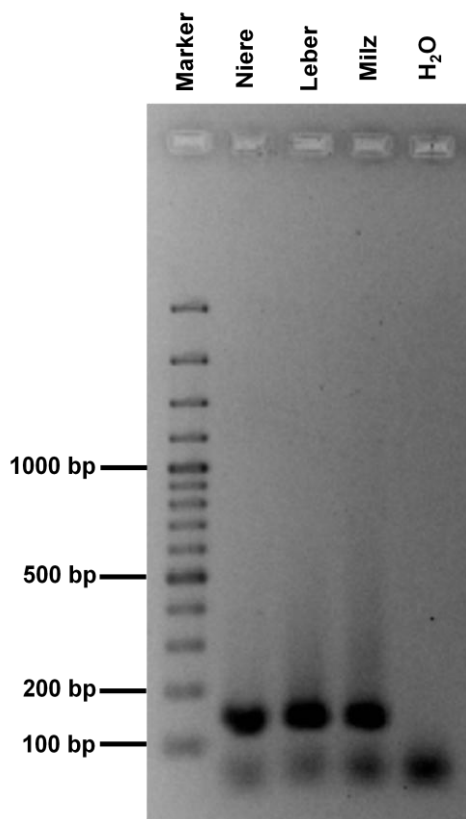
**Abb 4-1: Systolischer und diastolischer Blutdruck von Mäusen mit ATII-Behandlung.** Wildtyp-Mäuse und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden für vier Wochen mit 0,6 µg/kg/min ATII behandelt. Systolischer und diastolischer Blutdruck wurde am wachen Tier mit der „Tail-Cuff“-Methode gemessen. Der Blutdruck wurde während des Versuchs alle 2-3 Tage bestimmt. Mittelwerte ± SD.

Das Gewicht der Tiere wurde über den Verlauf des Tierversuchs kontrolliert. **Abbildung 4-2A** zeigt das mittlere Körpergewicht der Tiere vor und zum Ende des Tierversuchs. Die Wildtyp-Mäuse hatten ein leicht höheres Körpergewicht als die OGG1-defizienten Tiere. Es ist jedoch in beiden Versuchsgruppen keine Veränderung des Körpergewichts mit der Angiotensin II-Behandlung zu erkennen. Auch bei der Behandlung mit Kontroll-Lösung ist kein Einfluss auf das Gewicht zu erkennen. Bei dem Gewichtsverhältnis des Nierengewichts zum Körpergewicht ist in beiden Gruppen kein Effekt der ATII-Behandlung zu erkennen (**Abbildung 4-2B**).



**Abb 4-2 Körpergewicht (A) und Verhältnis des Nierengewicht zum Körpergewicht (B) von Mäusen mit ATII-Behandlung.** Das Körpergewicht der Tiere wurde vor Beginn des Versuchs bestimmt. Nach dem Versuch wurde das Körpergewicht, sowie das Nierengewicht bestimmt. (A) Gewicht der Tiere vor und nach der Behandlung. (B) Verhältnis (%) der Nieren zu Körpergewicht an. Mittelwerte  $\pm$  SD

Der DNA-schädigende Effekt von Angiotensin II sollte in der Niere, aber auch in der Leber und Lymphozyten aus der Milz untersucht werden. Um nachzuweisen, dass der Angiotensin II-Rezeptor 1 (AT1R), über den die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies vermittelt wird, in allen zu untersuchenden Organen vorhanden ist, wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt. Aus den Organen wurde die Gesamt-RNA isoliert und mit einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben (siehe 3.2.5). Mit Hilfe spezifischer Primer kann in einer PCR das zu untersuchende Gen vervielfältigt werden und durch Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht werden. Die entstandene Bande zwischen den Markerbanden für 100 und 200 Basenpaaren stimmt mit der Produktgröße von 149 Basenpaaren überein (**Abbildung 4-3**).



**Abb. 4-3: Nachweis des AT1R in Niere, Leber und Milz.** PCR-Reaktion mit spezifischen Primern und anschließender qualitativer Agarose-Gelelektrophorese.

Die in **Abbildungen 4-1** dargestellten physiologischen Daten der Tiere des Versuchs zeigen, dass die Behandlung mit Angiotensin II erfolgreich war. Gleichzeitig wird nachgewiesen, dass in der Niere, in Hepatozyten und in Lymphozyten aus der Milz der AT1R vorhanden ist (**Abbildung 4-3**), so dass im Folgenden die Versuche zur Untersuchung der Genotoxizität von Angiotensin II durchgeführt werden konnten.

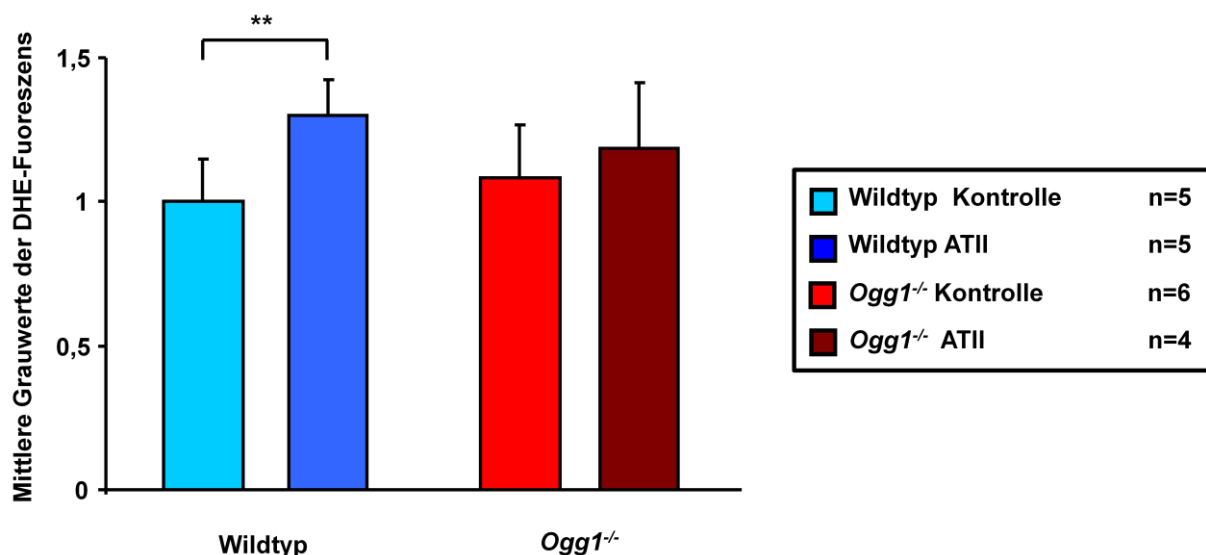


#### 4.1.2 Angiotensin II führt in der Niere zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Um zu prüfen, ob Angiotensin II zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und somit von oxidativem Stress führt, wurden Gewebeschnitte aus der Niere mit einer Dihydroethidium -Färbung analysiert. Dihydroethidium (DHE) ist die reduzierte Form des Farbstoffs Ethidiumbromid. In seiner reduzierten Form fluoresziert der Farbstoff blau, durch Oxidation durch Superoxid entsteht das rot fluoreszierende Ethidium. Die rote Fluoreszenz gibt oxidative Aktivitäten in der Zelle an und kann unter dem Mikroskop bestimmt werden.

Der Versuch der DHE-Färbung der Nieren-Schnitte wurde von unserem Kooperationspartner, der AG Schupp in Würzburg, durchgeführt.

**Abbildung 4-4** zeigt die Auswertung der DHE-Färbung der Nieren-Schnitte. In den Wildtyp-Tieren ist eine eindeutige, statistisch signifikante Erhöhung der reaktiven Sauerstoffspezies durch die Behandlung mit dem vasoaktiven Gewebshormon zu erkennen. In den *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Tieren ist im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren basal in der Tendenz stärkerer oxidativer Stress zu erkennen. Mit der Angiotensin II-Behandlung ist in den reparaturdefizienten Tieren ein schwacher, nicht signifikanter Anstieg der reaktiven Sauerstoffspezies zu erkennen.



**Abb. 4-4 DHE-Fluoreszenz in der Niere von Mäusen nach Behandlung mit ATII.** Ethidium-Fluoreszenz gibt den oxidativen Stress in den Nieren-Schnitten an. DHE-Färbung wurde von der Arbeitsgruppe Schupp in Würzburg durchgeführt. Ergebnisse normiert auf Wildtyp Kontrolle; MW ± SD

#### 4.1.3 Untersuchung der DNA-Schäden durch Angiotensin II in der Niere

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Behandlung mit Angiotensin II zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führt, sollte untersucht werden, ob die entstehenden reaktiven Sauerstoffspezies zu DNA-Schäden, und daraus folgend, zu Mutationen führen.

In der Niere wurden DNA-Schäden, DNA-Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Läsionen, mit Hilfe der Methode der Alkalischen Elution quantifiziert (siehe 3.2.3). Mit dem immunchemischen Nachweis von  $\gamma$ H2AX-Foci wurde von der Arbeitsgruppe Schupp in Würzburg die Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen untersucht.

##### 4.1.3.1 Fpg-sensitive Läsionen und DNA-Einzelstrangbrüche in der Niere

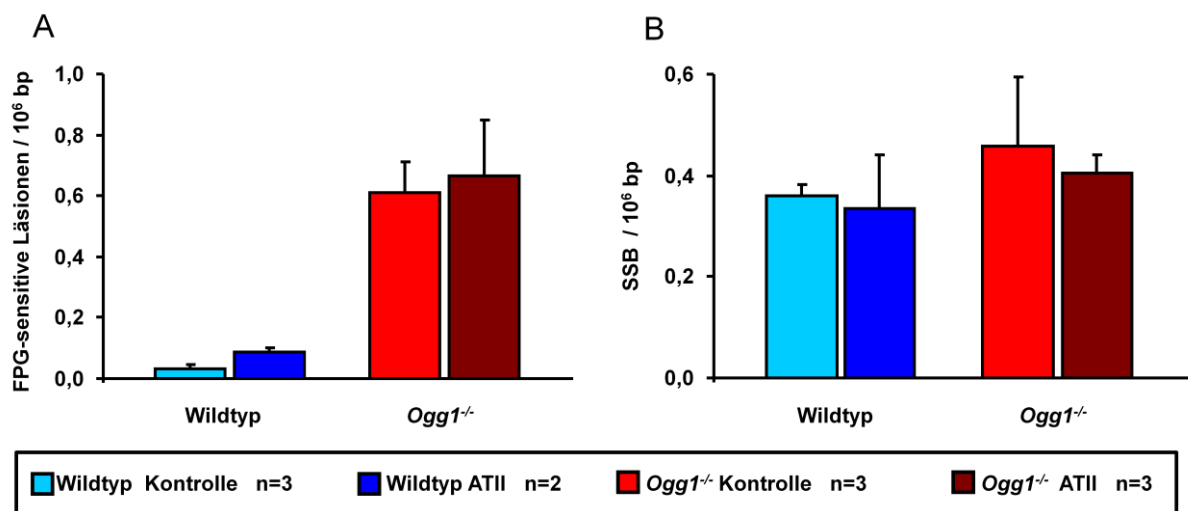
DNA-Einzelstrangbrüche und oxidative DNA-Modifikationen, die durch das Enzym Formaidopyrimidin-Glykosidase (Fpg) erkannt werden, können mit der Alkalischen Elution quantifiziert werden. Den Tieren, die in diesem Tierversuch mit Angiotensin II oder Kontroll-Lösung behandelt wurden, wurden die Nieren entnommen. Durch Behandlung mit einem Kollagenase-haltigen Puffer wurde eine Einzelzell-Suspension von Nierenzellen aus dem Gewebe gewonnen (siehe 3.2.1.4). **Abbildung 4-5** zeigt die mit der Alkalischen Elution gemessenen Fpg-sensitiven Läsionen, sowie die DNA-Einzelstrangbrüche in den Nierenzellen.

Wie bereits in früheren Versuchen unseres Labors gezeigt werden konnte ist zu erkennen, dass alle OGG1-defizienten Tiere höhere Spiegel an Fpg-sensitiven Läsionen in der Niere haben als Wildtyp-Tiere. Es ist jedoch in beiden Mausstämmen keine eindeutige Erhöhung der Fpg-sensitiven Läsionen durch Angiotensin II zu erkennen (**Abb. 4-5A**). Die Menge an DNA-Einzelstrangbrüchen ist in den mit Kontroll-Lösung behandelten Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen nahezu gleich. Auch hier ist in beiden Genotypen keine Erhöhung der DNA-Einzelstrangbrüche zu erkennen (**Abb. 4-5B**). Die Menge an DNA-Einzelstrangbrüchen in der Niere ist mit etwa 0,4 DNA-Einzelstrangbrüche pro 10<sup>5</sup> Basenpaare relativ hoch. Der Wert entspricht jedoch historischen Daten unseres Arbeitskreises.

Die Isolation von Einzelzell-Suspensionen aus der Niere gestaltete sich relativ schwierig. Es konnten nur Mengen von etwa 5 Millionen Zellen pro Tier isoliert werden. Im Gegensatz hierzu lassen sich aus der Leber etwa 40 Millionen

Hepatozyten, aus der Milz sogar über 100 Millionen Lymphozyten isolieren. Es ist demnach nicht gesichert, dass die in den isolierten Zellen gemessenen DNA-Schäden das gesamte Organ repräsentieren.

Die mit der Alkalischen Elution ermittelten DNA-Schäden zeigen, dass Angiotensin II in der Niere nicht zu einer Erhöhung der DNA-Schäden führt.



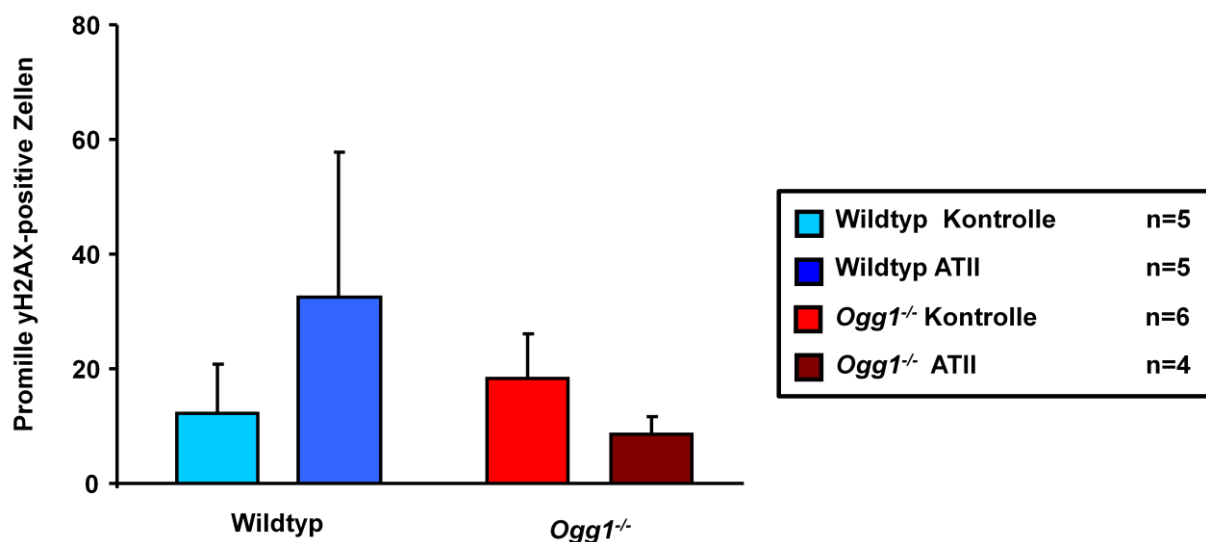
**Abb. 4-5: Fpg-sensitive Läsionen (A) und SSB (B) in der DNA der Niere nach Behandlung mit ATII.** Nach vierwöchiger Behandlung mit ATII (0,6 µg/ml\*min) wurden Einzelzellsuspensionen aus den Nieren von Wildtyp und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen isoliert. Fpg-sensitive Läsionen und SSB wurden mit der Alkalischen Elution quantifiziert. Mittelwerte ± SD.

#### 4.1.3.2 DNA-Doppelstrangbrüche in der Niere

Kommt es in der Zelle zu einem DNA-Doppelstrangbruch, so werden die den DNA-Doppelstrangbruch umgebende Histone H2AX phosphoryliert (Nakamura et al. 2006).  $\gamma$ -H2AX, das phosphorylierte Histon H2AX, kann somit als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche gewertet werden.  $\gamma$ -H2AX kann durch spezifische Antikörper sichtbar gemacht werden. Der immunchemische Nachweis in Gewebeschnitten aus der Niere wurde von unserem Kooperations-Partner in Würzburg, der AG Schupp durchgeführt.

Abbildung 4-6 zeigt das Ergebnis des immunchemischen Nachweises  $\gamma$ H2AX-positiver Zellen. Es ist zu erkennen, dass bei den Wildtyp-Tieren die mit Angiotensin II-behandelten Tiere deutlich mehr  $\gamma$ H2AX-positiver Zellen aufweisen. Es ist jedoch zu beachten, dass die behandelten Tiere eine sehr große Standardabweichung aufzeigen. Die Kontrollgruppe der *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Tiere haben in der Tendenz eine größere Anzahl  $\gamma$ H2AX-positiver Zellen als die Kontrollgruppe der Wildtyp-tiere. Im Vergleich mit der passenden Kontrollgruppe zeigen die mit Angiotensin II-behandelten *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse niedrigere Spiegel an  $\gamma$ H2AX-positiver Zellen auf.

Die Ergebnisse deuten nicht eindeutig auf eine Erhöhung der Menge an Doppelstrangbrüchen durch die Behandlung mit Angiotensin II in der Niere hin.



**Abb. 4-6: Immunchemischer Nachweis  $\gamma$ H2AX-positiver Zellen.** Nach vierwöchiger Behandlung mit ATII (0,6  $\mu$ g/ml\*min) wurde in Gewebeschnitten der Nieren von Wildtyp und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen der Anteil  $\gamma$ H2AX-positiver Zellen bestimmt. Mittelwert  $\pm$  SEM.

#### 4.1.4 Untersuchung der DNA-Schäden durch Angiotensin II in Hepatozyten und Lymphozyten aus der Milz

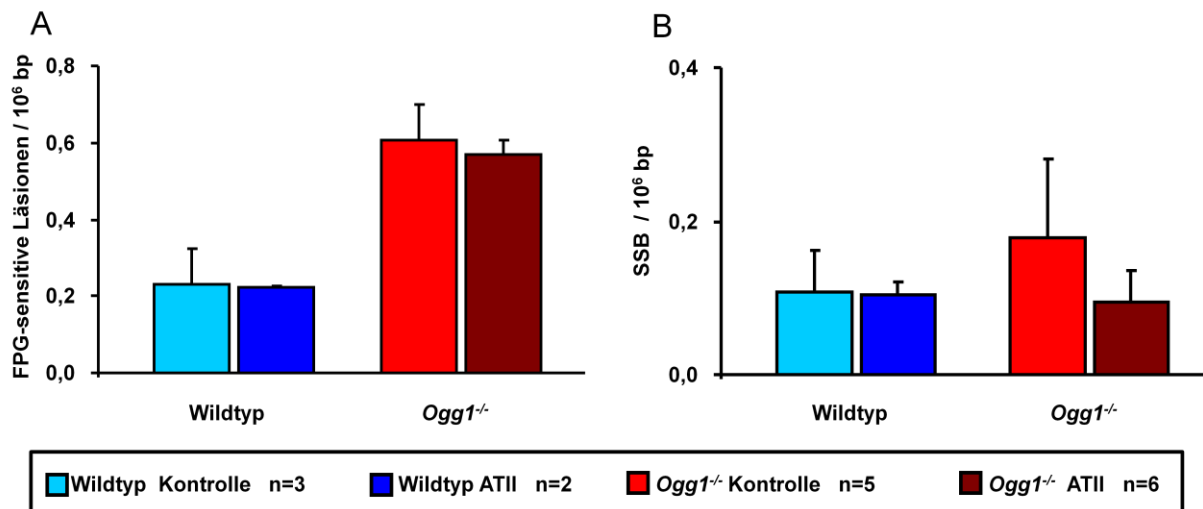
Es ist bekannt, dass bei der Fibrose der Leber reaktive Sauerstoffspezies eine zentrale Rolle spielen, wobei Angiotensin II mit hoher Wahrscheinlichkeit ein wichtiger Mediator ist (Parola und Robino 2001). So sind im Serum von Patienten mit Leberzirrhose die Angiotensin II-Spiegel erhöht (Asbert et al. 1992). Zudem konnte in experimentellen Modellen der Leberfibrose gezeigt werden, dass das lokale Renin-Angiotensin-System erhöht ist (Paizis et al. 2002).

