

# Untersuchung der DNA-Reparatur in humanen Lymphozyten

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

Carina von der Lippen, geb. Reiche

geb. in Rostock

Mainz, 2014

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung:

D77

*Our greatest weakness lies in giving up.  
The most certain way to succeed is always to try just one more time.*

Thomas Alva Edison (1847-1931)



# DANKSAGUNG



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>IMMUNSYSTEM</b>	<b>4</b>
1.1.1	LYMPHOZYTEN	5
1.1.2	AKTIVIERUNG VON T-LYMPHOZYTEN	6
1.1.3	AKTIVIERUNG VON T-LYMPHOZYTEN MIT PHYTOHÄMAGGLUTININ	8
<b>1.2</b>	<b>REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES UND OXIDATIVER STRESS</b>	<b>9</b>
1.2.1	ENDOGENE QUELLEN REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES	10
1.2.2	MECHANISMEN ZUR ABWEHR REAKTIVER SAUERSTOFFSPEZIES	12
<b>1.3</b>	<b>OXIDATIVE DNA-SCHÄDEN UND IHRE KONSEQUENZEN</b>	<b>13</b>
<b>1.4</b>	<b>GENERIERUNG ZELLULÄRER DNA-SCHÄDEN IN VITRO</b>	<b>15</b>
1.4.1	ACRIDINORANGE	15
1.4.2	WASSERSTOFFPEROXID (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	15
1.4.3	UV-B-STRAHLUNG	16
<b>1.5</b>	<b>DNA REPARATURMECHANISMEN</b>	<b>16</b>
1.5.1	DIREKTE DNA-REPARATUR (SCHADENSREVERSION)	17
1.5.2	BASENEXZISIONSREPARATUR (BER)	18
1.5.2.1	OGG1	20
1.5.3	NUKLEOTIDEXZISIONSREPARATUR (NER)	21
1.5.4	EINZELSTRANGBRUCHREPARATUR	23
1.5.5	POSTREPLIKATIVE REPARATUR (MISMATCH REPARATUR)	23
1.5.6	DOPPELSTRANGBRUCHREPARATUR	24
<b>1.6</b>	<b>DNA-REPARATUR IN HUMANEN LYMPHOZYTEN</b>	<b>24</b>
1.6.1	BASENEXZISIONSREPARATUR IN HUMANEN LYMPHOZYTEN	25
1.6.2	VERGLEICH DER DNA-REPARATUR IN PRIMÄREN UND PHA-STIMULIERTEN LYMPHOZYTEN	26
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>29</b>
<b>3.1</b>	<b>MATERIAL</b>	<b>29</b>
3.1.1	GERÄTE	29
3.1.2	SOFTWARE	31
3.1.3	VERBRAUCHSMATERIALIEN	32
3.1.4	CHEMIKALIEN	33
3.1.5	KINASEINHIBITOREN	35

3.1.6	KITS	35
3.1.7	ENZYME	35
3.1.8	DNA, MARKER & LADEPUFFER	36
3.1.9	PRIMER	36
3.1.10	ANTIKÖRPER & PROTEINMARKER	37
3.1.11	ZELLINIEN	38
3.1.11.1	Primäre humane Lymphozyten	38
3.1.11.2	PHA-stimulierte Lymphozyten	38
3.1.11.3	EBV-transformierte Lymphozyten	38
3.1.12	PUFFER, LÖSUNGEN & MEDIEN	39
3.1.12.1	Zellkultur	39
3.1.12.2	Stimulation primäre Lymphozyten mittels Phytohämagglutinin	39
3.1.12.3	Zellzyklusbestimmung	39
3.1.12.4	Alkalische Elution	39
3.1.12.5	DNA-Schadensinduktion (für Alkalische Elution)	40
3.1.12.6	PM <sub>2</sub> -Relaxationsassay	41
3.1.12.7	Western Blot	41
3.1.12.8	Quantitative RT-PCR	43
<b>3.2</b>	<b>METHODEN</b>	<b>44</b>
3.2.1	ZELLKULTUR	44
3.2.1.1	Kultur von humanen Lymphozyten	44
3.2.1.2	Kryokonservierung und Auftauen von humanen Lymphozyten	44
3.2.1.3	Zellzahlbestimmung	45
3.2.2	LYMPHOZYTENISOLATION	45
3.2.2.1	Lymphozytenisolation aus Buffy Coats	45
3.2.2.2	Lymphozytenisolation aus EDTA-Blut	46
3.2.3	STIMULATION PRIMÄRER LYMPHOZYTEN MITTELS PHYTOHÄMAGGLUTININ	47
3.2.4	BESTIMMUNG DER PROLIFERATION VON LYMPHOZYTEN	47
3.2.4.1	Prinzip	47
3.2.4.2	Durchführung	48
3.2.5	BESTIMMUNG DER VITALITÄT VON LYMPHOZYTEN	48
3.2.5.1	Prinzip	48
3.2.5.2	Durchführung	48
3.2.6	ZELLZYKLUSBESTIMMUNG	49
3.2.6.1	Prinzip	49
3.2.6.2	Durchführung	49
3.2.7	DIFFERENZIERUNG VON BLUTZELLEN	50
3.2.7.1	Prinzip	50
3.2.7.2	Durchführung	50



---

3.2.8	ALKALISCHE ELUTION	51
3.2.8.1	Prinzip	51
3.2.8.2	Versuchsaufbau und Vorbereitungen	52
3.2.8.3	Durchführung (Zellyse, Enzyminkubation und Elution)	53
3.2.8.4	Auswertung, (Quantifizierung und Berechnung des DNA-Schadens)	54
3.2.9	BEHANDLUNG DER LYMPHOZYTEN FÜR DIE ALKALISCHE ELUTION	55
3.2.9.1	Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Anwesenheit von Acridinorange	56
3.2.9.2	Bestrahlung mit UV-B	56
3.2.9.3	Behandlung mit H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	57
3.2.10	PM2-RELAXATIONSASSAY	58
3.2.10.1	Prinzip	58
3.2.10.2	Durchführung	59
3.2.11	WESTERN BLOTTING – BESTIMMUNG DES OGG1-PROTEINGEHALTES IN HUMANEN LYMPHOZYTEN	61
3.2.11.1	Prinzip	61
3.2.11.2	Durchführung	61
3.2.12	BEHANDLUNG PRIMÄRER LYMPHOZYTEN MIT PHA UND KINASEINHIBITOREN ZUR BESTIMMUNG DER OGG1 mRNA LEVEL	63
3.2.13	BESTIMMUNG DER GENEXPRESSION VON OGG1 IN HUMANEN LYMPHOZYTEN MITTELS QUANTITATIVER RT-PCR	64
3.2.13.1	Prinzip	64
3.2.13.2	RNA-Isolation	64
3.2.13.3	Überprüfung der RNA-Qualität	65
3.2.13.4	Reverse Transkription	66
3.2.13.5	Optimierung der PCR-Bedingungen für spezifische Primer	67
3.2.13.6	Quantitative RT-PCR	68
3.2.13.7	Auswertung	70
<b>3.3</b>	<b>STATISTIK</b>	<b>70</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>71</b>
<b>4.1</b>	<b>CHARAKTERISIERUNG DER VERWENDETEN PRIMÄREN HUMANEN LYMPHOZYTEN</b>	<b>71</b>
4.1.1	CHARAKTERISIERUNG PRIMÄRER HUMANER LYMPHOZYTEN MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE	71
4.1.2	VITALITÄT PRIMÄRER HUMANER LYMPHOZYTEN	73
4.1.3	INTER- UND INTRAINDIVIDUELLE SCHWANKUNGEN BASALER SPIEGEL VON OXIDATIVEN DNA-SCHÄDEN UND EINZELSTRANGBRÜCHEN IN PRIMÄREN HUMANEN LYMPHOZYTEN	74
<b>4.2</b>	<b>UNTERSUCHUNGEN ZUM EFFEKT DER PHA-STIMULATION IN HUMANEN LYMPHOZYTEN</b>	<b>77</b>
4.2.1	ÄNDERUNG DES FSC UND SSC IM DURCH PHA-STIMULATION	77
4.2.2	ÄNDERUNG DES ZELLYKLUS DURCH PHA-STIMULATION	78
4.2.3	EINFLUSS DER PHA-STIMULATION AUF DIE PROLIFERATION PRIMÄRER LYMPHOZYTEN	80

4.2.4	EINFLUSS DER PHA-STIMULATION AUF DIE VITALITÄT PRIMÄRER LYMPHOZYTEN	81
4.2.5	EINFLUSS DER PHA-STIMULATION AUF BASALE OXIDATIVE DNA-SCHÄDEN SOWIE EINZELSTRANGBRÜCHE	82
<b>4.3</b>	<b>INDUKTION UND REPARATUR OXIDATIVER BASENMODIFIKATIONEN NACH ACRIDINORANGE UND LICHT</b>	<b>85</b>
4.3.1	SCHADENSPROFIL IN PM <sub>2</sub> DNA	85
4.3.2	SCHADENSINDUKTION VON ACRIDINORANGE UND SICHTBAREM LICHT IN HUMANEN LYMPHOZYTEN	87
4.3.3	EINFLUSS DER SCHADENSINDUKTION DURCH ACRIDINORANGE UND SICHTBARES LICHT AUF DIE VITALITÄT	93
4.3.4	REPARATUR OXIDATIVER DNA-SCHÄDEN INDUZIERT DURCH ACRIDINORANGE UND SICHTBARES LICHT	94
<b>4.4</b>	<b>EINFLUSS DER PHA-STIMULATION AUF DIE EXPRESSION VON OGG1</b>	<b>96</b>
4.4.1	EINFLUSS DER PHA-STIMULATION AUF DIE PROTEINMENGE VON OGG1	96
4.4.2	EINFLUSS DER PHA-STIMULATION AUF DIE MRNA-SPIEGEL VON OGG1	98
4.4.3	EINFLUSS VON MAP-KINASEN AUF DIE INDUKTION DER OGG1-EXPRESSION NACH PHA-STIMULATION	100
4.4.4	EINFLUSS DER INHIBITION VON JNK AUF DIE INDUKTION DER OGG1 PROTEIN-EXPRESSION NACH PHA-STIMULATION	105
4.4.5	EINFLUSS EINER JNK-INHIBITION AUF DIE BINDUNG DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS NF-YA AN DEN OGG1-PROMOTOR	106
<b>4.5</b>	<b>INDUKTION UND REPARATUR VON EINZELSTRANGBRÜCHEN IN LYMPHOZYTEN NACH H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-BEHANDLUNG</b>	<b>108</b>
4.5.1	SCHADENSINDUKTION DURCH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> IN HUMANEN LYMPHOZYTEN	108
4.5.2	REPARATUR VON DURCH H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> INDUZIERTEN EINZELSTRANGBRÜCHEN	109
<b>4.6</b>	<b>INDUKTION UND REPARATUR VON CPDS IN LYMPHOZYTEN NACH UV-B-BESTRAHLUNG</b>	<b>111</b>
4.6.1	SCHADENSINDUKTION DURCH UV-B STRAHLUNG IN HUMANEN LYMPHOZYTEN	111
4.6.2	EINFLUSS DER SCHADENSINDUKTION DURCH UV-B STRAHLUNG AUF DIE VITALITÄT	112
4.6.3	REPARATUR OXIDATIVER DNA-SCHÄDEN INDUZIERT UV-B STRAHLUNG	113
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>115</b>
<b>5.1</b>	<b>HAT EINE PHA-STIMULATION HUMANER LYMPHOZYTEN EINFLUSS AUF BASALE OXIDATIVE DNA-SCHÄDEN?</b>	<b>115</b>
<b>5.2</b>	<b>BEEINFLUSST EINE PHA-STIMULATION DIE REPARATUR OXIDATIVER DNA-SCHÄDEN IN HUMANEN LYMPHOZYTEN?</b>	<b>117</b>
<b>5.3</b>	<b>WELCHE MECHANISMEN LIEGEN EINER BESCHLEUNIGTEN REPARATUR OXIDATIVER DNA-SCHÄDEN NACH PHA-STIMULATION ZU GRUNDE?</b>	<b>120</b>

---

5.4	WELCHE MECHANISMEN BEDINGEN EINE ÄNDERUNG DER OGG1 EXPRESSION NACH PHA-STIMULATION?	121
5.5	GIBT ES WEITERE DNA-REPARATURWEGE, DIE UNTERSCHIEDE IN PRIMÄREN UND PHA-STIMULIERTEN LYMPHOZYTEN AUFWEISEN?	124
6	ZUSAMMENFASSUNG	127
7	LITERATURVERZEICHNIS	129
8	LEBENS LAUF	147

---

## Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
AO	Acridinorange
AP-1	<i>activator protein 1</i>
AP4	<i>activator protein 4</i>
AP-Läsion	Apurinische/apyrimidinische Stelle in der DNA
APE1	AP-Endonuklease 1
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BER	Basenexzisionsreparatur
Bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (4 oder 8)
Cen2	Centrin 2
CPD	Cyclobutanpyrimidin-Dimer
CRAC-Kanäle	<i>Ca<sup>2+</sup> release-activated Ca<sup>2+</sup> channels</i>
CSA (ERCC8)	<i>Cockayne syndrome protein A</i>
CSB (ERCC6)	<i>Cockayne syndrome protein B</i>
DAG	Diacylglycerol
DAR	<i>differentiation associated repair</i> oder <i>transcription domain-associated repair</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Elk-1	<i>ETS domain-containing protein</i>
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
Facs	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAPY	Formamidopyrimidin
FCS	fetales Kälberserum

---

FEN1	Flap-Endonuklease 1
Fyn	Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinase
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
FSC	<i>forward scatter</i>
GGR	<i>global genome repair</i>
GSH	Glutathion
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
HR	Homologe Rekombination
HR23B	<i>human homolog of yeast Rad23</i>
IκB	<i>inhibitor of kappa B</i>
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
JNK	c-Jun N-terminal Kinasen
LAT	<i>linker of activation in T cells</i>
Lck	Leukozyten-spezifische Tyrosinkinase (Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinase)
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinasen
MBD4	Methyl-CpG-binding domain protein 4
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Klasse I und II)
min	Minute(n)
MMS	Methylmethansulfonat
MPG	DNA-3-Methyladenin Glykosylase
mRNA	(messenger-) Ribonukleinsäure
mTor	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
MW	Mittelwert
MYH	MUTYH Glykosylase
NEHJ	Nicht-homologes Endjoining
NEIL1, 2 und 3	Endonuklease VIII-like 1, 2 und 3 Enzym
NER	Nukleotidexcisionsreparatur
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>

---

NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NF-YA	nukleärer Transkriptionsfaktor Y, Untereinheit A
Nrf2	<i>nuclear respiratory factor 2</i>
NTHL1	Endonuklease III-like Enzym
NTS	nicht transkribierter Strang
OGG1	8-Hydroxyguanin-DNA-Glykosylase
8-oxoG (8-Hydroxyguanin)	7,8-Dihydro-8-oxoguanin
p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PHA	Phytohämagglutinin
PI3K	Phosphoinositidkinase 3
PIP2	Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol	Polymerase
Raf	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i> oder <i>rat fibrosarcoma</i> (Proteinkinase)
Ras	<i>Rat sarcoma</i> (G-Protein)
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkription bzw. Transkriptase
SD	<i>standard deviation</i> (Standardabweichung)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSB	Einzelstrangbruch (single-strand break)
SSC	<i>side scatter</i>
SMUG1	<i>Single-strand selective monofunctional uracil DNA glycosylase</i>
SOD	Superoxiddismutase
TCR	<i>transcription coupled repair</i>
TDG	Thymin-DNA-Glykosylase
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid
T4EndoV	T4-Endonuklease V
TFIIH	Transkriptionsfaktor IIH
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol

---

TS	transkribierter Strang
TZR	T-Zell-Rezeptor
U/min	Umdrehungen pro Minute
UNG2	nukleäre Uracil-DNA-Glykosylase
UV	Ultraviolettes Licht
UV-DDB	<i>UV-damaged DNA binding</i>
VIS	sichtbares Licht (visible light)
XPC	Xeroderma Pigmentosum Protein C
XRRC1	<i>X-ray repair cross-complementing protein 1</i>
Zap-70	<i>ζ-chain-associated protein kinase of 70 kDa</i> (Rezeptor-assozierte Tyrosinkinase)





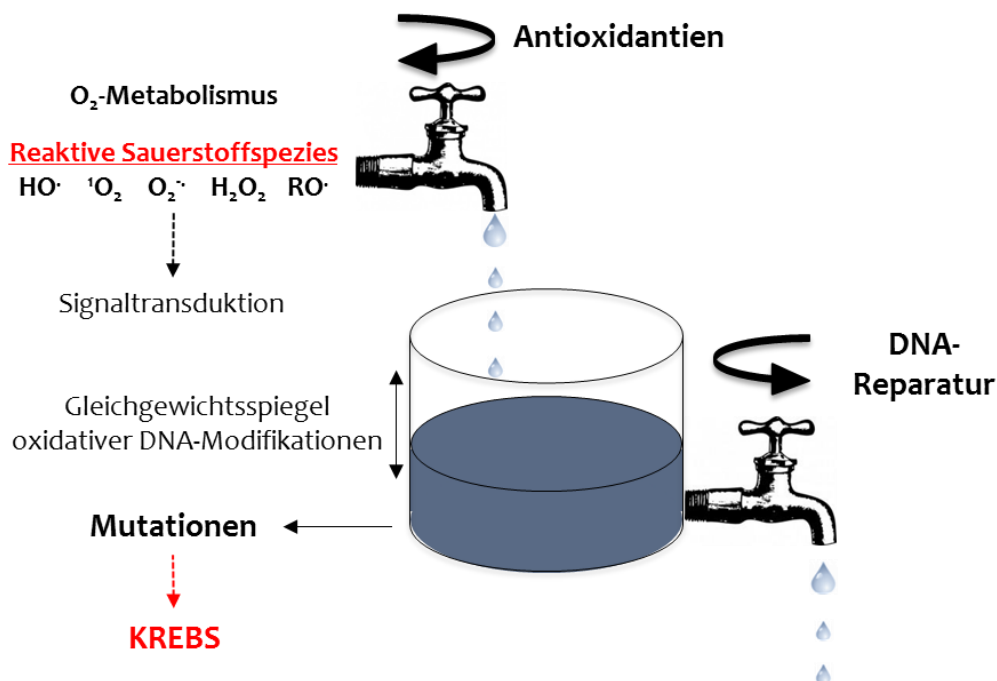
# 1 Einleitung

2011 war Krebs mit 26 % die zweithäufigste Todesursache nach den Herz-Kreislaufkrankungen in Deutschland (Destatis, 04.02.2013). Untersuchungen spezifischer molekularer Prozesse während der Entstehung und Manifestation von Krebs sind daher von großer Bedeutung. Aus ihnen lassen sich effektive Präventions- und Therapiemaßnahmen ableiten.

Die Mechanismen der Krebsentstehung, oder auch Karzinogenese, sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Nach heutigem Verständnis wird der Prozess der Karzinogenese in die Phasen Initiierung, Promotion und Progression unterteilt. Bei der Initiierung wird eine normale Zelle durch DNA-Schäden und daraus resultierenden genetischen Veränderungen (Mutationen) in eine Tumovorläuferzelle (initiierte Zelle) umgewandelt. Mutationen in Protoonkogenen führen dabei zur Aktivierung von Onkogenen (z.B. K-ras, c-myc) (*gain of function*), welche in der Regel Zellproliferation stimulieren. Tumorsuppressorproteine (z.B. p53, BRCA1/2, APC) hingegen wirken inhibierend auf ein unreguliertes Wachstum. Mutationen in den zugehörigen Tumorsuppressorgenen führen somit zu einem sogenannten *loss of function*. Während der Promotionsphase bedingt ein Wachstumsstimulus die klonale Expansion der initiierten Zellen. Deren Mutationen werden an die Tochterzellen weitergegeben. Durch genomische Instabilität der initiierten Zellen entstehen dabei oft weitere Mutationen. Die dritte Phase, die Progressionsphase, beinhaltet die eigentliche Transformation von präneoplastischen Zellen zum malignen Tumor.

Agentien mit DNA-schädigenden, also initiierenden (Karzinogene), oder promovierenden (Promotoren) Eigenschaften, welche zusammen eine Krebsentstehung begünstigen, können sowohl exogenen als auch endogenen Ursprungs sein. Exogene DNA-schädigende Agentien sind beispielsweise UV-Strahlung, radioaktive Strahlung, Industriechemikalien (u.a. Benzol) sowie Naturstoffe (Aflatoxin B<sub>1</sub>). Zu den exogenen promovierenden Agentien gehören beispielsweise Dioxine, Asbest und Phorbolster. Alle diese exogenen Noxen sind zu einem Großteil vermeidbar. Die Expositionslevel sind somit oft relativ gering und stellen deshalb nur eine begrenzte Erklärung für die hohe Krebsinzidenz in der Gesamtbevölkerung dar (AMES & GOLD 2000). Neben diesen vermeidbaren exogenen Noxen ist jede Zelle des Körpers tagtäglich aber auch endogenen Risikofaktoren, insbesondere den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), ausgesetzt. Diese entstehen als unvermeidliche Nebenprodukte in allen aerob lebenden Organismen. Interessanterweise sind in jeder Zelle basale oxidative DNA-Basenmodifikationen messbar, die auf eine ständige

endogene ROS-Produktion durch den Sauerstoffmetabolismus zurückgeführt werden (EPE 2002). 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG), die wohl am häufigsten gebildete oxidative Basenmodifikation, ist in der Lage durch Fehlpaarungen mit Adenin zu G:C zu T:A Transversionen zu führen. Bevor jedoch aus ROS DNA-Schäden generiert werden, die Mutationen und letztendlich auch Krebs verursachen können, schützt die Zelle sich mit einem hochspezialisierten Abwehrsystem. In erster Linie sind dies enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien (siehe 1.2.2). Die individuelle Ausstattung mit „detoxifizierenden“ Antioxidantien reguliert so die Induktion oxidativer DNA-Schäden durch endogen sowie exogen generierte ROS. Ein weiterer Mechanismus zum Schutz der Zelle sind hochspezialisierte DNA-Reparatursysteme (siehe 1.5). Sie sind in der Lage oxidative DNA-Modifikationen zu entfernen und somit die genomische Stabilität sicherzustellen. Aus dem Gegenspiel von Entstehung und Reparatur oxidativer DNA-Schäden resultieren sogenannte Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Basenmodifikationen (EPE 2002). Ein Modell für die Generierung, Entfernung sowie Auswirkungen des Gleichgewichtsspiegels an oxidativen DNA-Schäden gibt Abbildung 1-1 wieder.



**Abbildung 1-1 Modell basaler Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Basenmodifikationen (modifiziert nach EPE 2002)**

Defekte beispielsweise in einzelnen Reparaturgenen verschieben das Gleichgewicht in Richtung Oxidantien und führen zu einer Erhöhung basaler oxidativer DNA-Schäden (OSTEROD et al. 2001; TRAPP et al. 2007a). Demgegenüber kann aber auch eine Erhöhung des antioxidativen Gegengewichtes zu einer Reduzierung basaler oxidativer DNA-Schäden führen (FUSSER et al. 2011; GALLÉ et al. 2013).

Bei einer Erhöhung dieses Gleichgewichtsspiegels wird gleichzeitig das Mutationsrisiko erhöht. Tritt eine Mutation in Tumorsuppressor- oder Protoonkogenen auf, wird eine Entartung und somit Krebsentstehung über einen mehrstufigen Prozess begünstigt (siehe oben). Bei Mutation in sogenannten *caretaker*-Genen (z.B. DNA-Reparaturproteine) kann es durch den Ausfall von Schutzmechanismen indirekt zu einem Anstieg der Gleichgewichtsspiegel und so ebenfalls zu einem erhöhten Mutationsrisiko kommen (Mutatorhypothese) (LOEB et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit soll die Effektivität der DNA-Reparatur, vorrangig der von oxidativen DNA-Schäden, in primären humanen Lymphozyten untersucht werden. Als Teil des Immunsystems können Lymphozyten durch bestimmte Antigene aktiviert und gleichzeitig zur Zellteilung angeregt werden, wodurch nicht reparierte DNA-Schäden zu Mutationen führen (siehe oben). Inwiefern eine physiologische Aktivierung humaner Lymphozyten möglicherweise eine Modulation der DNA-Reparatur als Schutzmechanismus hervorrufen kann, soll deshalb ebenfalls Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit sein.

## 1.1 Immunsystem

Das Immunsystem (lat. *immunis*: unberührt, frei, rein) stellt ein komplexes Abwehrsystem dar mit der Aufgabe Pathogene (Bakterien, Viren, Parasiten) sowie entartete Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Eine Immunantwort kann grundsätzlich über zwei verschiedene Effektorsysteme erfolgen: über das angeborene (unspezifische) oder über das erworbene (spezifische) Immunsystem. Diese setzen sich jeweils aus einer zellulären und einer humoralen Immunantwort zusammen.

Die zelluläre Komponente des Immunsystems beinhaltet spezialisierte Immunzellen, die frei beweglich oder ortsfest sind. Hierzu zählen z.B. Granulozyten, dendritische Zellen, Makrophagen, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Das humorale System setzt sich aus Antikörpern, Komplementfaktoren und Zytokinen zusammen.

Die angeborene Immunantwort stellt die erste Barriere zur Verteidigung des Körpers gegen Pathogene dar. Sie ist eine Erreger-unspezifische Abwehr bestehend aus zellulären, phagozytierenden oder Apoptose-induzierenden Systemen (Monozyten / Makrophagen, Granulozyten, NK-Zellen) sowie humoralen Komponenten (Komplementfaktoren, Proteasen, Zytokine). Außerdem werden Oberflächenepithelien (Haut und Schleimhaut) zur angeborenen Immunantwort gezählt, die sowohl eine mechanische (*tight junctions*, Zilien, Schleim) als auch eine chemische / antimikrobielle (Lysozym, Pepsin, Surfactant-Proteine) Barriere für Pathogene darstellen. Dringen Fremdzellen nun in den Organismus ein, wird eine rezeptorvermittelte Phagozytose und Beseitigung der Pathogene initiiert. Durch Chemotaxis und Antigenpräsentation interagiert die unspezifische Immunabwehr mit der spezifischen. Bei Erstkontakt mit einem Antigen stellt die unspezifische Reaktion, aufgrund der verzögerten Antikörperproduktion durch das spezifische Immunsystem, die initiale Reaktion dar.

Das erworbene Immunsystem stellt eine zelluläre und / oder humorale Antwort des Körpers dar, die spezifisch gegen Antigene gerichtet ist. Eine MHC (*Major Histocompatibility Complex*)-abhängige Antigenpräsentation gilt als Voraussetzung für dieses Abwehrsystem. In Abhängigkeit vom Antigen kann eine MHC-I-vermittelte Aktivierung zytotoxischer T-Zellen ( $CD8^+$ ) erfolgen (wie z.B. bei Virusbefall oder entarteten Zellen) oder aber eine Aktivierung von T-Helferzellen ( $CD4^+$ ) durch eine MHC-II-vermittelte Antigenpräsentation. Die Bildung von T- und B-lymphozytären Gedächtniszellen im Verlauf der spezifischen Immunantwort ermöglicht eine schnellere Reaktion bei erneutem Antigenkontakt.

### 1.1.1 Lymphozyten

Lymphozyten gehören mit den Granulozyten und Monozyten in die Gruppe der Leukozyten. Zu ihnen zählen die T- und B-Lymphozyten sowie die NK-Zellen. Lymphozyten werden aus lymphatischen Stammzellen im Knochenmark gebildet und reifen anschließend in Thymus, Milz und Lymphknoten heran. Ins Blut gelangen sie hauptsächlich über die Lymphbahnen. Nur etwa 4 % aller Lymphozyten zirkulieren jedoch im Blut. Der Rest befindet sich in den lymphatischen Organen (ca. 75 %), im Knochenmark (ca. 10 %) und in den übrigen Organen (ca. 15 %). Im Blut stellen sie 25 – 40 % der Gesamtleukozyten dar. T- und B-Lymphozyten sind zwischen 6 und 9  $\mu\text{M}$  groß und bestehen aus einem großen, chromatindichten Zellkern und nur einem schmalen Zytoplasmaanteil. NK-Zellen sind etwas größer (11  $\mu\text{M}$ ) und haben eine deutlich sichtbare Granula. Die größte Gruppe der Lymphozyten sind die T-Lymphozyten mit etwa 70 – 80 %. Der Rest verteilt sich auf die B- und NK-Zellen.

T-Lymphozyten sind Teil der zellulären spezifischen Immunantwort. Nach der Entstehung im Knochenmark wandern sie in den Thymus unterliegen dort während ihrer Reifung einer Negativselektion. Hierbei kommt es zur Elimination potentiell autoreaktiver Thymozyten und solcher, die körpereigene MHC I-Moleküle nicht erkennen. Als  $\text{CD4}^+$  und  $\text{CD8}^+$ -positive Zellen rezirkulieren sie dann zwischen Blut und sekundären lymphatischen Organen. In Zweitgenannten treffen sie schließlich auf Antigen-präsentierende Zellen, die sie antigenspezifisch aktivieren können. Daraufhin expandieren die T-Lymphozyten klonal und differenzieren unter dem Einfluss von Zytokinen zu Effektor- oder Helferzellen. Unstimulierte und aktivierte T-Lymphozyten lassen sich anhand ihrer CD45-Expression unterscheiden. Naive T-Zellen tragen die CD45RA-Isoform, während aktivierte die CD45RO-Isoform exprimieren (BEVERLEY et al. 1992).

B-Lymphozyten können nach Antigenkontakt zu Plasmazellen differenzieren und spezifische Antikörper produzieren. Sie sind somit Träger der humoralen Immunantwort. Die Aktivierung naiver B-Lymphozyten beginnt mit dem Antigenkontakt auf dem B-Zell-Rezeptor. Sie nehmen daraufhin das Antigen auf, zerlegen es und präsentieren es zusammen mit MHC II-Molekülen auf ihrer Oberfläche. Dieser Komplex kann von T-Lymphozyten erkannt werden, die daraufhin Zytokine produzieren, welche die B-Lymphozyten letztendlich aktivieren. Diese wandern dann in die Lymphknoten oder Milz und beginnen dort zu proliferieren. Gleichzeitig kommt es dabei zur somatischen Hypermutation der Antikörpergene. Dadurch kann es zur erhöhten Affinität der Antikörper zu ihrem Antigen kommen. Mit der anschließenden Selektion werden die B-Zellen ausgewählt, die am besten das AG binden.

NK-Zellen haben eine zytotoxische Aktivität und können Apoptose in ihren Zielzellen auslösen. Hierzu gehören virusinfizierte und entartete Zellen, die durch eine verminderte MHC-I-Expression der Abwehr durch T-Lymphozyten entgehen.

Für die vorliegende Arbeit werden periphere humane Blutlymphozyten eingesetzt. Hierbei handelt es sich vorrangig um T-Lymphozyten. Diese befinden sich in der  $G_0$ -Phase des Zellzyklus. Erst durch einen Antigenkontakt oder aber eine ex vivo Aktivierung mit einem Mitogen können sie in den Zellzyklus eintreten. Im Folgenden soll die physiologische sowie die für diese Arbeit angewendete ex vivo Stimulation mittels dem Mitogen Phytohämagglutinin näher beschrieben.

### 1.1.2 Aktivierung von T-Lymphozyten

Der T-Zell-Rezeptor (TZR) erkennt spezifisch über MHC-Moleküle (*Major Histocompatibility Complex*) präsentierte Antigene (AG). Anhand der Zusammensetzung der Polypeptidketten des TZR werden  $\alpha/\beta$ - und  $\gamma/\delta$ -T-Lymphozyten unterschieden.  $\gamma/\delta$ -T-Zellen stellen die kleinere Gruppe der T-Lymphozyten dar und unterscheiden sich von den  $\alpha/\beta$ -T-Zellen durch die Art der AG-Erkennung. Da bisher kein Ligand für den  $\gamma/\delta$ -TZR bekannt ist, geht man davon aus, dass sie AG direkt erkennen können.  $\alpha/\beta$ -T-Zellen werden in  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen unterschieden. Bei allen T-Lymphozyten interagiert der TZR mit dem CD3-Komplex (siehe Abbildung 1-2), der für eine Signalweiterleitung bestimmt ist.

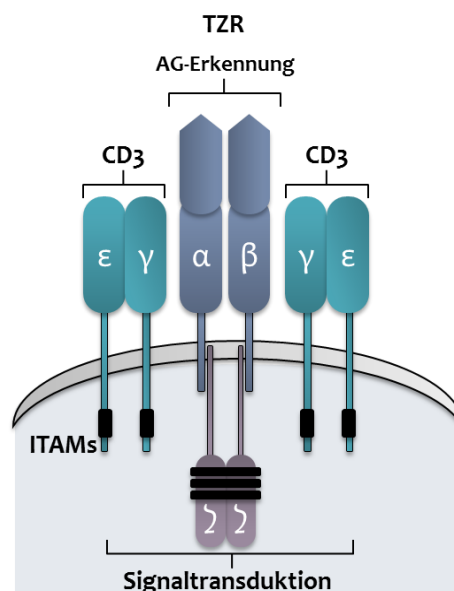


Abbildung 1-2 Schematischer Aufbau des T-Zell-Rezeptors und seine Aktivierung

Auf der intrazellulären Seite des CD3-Komplexes befindet sich jeweils ein ITAM (Immunreceptor Tyrosine-Based-Activation Motif). Jede  $\zeta$ -Kette enthält 3 ITAMs (KERSH et al. 1998) (siehe Abbildung 1-2). Für die Signaltransduktion (Abbildung 1-3) ist die Phosphorylierung der ITAMs entscheidend. Im weiteren Verlauf wird unter anderem die Tyrosinkinase Zap-70 ( $\zeta$ -chain-associated protein kinase of 70 kDa) gebunden, um dann von einer der Tyrosinkinasen, Lck (Leukozyten-spezifische Tyrosinkinase) oder Fyn, phosphoryliert zu werden. Zap-70 wiederum phosphoryliert das Adapterprotein LAT (linker of activation in T cells), was zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC) führt. Die aktivierte PLC spaltet PIP<sub>2</sub> (Phosphoinositol-4,5-bisphosphat) zu IP<sub>3</sub> (Inositoltriphosphat) und DAG (Diacylglycerol). Durch IP<sub>3</sub> werden IP<sub>3</sub>-Rezeptoren am ER stimuliert und es kommt zu einem intrazellulären Kalziumanstieg. Zusätzlich werden CRAC-Kanäle ( $Ca^{2+}$  release-activated  $Ca^{2+}$  channels) in der Plasmamembran geöffnet. Durch den intrazellulären Kalziumanstieg wird die Kalzium-abhängige Phosphatase Calcineurin aktiviert, welche NFAT (nuclear factor of activated T cells) dephosphoryliert und so dessen Translokation in den Zellkern erlaubt.