Im Folgenden sollte deshalb getestet werden, ob erhöhte Angiotensin II-Spiegel zu einem Anstieg an DNA-Schäden in der Leber führen. Eine Einzelzellsuspension an Hepatozyten kann durch Perfusion der Leber mit einem Kollagenasehaltigen Puffer erhalten werden (siehe 3.2.1.4).

**Abbildung 4-7** zeigt die mit der Alkalischen Elution gemessenen Fpg-sensitiven Läsionen sowie die DNA-Einzelstrangbrüche in den primären Hepatozyten der Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse nach Behandlung mit Angiotensin II.

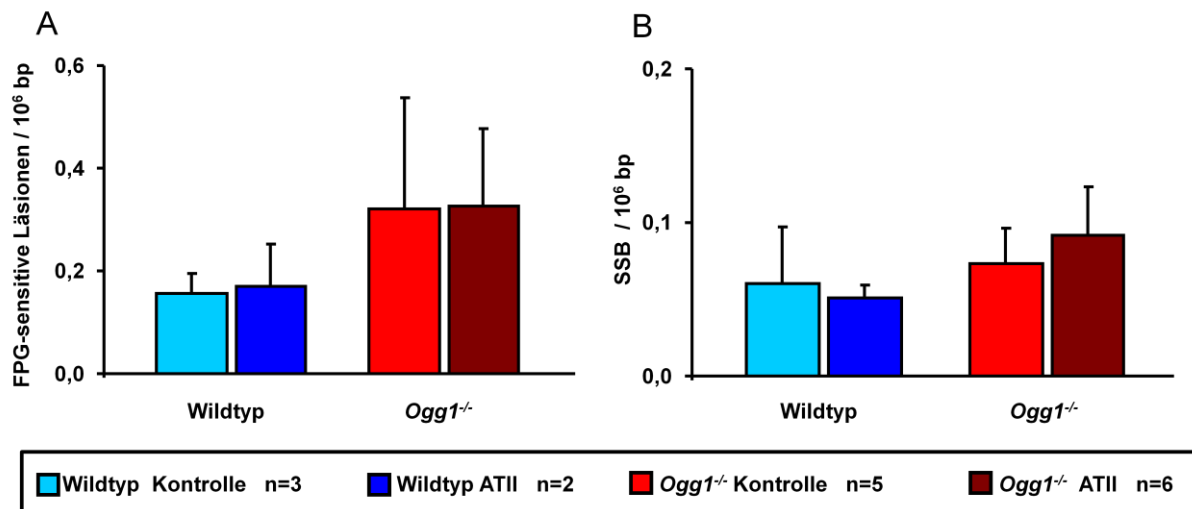
Es ist zu erkennen, dass die *Ogg1*-defizienten Tiere im Vergleich mit den Wildtyp-Tieren höhere Spiegel an Fpg-sensitiven Läsionen in den Hepatozyten haben (**Abbildung 4-7A**). Es ist jedoch in beiden Genotypen in den aus der Leber isolierten Zellen kein Anstieg der Fpg-sensitiven Läsionen nach Behandlung mit Angiotensin II ersichtlich.

Betrachtet man die gemessene Menge an DNA-Einzelstrangbrüchen (**Abbildung 4-7B**), ist zu erkennen, dass in den Hepatozyten der mit Kontroll-Lösung behandelten Tiere beider Genotypen weniger als 2 DNA-Einzelstrangbrüche pro 10.000.000 Basenpaare gemessen werden konnte. Diese geringe Menge an DNA-Einzelstrangbrüchen spricht für eine sehr schonende Aufarbeitung der Zellen. Beim Vorgang der Apoptose entstehen große Mengen an DNA-Einzelstrangbrüche. Diese können deshalb als Indikator für den programmierten Zelltod verwendet werden. Es ist jedoch bei den DNA-Einzelstrangbrüchen keine Auswirkung der Angiotensin-Behandlung zu erkennen.



**Abb. 4-7: Fpg-sensitive Läsionen (A) und SSB (B) in der Leber nach Behandlung mit ATII.** Nach vierwöchiger Behandlung mit ATII (0,6µg/ml\*min) wurden primäre Hepatozyten von Wildtyp und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen isoliert. Fpg-sensitive Läsionen und SSB wurden mit der Alkalischen Elution quantifiziert. Mittelwerte ± SD.

Auch die Lymphozyten aus der Milz besitzen den Angiotensin II-Rezeptor 1 (**Abbildung 4-4**). Für die Lymphozyten aus der Milz sind die gemessenen DNA-Schäden in **Abbildung 4-8** zu sehen. Es sind basal in beiden Genotypen sehr niedrige Spiegel an DNA-Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Läsionen zu erkennen. Wie auch in den Zellen der Niere und den Hepatozyten haben die OGG1-defizienten Tiere, im Vergleich mit den Wildtyp-Tieren, höhere Spiegel an Fpg-sensitiver Läsionen in der DNA der Lymphozyten (**Abbildung 4-8A**). Die Behandlung der Tiere mit Angiotensin II führt jedoch in den Wildtyp- und auch in den OGG1-defizienten Tieren zu keiner Erhöhung der DNA-Einzelstrangbrüchen und der Fpg-sensitiven Läsionen.



**Abb.4-8: Fpg-sensitive Läsionen (A) und SSB (B) in Lymphozyten aus der Milz nach Behandlung mit ATII.** Nach vierwöchiger Behandlung mit ATII (0,6 µg/ml\*min) wurden primäre Lymphozyten aus der Milz von Wildtyp und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen isoliert. Fpg-sensitive Läsionen und SSB wurden mit der Alkalischen Elution quantifiziert. Mittelwerte ± SD.

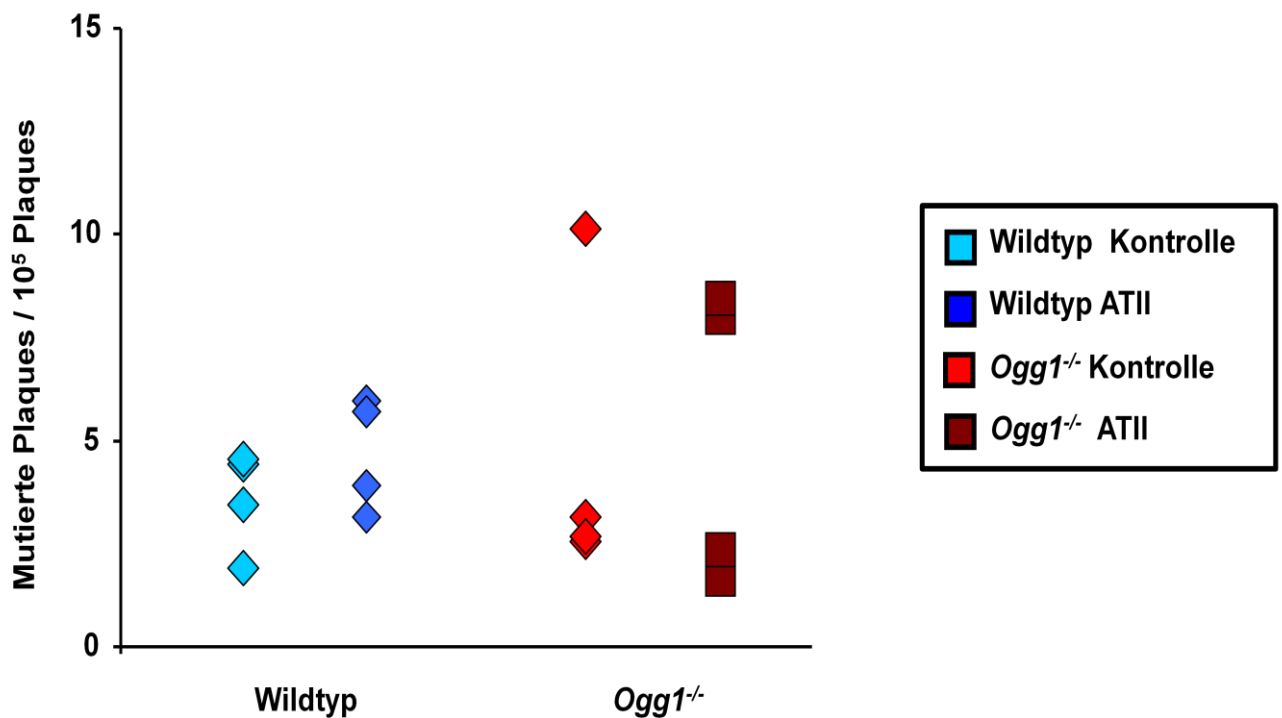
#### 4.1.5 Bestimmung der Mutationsfrequenzen im *lacI*-Gen in der Niere

Nicht reparierte DNA-Schäden können bei der Replikation in Mutationen überführt werden. Aus diesem Grund sollte außerdem getestet werden, ob das vasoaktive Gewebshormon in der Niere die Mutationsfrequenz in einem Reporter-gen erhöht. Die DNA-Modifikation 8-oxoG hat ein hohes mutagenes Potential, da 8-oxoG anstatt mit Cytosin eine Paarung mit Adenin eingehen kann und es so zu einer GC→TA-Transversion kommt. Die Mutationsfrequenzen können mit Hilfe des BigBlue®-Plaque Color Screening Assays bestimmt werden, da die in dem Tierversuch verwendeten Mäuse ein Reporter-Gen für Mutationen tragen. Es handelt sich um das ursprünglich bakterielle *lacI*-Gen, welches für den Repressor der β-Galactosidase codiert. Kommt es zu einer Mutation in dem Reporter-Gen wird der Repressor nicht mehr gebildet und die β-Galactosidase, das Reporter-gen, wird gebildet.

Den mit Angiotensin II oder Kontrolllösung behandelten Tieren wurden die Nieren entnommen und in flüssigem Stickstoff gefroren. Aus jeweils einer halben gefrorenen Niere wird die genomische DNA isoliert. Durch Überführung der genomischen Maus-DNA in Bakterien und Inkubation im X-Gal, welches durch die β-Galactosidase in einen indigofarbenen Farbstoff hydrolisiert wird, können entstandene Mutationen in

der genomischen Maus-DNA in einem Plaque-Color-Screening-Assay sichtbar gemacht werden (siehe 3.2.4).

**Abbildung 4-9** zeigt die Mutationsfrequenzen in der Niere von Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Behandlung mit Angiotensin II oder Kontrolle-Lösung. Je Gewebeprobe wurden mindestens 50.000 Plaque bildende Einheiten (plaque forming units *pfu*) analysiert. Blau gefärbte *pfu* wurden von den Bakterienplatten gepickt und durch erneutes Ausstreuen auf Blaufärbung überprüft. **Tabelle 4-1** zeigt die Anzahl an *pfu*, die pro Gewebeprobe analysiert wurden, mit der Anzahl an *pfu*, die als Mutanten verifiziert wurden.



**Abb. 4-9: BigBlue®-Mutationsfrequenzen in der Niere von Mäusen nach der Behandlung mit ATII.** Nach vierwöchiger Behandlung mit ATII (0,6 µg/ml\*min) wurde in den Nieren der Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit dem BigBlue®-Mutations-Assay die Mutationsfrequenz im transgenen *lacI*-Gen bestimmt und überprüft.



**Tabelle 4-1 : BigBlue®-Mutationen in der Niere von Mäusen nach der Behandlung mit ATII. Mit \* markierte Mäuse wurden im zweiten Versuchsdurchgang analysiert.**

Genotyp	Behandlung	Maus	Pfu	Mutiere pfu	Frequenz /10 <sup>5</sup> pfu
Wt	Kontrolle	11	208000	4	1,9
Wt	Kontrolle	15	247900	11	4,4
Wt	Kontrolle	560 *	699800	32	4,6
Wt	Kontrolle	621 *	490800	17	3,5
Wt	ATII	10	178200	7	3,9
Wt	ATII	12	158200	5	3,2
Wt	ATII	559 *	150400	9	6,0
Wt	ATII	550 *	52700	3	5,7
<i>Ogg1</i> <sup>-/-</sup>	Kontrolle	22	95500	3	3,1
<i>Ogg1</i> <sup>-/-</sup>	Kontrolle	27	233600	6	2,6
<i>Ogg1</i> <sup>-/-</sup>	Kontrolle	24	224300	6	2,7
<i>Ogg1</i> <sup>-/-</sup>	Kontrolle	536 *	88800	9	10,1
<i>Ogg1</i> <sup>-/-</sup>	ATII	23	310000	5	1,6
<i>Ogg1</i> <sup>-/-</sup>	ATII	28	297400	7	2,4
<i>Ogg1</i> <sup>-/-</sup>	ATII	540 *	288600	23	8,0
<i>Ogg1</i> <sup>-/-</sup>	ATII	539 *	142100	12	8,4

In den mit Kontroll-Lösung behandelten Wildtyp-Mäusen wurde in den Nieren ein Wert von  $3,6 \pm 1,2$  *lacI*-Mutationen pro  $10^5$  *pfu* ermittelt. Die analysierten Wildtyp-Tiere mit Angiotensin II-Behandlung zeigen eine *lacI*-Mutations-Frequenz von  $4,7 \pm 1,4$  pro  $10^5$  *pfu* in der Niere. Es ist also in den Wildtyp-Tieren keine eindeutige mutagene Wirkung durch die vierwöchige Behandlung mit Angiotensin II zu erkennen.

Es ergeben sich für die mit Kontroll-Lösung behandelten OGG1-defizienten Tiere ein Mittelwert von  $4,6 \pm 3,7$  und für die mit Angiotensin II-Lösung behandelten OGG1-defizienten Tiere ein Mittelwert von  $5,1 \pm 3,6$ . Bei den *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen der Kontrollgruppe ist zu erkennen, dass die Mutationsfrequenz von 3 analysierten Tieren nahezu gleich ist, bei Werten um die 2,8 *lacI*-Mutationen pro  $10^5$  *pfu*, jedoch die vierte analysierte Maus eine Mutationsfrequenz von 10,1 *lacI*-Mutationen pro  $10^5$  *pfu* aufweist. Auch bei den mit Angiotensin II-Lösung behandelten *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen sind sehr große Unterschiede in den erhaltenen Mutationsfrequenzen zu erkennen. Bei zwei Tieren konnten Mutationsfrequenzen um die 2 *lacI*-Mutationen pro  $10^5$  *pfu* bestimmt werden. Bei 2 weiteren Tieren lagen die Mutationsfrequenzen um die 8,2 *lacI*-Mutationen pro  $10^5$  *pfu*.

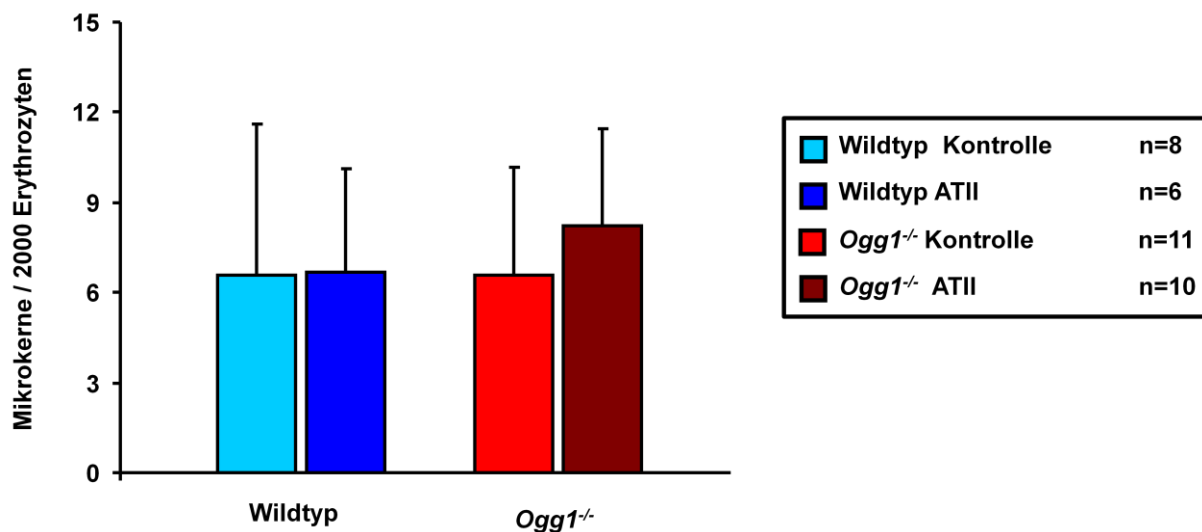
Die Daten des BigBlue® ColorScreening Assays wurden aus zwei Versuchsdurchgängen erhalten. Dies kann anhand **Tabelle 4-1** ersichtlich werden. Die Tiere des zweiten Durchgangs sind mit \* markiert.

#### 4.1.6 Untersuchung der Mikrokern-Häufigkeit in peripheren Erythrozyten

Mikrokerne sind sehr sensitive Marker für Genotoxizität, weshalb untersucht wurde, ob Angiotensin II einen Einfluß auf die Mikrokern-Häufigkeit in peripheren Erythrozyten hat. Den mit Angiotensin II oder Kontroll-Lösung behandelten Tieren wurde ein Tropfen Blut aus der Aorta mit einer Pipette entnommen und auf Objektträger ausgestrichen. Für die Analyse wurden die Proben angefärbt und verblindet unter dem Mikroskop ausgezählt (siehe 3.2.6).

**Abbildung 4-10** zeigt die in den peripheren Erythrozyten ausgezählten Mikrokerne. Bei den mit Kontroll-Lösung behandelten Tieren ist kein Unterschied zwischen Wildtyp-

und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen zu erkennen. Die Behandlung mit Angiotensin II bewirkt keine Erhöhung der Mikrokern-Häufigkeit in keiner der beiden Genotypen.



**Abb. 4-10: Mikrokernrate in peripheren Erythrozyten von Mäusen nach Behandlung mit ATII.** Mikrokernrate wurde pro Maus auf 2 Objektträgern mit 2000 Erythrozyten ausgezählt. MW ± SD.

#### 4.1.7 Untersuchung der Genexpression in der Niere

Um weitere Informationen über die Wirkung von Angiotensin II in der Niere zu erhalten wurde die Expression verschiedener Gene in der Niere untersucht. Da Angiotensin II die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies induziert, sollten zwei Gruppen an Genen analysiert werden. Zum einen wurden die Gene von Proteinen analysiert, welche zur Redox-Homöostase der Zelle beitragen. Zum anderen wurden verschiedene immun-sensitive Gene untersucht.

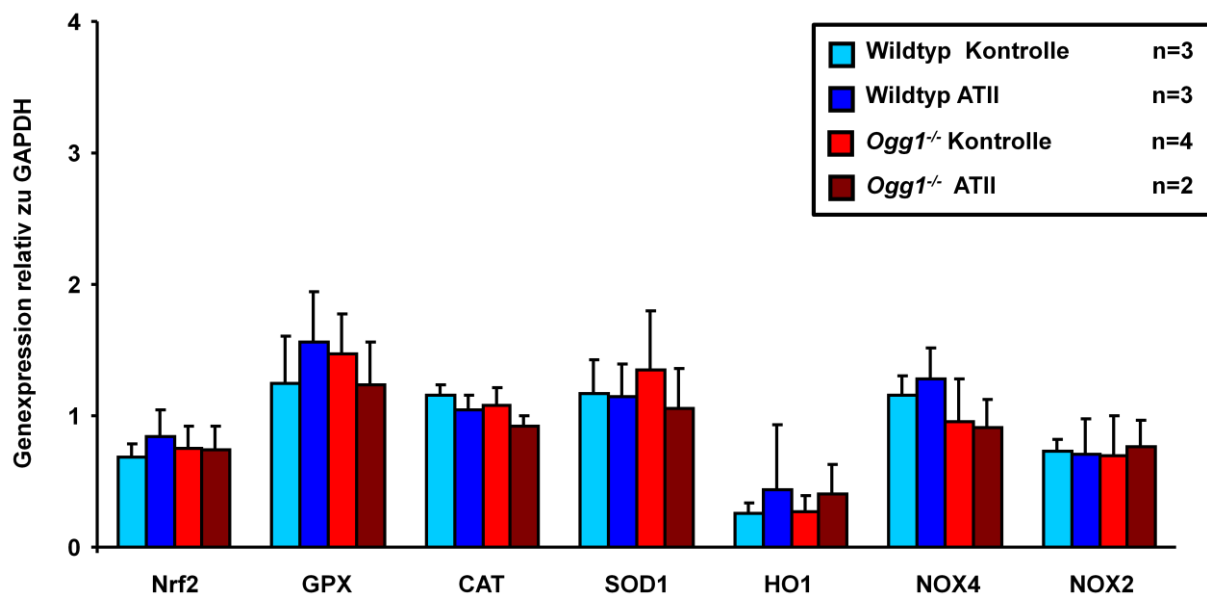
Für die Untersuchung der Genexpression wurden aus jeder Mausgruppe (Wildtyp ± ATII und *Ogg1*<sup>-/-</sup> ± ATII) jeweils 2-4 Tiere analysiert. Aus halben, in flüssigem Stickstoff gefrorenen Nieren wurde die Gesamt-RNA isoliert und mit einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe spezifischer Primer können in einer realtime-PCR die zu untersuchenden Gene quantifiziert werden. Durch Normalisierung auf ein in der Zelle konstitutiv exprimiertes Gen können Veränderungen in der Genexpression nachgewiesen werden (siehe 3.2.5)

##### 4.1.7.1 Untersuchung der Expression von Genen der Redoxhomöostase in der Niere

Wie in Kapitel 2.2 bereits beschrieben, aktiviert Angiotensin II NADPH-Oxidasen, welche Superoxidradikalanion und/oder Wasserstoffperoxid produzieren. Um zu testen, ob die Aktivierung der NADPH-Oxidasen durch Erhöhung der Expression der

NOX-Gene verläuft, wurden die Expression der NOX-Gene 2 und 4 untersucht. Bei der Untersuchung dieser beider Gene ist keine Induktion der NOX-Gene durch die Behandlung mit Angiotensin II zu erkennen (**Abbildung 4-11**).

Wie in Kapitel 2.3 bereits erläutert, gibt es ein sehr effektives Netzwerk an antioxidativen Enzymen, die die Zelle vor reaktiven Sauerstoffspezies schützen. Die Untersuchung der Genexpression in der Niere zeigt, dass die Behandlung mit Angiotensin II in beiden Genotypen die Expression von Katalase, Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und HO-1 nicht beeinflusst (**Abbildung 3-11**). Auch auf die Expression des Transkriptionsfaktors Nrf2 hat die Behandlung mit Angiotensin II keinen Einfluss.

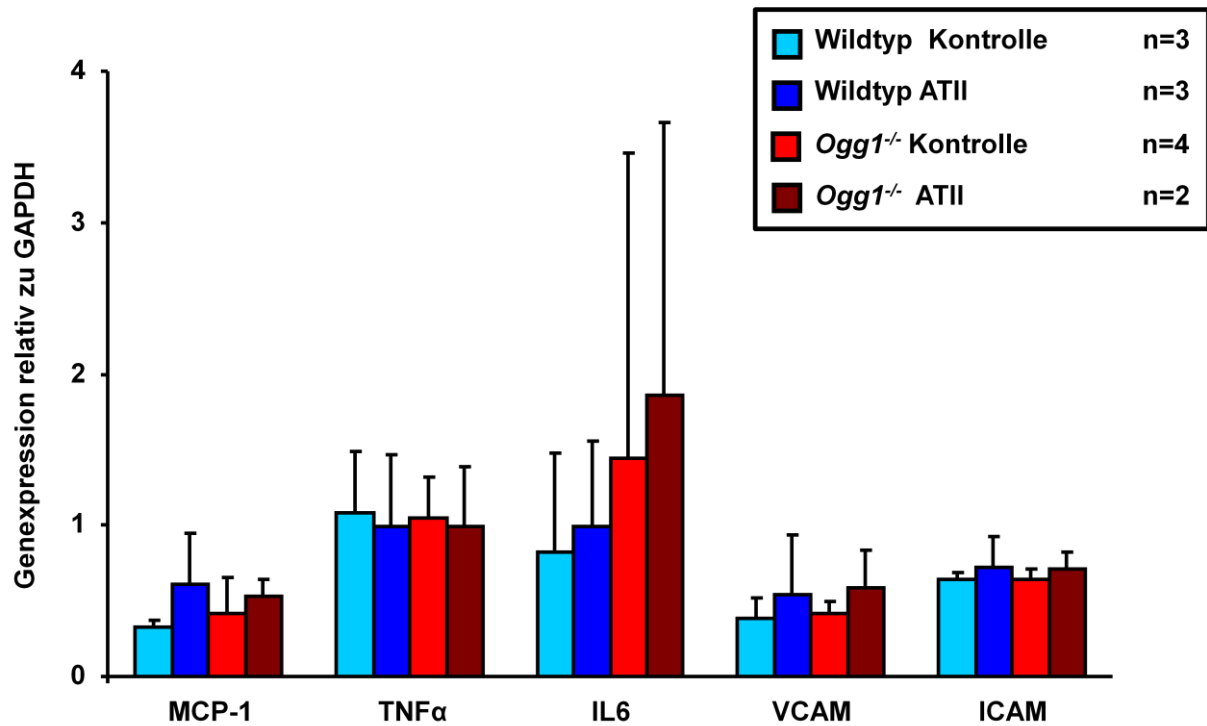


**Abb. 4-11: Expression von Genen der Redox-Homöostase in der Niere von Mäusen nach der Behandlung mit ATII.** Pro Maus wurde die Expression jedes Gens relativ zu dem Referenzgen GAPDH bestimmt. Mittelwerte  $\pm$  SD

#### 4.1.7.2 Untersuchung der Expression von immun-sensitiven Genen

Reaktive Sauerstoffspezies sind wichtige Mediatoren in entzündlichen Prozessen. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob bestimmte Entzündungsmarker durch die Angiotensin II-Behandlung erhöht werden. Es wurde die Expression von MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), IL6 (Interleukin 6) und der Zelladhäsionsproteine ICAM (intercellular adhesion molecule) und VCAM (vascular cell adhesion molecule) in der Niere, nach Behandlung mit

Angiotensin II, untersucht. Aus **Abbildung 4-12** kann man erkennen, dass die 4-wöchige Behandlung mit Angiotensin II die Expression der getesteten Immunmarker nicht beeinflusst.



**Abb. 4-12:** Expression von immun-sensitiven Genen in der Niere von Mäusen nach der Behandlung mit ATII. Pro Maus wurde die Expression jedes Gens relativ zu dem Referenzgen GAPDH bestimmt. Mittelwerte  $\pm$  SD

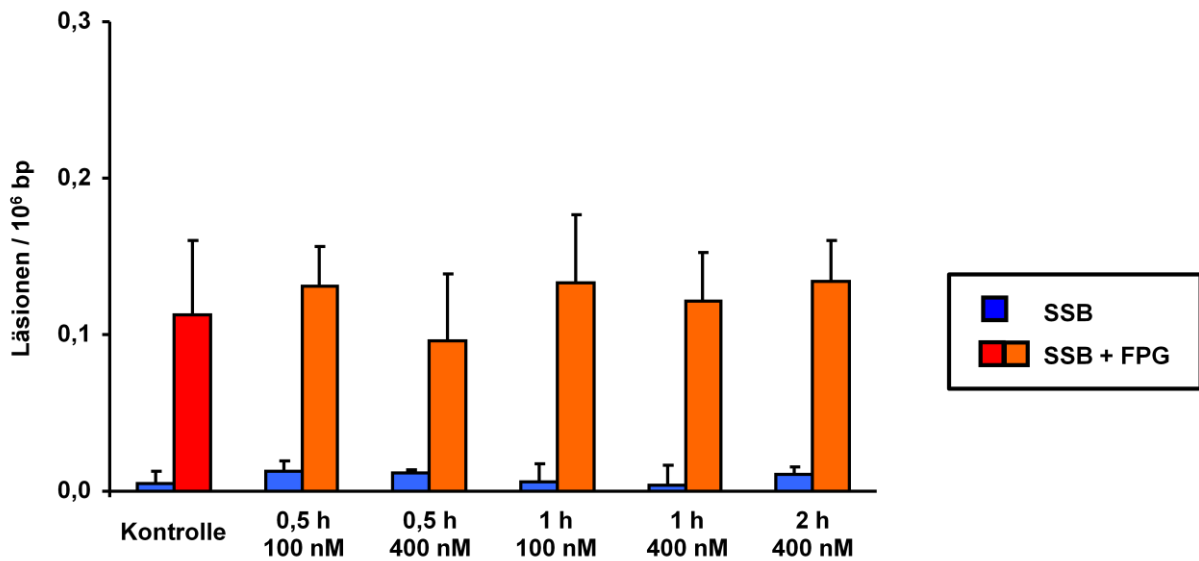
## 4.2 Untersuchung der Genotoxizität von Angiotensin II *in vitro*

Mit den nachfolgend beschriebenen Experimenten sollte die DNA-schädigende Wirkung von Angiotensin II *in vitro* untersucht werden. Die Vorteile dieser *in vitro* Behandlung sind, dass die die Zelle erreichende Konzentration von Angiotensin II genau bekannt ist und auch höhere Konzentrationen getestet werden können. Außerdem kann, vor allem bezogen auf die LLC-PK1 Nieren-Zellen, ein spezifischer Typ von Nierenzellen, nämlich Tubuluszellen, untersucht werden.

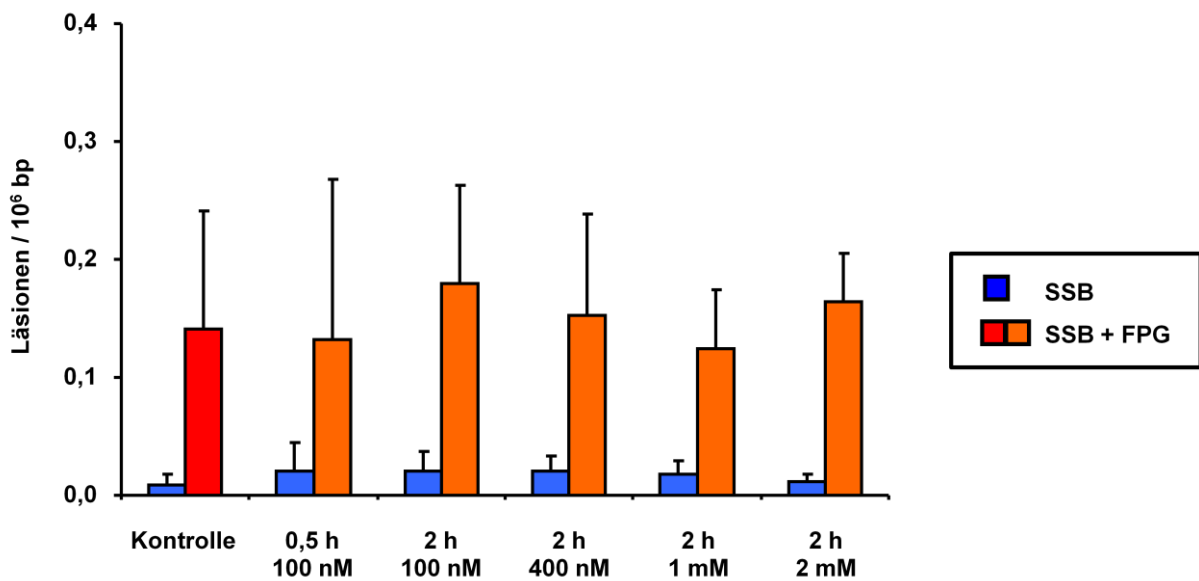
Die Versuche wurden mit den Nieren-Zellkulturlinien HEK und LLC-PK1 durchgeführt. Außerdem wurden immortalisierte Maus-Embryo-Fibroblasten aus Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen sowie mit primären Hepatozyten und primären Lymphozyten aus Wildtyp- und OGG1-defizienten Tieren untersucht. Für die Versuche in Zellkultur wurden die Zellen mit den angegebenen Konzentrationen, von 100 nM bis 2 mM, und über die angegebenen Zeiten, von 30 min bis 4 h, mit Angiotensin II inkubiert. Anschließend wurde mit Hilfe der Alkalischen Elution die Menge an DNA-Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitive Läsionen bestimmt (siehe 3.2.3).

Die Zellkulturlinie HEK ist eine humane embryonale Nierenzelllinie. **Abbildung 4-13** zeigt die Bestimmung der DNA-Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitiven Läsionen in HEK-Zellen nach Behandlung mit Angiotensin II. Es ist zu sehen, dass diese Zelllinie basal sehr niedrige Spiegel an oxidativen DNA-Schäden hat. Die DNA-Einzelstrangbrüche liegen unter 0,01 Läsionen pro 10<sup>6</sup> Basenpaare. Die Fpg-sensitiven Läsionen liegen bei 0,11 ± 0,05 Läsionen pro 10<sup>6</sup> Basenpaare. In den humanen embryonalen Nierenzellen ist keine Erhöhung der DNA-Einzelstrangbrüche sowie der Fpg-sensitiven Läsionen mit den angegebenen Konzentrationen in den angegebenen Zeiträumen zu erkennen.

LLC-PK1-Zellen sind Schweineepithelzellen mit der Charakteristik einer proximalen Tubuluszelle der Niere. Auch in den LLC-PK1-Zellen ist keine Erhöhung der DNA-Einzelstrangbrüche und der Fpg-sensitiven Läsionen durch die Inkubation mit Angiotensin II zu erkennen (**Abbildung 4-14**).



**Abb. 4-13: SSB und Fpg-sensitive Läsionen in HEK-Zellen nach Inkubation mit ATII** Die SSB und Fpg-sensitiven wurden mit der Alkalischen Elution quantifiziert. HEK-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit den angegebenen ATII-Konzentrationen behandelt.  $n=2$ ; Mittelwerte  $\pm$  Abweichung vom Mittelwert.

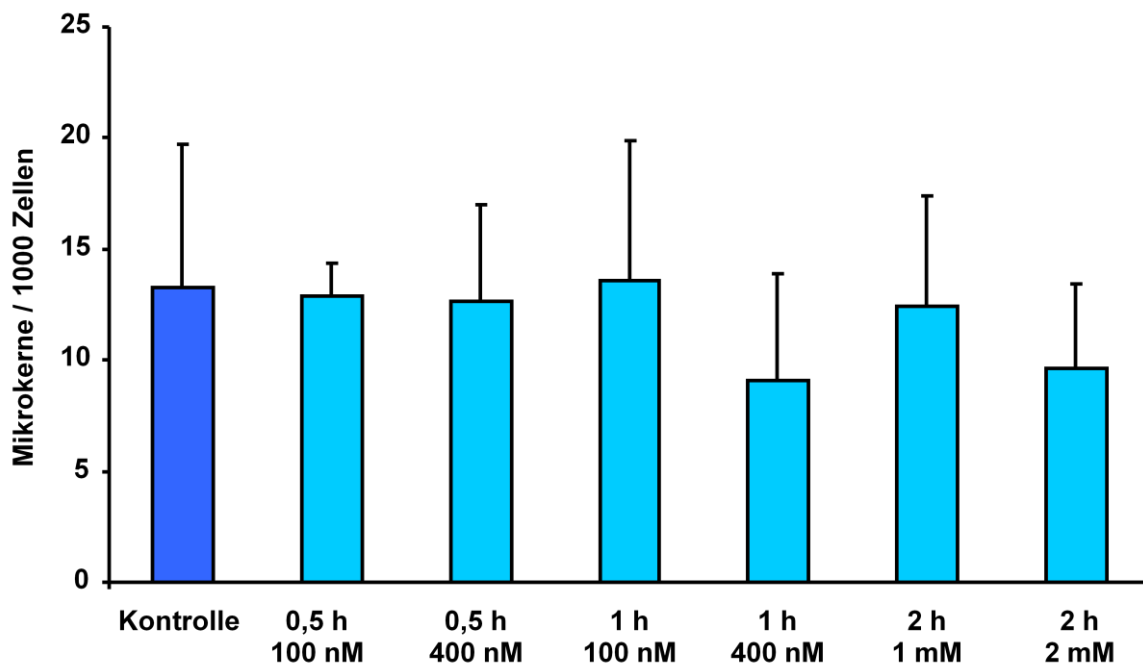


**Abb. 4-14: SSB und Fpg-sensitive Läsionen in LLC-PK1-Zellen nach Inkubation mit ATII** Die SSB und Fpg-sensitiven wurden mit der Alkalischen Elution quantifiziert. LLC-PK1-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit den angegebenen ATII-Konzentrationen behandelt.  $n=3-7$ ; Mittelwerte  $\pm$  SD.

In LLC-PK1-Zellen wurden neben den DNA-Schäden auch die Mikrokernraten bestimmt. Hierzu wurden die Zellen nach der Behandlung mit dem vasoaktiven Gewebshormon über mindestens einen Zellzyklus unter Standardbedingungen

inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Objektträger aufgeschleudert und nach Anfärben verblindet mit dem Mikroskop ausgezählt (siehe 3.2.6).

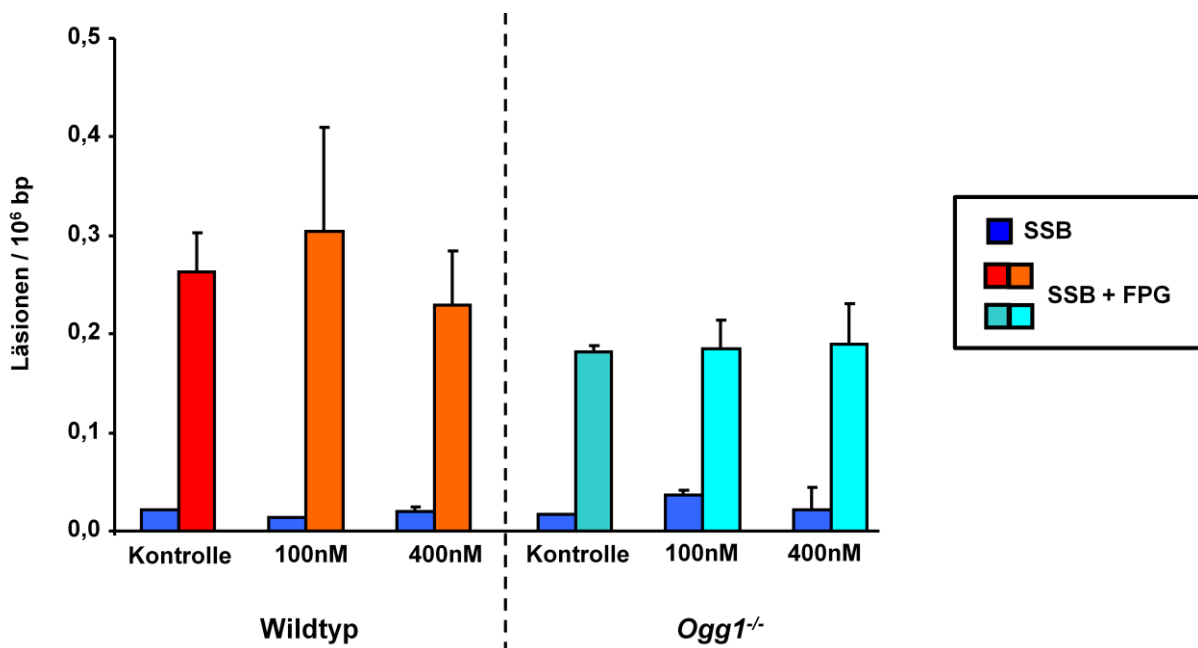
**Abbildung 4-15** zeigt die Mikrokernraten der Schweine-Epithelzellen nach Behandlung mit Angiotensin II. In den unbehandelten LLC-PK1-Zellen lassen sich  $13,3 \pm 6,5$  Mikrokern in 1000 Zellen zählen. Es ist jedoch auch bei diesem Versuchsendpunkt in dieser Zelllinie durch unterschiedliche Konzentrationen und unterschiedliche Inkubationszeiten keine Erhöhung der Mikrokernrate zu erkennen.



**Abb. 4-15: Mikrokernrate in LLC-PK1-Zellen nach Inkubation mit ATII.** Die LLC-PK1-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit den angegebenen ATII-Konzentrationen behandelt. Die Mikrokern wurden pro Ansatz auf zwei Objektträgern in jeweils 1000 Zellen ausgezählt.  $n=3-7$ ; Mittelwerte  $\pm$  Abweichung vom Mittelwert.



**Abbildung 4-16** zeigt die gemessenen DNA-Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitiven Läsionen in MEFs nach Behandlung mit Angiotensin II. Im Gegensatz zu den primären Zellen ist in den MEFs aus *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen keine Akkumulation der Fpg-sensitiven Läsionen zu erkennen. Es ist jedoch auch in diesen Zellen keine Erhöhung der DNA-Einzelstrangbrüche oder der Fpg-sensitiven Läsionen durch die Behandlung mit Angiotensin II zusehen.