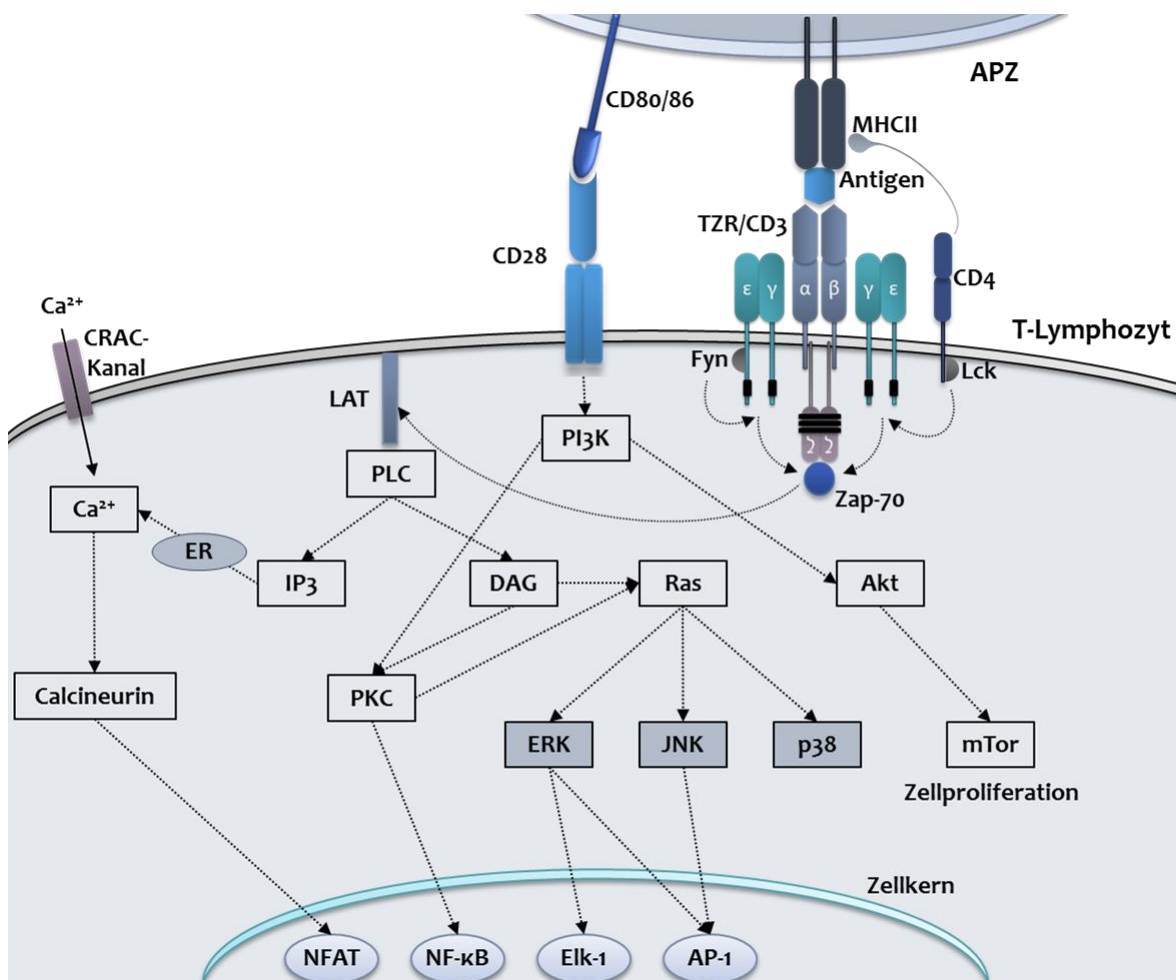


Abbildung 1-3 Die Hauptsignalwege der T-Zellaktivierung. Abkürzungen siehe Begleittext.

Durch Hydrolyse aus PIP<sub>2</sub> entstehendes DAG aktiviert schließlich die PKC (Proteinkinase C) sowie das G-Protein Ras. PKC aktiviert wiederum NF- $\kappa$ B (*nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells*) durch Phosphorylierung und anschließende Degradierung der inhibitorischen Untereinheit I $\kappa$ B (*inhibitor of kappa B*) und führt somit zur Translokation von NF- $\kappa$ B in den Zellkern. Ras stimuliert den Ras/Raf/Mitogen-aktivierenden Proteinkinase (MAPK)-Signalweg. Dies führt zur Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren wie Elk-1 (*ETS domain-containing protein*) und dem AP-1 (*activator protein 1*)-Komplex. (SMITH-GARVIN et al. 2009) Insgesamt kommt es zur vermehrten Gentranskription, Proteinsynthese, Proliferation und Differenzierung aktivierter T-Zellen.

Die AG-Erkennung durch den TZR alleine ist jedoch nicht ausreichend für eine T-Zell-Aktivierung. Die Korezeptoren CD4 oder CD8 sitzen ebenfalls auf der Zelloberfläche und interagieren mit dem TZR. CD4 wechselwirkt dabei mit MHCII-Molekülen und CD8 mit MHCI. Eine weitere kostimulatorische Struktur stellt CD28 dar. Es bindet CD80 und CD86 einer Antigen-präsentierenden Zelle (APZ) und rekrutiert so PI3K (Phosphoinositidkinase3) zur Zellmembran, welches wiederum Akt (Proteinkinase B) aktiviert. Durch Stimulation des PI3K-Akt-Signalweges kommt es unter anderem zur vermehrten Translokation von NF- $\kappa$ B und über mTor (*mammalian Target of Rapamycin*) zu einer Induktion der Zellproliferation. Die kostimulatorischen Rezeptoren induzieren offenbar keine alternativen Signalwege, sondern fungieren vielmehr als Signalverstärker und-modulatoren (SMITH-GARVIN et al. 2009; SHARPE 2009).

### 1.1.3 Aktivierung von T-Lymphozyten mit Phytohämagglutinin

Phytohämagglutinin (PHA) ist ein Lektin, welches hauptsächlich in der Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*) vorkommt. Bei den Lektinen handelt es sich um komplexe Proteine, die mit hoher Spezifität Mono- und Oligosaccharide auf Zellmembranen binden und somit Zellen agglutinieren können.

Bereits 1960 konnte gezeigt werden, dass PHA in peripheren, humanen T-Lymphozyten Mitose induziert (NOWELL 1960). Diese Stimulation ähnelt der einer Antigen-induzierten Aktivierung. Allerdings initiiert PHA eine polyklonale Stimulation in T-Lymphozyten, die unabhängig von deren Antigen-spezifität ist. Hierfür bindet PHA an den TZR/CD3-Komplex (CHILSON & KELLY-CHILSON 1989). Weitere mögliche Bindungsstellen für PHA, die zur Diskussion stehen, sind CD2 (BROWN et al. 1989), CD4, CD8 (SUZUKI et al. 1992) sowie CD5 (OSMAN et al. 1992), über die wahrscheinlich eine Vernetzung und somit Aktivierung der Lymphozyten erfolgt.



Die Stimulation von T-Lymphozyten zu T-Zell Lymphoblasten über PHA zeigt ebenfalls wie eine AG-abhängige Stimulation einen frühzeitigen intrazellulären Calciumanstieg, der durch die Spaltung von PIP<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat) zu DAG (Diacylglycerol) und IP<sub>3</sub> (Inositoltriphosphat) verursacht wird. Dadurch wird im weiteren Verlauf die Proteinkinase C aktiviert, welche wiederum die Phosphorylierung von Zielproteinen katalysiert (vergleiche 1.1.2). Es kommt zur vermehrten DNA-, RNA- und Proteinsynthese sowie zur Zellteilung. Neben einem erhöhten Calciumspiegel sind ebenfalls erhöhte Kalium- (SEGEL & LICHTMAN 1976) und Natriumkonzentration (SEGEL et al. 1979) messbar, die mit einer gesteigerten Membranpermeabilität einhergehen. Zusätzlich synthetisieren aktivierte Lymphozyten IL-2 und IL-2-Rezeptoren (MORGAN et al. 1976).

Der Übergang von in G<sub>0</sub> ruhenden Zellen nach G<sub>1</sub> ist mit einem massiven Anstieg von Transkription und Translation verbunden (DARZYNKIEWICZ et al. 1965). Die Lymphozyten, die sich in der G<sub>1</sub>-Phase befinden, haben einen über 10-fach höheren Gehalt an RNA und Proteinen im Vergleich zu Lymphozyten in G<sub>0</sub> (DARZYNKIEWICZ et al. 1976). Die ebenfalls zunehmende metabolische Aktivität zeigt sich an der erhöhten Masse der Mitochondrien sowie am Membranpotential (DARZYNKIEWICZ et al. 1981). Im Zusammenhang mit einer erhöhten Mitochondrienaktivierung zeigt sich ebenfalls eine erhöhte Produktion endogener reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in PHA-stimulierten Lymphozyten (TANAKA et al. 2007).

Die Entdeckung der mitogenen Wirkung von PHA auf T-Lymphozyten bewirkte die Entwicklung des Lymphozyten-Transformations-Tests (LTT) (DWYER et al. 1979), der zur in vitro Untersuchung von Antigen-spezifischen T-Lymphozyten eingesetzt wird. Hierfür werden isolierte Lymphozyten eines Patienten mit einem bestimmten Antigen versetzt und durch anschließende Messung des <sup>3</sup>H-Thymidineinbaus deren Stimulation gemessen. Ein positives Ergebnis der Thymidineinbaurates im Vergleich zur Negativkontrolle bedeutet eine bestehende Sensibilisierung des Immunsystems diesem Antigen gegenüber. Als Positivkontrolle für die Lymphozytenfunktion wird PHA eingesetzt.

## 1.2 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind Nebenprodukte der Energiegewinnung in jedem aerob lebendem Organismus. Sie entstehen durch die sequentielle Reduzierung von molekularem Sauerstoff zu Wasser. Die wichtigsten ROS sind Tabelle 1-1 zu entnehmen. Trotz ihrer relativ kurzen Lebensdauer können ROS mit Makromolekülen wie Proteinen, Lipiden und Nukleinsäuren reagieren. Sie sind somit maßgeblich an der

Entstehung von Entzündungsprozessen, an der Kanzerogenese sowie an Seneszenzvorgängen, aber ebenfalls als *Second Messenger* an der zellulären Signaltransduktion beteiligt (VALKO et al. 2006). Eine Dysbalance zwischen prooxidativen und antioxidativen Prozessen zugunsten der prooxidativen Seite wird als oxidativer Stress bezeichnet (SIES 1991).

**Tabelle 1-1 Lebensdauer verschiedener Reaktiver Sauerstoffspezies nach (SIES 1993)**

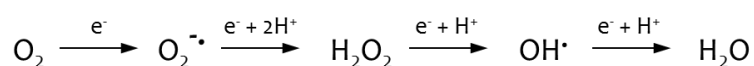
Reaktive Sauerstoffspezies	Halbwertszeit [s]
HO <sup>•</sup> (Hydroxylradikal)	10 <sup>-9</sup>
<sup>1</sup> O <sub>2</sub> (Singulett-Sauerstoff)	10 <sup>-5</sup>
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> (Superoxidanion-Radikal)	Dismutation
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (Wasserstoffperoxid)	stabil, enzymatischer Abbau
RO <sup>•</sup> (Alkoxyradikal)	10 <sup>-6</sup>
ROO <sup>•</sup> (Peroxyradikal)	7
NO <sup>•</sup> (Stickstoffmonoxid)	1-10

### 1.2.1 Endogene Quellen reaktiver Sauerstoffspezies

ROS besitzen neben pathophysiologischen auch physiologische Funktionen und nehmen an einer Vielzahl biologischer Prozesse teil. Sauerstoffradikale treten hierbei als regulatorische Moleküle auf. Einige wichtige endogene Quellen für ROS sind im Folgenden aufgelistet:

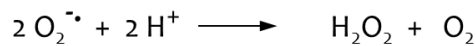
- Mitochondriale Atmungskette
- NADPH-Oxidase (*Respiratory Burst*)
- Arachidonsäure-Metabolismus
- Xenobiotika-Metabolismus durch Cytochrom-P450
- Peroxisomen
- Purinabbau durch das Xanthinoxidase-System

Die am häufigsten endogen produzierte Spezies von reaktivem Sauerstoff ist das Superoxidanion-Radikal (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). Bei der sequenziellen Reduktion von Sauerstoff während der Zellatmung wird ein kleiner Teil unvollständig und nur bis zum Superoxidanion-Radikal reduziert:



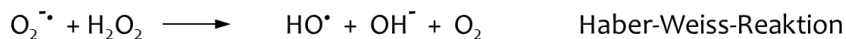
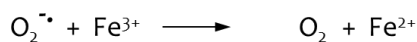
**Abbildung 1-4 Sequenzieller Reduktion von molekularem Sauerstoff**

Das Superoxidanion-Radikal kann aufgrund seiner Ladung allerdings biologische Membranen nicht passieren. Jedoch wird es durch spontane (Abbildung 1-5) oder enzymatische (über Superoxiddismutase (FRIDOVICH 1995) Dismutation in Sauerstoff und Wasserstoffperoxid umgewandelt.



**Abbildung 1-5 Spontane Dismutation von Superoxidanion-Radikal**

Wasserstoffperoxid ist von Natur aus zwar reaktionsträge, jedoch dafür auch relativ stabil (Tabelle 1-1) und kann somit weitere Strecken in entfernte Zellkompartimente zurücklegen. Außerdem ist Wasserstoffperoxid in der Lage Zellmembranen zu durchdringen. Zusammen mit Übergangsmetallen entsteht aus Wasserstoffperoxid schließlich das äußerst reaktive Hydroxylradikal (Fenton-Reaktion) (HALLIWELL 1996):



**Abbildung 1-6 Metallkatalysierte Bildung von Hydroxylradikalen**

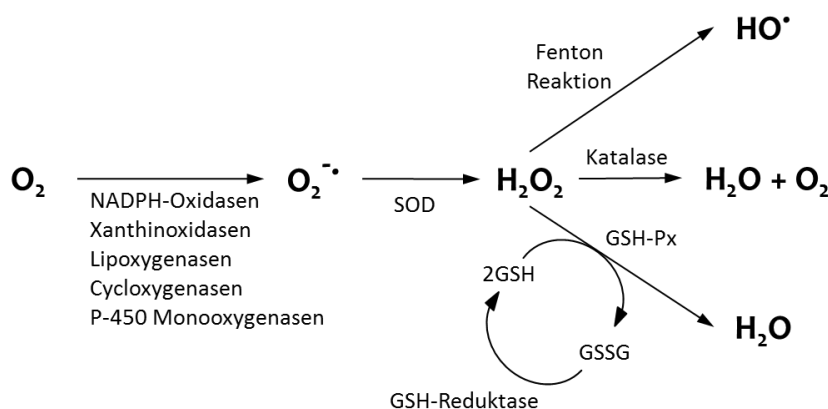
Hydroxylradikale sind äußerst reaktiv. Das Fehlen inaktivierender Enzyme ist durch die kurze Halbwertszeit von Hydroxylradikalen zu erklären. Daher besitzen sie selbst auch einen geringen Aktionsradius (nur etwa 2 nm (SARAN & BORS 1989), wodurch Entstehungs- und Reaktionsort nah beieinander liegen. Aber durch die Wanderungsfähigkeit von Wasserstoffperoxid in beinahe alle Zellkompartimenten ist es möglich das Hydroxylradikale ubiquitär in der Zelle entstehen und mit nahezu allen Zellbestandteilen (Kohlenhydrate, Lipide, Nukleinsäuren und Proteine) reagieren (HALLIWELL 1989). Konsequenzen für die DNA aus einem Kontakt mit Hydroxylradikalen sind typischerweise Einzel- und Doppelstrangbrüche, Verlust oder Modifikationen von DNA-Basen, DNA-Protein-Quervernetzungen sowie Fragmentierungen des Zucker-Phosphat-Gerüsts (HALLIWELL & ARUOMA 1991).

Die Bildung von Singulett-Sauerstoff erfolgt indirekt in der Zelle durch Anregung endogener Photosensibilisatoren (Protoporphyrin IX, Riboflavin) durch sichtbares Licht oder UVA-Strahlung (EPE et al. 1993a). Singulett-Sauerstoff ist zwar weitaus weniger reaktiv als Hydroxylradikale, jedoch besitzt er eine deutlich höhere Halbwertszeit, so dass er selbständig in den Zellkern gelangen und dort 8-oxoG generieren kann (EPE 1991).

Des Weiteren zählen auch Alkyl-(R $\cdot$ ), Alkoxy-(RO $\cdot$ ) und Peroxylradikale (ROO $\cdot$ ) zu den ROS, die ebenfalls die DNA direkt angreifen können.

### 1.2.2 Mechanismen zur Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies

Zum Abfangen der zuvor besprochenen ROS besitzt die Zelle eine Reihe enzymatischer und nicht-enzymatischer Radikalfänger und Antioxidantien. Wichtige Schritte der enzymatischen Abwehr sind die katalytische Dismutation von O $_2^{\cdot-}$  durch SOD (Superoxiddismutase) zu H $_2$ O $_2$  und die weitere Konversion durch Katalase oder GSH-Px (Glutathion-Peroxidase) (siehe Abbildung 1-7). Im Falle der Umsetzung durch GSH-Px ist die Reaktion von der GSH-Menge abhängig sowie teilweise vom GSH:GSSG Verhältnis. Dies zusammen gibt Aufschluss über den Redoxstatus der Zelle. Weitere bisher bekannte antioxidativ wirkende Enzyme sind Thioredoxins sowie Thioredoxinreduktase (HOLMGREN & LU 2010), Peroxiredoxin und Methioninsulfoxidreduktase (WEISSBACH et al. 2002) sowie die Hämoxygenase 1 (HO1) (APPLEGATE et al. 1991).



**Abbildung 1-7 Antioxidative Abwehrmechanismen**

Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien zählt unter anderem das endogene GSH sowie die exogenen Antioxidantien Vitamin C und E, Carotinoide und sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe wie Flavonoide und Polyphenole, die mit der Nahrung aufgenommen werden.

### 1.3 Oxidative DNA-Schäden und ihre Konsequenzen

Durch endogene und exogene ROS kommt es tagtäglich in jeder Zelle neben Lipid- und Proteinoxidationen ebenfalls zu Oxidationen der DNA. Eine Vielzahl oxidativer DNA-Modifikationen ist bisher bekannt (DIZDAROGLU 1992; BJELLAND & SEEBERG 2003). Einige der wichtigsten Modifikationen sind in Abbildung 1-8 dargestellt. Die Oxidation betrifft entweder die Base oder das Zucker-Phosphat-Rückgrat. Es können dabei modifizierte Basen, AP-Läsionen, Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie Proteinaddukte entstehen. Oxidative Basenmodifikationen stehen im Zusammenhang mit Zelltod, Mutagenese, Krebs, neurologischen Erkrankungen sowie Seneszenz.

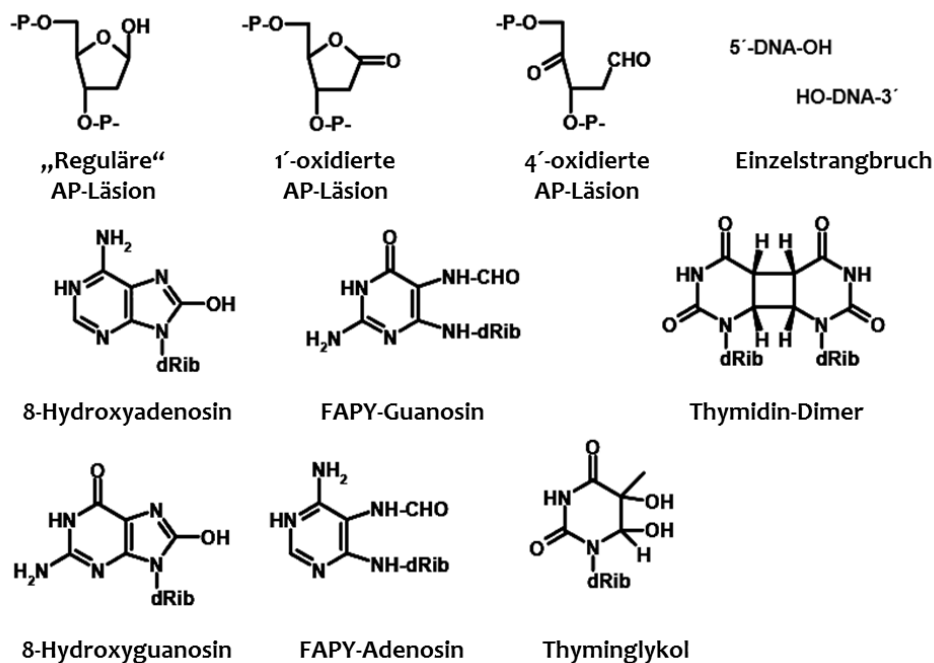


Abbildung 1-8 Durch ROS induzierte DNA-Basenmodifikationen

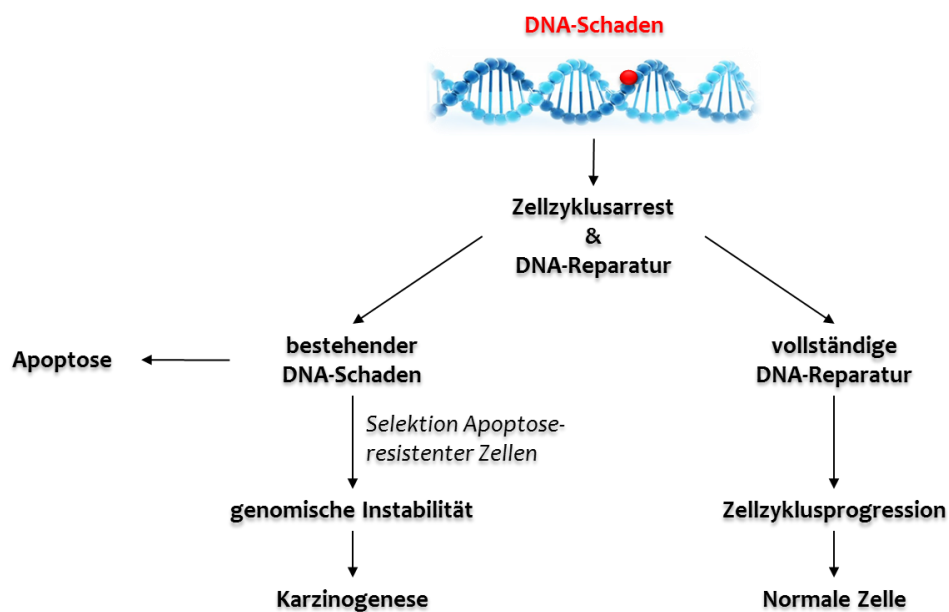
7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG) ist die am häufigsten gebildete, mutagene oxidative Basenmodifikation. Pro Zelle entstehen schätzungsweise 100 bis 500 8-oxoGs (LINDAHL 1993). 8-oxoG entsteht durch die Reaktion von DNA mit Hydroxylradikalen, Singulett-Sauerstoff und angeregten Photosensibilisatoren (EPE 1996). Das mutagene Potential beruht auf der Tatsache, dass 8-oxoG in der Lage ist, nicht nur mit Cytosin sondern auch mit Adenin zu paaren (SHIBUTANI et al. 1991). Untersuchungen zeigten für einzelnes 8-oxoG, verpackt in einem einzelsträngigen Vektor, eine Mutationsfrequenz (G:C zu T:A) von 2,5-4,8 % (MORIYA 1993).

**Formamidopyrimidine** (Fapy-Adenin und Fapy-Guanin) weisen kein mutagenes Potential auf. Allerdings wirken sie durch Blockade der Replikation zytotoxisch (Tudeck, 1992).

**Reguläre AP-Läsionen** entstehen durch eine einfache Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung während oxidierte AP-Läsionen aus einem radikalischen Angriff am Zuckerrest resultieren (EPE 1996). AP-Läsionen sind ebenfalls mutagen, da sie während der Replikation zu Basenfehlpaarungen führen können oder durch spontane Hydrolyse in Einzelstrangbrüche umgewandelt werden können (LINDAHL 1993).

**Einzelstrangbrüche (SSB)** sind eine Unterbrechung des Zucker-Phosphat-Rückgrats der DNA. Sie werden endogen durch den direkten Angriff reaktiver Sauerstoffspezies oder anderer Elektrophiler auf den Zuckerrest generiert. Exogene Ursachen stellen ionisierende Strahlen und Umwelttoxine (z.B. Zigarettenrauch) dar (CALDECOTT 2001). Ein mutagenes Potential von SSB ist nicht auszuschließen (EPE 1996). (LINGG 2009) konnte eine starke Transkriptionshemmung nachweisen.

Zur Erhaltung der genomischen Integrität nach Induktion oxidativer DNA-Schäden besitzt der Organismus 2 Schutzmechanismen, DNA-Reparatur und Apoptose. Zellen mit einer defekten DNA-Reparatur akkumulieren exzessiv DNA-Schäden. Zellen ohne funktionierende Apoptosemechanismen besitzen die Möglichkeit trotz einer hohen Zahl an DNA-Schäden zu überleben und zu replizieren. Dadurch wird die Entstehung von Mutation und somit die Karzinogenese gefördert.



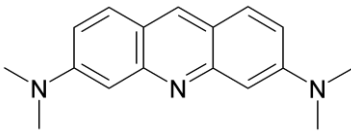
**Abbildung 1-9 DNA-Schadensantwort (modifiziert nach BERNSTEIN & BERNSTEIN 2006)**

## 1.4 Generierung zellulärer DNA-Schäden in vitro

Im folgenden Abschnitt werden die Substanzen und Strahlungsarten, die zur Induktion reaktiver Sauerstoffspezies in Lymphozyten eingesetzt wurden, näher beschrieben.

### 1.4.1 Acridinorange

Acridinorange (AO) ist ein Fluoreszenzfarbstoff der durch Interkalation oder elektrostatische Anziehung mit Nukleinsäuren interagiert. Die Besonderheit von AO ist, dass es eine Unterscheidung von DNA und RNA ermöglicht. Im Komplex mit DNA hat AO sein Absorptionsmaximum bei 502 nm und sein Emissionsmaximum bei 525 nm (grün). Im RNA-Komplex hingegen liegt das Absorptionsmaximum bei 460 nm und das Emissionsmaximum bei 650 nm (rot). Somit kann nach Färbung mit AO sehr gut zwischen DNA (grün) und RNA (rot) unterschieden werden.



**Abbildung 1-10 Strukturformel Acridinorange (3,6-Bis(dimethylamino)acridin)**

Zusammen mit sichtbarem Licht induziert AO vorrangig Fpg-sensitive DNA-Basenmodifikationen. Diese entstehen in zellfreier PM<sub>2</sub>-DNA und in Säugerzellen in vergleichbarem Ausmaß (EPE et al. 1993a; EPE et al. 1993b). Als Mechanismus für diese Schadensinduktion sind Hydroxylradikale (HO<sup>•</sup>) auszuschließen, da die Anzahl entstehender Einzelstrangbrüche sehr gering im Verhältnis zu den Fpg-sensitiven Modifikationen ist. Die Entstehung von Singulett-Sauerstoff als Intermediat kann ebenfalls nur bedingt verantwortlich gemacht werden. Zusätzlich kann ein direkter Elektronen-Transfer von AO auf die DNA angenommen werden, der ein Guaninradikal erzeugt, welches zu 8-oxoG oxidiert werden kann (EPE et al. 1993a).

### 1.4.2 Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Wasserstoffperoxid wird zur Erzeugung von Einzelstrangbrüchen eingesetzt. Ursächlich sind hierbei wahrscheinlich entstehende Hydroxylradikale, die über eine metallvermittelte Fenton-Reaktion (Abbildung 1-6) erzeugt werden (JEZOWSKA-BOJCZUK et al. 2002).

### 1.4.3 UV-B-Strahlung

UV-B-Strahlung ist eine energiereiche und elektromagnetische Strahlung, die sich von 280 bis 315 nm erstreckt. DNA sowie RNA zeigen ein Absorptionsmaximum bei 260 nm und können direkt von UV-B-Strahlung angeregt werden. Die so entstehenden Läsionen sind Cyclobutanpyrimidin-Dimere (CPD) (MITCHELL et al. 1991) und einige Pyrimidin-(6-4)-Photoprodukte (LIPPKE et al. 1981; SANCAR & RUPP 1983).

## 1.5 DNA Reparaturmechanismen

DNA-Schäden sind ein relativ häufiges Ereignis im Leben einer Zelle (siehe Tabelle 1-2) und können zu Mutation, Krebs oder auch zum Zelltod führen. Demzufolge ist eine effektive DNA-Reparatur zur Erhaltung der genomischen Integrität essentiell. Im Verlauf der Evolution haben sich komplexe Reparaturmechanismen für die Entfernung unterschiedlicher Arten von DNA-Schäden entwickelt. Die Bedeutung dieser DNA-Reparaturmechanismen wird dadurch verdeutlicht, dass Mutationen in einzelnen Reparaturproteinen schwerwiegende Erbkrankheiten bedingen, die durch eine erhöhte Krebsinzidenz (z.B. Xeroderma Pigmentosum, Nijmegen Breakage Syndrom, Ataxia Telangiectasia) (HOEIJMAKERS 2001), neurologische Defekte (z.B. Cockayne Syndrom, Werner Syndrom) (JEPPESEN et al. 2011) sowie vorzeitiges Altern (z.B. Cockayne Syndrom BROSH & BOHR 2007, Werner Syndrom HUANG et al. 1998) gekennzeichnet sind.

**Tabelle 1-2 geschätztes Auftreten endogener DNA-Schäden in Säugerzellen (RAO 2009)**

DNA-Schaden	Bildung pro Zelle pro Tag
SSB	20.000-40.000
Depurinierung	10.000
Depyrimidierung	600
Deaminierung	100-300
Oxidierte Basen	10.000
Alkylierte Basen	5.000
DSB	9
Interstrand-Crosslinks	8
DNA-Protein-Crosslinks	n.b.



Inzwischen rückt immer öfter die DNA-Reparatur in den Fokus bei der Entwicklung neuer Krebstherapeutika. Die Inhibierung von DNA-Reparaturmechanismen in der Monotherapie sowie die Anwendung in Kombination mit Bestrahlung oder anderen Chemotherapeutika gewinnen zunehmend an Bedeutung bei der Tumorerstörung (HELLEDAY et al. 2008). So konnte beispielsweise die zytotoxische Wirkung von Poly(ADP-Ribose)-Polymerase-1 (PARP-1) Inhibitoren sowohl zellulär (BRYANT et al. 2005; FARMER et al. 2005) als auch in klinischen Studien bei Brustkrebspatientinnen (O'SHAUGHNESSY et al. 2011) nachgewiesen werden. Auch der Einsatz von O<sup>6</sup>-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT) Inhibitoren zusammen mit Alkylantien zeigt gute Ansprechraten in Krebspatienten (RANSON et al. 2006).

Die wichtigsten Reparaturwege werden in den folgenden Kapiteln kurz beschrieben.

### 1.5.1 Direkte DNA-Reparatur (Schadensreversion)

Bei der direkten Reversion eines Schadens wird das entstandene Produkt durch eine einzige enzymatische Reaktion wieder in den Ausgangszustand gebracht. Hierzu gehören die Reversion von UV-induzierten DNA-Schäden mittels Photolyase und Licht, die Entfernung bestimmter methylierter Basen sowie die direkte Ligation von Einzelstrangbrüchen.

Photolyasen können durch Nutzung von sichtbarem Licht kovalente Bindungen von Pyrimidindimeren und 6-4-Photoprodukten spalten. Sie sind außer bei Plazentar-Tieren ubiquitär verbreitet (ESSEN & KLAR 2006).

Ein weiteres Enzym für eine direkte Schadensreversion ist die MGMT, welche in der Lage ist, O<sup>6</sup>-Methylguanin durch Übertragung des Alkylrestes auf eine eigene Cysteingruppe zu reparieren (DANIELS et al. 2004). Das Enzym wird dabei inaktiviert und ist somit ein Suizidenzym (SAMSON 1992). Die humanen Dioxygenasen ABH2 und ABH3 (*E. coli* Homolog: AlkB) können ebenfalls alkylierte Basen direkt reparieren. Hierbei werden die Methylgruppen von 1-Methyladenin und 3-Methylcytosin zunächst oxidiert um dann als Formaldehyd freigesetzt zu werden (DUNCAN et al. 2002).

Die einfachste Form einer direkten Schadensreversion stellt aber vermutlich die Reparatur eines Einzelstrangbruchs durch eine Ligase dar. Sofern der Einzelstrangbruch ein 3`OH und ein 5`Phosphat-Ende aufweist, wie es auch bei der Replikation zwischen Okazakifragmenten vorkommt, ist er direkt legierbar.

## 1.5.2 Basenexzisionsreparatur (BER)

Basenexzisionsreparatur, kurz BER, stellt den grundlegenden Reparaturweg zur Beseitigung von DNA-Basenmodifikation, ausgelöst durch Oxidation, Alkylierung, Deaminierung sowie Depurinierung / Depyrimidierung, dar. Initiiert wird BER durch eine von bisher 11 bekannten spezifischen DNA-Glykosylasen (DIANOV & HÜBSCHER 2013), die modifizierte DNA-Basen erkennen und durch Spaltung der N-glykosidischen Bindung entfernen. Monofunktionelle Glykosylasen hinterlassen eine apurinische / apyrimidinische Stelle (AP-Läsion), welche im weiteren Verlauf von einer AP-Endonuklease (APE1) in 5' Position zur AP-Läsion eingeschnitten wird (ROBERTSON et al. 2009). Es entsteht ein Einzelstrangbruch mit einer Hydroxylgruppe am 3' Ende und einer Desoxyribosephosphatgruppe am 5' Ende. Für die anschließende Religation entfernt nun Pol  $\beta$  mittels seiner dRP Lyase Aktivität die Zuckerphosphatgruppe am 5' Ende und fügt ein neues Nukleotid am 3' Ende der entstandenen Lücke ein (MATSUMOTO & KIM 1995). Anschließend werden die DNA-Enden durch einen Komplex aus XRCC1 und Ligase III ligiert (NASH et al. 1997b).