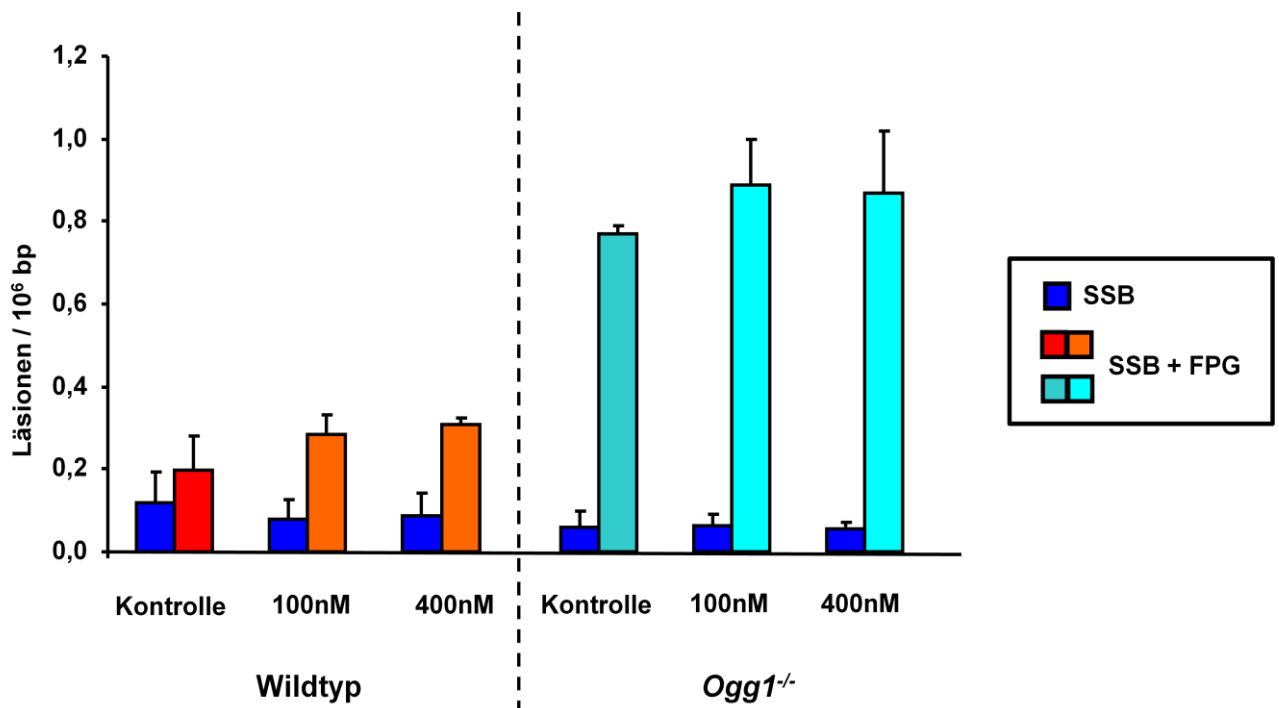


**Abb. 4-16: SSB und Fpg-sensitive Läsionen in MEFs nach Inkubation mit ATII.** MEFs von Wildtyp und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden für 4 Stunden mit den angegebenen ATII-Konzentrationen behandelt. SSB und Fpg-sensitive Läsionen wurden mit der Alkalischen Elution quantifiziert. n=2; Mittelwerte ± Abweichung vom Mittelwert.

Die *in vitro* Behandlung mit Angiotensin II wurde zudem in primären, aus Leber und Milz isolierten Zellen, von Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen durchgeführt. Zelltypen, die auch schon in dem Tierversuch verwendet wurden.

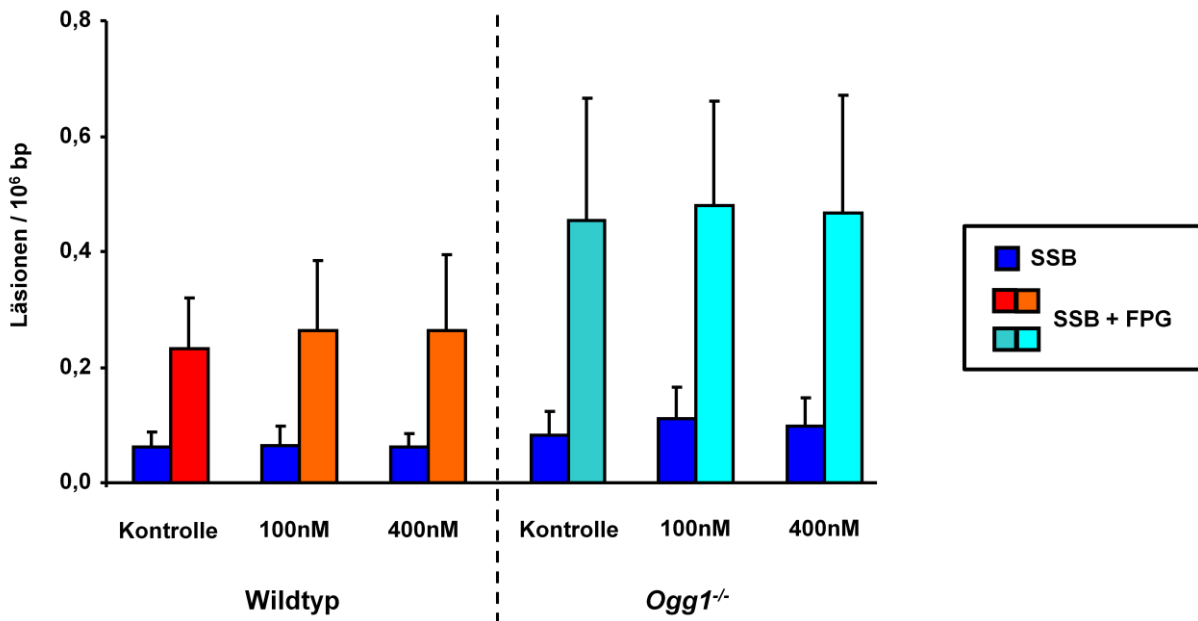
Abbildung 4-17 zeigt die Ergebnisse der Behandlung primärer Hepatozyten aus Wildtyp-Mäusen und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Angiotensin II. Es ist wieder zu erkennen, dass die Hepatozyten aus den reparaturdefizienten Mäusen höhere Spiegel an Fpg-sensitiven Läsionen aufweisen. Bei beiden Genotypen liegen die basalen DNA-Einzelstrangbrüchen unter 0,2 Läsionen pro 10<sup>6</sup> Basenpaare. Die basalen Spiegel an Fpg-sensitiven Läsionen der Hepatozyten der Wildtyp-Tiere liegen mit 0,20 ± 0,08 Läsionen pro 10<sup>6</sup> Basenpaare niedriger, die Spiegel der *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Tiere mit 0,77 ± 0,02 Läsionen pro 10<sup>6</sup> Basenpaare leicht höher, als bei den Tieren des Angiotensin-Versuchs.

Aber auch durch diese kurze Angiotensin II-Behandlung mit hohen Konzentrationen ist keine signifikante Induktion von DNA-Schäden in Form von DNA-Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Läsionen zu erkennen.



**Abb. 4-17: SSB und Fpg-sensitive Läsionen in primären Hepatozyten nach Inkubation mit ATII**  
Die SSB und Fpg-sensitiven wurden mit der Alkalischen Elution quantifiziert. Die Zellen wurden aus Wildtyp und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen isoliert und für 2 Stunden mit den angegebenen ATII-Konzentrationen behandelt. n=2; Mittelwerte ± Abweichung vom Mittelwert.

**Abbildung 4-18** zeigt die Ergebnisse der Behandlung primärer Lymphozyten aus der Milz von Wildtyp-Mäusen *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Angiotensin II. Auch hier stimmen die basalen Spiegel an DNA-Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Läsionen mit den im Tierversuch bestimmten Werte überein. Es ist zu sehen, dass in den Zellen der reparaturdefizienten Tieren höhere Spiegel an Fpg-sensitiven Läsionen haben, aber die Behandlung mit Angiotensin II in beiden Genotypen zu keiner Erhöhung der DNA-Schäden führt.



**Abb. 4-18: SSB und Fpg-sensitive Läsionen in primären Lymphozyten nach Inkubation mit ATII**  
Die primären Lymphozyten wurden aus der Milz von Wildtyp und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen isoliert und für 4 Stunden mit den angegebenen ATII-Konzentrationen behandelt. SSB und Fpg-sensitive Läsionen wurden mit der Alkalischen Elution quantifiziert. n=3; Mittelwerte ± SD.

### 4.3 Arteriosklerose

Wie in Kapitel 2.6.2 bereits erläutert Arteriosklerose ist eine chronisch-entzündliche Krankheit der Arterienwände. Die Krankheit zeichnet sich durch eine endotheliale Dysfunktion aus. Hierbei handelt es sich um eine Funktionsstörung des Endothels in Hinsicht Gefäßweitenregulation, Gefäßpermeabilität, Modulation der adhäsiven Eigenschaften und der Thrombozytenaggregation. Die Endothelfunktion kann als Marker für Arteriosklerose gesehen werden. Oxidativer Stress trägt zur Entstehung der endothelialen Dysfunktion bei, weswegen mit den folgenden Versuchen untersucht werden sollte, ob auch oxidative DNA-Schäden kausal mit der Entstehung der Arteriosklerose und somit auch mit der endothelialen Dysfunktion zusammenhängen. Zur Überprüfung dieser Theorie wurde die Endothelfunktion von unbehandelten Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen untersucht.

#### 4.3.1 Untersuchung der Endothelfunktion in unbehandelten Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen

Die Untersuchung der Endothelfunktion wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Li der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt. Aus Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde die Aorta präpariert. Die isolierte Aorta wurde mit Noradrenalin kontrahiert und anschließend mit Acetylcholin relaxiert. Die Relaxation wird als Maß für die Endothelfunktion gewertet. Es wurden Tiere in den Altersgruppen 2 Jahre, 6 Monate und 2 Monate untersucht.

**Abbildung 4-19** zeigt die Endothelfunktion von Wildtyp und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Es ist zu erkennen, dass die mit Noradrenalin kontrahierten Gefäße reparaturdefizienter Tiere in allen 3 Altersgruppen bei niedrigeren Acetylcholin-Konzentrationen relaxieren als die Gefäße der Wildtyp-Tiere. Demzufolge besitzen *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen in allen drei getesteten Altersbereichen eine bessere Endothelfunktion als Wildtyp-Tiere.

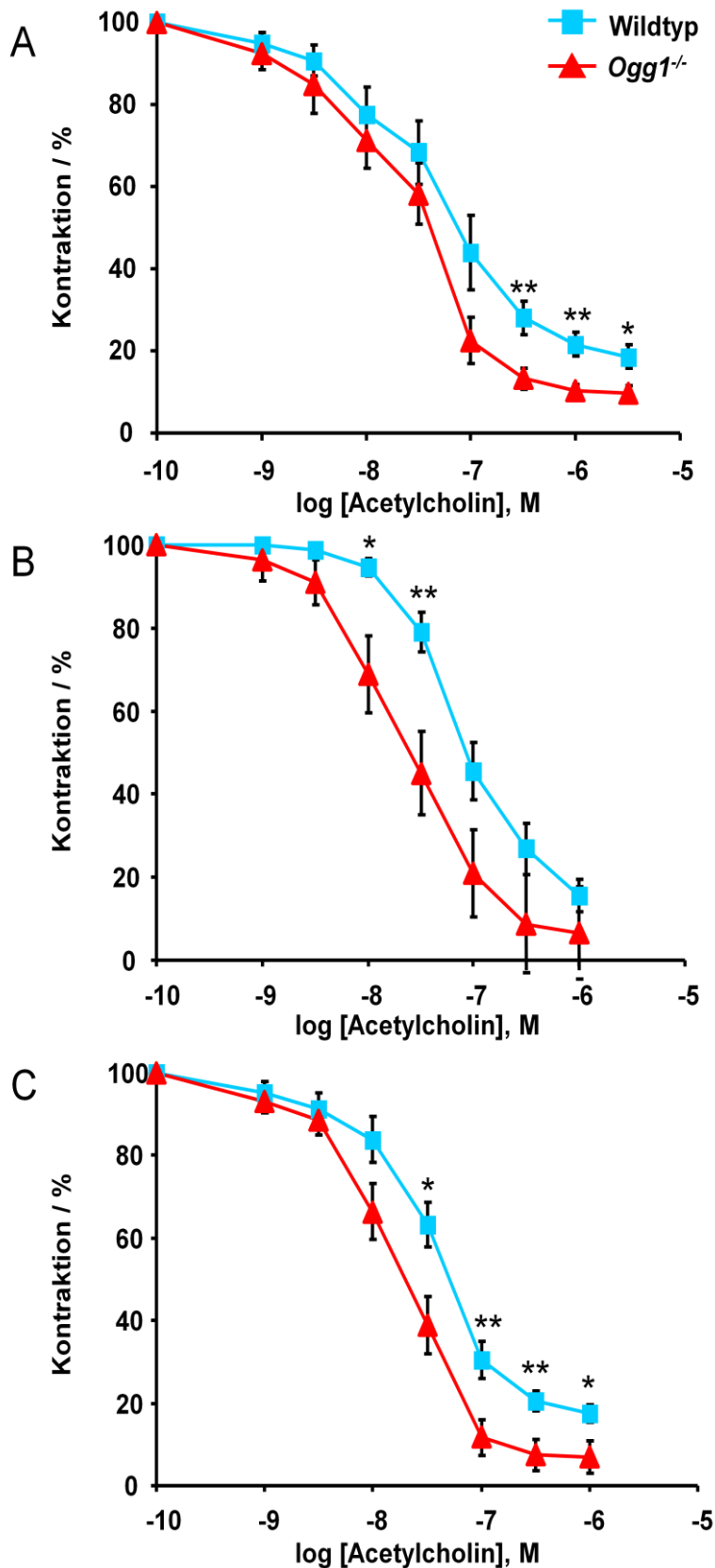


Abb. 4-19: Endothelfunktion von unbehandelten Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Alter von 2 Jahren (A), 6 Monaten (B) und 2 Monaten (C). Die Endothelfunktion wurde von der AG Li (Uniklinik Mainz) mit der Organbad-Methode gemessen. Es wurden (A) 2 Aortenringe von 5 Tieren, (B) 4 Aortenringe von 3 Tieren und (C) 4 Aortenringe von 3 Tieren untersucht. Mittelwerte  $\pm$  SEM.

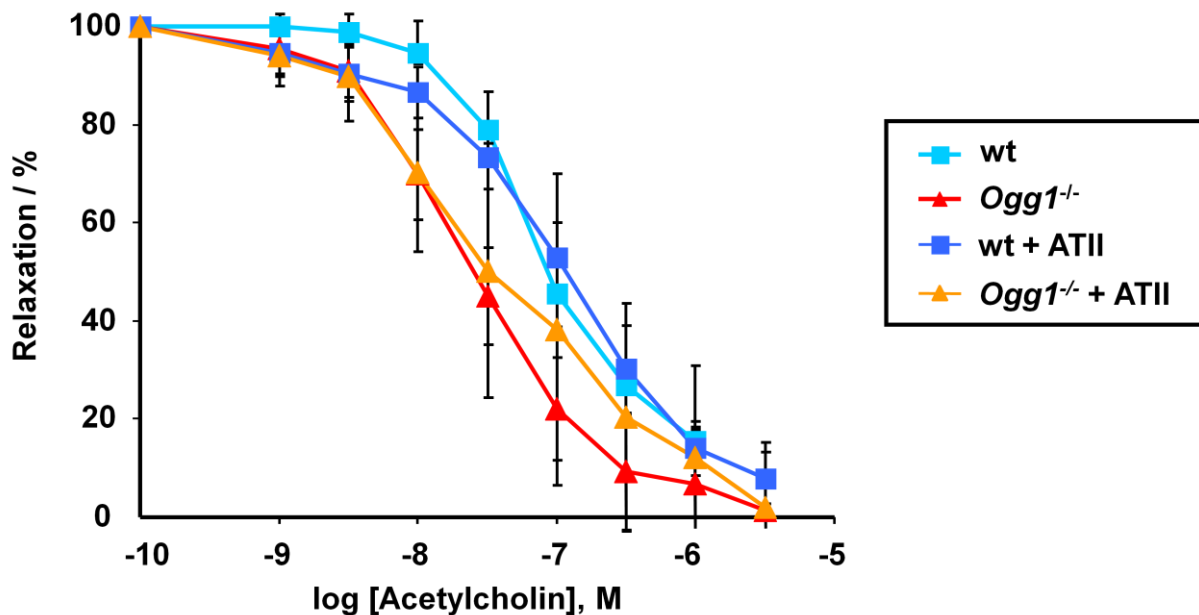
#### 4.3.2 Untersuchung der Endothelfunktion von Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Angiotensin II-Behandlung

Arteriosklerose wird durch reaktive Sauerstoffspezies initiiert und verstärkt. Aus diesem Grunde sollte untersucht werden, ob eine vierwöchige Behandlung mit Angiotensin II (0,6µg/kg/min) einen Einfluss auf die Endothelfunktion von Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen besitzt. Von verschiedenen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass Hypertonie, beziehungsweise eine Behandlung mit Angiotensin II, zu einer Verschlechterung der Endothelfunktion führt (Nishida et al. 2013).

Die Messung der Endothelfunktion wurde erneut von der Arbeitsgruppe Li in der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Die Ergebnisse der Messung der Endothelfunktion der mit Angiotensin II oder Kontroll-Lösung behandelten Tiere sind in **Abbildung 4-20** zu sehen. Die mit Kontroll-Lösung behandelten Wildtyp- und OGG1-defizienten Mäuse entsprechen den Tieren in **Abbildung 4-19B**.

Die Behandlung mit Angiotensin II bewirkt in den Wildtyp-Tieren keine Änderung der Endothelfunktion. Die Kontraktion nimmt mit steigender Acetylcholin-Konzentration in beiden Versuchsgruppen in etwa gleichem Maß ab. Bei den OGG1-defizienten Tieren ist bei niedrigen Acetylcholin-Konzentrationen die Abnahme der Relaxation gleich. Bei höheren Konzentrationen, zwischen den Acetylcholin-Konzentrationen von  $10^{-7,5}$  bis  $10^{-6}$  M, ist eine schwächere Relaxation der Gefäße der mit Angiotensin II behandelten OGG1-defizienten Tieren zu erkennen. Dieser unterschiedliche Verlauf der behandelten Tiere und der Kontrollgruppe ist jedoch nicht signifikant.



**Abb. 4-20: Endothelfunktion von Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach vierwöchiger Behandlung mit ATII (0,6µg/kg\*min).** Die Endothelfunktion wurde von der AG Li (Uniklinik Mainz) mit der Organbad-Methode gemessen. Es wurden jeweils 4 Aortenring von 3 Tieren (*Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse + ATII: 2 Tiere) untersucht. Mittelwerte ± SEM.

#### 4.3.3 Untersuchung der Genexpression in der Aorta

Das Ergebnis der schlechteren Endothelfunktion der Wildtyp-Tiere im Vergleich mit den *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Tieren war überraschend, so dass im Folgenden Versuche zur Klärung des molekularen Mechanismus durchgeführt wurden.

Die Relaxation des Endothels wird durch Stickstoffmonoxid (NO) vermittelt. NO ist das kleinste Signalmolekül und spielt bei vielen Prozessen eine fundamentale Rolle. Über Aktivierung der löslichen Guanylzyklase reguliert NO den Gefäßtonus. Die molekulare Grundlage der endothelialen Dysfunktion ist eine verminderte Konzentration an NO. NO wird durch NO-Synthasen (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff hergestellt werden. Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) ist ein Kofaktor der endothelialen NOS (eNOS). Ist dieser zu wenig im Endothel vorhanden, kann es zur Entkoppelung der eNOS kommen. In diesem Fall wird Superoxid anstelle von NO gebildet. Das Superoxid reagiert mit noch vorhandenem NO zu Peroxynitrit, und inaktiviert dieses (Cai und Harrison 2000). Die NO-Konzentration nimmt immer weiter ab, wodurch die eNOS immer stärker entkoppelt wird (Förstermann 2006).

Wie beschrieben ist von der Aktivität der eNOS der BH<sub>4</sub>-Spiegel abhängig. Das BH<sub>4</sub>-produzierende Enzym ist die GTP-Cyclohydrolase I (GTPCH1). BH<sub>4</sub> kann zu 7,8-Dihydrobiopterin (BH<sub>2</sub>) oxidiert werden. Durch die Dihydrofolatreduktase (DHFR) wird BH<sub>2</sub> zu BH<sub>4</sub> regeneriert. Die beiden Enzyme GTPCH1 und DHFR sind somit für den BH<sub>4</sub>-Spiegel verantwortlich (Crabtree et al. 2009).

Da die eNOS an der Entstehung der endothelialen Dysfunktion beteiligt ist sowie BH<sub>4</sub> als Cofaktor der eNOS notwendig ist, sollte untersucht werden, ob eine unterschiedliche Expression der eNOS und der für den BH<sub>4</sub>-Spiegel verantwortlichen Enzyme GTPCH1 und DHFR in Wildtyp- und OGG1-defizienten Tieren für die unterschiedliche Endothelfunktion der Mäuse verantwortlich sein kann.

Für die Untersuchung der Genexpression in der Aorta von Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden jeweils 3 Tiere im Alter von 2 Monaten analysiert. Es handelt sich um eben die Tiere, in welchen auch schon die Endothelfunktion analysiert wurde. Aus Aortenstücken (in flüssigem Stickstoff gefroren) wurde die Gesamt-RNA isoliert und mit einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe spezifischer Primer können in einer realtime-PCR die zu untersuchenden Gene quantifiziert werden. Durch Normalisierung auf ein in der Zelle konstitutiv exprimiertes Gen können Veränderungen in der Genexpression nachgewiesen werden. Als Referenzgene wurden GAPDH, β-Akt und 18s verwendet (siehe 3.2.5).

**Abbildung 4-21** zeigt, dass bei allen drei untersuchten Genen kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen zu erkennen ist.

Die Aktivität der eNOS wird durch posttranslationale Modifikationen beeinflusst. Eine Phosphorylierung am Serin-Rest 1177 erhöht die Aktivität der eNOS. Um zu untersuchen, ob der unterschiedlicher Phosphorylierungsgrad der eNOS von Wildtyp- und OGG1-defizienten Tieren unterschiedlich ist, wurden Proteinextrakte aus der Aorta von den Mäusen mit phospho-sensitiven Antikörpern im Western Blot untersucht. Aus **Abbildung 4-22** ist zu erkennen, dass unbehandelte Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse einen gleichen Phosphorylierungsgrad des Serin-Rests 1177 besitzen.



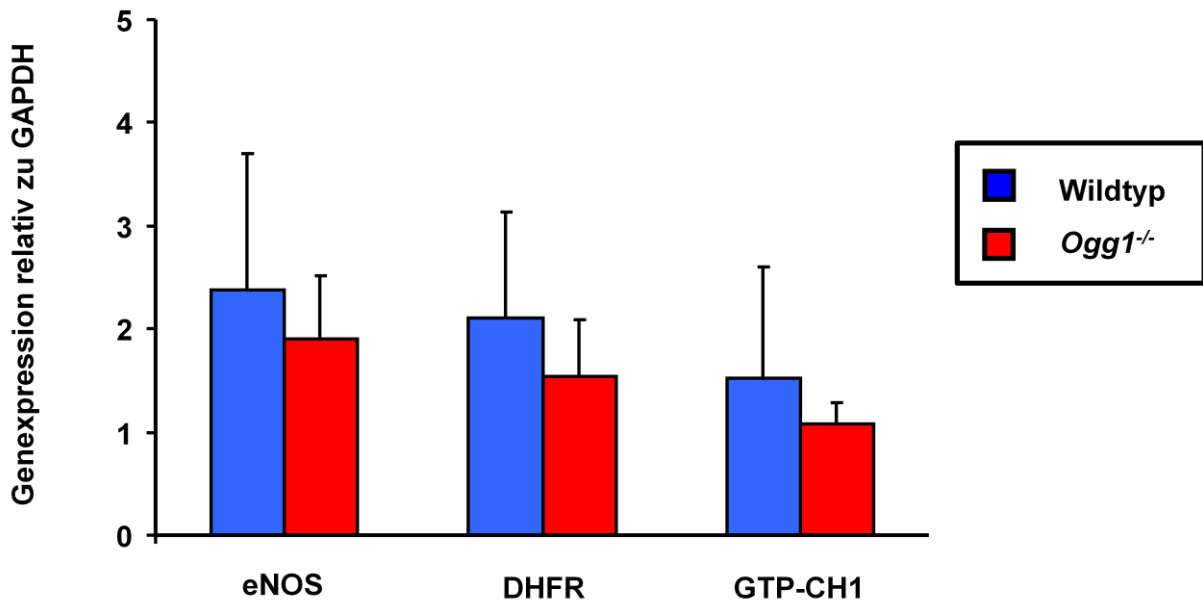


Abb. 4-21: Expression von eNOS, DHFR und GTP-CH1 in der Aorta von unbehandelten Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Pro Maus wurde die Expression jedes Gens relativ zu dem Referenzgen GAPDH bestimmt. Mittelwerte  $\pm$  SD

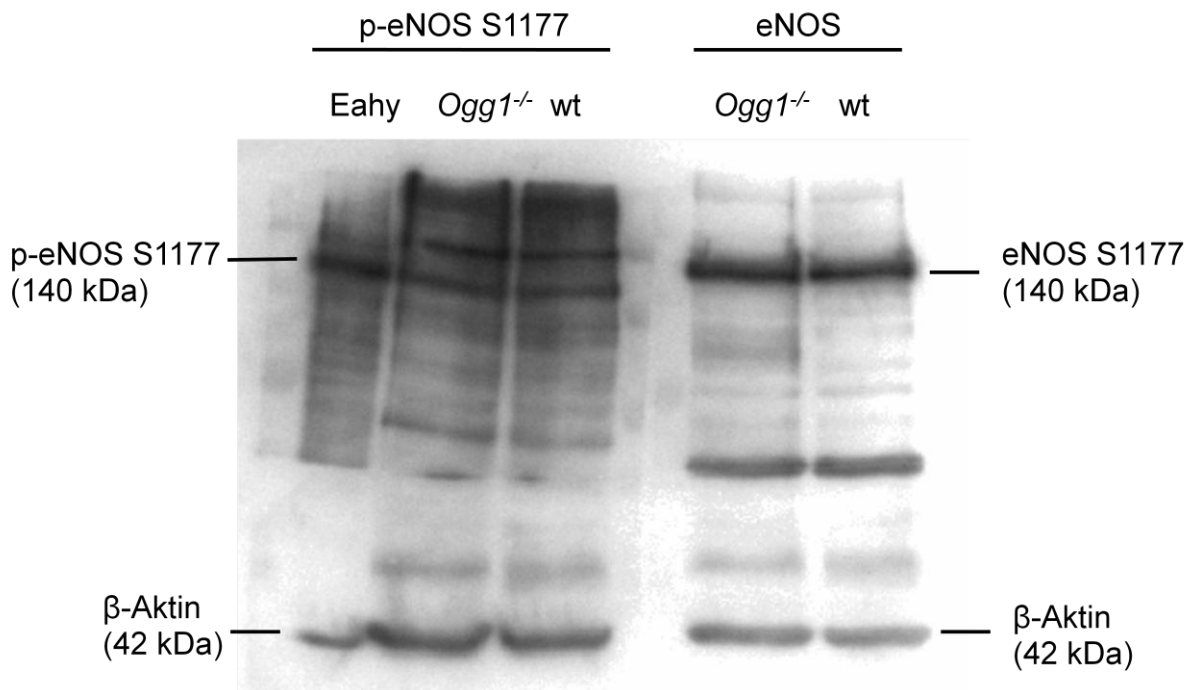


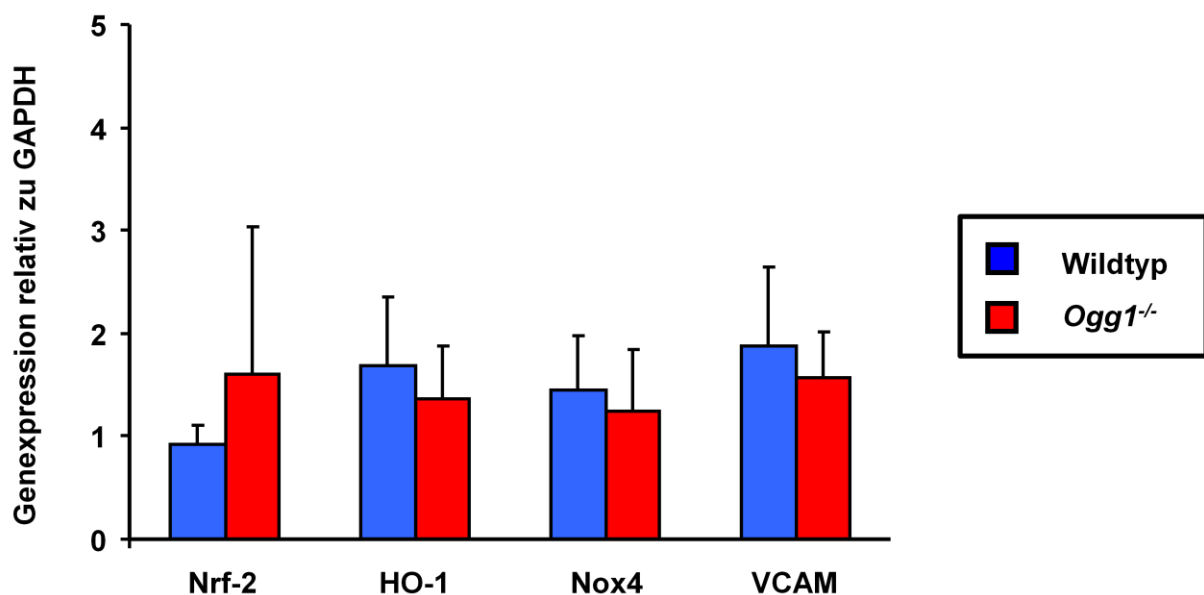
Abb. 4-22: Western Blot: eNOS und p-eNOS S1177 Expression in der Aorta von Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Je 3 gepoolte Aorten von unbehandelten Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Referenzprotein  $\beta$ -Aktin.

Zusätzlich wurde die Expression weiterer Gene untersucht. In Gefäßzellen hat HO-1 eine wichtige anti-oxidative, anti-entzündliche, anti-apoptotische, ant-iproliferative

und immunmodulatorische Funktion (siehe 2.3). Nrf-2 ist ein Transkriptionsfaktor der für die Expression von HO-1 verantwortlich ist (siehe 2.3). Das Adhäsionsmolekül VCAM ist in der Pathogenese der Arteriosklerose involviert. Aus **Abbildung 4-23** wird jedoch ersichtlich, dass auch für die Gene Nrf-2, HO-1 und VCAM keine unterschiedliche Expression zwischen den beiden Genotypen gezeigt werden kann.

Wie in Kapitel 2.1 bereits erklärt gibt es viele verschiedene Quelle für reaktive Sauerstoffspezies. Welche Quellen an reaktiven Sauerstoffspezies bei der Entstehung der Arteriosklerose von Bedeutung sind konnte noch nicht genau geklärt werden. Aus diesem Grund wurde die Expression des NOX4-Gens untersucht. Es konnte jedoch auch hier keine Unterschiedliche Expression zwischen Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen gezeigt werden.

Die Expression der Gene für die Cytokine MCP-1, MIP1 und das Chemokin TNF $\alpha$  konnten in der Aorta nicht nachgewiesen werden.



**Abb. 4-23: Genexpression in der Aorta von Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen.** Pro Maus wurde die Expression jedes Gens relativ zu dem Referenzgen GAPDH bestimmt. Mittelwerte  $\pm$  SD

## 5 Diskussion

### 5.1 Ist Angiotensin II in Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen genotoxisch?

In der vorliegenden Arbeit sollte ein möglicher DNA-schädigender und mutagener Effekt durch das vasoaktive Gewebshormon Angiotensin II untersucht werden. Es wurden Wildtyp-Mäuse und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse, welche defizient in der Reparatur der prämutagenen DNA-Modifikation 8-oxoG sind, über vier Wochen mit Angiotensin II behandelt (0,6 µg / kg / min). Für die *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse konnte bereits gezeigt werden, dass sie aufgrund ihrer Reparaturdefizienz erhöhte Spiegel an 8-oxoG haben (Klungland et al. 1999; Osterod et al. 2001) und auch eine höhere Spontan-Mutationsrate in Leber und Hoden aufweisen (Klungland et al. 1999). Diese *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse stellen somit ein sehr sensibles Modell dar, um oxidativen Stress erzeugende Substanzen hinsichtlich ihrer genotoxischen Wirkung zu untersuchen.

Die Behandlung der Tiere mit Angiotensin II verlief wie in früher publizierten Studien (Brand et al. 2013). Es war in beiden untersuchten Genotypen, Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen, ein signifikanter Anstieg des systolischen sowie des diastolischen Blutdrucks zu beobachten (**Abbildung 4-1**). Das über die Behandlung kontrollierte Körper- und Nierengewicht zeigte keine Auffälligkeiten (**Abbildung 4-2**). Das Körpergewicht ist ein sensibler Marker für Schmerz, Leiden und Schäden, was somit ausgeschlossen werden kann.

Es ist beschrieben, dass Angiotensin II NADPH-Oxidasen aktiviert, welche reaktive Sauerstoffspezies bilden (Seshiah et al. 2002; Fazeli et al. 2012). Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in der Niere wurde vom Kooperationspartner in Würzburg untersucht. In Gewebeschnitten der Niere kann in beiden Maus-Genotypen mit dem Farbstoff DHE eine vermehrte Ethidium-Fluoreszenz nachgewiesen werden, die als Folge von oxidativem Stress, beziehungsweise der Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies angesehen werden kann (**Abbildung 4-4**). Dies entspricht bereits publizierten Daten der Arbeitsgruppe Schupp (Brand et al. 2013).

Reaktive Sauerstoffspezies können DNA-Schäden generieren (siehe 2.3). Durch Angiotensin II induzierte DNA-Schäden, nachgewiesen mit dem Comet Assay,

konnten schon in verschiedenen Zellsystemen gezeigt werden (Mazza et al. 2003; Fazeli et al. 2012). In den Nieren, der in diesem Versuch behandelten Tiere, wurde mit zwei Methoden, der Alkalischen Elution, zur Detektion von DNA-Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Läsionen, und einer Immunfluoreszenz-Färbung, zum Nachweis von  $\gamma$ H2AX-Foci und damit DNA-Doppelstrangbrüchen, das Entstehen von DNA-Schäden durch Angiotensin II untersucht.

Die Ergebnisse der Alkalischen Elution zeigen, dass in den Nieren beider Maus-Genotypen keine Erhöhung von DNA-Einzelstrangbrüchen sowie Fpg-sensitiven Läsionen durch die Angiotensin II-Behandlung zu erkennen ist (**Abbildung 4-5**). Wie in Kapitel 4.1.3.1 beschrieben, gestaltete sich die Präparation der Einzelzellsuspension an Nierenzellen für die Alkalische Elution schwierig. Es konnten nur kleine Mengen an Zellen isoliert werden. Dies wirft die Frage auf, ob die erhaltenen Daten der Alkalischen Elution überhaupt das gesamte Organ repräsentieren, da die Gefahr besteht, dass ein Zelltyp selektiert wurde.

Mit der Immunfluoreszenz-Färbung von  $\gamma$ H2AX-Foci (durchgeführt von AG Schupp in Würzburg) wurde in den Nieren der Wildtyp-Tiere durch die Behandlung mit Angiotensin II eine Erhöhung der  $\gamma$ H2AX-Foci nachgewiesen. Dagegen wurde bei den *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Angiotensin II-Behandlung eine geringere Menge an  $\gamma$ H2AX-positiven Zellen beobachtet als bei den reparaturdefizienten Kontroll-Tieren. (**Abbildung 4-6**). Es stellt sich die Frage, warum in *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Angiotensin II-Behandlung eine geringeren Menge an  $\gamma$ H2AX-Foci gemessen wurden als bei den mit Kontroll-Lösung behandelten Tieren. Dies ist auch deshalb nicht zu erwarten, da OGG1 nicht an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen beteiligt ist. Auch stellen DNA-Doppelstrangbrüche kein Reparaturintermediat der Basenexzisions-Reparatur dar, so dass es bei der Entstehung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch reaktive Sauerstoffspezies keinen Unterschied zwischen Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen geben dürfte.

Aus nicht-reparierten DNA-Schäden können Mutationen entstehen. Die in dem Versuch eingesetzten Tiere besitzen das ursprünglich bakterielle, nicht transkribierte *lacI*-Gen als Transgen, welches ein Mutation-Marker ist. Über den „Plaque Color Screening Assay“ kann die Mutationsfrequenz des *lacI*-Gens in nahezu allen

Gewebe der Tiere bestimmt werden (siehe 3.2.4). Der in unserem Versuch ermittelte Wert von  $3,6 \pm 1,2$  *lacI*-Mutationen, in der Niere mit Kontroll-Lösung behandelte Wildtyp-Mäuse, liegt im Bereich bisher publizierter Daten unbehandelte Mäuse. Bisher konnte gezeigt werden, dass die basalen Level an *lacI*-Mutationen in der Niere zwischen 2 (Nishikawa et al. 1997),  $3 \pm 0,6$  (Gorelick et al. 1999); 3,2 (Autrup et al. 1996) und  $3,8 \pm 1,5$  (de Boer et al. 1998) liegen.

In den *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen ergeben sich sehr große Abweichungen bei den Mutationsfrequenzen. Bei den Tieren der Kontrollgruppe sind die Mutationsfrequenzen im *lacI*-Gen dreier Tiere nahezu gleich und zeigen einen den Wildtyp-Tieren ähnlichen Spiegel an Mutationen. Jedoch beträgt der bestimmte Wert der Mutationsfrequenz einer vierten, mit Kontroll-Lösung behandelte *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Maus, etwa das Dreifache. Bei den mit Angiotensin II behandelte *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen ergeben sich ebenfalls sehr große Abweichungen in den Mutationsfrequenzen im *lacI*-Gen. Je zwei *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Tiere zeigen sehr niedrige Mutationsfrequenzen, zwei weitere analysierte Tiere zeigen jeweils eine etwa vierfach erhöhte Mutationsfrequenz (**Abbildung 4-9; Tabelle 4-1**). Alle höheren Mutationsfrequenzen im *lacI*-Gen, unabhängig von Genotyp und Behandlung, wurden in einem zweiten Versuchsdurchgang beobachtet (**Tabelle 4-1** mit \* markierte Tiere). Die Ursache der höheren Mutationsfrequenzen ist unklar. Die Tiere zeigten keine Auffälligkeiten (bezüglich Körpergewicht, Erscheinung, Organanomalien), die auf eine Infektion oder Krankheit hindeuten könnten und so die Erhöhung der Mutationsfrequenzen erklären würden. Die Durchführung des Versuchs wurde mit Hilfe der mitgelieferte Reagenzien und nach Anleitung durchgeführt, so dass auch hier Abweichungen, die zu solch großen Unterschieden in der Mutationsfrequenz führen, ausgeschlossen werden können.

Wertet man die Versuche getrennt aus, ist dennoch keine signifikante Erhöhung der Mutationen im *lacI*-Gen durch die Angiotensin II-Behandlung zu erkennen.

Da zur Entstehung von Mutationen die Proliferation des Gewebes notwendig ist, stellt sich die Frage, ob eine vierwöchige Behandlung der Tiere ausreichend ist, um durch die Behandlung entstandene DNA-Schäden in Mutationen zu überführen. Dass dies in der Niere selbst nach einer kurzen Behandlung möglich ist, konnte von Autrup et al. (1996) gezeigt werden. Die Arbeitsgruppe führte eine viertägige Behandlung mit

Aflatoxin (8 mg/kg) in Mäusen durch. Die Mutationen im *lacI*-Gen wurden 21 Tage nach der Behandlung analysiert. Es konnte eine Erhöhung der Mutationen im *lacI*-Gen von 3,2 (n=2) auf  $11,9 \pm 1,1$  (n=4) gezeigt werden. In Kombination mit einer Glutathion-Depletion durch Phorone konnten die Mutationen sogar auf  $17,5 \pm 3,2$  (n=4) erhöht werden. Die Glutathion-Depletion selbst zeigte eine Erhöhung der Mutationen auf  $6,5 \pm 0,6$  (n=4). Allerdings ist Aflatoxin B ein starkes Mutagen, was zu hohen DNA-Addukt-Zahlen führt.

Ein weiteres Werkzeug, um die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies und genotoxischer Ereignisse zu untersuchen, ist die Bestimmung der Expression von Genen der Redoxhomöostase (siehe 4.1.7).