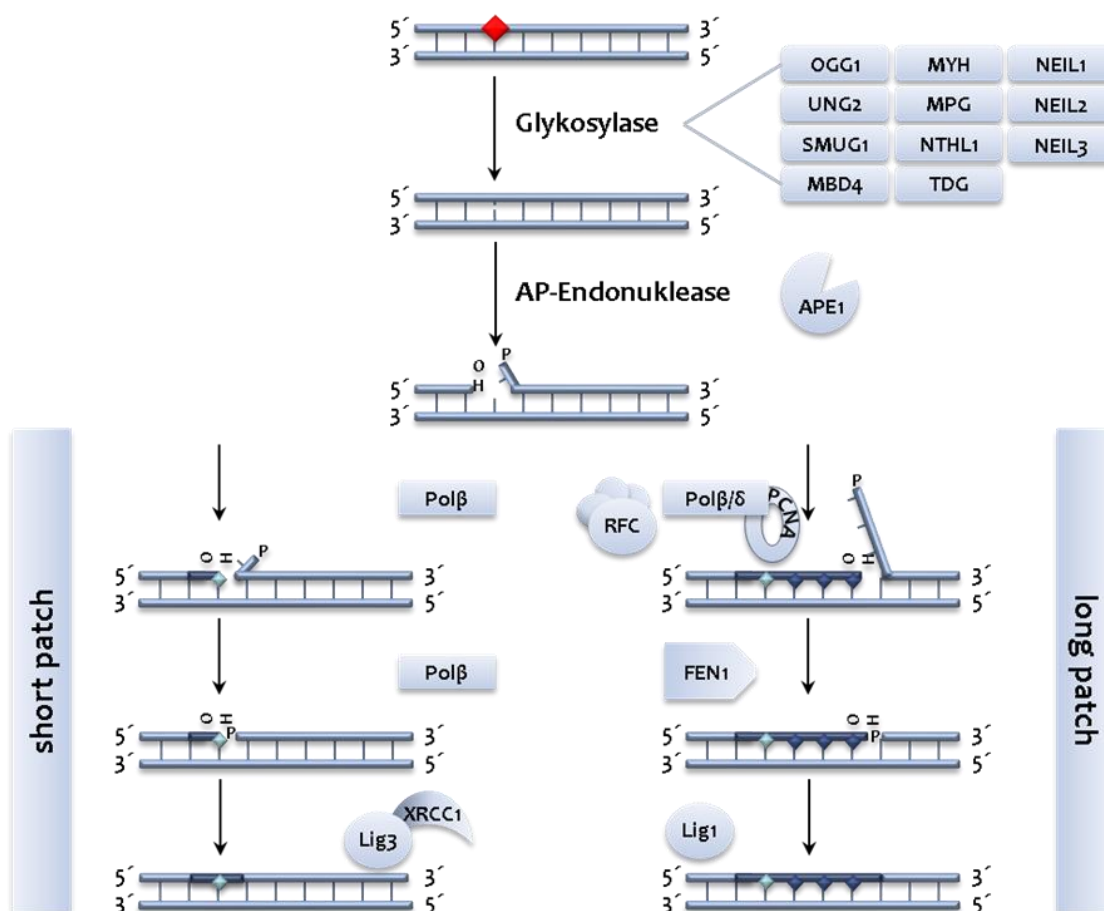


Abbildung 1-11 vereinfachte Darstellung der Basenexzisionsreparatur (BER), modifiziert nach (ROBERTSON et al. 2009) und (SANCAR et al. 2004)

Einige DNA-Glykosylasen haben über ihre Funktion als reine Glykosylase hinaus eine AP-Lyase-Funktion, wodurch ein Einschnitt in 3'Position zur AP-Läsion erfolgt (McCULLOUGH et al. 1999). In diesem Fall entfernt die AP-Endonuklease den am 3'Ende zurückbleibenden Zuckerrest und schneidet am 5'Ende ein, so dass eine Lücke entsteht, die wiederum durch Pol  $\beta$  (Polymerase  $\beta$ ) und den XRRC1 (*X-ray repair cross-complementing protein 1*) / Lig III (Ligase III) Komplex geschlossen wird.

Dieser Ein-Nukleotid-Austausch wird als *short patch* BER bezeichnet. Alternativ dazu steht die *long patch* BER zu Verfügung. Hierbei erfolgt ebenfalls am 5'Ende der AP-Läsion der Einschnitt durch die AP-Endonuklease. In den meisten Fällen fügt Pol  $\beta$  dann das erste Nukleotid in die entstandene Lücke ein (PODLUTSKY et al. 2001). In Anwesenheit von PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) und Replikationsfaktor C (RFC) fährt Pol  $\delta$  (Polymerase  $\delta$ ) mit der Neusynthese eines DNA Stranges von 2 bis 8 Nukleotide fort, der den alten verdrängt. Der so entstandene Flap wird von FEN1 (Flap-Endonuklease 1) entfernt und abschließend wird der DNA-Stang durch Ligase I geschlossen (KLUNGLAND 1997).

Wann eine Basenmodifikation über *short patch* und wann über *long patch* repariert wird, ist bislang nicht bekannt. Als mögliche Faktoren wurden bisher die ATP-Konzentration im Bereich der AP-Läsion (PETERMANN et al. 2003) sowie die Art der Läsion und der Zellzyklus (FROSINA et al. 1996) diskutiert.

**Tabelle 1-3 DNA-Glykosylasen und ihre Substrate nach (ROBERTSON et al. 2009) und (BARNES & LINDAHL 2004)**

Glykosylase	Substrate
OGG1	8-oxoG, FapyG, 8-oxoA
UNG2	Uracil
SMUG1	Uracil, 5-OH-meUracil
MBD4	T und U gegenüber G (CpG-Stellen), T gegenüber O <sup>6</sup> -meG
MYH	A gegenüber 8-oxoG, 2-OH-A gegenüber G
MPG	3meA, Hypoxanthin, EthenoA
NTHL1	Tg, FapyG, DHU, 5-OHU, 5-OHC
TDG	T, U und EthenoC (CpG-Stellen)
NEIL1	siehe NTHL1 und FapyA, 8-oxoG
NEIL2	siehe NTHL1 und NEIL1
NEIL3	bisher unbekannt

### 1.5.2.1 OGG1

OGG1, auch bekannt als 7,8-Dihydro-8-oxoguanin-DNA-Glykosylase, initiiert die Basenexzisionsreparatur von 8-oxoG. Zusätzlich erkennt es FAPY-Guanin (siehe Abbildung 1-8) sowie Methyl-FAPY-Guanin, jedoch nur solange diese modifizierten Basen mit Cytosin gepaart sind. OGG1 gehört zu den bifunktionellen Glykosylasen, die zum einen die N-glykosidische Bindung hydrolytisch spalten und anschließend den Phosphatrest an der entstandenen AP-Läsion entfernen (NASH et al. 1997a). Dabei weist OGG1 nicht zu allen 8-oxoGs die gleiche Affinität auf, vielmehr scheint die Detektion und das Herausschneiden der Base von der umgebenden Nukleotidsequenz abhängig zu sein (ALLGAYER et al. 2013). (KITSERÁ et al. 2011) konnten zeigen, dass die durch Prozession von 8-oxoG entstehenden Intermediate die Transkription blockieren.

Unter den eukaryotischen Organismen ist OGG1 von Hefe bis Mensch evolutionär konserviert geblieben (ABURATANI et al. 1997; BJORÁS et al. 1997; LU et al. 1997; RADICELLA et al. 1997; ROLDÁN-ARJONA et al. 1997; ROSENQUIST et al. 1997). In Prokaryoten übernimmt hingegen die Formamido-Pyrimidin-Glykosylase (Fpg) die Aufgabe von OGG1 (BOITEUX et al. 1987).

Das humane OGG1-Gen ist auf Chromosom 3 lokalisiert (RADICELLA et al. 1997). Durch alternatives Splicen des C-Terminus existieren verschiedene Splice-Varianten. Diese können anhand ihres letzten Exons in 2 Gruppen eingeteilt werden: Typ 1 ( $\alpha$ -OGG1) und Typ 2 ( $\beta$ -OGG1). Der N-Terminus, welcher für das mitochondriale Targeting verantwortlich ist, ist allen Varianten gemein.  $\alpha$ -OGG1 ist hauptsächlich im Nukleus zu finden, während  $\beta$ -OGG1 nur in Mitochondrien vorkommt (NISHIOKA et al. 1999). Eine Glykosylaseaktivität konnte bisher nur für  $\alpha$ -OGG1 nachgewiesen werden (HASHIGUCHI et al. 2004).

Das humane OGG1 Protein ist ubiquitär in allen Geweben verteilt (RADICELLA et al. 1997). Untersuchungen zur Abhängigkeit der Expression vom Zellzyklus zeigten, dass OGG1 in Zellkultur als eine Art *Housekeeping* Gen gleichbleibend exprimiert wird (DHÉNAUT et al. 2000). In Abhängigkeit von genotoxischen Agenzien ist teilweise eine Regulation der Transkription beobachtet worden. In Kolorektalkarzinomazellen (HCT116) konnte beispielsweise eine Zunahme der Expression von mRNA und Protein nach MMS- jedoch nicht nach Wasserstoffperoxid-Exposition gezeigt werden (LEE et al. 2004). Ein induzierender Effekt auf OGG1 mRNA-Ebene wurde ebenfalls für ionisierende Strahlung in Lungengewebe von Mäusen beschrieben (RISOM et al. 2003). Eine gegenteilige Regulation der OGG1 mRNA sowie Proteinmenge konnte unter Einfluss von Estrogen in Mammakarzinomen von Ratten (SINGH et al. 2013) und Silbernanopartikeln in humanen Chang-Leberzellen (PIAO et al. 2011) beobachtet werden.

Als verantwortliche Transkriptionsfaktoren zur Regulation der Genexpression werden NF-YA (Nukleärer Transkriptionsfaktor Y Untereinheit Alpha) (HABIB et al. 2008; LEE et al. 2004), AP4 (*activator protein 4*) (HABIB et al. 2010) sowie Nrf2 (*nuclear respiratory factor 2*) (SINGH et al. 2013; PIAO et al. 2011) diskutiert.

Fehlendes OGG1 führt zu einer Akkumulation basaler 8-oxoG-Spiegel; zu beobachten in Hepatozyten von *Ogg1*<sup>-/-</sup> Mäusen (KLUNGLAND et al. 1999; OSTEROD et al. 2002). Zusätzlich zeigen diese Mäuse eine Erhöhung charakteristischer G:C nach T:A Transversionen jedoch keine erhöhte Tumorzinzidenz (KLUNGLAND et al. 1999). Erst nach Provokation durch Einsatz des Peroxisom-Proliferators WY-14,643 in reparaturdefizienten *Csb*<sup>m/m</sup>/*Ogg1*<sup>-/-</sup> Mäusen wurden präneoplastische Läsionen in der Leber vermehrt detektiert (TRAPP et al. 2007b). In der Bevölkerung existiert ein Ser326Cys-Polymorphismus des *hOgg1*-Gens. Beobachtung bezüglich einer Korrelation zwischen dem Polymorphismus und einer erhöhten Tumorzinzidenz sind bisher inkonsistent (KARAHALIL et al. 2012). Das Vorhandensein von OGG1 schützt nicht allein vor 8-oxoG-induzierter Mutagenese. Vielmehr weisen Tumore von Patienten mit Mutation im MUTYH-Gen eine erhöhte Rate von G:C nach T:A Transversionen auf (AL-TASSAN et al. 2002). Das MUTYH-Gen codiert für eine monofunktionelle Glykosylase, die in der Lage ist, Adenin fehlgepaart gegenüber von 8-oxoG auszuschneiden (DAVID et al. 2007). Somit wird die Transversion von G:C nach T:A verhindert und OGG1 bekommt erneut die Chance zum Entfernen von 8-oxoG. Sind beide Enzyme jedoch nicht vorhanden, wie in *Muth*<sup>-/-</sup> *Ogg1*<sup>-/-</sup> Mäusen, wird eine deutlich erhöhte Tumorzinzidenz beobachtet (RUSSO et al. 2004; XIE et al. 2004).

### 1.5.3 Nukleotidexzisionsreparatur (NER)

Die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) ist verantwortlich für die Entfernung voluminöser DNA-Schäden, die zu einer Distorsion der DNA-Helix führen. Zu diesen „*bulky lesions*“ gehören beispielsweise durch UV-Licht induzierte Cyclobutanpyrimidin-Dimere (CPDs) und 6-4 Photoprodukte sowie viele durch Chemikalien erzeugte DNA-Addukte (URA & HAYES 2002). 2 Wege der Nukleotidexzisionsreparatur lassen sich unterscheiden; die Globale Genom Reparatur (GGR), welche im gesamten Genom aktiv ist, sowie die Transkriptionsgekoppelte Reparatur, welche nur im transkribierten DNA-Strang arbeitet (HANAWALT 2002).

Die Initiierung der GGR erfolgt durch die Erkennung einer Distorsion der Doppelhelix durch den XPC/HR23B/Cen2 Komplex (Xeroderma Pigmentosum Protein C / human homolog of yeast Rad23 / Centrin 2) (ARAKI et al. 2001). Für die Detektion von weniger Helix-verändernden DNA-Schäden, wie z.B. CPDs (KIM et al. 1995), wirkt der UV-DDB (*UV-damaged DNA binding*) Komplex zusätzlich als Verstärker und vereinfacht somit die

Erkennung durch XPC (SUGASAWA 2011). Nagerzellen zeigen eine defiziente GGR, da sie über kein p48 verfügen, welches eine Komponente des UV-DDB-Komplexes ist (TANG et al. 2000). Im Anschluss an die Schadenserkenkung wird der Transkriptionsfaktor TFIIH (Transkriptionsfaktor IIH), ein Komplex bestehend aus 10 Untereinheiten, rekrutiert. Die in diesem Komplex enthaltenen Helikasen XPD und XPB entwinden dann die Doppelhelix (WINKLER et al. 2001), so dass die Endonukleasen XPG und ERCC1-XPB den Strang einschneiden und ein Oligomer von etwa 25 bis 30 Nukleotiden, abhängig von der Läsion, entfernen. Die entstehende Lücke wird anschließend durch Pol  $\delta$  oder  $\epsilon$  (POPANDA & THIELMANN 1992) in Zusammenarbeit mit PCNA aufgefüllt und durch Ligase III und XRCC1 (MOSER et al. 2007), teilweise auch durch Ligase I, geschlossen.

Die TCR unterscheidet sich zur GGR nur durch die Schadenserkenkung. Diese erfolgt hier durch eine blockierte RNA Polymerase II, welche weitere Reparatur-relevante Proteine (z.B. TFIIH, XPA, RPA, XPG und XPF) zum DNA-Schaden rekrutiert (LAINÉ & EGLY 2006). Durch die Proteine CSA und CSB (Cockayne syndrome protein A, B) wird die RNA Polymerase II entfernt und die Reparatur verläuft anschließend analog zur GGR.

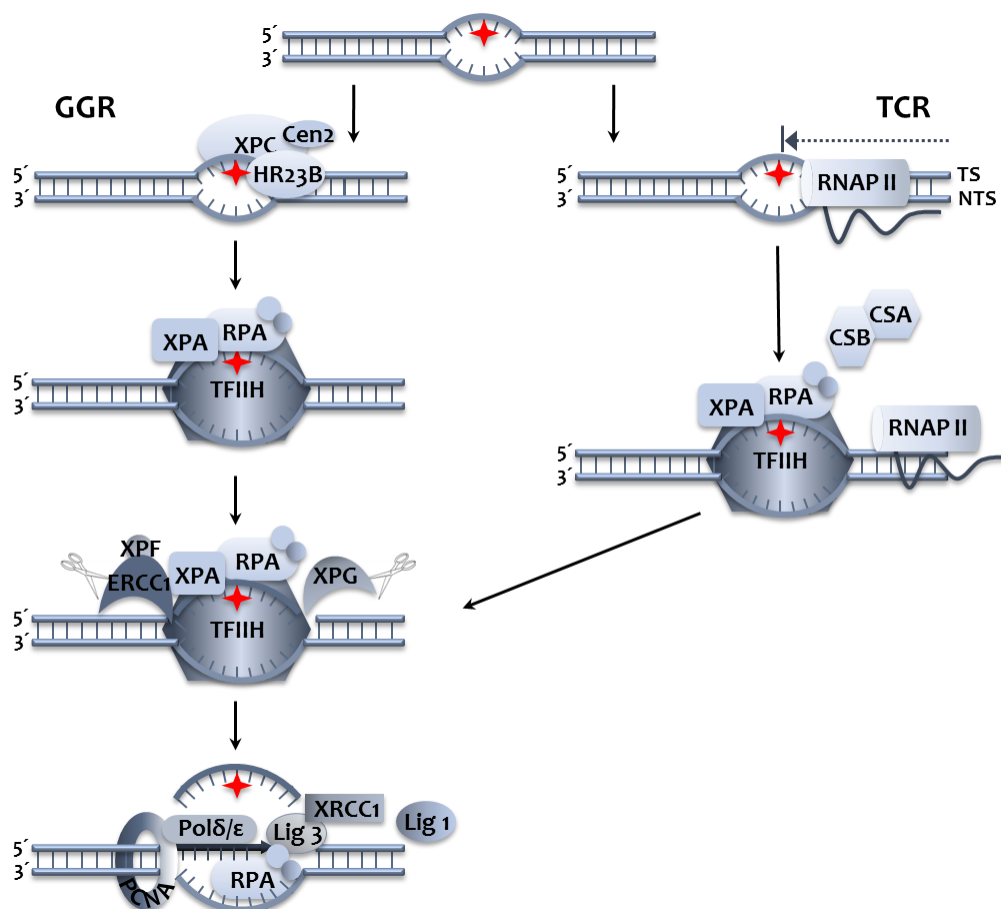


Abbildung 1-12 vereinfachte Darstellung der Nukleotidexzisionsreparatur (NER), nach (NOUSPIKEL 2009)

### 1.5.4 Einzelstrangbruchreparatur

Einzelstrangbrüche (SSB) der DNA können verschiedenste Ursachen haben. So entstehen SSB zum einen durch Reaktion mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), die direkt die DNA angreifen, und zum anderen als Intermediate enzymatischer Reaktionen während der BER, Replikation sowie Transkription (CALDECOTT 2003). Unreparierte SSB, insbesondere an der Replikationsgabel, können zu Doppelstrangbrüchen führen, die ein hohes zytotoxisches und mutagenes Potential haben.

Die Initiierung der SSB-Reparatur erfolgt über die Bindung von Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP 1) an den Einzelstrangbruch. Daraufhin wird PARP 1 aktiviert und synthetisiert ADP-Ribose-Polymere (MURCIA & MÉNISSIER DE MURCIA 1994). Dadurch kommt es zur Rekrutierung des XRCC1/LigIII $\alpha$ -Komplexes zum Schaden (LEPPARD et al. 2003) und PARP 1 kann im Anschluss ab dissoziieren. XRCC1 fungiert nun als Plattformprotein für weitere Reparaturproteine. Um den SSB wieder ligieren zu können, muss ein 3'OH- sowie ein 5'Phosphat-Rest vorliegen. Sofern das nicht der Fall ist, können die notwendigen Prozessierungsarbeiten von Pol  $\beta$  (MATSUMOTO & KIM 1995), APE (DEMPLE & HARRISON 1994), PNKP (Polynukleotid-Kinase-Phosphatase) (WEINFELD et al. 2011) oder Aprataxin (AHEL et al. 2006) erfolgen. Anschließend kann die Reparatur über Pol  $\beta$  (*short-patch* oder *long-patch*) oder Pol  $\delta$  bzw.  $\epsilon$  (*long-patch*) abgeschlossen werden (CALDECOTT 2003).

### 1.5.5 Postreplikative Reparatur (*mismatch* Reparatur)

Die *mismatch* Reparatur (MMR) dient der Entfernung fehlgepaarter oder zusätzlicher Basen aus dem Genom, die durch Fehler während der Replikation entstehen (MARTI et al. 2002). Diese Fehlpaarungen sind meistens auf inkorrekt arbeitende Polymerasen sowie DNA-Basenmodifikationen zurückzuführen (KUNZ et al. 2009).

Die MMR ist ein essentieller Reparaturweg zur Erhaltung der genomischen Stabilität. Purin-Pyrimidin-Fehlpaarungen können unrepariert zu Transitionsmutationen führen während Purin-Purin- sowie Pyrimidin-Pyrimidin-Fehlpaarungen Transversionsmutationen entstehen lassen können (KUNZ et al. 2009). Komplexe aus den MMR-Proteinen MutS, MutH und MutL erkennen diese Fehlpaarungen, schneiden sie heraus und ermöglichen anderen Enzymen eine weitere Prozessierung (MARTI et al. 2002). Mutationen in diesen MMR-Genen beim Menschen gehen einher mit einer erhöhten Tumorzinzidenz (PELTOMÄKI 2003; GALIATSATOS & FOULKES 2006; RUSTGI 2007).

### 1.5.6 Doppelstrangbruchreparatur

Doppelstrangbrüche (DSB) in der DNA werden endogen über reaktive Sauerstoffspezies des Zellmetabolismus, kollabierte Replikationsgabeln oder Nukleasen sowie exogen über ionisierende Strahlung oder in der Krebstherapie eingesetzte Chemotherapeutika generiert (SHRIVASTAV et al. 2008). Nicht reparierte DSB führen zu Chromosomenaberrationen bis hin zum Zelltod. Um die genomische Stabilität zu erhalten, stehen in der Zelle zur Beseitigung von DSB komplexe Signaltransduktionswege, Zellzyklus-Checkpoints sowie DNA-Reparaturwege zur Verfügung (O'DRISCOLL & JEGGO 2006).

Die Reparatur von DSB erfolgt in der Zelle entweder über Nicht-homologes Endjoining (NHEJ) oder Homologe Rekombination (HR). Bei dem NHEJ werden die getrennten DSB-Enden ohne Nutzung einer homologen DNA-Sequenz als Matrize direkt miteinander verknüpft und können so vermehrt zu kleineren Deletionen in der DNA-Sequenz führen (KHANNA & JACKSON 2001). Die HR gilt hingegen als weniger fehlerbehaftet, da sie eine homologe Sequenz der Schadensregion voraussetzt (PARDO et al. 2009). Die HR steht allerdings auch nur in der S-Phase (insbesondere an der Replikationsgabel) und G<sub>2</sub>-Phase des Zellzyklus zur Verfügung, während die Prozessierung von DSB durch NHEJ über den gesamten Zellzyklus erfolgen kann (TAKATA et al. 1998).

## 1.6 DNA-Reparatur in humanen Lymphozyten

Periphere Blutlymphozyten werden oftmals zur Untersuchung verschiedenster Biomarker in epidemiologischen Studien eingesetzt. Sie sind ein sehr leicht zugängliches humanes Probenmaterial, das aus peripherem Blut isoliert werden kann. Durch die Zirkulation im ganzen Organismus ist anzunehmen, dass ihr zellulärer sowie metabolischer Zustand die Exposition des gesamten Körpers widerspiegelt. Daher existieren bereits eine Reihe von Untersuchungen in humanen Lymphozyten in Bezug auf ihre DNA-Reparaturkapazität, oft mit dem Versuch, diese mit der Krebsinzidenz in Zusammenhang zu bringen. Im Folgenden soll ein Überblick über bereits publizierte Daten zur DNA-Reparatur in humanen Lymphozyten gegeben werden, mit Fokus auf die Basenexzisionsreparatur.



### 1.6.1 Basenexzisionsreparatur in humanen Lymphozyten

Eine direkte Entfernung von Basenmodifikationen konnte für Lymphozyten bisher nicht gezeigt werden. Zum Nachweis der BER-Aktivität in humanen Lymphozyten wurden bislang nur Ergebnisse indirekter in vitro Assays publiziert. Hauptsächlich wird hierbei mit verschiedensten Techniken die Aktivität eines Zellextraktes humaner Lymphozyten an einem DNA-Substrat mit einer spezifischen Läsion, vorzugsweise 8-oxoG, gemessen:

#### **Cleavage-Assay**

Hierbei wird ein Oligonukleotid, welches ein 8-oxoG beinhaltet, konstruiert und mit radioaktivem  $^{32}\text{P}$  markiert. Nach Inkubation mit dem Zellextrakt können die Produkte des geschnittenen Oligonukleotids mittels PAGE aufgetrennt und über Phosphoimaging sichtbar gemacht werden. Somit kann auf die Glykosylaseaktivität des Zellextraktes geschlossen werden (ROLDÁN-ARJONA et al. 1997). Paz-Elizur et al. validierten diese Methode für epidemiologische Studien in humanen Lymphozyten und konnten Schwankungen der OGG1-Glykosylaseaktivität zwischen 120 Individuen um das fast 3-fache zeigen (PAZ-ELIZUR et al. 2007).

#### **Relaxationsassay**

Bei diesem Assay werden ebenfalls spezifische DNA-Modifikationen in ein superhelikales Plasmid eingefügt. Bei Inkubation mit einem Zellextrakt wird die Läsion durch die Glykosylase erkannt und ausgeschnitten. Es entsteht ein Einzelstrangbruch, der das Plasmid in eine relaxierte Form überführt. Diese kann durch Agarosegelelektrophorese von der ungeschnittenen, superhelikalen Form getrennt werden (siehe auch 3.2.10). Redaelli et al. konnten so die AP-Endonukleaseaktivität in humanen Lymphozyten untersuchen und interindividuelle Schwankungen um das 2,5-fache zeigen (REDAELLI et al. 1998). Ein Vergleich der Aktivität der Zellextrakte von 64 Individuen in Plasmiden, geschädigt mit Singulett-Sauerstoff oder Hydroxylradikalen, weist sogar einen interindividuellen Unterschied um das 10-fache auf (ASTLEY et al. 2004).

#### **Modifizierter Comet-Assay**

Bei dieser Methode werden HeLa-Zellen mit dem Photosensibilisator Ro19-8022 und Licht geschädigt und anschließend in ein Agarosegel gebettet. Die Zellen werden lysiert und die zurückbleibende geschädigte DNA wird mit Zellextrakten von Lymphozyten inkubiert (COLLINS et al. 2001). Je höher die Aktivität des jeweiligen Extraktes ist, desto mehr 8-oxoG wird durch OGG1 erkannt, entfernt und in Einzelstrangbrüche umgewandelt. Bei der sich anschließenden alkalischen Gelelektrophorese führen Einzelstrangbrüche zu einem Kometen, der fluoreszenzmikroskopisch detektiert wird und dessen Größe der Zahl der Strangbrüche

proportional ist. Collins et al. zeigten mit dieser Technik einen interindividuellen Unterschied der Reparaturaktivität um das 4-fache in 35 Individuen (COLLINS & GAIVÃO 2007).

Auch der modifizierte Cometassay ist wiederum nur eine Messung der Glykosylaseaktivität von Lymphozytenextrakten. Die Entfernung von induzierten oxidativen Basenmodifikationen direkt in Lymphozyten wurde bisher nicht gezeigt. Auch die Bestimmung von OGG1 mRNA-Leveln in humanen Lymphozyten gibt keinen direkten Aufschluss über die Reparatur von 8-oxoG diesen Zellen.

## 1.6.2 Vergleich der DNA-Reparatur in primären und PHA-stimulierten Lymphozyten

### Basenexzisionsreparatur

Im Vergleich von primären mit PHA-stimulierten Lymphozyten gibt es Hinweise, dass eine Aktivierung von Lymphozyten mit PHA die DNA-Reparaturkapazität steigern kann. Bezüglich OGG1 mRNA-Level konnte eine Erhöhung in Abhängigkeit von einer PHA-Stimulation bereits gezeigt werden. Allerdings wurde dabei auf eine Bestätigung auf Proteinebene sowie über die Glykosylaseaktivität verzichtet. Diesbezüglich wurde nur ein Anstieg in EBV-transformierten Lymphozyten, jedoch nicht in PHA-stimulierten Lymphozyten, im Vergleich zu primären Lymphozyten gezeigt (MAZZEI et al. 2011). Zu diesem Punkt ist anzumerken, dass es sich bei EBV-transformierten Zellen um immortalisierte B-Lymphozyten handelt, während PHA-stimulierte Zellen ausschließlich vorübergehend aktivierte T-Zellen darstellen. Für AP-Läsionen konnte in einem In vitro BER-Assay gezeigt werden, dass primäre Lymphozyten im Vergleich zu PHA-stimulierten Lymphozyten eine geringere Aktivität aufweisen. Scheinbar läuft eine Reparatur von AP-Läsionen in Extrakten von primären Lymphozyten nur über *short patch* BER, während proliferierende PHA-stimulierte Lymphozytenextrakte auch *long patch* BER Aktivitäten zeigen (AKBARI et al. 2009).

Somit konnte ein Vergleich der Entfernung von oxidativen Basenmodifikationen aus der genomischen DNA in lebenden primären und PHA-stimulierten Lymphozyten bisher nicht gezeigt werden.

### Reparatur von Einzel- und Doppelstrangbrüchen

Es konnte als Antwort auf entstehende Doppelstrangbrüche (DSB) nach  $\gamma$ -Strahlung gezeigt werden, dass PHA-stimulierte Lymphozyten deutlich mehr  $\gamma$ H2AX-Foci bilden als unstimulierte (HAMASAKI et al. 2007; VILASOVÁ et al. 2008). Inwieweit, dies eine unterschiedliche Induktion von DSB oder aber eine veränderte Reparatur widerspiegelt, bleibt zu diskutieren. Allerdings scheint die Mutationsfrequenz nach  $\gamma$ -

Strahlung deutlich in zuvor PHA-stimulierten Lymphozyten gesenkt zu sein (SANDERSON & MORLEY 1986). Bezüglich der Reparatur von Einzelstrangbrüchen (SSB) nach  $\gamma$ -Strahlung existieren unterschiedliche Daten. Während Lavin und Boerrigter eine schnellere Abnahme induzierter Einzelstrangbrüche in PHA-stimulierten Lymphozyten zeigen konnten (LAVIN & KIDSON 1977; BOERRIGTER & VIJG 1992), stellten Mayer et al. keinen Unterschied zwischen primären und PHA-stimulierten Lymphozyten fest (MAYER et al. 2002).

### **Nukleotidexzisionsreparatur**

Für die Entfernung von durch UV-Strahlung induzierter CPDs konnte bereits eine schnellere Reparatur für PHA-stimulierte Lymphozyten im Vergleich zu primären Lymphozyten über UDS (*unscheduled DNA synthesis*) gezeigt werden (FREEMAN & RYAN 1988; GENTER et al. 1984). Genauer betrachtet sind primäre B-Lymphozyten in der Lage CPDs nur in aktiven Genen zu reparieren. Während innerhalb von 24 h 80 % der CPDs in transkribierten Genen repariert werden können, ist über den gleichen Zeitraum keine Reparatur von CPDs über die GGR detektierbar; dies ist nur über Stimulation der Zellen möglich. Bei Schadensinduktion in primären B-Lymphozyten und anschließender Stimulation treten vermehrt Punktmutation in Genen auf, die in primären Zellen nicht aktiv sind und somit auch nicht über die TCR repariert werden. Somit ist möglicherweise die Wiedergewinnung der GGR in stimulierten B-Lymphozyten zu langsam, um vor der Replikation den Schaden zu beseitigen (HYKA-NOUSPIKEL et al. 2011).

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es zunächst die Reparatur oxidativer DNA-Schäden (u.a. 8-oxoG) in primären humanen Lymphozyten verschiedener Spender zu untersuchen. Hierzu wurden primäre humane Lymphozyten aus Buffy Coats isoliert und die Reparatur *ex vivo*-induzierter, oxidativer DNA-Schäden mittels Alkalischer Elution untersucht.

Als Teil des Immunsystems können T-Lymphozyten durch bestimmte Antigene über ihren T-Zell-Rezeptor aktiviert werden (siehe 1.1.2). Ob diese Aktivierung humaner Lymphozyten eine Modulation der Reparatur oxidativer DNA-Schäden hervorrufen kann, sollte ebenfalls Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit sein. Diese Form der Aktivierung primärer Lymphozyten sollte *ex vivo* durch den Einsatz des Mitogens Phytohämagglutinin (PHA) nachgeahmt werden (siehe 1.1.3). Um eine Regulation der DNA-Reparatur in Abhängigkeit von einer PHA-Stimulation untersuchen zu können, sollte neben dem Vergleich der Reparaturkapazitäten primärer und aktivierter (PHA-stimulierter) Lymphozyten ebenfalls die Expression von OGG1, der Reparatur-initiiierenden Glykosylase, untersucht werden.