Von verschiedenen Genen ist bekannt, dass ihre Hochregulation zu vermindertem oxidativen Stress und erniedrigten DNA-Schäden führt. So kann durch eine Überexpression von SOD1 die Menge an Fpg-sensitiven Läsionen reduziert werden (Gallé et al. 2014, noch nicht veröffentlicht). In Ratten zeigt sich, dass eine Überexpression von Katalase vor Hypertonie und einer tubulären Nierenfunktionsstörung durch Angiotensin II schützt (Shi et al. 2013). Das Polyphenol Resveratrol induziert die Expression von SOD1, SOD2, SOD3, Glutathionperoxidase und HO-1. Die Expression dieser Gene wird möglicherweise über den Keap1-Nrf2-ARE-Signalweg induziert. Als Resultat wurde der oxidative Stress vermindert und es konnten in der Leber erniedrigte Spiegel an oxidativen DNA-Modifikationen sowie Mutationen im *lacI*-Gen detektiert werden (Fusser et al. 2011). So ist der Keap-Nrf2-ARE-Signalweg als Schutzmechanismus der Zelle gegenüber endogen und exogen entstehendem oxidativem Stress anzusehen. Durch Bindung von Nrf2 an ARE, das Antioxidative Response-Element, kommt es zur Transkription protektiver Enzyme wie Katalase, Superoxiddismutase, Hämoxygenase und vielen weiteren Proteinen (Kensler et al. 2007). Eine Hochregulation dieser Enzyme kann somit als Indikator für oxidativen Stress angesehen werden. Durch Angiotensin II entstehender oxidativer Stress aktiviert eventuell eben diesen Signalweg, der zur Expression der detoxifizierenden Enzyme führt, die die Zelle vor der Bildung von DNA-Schäden schützen. Die Expression der Gene Katalase, Glutathionperoxidase, Superoxiddismutase 1, Hämoxygenase 1 und Nrf2 wurde in der Niere nach der Behandlung mit Angiotensin II untersucht (**Abbildung 4-11**). Es wurde jedoch kein Einfluss der Behandlung auf die Genexpression beobachtet.

Ein generelles Problem der Untersuchung der Niere nach Angiotensin II-Behandlung ist, dass die Niere ein sehr heterogen aufgebautes Organ ist. Das Nephron, die funktionelle Einheit der Niere, lässt sich in den Glomerulus und den Tubulusapparat unterteilen. Während im Glomerulus durch Filtration des Blutes der Primärharn gebildet wird, hat der Tubulusapparat die Aufgabe der Rückresorption und Sekretion verschiedenster Substanzen. Diese unterschiedlichen Aufgaben werden durch eine Vielzahl an unterschiedlichen Zellen übernommen, die sich in ihrem Aufbau und enzymatischer Ausstattung deutlich unterscheiden. In mehreren Arbeiten wurde speziell in Tubuluszellen die Generierung von oxidativem Stress durch ATII gezeigt (Tanifuji et al. 2005; Fazeli et al. 2012; Kim et al. 2012). Bei den von uns durchgeführten Versuchen wie der Messung der DNA-Schäden mit der Alkalischen Elution, dem BigBlue® Mutations-Assay sowie der Analyse der Genexpression wurden die Zellen, die DNA und auch die RNA aus dem gesamten Gewebe, also nicht nach Zelltypen getrennt, untersucht. Es besteht deshalb die Möglichkeit, dass ein eventuell vorhandener Effekt nicht nachgewiesen werden konnte, weil dieser nur in einem spezialisierten Zelltyp vorhanden ist.

Neben der Niere wurden außerdem die Leber und die Milz behandelte Tiere auf genotoxische Effekte untersucht. In primären Hepatozyten und Lymphozyten aus der Milz wurde mit der Alkalischen Elution die Menge an DNA Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Läsionen bestimmt (**Abbildung 4-7 und 4-8**). In beiden Organen und bezogen auf beide detektierte Arten von DNA-Schäden konnte kein Einfluss der Angiotensin II-Behandlung gezeigt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dem von uns durchgeführten Tierversuch Angiotensin II sich nicht als genotoxisch erwies.

## 5.2 Ist eine *in vitro*-Behandlung mit Angiotensin II genotoxisch?

Nachdem *in vivo* keine Genotoxizität von Angiotensin II beobachtet wurde, sollte weiter untersucht werden, ob mit den von uns verwendeten Methoden das vasoaktive Gewebshormon als *in vitro* genotoxisch bewertet werden kann. Eine Untersuchung *in vitro* hat den Vorteil, dass hohe Konzentrationen und definierte Zelltypen untersucht werden können.

In Zellen der glatten Gefäßmuskulatur konnte gezeigt werden, dass bereits eine 30-minütige Inkubation mit Angiotensin II (100nM) eine Verdoppelung der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (Seshiah et al. 2002) bewirkt. In der Niere konnte insbesondere in Tubulus-Zellen die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies durch Angiotensin II nachgewiesen werden (Tanifuji et al. 2005; Fazeli et al. 2012; Kim et al. 2012).

In den von uns untersuchten LLC-PK1-Zellen, Schweineepithelzellen des proximalen Tubulus (LLC-PK-1-Zellen), wird mit der Alkalischen Elution keine Erhöhung der DNA-Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Läsionen nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Angiotensin II gezeigt (**Abbildung 4-14**). Ebenso zeigt sich kein Anstieg der DNA-Schäden durch Inkubation mit Angiotensin II in den HEK-Zellen (**Abbildung 4-13**).

Mit dem Comet Assay konnte die Arbeitsgruppe Schupp aus Würzburg zeigen, dass in HEK-Zellen sowie in LLC-PK-1-Zellen nach einer 4-stündigen Inkubation mit ATII (50-400nM ATII) die DNA-Schäden ansteigen und auch die Mikrokernrate erhöht wird (Fazeli et al. 2012). Comet Assay und Alkalische Elution sind Methoden mit einem ähnlichen Prinzip. Beide Methoden nutzen die Tatsache, dass DNA-Strangbrüche das physikalisch-chemische Verhalten der DNA beeinflussen. Im Comet Assay werden die entsprechend der Schädigung unterschiedlich langen DNA-Fragmente in einer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Bei der Alkalischen Elution passieren die durch Strangbrüche entstandenen DNA-Fragmente einen Polycarbonatfilter unterschiedlich schnell, entsprechend ihrer Länge. Es stellt sich natürlich die Frage, ob die beiden Methoden eine ähnliche Sensitivität aufweisen, so dass sich die erhaltenen Daten vergleichen lassen.

Die Kalibration der Alkalischen Elution ergibt einen linearen Anstieg an Strangbrüchen nach  $\gamma$ -Strahlung. Bei einer Bestrahlung mit 6 Gy kann ein Schaden von etwa 1 DNA-Einzelstrangbruch pro  $10^6$  Basenpaare detektiert werden (Kohn et al. 1976). Ein linearer Zusammenhang konnte in unserem Labor bestätigt werden. Bei 3 Gy wurde ein Schaden von 0,5 DNA-Einzelstrangbrüchen pro  $10^6$  Basenpaare bestimmt (Ballmeier, 1997). Der Comet Assay zeigt ein ähnliches Ergebnis: über den Bereich von 0 bis 8 Gy ist die DNA-Schädigung linear, was einem DNA-Schaden bis etwa 1,4 Läsionen /  $10^6$  Basenpaare entspricht (Collins 2004). Die



übereinstimmenden Ergebnisse der Kalibration der beiden Methoden lassen jedoch nicht unbedingt auch auf eine ähnliche Sensitivität schließen. Mit der Alkalischen Elution ist es durchaus möglich Läsionen von 0,5 – 1 pro  $10^7$  Basenpaare zu detektieren. In der Literatur ist beschrieben, dass beim Comet Assay Schäden ab 0,4 - 20 Läsionen pro  $10^7$  Basenpaare gemessen werden können (Collins et al. 2008). Ein absoluter Vorteil der Alkalischen Elution ist, dass bei dieser Methode das Mittel aus einer Million Zellen gewertet wird, was auf eine stärkere Robustheit hindeutet. Im Gegensatz dazu werden beim Comet Assay häufig lediglich 100 Zellen pro Probe untersucht.

Von unserem Kooperationspartner konnte in LLC-PK1-Zellen ein Anstieg der Mikrokern-Rate durch Angiotensin II gezeigt werden (Fazeli et al. 2012). Diese Erhöhung der Mikrokernrate konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (**Abbildung 4-15**). Die hier gezeigten Daten der Mikrokerne bestätigen ganz klar den mit der Alkalischen Elution bestimmten fehlenden genotoxischen Effekt in den LLC-PK1-Zellen (**Abbildung 4-14**).

Neben den Zellkulturlinien aus der Niere wurden weitere Arten von Mauszellen aus Wildtyp- und OGG1-defizienten Tiere untersucht. So wurden Versuche mit primären Hepatozyten (**Abbildung 4-17**) und primären Lymphozyten aus der Milz (**Abbildung 4-18**) durchgeführt, sowie mit immortalisierten Mausembryofibroblasten (**Abbildung 4-16**). In keinem der getesteten Zellsysteme wurde ein Anstieg der DNA-Einzelstrangbrüche sowie der Fpg-sensitiven Läsionen nachgewiesen. Die hier gezeigten Daten aus Leber und Milz bestätigen die im Tierversuch erhaltenen Ergebnisse.

Es lässt sich zusammenfassen, dass auch durch die *in vitro* Versuche mit Angiotensin II keine genotoxischen Wirkungen des vasoaktiven Gewebehormons nachgewiesen werden können.

### 5.3 Welche Rolle spielen durch Angiotensin II generierte reaktive Sauerstoffspezies?

Angiotensin II aktiviert NADPH-Oxidasen, welche zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen können (Seshiah et al. 2002; Fazeli et al. 2012). Zur

Klärung der Frage ob in der Niere Nox2 oder Nox4 tatsächlich die Quelle der reaktiver Sauerstoffspezies nach Angiotensin II-Behandlung sind, wurde die Expression dieser beiden NOX-Gene untersucht (**Abbildung 4-11**). Nox4 ist in der Niere lokalisiert, ebenso die Nox2. In Zellen der glatten Gefäßmuskulatur (VSMC: vascular smooth muscle cells) konnte bisher eine Hochregulation von NOX1 und NOX2 und eine Herunter-Regulation von NOX4 durch Angiotensin II gezeigt werden (Lassegue et al. 2001). Eine weitere Arbeitsgruppe dagegen zeigte *in vitro* in VSMC eine Erhöhung der Expression von NOX1 und NOX4 durch Angiotensin II (Wingler et al. 2001). Für die beiden Gene konnte in beiden Mausstämmen kein Einfluss der Angiotensin II-Behandlung beobachtet werden. Möglich ist, dass die Aktivierung der NADPH-Oxidasen nicht über Erhöhung der Expression der Untereinheiten, sondern über posttranslationale Modifikation verläuft. Die durch Angiotensin II aktivierte Proteinkinase C phosphoryliert möglicherweise Untereinheiten der NADPH-Oxidase. Diese Phosphorylierung erleichtert die Zusammenlagerung der Untereinheiten des NADPH-Oxidase-Proteins und führt so zu dessen Aktivierung und der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Zudem zeigte sich, dass es aufgrund der ATII-Behandlung zu einer Translokation der Untereinheiten, im publizierten Fall der p47<sup>phox</sup>, vom Cytosol an die Plasmamembran kommt (Papparella et al. 2005).

Neben einem möglichen DNA-schädigenden Effekt durch oxidativen Stress, spielen reaktive Sauerstoffspezies auch als Signalmoleküle eine große Rolle. Reaktive Sauerstoffspezies können die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und AP-1 aktivieren, welche dann wiederum die Expression entzündungsvermittelnder Gene induzieren (Bulua et al. 2011; Sen und Packer 1996). Eine Rekrutierung inflammatorischer Zellen, sowie eine Infiltration von Lymphozyten durch Angiotensin II kann zur Schädigung der Niere führen (Kaliappan et al. 2012). In Mesangial Zellen der Niere werden durch reaktive Sauerstoffspezies MAP-Kinasen aktiviert, die das Zellwachstum anregen und so zu Hypertrophie führen (Jaimes et al. 1998).

Die Expression der Gene MCP-1, IL6, ICAM und VCAM kann mit der Signaltransduktion von Angiotensin II und reaktiven Sauerstoffspezies in Verbindung gebracht werden. In transgenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass durch ein verstärktes Renin-Angiotensin-Aldosteron-System die Expression von MCP-1 und der Adhäsionsproteine ICAM und VCAM erhöht wird (Theuer et al. 2002). Das

Zytokin IL6 kann durch die Bindung an seinen Rezeptor den Jak-Stat-Signaltransduktionsweg und MAP-Kinase-Weg aktivieren (Heinrich et al. 2003). IL6 spielt bei der Signaltransduktion von Angiotensin II eine Rolle, was anhand IL6-defizienter Mäuse gezeigt werden kann. Diese Tiere entwickeln durch die Behandlung mit Angiotensin II keinen erhöhten Blutdruck (Brands et al. 2010). Bei der durchgeführten Analyse der Expression der oben genannten Gene sowie des Gens für TNF $\alpha$  wird jedoch keine Auswirkung der Behandlung auf die Expression der Gene beobachtet (**Abbildung 4-12**). Mit den in diesem Versuch durchgeführten Experimenten kann demnach keine Rolle der durch Angiotensin II generierten reaktiven Sauerstoffspezies auf Signatransduktionswege gezeigt werden.

#### 5.4 Hat OGG1 eine weitere Funktion neben seiner Rolle in der Basenexzisionsreparatur?

Eine durch Angiotensin II bewirkte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und dadurch verursachte DNA-Schäden können nicht nur zur Entstehung von Krebs führen, sondern auch zur Entstehung von Arteriosklerose beitragen (siehe 2.6.2). Neben der Untersuchung des genotoxischen Effekts von Angiotensin II sollte in dieser Arbeit deshalb auch dessen Einfluss auf den Pathomechanismus der Arteriosklerose untersucht werden.

Entgegen der Erwartung, dass durch den oben beschriebenen Mechanismus die reparaturdefizienten *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse durch ihre erhöhten Spiegel an oxidativen DNA-Modifikationen ein höheres Risiko besitzen an Arteriosklerose zu erkranken, konnte gezeigt werden, dass diese Tiere, ohne Angiotensin II-Behandlung, eine signifikant bessere Endothelfunktion besitzen als die Wildtyp-Tiere (**Abbildung 4-19 und 4-20**).

Um die molekulare Ursache der besseren Endothelfunktion der *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen zu untersuchen, wurde die Genexpression in der Aorta analysiert. Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) ist ein zentrales Protein der Endothelfunktion. NO-Synthasen produzieren NO, ein kleines Signalmolekül, das den Gefäßtonus reguliert. Bei der Entkoppelung der eNOS, produziert diese reaktive Sauerstoffspezies, welche NO zu Peroxynitrit inaktivieren. Zu dieser Entkoppelung kommt es, wenn zu wenig Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) als Kofaktor der eNOS vorhanden ist. Die beiden BH<sub>4</sub> produzierenden und regenerierenden Enzyme sind die GTP-Cyclohydrolase I

(GTPCH1) und die Dihydrofolatreduktase (DHFR). Um zu untersuchen, ob eine unterschiedliche Expression der eNOS in den beiden Tierstämmen für die unterschiedliche Endothelfunktion verantwortlich ist, wurde die Expression der Gene eNOS, GTPCH1 und DHFR in der Aorta von Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen analysiert. Die Quantifikation der Gene zeigt jedoch keinen Unterschied zwischen den Aorten von Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen (**Abbildung 4-21**).

Die Aktivität der eNOS wird zusätzlich über posttranslationale Modifikationen beeinflusst. Über verschiedene Signaltransduktionswege wie Akt/Proteinkinase B, Proteinkinase A und AMPK kann es zur Phosphorylierung des Serin-Rests 1177 und so zur Aktivierung der eNOS kommen (Dimmeler et al. 1999; Fulton et al. 1999). Auch ein unterschiedlicher Phosphorylierungsstatus könnte der Grund für die unterschiedliche Endothelfunktion von Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen sein. Mit dem durchgeführten Western Blot-Versuche konnte jedoch gezeigt werden, dass unbehandelte Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse den gleichen Phosphorylierungs-Status der eNOS haben (**Abbildung 4-22**).

Ein interessanter Befund, der mit der besseren Endothelfunktion der *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich mit den Wildtyp-Mäusen in Zusammenhang gebracht werden kann, ist, dass OGG1 auch von anderen Arbeitsgruppen mit einer Regulation und Modulation von Entzündungsreaktionen in Verbindung gebracht wurde. So zeigten Mabley et al. (2005), dass OGG1-defiziente Tiere eine höhere Resistenz gegenüber einer durch das Endotoxin LPS induzierten, systemischen Inflammation haben. Außerdem sind die Tiere weniger sensitiv gegen eine, durch Streptozotocin ausgelöste, Diabetes Typ I-Erkrankung. Als drittes konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass die Knockout-Tiere im Gegensatz zu Wildtyp-Tieren, nach Behandlung mit Oxazolone eine weniger stark ausgeprägte Kontakthypersensitivität entwickelten.

Mit transgenen BigBlue® *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde gezeigt, dass die reparaturdefizienten Tiere durch eine chronische *H. pylori*-Infektion weniger schwerwiegende inflammatorische Läsionen entwickeln und die Mutationsfrequenz im Magen durch die Infektion weniger ansteigt als bei der Vergleichsgruppe mit Wildtyp-Tieren (Touati et al. 2006).

Auch in einem Modell der Entzündungen der Atemwege durch Ovalbumin stellte sich heraus, dass OGG1 die Entzündungsreaktion beeinflusst. So zeigten Li et al. (2012)

dass nach Sensibilisierung und Anregung mit Ovalbumin *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse, im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren, eine niedrigere Infiltration von inflammatorischen Zellen und weniger oxidativen Stress in den Lungen aufwiesen. In Zellkultur konnten sie zeigen, dass eine Herunterregulation von OGG1 durch si-RNA in kultivierten Epithel-Zellen nach Behandlung mit Hausstaubmilben-Extrakten die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies sowie IL4-Spiegel vermindert waren und TNF $\alpha$ -Spiegel erhöht waren.

Eine immunmodulierende Funktion wurde nicht nur von der DNA-Glycosylase OGG1 gezeigt. In Tieren mit Defizienz einer anderen DNA-Glykosylase, MuthY, zeigte sich ebenfalls eine verminderte Immunantwort. Eine Behandlung mit Dextran-Natriumsulfat induziert in Wildtyp-Tieren eine akute schwere Colitis Ulcerosa, wohingegen in den MuthY-defizienten Tieren die Läsionen deutlich schwächer ausfielen (Casorelli et al. 2010).

Um zu überprüfen, ob eine unterschiedliche Regulation inflammatorischer Gene oder Gene, die für den Redox-Status der Zelle verantwortlich sind, für die beobachtete bessere Endothelfunktion der *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse verantwortlich sein kann, wurde in den Aorten der Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen die Expression weiterer Gene untersucht. Über die analysierten Gene ist bekannt, dass die Expression von HO-1 in arteriosklerotischen Läsionen induziert wird (Wang et al. 1998). Nrf-2 hat einen pro-arteriosklerotischen Einfluss, was dadurch gezeigt werden konnte, dass NRF-2<sup>-/-</sup> ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse weniger Arteriosklerose entwickeln als Nrf-2 profiziente ApoE<sup>-/-</sup>-Mäuse (Barajas et al. 2011). Das Adhäsionsmolekül VCAM ist ebenfalls in die Pathogenese der Arteriosklerose involviert. Die Expression von VCAM kann schon früh in Schaumzellen detektiert werden und dient so als Biomarker (Cybulsky und Gimbrone 1991). Als weiteres Gen wurde die Expression von Nox4 untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass bei der altersabhängigen Verschlechterung der Endothelfunktion NADPH-Oxidasen, eine Rolle spielen (Trott et al. 2011), weswegen auch die Expression der Nox4 in der Aorta überprüft wurde.

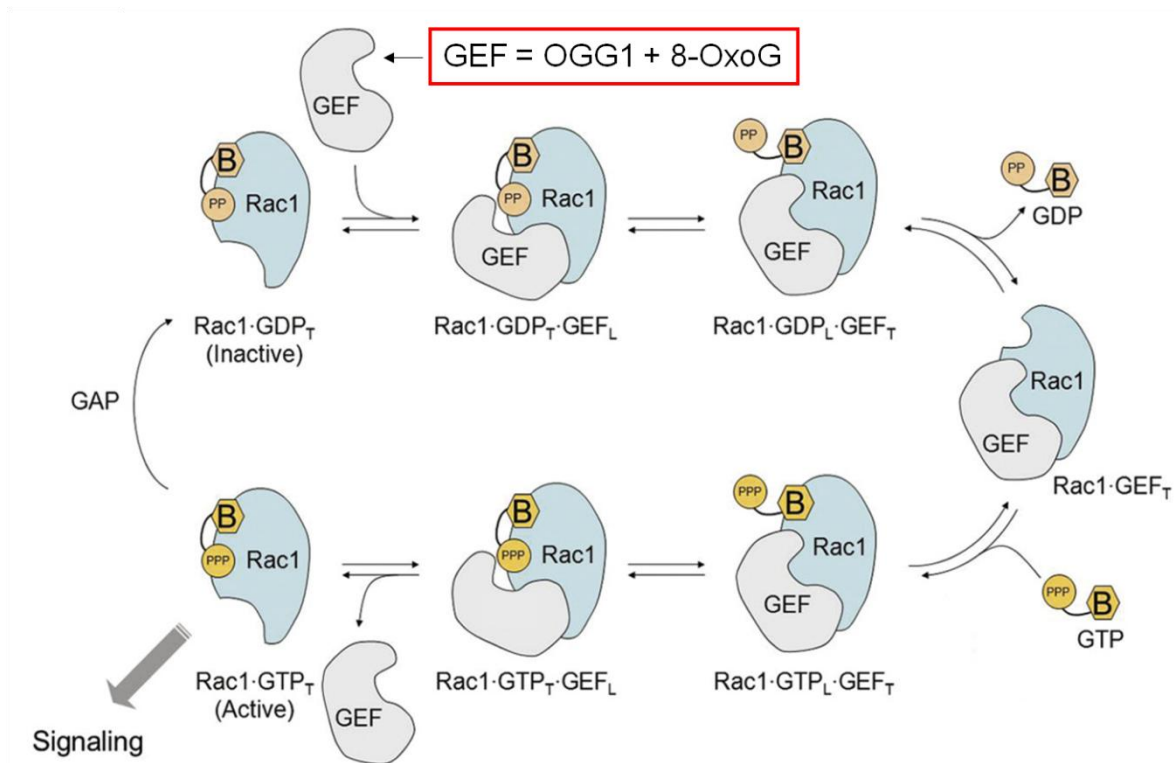
Bei keinem der untersuchten Gene konnte jedoch ein Unterschied zwischen der Aorta von Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen beobachtet werden (**Abb. 4-21**).