Abschließend sollte überprüft werden, ob eine PHA-Stimulation sich ähnlich wie auf die Reparatur oxidativer DNA-Schäden auch auf andere DNA-Reparaturwege auswirkt. Daher sollte die Reparatur von Einzelstrangbrüchen und Cyclobutanpyrimidin-Dimeren in primären und PHA-stimulierten Lymphozyten verglichen werden, welche durch andere Reparaturmechanismen als oxidative DNA-Schäden entfernt werden (siehe 1.5). Vergleichend wurde stets eine unabhängige immortalisierte EBV-transformierte B-Lymphozytenzelllinie herangezogen.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

Autoklav	Technoclav 50 6.0 bzw. 2.0 (Fedegari Autoclav SPA, Albuzzo, Italien)
Autoradiographiekassette	Typ G (Rego, Augsburg)
Brutschränke	CO <sub>2</sub> -Inkubator BB16, BB6060 O <sub>2</sub> und Hera-Cell (Heraeus Instruments, Hanau)
Coulter Counter	Z2TM (Beckman Coulter, USA)
Destillations-Apparatur	Destamat® (Heraeus, Hanau)
Durchflusszytometer	FACScalibur FACS System (Becton Dickinson, Heidelberg)
Filterpapier	Gel Blot Paper, 15 x 20 cm (GE Healthcare Europe)
Fluorimeter	TKO 100, DNA Fluorimeter (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA), SFM 25 Fluorimeter (Kontron Instruments, Zürich, Schweiz)
Fraktionssammler	Ultrorac 2070 II (Pharmacia / LKB, Uppsala, Schweden) und MM 10, Neolab 4 mit Zeitnehmer SM 999 (Neolab, Heidelberg)
Gefrierschrank (-20 °C)	KG 3666-23 (Liebherr)
Gefrierschrank (-80 °C)	Colora UF 85-300S (Colora, Lorch)
Geldokumentationssystem	BioRad Gel Doc 1000 (v 2.1, 1995, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Gelelektrophoresekammer (SDS-PAGE)	MGV-202 (C.B.S. Scientific, Kalifornien, USA)
Gelelektrophoresekammer (Agarosegel)	(Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)

---

Halogenlampe	Osram SLG 1000-Studio (Osram, München) mit Flecta Halogen Mini-Brenner (Reflekta)
Lichtmikroskop	Telaval 31 (Zeiss, Oberkochen)
Magnetrührer	Ikamag RET-G (Ika-Werk, Janke & Kunkel, Staufen i. Br.)
Microplatereader	Victor™ X5 (PerkinElmer, Rodgau)
Mikrowelle	Micromat 175 Z (AEG) und Dimension 4 (Panasonic Service, Wiesbaden)
PCR-Cycler	TGradient Thermocycler Biometra®; (Biometra, Göttingen)
Peristaltikpumpe	ISM 759 (Ismatec Laboratoriumstechnik, Schweiz)
pH-Meter	PHM 62 (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark)
Pipetten	Pipetman P 20, P 100, P 200, P 1000, P 5000 und P 10000 (Gilson, Frankreich)
Pipettierhilfe	pipetus®-akku (Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)
Powersupply	PowerPac Basic (Bio-Rad Laboratories GmbH)
Realtime-PCR-Cycler	Lightcycler® 1.5 Real Time PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim)
Schüttler	Orbit LS (Labnet, Ried im Innkreis, Österreich)
Spectrophotometer	Biochrom WPA S2100 Diode Array (Whatman Biometra, Göttingen)
Sterile Werkbank	Lamin Air® HB 2472 und HB 2448 (Heraeus Instruments, Hanau)
Thermostat für Haake	W19 Haake D8 (Haake, Karlsruhe)
Tischschüttler	GFL 3015 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)

Tischzentrifuge	Galaxy Mini (VWR International, Darmstadt)
Transferkammer	Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA)
Trockenschrank	(Heraeus Instruments, Hanau)r
UV-B Lampe	TL20W/12RS (Philips Licht, Hamburg)
UV-Sensor	UV-B (Dr. Gröbel UV-Elektronik GmbH, Ettlingen)
Vortexer	Vortex Genie 2, Model G-560E (Scientific Industries, Bohemia, N.Y., USA)
Waagen	PB 3002, Delta Range, max. 3100g (Mettler Toledo, Schweiz) AG 245, max. 210g (Mettler Toledo, Schweiz)
Wasserbäder	Köttermann Type 3042 (Köttermann, Uetze-Hänigsen, Deutschland)
Zählkammer nach Neubauer	(Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen)
Zentrifugen	Hettich Micro Rapid/K, Hettich Universal/K2S (Hettich, Tuttlingen), Labofuge 400R mit Ausschwingrotor (Heraeus)

### 3.1.2 Software

Durchflusszytometersoftware	CellQuest™ Pro Software (Becton Dickinson, Heidelberg)
Gel-Analysesoftware	Image Lab™, Version 3.0 (Bio-Rad)
PCR-Primer-Design Software	Primer Blast ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a> ); Primer Designer 4, Version 4.10, Scientific & Educational Software (Cary, North Carolina, USA)

Lightcycler® Software Version 3.5.3 (Roche Diagnostics; Mannheim)

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Blotting-Film	Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare Europe)
Coulter Counter Döschen	Beckman Coulter, USA
EDTA-Monovetten	S-Monovetten® 9 ml K3E (Sarstedt, Nümbrecht)
Filterhalter (Alkalische Elution)	Swinnex SX 2500 (Millipore, Schwalbach)
Glasgeräte	Schott Spezialglas GmbH, Mainz
Glaspipetten (Zellkultur)	Hartenstein, Würzburg
Kryo-Röhrchen, steril	Nunc Kryo, 1,5 ml (Nunc A/S, Roskilde, Dänemark)
Membranfilter (Alkalische Elution)	Isopore Membranfilter, 2 µM (Millipore Schwalbach)
Nitrocellulosemembran	Hybond™-C Extra (Amersham Biosciences)
Pasteurpipetten	Hartenstein, Würzburg
Plastikpipetten, steril (5, 10 und 25ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (10, 200 und 1000µl)	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen (5 und 10 ml)	Hartenstein, Würzburg
Pipettenspitzen mit Filter	ART® (Thermo Scientific, Dreieich)
Safelock® Caps	Eppendorf, Hamburg
Spritzen (Alkalische Elution)	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen, Plastik	Greiner Bio-One, Frickenhausen



### 3.1.4 Chemikalien

30 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Stammlösung Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose (Typ I, low EEO)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Aktivkohle	Merck, Darmstadt
Albumin Fraktion V, proteasefrei	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat	Carl Roth, Karlsruhe
BIORAD Protein Assay	Bio-Rad, Hercules, USA
Bisbenzimid (Hoechst No. 33258)	Sigma Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe
cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics, Mannheim
DEPC	Carl Roth, Karlsruhe
DMSO	Sigma Aldrich, Steinheim
Eichlösungen (pH 5, 7, 8, 10, 11)	Merck, Darmstadt
EDTA	Carl Roth, Karlsruhe
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth, Karlsruhe
Entwickler	Ilford, England
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol, technisch	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe
FCS	PAA Laboratories, Cölbe (GE Healthcare Europe GmbH)
Ficoll	Biochrom, Berlin
Fixierer Rapid Fixer	Ilford, England
Formaldehyd, 36 %	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycerol	Sigma Aldrich, Steinheim

---

Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Isoton II-Lösung	Beckman Coulter, Krefeld
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kinder Schokolade	Ferrero, Frankfurt am Main
Kohlendioxid für Brutschränke	Linde, Höllriegelskreuth
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natrium-Deoxycholat	Sigma Aldrich, Steinheim
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid, 50 mM	Life Technologies GmbH, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Orange G	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAA Laboratories, Cölbe (GE Healthcare Europe GmbH)
Phytohämagglutinin L (PHA L) lyophilisiert, für 5 ml	Biochrom, Berlin
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich, Steinheim
Platinum <sup>®</sup> Tfi Reaction buffer, 5fach	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Ponceau S	Sigma Aldrich, Steinheim
Propidiumjodid	Sigma Aldrich, Steinheim
Proteinase K	Carl Roth, Karlsruhe
RPMI 1640	PAA Laboratories, Cölbe (GE Healthcare Europe GmbH)
Salzsäure, 37 %	Merck, Darmstadt
SDS-Pellets	Carl Roth, Karlsruhe
Stickstoff, flüssig	Linde, Höllriegelskreuth

Sulfosalicylsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
TEAH	Merck, Darmstadt
TEMED	Carl Roth, Karlsruhe
Trichloressigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim
Trizol	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Trypanblau-Lösung, 0,4 %	Sigma Aldrich, Steinheim
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Wasserstoffperoxidlösung, 8,8 M	Sigma Aldrich, Steinheim
Western Lightning <sup>®</sup> -ECL	PerkinElmer, Rodgau

### 3.1.5 Kinaseinhibitoren

ERK-Inhibitor U-0126	Biomol, Hamburg
JNK-Inhibitor SP600125	Sigma Aldrich, Steinheim
p38-Inhibitor PD169316	Sigma Aldrich, Steinheim

### 3.1.6 Kits

RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Scientific, Dreieich
Light Cycler <sup>®</sup> FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim

### 3.1.7 Enzyme

Endonuklease IV (Endo IV)	Thermo Scientific, Dreieich
Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Rohextrakt)	aus E. coli; hergestellt von D. Warken nach (BOITEUX et al. 1990)

Katalase	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
OGG1	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Proteinase K (lyophilisiert)	Carl Roth, Karlsruhe
Ribonuclease A (RNase)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tfi DNA Polymerase	Life Technologies GmbH, Darmstadt
T4-Endonuklease V	aus <i>E. coli</i> ; Präparation nach (NAKABEPPU et al. 1982), modifiziert durch Pflaum (PFLAUM 1996), hergestellt durch M. Pflaum bzw. C. Flohr und I. Schulz (Mainz)

### 3.1.8 DNA, Marker & Ladepuffer

dNTP-Mix, 10 mM each	Thermo Scientific, Dreieich
GeneRuler 100 bp DNA Ladder inclusive 6fach DNA Loading Dye (SM0241)	Thermo Scientific, Dreieich
Gene Ruler 100 bp Plus (SM0321)	Thermo Scientific, Dreieich
Kalbsthymus-DNA	Sigma Aldrich, Steinheim
PM2-Plasmid-DNA	Größe: 10000 bp; DNA des Bakteriophagen PM2; Präparation nach (SALDITT et al. 1972) von Ina Schulz, Mainz
2x RNA Loading Dye (Ro641)	Thermo Scientific, Dreieich

### 3.1.9 Primer

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

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

**Tabelle 3-1 Eingesetzte Primerpärchen (erstellt mittels PrimerBlast)**

Primer	Sequenz 5' → 3'	Template	Produktlänge
hOGG1 forward	GACTACAGCTGGCACCCCTAC	1175 – 1194	131
hOGG1 reverse	GCACTGAACAGCACCGCTTG	1305 – 1286	
hGAPDH forward	CTATAAATTGAGCCCCGAGCC	69 – 89	110
hGAPDH reverse	CCATGGTGTCTGAGCGATGT	178 – 159	
h18S forward	CTCCACAGGAGGCCTACAC	5 – 24	157
h18S reverse	CTTCGGCCCACACCCTTAAT	161 – 142	

### 3.1.10 Antikörper & Proteinmarker

β-Actin (C4) (sc-4778; Lot C3012) 1:2.000 in 0,1% TBST (1 % BSA)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg
OGG1 (rabbit mAb), (5104-1; Lot YIO 10702C) 1:40.000 in 0,1% TBST (1 % BSA)	Biomol GmbH, Hamburg
Goat anti rabbit IgG-HRP (sc-2004, Lot F1212) 1:2.000 in 0,1 % TBST (1 % BSA)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg
Goat anti mouse IgG-HRP (SC-2005, Lot A2312) 1:10.000 in 0,1% TBST (1 % BSA)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg
Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (26616)	Thermo Scientific, Dreieich

### **3.1.11 Zelllinien**

#### **3.1.11.1 Primäre humane Lymphozyten**

Primäre, humane Lymphozyten werden aus Buffy Coats der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz gewonnen. Die Isolation erfolgt mittels Dichtegradientenzentrifugation die ausführlich unter 3.2.2 beschrieben ist.

Buffy Coats entstehen bei der Aufarbeitung von Blutspenden. Die Blutspenden werden dafür zunächst durch Zentrifugation in 3 Teile separiert: überstehendes Plasma, ab sedimentierte Erythrozyten und den Buffy Coat, bestehend aus Thrombozyten, Monozyten, Lymphozyten sowie Reste von Plasma und Erythrozyten.

Jeder einzelne Buffy Coat wird nur aus der Blutspende eines Spenders hergestellt. Die Ausgabe der Buffy Coats erfolgt immer erst am Folgetag der Blutentnahme aufgrund von Freigabeproofungen. Bis zur Abholung werden die Buffy Coats bei 4 °C in der Transfusionszentrale gelagert. Primäre, humane Lymphozyten sind ausdifferenzierte Suspensionszellen, die keiner Zellteilung mehr unterliegen. Die gewählte Kultivierungsdauer liegt zwischen 1 bis 7 Tagen.

#### **3.1.11.2 PHA-stimulierte Lymphozyten**

Primären, humane Lymphozyten (3.1.11.1) werden hierfür nach der Isolation 72 h mit PHA stimuliert (siehe 3.2.3). Eine weitere Kultivierung der Suspensionszellen erfolgt für 3 bis 4 Tage.

#### **3.1.11.3 EBV-transformierte Lymphozyten**

Hierbei handelt es sich um Lymphozyten, die durch eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) immortalisiert wurden. Diese Infektion betrifft ausschließlich B-Lymphozyten. Die Zelllinie wird intern als CC47 bezeichnet. Bereits publizierte Daten sind bei BRAVARD et al. 2009 zu finden.

### 3.1.12 Puffer, Lösungen & Medien

#### 3.1.12.1 Zellkultur

PBS/CMF pH 7,5 (autoklaviert)	137 mM 2,7 mM 6,5 mM 1,5 mM	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Kulturmedium für <i>primäre und PHA-stimulierte, humane Lymphozyten</i>	RPMI 1640 20 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg/ml)	
Kulturmedium für <i>EBV-transformierte Lymphozyten (CC47)</i>	RPMI 1640 15 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg/ml)	
Einfriermedium zur Kryokonservierung für <i>EBV-transformierte Lymphozyten (CC47)</i>	FCS 10 % DMSO	

#### 3.1.12.2 Stimulation primäre Lymphozyten mittels Phytohämagglutinin

PHA-Stammlösung (0,24 mg/ml)	1 Vial 5 ml	PHA L (1,2 mg Protein) steriles H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
------------------------------	----------------	--

#### 3.1.12.3 Zellzyklusbestimmung

DNA-Färbelösung	50 µg/ml 10 µg/ml in PBS/CMF	Propidiumjodid RNase
-----------------	------------------------------------	-------------------------

#### 3.1.12.4 Alkalische Elution

BE <sub>1</sub> pH 7,5 (autoklaviert)	20 mM 100 mM 1 mM	Tris NaCl Na <sub>2</sub> EDTA
pH-Wert mit konz. HCl einstellen		
BE <sub>1</sub> mit BSA	15 g 30 ml	BSA BE <sub>1</sub> pH 7,5

BE <sub>15</sub> pH 7,5 (autoklaviert)	20 mM 75 mM	Tris KCl
pH-Wert mit konz. HCl einstellen	15 mM	Na <sub>2</sub> EDTA
BE <sub>15</sub> mit BSA	15 g 30 ml	BSA BE <sub>15</sub> pH 7,5
Lysepuffer pH 10 pH-Wert mit 10 N NaOH einstellen	2 % 100 mM 20 mM	SDS Glycin Na <sub>2</sub> EDTA 2 H <sub>2</sub> O
Lysepuffer mit Proteinase K	40 mg 100 ml	Proteinase K Lysepuffer pH 10
Waschpuffer pH 10 pH-Wert mit 10 N NaOH einstellen	20 mM	Na <sub>2</sub> EDTA 2 H <sub>2</sub> O
Elutionspuffer pH 12,15 pH-Wert mit TEAH einstellen	20 mM	H <sub>4</sub> EDTA
Phosphatpuffer pH 6,0 (autoklaviert)	87,8 mM 12,2 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O
Phosphatpuffer pH 7,2 (autoklaviert) mit Bisbenzimid	28 mM 72 mM 1 % (v/v)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O Bisbenzimid (0,15 mM)
Zugabe der Bisbenzimid-Stammlösung erst kurz vor Benutzung, in Braunglasflasche.		
DNA Standard Lagerung der Aliquots: -20 °C, kurzzeitig: 4 °C	200 µg/ml in BE, pH 7,5	Kalbsthymus DNA
Bisbenzimid-Stammlösung Lagerung der Aliquots: -20 °C	0,15 mM in Aqua dest.	Bisbenzimid

### 3.1.12.5 DNA-Schadensinduktion (für Alkalische Elution)

Acridinorange-Stammlösung	10 mM in Aqua dest.	Acridinorange
Lagerung bei -20°C		



PBS Lösung I (autoklaviert)	3 mM 5,4 mM 274 mM 13 mM	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ KCl NaCl $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
--------------------------------	-----------------------------------	---

pH-Wert auf 7,4 einstellen (NaOH/HCl).

PBS Lösung II (autoklaviert)	1,8 mM 1 mM	$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
---------------------------------	----------------	--

Lösung I und II nach dem Autoklavieren vereinen.

### 3.1.12.6 PM2-Relaxationsassay

Fällungslösung F, pH 7,2	5 ml 95 ml	Natriumacetat (2,5 M) Ethanol
--------------------------	---------------	----------------------------------

TAE-Puffer, 10fach, pH 7,8 pH-Wert mit Essigsäure einstellen	400 mM 500 mM 100 mM	Tris Natriumacetat EDTA
---	----------------------------	-------------------------------

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

### 3.1.12.7 Western Blot

APS, 10% Lagerung der Aliquots: -20 °C	100 mg 1 ml	Ammoniumpersulfat Aqua dest.
---	----------------	---------------------------------

Blocking-Lösung	1,5 g ad 30 ml	BSA 0,1 % TBST
-----------------	-------------------	-------------------

Elektrophoresepuffer, 5-fach	15,1 g 94 g 25 ml ad 1l	Tris Glycin SDS 20 % Aqua dest.
------------------------------	----------------------------------	--

Laemmli-Puffer, 6-fach	8 ml	1 M Tris-HCl (pH 6,8)
	2 g	SDS
	10 ml	Glycerol
	Spatelspitze	Bromphenolblau
	1,4 ml	2-Mercaptoethanol
PMSF-Stammlösung (100 mM) Lagerung der Aliquots: -20 °C	175 mg	PMSF
	10 ml	Isopropanol
Ponceaurot, 10fach	2 g	Ponceau S
	30 g	Trichloressigsäure
	30 g	Sulfosalicylsäure
	ad 1l	Aqua dest.
Protease Inhibitor Cocktail 10fach Lagerung der Aliquots: -20 °C	1 Tablette	cOmplete
	1 ml	Aqua dest.
RIPA-Puffer Lagerung: lichtgeschützt bei 4-8 °C	1,25 ml	1M Tris-HCl (pH 7,4)
	3,75 ml	1M NaCl-Lösung
	250 µl	Triton-X100
	0,125 g	Natrium-Deoxycholat
	125 µl	20 % SDS
	250 µl	0,5 M EDTA
	ad 25 ml	Aqua dest.
PMSF-Lösung erst kurz vor Gebrauch zugeben (Endkonzentration 1 mM)		
SDS 20%	10 g	SDS
	ad 50 ml	Aqua dest.
Sammelgel	3,425 ml	Aqua dest.
	850 µl	30 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Lösung
	650 µl	1 M Tris (pH 6,8)
	25 µl	SDS 20 %
	50 µl	APS 10 %
	5 µl	TEMED
TBS, 10-fach (autoklaviert)	12,1 g	Tris
	87,8 g	NaCl
	ad 1l	Aqua dest.

TBST, 0,1 %	100 ml 1 ml ad 1l	TBS, 10-fach Tween 20 Aqua dest.
TBST, 0,5 %	100 ml 5 ml ad 1l	TBS, 10-fach Tween 20 Aqua dest.
Transferpuffer Lagerung: 4-8 °C	5,8 g 2,9g 200 ml ad 1l	Tris Glycin Ethanol Aqua dest.
Trenngel SDS-PAGE (10%)	3,85 ml 3,4 ml  2,6 ml 50 µl 100 µl 4 µl	Aqua dest. 30 % Acrylamid-, Bisacrylamid-Lösung 1,5 M Tris (pH 8,8) SDS 20 % APS 10 % TEMED

### 3.1.12.8 Quantitative RT-PCR

DEPC-Wasser	1 ml ad 1 l	DEPC Aqua dest.
Gut mischen durch mehrmaliges Umschütteln, über Nacht bei RT inkubieren und anschließend autoklavieren		
Ethanol, 75 % (v/v)	75 ml ad 100 ml	Ethanol abs. DEPC-Wasser
TAE-Puffer, 50fach, pH 7,8 pH-Wert mit Essigsäure einstellen	2 M 2,5 M 0,5 M	Tris Natriumacetat EDTA
TE-Puffer, pH 8,0	10 mM 1 mM	1 M Tris 0,5 M EDTA
Ladepuffer, 6fach	60 % v/v 40 % v/v 0,3 µg/µl	Glycerol TAE, 6fach Orange G

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

#### 3.2.1.1 Kultur von humanen Lymphozyten

Die Kultivierung aller eingesetzten Lymphozyten wird ausschließlich unter sterilen Bedingungen durch Nutzung einer Laminar-Air-Flow-Box durchgeführt. Ihre Inkubation im Zellkulturbrutschrank erfolgt stets bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 99 % Luftfeuchtigkeit. Bei den eingesetzten primären sowie immortalisierten, humanen Lymphozyten handelt es sich um Suspensionszellen. Zum Passagieren wird die gesamte Zellsuspension zunächst mit einer sterilen Glaspipette mehrmals resuspendiert und anschließend in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei 380 x g für 5 min. Der Überstand wird vorsichtig abgekippt und das Pellet wird vorsichtig in PBS/CMF resuspendiert. Es wird erneut zentrifugiert und das Pellet in Kulturmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Coulter-Counter kann die gewünschte Zellzahl durch Verdünnen mit Kulturmedium hergestellt werden. Die Zellsuspension wird in eine oder mehrere, vorzugsweise mittlere Zellkulturflaschen überführt und aufrecht im Zellkulturbrutschrank inkubiert. Die lymphoblastoide Zelllinie CC47 wurde alle 3 bis 4 Tage passagiert über maximal 4 Wochen. Die primären Lymphozyten wurden entweder direkt nach der Isolation eingesetzt und somit nicht weiter kultiviert oder analog zu den PHA-stimulierten Lymphozyten passagiert (siehe hierzu 3.2.3).

#### 3.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von humanen Lymphozyten

Zur Gewährleistung einer langfristigen Lagerung von Zelllinien wird die Kryokonservierung, die Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff, eingesetzt. Diese Methode wurde für diese Arbeit nur für die EBV-transformierten Lymphozyten angewendet. Hierzu sollten sich die einzufrierenden Lymphozyten kurz vor dem Einfrieren in einer exponentiellen Wachstumsphase befinden. Zunächst wird die Zellzahl, wie unter 3.2.1.3 beschrieben, bestimmt. Dann erfolgt ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 380 x g und 4 °C. Das Zellpellet wird dann sorgfältig in kaltem Einfriermedium (FCS, 10 % DMSO) resuspendiert und eine Zelldichte von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Die Zellsuspension wird auf spezielle Kryoröhrchen aufgeteilt und anschließend langsam eingefroren: mindestens 2 h bei -20 °C, über Nacht bei -80 °C und dann in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen der Zellen wird die gewünschte Anzahl an Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C weitestgehend aufgetaut und dann zügig in 9 ml kaltes Kulturmedium

überführt. Es folgt ein Zentrifugationsschritt bei  $380 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$  für 5 min. Der Überstand wird dann verworfen, das Pellet in 10 ml warmem Kulturmedium resuspendiert und in eine kleine Zellkulturflasche zum Kultivieren überführt. Die erste Passage erfolgt am darauffolgenden Tag wie unter 3.2.1.1 beschrieben.

Primäre Lymphozyten bzw. PHA-stimulierte Lymphozyten wurden für diese Arbeit nicht kryokonserviert, sondern maximal 7 Tage nach Isolation für Versuche eingesetzt.

### 3.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgt mittels Coulter Counter. Zunächst wird die zu bestimmende Zellsuspension primärer, PHA-stimulierter oder EBV-transformierter Lymphozyten vorsichtig mit einer 5 ml Pipette resuspendiert. Dann werden 9,8 ml Isoton-Lösung in ein entsprechendes Coulter Counter Döschen gefüllt und 200  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension zugegeben. Die Zellzahl wird vom Coulter Counter durch Doppelzählung ermittelt. Primäre und PHA-stimulierte Lymphozyten werden zwischen 5 und 15  $\mu\text{m}$  bestimmt, während EBV-transformierte Lymphozyten zwischen 7,5 und 20  $\mu\text{m}$  gezählt werden.

## 3.2.2 Lymphozytenisolation

### 3.2.2.1 Lymphozytenisolation aus Buffy Coats

Für die Isolation der Lymphozyten werden jeweils 15 ml eines Buffy Coats (Gesamtvolumen ca. 70 bis 80 ml) in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 30 ml kaltem PBS/CMF verdünnt. Anschließend werden 15 ml Ficoll-Lösung in neuen 50 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Diese werden dann vorsichtig mit 20 ml des verdünnten Buffy Coats überschichtet, so dass keine Verwirbelung der Schichten auftritt. Es folgt eine Zentrifugation bei 2300 U/min ( $1000 \times g$ ) für 15 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  im Ausschwingrotor und bei ausgeschalteter Bremse, um Verwirbelungen der Schichten zu vermeiden. Nach der Zentrifugation wird die oberste Schicht (Plasmaschicht) bis etwa 0,5 cm über dem deutlich abgegrenzten Ring mononukleärer Zellen (Lymphozyten und Monozyten) vorsichtig abgenommen (Abbildung 3-1). Mittels einer 1000  $\mu\text{l}$ -Pipette werden die mononukleären Zellen in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen werden mit 10 ml kaltem PBS/CMF gewaschen und erneut bei 2100 U/min ( $850 \times g$ ) für 5 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  mit Bremse zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet vorsichtig zunächst in 1 ml PBS/CMF resuspendiert und dann in weiteren 9 ml gewaschen. Im Anschluss wird bei 1400 U/min ( $380 \times g$ ) für 5 Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Der letzte Waschschrift wird zweimal wiederholt, um so Verschleppungen von Thrombozyten aus der

Plasmaschicht zu entfernen. Sollte nach dem letzten Waschschrift das Pellet noch deutlich von Erythrozyten gefärbt sein, so kann der Isolationschritt mit Ficoll wiederholt werden.

Um im weiteren Verlauf die isolierten Monozyten und Lymphozyten voneinander zu trennen bedient man sich der Adhäsion von Monozyten an Plastik. Hierzu werden die isolierten Zellen im Anschluss an die Zentrifugations- und Waschschrift in RPMI 1640 (20% FCS) resuspendiert und mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in große Zellkulturflaschen überführt. Diese werden für eine Stunde horizontal im Brutschrank gelagert. Danach sind die am Plastikboden der Zellkulturflaschen anhaftenden Monozyten deutlich zu erkennen. Der Überstand mit den Lymphozyten wird vorsichtig für die Weiterverwendung abgenommen und die Monozyten werden verworfen. Die so erhaltenen primären Lymphozyten können direkt verwendet werden oder mittels Phytohämagglutinin stimuliert werden.



**Abbildung 3-1 Isolierung mononukleärer Zellen aus Buffy Coats mittels Dichtegradientenzentrifugation**

### 3.2.2.2 Lymphozytenisolation aus EDTA-Blut

Um aus frischem EDTA-Blut eines Spenders ausreichend Lymphozyten zu gewinnen, werden 9 Monovetten Blut abgenommen. Für die Isolation werden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen 20 ml Ficoll-Lösung vorgelegt und dann vorsichtig mit 15 ml unverdünntem EDTA-Blut überschichtet. Die weitere Isolation verläuft wie unter 3.2.2.1 beschrieben.

### 3.2.3 Stimulation primärer Lymphozyten mittels Phytohämagglutinin

Frisch isolierte, primäre Lymphozyten können durch Zugabe von Phytohämagglutinin (PHA) zur Zellproliferation angeregt werden. Das eingesetzte PHA-L stimuliert selektiv nur die T-Lymphozyten. PHA gehört zu den Lektinen und kann durch Bindung von Glykomembranproteinen T-Lymphozyten miteinander vernetzen. Durch einen somit gesteigerten Informationsaustausch lassen sich die T-Lymphozyten zur Proliferation anregen.

Zur Stimulation wird die Zelldichte der isolierten Lymphozyten auf  $0,8 \times 10^6$  Zellen / ml Kulturmedium (20 % FCS) eingestellt. Die PHA-Stammlösung (240 µg/ml) wird im Verhältnis 1:100 zur Zellsuspension zugegeben. Somit ergibt sich eine Endkonzentration für PHA von 2,4 µg/ml. Die Stimulation erfolgt über 72 Stunden in großen Zellkulturflaschen, die horizontal im Brutschrank gelagert werden. Nach 12 Stunden sind bereits Agglomerate der stimulierten T-Lymphozyten erkennbar. Am Ende der 72 Stunden PHA-Stimulation werden die Zellsuspensionen zum Waschen in Zentrifugenröhrchen überführt. Hierbei ist darauf zu achten, dass wirklich alle Zellen erfasst werden. Die stimulierten Lymphozyten können teilweise in Agglomeraten am Boden der Zellkulturflaschen anhaften. Durch vorsichtiges Resuspendieren oder den Einsatz eines Zellkulturschabers können die Lymphozyten gelöst werden. Die Zellsuspension wird bei 1400 RPM (380 x g) 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet vorsichtig in PBS/CMF resuspendiert. Der Waschschrift wird einmal wiederholt. Dann wird das Pellet vorsichtig in Kulturmedium (RPMI, 20 % FCS) aufgenommen und die Zellen werden bis zu 72 Stunden weiterkultiviert. In dieser Zeit bleiben die T-Lymphozyten durch die vorhergehende Stimulation aktiviert und proliferieren weiterhin. Somit beträgt die maximale Kulturdauer der Lymphozyten 7 Tage.

### 3.2.4 Bestimmung der Proliferation von Lymphozyten

#### 3.2.4.1 Prinzip

Mit Hilfe des Proliferationsfaktors lässt sich ermitteln inwieweit eine Substanz oder eine Behandlungsmethode Einfluss auf das Zellwachstum hat. Hierfür werden Zellen mit einer Substanz behandelt und/oder bestrahlt und die Zellzahl zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung bestimmt. Durch den Vergleich mit einer unbehandelten Kontrolle lassen sich Rückschlüsse auf die Toxizität ziehen.

### 3.2.4.2 Durchführung

Um das Ausmaß der PHA-Stimulation in primären Lymphozyten zu bestimmen, wird der Proliferationsfaktor nach abgeschlossener Stimulation ermittelt. Hierfür werden isolierte Lymphozyten zunächst 72 Stunden mit PHA stimuliert (siehe 3.2.3). Im Anschluss wird das Stimulanz durch zweimaliges Waschen mit PBS/CMF entfernt (Zentrifugationsschritt:  $380 \times g$ , 5 min) und die Lymphozyten werden in RPMI-Medium (20 % FCS) resuspendiert. Zur Bestimmung des Proliferationsfaktors wird nun eine Zelldichte von  $2 \times 10^5$  Zellen je ml eingestellt und jeweils 10 ml davon in 2 kleine Zellkulturflaschen (Doppelbestimmung) pipettiert (Ausgangszellzahl  $t_0$ : ca.  $2 \times 10^6$ ). Unstimulierte Lymphozyten aus der gleichen Isolation werden parallel dazu behandelt. Die Zellkulturflaschen werden stehend im Brutschrank inkubiert. Über 4 Tage wird die Zellzahl alle 24 Stunden mittels Coulter Counter erfasst ( $t_{1-4}$ ). Da es sich hierbei um Suspensionzellen handelt, ist ein Ablösen der Zellen nicht notwendig. Vor jeder Zellzahlbestimmung werden die Zellsuspensionen sorgfältig mit einer 5-ml-Glaspipette resuspendiert und dann im Coulter Counter gezählt. Anschließend werden die Zellkulturflaschen weiter inkubiert. Somit sind keine separaten Ansätze für verschiedene Zeitpunkte notwendig. Der Proliferationsfaktor zu jedem gemessenen Zeitpunkt wird als Quotient aus der mittleren Zellzahl von  $t_{1-4}$  und der mittleren Zellzahl von  $t_0$  berechnet.

## 3.2.5 Bestimmung der Vitalität von Lymphozyten

### 3.2.5.1 Prinzip

Die Vitalität der untersuchten humanen Lymphozyten wird mittels Trypanblau-Ausschluss kontrolliert. Bei dieser Methode nutzt man eine veränderte Membrandurchlässigkeit toter Zellen aus, so dass Trypanblau in diese aufgenommen werden kann. Tote Zellen werden somit blau gefärbt, während lebende Zellen farblos bleiben.

### 3.2.5.2 Durchführung

50  $\mu$ l Zellsuspension werden mit 50  $\mu$ l Trypanblau-Lösung (0,4 %) vorsichtig in einem Cap durch mehrmaliges Resuspendieren gemischt und direkt in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Nun kann die Anzahl lebender und toter Zellen im Mikroskop bestimmt werden. Da Trypanblau selber zytotoxische Eigenschaften hat, sollte das Vermischen mit der Zellsuspension direkt vor der Auszählung erfolgen. Die Vitalität der Lymphozyten wurde direkt nach der Isolation, während der PHA-Stimulation und nach verschiedenen Schädigungsbedingungen untersucht.



## 3.2.6 Zellzyklusbestimmung

### 3.2.6.1 Prinzip

Während des Durchlaufens des Zellzyklus ändert sich der DNA-Gehalt der Zellen. Zur Untersuchung der Zellzyklusphasen werden die Zellen fixiert und ihre DNA mittels eines interkalierenden Farbstoffs (Propidiumjodid) angefärbt. Bei der anschließenden zytometrischen Messung werden die Zellen anhand ihres DNA-Gehaltes aufgetrennt und können so den verschiedenen Zellzyklusphasen zugeordnet werden (siehe Abbildung 3-2).

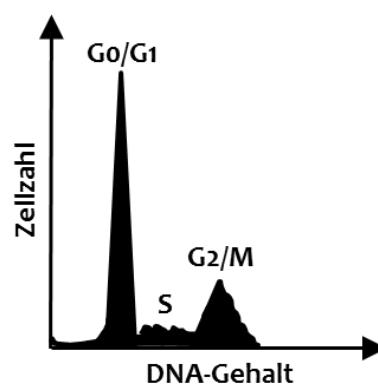


Abbildung 3-2 Schematische Darstellung eines Histogramms zur Zellzyklusanalyse

### 3.2.6.2 Durchführung

Zur Untersuchung der Änderung des Zellzyklus durch PHA-Stimulation in humanen Lymphozyten werden primäre sowie PHA-stimulierte Lymphozyten, zu unterschiedlichen Zeitpunkten, gemessen.

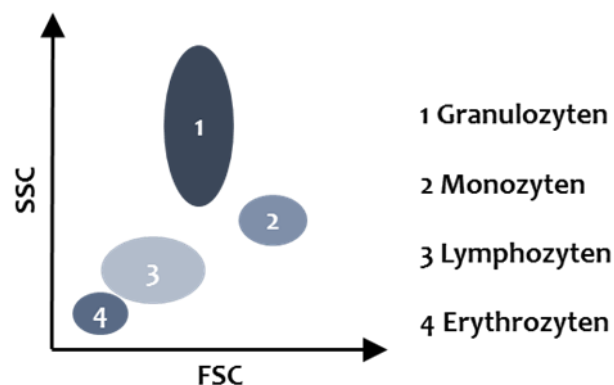
Jeweils  $10 \times 10^6$  Zellen (Zelldichte:  $0,8 \times 10^6$  Zellen, 12,5 ml Volumen) werden in eine kleine Zellkulturflasche überführt und 125  $\mu$ l (1:100) PHA-Stammlösung zugegeben. Die Flaschen werden für die indizierten Zeitpunkte (6, 24 oder 72 h) im Brutschrank horizontal inkubiert. Nach Ablauf der Stimulationszeit wird die Zellsuspension vollständig in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Gegebenenfalls ist ein Zellkulturschaber zu verwenden, um am Boden anhaftende Zellen abzulösen. Dann wird bei  $380 \times g$  bei  $4^\circ\text{C}$  für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen, das Zellpellet in 1 ml kaltem PBS/CMF resuspendiert und in ein 2-ml-Cap überführt. Anschließend wird in einer Tischzentrifuge für eine Minute zentrifugiert. Der Überstand wird zügig abgekippt, das Pellet erneut in 1 ml PBS/CMF resuspendiert und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Nach zweimaligem Waschen wird nun das Pellet

zunächst in 100 µl PBS/CMF resuspendiert und dann unter Schütteln (auf dem Vortexer) 1 ml 95 %iger, kalter Ethanol zugegeben zum Fixieren. Bis zur weiteren Verarbeitung werden die Zellen bei -20 °C gelagert. Primäre, unstimulierte Lymphozyten werden nach der Isolation (siehe 3.2.2) analog fixiert. Es werden hierbei ebenfalls  $10 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Für die DNA-Färbung werden die fixierten Zellen zunächst 2-mal mit kaltem PBS/CMF gewaschen (siehe oben). Danach in 500 µl PBS/CMF mit Propidiumjodid (50 µg/ml) und RNase (10 µg/ml) resuspendiert und für 30 min bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss werden alle Zellen dunkel auf Eis bis zur Messung im Durchflusszytometer aufbewahrt.

### 3.2.7 Differenzierung von Blutzellen

#### 3.2.7.1 Prinzip

Blutzellen unterscheiden sich in ihrer Granularität und Größe. Durch die Untersuchung der Stärke der Lichtstreuung des Vorwärtslichtes (FSC, *forward scatter*) und des Seitwärtslichtes (SSC, *side scatter*) mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist es möglich zwischen Erythrozyten, Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten zu unterscheiden (siehe Abbildung 3-3). Die Untersuchung von FSC und SSC dient für diese Arbeit der Überprüfung der Qualität isolierter Lymphozyten aus Buffy Coats. So ist es möglich die isolierten Zellen zu identifizieren.



**Abbildung 3-3** Schematische Darstellung der durchflusszytometrischen Ergebnisse einer Blutprobe

#### 3.2.7.2 Durchführung

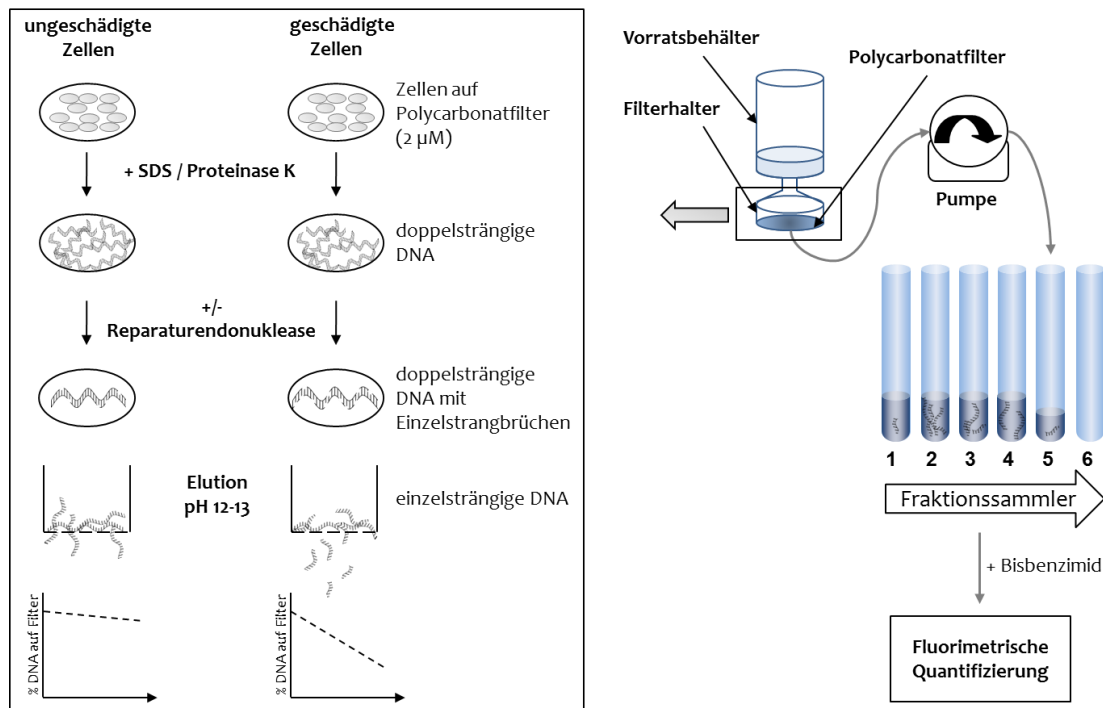
Die Untersuchung von FSC und SSC werden gleichzeitig mit der Zellzyklusanalyse vorgenommen. Die Durchführung ist 3.2.6.2 zu entnehmen.