Molekularbiologisch gibt es verschiedene Beobachtungen, die sich mit diesem immunmodulierenden Effekt von OGG1 in Zusammenhang bringen lassen. Es wurde

gezeigt, dass OGG1 die herausgeschnittene Base 8-oxoG bindet und die kleine GTPase Ras aktiviert (Huh et al. 2012). Die Bindung von 8-oxoG an OGG1 ist sehr spezifisch, es wird keine andere Basenmodifikation wie FapyG oder oder 8-oxoA, oder das Nukleosid 8-oxodG von OGG1 gebunden. OGG1 zusammen mit 8-oxoG wirkt als Nukleotid-Austauschfaktor. Es bewirkt den Austausch von GTP gegen das von Ras gebundene GDP und bewirkt so dessen Aktivierung (Boldogh et al. 2012). Auch für das kleine G-Protein Rac gilt, dass es durch OGG1 in der Gegenwart von 8-oxoG aktiviert wird (Hajas et al. 2013). Rac ist an der zellulären Redox-Homöostase, durch Aktivierung von NADPH-Oxidasen beteiligt (Bedard und Krause 2007). Es wurde beschrieben, dass eine Behandlung mit 8-oxoG zur intrazellulären Generierung reaktiver Sauerstoffspezies durch die NADPH-Oxidase Nox4 führt. In Zellen mit verminderter OGG1-Expression war keine Induktion reaktiver Sauerstoffspezies durch 8-oxoG zu erkennen (Hajas et al. 2013).

**Abbildung 5-1** zeigt schematisch, wie OGG1 und sein gebundenes Substrat 8-oxoG als Nukleotid-Austauschfaktor für das kleine G-Protein Rac wirken und so zur Signaltransduktion führen.

Ras und Rac gehören zu der Gruppe kleiner G-Proteine und stehen in ihrer aktivierten Form zu Beginn einer ganzen Reihe intrazellulärer Signalkaskaden (Takai et al. 2001). Eine verminderte Aktivierung von Ras und Rac könnte die bessere Endothelfunktion der *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse erklären. Durch eine verminderte basale Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege werden Entzündungsmarker weniger stark exprimiert. Dies könnte zu einer besseren Endothelfunktion führen. Über Signalwege wie MEK/ERK, Akt/PKB, Jnk sowie JAK/STAT kommt es zu einer Umgestaltung der Gefäße (Ohtsu et al. 2006). Rac spielt womöglich auch bei der Generierung reaktiver Sauerstoffspezies und darauf folgend der Aktivierung reaktiver Sauerstoffspezies-sensitiver Kinasen eine Rolle (Ohtsu et al. 2006). Diese beschriebenen Wirkungen könnten also zu der beobachteten Verschlechterung der Endothelfunktion beitragen.



**Abbildung 5-1: Schematische Darstellung der Aktivierung des kleinen G-Proteins Rac durch OGG1 und seinem gebundenen Substrat 8-oxoG (modifiziert nach (Huh et al. 2012))**

## 5.5 Wie beeinflusst die Behandlung mit Angiotensin II die Endothelfunktion der Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen

Durch eine Untersuchung der Endothelfunktion von *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Behandlung mit Angiotensin II sollte es möglich sein einen immunmodulierenden Effekt von OGG1 genauer zu untersuchen. Wenn die bessere Endothelfunktion der *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse durch eine verminderte Aktivierung der kleinen G-Proteine Ras und Rac resultiert, kann dies durch die Angiotensin II-Behandlung untersucht werden. Hypertonie ist ein Risikofaktor für die Entstehung der Arteriosklerose. Dies kann durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch Angiotensin II erklärt werden. Gleichzeitig aktiviert Angiotensin II verschiedene Signaltransduktionswege. Diese Wirkungen könnten also eine OGG1-abhängige Verschlechterung der Endothelfunktion bewirken.

Das Ergebnis der Untersuchung der Endothelfunktion der Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigt, dass in den Wildtyp-Tieren keine Verschlechterung der Endothelfunktion durch Angiotensin II zu erkennen ist. In den *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäusen ist das Ergebnis nicht eindeutig. Nach Kontraktion der Aorta mit Noradrenalin ist die

Relaxation der Aorta, der mit Angiotensin II-behandelten Mäuse, bei niedrigen Acetylcholin-Konzentrationen der Relaxation der Gefäße der unbehandelten Tiere ähnlich. Bei höheren Acetylcholin-Konzentrationen jedoch zeigen die Aorten der Angiotensin II-behandelten Tiere eine verminderte Relaxation, also eine schlechtere Endothelfunktion. Ein solcher Unterschied zwischen Wildtyp- und *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse spricht für eine Rolle von durch Angiotensin II gebildete oxidativen DNA-Modifikationen bei der Entstehung der endothelialen Dysfunktion.

Ein wichtiger Beleg der Hypothese, dass oxidative DNA-Modifikationen kausal an der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt sind, wäre ein Nachweis, dass *Ogg1*<sup>-/-</sup>-Mäuse auch in der Aorta höhere Spiegel an oxidativen DNA-Modifikationen haben. Für die Alkalische Elution sind jedoch Einzelzell-Suspensionen und große Zellmengen notwendig, weswegen dieser Nachweis nicht durchgeführt werden konnte.

Eine immunmodulatorische Funktion von OGG1 konnte mit der Untersuchung der Endothelfunktion nach Angiotensin II-Behandlung nicht nachgewiesen werden. Das Ergebnis deutet eher auf eine Bestätigung der „Somatic Mutation“-Theorie hin.

Eine immunmodulatorische Funktion von OGG1 auf die kleinen G-Proteine könnte sich auch in der Niere nach der Behandlung mit Angiotensin II auswirken. Angiotensin II bewirkt in der Niere Hypertrophie, Migration und Entzündung (Ohtsu et al. 2006; Kaliappan et al. 2012). Dies wird über zahlreiche Signaltransduktionswege vermittelt (Savoia und Schiffrin 2006), wobei bekannt ist, dass Angiotensin II auch die kleine G-Proteine Rac und Ras aktiviert, demnach diese an den pathologischen Veränderungen in der Niere involviert sind. Mit diesem Hintergrund lassen sich die Daten der Untersuchung der Genexpression von Immunmarker in der Niere neu betrachten. Da jedoch in beiden Maus-Stämmen durch die Behandlung mit Angiotensin II keine Auswirkung auf die Genexpression zu erkennen ist, lässt sich auch kein möglicher immunmodulierender Effekt von OGG1 nachweisen (**Abbildung 4-12**).

## 5.6 Ausblick

Die Hypothese, dass Angiotensin II die Bildung oxidativer DNA-Schäden und Mutationen induziert, welche dann die beobachtete erhöhte Krebsinzidenz hypertensiver Menschen erklären, wurde mit den im Rahmen dieses Projekts



durchgeführten Versuchen nicht bestätigt. Um die Nachweisempfindlichkeit für die Entstehung von Mutationen durch Angiotensin II zu erhöhen, könnte eine längere hypertensive Phase von Vorteil sein. Dies wäre zum Beispiel mit einer Ren2-Ratte, einem transgenen Hypertonie-Modell, möglich. Durch Integration des Mutationsmarkers *lacI* könnte so der Einfluss einer längeren hypertensiven Phase mit dem BigBlue® Assay untersucht werden.

Die in dieser Arbeit völlig unerwartet gefundene bessere (statt schlechtere) Endothelfunktion in reparaturdefizienten (OGG1<sup>-/-</sup>) Mäusen spricht auch bei der Pathogenese der Arteriosklerose gegen eine kausale Rolle oxidativer DNA-Schäden und weist stattdessen auf eine neuartige, von der DNA-Reparatur unabhängige Funktion von OGG1 hin, zum Beispiel bei der Signaltransduktion entzündlicher Prozesse. Eine Bestätigung und genauere Charakterisierung einer solchen inflammatorischen bzw. immunmodulatorischen Rolle von OGG1 ist nicht nur von großem Interesse für das Verständnis von DNA-Reparaturproteinen, sondern könnte auch neue Wege weisen, die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion und damit ein frühes Stadium der Arteriosklerose durch Pharmaka zu beeinflussen.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alexander, R. W. (1995). "Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective." Hypertension **25**(2): 155-161.
- Applegate, L. A., Luscher, P. and Tyrrell, R. M. (1991). "Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells." Cancer Res **51**(3): 974-978.
- Aruoma, O. I., Kaur, H. and Halliwell, B. (1991). "Oxygen free radicals and human diseases." J R Soc Health **111**(5): 172-177.
- Asbert, M., Jimenez, W., Gaya, J., Gines, P., Arroyo, V., Rivera, F. and Rodes, J. (1992). "Assessment of the renin-angiotensin system in cirrhotic patients. Comparison between plasma renin activity and direct measurement of immunoreactive renin." J Hepatol **15**(1-2): 179-183.
- Autrup, H., Jorgensen, E. C. and Jensen, O. (1996). "Aflatoxin B1 induced lacI mutation in liver and kidney of transgenic mice C57BL/6N: effect of phorone." Mutagenesis **11**(1): 69-73.
- Ballmeier, D. (1997). „Oxidative DNA-Modifikationen durch extrazellulär und intrazellulär gebildete reaktive Sauerstoffspezies.“ Dissertation, Würzburg
- Barajas, B., Che, N., Yin, F., Rowshanrad, A., Orozco, L. D., Gong, K. W., Wang, X., Castellani, L. W., Reue, K., Lusis, A. J. and Araujo, J. A. (2011). "NF-E2-related factor 2 promotes atherosclerosis by effects on plasma lipoproteins and cholesterol transport that overshadow antioxidant protection." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(1): 58-66.
- Barnes, D. E. and Lindahl, T. (2004). "Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells." Annu Rev Genet **38**: 445-476.
- Barry-Lane, P. A., Patterson, C., van der Merwe, M., Hu Z., Holland, S. M., Yeh E. T. and Runge, M. S. (2001). "p47phox is required for atherosclerotic lesion progression in ApoE(-/-) mice." J Clin Invest **108**(10): 1513-1522.
- Bedard, K. and Krause, K. H. (2007). "The NOX family of reaktive Sauerstoffspezies-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology." Physiol Rev **87**(1): 245-313.
- Benditt, E. P. and Benditt, J. M. (1973). "Evidence for a monoclonal origin of human atherosclerotic plaques." Proc Natl Acad Sci U S A **70**(6): 1753-1756.

- Bhakat, K. K., Mokkaapati, S. K., Boldogh, I., Hazra, T. K. and Mitra, S. (2006). "Acetylation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by p300 and its role in 8-oxoguanine repair in vivo." Mol Cell Biol **26**(5): 1654-1665.
- Bjoras, M., Luna, L., Johnsen, B., Hoff, E., Haug, T., Rognes, T. and Seeberg, E. (1997). "Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites." EMBO J **16**(20): 6314-6322.
- Boiteux, S., O'Connor, T. R., Lederer, F., Gouyette, A. and Laval, J. (1990). "Homogeneous Escherichia coli Fpg protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/aprimidinic sites." J Biol Chem **265**(7): 3916-3922.
- Boldogh, I., Hajas, G., Aguilera-Aguirre, L., Hegde M. L., Radak, Z., Bacsi, A., Sur, S., Hazra, T. K. and Mitra, S. (2012). "Activation of ras signaling pathway by 8-oxoguanine DNA glycosylase bound to its excision product, 8-oxoguanine." J Biol Chem **287**(25): 20769-20773.
- Botto, N., Masetti, S., Petrozzi, L., Vassalle, C., Manfredi, S., Biagini, A. and Andreassi, M. G. (2002). "Elevated levels of oxidative DNA damage in patients with coronary artery disease." Coron Artery Dis **13**(5): 269-274.
- Bradley, M. O. and Kohn, K. W. (1979). "X-ray induced DNA double strand break production and repair in mammalian cells as measured by neutral filter elution." Nucleic Acids Res **7**(3): 793-804.
- Brand, S., Amann, K. and Schupp, N. (2013). "Angiotensin II-induced hypertension dose-dependently leads to oxidative stress and DNA damage in mouse kidneys and hearts." J Hypertens **31**(2): 333-344.
- Brands, M. W., Banes-Berceli, K., Inscho, E. W., Al-Azawi, H., Allen, A. J. and Labazi, H. (2010). "Interleukin 6 knockout prevents angiotensin II hypertension: role of renal vasoconstriction and janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 activation." Hypertension **56**(5): 879-884.
- Brosh, R. M., Jr. and Bohr, V. A. (2007). "Human premature aging, DNA repair and RecQ helicases." Nucleic Acids Res **35**(22): 7527-7544.
- Bulua, A. C., Simon, A., Maddipati, R., Pelletier, M., Park, H., Kim, K. Y., Sack, M. N., Kastner, D. L. and Siegel, R. M. (2011). "Mitochondrial reactive oxygen species promote production of proinflammatory cytokines and are elevated in TNFR1-associated periodic syndrome (TRAPS)." J Exp Med **208**(3): 519-533.
- Cai, H. and Harrison, D. G. (2000). "Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress." Circ Res **87**(10): 840-844.

- Caldecott, K. W. (2004). "DNA single-strand breaks and neurodegeneration." DNA Repair (Amst) **3**(8-9): 875-882.
- Caldecott, K. W. (2008). "Single-strand break repair and genetic disease." Nat Rev Genet **9**(8): 619-631.
- Casorelli, I., Pannellini, T., De Luca, G., Degan, P., Chiera, F., Iavarone, I., Giuliani, A., Butera, A., Boirivant, M., Musiani, P. and Bignami, M. (2010). "The Mutyh base excision repair gene influences the inflammatory response in a mouse model of ulcerative colitis." PLoS One **5**(8): e12070.
- Cheng, K. C., Cahill, D. S., Kasai, H., Nishimura, S. and Loeb, L. A. (1992). "8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions." J Biol Chem **267**(1): 166-172.
- Chung, I. M., Schwartz, S. M. and Murry, C. E. (1998). "Clonal architecture of normal and atherosclerotic aorta: implications for atherogenesis and vascular development." Am J Pathol **152**(4): 913-923.
- Collins, A. R. (2004). "The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations." Mol Biotechnol **26**(3): 249-261.
- Collins, A.R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C. C. and Stetina, R. (2008). "The comet assay: topical issues." Mutagenesis. **23**(3):143-51.
- Cooke, M. S., Evans, M. D., Dizdaroglu M. and Lunec, J. (2003). "Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease." FASEB J **17**(10): 1195-1214.
- Crabtree, M. J., Tatham, A. L., Hale, A. B., Alp, N. J. and Channon, K. M. (2009). "Critical role for tetrahydrobiopterin recycling by dihydrofolate reductase in regulation of endothelial nitric-oxide synthase coupling: relative importance of the de novo biopterin synthesis versus salvage pathways." J Biol Chem **284**(41): 28128-28136.
- Cybulsky, M. I. and Gimbrone, M. A. Jr. (1991). "Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis." Science **251**(4995): 788-791.
- D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva I. and Poirier, G. G. (1999). "Poly(ADP-ribose)ylation reactions in the regulation of nuclear functions." Biochem J **342** (Pt 2): 249-268.
- Dantzer, F., Luna, L., Bjoras, M. and Seeberg, E. (2002). "Human OGG1 undergoes serine phosphorylation and associates with the nuclear matrix and mitotic chromatin in vivo." Nucleic Acids Res **30**(11): 2349-2357.

- Davidovic, L., Vodenicharov, M., Affar, E. B. and Poirier, G. G. (2001). "Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism." Exp Cell Res **268**(1): 7-13.
- de Boer, J. G., Provost, S., Gorelick, N., Tindall, K. and Glickman, B. W. (1998). "Spontaneous mutation in lacI transgenic mice: a comparison of tissues." Mutagenesis **13**(2): 109-114.
- Dherin, C., Radicella, J. P., Dizdaroglu, M. and Boiteux, S. (1999). "Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human alpha-hOgg1 protein and the polymorphic alpha-hOgg1(Ser326Cys) protein which is frequently found in human populations." Nucleic Acids Res **27**(20): 4001-4007.
- Dikalova, A., Clempus, R., Lassegue, B., Cheng G., McCoy J., Dikalov S., San Martin A., Lyle A., Weber D. S., Weiss D., Taylor W. R., Schmidt H. H., Owens G. K., Lambeth J. D. and Griending, K. K. (2005). "Nox1 overexpression potentiates angiotensin II-induced hypertension and vascular smooth muscle hypertrophy in transgenic mice." Circulation **112**(17): 2668-2676.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse R. and Zeiher, A. M. (1999). "Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation." Nature **399**(6736): 601-605.
- Epe, B. (1996). "DNA damage profiles induced by oxidizing agents." Rev Physiol Biochem Pharmacol **127**: 223-249.
- Epe, B., Pflaum, M. and Boiteux, S. (1993). "DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems." Mutat Res **299**(3-4): 135-145.
- Epe, B. and Hegler, J. (1994). "Oxidative DNA damage: endonuclease fingerprinting." Methods Enzymol **234**: 122-131.
- Epe, B., Pflaum, M., Haring, M., Hegler, J. and Rudiger, H. (1993). "Use of repair endonucleases to characterize DNA damage induced by reactive oxygen species in cellular and cell-free systems." Toxicol Lett **67**(1-3): 57-72.
- Fazeli, G., Stopper, H., Schinzel, R., Ni, C. W., Jo, H. and Schupp, N. (2012). "Angiotensin II induces DNA damage via AT1 receptor and NADPH oxidase isoform Nox4." Mutagenesis **27**(6): 673-681.
- Fenech, M. (2000). "The in vitro micronucleus technique." Mutat Res **455**(1-2): 81-95.
- Förstermann, U. (2006). "Janus-faced role of endothelial NO synthase in vascular disease: uncoupling of oxygen reduction from NO synthesis and its pharmacological reversal." Biol Chem **387**(12): 1521-1533.

- Fortini, P., Parlanti, E., Sidorkina, O. M., Laval, J. and Dogliotti, E. (1999). "The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells." J Biol Chem **274**(21): 15230-15236.
- Frosina, G., Fortini, P., Rossi, O., Carrozzino, F., Raspaglio, G., Cox, L. S., Lane, D. P., Abbondandolo, A. and Dogliotti E. (1996). "Two pathways for base excision repair in mammalian cells." J Biol Chem **271**(16): 9573-9578.
- Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A. and Sessa, W. C. (1999). "Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt." Nature **399**(6736): 597-601.
- Fusser, M. (2010). „Einfluss von Resveratrol auf oxidative DNA-Schäden und Mutagenese *in vivo*“. Dissertation, Mainz
- Fusser, M., Nesse, G. J., Khobta, A., Xia, N., Li, H., Klungland, A. and Epe, B. (2011). "Spontaneous mutagenesis in *Csb(m/m)Ogg1(-)/(-)* mice is attenuated by dietary resveratrol." Carcinogenesis **32**(1): 80-85.
- Gallé, K., Fusser, M., Liebl, M., Clement, A. M. and Epe, B. (2013): Overexpression of human superoxide dismutase 1 prevents the accumulation of oxidative DNA base damage in *Csb m/m Ogg 1-/-* double knockout mice. unpublished data, Mainz
- Geiszt, M., Kopp, J. B., Varnai, P. und Leto, T. L. (2000). "Identification of renox, an NAD(P)H oxidase in kidney." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(14): 8010-8014.
- Gorelick, N. J., Andrews, J. L., deBoer, J. G., Young, R., Gibson, D. P. and Walker, V. E. (1999). "Tissue-specific mutant frequencies and mutational spectra in cyclophosphamide-treated *lacI* transgenic mice." Environ Mol Mutagen **34**(2-3): 154-166.
- Gorin, Y., Kim, N. H., Feliars, D., Bhandari, B., Choudhury, G. G. and Abboud, H. E. (2001). "Angiotensin II activates Akt/protein kinase B by an arachidonic acid/redox-dependent pathway and independent of phosphoinositide 3-kinase." FASEB J **15**(11): 1909-1920.
- Gray, K. and Bennett, M. (2011). "Role of DNA damage in atherosclerosis--bystander or participant?" Biochem Pharmacol **82**(7): 693-700.
- Graziewicz, M. A., Zastawny, T. H., Olinski, R., Speina, E., Siedlecki, J. and Tudek, B. (2000). "Fapyadenine is a moderately efficient chain terminator for prokaryotic DNA polymerases." Free Radic Biol Med **28**(1): 75-83.
- Grossman, E., Messerli, F. H., Boyko, V. and Goldbourt, U. (2002). "Is there an association between hypertension and cancer mortality?" Am J Med **112**(6): 479-486.

- Hajas, G., Bacsi, A., Aguilera-Aguirre, L., Hegde, M. L., Tapas, K. H., Sur, S., Radak, Z., Ba, X. and Boldogh, I. (2013). "8-Oxoguanine DNA glycosylase-1 links DNA repair to cellular signaling via the activation of the small GTPase Rac1." Free Radic Biol Med.
- Halliwell, B. and Aruoma, O. I. (1991). "DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems." FEBS Lett **281**(1-2): 9-19.
- Harman, D. (1956). "Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry." J Gerontol **11**(3): 298-300.
- Heeres, J. T. and Hergenrother, P. J. (2007). "Poly(ADP-ribose) makes a date with death." Curr Opin Chem Biol **11**(6): 644-653.
- Heinmoller, P. W., Hill K. A. and Sommer S. S. (2000). "High plating density improves Big Blue system efficiency without loss of sensitivity." Mutat Res **453**(1): 97-103.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G. and Schaper, F. (2003). "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation." Biochem J **374**(Pt 1): 1-20.
- Hengstler, J. G., Utesch, D., Steinberg, P., Platt, K. L., Diener, B., Ringel, M., Swales, N., Fischer, T., Biefang, K., Gerl, M., Bottger, T. and Oesch, F. (2000). "Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction." Drug Metab Rev **32**(1): 81-118.
- Hoeijmakers, J. H. (2001). "Genome maintenance mechanisms for preventing cancer." Nature **411**(6835): 366-374.
- Huh, J. Y., Son, D. J., Lee, Y., Lee, J., Kim, B., Lee, H. M., Jo, H., Choi, S., Ha, H. and Chung, M. H. (2012). "8-Hydroxy-2-deoxyguanosine prevents plaque formation and inhibits vascular smooth muscle cell activation through Rac1 inactivation." Free Radic Biol Med **53**(1): 109-121.
- Izumi, T., Hazra, T. K., Boldogh, I., Tomkinson, A. E., Park, M. S., Ikeda, S. and Mitra, S. (2000). "Requirement for human AP endonuclease 1 for repair of 3'-blocking damage at DNA single-strand breaks induced by reactive oxygen species." Carcinogenesis **21**(7): 1329-1334.
- Jaimes, E. A., Galceran, J. M. and Raji, L. (1998). "Angiotensin II induces superoxide anion production by mesangial cells." Kidney Int **54**(3): 775-784.
- Kaliappan, G., Nagarajan, P., Moorthy, R., Kalai Gana Selvi, S., Avinash Raj, T. and Mahesh Kumar, J. (2012). "Ang II induce kidney damage by recruiting

- inflammatory cells and up regulates PPAR gamma and Renin 1 gene: effect of beta carotene on chronic renal damage." J Thromb Thrombolysis.
- 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**(18): 18511-18520.
- Katsuyama, M. (2010). "NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme: its transcriptional regulation and physiological roles." J Pharmacol Sci **114**(2): 134-146.
- Kensler, T. W., Wakabayashi, N. and Biswal, S. (2007). "Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway." Annu Rev Pharmacol Toxicol **47**: 89-116.
- Kim, S. M., Kim, Y. G., Jeong, K. H., Lee, S. H., Lee, T. W., Ihm, C. G. and Moon, J. Y. (2012). "Angiotensin II-induced mitochondrial Nox4 is a major endogenous source of oxidative stress in kidney tubular cells." PLoS One **7**(7): e39739.
- Kitsera, N., Stathis, D., Luhnsdorf, B., Muller, H., Carell, T., Epe, B. and Khobta, A. (2011). "8-Oxo-7,8-dihydroguanine in DNA does not constitute a barrier to transcription, but is converted into transcription-blocking damage by OGG1." Nucleic Acids Res **39**(14): 5926-5934.
- Klungland, A. and Lindahl, T. (1997). "Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1)." EMBO J **16**(11): 3341-3348.
- Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T. and Barnes, D. E. (1999). "Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(23): 13300-13305.
- Kohn, K. W., Erickson, L. C., Ewig, R. A. and Friedman, C. A. (1976). "Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution." Biochemistry **15**(21): 4629-4637.
- Landmesser, U., Cai H., Dikalov, S., McCann, L., Hwang, J., Jo H., Holland, S. M. and Harrison, D. G. (2002). "Role of p47(phox) in vascular oxidative stress and hypertension caused by angiotensin II." Hypertension **40**(4): 511-515.
- Lassegue, B. and Griendling, K. K. (2010). "NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(4): 653-661.
- Lassegue, B., Sorescu, D., Szocs, K., Yin, Q., Akers, M., Zhang, Y., Grant, S. L., Lambeth, J. D. and Griendling, K. K. (2001). "Novel gp91(phox) homologues in vascular smooth muscle cells : nox1 mediates angiotensin II-induced



- superoxide formation and redox-sensitive signaling pathways." Circ Res **88**(9): 888-894.
- Li, G., Yuan, K., Yan, C., Fox, J., 3rd, Gaid, M., Breitwieser, W., Bansal, A. K., Zeng, H., Gao H. and Wu M. (2012). "8-Oxoguanine-DNA glycosylase 1 deficiency modifies allergic airway inflammation by regulating STAT6 and IL-4 in cells and in mice." Free Radic Biol Med **52**(2): 392-401.
- Lindahl, T., Satoh, M. S., Poirier, G. G. and Klungland, A. (1995). "Post-translational modification of poly(ADP-ribose) polymerase induced by DNA strand breaks." Trends Biochem Sci **20**(10): 405-411.
- Mabley, J. G., Pacher, P., Deb, A., Wallace, R., Elder, R. H. and Szabo, C. (2005). "Potential role for 8-oxoguanine DNA glycosylase in regulating inflammation." FASEB J **19**(2): 290-292.
- Martinet, W., Knaapen, M. W., De Meyer, G. R., Herman, A. G. and Kockx, M. M. (2002). "Elevated levels of oxidative DNA damage and DNA repair enzymes in human atherosclerotic plaques." Circulation **106**(8): 927-932.
- Martyn, K. D., Frederick, L. M., von Loehneysen, K., Dinauer, M. C. and Knaus, U. G. (2006). "Functional analysis of Nox4 reveals unique characteristics compared to other NADPH oxidases." Cell Signal **18**(1): 69-82.
- Mates, J. M., Perez-Gomez, C. and Nunez de Castro, I. (1999). "Antioxidant enzymes and human diseases." Clin Biochem **32**(8): 595-603.
- Matsumoto, Y. and Kim, K. (1995). "Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair." Science **269**(5224): 699-702.
- Mazza, F., Goodman, A., Lombardo, G., Vanella, A. and Abraham, N. G. (2003). "Heme oxygenase-1 gene expression attenuates angiotensin II-mediated DNA damage in endothelial cells." Exp Biol Med (Maywood) **228**(5): 576-583.
- McCord, J. M. and Fridovich, I. (1969). "Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein)." J Biol Chem **244**(22): 6049-6055.
- McCullough, A. K., Sanchez, A., Dodson, M. L., Marapaka, P., Taylor, J. S. and Lloyd, R. S. (2001). "The reaction mechanism of DNA glycosylase/AP lyases at abasic sites." Biochemistry **40**(2): 561-568.
- McGoldrick, J. P., Yeh, Y. C., Solomon, M., Essigmann, J. M. and Lu, A. L. (1995). "Characterization of a mammalian homolog of the Escherichia coli MutY mismatch repair protein." Mol Cell Biol **15**(2): 989-996.
- Mercer, J. R., Cheng, K. K., Figg, N., Gorenne, I., Mahmoudi, M., Griffin, J., Vidal-Puig, A., Logan, A., Murphy, M. P. and Bennett, M. (2010). "DNA damage links mitochondrial dysfunction to atherosclerosis and the metabolic syndrome." Circ Res **107**(8): 1021-1031.

- Nakamura, A., Sedelnikova, O. A., Redon, C., Pilch, D. R., Sinogeeva, N. I., Shroff, R., Lichten, M. and Bonner, W. M. (2006). "Techniques for gamma-H2AX detection." Methods Enzymol **409**: 236-250.
- Nishida, M., Ishikawa, T., Saiki, S., Sunggip, C., Aritomi, S., Harada, E., Kuwahara, K., Hirano, K., Mori, Y. and Kim-Mitsuyama, S. (2013). "Voltage-dependent N-type Ca<sup>2+</sup> channels in endothelial cells contribute to oxidative stress-related endothelial dysfunction induced by angiotensin II in mice." Biochem Biophys Res Commun **434**(2): 210-216.
- Nishikawa, A., Furukawa, F., Kasahara, K., Lee, I. S., Suzuki, T., Hayashi, M., Sofuni, T. and Takahashi, M. (1997). "Comparative study on organ-specificity of tumorigenicity, mutagenicity and cell proliferative activity induced by dimethylnitrosamine in Big Blue mice." Cancer Lett **117**(2): 143-147.
- Oei, S. L. and Ziegler, M. (2000). "ATP for the DNA ligation step in base excision repair is generated from poly(ADP-ribose)." J Biol Chem **275**(30): 23234-23239.
- Ohtsu, H., Suzuki, H., Nakashima, H., Dhobale, S., Frank, G. D., Motley, E. D. and Eguchi, S. (2006). "Angiotensin II signal transduction through small GTP-binding proteins: mechanism and significance in vascular smooth muscle cells." Hypertension **48**(4): 534-540.
- Okano, S., Lan, L., Caldecott, K. W., Mori, T. and Yasui, A. (2003). "Spatial and temporal cellular responses to single-strand breaks in human cells." Mol Cell Biol **23**(11): 3974-3981.
- Osterod, M., Hollenbach, S., Hengstler, J. G., Barnes, D. E., Lindahl, T. and Epe, B. (2001). "Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1) deficient mice." Carcinogenesis **22**(9): 1459-1463.
- Paizis, G., Cooper, M. E., Schembri, J. M., Tikellis, C., Burrell, L. M. and Angus, P. W. (2002). "Up-regulation of components of the renin-angiotensin system in the bile duct-ligated rat liver." Gastroenterology **123**(5): 1667-1676.
- Papparella, I., Ceolotto, G., Lenzini, L., Mazzoni, M., Franco, L., Sartori, M., Ciccariello, L. and Semplicini, A. (2005). "Angiotensin II-induced over-activation of p47phox in fibroblasts from hypertensives: which role in the enhanced ERK1/2 responsiveness to angiotensin II?" J Hypertens **23**(4): 793-800.
- Parola, M. and Robino, G. (2001). "Oxidative stress-related molecules and liver fibrosis." J Hepatol **35**(2): 297-306.
- Parsons, J. L. and Dianov, G. L. (2013). "Co-ordination of base excision repair and genome stability." DNA Repair (Amst) **12**(5): 326-333.

- Pascucci, B., Maga, G., Hubscher, U., Bjoras, M., Seeberg, E., Hickson, I. D., Villani, G., Giordano, C., Cellai, L. and Dogliotti, E. (2002). "Reconstitution of the base excision repair pathway for 7,8-dihydro-8-oxoguanine with purified human proteins." Nucleic Acids Res **30**(10): 2124-2130.
- Pflaum, M. (1996). „Oxidative DNA-Modifikationen durch langwelliges UV-Licht und sichtbares Licht." Dissertation, Pharmakologie & Toxikologie, Universität Würzburg.
- Poirier, G. G., de Murcia, G., Jongstra-Bilen, J., Niedergang, C. and Mandel, P. (1982). "Poly(ADP-ribosyl)ation of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure." Proc Natl Acad Sci U S A **79**(11): 3423-3427.
- Rass, U., Ahel, I. and West, S. C. (2007). "Defective DNA repair and neurodegenerative disease." Cell **130**(6): 991-1004.
- Robertson, A. B., Klungland, A., Rognes, T. and Leiros, I. (2009). "DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it." Cell Mol Life Sci **66**(6): 981-993.
- Russo, M. T., De Luca, G., Degan, P., Parlanti, E., Dogliotti, E., Barnes, D. E., Lindahl, T., Yang, H., Miller, J. H. and Bignami, M. (2004). "Accumulation of the oxidative base lesion 8-hydroxyguanine in DNA of tumor-prone mice defective in both the Myh and Ogg1 DNA glycosylases." Cancer Res **64**(13): 4411-4414.
- Ryter, S. W. and Choi, A. M. (2009). "Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy." Am J Respir Cell Mol Biol **41**(3): 251-260.
- Sachse, A. und Wolf, G. (2007). "Angiotensin II-induced reactive oxygen species and the kidney." J Am Soc Nephrol **18**(9): 2439-2446.
- Sakamoto, K., Tominaga, Y., Yamauchi K., Nakatsu, Y., Sakumi, K., Yoshiyama, K., Egashira, A., Kura, S., Yao, T., Tsuneyoshi, M., Maki, H., Nakabeppu, Y. and Tsuzuki, T. (2007). "MUTYH-null mice are susceptible to spontaneous and oxidative stress induced intestinal tumorigenesis." Cancer Res **67**(14): 6599-6604.
- Savoia, C. and Schiffrin, E. L. (2006). "Inflammation in hypertension." Curr Opin Nephrol Hypertens **15**(2): 152-158.
- Schmid, U., Stopper, H., Schweda, F., Queisser, N. and Schupp, N. (2008). "Angiotensin II induces DNA damage in the kidney." Cancer Res **68**(22): 9239-9246.
- Schupp, N., Schmid, U., Rutkowski, P., Lakner, U., Kanase, N., Heidland, A. and Stopper, H. (2007). "Angiotensin II-induced genomic damage in renal cells can

- be prevented by angiotensin II type 1 receptor blockage or radical scavenging." Am J Physiol Renal Physiol **292**(5): F1427-1434.
- Sedelnikova, O. A., Redon, C. E., Dickey, J. S., Nakamura, A. J., Georgakilas, A. G. and Bonner, W. M. (2010). "Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis." Mutat Res **704**(1-3): 152-159.
- Sen, C. K. and Packer, L. (1996). "Antioxidant and redox regulation of gene transcription." FASEB J **10**(7): 709-720.
- Seshiah, P. N., Weber, D. S., Rocic, P., Valppu, L., Taniyama, Y. and Griendling, K. K. (2002). "Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators." Circ Res **91**(5): 406-413.
- Shi, Y., Lo, C. S., Chenier, I., Maachi, H., Filep, J. G., Ingelfinger, J. R., Zhang, S. L. and Chan, J. S. (2013). "Overexpression of catalase prevents hypertension and tubulointerstitial fibrosis and normalization of renal angiotensin-converting enzyme-2 expression in Akita mice." Am J Physiol Renal Physiol **304**(11): F1335-1346.
- Sies, H. (1993). "Strategies of antioxidant defense." Eur J Biochem **215**(2): 213-219.
- Sinha, B. K., Katki, A. G., Batist, G., Cowan, K. H. and Myers, C. E. (1987). "Adriamycin-stimulated hydroxyl radical formation in human breast tumor cells." Biochem Pharmacol **36**(6): 793-796.
- Sobol, R. W., Prasad, R., Evenski, A., Baker, A., Yang, X. P., Horton, J. K. and Wilson, S. H. (2000). "The lyase activity of the DNA repair protein beta-polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity." Nature **405**(6788): 807-810.
- Steckelings, U. Kaschina, M., E. and Unger, T. (2005). "The AT2 receptor--a matter of love and hate." Peptides **26**(8): 1401-1409.
- Su Y. and Swift, M. (2000). "Mortality rates among carriers of ataxia-telaniectasia mutant alleles". Ann Intern Med **133**; 770-778
- Takai, Y., Sasaki, T. and Matozaki, T. (2001). "Small GTP-binding proteins." Physiol Rev **81**(1): 153-208.
- Tanifuji, C., Suzuki, Y., Geot, W. M., Horikoshi, S., Sugaya, T., Ruiz-Ortega, M., Egido, J. and Tomino, Y. (2005). "Reactive oxygen species-mediated signaling pathways in angiotensin II-induced MCP-1 expression of proximal tubular cells." Antioxid Redox Signal **7**(9-10): 1261-1268.
- Theuer, J., Dechend, R., Muller, D. N., Park, J. K., Fiebeler, A., Barta, P., Ganten, D., Haller, H., Dietz, R. and Luft, F. C. (2002). "Angiotensin II induced inflammation in the kidney and in the heart of double transgenic rats." BMC Cardiovasc Disord **2**: 3.

- Touati, E., Michel V., Thiberge J. M., Ave P., Huerre M., Bourgade F., Klungland A. and Labigne A. (2006). "Deficiency in OGG1 protects against inflammation and mutagenic effects associated with *H. pylori* infection in mouse." Helicobacter **11**(5): 494-505.
- Touyz, R. M. and Berry, C. (2002). "Recent advances in angiotensin II signaling." Braz J Med Biol Res **35**(9): 1001-1015.
- Trosko, J. E. and Chang, C. C. (1980). "An integrative hypothesis linking cancer, diabetes and atherosclerosis: the role of mutations and epigenetic changes." Med Hypotheses **6**(5): 455-468.
- Trott, D. W., Seawright, J. W., Luttrell, M. J. and Woodman, C. R. (2011). "NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species contribute to age-related impairments of endothelium-dependent dilation in rat soleus feed arteries." J Appl Physiol **110**(5): 1171-1180.
- Van Buul, J. D., Fernandez-Borja, M., Anthony, E. C. and Hordijk, P. L. (2005). "Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells." Antioxid Redox Signal **7**(3-4): 308-317.
- Wang, L. J., Lee, T. S., Lee, F. Y., Pai, R. C. and Chau, L. Y. (1998). "Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions." Am J Pathol **152**(3): 711-720.
- Warnholtz, A., Nickenig, G., Schulz, E., Macharzina, R., Brasen, J. H., Skatchkov, M., Heitzer, T., Stasch, J. P., Griendling, K. K., Harrison, D. G., Bohm, M., Meinertz, T. and Munzel, T. (1999). "Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system." Circulation **99**(15): 2027-2033.
- Weitzman, S. A. and Gordon, L. I. (1990). "Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis." Blood **76**(4): 655-663.
- Whitehouse, C. J., Taylor, R. M., Thistlethwaite, A., Zhang, H., Karimi-Busheri, F., Lasko, D. D., Weinfeld, M. and Caldecott, K. W. (2001). "XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair." Cell **104**(1): 107-117.
- Will, O., Gocke, E., Eckert, I., Schulz, I., Pflaum, M., Mahler, H. C. and Epe, B. (1999). "Oxidative DNA damage and mutations induced by a polar photosensitizer, Ro19-8022." Mutat Res **435**(1): 89-101.
- Wingler, K., Wunsch, S., Kreutz, R., Rothermund, L., Paul, M. and Schmidt, H. H. (2001). "Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo." Free Radic Biol Med **31**(11): 1456-1464.

- Yang, W., Zhang, J., Wang, H., Gao, P., Singh, M., Shen, K. and Fang, N. (2011). "Angiotensin II downregulates catalase expression and activity in vascular adventitial fibroblasts through an AT1R/ERK1/2-dependent pathway." Mol Cell Biochem **358**(1-2): 21-29.
- Zalba, G., Beaumont, F. J., San Jose, G., Fortuno, A., Fortuno, M. A., Etayo, J. C. and Diez, J. (2000). "Vascular NADH/NADPH oxidase is involved in enhanced superoxide production in spontaneously hypertensive rats." Hypertension **35**(5): 1055-1061.
- Zhou, W. and Doetsch, P. W. (1993). "Effects of abasic sites and DNA single-strand breaks on prokaryotic RNA polymerases." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(14): 6601-6605.

## 7 Lebenslauf