### 3.2.8 Alkalische Elution

#### 3.2.8.1 Prinzip

Die von Kohn entwickelte Alkalische Elution (KOHN et al. 1976) ist eine äußerst sensitive Methode zur Detektion von intrazellulären DNA-Einzelstrangbrüchen (SSB). Sie beruht auf dem Prinzip, dass einzelsträngige DNA unterschiedlich schnell in Abhängigkeit von ihrer Länge von einem Polycarbonatfilter eluiert. Kleinere DNA-Stücke, entstanden aus einer Vielzahl von SSB, eluieren somit schneller als größere DNA-Stücke, die durch weniger SSB hervorgerufen wurden. Durch eine Modifizierung der Methode, die eine zusätzliche Inkubation mit Reparaturenendonukleasen beinhaltet, ist es außerdem möglich auch DNA-Basenmodifikationen nachzuweisen (EPE & HEGLER 1994). Die eingesetzten Reparaturenendonukleasen sind in der Lage DNA-Basenmodifikationen ihres Erkennungsspektrums zu detektieren, auszuschneiden und somit in zusätzliche Einzelstrangbrüche zu überführen, die quantifiziert werden können. Die Alkalische Elution ermöglicht die Detektion von DNA-Schäden bis zu einer Nachweisgrenze von 0,05 Läsionen pro  $10^6$  Basenpaare. Die Methode ist somit 200-mal empfindlicher als der zellfreie PM2-Relaxationsassay und bis zu 10-mal empfindlicher als eine Detektion über HPLC/ECD (PFLAUM et al. 1997). Das Prinzip ist in Abbildung 3-4 veranschaulicht.

Zellen, deren DNA-Schaden zu quantifizieren ist, werden in Suspension auf einen Polycarbonatfilter (Porengröße  $2 \mu\text{M}$ ) aufgetragen. Direkt im Anschluss werden die Zellen durch Behandlung mit einem SDS- und Proteinase-K-haltigen Puffer (pH 10) lysiert. Im folgenden Waschschrift werden Proteine, RNA und Membranen vom Filter gewaschen und nur die doppelsträngige DNA bleibt zurück. Diese kann nun mit Reparaturenendonukleasen inkubiert werden. Zum Schluss wird mit einem alkalischen Puffer (pH 12,15) die DNA in Einzelstränge getrennt und fraktionsweise eluiert. Die DNA-Menge pro Fraktion wird anschließend fluorimetrisch durch Zugabe von Bisbenzimid (Hoechst 33258) in einem neutralen Puffer bestimmt. Eine Kalibrierung mit  $\gamma$ -Strahlen ( $6\text{Gy} = 1 \text{SSB}/10^6$  Basenpaare) (KOHN et al. 1976) ermöglicht die Quantifizierung der DNA-Schäden.



**Abbildung 3-4 Prinzip der Alkalischen Elution**

### 3.2.8.2 Versuchsaufbau und Vorbereitungen

Die Anlage besteht aus insgesamt 20 25-ml-Einwegspritzen ohne Kolben. Am unteren Ende jeder Spritze ist ein Frittenboden befestigt, auf dem ein Polycarbonatfilter (Porendurchmesser  $2 \mu\text{M}$ ) blasenfrei aufzulegen ist. Alle Einwegspritzen sind auf gleicher Höhe befestigt und können in ein temperierbares Wasserbad bis zum Filterhalter getaucht werden. Die Zellsuspensionen und Puffer werden von oben in die Spritzen pipettiert und über eine Mehrkanalpumpe durch Spritze, Filter, Frittenboden und Dialyseschlauch in ein Abfallgefäß gepumpt. Dieses wird am Ende gegen einen Fraktionssammler, bestückt mit Reagenzgläsern zum Auffangen des Eluats, ausgetauscht. Vor Versuchsbeginn muss die benötigte Anzahl an Spritzen mit Frittenböden und Polycarbonatfiltern bestückt werden. Je Probe werden zur Detektion Reparaturenendonuklease-sensitiver DNA-Schäden 3 Spritzen benötigt; einmal ohne und zweimal mit Enzym. Die angefeuchteten Filter werden hierfür blasenfrei auf die bereits eingesetzten Frittenböden im Filterhalter gelegt und mit Wasser dest. aufgefüllt. Dann werden  $2 \times 2,5 \text{ ml}$  kaltes PBS/CMF durchgepumpt und die Filterhalter der Spritzen im Wasserbad auf  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  temperiert. Dies ist notwendig um eine Reparatur der Zellen zwischen Auftragen auf die Filter und Zellyse zu verhindern.

### 3.2.8.3 Durchführung (Zelllyse, Enzyminkubation und Elution)

Pro Filter werden je nach Zelltyp zwischen 1 und  $1,5 \times 10^6$  Zellen aufgetragen; entsprechend einer DNA-Menge von etwa 10 µg. Da primäre Lymphozyten keiner Proliferation unterliegen und somit ihr DNA-Gehalt geringer ist als bei den verglichenen proliferierenden Zellen, werden in diesem Fall  $1,5 \times 10^6$  Zellen pro Filter eingesetzt.

Die zu untersuchenden Zellen werden in Suspension auf die Filter aufgetragen. Durch zweimaliges Waschen mit je 3 ml kaltem PBS/CMF werden Reste des Zellkulturmediums beseitigt. Während des zweiten Waschschrilles wird das Thermostat des Wasserbades auf 25 °C gestellt. Ab einer Temperatur von 15 °C kann mit der Zelllyse begonnen werden, so wird ein Ausfallen des enthaltenen SDS verhindert. 2 ml Lysepuffer (2 % SDS) werden hierzu mit maximaler Pumpleistung durch die Filter gepumpt. Zur Vervollständigung der Lyse und zum Entfernen aller Proteine werden 5 ml des Lysepuffers, versetzt mit 400 mg/l Proteinase K, über 90 min langsam durchgepumpt. Vor der anschließenden Enzyminkubation müssen alle Reste des Lysepuffers sorgfältig entfernt werden. Dazu werden die Filter insgesamt 7-mal mit jeweils 5 ml BE1-Puffer gewaschen. Dabei ist darauf zu achten, dass auch die Innenwände der Spritzen vollständig von Resten des Lysepuffers befreit sind. Während dieser Waschschrilles wird die Temperatur auf 37 °C erhöht um optimale Bedingungen für die anschließende Inkubation mit Reparaturenukleasen zu schaffen. Es werden 2 ml der Enzymlösung (Zusammensetzung siehe Tabelle 3-2) auf die Filter pipettiert, wovon 1 ml bei maximaler Geschwindigkeit direkt durchgepumpt wird und der zweite langsam über einen Zeitraum von 50 min. Am Ende werden die Reste der Enzymlösung ab pipettiert, die Temperatur auf 25 °C gesenkt und 2-mal mit BE1 gewaschen. Dann werden 5 ml Waschpuffer (pH 10) mit maximaler Pumpleistung durchgepumpt. Das Abfallgefäß wird nun gegen einen Fraktionssammler, bestückt mit jeweils 6 Reagenzgläsern je Filter, ausgetauscht und die Vorratsgefäße vollständig mit Elutionspuffer (pH 12,15) gefüllt. Je nach Ausmaß der zu untersuchenden DNA-Schäden kann nun entweder eine langsame Elution (DNA-Schäden bis maximal 0,9 Läsionen je  $10^6$  Basenpaare) über 11 Stunden oder eine schnelle Elution (0,9-3 Läsionen je  $10^6$  Basenpaare) über 54 min gestartet werden. Während der Elution wechselt der Fraktionssammler alle 120 bzw. 9 min, so dass je Filter 6 Fraktionen entstehen. Am Ende wird das noch in den Spritzen verbliebene Volumen in die letzte Fraktion gepumpt. Alle Filter und Frittenböden werden ausgebaut und in Coulter-Counter-Döschen gelegt. Das Volumen der letzten Fraktion wird gemessen und zu dem zugehörigen Filter mit Frittenboden zugegeben. Um die auf den Filtern verbliebene DNA zu lösen, werden die im Volumen der letzten Fraktion eingelegten Filter mit Frittenböden bei 60 °C für 2 Stunden im Wasserbad geschüttelt.

**Tabelle 3-2 Reparaturenendonukleasen für die Alkalische Elution nach (EPE 1996)**

	<b>FPG</b>	<b>T4endoV</b>
Erkennungsspektrum	8-oxoG AP-Läsionen Formamidopyrimidine	AP-Läsionen Cyclobutanpyrimidin-Dimere
Endkonzentration	3 µg/ml (Rohextrakt)	1 µg/ml
Alkalische Elution	in BE1-Puffer (0,5 mg/ml BSA)	in BE1-Puffer (0,5 mg/ml BSA)

### 3.2.8.4 Auswertung, (Quantifizierung und Berechnung des DNA-Schadens)

Zunächst wird das Volumen der einzelnen Fraktionen gemessen (Fraktionsvolumen) und dasselbe Volumen wird der letzten Fraktion, nach der 2-stündigen Inkubation bei 60 °C, entnommen (Filterwert). Nun wird zu jeder Fraktion das gleiche Volumen eines Phosphatpuffers (PP pH 6,0) zugegeben und für 15 min inkubiert. Durch die Neutralisation können sich nun enthaltene einzelsträngige DNA-Moleküle wieder zu doppelsträngiger DNA zusammenfügen. Im anschließenden Schritt wird neutraler Phosphatpuffer (PP pH 7,2), versetzt mit Bisbenzimid (Hoechst 33528; 1,5 µM), im gleichen Volumen (Fraktionsvolumen) zugegeben. Während einer Inkubationszeit von weiteren 15 min kann der Farbstoff vollständig mit der vorhandenen doppelsträngigen DNA interkalieren.

Zu Beginn der Quantifizierung muss das Fluorimeter mit einer Blindprobe (gleiche Volumina Elutionspuffer, PP pH 6 und 1,5 µM Bisbenzimid in PP pH 7,2) auf einen Nullwert eingestellt werden. Der DNA-Gehalt jeder einzelnen Fraktion kann dann ermittelt werden (Extinktion: 360 nm, Emission: 450 nm). Es wird ebenfalls die Fluoreszenz der Fraktionen einer zellfreien Spur gemessen und von den zugehörigen Fraktionen subtrahiert. Die Summe der Fluoreszenzintensitäten einer Spur (Fraktionen 1 bis 6) ist proportional zur DNA-Menge. So ist es möglich zu bestimmten Zeitpunkten (Fraktionen) den relativen Anteil an DNA auf dem Filter zur Gesamt-DNA-Menge einer Spur zu ermitteln. Die relative DNA-Menge halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen ergibt eine Gerade, deren Anstieg proportional zu den enthaltenen Einzelstrangbrüchen ist, eine zufällige Verteilung der Einzelstrangbrüche in der DNA vorausgesetzt. Die Berechnung der absoluten Einzelstrangbrüche sowie der Reparaturenendonuklease-sensitiven DNA-Schäden berechnet sich nach folgender Formel:

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

**Formel 3-1 Berechnung der DNA-Schäden in der Alkalischen Elution**

SSB (Anzahl der Einzelstrangbrüche), RE (Anzahl der Reparaturrendonuklease-sensitiven Läsionen), m (mittlere Steigung der Geraden)

Der Faktor -2,24 gilt für die langsame Elution und wurde durch Kalibrierung mit  $\gamma$ -Strahlen ermittelt (EPE et al. 1993a), (PFLAUM 1996). Für die schnelle Elution wurde ein Faktor von -8,6 ermittelt (BALLMAIER 1997). Die absolute DNA-Menge kann durch einen Vergleich mit einem Standard (4  $\mu$ g Kalbsthymus-DNA in Elutionspuffer) berechnet werden. Zur Quantifizierung der Reparaturrendonuklease-sensitiven Modifikationen müssen die entsprechenden Werte, die ohne Enzym (Einzelstrangbrüche) berechnet wurden, abgezogen werden. Für alle Darstellungen der Reparaturrendonuklease-sensitiven Modifikationen im Ergebnisteil sind die jeweiligen Einzelstrangbrüche abgezogen. Zur Darstellung induzierter Werte sind zusätzlich die zugehörigen basalen DNA-Schäden abgezogen.

### 3.2.9 Behandlung der Lymphozyten für die Alkalische Elution

Um die Kapazität verschiedener DNA-Reparaturmechanismen in humanen Lymphozyten zu untersuchen, werden verschiedene Noxen eingesetzt:

- Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Anwesenheit von Acridinorange induziert oxidative DNA-Modifikationen (BER); siehe 1.4.1.
- Inkubation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert neben oxidativen DNA-Modifikationen vor allem Einzelstrangbrüche (SSB-Reparatur); siehe 1.4.2.
- Bestrahlung mit UV-B induziert CPDs (NER); siehe 1.4.3.

Vergleichend werden die DNA-Reparaturkapazitäten von primären Lymphozyten, PHA-stimulierten Lymphozyten und immortalisierten, EBV-transformierten Lymphozyten (Zelllinie CC47) untersucht. Primäre humane Lymphozyten werden direkt nach der Isolation (siehe 3.2.2) behandelt; testweise werden auch Versuche nach 24 h Inkubation in Kulturmedium im Brutschrank durchgeführt. PHA-stimulierte Lymphozyten werden wie beschrieben (siehe 3.2.3) 72 h stimuliert und weitere 72 h in Kulturmedium inkubiert. Am Tag 7 erfolgt dann die Behandlung. Die EBV-transformierten Lymphozyten werden zunächst aufgetaut und bei ausreichender Zelldichte behandelt.

### 3.2.9.1 Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Anwesenheit von Acridinorange

Zunächst werden die zu untersuchenden Lymphozyten 2-mal mit PBS/CMF gewaschen um das Kulturmedium zu entfernen. Die Zellsuspension wird hierfür bei  $380 \times g$  5 min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt und das Pellet in PBS/CMF resuspendiert. Nach 2-maligem Waschen mit PBS/CMF wird das Pellet in PBS resuspendiert. 50 ml dieser Zellsuspension mit einer Zelldichte von  $0,8 \times 10^6$  Zellen/ml PBS werden anschließend in eine große Zellkulturflasche überführt. Anschließend wird Katalase (315 U/ml) sowie 50  $\mu$ l einer 50 mM Acridinorange-Lösung (Endkonzentration: 50nM) zugegeben. Die Suspension wird durch mehrmaliges Resuspendieren gut gemischt und auf eine weitere große Zellkulturflasche aufgeteilt (jeweils 25 ml). Beide Zellkulturflaschen werden in einer eben mit Eis gefüllten Styroporbox mittig, in einem Abstand von 38 cm, unter der Halogenlampe platziert. Unter leichtem Schwenken werden die Zellen nun bestrahlt (Bestrahlungszeiten variieren in den Versuchen zwischen 15 sec und 2 min). Im Anschluss an die Bestrahlung werden die Zellsuspensionen nochmals in einer der beiden Zellkulturflaschen vereinigt, um von einer Grundgesamtheit ausgehen zu können. Dann werden jeweils 12,5 ml in eines von 4 15-ml-Zentrifugenröhrchen, die zum Schutz vor Licht mit Aluminiumfolie umwickelt wurden, pipettiert. Anschließend wird bei  $380 \times g$  5 min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen. Zur Ermittlung der Schadensinduktion wird das Pellet von einer Probe in 2 ml kaltem RPMI-Kulturmedium, versetzt mit 10 % DMSO, resuspendiert und bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren. Die restlichen Proben werden in 10 ml warmem RPMI-Kulturmedium resuspendiert und zur Bestimmung der Reparatur für unterschiedlich lange Zeitpunkte im Brutschrank inkubiert. Nach abgelaufener Reparaturzeit werden die Proben analog zum Induktionswert aufgearbeitet und eingefroren. Eine unbestrahlte Probe wird parallel behandelt. Die eingefrorenen Proben werden nach ca. 2 h bei  $-20^\circ\text{C}$  zur weiteren Aufbewahrung in  $-80^\circ\text{C}$  überführt.

### 3.2.9.2 Bestrahlung mit UV-B

Zur Untersuchung der Reparatur von UV-B induzierten DNA-Schäden wird entsprechend nach dem Protokoll unter 3.2.9.1 (Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Anwesenheit von Acridinorange) gearbeitet. 50 ml Zellsuspension (Zelldichte:  $0,8 \times 10^6$  Zellen/ml) werden für die UV-B-Bestrahlung auf 2 große Zellkulturplatten aufgeteilt. Die Bestrahlung erfolgt ohne Deckel für 8 sec in 1 m Abstand zur UV-B-Lampe (Dosis  $2,88 \text{ J/m}^2$ ) für beide Platten gleichzeitig. Im Anschluss wird das Volumen beider Zellkulturplatten vereinigt und dann gleichmäßig auf 4 15-ml-Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Um den induzierten Schaden bestimmen zu können, wird direkt eine Probe eingefroren und der Rest wie zuvor beschrieben (3.2.9.1) behandelt.



### 3.2.9.3 Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Zur Quantifizierung der Induktion und Reparatur von Einzelstrangbrüchen, ausgelöst durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, werden die Lymphozyten zunächst 2-mal mit PBS/CMF gewaschen (analog 3.2.9.1). Das so gewonnene Zellpellet wird in kaltem, FCS-freiem RPMI-Medium aufgenommen. Je Probe werden 3 ml ( Zelldichte:  $1,5 \times 10^6$ ) in ein 15-ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert und auf Eis gelagert. 5 min vor Schadensinduktion werden die Röhrchen in einem Wasserbad auf 37 °C temperiert. Zur Bestimmung der Schadensinduktion in Abhängigkeit von der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration erfolgt nun die Zugabe von jeweils 150 µl verschiedener H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (21-faches der Endkonzentration) in die unterschiedlichen Proben. Nach 15 min Inkubation im Wasserbad, wird die Reaktion durch Zugabe von Katalase (315 U/ml Endvolumen) abgestoppt. Anschließend werden 6 ml kaltes RPMI-Kulturmedium zugegeben um eine weitere Reparatur zu verhindern. Eine unbehandelte Kontrollprobe wird analog behandelt. Zur Bestimmung der Reparatur von SSB nach verschiedenen Zeiten müssen die Proben nacheinander behandelt werden, damit alle Reparaturzeiten gleichzeitig fertig sind. Tabelle 3-3 gibt für diese Vorgehensweise eine Übersicht. Für die jeweilige Reparaturzeit werden die Proben im Brutschrank in den Zentrifugenröhrchen (mit aufgelegtem Deckel) inkubiert. Die Reaktion wird analog wie bei der Schadensinduktion mit Katalase abgestoppt und 6 ml warmes RPMI-Kulturmedium werden zugegeben.

**Tabelle 3-3 Zeitplan für SSB-Reparaturversuch mit verschiedenen Zeiten**

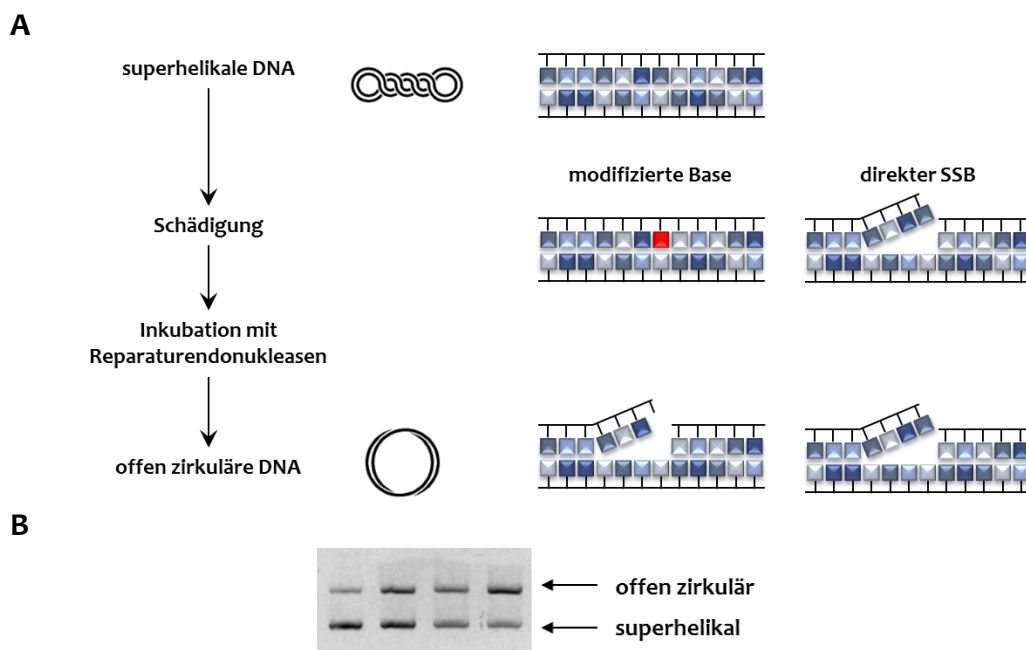
	<b>Vorinkubation*</b> (5 min 37 °C Wasserbad)	<b>Schädigung*</b> (15 min H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	<b>Reparatur*</b>
60 min	1 h 20 min	1 h 15 min	1 h
30 min	50 min	45 min	30 min
15 min	35 min	30 min	15 min
7,5 min	27,5 min	22,5 min	7,5 min
0 min	20 min	15 min	0 min
Kontrolle	-	-	-

\*angegebene Zeit = vor Versuchsende

### 3.2.10 PM2-Relaxationsassay

#### 3.2.10.1 Prinzip

Der PM2-Relaxationsassay ermöglicht die zellfreie Untersuchung DNA-schädigender Wirkungen chemischer Substanzen und/oder Strahlung. Man nutzt dabei die Tatsache, dass sich die ungeschädigte superhelikale PM2-DNA durch einen einzigen SSB bzw. durch einen Einschnitt einer Reparaturenuklease in die offenzirkuläre Form überführen lässt (siehe Abbildung 3-5.A). Ein Doppelstrangbruch führt hingegen zur Linearisierung der Plasmid-DNA. Die verschiedenen Konformationen der PM2-DNA lassen sich im Agarosegel einfach auftrennen, da sie aufgrund ihrer unterschiedlichen Kompaktheit im Agarosegel unterschiedlich weit laufen (Abbildung 3-5.B). Durch den Einsatz verschiedener Reparaturenukleasen, können unterschiedliche DNA-Modifikationen erkannt und in einen SSB umgewandelt werden. So ist es möglich ein komplexes Schadensprofil einer Substanz zu ermitteln (EPE et al. 1988).



**Abbildung 3-5 Schematische Darstellung des PM2-DNA-Relaxationsassay**

(A) Prinzip (B) Auftrennung der PM2-DNA im Agarosegel

### 3.2.10.2 Durchführung

#### 3.2.10.2.1 Schadensinduktion und Enzymbehandlung

Zur Untersuchung der durch Acridinorange und unterschiedliche Bestrahlungszeiten induzierten Fpg-sensitiver Läsionen werden die Proben nach folgendem Schema zusammen pipettiert (Tabelle 3-4) und gevortext. Alle Proben, die Acridinorange enthalten werden zusammen in einem Cap, das mit Alufolie umwickelt ist, angesetzt.

**Tabelle 3-4 Pipettierschema PM<sub>2</sub> Assay (Acridinorange + Licht)**

	Phosphat- puffer	PM <sub>2</sub> -DNA (0,05 µg/µl)	Acridinorange- Lösung (1 µM)	Bestrahlungs- zeit
Kontrolle	52 µl	8 µl	6 µl	-
Dunkelkontrolle	46 µl	8 µl	6 µl	-
bestrahlte Proben (je)	46 µ	8 µl	6 µl	1, 3, 5, 8, 10 min

Für die Dunkelkontrolle werden 60 µl direkt in ein neues Cap überführt. Je Bestrahlungszeitpunkt werden 60-µl-Tropfen auf eine Quadripermschale nebeneinander pipettiert. Die Bestrahlung erfolgt im Abstand von 38 cm zur Halogenlampe (1000 W) auf einer ebenen Eisfläche. Nach 1, 3, 5, 8 und 10 min wird jeweils ein Tropfen von der Quadripermschale vollständig abgenommen und in ein neues, mit Alufolie umwickeltes Cap gefüllt. Im Anschluss wird das Acridinorange durch Zugabe von jeweils 200 µl Butanol und Vortexen extrahiert (Parallelbehandlung der Kontrolle und Dunkelkontrolle). Es folgt ein Zentrifugationsschritt (12.000 U/min, 5 min) bei dem sich 2 Phasen bilden. Die oberste Phase wird verworfen. In dieser befindet sich das Butanol mit Acridinorange. In der kleineren unteren Phase ist nun die DNA, die durch Zugabe von 150 µl Fällungslösung F präzipitiert wird und für etwa 60 min bei -20 °C gelagert wird. Anschließend folgt ein Zentrifugationsschritt bei 12.000 U/min, 10 min. Der ethanolische Überstand wird zügig abgekippt und das milchige DNA-Pellet in 40 µl BE1-Puffer unter 1-minütigem Vortexen gelöst. Jede Probe wird in 2 gleiche Ansätze (20 µl) aufgeteilt. Zu jeweils einem Ansatz je Probe werden 10 µl Fpg-Lösung (3 µg/ml Rohextrakt in BE1/BSA; Endkonzentration 1 µg/ml) gegeben. Der zweite Ansatz erhält 10 µl BE1/BSA. Alle Proben werden durch sorgfältiges Resuspendieren gemischt. Die Enzyminkubation findet bei 37 °C im Wasserbad für 30 min statt. Durch Zugabe von jeweils 10 µl Stopppuffer wird die Enzymreaktion beendet. Hierzu werden jeweils 10 µl Stopppuffer in die Deckelvertiefungen der Caps pipettiert und anschließend kurz zentrifugiert. Somit werden alle Proben gleichzeitig abgestoppt. Dann werden alle Proben nochmals gevortext und die Gelelektrophorese folgt (siehe 3.2.10.2.3).

### 3.2.10.2.2 Erstellung eines Schadensprofils

Zur Bestimmung des gesamten Schadensprofils von Acridinorange und Licht werden neben Fpg weitere Endonukleasen eingesetzt. Es wird analog zu 3.2.10.2.1 vorgegangen. Als einheitliche Bestrahlungszeit werden 3 min gewählt. Hierbei ist darauf zu achten, dass trotz des gleichen Ansatzes für alle zu bestrahlende Proben und der identischen Bestrahlungszeit die Proben nicht im Ganzen bestrahlt werden sondern als einzelne 60 µl Tropfen. Die eingesetzten Endonukleasen sowie die verwendete Konzentration sind Tabelle 3-5 zu entnehmen.

**Tabelle 3-5 eingesetzte Endonukleasen für PM<sub>2</sub>-Assay**

Enzym	Endkonzentration	Erkennungsspektrum
Fpg	1 µg/ml	8-oxoG, AP-Läsionen, Formamidopyrimidine
OGG1	0,76 µg/ml	8-oxoG
EndoIV	130 U/ml	AP-Läsionen
T4EndoV	1,12 µg/ml	AP-Läsionen, Cyclobutanpyrimidin-Dimere

### 3.2.10.2.3 Agarosegelelektrophorese

Für die Detektion der verschiedenen Konformationen der PM<sub>2</sub>-DNA wird ein 0,8%iges Agarosegel gegossen. Hierzu werden 0,8 g Agarose in 100 ml TAE unter Erhitzen in der Mikrowelle vollständig gelöst. Über Siedeverzug verlorengewonnenes Wasser ist auszugleichen. Die Lösung wird anschließend blasenfrei in eine Gelkammer gegossen, die mit Kämmen bestückt wird. Das gesamte Probenvolumen (40 µl) wird in die Geltaschen gefüllt und das Gel bei 80 V 60 min laufen gelassen.

### 3.2.10.2.4 Auswertung

Durch Färbung mit Ethidiumbromid kann anhand der Fluoreszenzintensitäten die Anzahl der direkten SSB bzw. der durch Inkubation mit Reparaturoendonukleasen entstandenen SSB pro Molekül (10<sup>4</sup> Bp) berechnet werden (siehe Formel 3-2). Die Agarosegele werden hierfür mit Hilfe des BioRad Gel Doc 1000 dokumentiert. Die densitometrische Messung erfolgt durch die Software Image Lab<sup>TM</sup>.

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

#### **Formel 3-2 Berechnung der SSB und Endonuklease-sensitiven SSB**

- SSB Einzelstrangbrüche pro PM<sub>2</sub>-Molekül (1/10<sup>4</sup> Basenpaare)  
 ESS Endonuklease-sensitive Modifikationen pro PM<sub>2</sub>-Molekül (1/10<sup>4</sup> Basenpaare)  
 S Fluoreszenz der superhelikalen Form  
 R Fluoreszenz der relaxierten (offen zirkulären) Form  
 1,4 Korrekturfaktor, der eine geringere Interkalation von Ethidiumbromid in superhelikale DNA berücksichtigt

### 3.2.11 Western Blotting – Bestimmung des OGG1-Proteingehaltes in humanen Lymphozyten

#### 3.2.11.1 Prinzip

Western Blotting ist eine Methode zum Nachweis von Proteinen in Zelllysaten. Zunächst müssen hierfür die Proteine eines Lysates mittels SDS-Page nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Anschließend erfolgt das sogenannte Blotting, wobei durch Anlegen einer Spannung die aufgetrennten Proteine auf eine Membran (Nitrocellulose oder PVDF) transferiert werden. Die Proteine bleiben an der Membran durch hydrophobe Wechselwirkungen haften. Durch den Einsatz spezifischer Antikörper kann prinzipiell jedes vorhandene Protein nachgewiesen werden.

#### 3.2.11.2 Durchführung

##### 3.2.11.2.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Gewinnung von Zelllysaten werden 10 bis  $15 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Das entsprechende Volumen der Suspensionszellen wird in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei  $380 \times g$  zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und das Zellpellet wird in 10 ml PBS/CMF gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach einem zweiten Waschschrift wird der Überstand vollständig abgenommen und das Zellpellet wird in RIPA-Puffer vorsichtig resuspendiert. Je  $10 \times 10^6$  Zellen werden 100  $\mu$ l RIPA-Puffer, der kurz zuvor mit PMSF versetzt wird, eingesetzt. Die Zellsuspension wird in dem Zentrifugenröhrchen auf Eis für 15 min auf einem Schüttler inkubiert. Danach wird die Suspension in ein 2-ml-Cap überführt und für weitere 30 min auf Eis stehen gelassen. Im Anschluss erfolgt ein Zentrifugationsschritt für 10 min bei  $10.000 \times g$  und  $4^\circ\text{C}$ . Der Überstand ergibt das Proteinlysate, welches in Aliquots zu je 30  $\mu$ l (+ 3,3  $\mu$ l cOmplete, Mini Protease Inhibitor Cocktail 10fach) bei  $-80^\circ\text{C}$  für die weitere Verwendung gelagert wird. Für die Proteinbestimmung wird direkt eine geringe Menge des Proteinlysats ohne Proteaseinhibitor gemessen.

##### 3.2.11.2.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgt nach (BRADFORD 1976). Für jede Probe werden 798  $\mu$ l Wasser in je einem 2-ml-Cap vorgelegt. 200  $\mu$ l Bio-Rad-Lösung werden langsam dazu pipettiert. Zum Schluss werden 2  $\mu$ l des unverdünnten Proteinlysats dazugegeben und gut gevortext. Nach 10 min wird die Absorption der Lösung bei 595 nm gemessen. Zur Bestimmung der Konzentration wurde mehrfach eine Kalibriergerade mit BSA erstellt, die folgende Geradengleichung ergab:  $y = 0,069 x$ .

### 3.2.11.2.3 SDS-PAGE und Protein-Blotting

Zur Auftrennung der Proteinlysate wird ein 10%iges Acrylamidrenngel, überschichtet mit einem Sammelgel, in einer Dicke von 0,75 mm gegossen. Für die Detektion von humanem OGG1 werden je Probe 5 µg Gesamtprotein aufgetragen sowie 7 µl des Proteinmarkers zur Größenbestimmung. Die Elektrophorese erfolgt bei 100 V für ca. 1,5 Stunden. Im Anschluss wird das Gel vorsichtig in entionisiertem Wasser gewaschen um den Elektrophoresepuffer zu entfernen. Dann werden das Gel, die Nitrocellulosemembran sowie zwei Faserpads und zwei Filterpapiere für 30 min in kaltem Transferpuffer eingelegt. Für das Blotten der Proteine auf die Membran werden alle zuvor eingelegten Bestandteile wie folgt blasenfrei in einem mit Transferpuffer gefülltem Gefäß übereinander geschichtet: Faserpad – Filterpapier – Gel – Membran – Filterpapier – Faserpad. Dieses „Sandwich“ wird in eine Kassette eingespannt, die dann in die Transferkammer eingesetzt wird. Dabei ist darauf zu achten, dass die Membran der Anode zugewandt ist. Die Transferkammer wird zusätzlich mit einem Kühlakku bestückt und komplett mit Transferpuffer gefüllt. Der Proteintransfer erfolgt dann bei 100 V für 60 min. Im Anschluss wird der Proteintransfer durch Färben mit Ponceau Rot überprüft. Hierfür ist es ausreichend die Membran für einige Sekunden in Ponceau Rot-Lösung zu schwenken, so dass die Proteinbanden auf der Membran erkenntlich werden. Durch mehrmaliges kurzes Waschen mit entionisiertem Wasser kann die Ponceau-Färbung wieder entfernt werden.

### 3.2.11.2.4 Antikörperinkubation

Bevor die AK-Inkubation erfolgen kann, müssen freie Bindungsstellen blockiert werden. Hierzu wird die Membran in 5 %iger BSA Blocking-Lösung für mindestens 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wird die Membran mehrmals kurz in TBST 0,1 % geschwenkt und dann weitere dreimal wie folgt gewaschen: 15 min in TBST 0,1 %, 10 in TBST 0,5 % und abschließend 5 min mit TBST 0,1 %. Wichtig ist, dass die folgende AK-Inkubation in dem gleichen Gefäß wie das Blocking erfolgt. Die Inkubation mit den Primärantikörpern gegen humanes OGG1 und β-Actin, als Ladekontrolle, erfolgt gleichzeitig bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler. Anti-OGG1 wird in einer Verdünnung von 1:40.000 und anti-β-Actin 1:2.000 in TBST 0,1 % (1 % BSA) eingesetzt. Pro zu inkubierender Membran werden 5 bis 6 ml Antikörperlösung benötigt. Nach der Inkubation mit den Primärantikörpern wird analog wie nach dem Blocking in drei Schritten gewaschen. Die Inkubation mit den beiden Sekundärantikörpern erfolgt nun getrennt. Zunächst wird für 2 h bei RT mit goat anti-rabbit IgG HRP (1:2.000) inkubiert und OGG1 im Anschluss detektiert. Danach wird die Membran mit goat anti-mouse IgG HRP (1:10.000) und die Ladekontrolle β-Actin kann detektiert werden.

### 3.2.11.2.5 Immundetektion

Die Detektion der zu untersuchenden Proteine basiert auf einer Antigen-Antikörper-Bindung. Der Primärantikörper bindet dabei spezifisch an das zu detektierende Protein. An den Fc-Teil dieses 1. Antikörpers bindet ein entsprechender Sekundärantikörper, der mit horse-raddish-peroxidase (HRP) gelabelt ist, über den dann die Detektion abläuft. Nach der Inkubation mit dem jeweiligen 2. Antikörper wird wiederum dreimal mit TBST gewaschen. Die Membran wird aus dem TBST vorsichtig entnommen und plan auf ein Stück Alu-Folie gelegt. Nun wird die Membran vollständig mit Chemilumineszenz-Lösung (ca. 1 ml pro Membran) für 2 min inkubiert. Anschließend wird die Membran blasenfrei in Klarsichtfolie verpackt. Ein entsprechend zugeschnittenes Stück Blotting-Film wird zusammen mit der verpackten Membran in einer Autoradiographiekassette fixiert und diese dann fest verschlossen. Das Luminol aus der Chemilumineszenz-Lösung kann nun durch die HRP, welche am Sekundärantikörper gebunden ist, in seine oxidierte Form umgewandelt werden. Diese belichtet dann den Blotting-Film genau an den Stellen, wo auf der Membran auch HRP vorhanden ist. Die Belichtungszeit variiert zwischen 30 sec und 5 min für die untersuchten Proteine. Dann wird der Blotting-Film solange in Entwickler gelegt bis die Banden zu sehen sind. Abschließend wird der Blotting-Film für etwa 1 min in Fixierlösung eingelegt. Die Membran kann im Anschluss wieder in TBST gewaschen werden und für weitere Antikörperinkubationen genutzt werden. Alle Arbeitsschritte während der Detektion werden in einer Dunkelkammer durchgeführt.

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

### 3.2.12 Behandlung primärer Lymphozyten mit PHA und Kinaseinhibitoren zur Bestimmung der OGG1 mRNA Level

Zur Messung der Bildung von OGG1 mRNA in Folge der PHA-Stimulation werden primäre, humane Lymphozyten über verschiedene Zeiten stimuliert und anschließend die RNA, wie unter 3.2.13.2 beschrieben, isoliert. Um einen Einfluss der Kinasen ERK, JNK und p38 zu ermitteln, wird außerdem gleichzeitig zur Stimulation eine der drei Kinasen inhibiert.

	Bezeichnung	Stammlösung in DMSO	Endkonzentration
ERK-Inhibitor	U-0126	10 mM	10 µM
JNK-Inhibitor	SP600125	30 mM	30 µM
p38-Inhibitor	PD169316	10 mM	10 µM

Nach der Isolation wird zunächst die Zellzahl mittels Coulter Counter bestimmt und eine Zelldichte von  $0,8 \times 10^6$  Zellen / ml eingestellt. Für jede Stimulationszeit werden 4 kleine Zellkulturflaschen mit jeweils 14 ml der Zellsuspension befüllt. Zu 3 der 4 Zellkulturflaschen werden nun 14 µl Stammlösung jeweils eines Inhibitors zu pipettiert. Die letzte Flasche erhält 14 µl DMSO (0,1 %). Alle Flaschen werden für 30 min aufrecht im Brutschrank mit den Inhibitoren bzw. DMSO inkubiert. Anschließend werden 140 µl PHA-Stammlösung in jede Zellkulturflasche gegeben und die Inkubation im Brutschrank erfolgt nun für 30 min, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h oder 18 h in horizontaler Lage. Die RNA-Isolation nach den entsprechenden Zeitpunkten erfolgt wie unter 3.2.13.2 beschrieben.

### **3.2.13 Bestimmung der Genexpression von OGG1 in humanen Lymphozyten mittels quantitativer RT-PCR**

#### **3.2.13.1 Prinzip**

Die quantitative reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) ist eine schnelle Methode zur Analyse der Genexpression (mRNA-Expression) zum Zeitpunkt der RNA-Isolation einer Zellpopulation. Zunächst wird hierfür die gesamte RNA der zu untersuchenden Zellpopulation isoliert. Diese wird dann mittels Reverser Transkriptase in cDNA (copy DNA) umgeschrieben. In einer anschließenden qPCR wird die erhaltene cDNA als Template eingesetzt. Während der qPCR erfolgt eine direkte Detektion der PCR-Produktakkumulation durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green®, der mit der DNA interkaliert. Das Fluoreszenzsignal korreliert dabei quantitativ mit der Menge des PCR-Produktes und kann in Echtzeit (Real Time) dargestellt werden. Die Verwendung spezifischer Primer ermöglicht die Detektion verschiedener Gene. Zur Quantifizierung muss eine Normalisierung über entsprechende house-keeping Gene erfolgen (HUGGETT et al. 2005).

#### **3.2.13.2 RNA-Isolation**

Die RNA-Isolation wird nach dem „single-step“ Verfahren von (CHOMCZYNSKI & SACCHI 2006) mittels TRIzol® durchgeführt. Da RNA äußerst anfällig für den Abbau durch stabile RNAsen ist, ist es notwendig einen vorzeitigen Abbau durch RNase-freies Arbeiten zu verhindern. Hierfür werden alle Oberflächen und eingesetzten Materialien mit Ethanol und RNase-freiem DEPC-Wasser gesäubert. Zusätzlich werden Einmalhandschuhe getragen, die regelmäßig zu wechseln sind. Für die RNA-Isolation werden etwa 10 Millionen Lymphozyten eingesetzt. Das entsprechende Volumen der Suspensionszellen wird in ein Zentrifugenröhrchen gefüllt und bei  $380 \times g$  5 min



zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgekippt und das Zellpellet wird dann sorgfältig in 1 ml TRIzol<sup>®</sup> resuspendiert und in ein 2-ml-Cap überführt (unter dem Abzug arbeiten!). Durch das im TRIzol<sup>®</sup> enthaltene Guanidiniumthiocyanat werden die Zellen lysiert und RNAsen inaktiviert. Außerdem besteht TRIzol<sup>®</sup> aus Phenol, in dem sich Proteine und DNA lösen. Das TRIzol<sup>®</sup>-Zellsuspensionsgemisch wird für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend werden 200 µl Chloroform zugegeben und das Cap wird für mindestens 10 sec gevortext. Dann wird für weitere 5 min bei RT inkubiert. Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 4 °C und 12.000 x g. Die RNA befindet sich nun in der oberen wässrigen Phase, die DNA in der Interphase und Proteine in der unteren Chloroformphase. Die obere Phase wird in ein neues 2-ml-Cap überführt und es werden 500 µl Isopropanol zur RNA-Präzipitation zugefügt. Es wird für 10 min bei RT inkubiert und anschließend für 15 min bei 4 °C und 12.000 x g zentrifugiert. Die RNA wird nun meist als milchiges Pellet am Capboden sichtbar. Das Isopropanol wird nun zügig abgekippt und die Caps werden kurz über Kopf auf ein Küchentuch gestellt um weitere Isopropanolreste zu entfernen. Anschließend wird das Pellet in 75%igem Ethanol (DEPC-Wasser) aufgenommen, gevortext und kann bei -80 °C mehrere Wochen gelagert werden.

### 3.2.13.3 Überprüfung der RNA-Qualität

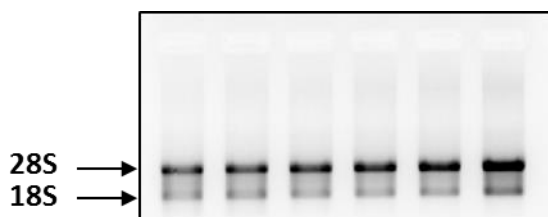
Nach der Isolation wird zunächst die Konzentration und Reinheit der RNA überprüft. Die in 75%igem Ethanol gelagerte RNA wird für 15 min bei 12.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Dann wird der Überstand zügig abgekippt und erst wenn nahezu alle Ethanolreste entfernt sind, wird das milchige Pellet in 20 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Für die Konzentrationsbestimmung der RNA wird die Absorption anschließend bei 260 nm gemessen und nach folgender Gleichung berechnet. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration, die aus Lymphozyten isoliert werden, wird eine 35fache Verdünnung mit DEPC-Wasser eingesetzt.

$$RNA - Konzentration [\mu g/\mu l] = A_{260} * Verdünnungsfaktor * 0,04$$

Eine Verunreinigung mit Proteinen kann durch die Ermittlung des Quotienten aus A<sub>260</sub> und A<sub>280</sub> ermittelt werden. Dieser sollte bei reiner RNA bei ungefähr 1,8 liegen.

Zusätzlich wird die Überprüfung der RNA Präparation visuell mittels eines Agarosegels vorgenommen. Zur Vermeidung einer Kontamination mit RNAsen ist es unbedingt notwendig die Gelkammer sowie jeweils ein Gefäß zum Ansetzen des Agarosegels und des Laufpuffers (TAE-Puffer) mit DEPC-Wasser vorher zu spülen. Für ein 1%iges Agarosegel wird 1 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (hergestellt aus 50fach TAE und DEPC-Wasser) durch Erhitzen in der Mikrowelle vollständig gelöst und in die

entsprechende Kammer gegossen. Der Laufpuffer wird ebenfalls aus 50fachen TAE und DEPC-Wasser hergestellt. Pro Probe werden 1,5 µg RNA auf das Gel aufgetragen. Dafür wird das Gesamtvolumen der Proben auf 10 µl eingestellt: 5 µl 2fach RNA-Ladepuffer + 5µl RNA(1,5 µg)-DEPC-Wasser-Lösung. Die Proben werden für mindestens 5 min bei 65 °C auf dem Heizblock erhitzt und können dann aufgetragen werden. Der Marker wird ebenfalls mit 2fach RNA-Ladepuffer versetzt und ist dann ohne Erhitzen auftragsfertig. Das Gel wird bei 80 V für 60 min laufen gelassen. Da bereits im RNA-Ladepuffer Ethidiumbromid enthalten ist, kann direkt im Anschluss an die Gelelektrophorese ein Bild gemacht und die RNA visuell kontrolliert werden. Bei intakter RNA sind zwei deutlich getrennte Banden zu erkennen, 28S und 18S rRNA.



**Abbildung 3-6 RNA-Gel**

### 3.2.13.4 Reverse Transkription

Zum Umschreiben der isolierten RNA in cDNA wird das Revert Aid H Minus 1st strand synthesis Kit benutzt. Zunächst werden alle Proben auf eine RNA-Konzentration von 0,3 – 0,5 µg/µl durch Verdünnen mit DEPC-Wasser eingestellt (20 µl Gesamtvolumen). Somit ergibt sich bei einem Einsatz von 2 µl je Reaktion ein RNA-Gehalt von 0,6-1 µg pro Reaktion. Während einer reversen Transkription ist der RNA-Gehalt dabei in jeder Probe identisch. Die RNA wird dann im ersten Schritt mit Random Hexamer Primern und DEPC-Wasser wie folgt gemischt.

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

Idealerweise wird vorher ein Mix aus DEPC-Wasser und Primern für alle Proben zusammen angesetzt, von dem je Probe 10 µl eingesetzt werden. RNA und Primer werden nun für 5 min bei 70 °C inkubiert und im Anschluss auf 4°C gekühlt. Im zweiten Schritt erfolgt die Zugabe von Nukleotiden (dNTPs) und RNase-Inhibitor (RiboLock) in Reaktionspuffer. Es wird ebenfalls ein Mix aus den drei Bestandteilen für alle Proben zusammen hergestellt:

Reaktionspuffer, 5fach	4 $\mu$ l
RiboLock RNase-Inhibitor (20 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
dNTP-Mix (10 mM)	2 $\mu$ l

Pro Reaktion werden 7  $\mu$ l zugegeben und es wird für weitere 5 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wird 1  $\mu$ l Reverse Transkriptase hinzugefügt und es folgt eine Inkubation bei 42 °C für 60 min. Die Reaktion wird durch eine Temperaturerhöhung auf 70 °C für 10 min beendet. Danach werden die Proben mit autoklaviertem Wasser im Verhältnis 1:5 verdünnt und bei -20 °C gelagert. Aus diesen Proben können weitere Verdünnungen für die RT-PCR hergestellt werden. Als Kontrolle wird für jede Probe ebenfalls ein Ansatz ohne Reverse Transkriptase angesetzt (noRT).

### 3.2.13.5 Optimierung der PCR-Bedingungen für spezifische Primer

Für optimale Bedingungen während der quantitativen RT-PCR werden alle eingesetzten Primer zuvor getestet. Im ersten Schritt wird die optimale Annealing-Temperatur in einer nicht-quantitativen PCR mittels eines Temperaturgradienten ermittelt. Hierfür wird zunächst Mix I für alle Proben zusammen hergestellt:

5fach Platinum Tfi reaction buffer	5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	0,75 $\mu$ l
dNTP Mix (10 mM each)	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	11,25 $\mu$ l
Gesamt Mix I	17,5 $\mu$ l

Anschließend wird Mix I mit den jeweiligen Primern sowie der Tfi DNA Polymerase wie folgt gemischt.

Mix I	17,5 $\mu$ l
Primer 1 (2 $\mu$ M)	2,5 $\mu$ l
Primer 2 (2 $\mu$ M)	2,5 $\mu$ l
Tfi DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
Gesamt Mix II	23 $\mu$ l

23  $\mu$ l Mix II werden nun mit 2  $\mu$ l Template (c-DNA) gemischt und die PCR wird gestartet (siehe Tabelle 3-6). Für jedes Primerpärchen werden 3 verschiedene Annealing-Temperaturen für jeweils 2 verschiedene Template-Verdünnungen getestet. Die Annealing-Temperaturen werden ausgehend von der angegebenen Schmelztemperatur der Primer gewählt (Temperaturspanne: 10 bis 12°C).

**Tabelle 3-6 PCR Programm mit Temperaturgradient**

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

Die Spezifität der PCR wird im Anschluss anhand eines 1,8%igen Agarosegels überprüft. Hier kann nun festgelegt werden, ob nur ein spezifisches Produkt entstanden ist und die Größe des Produktes mit dem Zielprodukt übereinstimmt, und zum anderen welche Annealing-Temperatur optimal ist.

Im zweiten Schritt wird nun die ermittelte Annealing-Temperatur für die qRT-PCR überprüft und die Akquisitionstemperatur (T<sub>acq</sub>), bei der die Fluoreszenz des spezifischen Produktes gemessen werden soll, bestimmt. Diese kann anhand der Schmelzkurve am Ende der qRT-PCR festgelegt werden. Hier kann die Bildung von Primerdimeren oder unspezifischen PCR-Produkten ausgeschlossen werden. Sollten jedoch unspezifische Produkte auftauchen, muss die T<sub>acq</sub> höher als die Schmelztemperatur unspezifischer Produkte und niedriger als die des spezifischen Produktes gewählt werden. Zusätzlich werden auch die Produkte qRT-PCR anhand ihrer Größe anschließend in einem 1,8 %igen Agarosegel kontrolliert.

### 3.2.13.6 Quantitative RT-PCR

Für die quantitative Bestimmung von humanem OGG1 und dem Referenzgen 18S in primären humanen Lymphozyten wurden die folgenden Verdünnungen der zuvor erhaltenen cDNA eingesetzt.

**Tabelle 3-7 eingesetzte cDNA-Verdünnungen für quantitative RT-PCR**

cDNA-Verdünnung	hOGG1	h18S
Primäre humane Lymphozyten	1:25	1:50
PHA-stimulierte Lymphozyten	1:25 – 1:50	1:50
HeLa-Zellen, unbehandelt (Standardkurve)	1:25 und 1:250	1:25 und 1:250

Zunächst wird ein Mix für alle Proben mit folgender Zusammensetzung hergestellt. Die Sequenz der Primer ist der Tabelle unter 3.1.9 zu entnehmen.

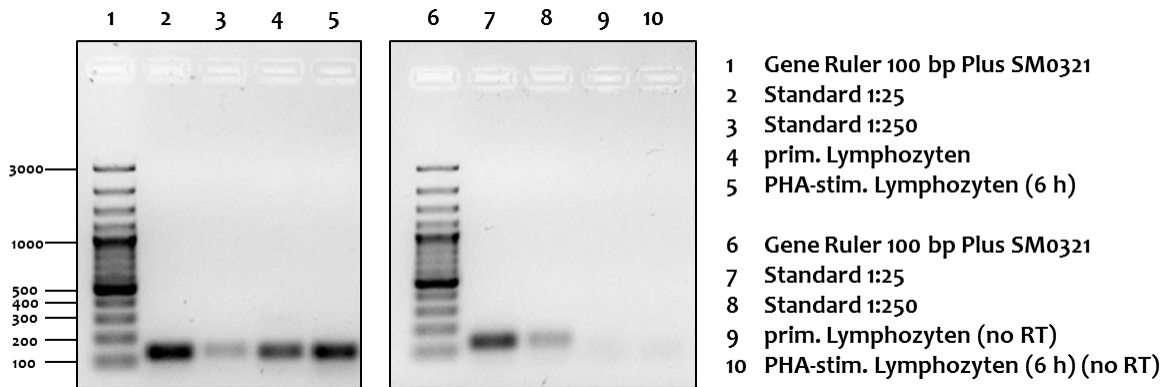
PCR-Wasser	2,44 µl
Primer Forward (2 µM)	3 µl
Primer Reverse (2 µM)	3 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0,36 µl
SYBR Green PLUS Mix, 10fach	1,2 µl
<b>Gesamt</b>	<b>10 µl</b>

Es werden pro Kapillare 10 µl des Mixes vorgelegt und anschließend 2 µl cDNA bzw. 2 µl der noRT-Proben hinzugefügt. Die Kapillaren werden verschlossen und 1 min bei 500 x g zentrifugiert. Die Kapillaren werden vorsichtig in das Karussell des LightCyclers überführt und das Volumen in den Kapillaren wird optisch überprüft. Dann wird die qRT-PCR unter folgenden Bedingungen für die verschiedenen Primer durchgeführt:

**Tabelle 3-8 Durchführungsbedingungen der qRT-PCR für die verwendeten Primer**

	OGG1		18S	
<b>Präinkubation</b>	95 °C	600 s	95 °C	600 s
<b>Quantifizierung</b>	37 Zyklen		30 Zyklen	
<i>Denaturierung</i>	95 °C	10 s	95 °C	10 s
<i>Annealing</i>	72 °C	10 s	60 °C	10 s
<i>Elongation</i>	72 °C	15 s	72 °C	15 s
<i>Tacq</i>	88 °C	5 s	72 °C	5 s
<b>Schmelzkurve</b>	95 °C		95 °C	
	65 °C	60 s	60 °C	60 s
	95 °C	0,1 °C/s 5 min	95 °C	0,1 °C/s 5 min
<b>Kühlen / Ende</b>	40 °C	30 s	40 °C	30 s

Die Spezifität der qRT-PCR wird am Ende immer nochmals anhand der Schmelzkurve überprüft. Abbildung 3-7 zeigt zusätzlich ein exemplarisches Agarosegelbild der Produkte der quantitativen RT-PCR für OGG1. Anhand des Gelbilds ist erkenntlich, dass ein spezifisches Produkt mit der entsprechenden Größe während der qRT-PCR entsteht.



**Abbildung 3-7** Produkte der RT-PCR für OGG1 (131 nt). 1,8 % Agarosegel.

### 3.2.13.7 Auswertung

Für jede Probe erfolgt pro Run eine Doppelbestimmung; Ausnahmen sind noRT-Proben sowie Wasser. Zur Quantifizierung werden in jedem Run 2 verschiedene Verdünnungen (siehe Tabelle 3-7) von cDNA aus HeLa-Zellen als Standard benutzt. Hierdurch wird der zu erfassende Konzentrationsbereich festgelegt. Alle zu messenden Proben müssen in diesem Bereich liegen um quantifiziert werden zu können. Alle Proben werden dann auf eine Probe des gleichen Runs normiert. Hierbei handelt es sich immer um die unbehandelten primären Lymphozyten zugehörig zu den PHA-stimulierten, auf die normalisiert wird. Anschließend wird über die Quantifizierung des Referenzgens 18S der OGG1-Gehalt in den PHA-stimulierten Lymphozyten auf unbehandelte Lymphozyten des gleichen Spenders normalisiert.

## 3.3 Statistik

Alle statistischen Berechnungen für diese Arbeit wurden mit Microsoft Excel 2010 durchgeführt. Für den Vergleich von zwei Mittelwerten wurde der Student's T-Test eingesetzt. Hierbei wurde ein ungepaarter, zweiseitiger T-Test mit Welch-Korrektur zur Berücksichtigung der Annahme einer unterschiedlichen Varianz durchgeführt. Zur Angabe der Signifikanz wurde eine Einteilung nach den folgenden Wahrscheinlichkeiten (p-Wert) vorgenommen:

*	$0,01 < p \leq 0,05$	statistisch signifikant
**	$0,001 < p \leq 0,01$	statistisch sehr signifikant
***	$p < 0,001$	statistisch hoch signifikant

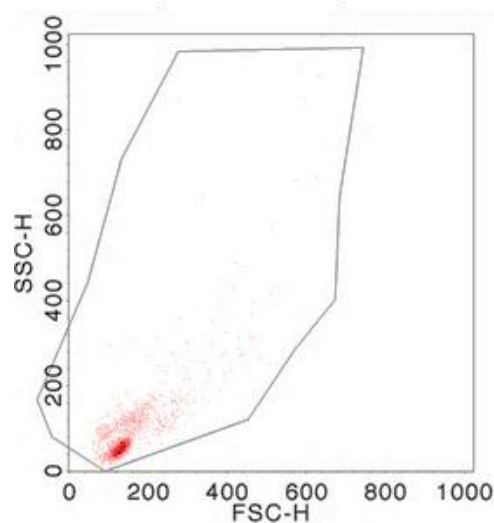
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung der verwendeten primären humanen Lymphozyten

Durch die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen sollten die eingesetzten primären humanen Lymphozyten zunächst hinsichtlich ihres Zellzyklus, ihrer Vitalität während der Kultivierung sowie der basalen oxidativen DNA-Schäden charakterisiert werden.

#### 4.1.1 Charakterisierung primärer humaner Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie

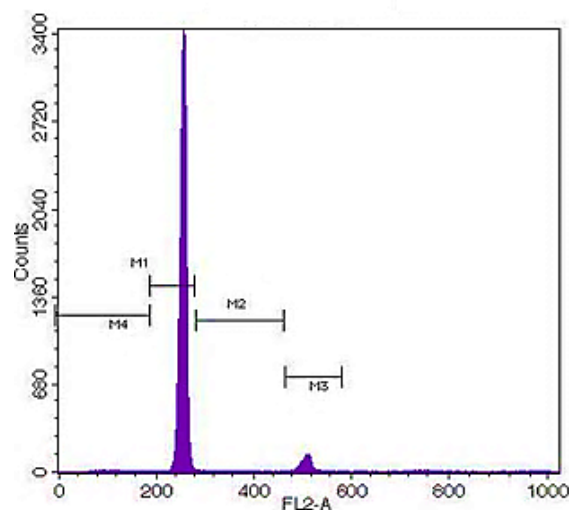
Die eingesetzten Lymphozyten wurden durch Dichtegradientenzentrifugation aus Buffy Coats isoliert (siehe 3.2.2). Die in den Buffy Coats enthaltenen Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten sowie Monozyten sollten dabei möglichst quantitativ von den Lymphozyten abgetrennt werden. Da sich die Zelltypen des Blutes stark in Größe und Granularität unterscheiden, lassen sich die verschiedenen Populationen einfach durchflusszytometrisch anhand des FSC (*forward scatter*) und SSC (*side scatter*) unterscheiden. Um die Qualität der Isolation der Lymphozyten zu überprüfen, wurden daher frisch isolierte Lymphozyten aus Buffy Coats direkt mit Ethanol fixiert und durchflusszytometrisch vermessen.



**Abbildung 4-1 Analyse primärer humaner Lymphozyten mittels Durchflusszytometrie.** Die Lymphozyten wurden direkt nach der Isolation aus Buffy Coats (siehe 3.2.2.1) mit Ethanol fixiert (siehe 3.2.7). Für den dargestellten Dot-Blot wurden 50.000 Zellen durchflusszytometrisch erfasst und der FSC gegen den SSC aufgetragen.

In Abbildung 4-1 ist gut zu erkennen, dass die isolierten Zellen hauptsächlich aus einer Population mit geringer Größe und Granularität bestehen – den Lymphozyten (vergleiche hierzu Abbildung 3-3). Die vereinzelt Zellen, die im Dot-Blot durch einen höheren FSC (Größe) sowie SSC (Granularität) gekennzeichnet sind, gehören zu den Monozyten. Sie bilden zusammen mit den Lymphozyten nach der Dichtegradientenzentrifugation einen Ring mononukleärer Zellen und werden daher gleichzeitig isoliert. Die sich anschließende Abtrennung der Monozyten über Adhäsion an Plastik (siehe 3.2.2.1) erfolgte allerdings nicht vollständig. Anhand der durchflusszytometrischen Analyse wurde durchschnittlich ein Anteil von  $14\% \pm 5,7$  ( $n=10$ ) Monozyten ermittelt.

Gleichzeitig mit der Analyse des FSC und SSC wurde die DNA der Zellen mit Propidiumjodid gefärbt um den Zellzyklus zu bestimmen (siehe 3.2.6).



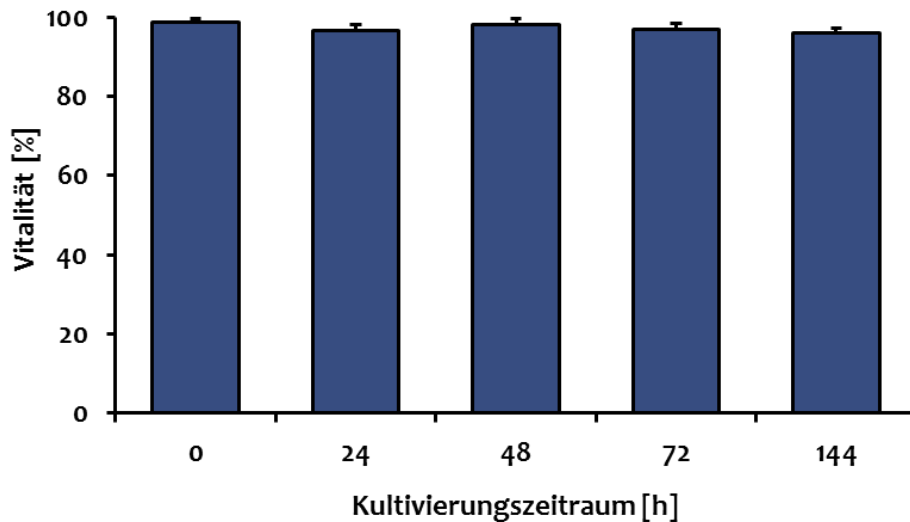
**Abbildung 4-2 Zellzyklusbestimmung primärer humaner Lymphozyten.** Die Lymphozyten wurden direkt nach der Isolation aus Buffy Coats (siehe 3.2.2.1) mit Ethanol fixiert. Vor der durchflusszytometrischen Messung wurde die DNA der Zellen mit Propidiumjodid gefärbt (siehe 3.2.6). Für den dargestellten Dot-Blot wurden 50.000 Zellen durchflusszytometrisch erfasst und die gemessene Fluoreszenz (FL2-A) gegen die entsprechende Zellzahl (Counts) aufgetragen. M1 = G0/G1-Phase; M2 = S-Phase; M3 = G2/M-Phase; M4 = subG1.

Die Abbildung 4-2 zeigt deutlich, dass der Großteil der isolierten Lymphozyten sich in der G0/G1-Phase befindet. Es liegen fast keine Zellen in der S-Phase und nur ein geringer Teil (ca. 5 %) in der G2-Phase vor. Wie zu erwarten war, handelt es sich somit bei den isolierten primären humanen Lymphozyten um ruhende Zellen, die keiner ständigen Zellteilung unterliegen.



### 4.1.2 Vitalität primärer humaner Lymphozyten

Hauptsächlich wurden Behandlungen mit primären humanen Lymphozyten innerhalb von 24 Stunden nach der Isolation abgeschlossen. Um jedoch beurteilen zu können wie stabil die Lymphozyten unter Zellkulturbedingungen sind, wurde die Vitalität mittels Trypanblau (siehe 3.2.5) über 6 Tage nach der Isolation ermittelt.



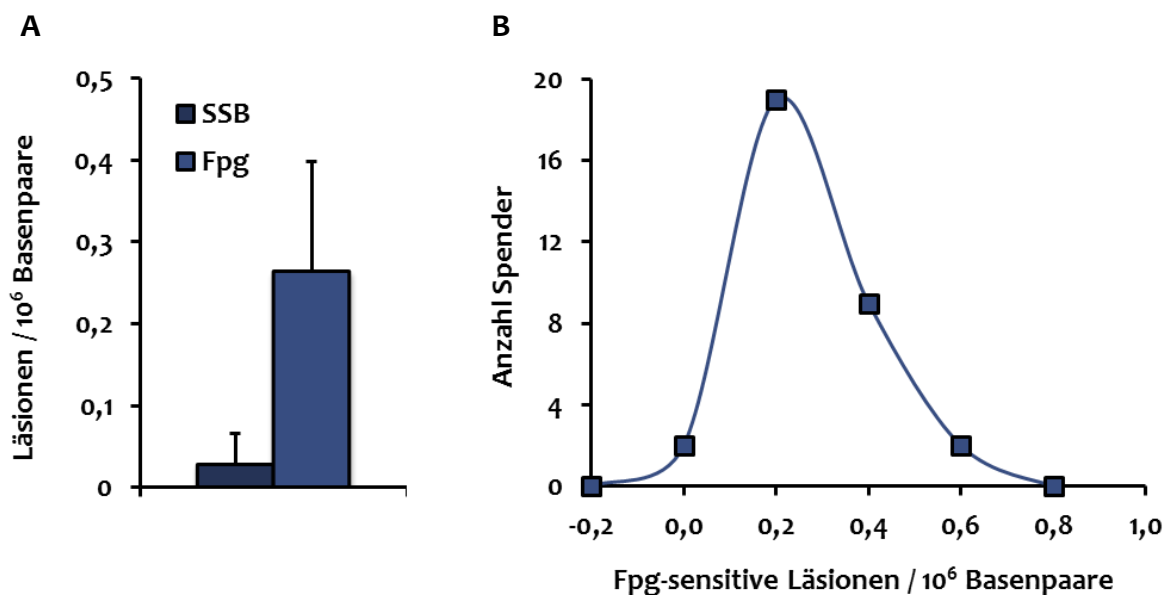
**Abbildung 4-3 Zellvitalität primärer humaner Lymphozyten in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer.** Die Lymphozyten wurden aus Buffy Coats isoliert (siehe 3.2.2.1) und in RPMI-Medium (20 % FCS) kultiviert. Die Vitalität wurde nach unterschiedlich langer Kultivierungsdauer mittels Trypanblau und Neubauer-Zählkammer ermittelt (siehe 3.2.5).  $n=2-7$ .  $MW \pm SD$ .

Die primären humanen Lymphozyten zeigten unter den gewählten Kulturbedingungen eine Vitalität von über 96 % während des gesamten, betrachteten Zeitraumes.

### 4.1.3 Inter- und intraindividuelle Schwankungen basaler Spiegel von oxidativen DNA-Schäden und Einzelstrangbrüchen in primären humanen Lymphozyten

Basale DNA-Schäden spiegeln das Zusammenspiel der Induktion von DNA-Schäden durch endogene sowie exogene Quellen, der zelleigenen DNA-Reparatur sowie der antioxidativen Abwehrmechanismen gegen ROS wider (siehe Abbildung 1-1). Die ständig zirkulierenden Lymphozyten sind dabei ein guter Biomarker stellvertretend für den gesamten Organismus. Inwieweit interindividuelle Unterschiede hinsichtlich oxidativer DNA-Schäden und Einzelstrangbrüche auftreten, sollte durch den Vergleich von 31 Spendern ermittelt werden. Hierfür wurden die basalen DNA-Schäden mit Hilfe der Alkalischen Elution quantifiziert (siehe 3.2.7). Als Sonde wurde die bakterielle Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase (Fpg) eingesetzt, welche oxidative DNA-Schäden (u.a. 8-oxoG) erkennt und einschneidet.

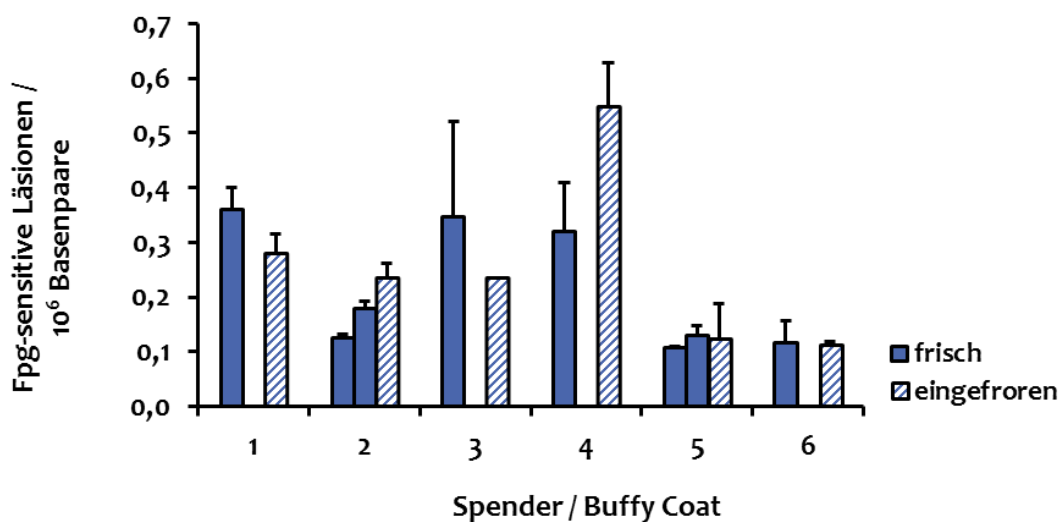
Abbildung 4-4 A zeigt die Mittelwerte der basalen Einzelstrangbrüche sowie Fpg-sensitiven Basenmodifikationen. Die gemessenen oxidativen (Fpg-sensitiven) Basenmodifikationen variieren von 0,110 bis 0,606 pro  $10^6$  Basenpaare. Die Einzelstrangbrüche liegen im Mittel bei 0,03 pro  $10^6$  Basenpaare und sind damit an der Nachweisgrenze. Das Ausmaß oxidativer Basenmodifikationen zeigt große interindividuelle Unterschiede.



**Abbildung 4-4 Basale Einzelstrangbrüche (SSB) und Fpg-sensitive Basenmodifikationen in primären humanen Lymphozyten.** Die Quantifizierung erfolgte in primären Lymphozyten ( $n=31$ ), isoliert aus Buffy Coats, mit Hilfe der Alkalischen Elution (siehe 3.2.8). **(A):** Mittelwerte der SSB und Fpg-sensitiven Basenmodifikationen.  $MW \pm SD$ . **(B):** Verteilung der FPG-sensitiven Basenmodifikationen ( $MW=0,26 \pm 3 SD$ ) Spannweite aufgetragener Punkte  $\pm 0,1$  Fpg-sensitive Basenmodifikationen.

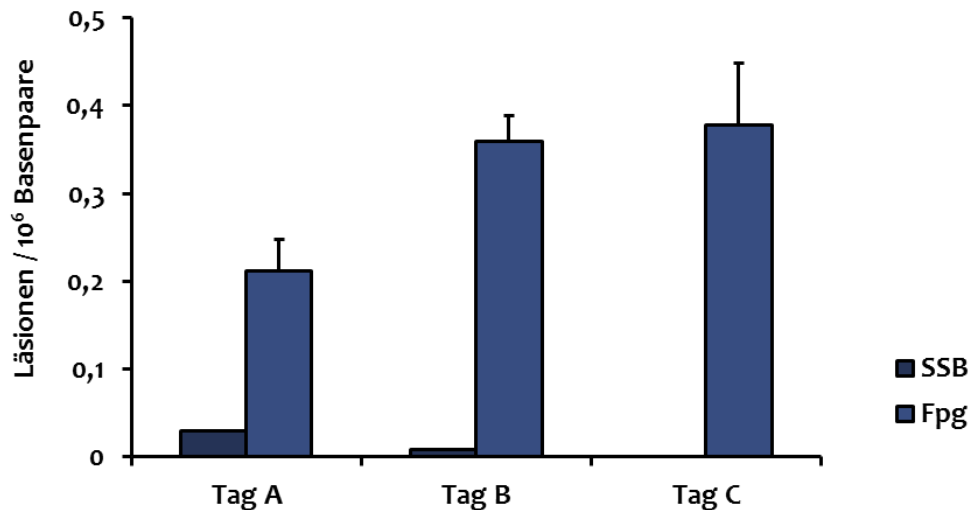
Betrachtet man die Verteilung der Fpg-sensitiven Basenmodifikationen in Abbildung 4-4 B genauer, ergibt sich eine leicht links-schiefe Normalverteilung innerhalb der 31 untersuchten Spender.

Für 6 der 31 Spender wurden mehrere unabhängige Messungen der Fpg-sensitiven Basenmodifikationen vorgenommen (siehe Abbildung 4-5). Hierfür wurden die Lymphozyten, die aus einer Isolation gewonnen wurden, zu unterschiedlichen Zeiten untersucht. Sie wurden entweder direkt mit Hilfe der Alkalischen Elution quantifiziert oder zunächst eingefroren um zu einem späteren Zeitpunkt untersucht werden zu können. Aus den Mehrfachbestimmungen der Fpg-sensitiven Basenmodifikationen ist ersichtlich, dass die Messungen zu einem geringen Teil keine gute Reproduzierbarkeit zeigen. Daher sind experimentelle Schwankungen einzuräumen, die ebenfalls auch Einfluss auf die Streuung der Ergebnisse aus Abbildung 4-4 haben.



**Abbildung 4-5 Mehrfachbestimmung der basalen Fpg-sensitiven Basenmodifikationen in primären humanen Lymphozyten aus einer Isolation.** Primäre Lymphozyten wurden aus Buffy Coats isoliert (siehe 3.2.2) und entweder direkt untersucht (frisch; bei Spender 2 und 5 Parallelmessung) oder nach Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  (eingefroren). Die Fpg-sensitiven Basenmodifikationen wurden mittels Alkalischer Elution (siehe 3.2.8) quantifiziert. Die basalen Fpg-sensitiven Basenmodifikationen aus 2-3 unabhängigen Quantifizierungen (frisch oder eingefroren) sind nebeneinander je Buffy Coat dargestellt. MW aus 2 Fpg-Spuren  $\pm$  Diff. vom MW.

Im Folgenden sollte nun überprüft werden, inwieweit Unterschiede auch intraindividuell auftreten.



**Abbildung 4-6 Intraindividuelle Schwankungen der basalen Einzelstrangbrüche (SSB) und Fpg-sensitiven Modifikationen in primären humanen Lymphozyten eines Spenders.** Die Lymphozyten wurden an drei unterschiedlichen Tagen (innerhalb von 2 Wochen) einem Spender durch Venenpunktion entnommen. Im Anschluss an die Isolation (siehe 3.2.2.2) wurden die Lymphozyten direkt mittels Alkalischer Elution zur Bestimmung der SSB und Fpg-sensitiven Modifikationen untersucht. Die aufgetragenen Mittelwerte ergaben sich aus 2 gleichzeitigen Fpg-Bestimmungen ( $\pm$  Diff. vom MW).

Abbildung 4-6 zeigt basale Einzelstrangbrüche sowie oxidative (Fpg-sensitive) DNA-Modifikationen von einem Spender. Die Lymphozyten wurden hierbei aus EDTA-Blut nach Venenpunktion in einem Zeitraum von 2 Wochen gewonnen und immer direkt gemessen. Während die Einzelstrangbrüche immer deutlich unter 0,05 pro  $10^6$  Basenpaare liegen, ist eine Änderung bezüglich der oxidativen DNA-Schäden um den Faktor 2 gemessen worden; zwischen 0,191 und 0,377 pro  $10^6$  Basenpaare. Aufgrund der Daten aus Abbildung 4-5 muss allerdings die gezeigte experimentelle Variabilität auch hier mit berücksichtigt werden. Die gemessenen Abweichungen innerhalb eines Spenders, isoliert zu unterschiedlichen Zeiten (siehe Abbildung 4-6), sind jedoch höher als innerhalb der Mehrfachbestimmungen aus einer Lymphozytenisolation (siehe Abbildung 4-5). Somit können intraindividuelle Schwankungen angenommen werden.

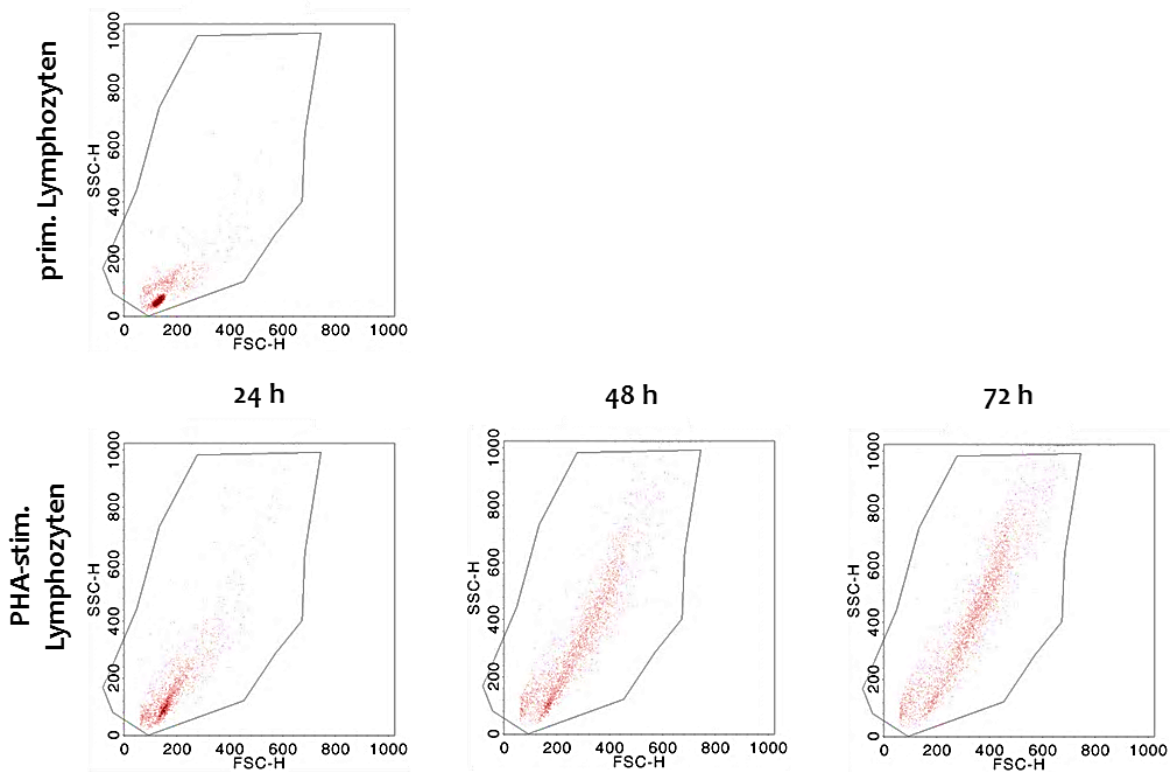
## 4.2 Untersuchungen zum Effekt der PHA-Stimulation in humanen Lymphozyten

Im Rahmen der Charakterisierung basaler oxidativer DNA-Schäden in Lymphozyten wurden diese nicht nur in ihrem primären, ruhenden Status, wie 4.1 beschrieben, untersucht, sondern auch im aktivierten Zustand. Hierfür wurde das Mitogen PHA eingesetzt, welches die physiologische Aktivierung von Lymphozyten über eine Antigenpräsentation nachahmt (siehe hierzu 1.1.2 und 1.1.3). Die folgenden Untersuchungen sollten zunächst die zytologischen Veränderungen durch die PHA-Stimulation aufzeigen. Hierfür werden die Lymphozyten insgesamt 72 Stunden mit PHA stimuliert, anschließend weitere 72 Stunden ohne PHA kultiviert (siehe 3.2.3) und während oder nach der Stimulation untersucht.

### 4.2.1 Änderung des FSC und SSC im durch PHA-Stimulation

Primäre humane Lymphozyten sind kleine (6-9  $\mu\text{M}$ ) Zellen, die hauptsächlich aus einem Zellkern mit einer dünnen Zytoplasmaschicht bestehen. Durch die PHA-Stimulation werden sie aktiviert und modifizieren ihre Morphologie. Um die Änderung von Größe und Granularität untersuchen zu können, die durch die PHA-Stimulation bedingt ist, wurden Lymphozyten durchflusszytometrisch vermessen.

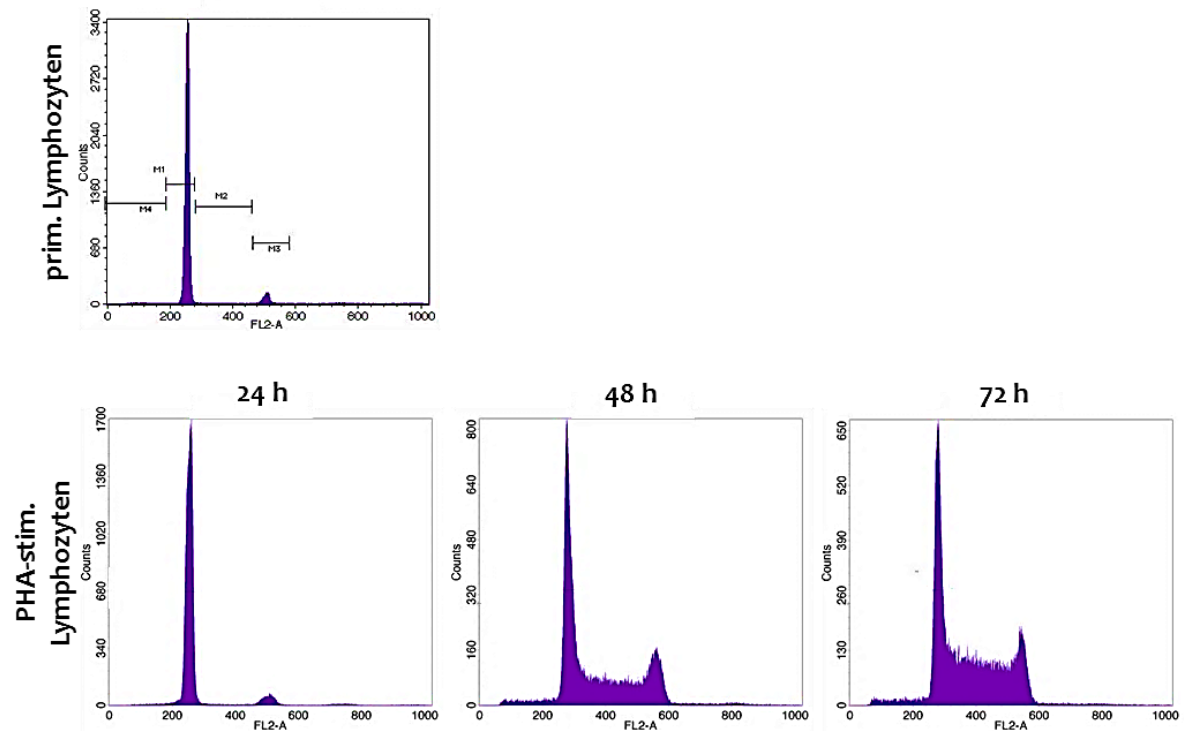
In Abbildung 4-7 ist zu erkennen, dass bereits nach 24 Stunden PHA-Stimulation eine Erhöhung von FSC (Größe) und SSC (Granularität) erkennbar ist. Dieser Effekt wird nach 48 und schließlich 72 Stunden nochmals deutlich gesteigert. Im Vergleich zu den primären Lymphozyten sind die PHA-stimulierte Lymphozyten eine heterogenere Zellpopulation mit unterschiedlichen Zellgrößen und Granularitäten. Da selbst nach 72 Stunden Stimulation ein geringer Teil der Zellen weiterhin die Eigenschaften der primären Lymphozyten zeigt (geringer FSC und SSC), ist davon auszugehen, dass wahrscheinlich nicht alle Lymphozyten durch PHA aktiviert wurden.



**Abbildung 4-7 Analyse humaner Lymphozyten ± PHA mittels Durchflusszytometrie.** Die Lymphozyten jeweils eines Buffy Coats (Isolation siehe 3.2.2.1) wurden entweder direkt mit Ethanol fixiert (primäre Lymphozyten) oder nach Stimulation mit PHA (24, 48 oder 72 h). Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Untersuchung (siehe 3.2.7). Für die dargestellten Dot-Blots wurden jeweils 50.000 Zellen durchflusszytometrisch erfasst und der FSC gegen den SSC aufgetragen.

#### 4.2.2 Änderung des Zellzyklus durch PHA-Stimulation

Eine PHA-Stimulation bewirkt nicht nur eine morphologische Veränderung in den Lymphozyten, sondern ändert auch den Zellzyklus. Stimulierte Lymphozyten sind im Vergleich zu primären Lymphozyten in der Lage wieder in den Zellzyklus einzutreten und sich zu teilen. Wie schnell sich diese Fähigkeit während der Stimulation entwickelt sollte im Folgenden untersucht werden. Hierfür erfolgte eine Zellzyklusanalyse nach verschiedenen Stimulationszeiten (siehe 3.2.6). Die Histogramme der durchflusszytometrischen Auswertung sind in Abbildung 4-8 dargestellt. Die zugehörige Aufteilung der gemessenen Zellen auf die einzelnen Phasen des Zellzyklus sind Tabelle 4-1 zu entnehmen.



**Abbildung 4-8 Bestimmung des Zellzyklus in Abhängigkeit von der PHA-Stimulation in humanen Lymphozyten.** Die Lymphozyten wurden aus Buffy Coats isoliert (siehe 3.2.2.1) und direkt mit Ethanol fixiert (primäre Lymphozyten) oder nach PHA Stimulation (24, 48 oder 72 h). Vor der durchflusszytometrischen Messung wurde die DNA der Zellen mit Propidiumjodid gefärbt (siehe 3.2.6). Für die dargestellten Dot-Blots wurden jeweils 50.000 Zellen durchflusszytometrisch erfasst und die gemessene Fluoreszenz (FL2-A) gegen die entsprechende Zellzahl (Counts) aufgetragen. M1 = Go/G1-Phase; M2 = S-Phase; M3 = G2/M-Phase; M4 = subG1.

**Tabelle 4-1 Prozentuale Zellzyklusverteilung der primären und PHA-stimulierten Lymphozyten aus Abbildung 4-8.**

	prim. Lymphozyten	24 h PHA	48 h PHA	72 h PHA
Go/G1	91,1	89,8	44,2	41,8
S	1,1	1,1	26,9	37,2
G2/M	5,3	6,1	24,3	15,6
sub G1	1,3	1,1	2,8	4,2

Nach 24 Stunden PHA-Stimulation konnte bereits eine Änderung der Größe und Granularität festgestellt werden (vergleiche Abbildung 4-7). Hinsichtlich des Zellzyklus ist jedoch zu diesem Zeitpunkt keine Änderung erkennbar. Der Großteil der Zellen befindet sich weiterhin in der Go/G1-Phase. Nach 48 Stunden sind jedoch deutlich mehr Zellen in der S- (27 %) und G2/M-Phase (24 %). Dieser Effekt wird nach 72 Stunden Stimulation nochmals verstärkt (37 % S-Phase, 16 % G2/M-Phase). Zu diesem Zeitpunkt

liegt eine deutlich proliferierende Population vor. Die primären, ruhenden Lymphozyten sind somit in der Lage, durch PHA-Stimulation nach 48 Stunden wieder in den Zellzyklus einzutreten und zu proliferieren.

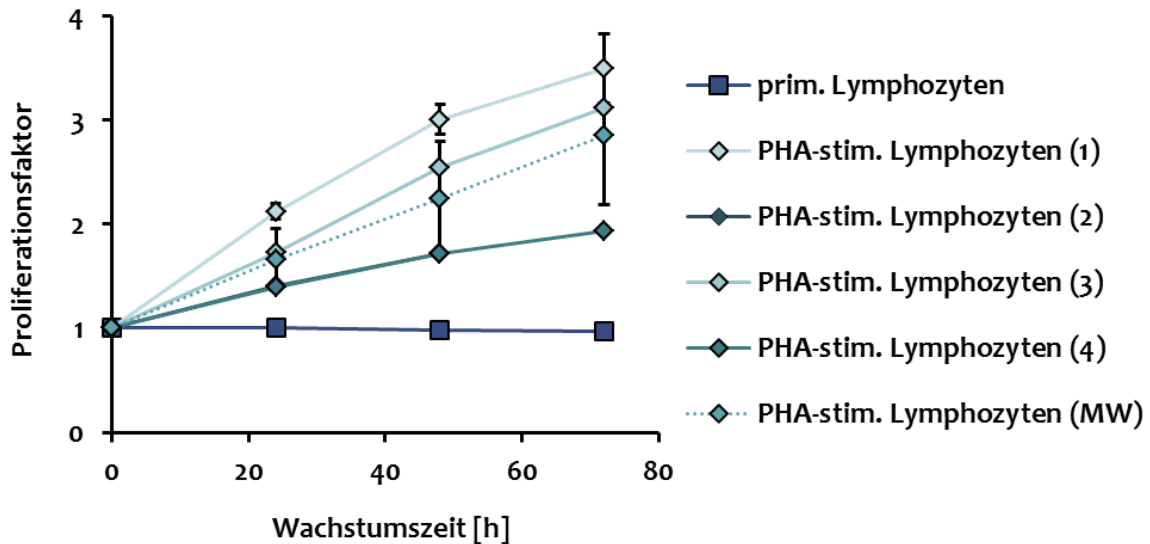
### **4.2.3 Einfluss der PHA-Stimulation auf die Proliferation primärer Lymphozyten**

Anhand der folgenden Proliferationsdaten sollte untersucht werden, wie schnell die Teilung stimulierter Lymphozyten erfolgt. Unter 4.2.2 wurde bereits mithilfe der Zellzyklusverteilung gezeigt, dass nach 48 Stunden eine deutliche Proliferation eintritt, die nach 72 Stunden nochmals gesteigert wird. Inwieweit die stimulierten Lymphozyten, nach der 72-stündigen PHA-Behandlung, unter den sich anschließenden normalen Kulturbedingungen (RPMI-Medium mit 20 % FCS, ohne PHA) weiterhin proliferieren, zeigen die folgenden Ergebnisse.

Hierzu wird nach 72-stündiger Stimulation der Proliferationsfaktor in den folgenden 3 Tagen alle 24 Stunden ermittelt. Die Lymphozyten werden währenddessen unter normalen Kulturbedingungen ohne PHA gehalten.

Abbildung 4-9 zeigt, dass alle stimulierten Lymphozyten auch nach Abschluss der PHA-Behandlung in der Lage sind zu proliferieren, während primäre Lymphozyten im gleichen Zeitraum keine Proliferation zeigen. Die ermittelten Proliferationsfaktoren sind jedoch unterschiedlich in den Lymphozyten aus verschiedenen Isolationen. Da unter 4.2.1 bereits gezeigt werden konnte, dass nicht alle Lymphozyten aktiviert werden, ist anzunehmen, dass dadurch die unterschiedlichen Proliferationsfaktoren, zumindest teilweise, erklärt werden können.



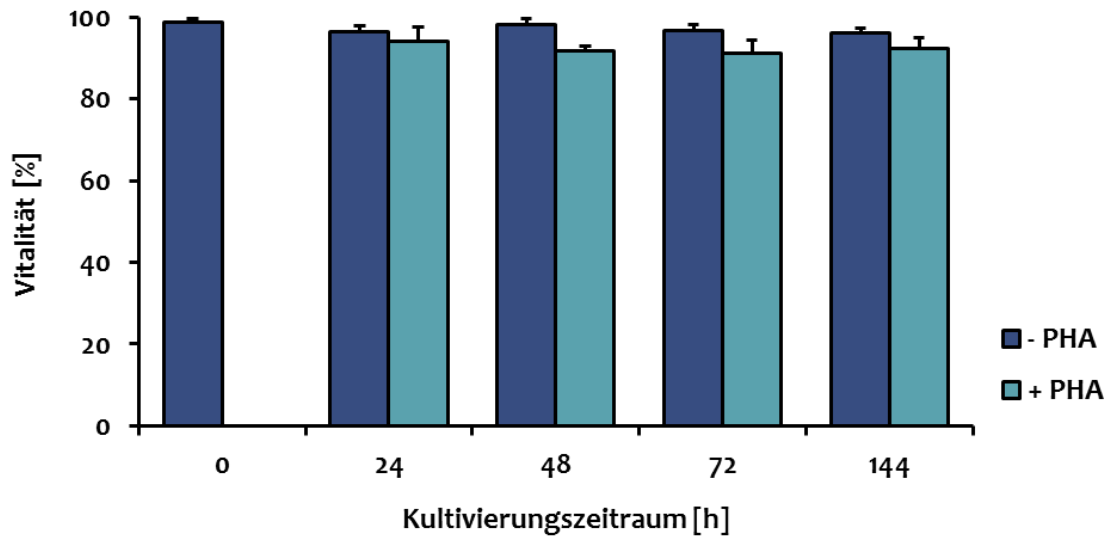


**Abbildung 4-9 Proliferation PHA-stimulierter Lymphozyten (nach abgeschlossener Stimulation) im Vergleich zu primären Lymphozyten.** Die Lymphozyten wurden nach der Isolation 72 h mit PHA in RPMI-Medium (20 % FCS) stimuliert oder 72 Std. nur in RPMI-Medium (20 %) kultiviert. Die Proliferationsfaktoren wurden danach für die folgenden 72 Std. ermittelt (Zeitpunkt 0 entspricht 72 h nach der Isolation) (siehe 3.2.4). Während der Bestimmung der Proliferationsfaktoren erfolgte die Kultivierung der PHA-stimulierten und primären Lymphozyten nur in RPMI-Medium (20% FCS). PHA-stimulierte Lymphozyten 1-4 stammen aus unabhängigen Buffy Coats, die an verschiedenen Tagen isoliert wurden. Buffy Coat 2 und 4 verlaufen identisch. MW von jeweils 2 Bestimmungen  $\pm$  Differenz vom MW. MW aus 4 unabhängigen Bestimmungen (1-4)  $\pm$  SD. MW primärer Lymphozyten ( $n=3$ )  $\pm$  SD.

#### 4.2.4 Einfluss der PHA-Stimulation auf die Vitalität primärer Lymphozyten

Da das Mitogen PHA 72 Stunden in der Lymphozytenkultur vorhanden ist, sollte im Folgenden überprüft werden, ob diese Bedingungen einen Einfluss auf die Vitalität haben und die Behandlung toxisch ist.

Nachfolgend wurden Lymphozyten mit oder ohne PHA kultiviert (siehe 3.2.3) und über einen Zeitraum von 6 Tagen die Vitalität alle 24 Stunden mittels Trypanblau gemessen (siehe 3.2.5). In den letzten 3 Tagen wurden alle Lymphozyten, auch die stimulierten, ohne PHA kultiviert.



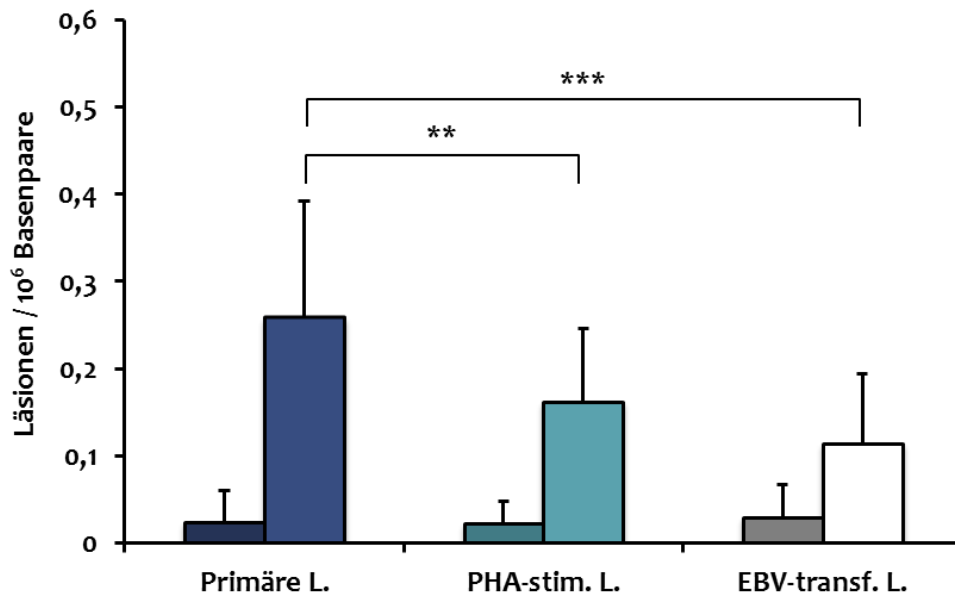
**Abbildung 4-10 Zellvitalität primärer und PHA-stimulierter Lymphozyten in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer.** Die Lymphozyten wurden aus Buffy Coats isoliert (siehe 3.2.2.1). und für die folgenden 72 h mit oder ohne PHA in RPMI-Medium (20 % FCS) kultiviert. Für weitere 72 h erfolgte die Kultivierung aller Lymphozyten nur in RPMI-Medium ohne PHA (20 % FCS) (siehe 3.2.3). Die Vitalität wurde nach unterschiedlich langer Kultivierungsdauer mittels Trypanblau und Neubauer-Zählkammer ermittelt (siehe 3.2.5). n=2-7; MW + SD.

Abbildung 4-10 ist zu entnehmen, dass die Vitalität durch eine PHA-Behandlung kaum beeinflusst wird. Die Vitalität der stimulierten Lymphozyten liegt zwischen 91 und 94 % und ist somit im Vergleich zu den unstimulierten (> 96 %) leicht erniedrigt.

#### 4.2.5 Einfluss der PHA-Stimulation auf basale oxidative DNA-Schäden sowie Einzelstrangbrüche

Interindividuelle sowie intraindividuelle Schwankungen der basalen oxidativen DNA-Schäden konnten bereits für primäre Lymphozyten gezeigt werden (siehe Abbildung 4-4 und Abbildung 4-6). In den folgenden Versuchen sollte nun untersucht werden, ob basale oxidative DNA-Schäden ebenfalls durch eine PHA Stimulation verändert sind.

Hierfür wurden die basalen DNA-Schäden in primären Lymphozyten direkt nach der Isolation und in PHA-stimulierten Lymphozyten nach 72-stündiger Stimulation sowie anschließender gleichlanger Kultivierung ohne PHA (siehe 3.2.3) mit Hilfe der Alkalischen Elution unter Verwendung von Fpg gemessen (siehe 3.2.8). Zusätzlich wurde ein Vergleich zu einer immortalisierten Lymphozytenzelllinie gezogen. Hierbei handelte es sich um B-Lymphozyten von einem Spender, die über eine EBV-Transfektion immortalisiert wurden (siehe 3.1.11.3).

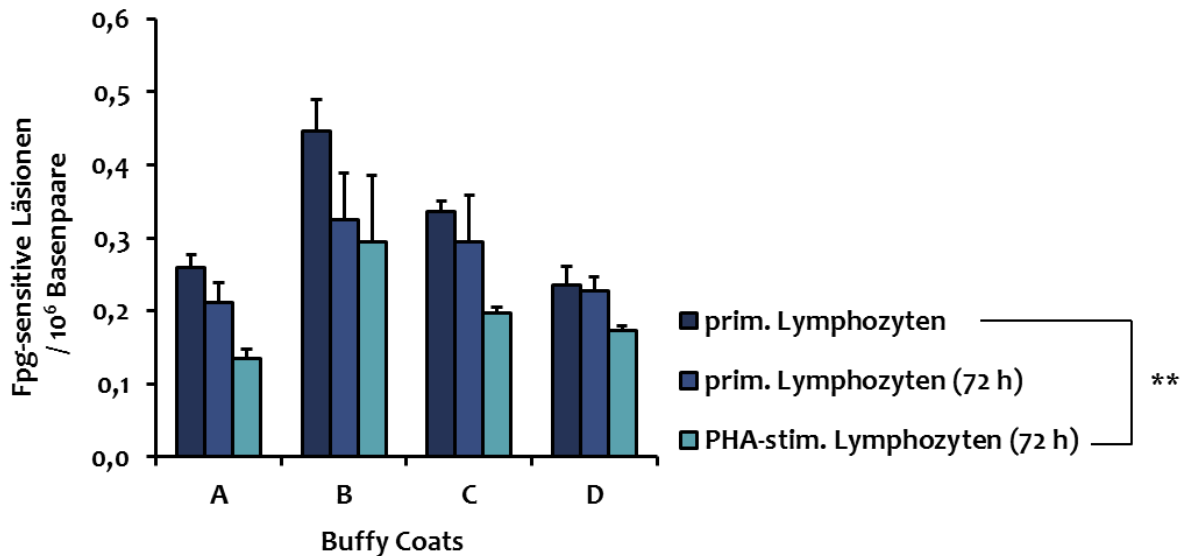


**Abbildung 4-11 Vergleich basaler Einzelstrangbrüche (SSB) und Fpg-sensitiver Basenmodifikationen in Lymphozyten.** Die Abbildung zeigt je untersuchter Gruppe die gemessenen SSB und Fpg-sensitiven Basenmodifikationen nebeneinander. Die Quantifizierung der SSB und Fpg-sensitiven Basenmodifikationen erfolgte mit Hilfe der Alkalischen Elution. Primäre Lymphozyten ( $n=31$ ) wurden direkt nach der Isolation (siehe 3.2.2.1) untersucht, PHA-stimulierte Lymphozyten ( $n=20$ ) im Anschluss an die Stimulation und weiteren 72 Std. Kultivierung (siehe 3.2.3) und EBV-transformierte Lymphozyten ( $n=9$ ) nach unterschiedlichen Kultivierungszeiträumen (siehe 3.1.11.3). Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines zweiseitigen T-Tests mit Welchkorrektur (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) bezogen auf die primären Lymphozyten berechnet. MW + SD.

Abbildung 4-11 zeigt für alle drei untersuchten Gruppen ein vergleichbares Ausmaß an basalen Einzelstrangbrüchen, welches deutlich unter  $0,1$  SSB pro  $10^6$  Basenpaare liegt. Die gemessenen oxidativen DNA-Schäden (Fpg-sensitive Schäden) sind hingegen in den primären Lymphozyten am höchsten. Eine PHA-Stimulation der Lymphozyten führt zu einer signifikanten Erniedrigung der oxidativen DNA-Schäden. In den EBV-transformierten Lymphozyten wurden ebenfalls signifikant niedrigere oxidative DNA-Schäden ermittelt als in den primären Lymphozyten. Hierbei ist allerdings zu beachten, dass es sich nur um eine immortalisierte Zelllinie von einem Spender handelt. Somit sind hier keine interindividuellen Unterschiede nach EBV-Transfektion inbegriffen.

Um den Effekt der PHA-Stimulation genauer beurteilen zu können, wurden im folgenden Experiment jeweils für 4 verschiedene Spender (Buffy Coat A bis D) die Änderungen der basalen oxidativen (Fpg-sensitiven) DNA-Schäden einzeln betrachtet. Mit Hilfe der Alkalischen Elution wurden die Fpg-sensitiven Basenmodifikationen der

Lymphozyten entweder direkt nach der Isolation (primäre) oder nach 72 Stunden Kultivierung  $\pm$  PHA untersucht.



**Abbildung 4-12 Basale Fpg-sensitive Basenmodifikationen in primären und PHA-stim. Lymphozyten.** Die Quantifizierung der Fpg-sensitiven Basenmodifikationen erfolgte mittels der Alkalischen Elution (siehe 3.2.8). Die untersuchten Lymphozyten wurden aus 4 verschiedenen Buffy Coats (A-D) an 4 unterschiedlichen Tagen isoliert (siehe 3.2.2.1). Die Lymphozyten wurden entweder direkt nach der Isolation oder nach 72 h Kultivierung  $\pm$  PHA (siehe 3.2.3) eingefroren um gleichzeitig (Lymphozyten eines Buffy Coats) untersucht werden zu können. MW stammen aus Doppelbestimmungen während einer Messung  $\pm$  Diff. vom MW. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines zweiseitigen T-Tests mit Welchkorrektur (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) bezogen auf die primären Lymphozyten berechnet.

In allen 4 untersuchten Spendern führte die PHA-Stimulation zu einer signifikanten Erniedrigung der gemessenen basalen oxidativen DNA-Schäden nach 72 Stunden. Diese basalen oxidativen DNA-Schäden lagen zwischen 52 und 73 % der entsprechenden frisch isolierten Lymphozyten. Die reine Kultivierung der Lymphozyten über 72 Stunden führte zu einer geringfügigen, nicht signifikanten Reduktion um 3 bis 27 %.

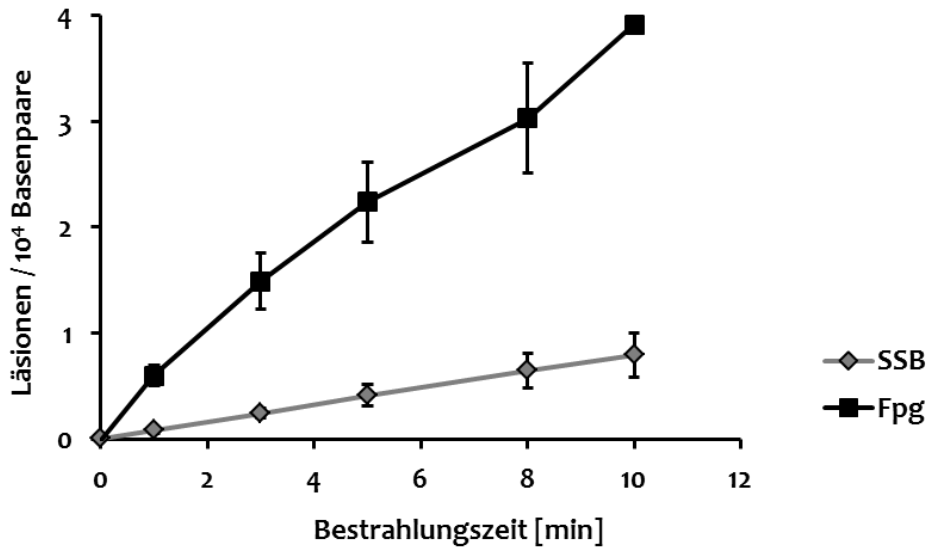
## 4.3 Induktion und Reparatur oxidativer Basenmodifikationen nach Acridinorange und Licht

Oxidative Basenmodifikationen sind das Ergebnis nicht nur von exogenen sondern auch von endogenen ROS, wie in Kapitel 1 erläutert. Die bisherigen Ergebnisse konnten zeigen, dass die basalen Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Schäden in primären Lymphozyten sowohl inter- als auch intraindividuell variieren. Durch eine Stimulation mit PHA wurde eine Senkung der basalen oxidativen DNA-Schäden beobachtet. Dies könnte entweder durch einen besseren Schutz gegenüber endogener DNA-Schädigung oder durch eine bessere Reparatur in den stimulierten Zellen begründet sein. Durch die folgenden Experimente sollte deshalb überprüft werden, inwiefern sich durch eine PHA-Stimulation einerseits die Suszeptibilität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien oder andererseits die Reparaturgeschwindigkeit ändert.

Für die Induktion oxidativer DNA-Schäden wurde der Photosensibilisator Acridinorange (siehe 1.4.1) eingesetzt. Im Folgenden sollten die durch Acridinorange (AO) und sichtbares Licht induzierten DNA-Schäden zunächst in zellfreier PM<sub>2</sub>-DNA und anschließend in den für die vorliegende Arbeit eingesetzten Lymphozyten analysiert werden. Daraus wurden dann geeignete Schädigungsbedingungen für die Untersuchung der DNA-Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen abgeleitet.

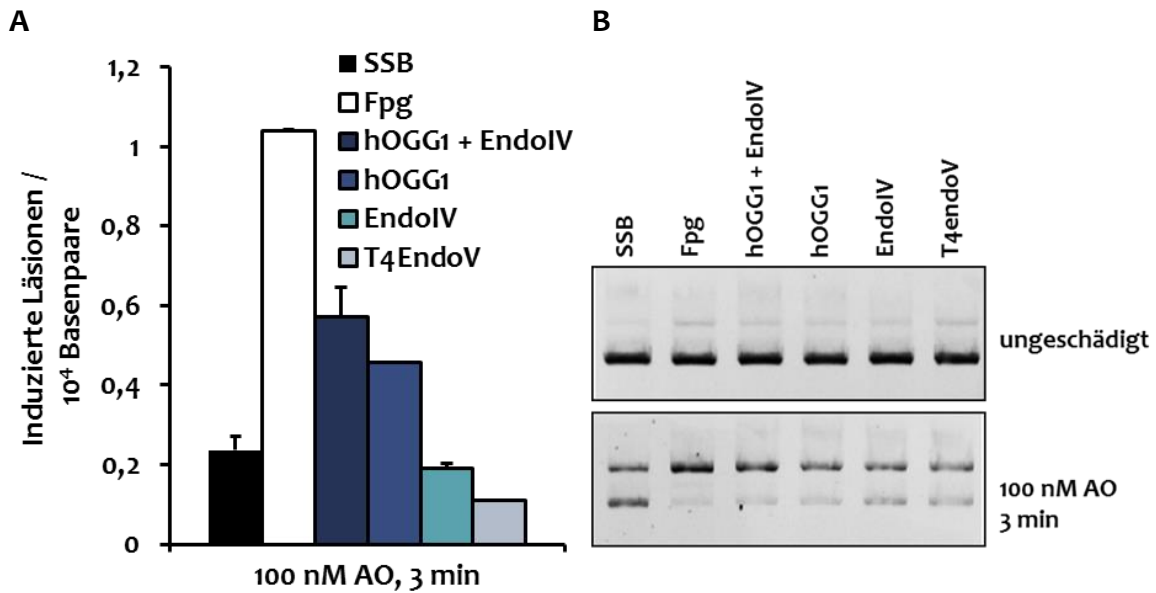
### 4.3.1 Schadensprofil in PM<sub>2</sub> DNA

Um ein Schadensprofil, einen sogenannten *fingerprint*, von AO und Licht detektieren zu können, wurden zunächst die Fpg-sensitiven Modifikationen in Abhängigkeit von der Bestrahlungszeit mit jeweils 100 nM AO mit Hilfe des PM<sub>2</sub>-Relaxationsassays (siehe 3.2.10) ermittelt. Da bereits bekannt war, dass hauptsächlich Fpg-sensitive Modifikationen durch AO und Licht erzeugt werden (EPE et al. 1993a; EPE et al. 1993b), sollte so zunächst eine geeignete Bestrahlungszeit zur Testung weiterer Endonuklease-sensitiver Läsionen ermittelt werden.



**Abbildung 4-13 Induktion von Einzelstrangbrüchen (SSB) und Fpg-sensitiven Läsionen in PM<sub>2</sub> DNA durch Acridinorange und sichtbares Licht in Abhängigkeit von der Bestrahlungsdauer.** Die Schadensinduktion erfolgte in Anwesenheit von 100 nM AO und Bestrahlung mit sichtbarem Licht (38 cm Abstand zur Lampe, 1-10 min Bestrahlung zwischen 400 und 800 nm). n=2. MW ± Diff. vom MW.

Abbildung 4-13 gibt sowohl für die induzierten Einzelstrangbrüche als auch für die induzierten Fpg-sensitiven Basenmodifikationen einen linearen Zusammenhang zur Bestrahlungszeit wieder. Für den nachfolgenden Einsatz verschiedener Reparaturenzyme zur Differenzierung des Schadensprofils wurden 3 min als Bestrahlungszeit ausgewählt. Für dieses Experiment wurde nun eine größere Menge PM<sub>2</sub> DNA, aufgeteilt auf mehrere Tropfen zu je 60 µl, gleichzeitig bestrahlt und anschließend mit verschiedenen Reparaturenendonukleasen inkubiert. Insbesondere sollte die Frage beantwortet werden, welcher Anteil der Fpg-sensitiven Läsionen 8-oxoG entsprechen. Um dies zu untersuchen wurde OGG1 eingesetzt, da es für die Detektion von 8-oxoG spezifischer als Fpg ist. OGG1 erkennt beispielsweise keine oxidierten Adenin-Modifikationen. EndoIV wurde gleichzeitig hinzugefügt um die Glykosylaseaktivität von OGG1 zu unterstützen und somit nicht nur eine AP-Läsion zu erzeugen, sondern auch einen Strangbruch, denn nur dieser kann im PM<sub>2</sub>-Assay detektiert werden.



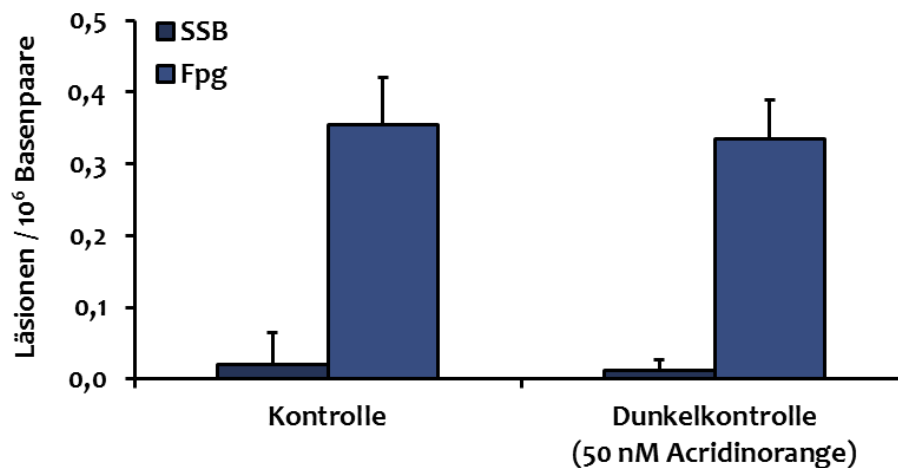
**Abbildung 4-14 Schadensspektrum von Acridinorange.** Die Untersuchung des Schadensspektrums wurde mit Hilfe des PM<sub>2</sub>-Relaxationsassays (siehe 3.2.10) durchgeführt. Die Schadensinduktion erfolgte durch 100 nM AO und Bestrahlung mit sichtbarem Licht (3 min, 50 kJ/m<sup>2</sup> zwischen 400 und 800 nm). (A) Induzierte Läsionen: Fpg [1 µg/ml], OGG1 [0,76 µg/ml], EndoIV [0,13 U/µl], T4EndoV [1,12 µg/ml]. Die DNA-Schäden der unbehandelten PM<sub>2</sub>-DNA sowie Einzelstrangbrüche wurden jeweils abgezogen. (B) Exemplarisches Gelbild. n=1-2. MW ± Diff. vom MW.

In Abbildung 4-14 ist zu sehen, dass etwa 60 % der Fpg-sensitiven Läsionen auch OGG1-sensitiv (+ EndoIV) sind. Es ist wahrscheinlich, dass dieser Anteil hauptsächlich 8-oxoG entspricht. Unklar ist bisher, welche Läsionen den Anteil der Fpg-sensitiven Basenmodifikationen ausmachen, die nicht von OGG1 erkannt werden. Zusätzlich entstehen Einzelstrangbrüche sowie AP-Läsionen in vergleichbarem Ausmaß. Diese werden von den Endonukleasen EndoIV und T4EndoV erkannt.

#### 4.3.2 Schadensinduktion von Acridinorange und sichtbarem Licht in humanen Lymphozyten

In den folgenden Experimenten sollte nun überprüft werden, ob die Schadensinduktion mit Acridinorange und sichtbarem Licht geeignet ist, um Suszeptibilitätsunterschiede zwischen primären und PHA-stimulierten Lymphozyten nachzuweisen. Hierzu wurden die durch Acridinorange und sichtbares Licht induzierten Einzelstrangbrüche, AP-Läsionen (T4EndoV-sensitiv) und oxidativen DNA-Modifikationen (Fpg-sensitiv) in primären, PHA-stimulierten und EBV-transformierten Lymphozyten mittels der Alkalischer Elution quantifiziert (siehe 3.2.8).

Zunächst sollte überprüft werden, ob Acridinorange ohne Licht (Dunkelkontrolle) DNA-Schäden in Zellen erzeugt. Abbildung 4-15 zeigt die Ergebnisse für primäre Lymphozyten. Kontrolle und Dunkelkontrolle wurden analog zu den Bestrahlungsbedingungen in PBS aufgenommen und die Dunkelkontrolle zusätzlich mit 50 nM Acridinorange versetzt. Anschließend wurde abzentrifugiert und die Zellen in RPMI-Medium 4 Stunden im Brutschrank inkubiert.

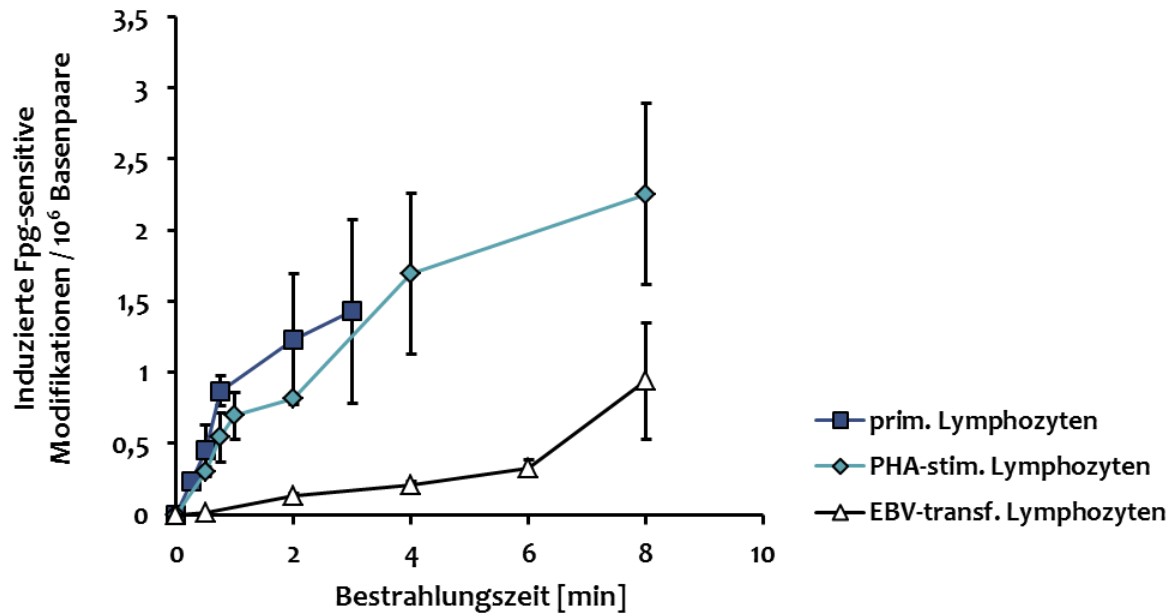


**Abbildung 4-15 Einfluss von Acridinorange (AO) auf basale Einzelstrangbrüche (SSB) und Fpg-sensitive Basenmodifikationen in primären Lymphozyten.** Die Quantifizierung der DNA-Schäden erfolgte mit Hilfe der Alkalischen Elution (siehe 3.2.7). Lymphozyten wurden direkt nach der Isolation (siehe 3.2.2.1) analog zur Schadensinduktion mit  $\pm$  50 nM AO in PBS (siehe 3.2.9.1) versetzt, für den Bestrahlungszeitraum im Dunkeln inkubiert und anschließend für 4 h im Brutschrank in RPMI-Medium (20 % FCS) kultiviert.  $n=5$ . MW  $\pm$  SD.

Wie in Abbildung 4-15 zu erkennen ist, werden basale Spiegel von Einzelstrangbrüchen und oxidativen Basenmodifikationen in primären Lymphozyten von 50 nM Acridinorange nicht beeinflusst.

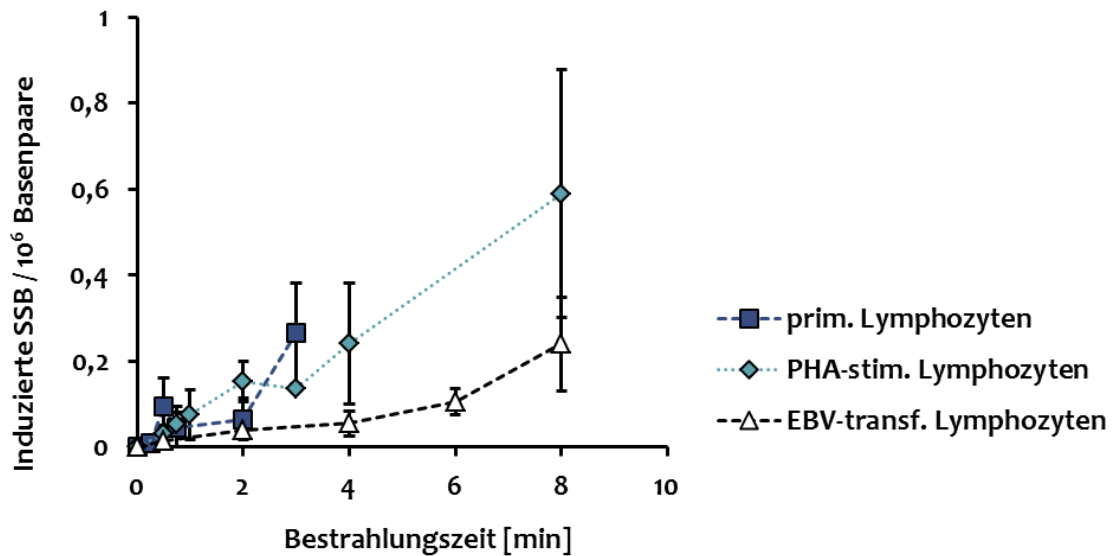
Erst durch die Bestrahlung mit sichtbarem Licht kommt es zur Generierung von DNA-Schäden. Diese sollten nun einzeln nach Art des Schadens in den verschiedenen Lymphozyten untersucht und verglichen werden. Hierfür wurden primäre, PHA-stimulierte und EBV-transformierte Lymphozyten in Anwesenheit von 50 nM Acridinorange, im Abstand von 38 cm zur Lichtquelle, auf Eis, unterschiedlich lang bestrahlt.





**Abbildung 4-16 Induktion Fpg-sensitiver Basenmodifikationen durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Anwesenheit von Acridinorange.** Die Schadensinduktion erfolgte auf Eis mit 50 nM AO, 38 cm Abstand zur Halogenlampe (400-800 nm) und verschiedenen Bestrahlungszeiten (15 sec bis 8 min) (siehe 3.2.9.1). Die Fpg-sensitiven DNA-Schäden wurden mit Hilfe der Alkalischen Elution quantifiziert (siehe 3.2.7) Primäre Lymphozyten (n=2-7), PHA-stimulierte Lymphozyten (n=3-12) und EBV-transformierte Lymphozyten (n=3-8). MW  $\pm$  SD.

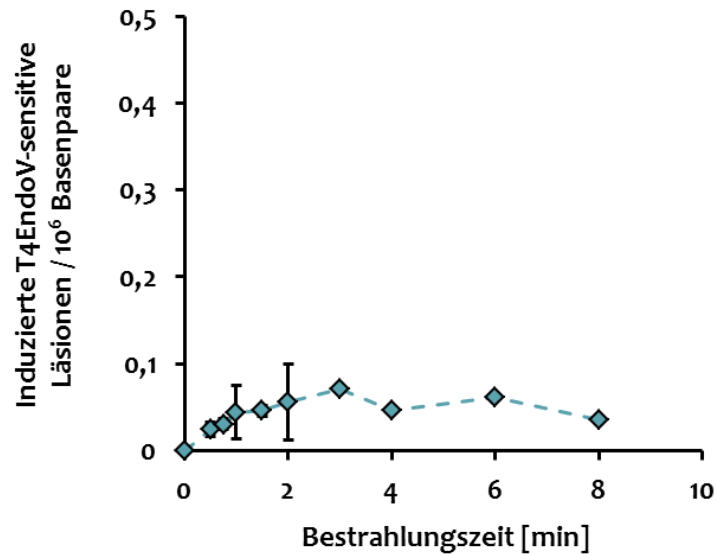
In Abbildung 4-16 sind die induzierten Fpg-sensitiven Modifikationen in den unterschiedlichen Lymphozyten dargestellt. Primäre und PHA-stimulierte Lymphozyten zeigen ein vergleichbares Ausmaß der Schadensinduktion. Die induzierten Fpg-sensitiven DNA-Schäden sind allerdings bei gleicher Bestrahlungszeit in primären und PHA-stimulierten Lymphozyten höher als in den EBV-transformierten. In Anwesenheit von 50 nM Acridinorange sind in primären und PHA-stimulierten Lymphozyten Bestrahlungszeiten von 45 sec bis 1 min ausreichend, um Werte von ca. 0,8 Läsionen pro 10<sup>6</sup> Basenpaare zu erreichen. Für eine vergleichbare Induktion müssen die EBV-transformierten Lymphozyten hingegen 8 min bestrahlt werden. Die Abhängigkeit der Induktion von Fpg-sensitiven Modifikationen von der Bestrahlungszeit ist in allen Zellen gut erkennbar. PHA-stimulierte sowie primäre Lymphozyten zeigen für die Bestrahlungszeiten bis zu 1 min einen linearen Zusammenhang zwischen induzierten DNA-Schäden und Bestrahlungszeit mit einem steilen Anstieg. Ab 1 min Bestrahlungszeit flacht dieser anfängliche Anstieg sichtbar ab. Zusätzlich gibt es in diesem Bestrahlungsintervall deutlich größere Schwankungen. Bei EBV-transformierten Lymphozyten verläuft die Schadensinduktion bis 6 min Bestrahlungszeit linear.



**Abbildung 4-17 Induktion von Einzelstrangbrüchen durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Anwesenheit von Acridinorange.** Die Schadensinduktion erfolgte auf Eis mit 50 nM AO, 38 cm Abstand zur Halogenlampe (400-800 nm) und verschiedenen Bestrahlungszeiten (15 sec bis 8 min) (siehe 3.2.9.1). Die induzierten Einzelstrangbrüche wurden mit Hilfe der Alkalischen Elution quantifiziert (siehe 3.2.7). Primäre Lymphozyten ( $n=2-7$ ), PHA-stimulierte Lymphozyten ( $n=3-12$ ) und EBV-transformierte Lymphozyten ( $n=3-8$ ). MW  $\pm$  SD.

Die in Abbildung 4-17 dargestellte Generierung von Einzelstrangbrüchen durch Acridinorange ist im Vergleich zur Generierung von Fpg-sensitiven Läsionen deutlich geringer, wie es auch aus den PM2-Daten zu erwarten war. Wie auch schon für die Fpg-sensitiven Modifikationen beobachtet werden konnte, sind bei gleicher Bestrahlungszeit die induzierten Einzelstrangbrüche in primären und PHA-stimulierten Lymphozyten höher als in EBV-transformierten Lymphozyten.

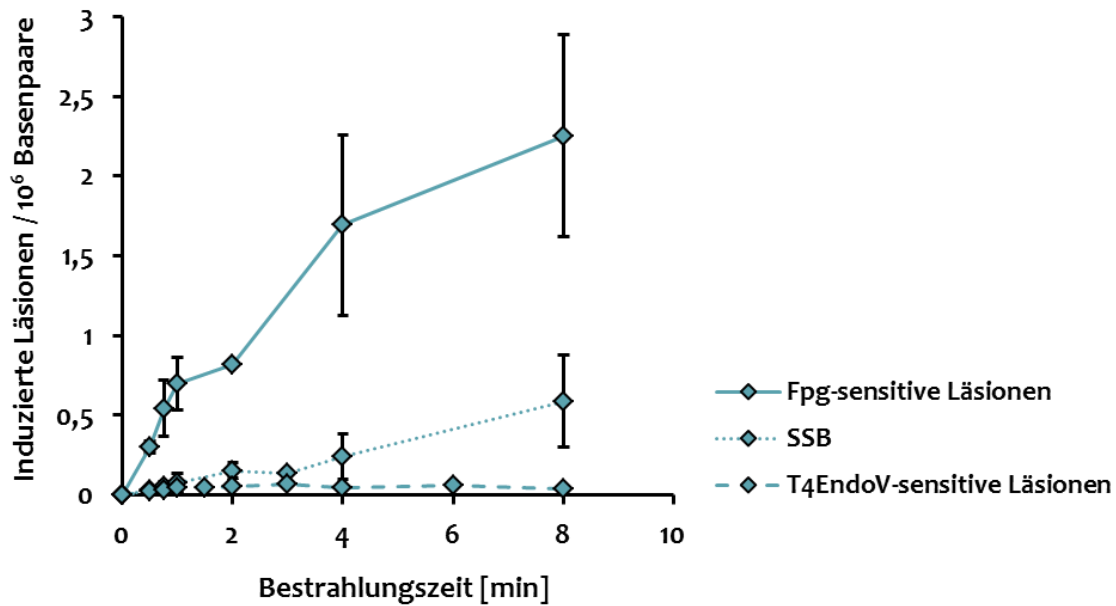
Zur Untersuchung, ob ebenfalls AP-Läsionen durch Acridinorange und Licht erzeugt werden wie es in einem geringen Maße in PM2-DNA zu sehen war, wurde die T4EndoV-Endonuklease eingesetzt. In diesem Fall wurden exemplarisch nur PHA-stimulierte Lymphozyten untersucht, da diese bereits für die anderen betrachteten Läsionen mit das höchste Schadensausmaß hatten.



**Abbildung 4-18 Induktion T4EndoV-sensitiver Modifikationen durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Anwesenheit von Acridinorange in PHA-stimulierten Lymphozyten.** Die Schadensinduktion erfolgte mit 50 nM AO, 38 cm Abstand zur Halogenlampe (400-800 nm) und verschiedenen Bestrahlungszeiten (30 sec bis 8 min). Die T4EndoV-sensitiven DNA-Schäden wurden mit Hilfe der Alkalischen Elution quantifiziert (siehe 3.2.7). PHA-stimulierte Lymphozyten ( $n=1-2$ ). MW  $\pm$  Diff. vom MW.

Wie in Abbildung 4-18 deutlich zu sehen ist, entstehen AP-Läsionen über den gesamten Bestrahlungszeitraum nur geringfügig. Es ist ein leichter Anstieg bis 3 min erkennbar und dann erfolgt keine weitere Zunahme der induzierten AP-Läsionen. Die gemessenen Werte liegen unter 0,1 Läsionen pro  $10^6$  Basenpaare und spielen somit im Vergleich zu den oxidativen Basenmodifikationen und Einzelstrangbrüchen eine untergeordnete Rolle.

Zur besseren Übersicht sind in Abbildung 4-19 die induzierten Läsionen nach Acridinorange und sichtbarem Licht in PHA-stimulierten Lymphozyten zusammengefasst gezeigt. In der vergleichenden Darstellung wird nochmals deutlich, dass Acridinorange zusammen mit sichtbarem Licht zellulär vorrangig oxidative (Fpg-sensitive) Basenmodifikationen induziert. Die Suszeptibilität gegenüber der Generierung dieser oxidativen DNA-Schäden und Einzelstrangbrüche durch Acridinorange und sichtbares Licht ist in primären und PHA-stimulierten Lymphozyten vergleichbar (siehe Abbildung 4-16 und Abbildung 4-17). Eine PHA-Stimulation führt somit nicht zu einer herabgesetzten Suszeptibilität gegenüber der Induktion von oxidativen DNA-Schäden.

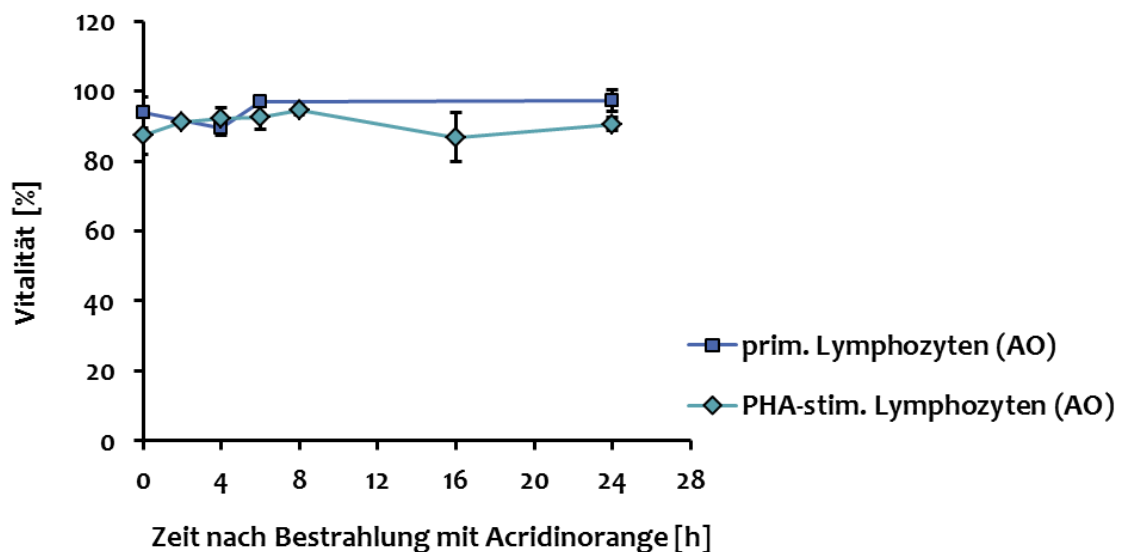


**Abbildung 4-19** Vergleich der durch AO und sichtbares Licht induzierten Einzelstrangbrüche (SSB), Fpg-sensitiven und T4EndoV-sensitiven Basenmodifikationen in PHA-stimulierten Lymphozyten. Zusammenfassende Darstellung von Abbildung 4-16, Abbildung 4-17 und Abbildung 4-18. MW  $\pm$  SD.

Für die nachfolgenden Reparaturversuche wurden für alle Lymphozyten 50 nM Acridinorange eingesetzt jedoch mit verschiedenen Bestrahlungszeiten. Für primäre und PHA-stimulierte Lymphozyten wurden 45 sec als Bestrahlungszeit gewählt, für EBV-transformierte 8 min. Nach Abbildung 4-16 war somit eine vergleichbare Induktion Fpg-sensitiver Modifikationen von ca. 0,8 pro 10<sup>6</sup> Basenpaare zu erwarten.

### 4.3.3 Einfluss der Schadensinduktion durch Acridinorange und sichtbares Licht auf die Vitalität

Für die nachfolgenden Reparaturversuche sollte zunächst die Vitalität unter den gewählten Schädigungsbedingungen untersucht werden. Hierfür wurden primäre und PHA-stimulierte Lymphozyten in Anwesenheit von 50 nM Acridinorange jeweils 45 sec bestrahlt (siehe 3.2.9.1). Die Vitalität wurde mit Hilfe von Trypanblau (3.2.5) direkt nach der Bestrahlung (0 h) und innerhalb der folgenden 24 h Reparaturzeit gemessen.

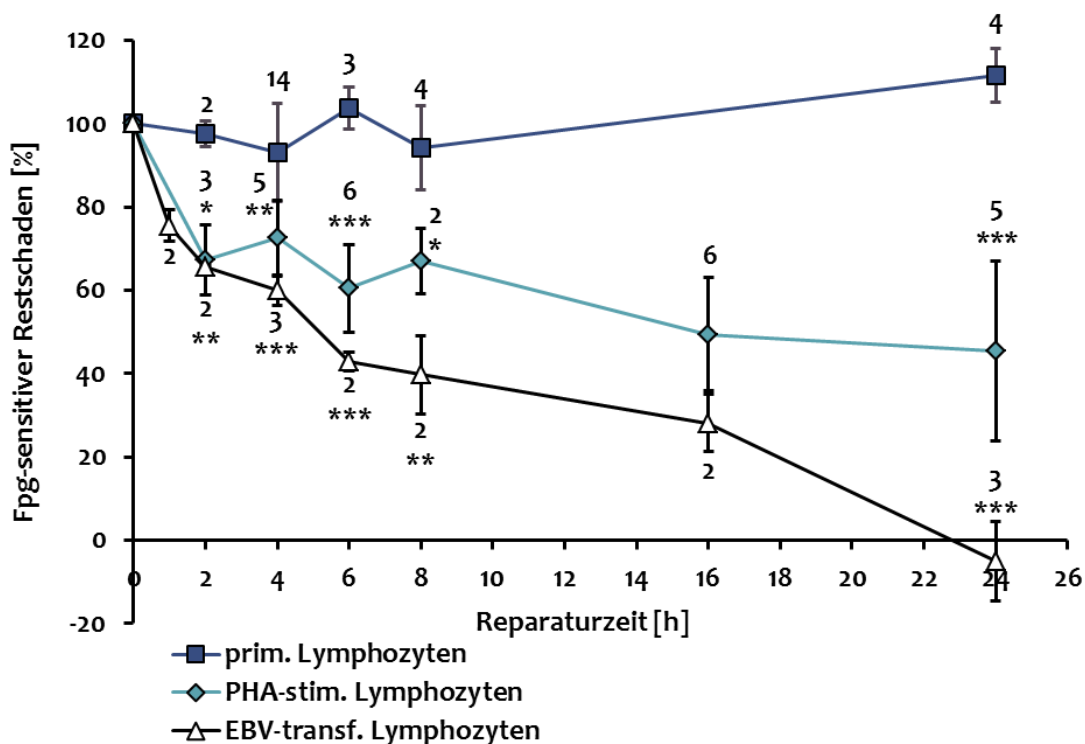


**Abbildung 4-20 Zellvitalität nach Bestrahlung mit sichtbarem Licht in Anwesenheit von AO in Lymphozyten.** Die Schadensinduktion erfolgte durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht (45 sec, 12,5 kJ/m<sup>2</sup> zwischen 400 und 800 nm, auf Eis) in Anwesenheit von 50 nM AO (siehe 3.2.9.1). Die Vitalität wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung mittels Trypanblau und Neubauer-Zählkammer untersucht (siehe 3.2.5). Die mittlere Zellvitalität der jeweiligen Kontrollen lag bei 94 % (primäre Lymphozyten: n=3-4) und 95,5 % (PHA-stimulierte Lymphozyten: n=3-5) (siehe 3.2.5). MW ± SD.

Abbildung 4-20 ist zu entnehmen, dass unter den genannten Schädigungsbedingungen keine Änderung der Vitalität innerhalb der folgenden 24 Stunden eintritt. Insgesamt betrachtet liegt die Vitalität durchgehend über 80 %. Verglichen mit den jeweiligen unbehandelten Kontrollen war nur eine geringfügige Toxizität erkennbar. In den Kontrollen wurden Vitalitäten von 94 % (primäre; n=4) und 95,5 % (PHA-stimulierte; n=5) ermittelt, während nach Schädigung noch 89,5 % (primäre) bzw. 87,3 % (PHA-stimulierte) vitale Zellen ermittelt wurden.

#### 4.3.4 Reparatur oxidativer DNA-Schäden induziert durch Acridinorange und sichtbares Licht

Mit den folgenden Experimenten sollte nun die Reparatur von oxidativen DNA-Schäden, induziert durch AO und sichtbares Licht (siehe 3.2.9.1), in Lymphozyten vergleichend untersucht werden. Anhand der zuvor ermittelten induzierten Fpg-sensitiven DNA-Schäden (siehe hierzu 4.3.2) wurde für primäre sowie PHA-stimulierte Lymphozyten eine Bestrahlungszeit von 45 Sekunden und für EBV-transformierte Lymphozyten von 8 Minuten gewählt, um so ein vergleichbares Schadensausmaß zu generieren. Die Zahl der auf 100% normierten induzierten Fpg-sensitiven Basenmodifikationen lag bei ca. 0,8 Läsionen pro  $10^6$  Basenmodifikationen.



**Abbildung 4-21 Reparatur Fpg-sensitiver Basenmodifikationen, induziert durch Acridinorange (AO) und sichtbares Licht, in primären, PHA-stimulierten und EBV-transformierten Lymphozyten.** Die Schadensinduktion erfolgte durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht (45 sec, 12,5 kJ/m<sup>2</sup> für primäre und PHA-stimulierte Lymphozyten oder 8 min, 133 kJ/m<sup>2</sup> zwischen 400 und 800 nm für EBV-transformierte Lymphozyten, auf Eis) in Anwesenheit von 50 nM AO (siehe 3.2.9.1). Während der Schadensinduktion und Reparatur war Katalase (315 U/ml) anwesend. Die Quantifizierung der Fpg-sensitiven Basenmodifikationen wurde mit Hilfe der Alkalischen Elution vorgenommen. MW  $\pm$  SD; bei n=2 MW  $\pm$  Diff. vom MW. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines zweiseitigen T-Tests mit Welchkorrektur (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001) bezogen auf die primären Lymphozyten berechnet.

Die Daten aus Abbildung 4-21 zeigen das überraschende Ergebnis, dass primäre Lymphozyten keinerlei Abnahme der induzierten Fpg-sensitiven Basenmodifikationen aufweisen. Im Vergleich dazu zeigen PHA-stimulierte Lymphozyten, die aus den primären Lymphozyten durch eine 72-stündige Stimulation erhalten werden, eine deutliche Abnahme der induzierten oxidativen Basenmodifikationen. Innerhalb von 24 Stunden nach Schadensinduktion werden die Fpg-sensitiven Läsionen im Mittel zu über 50 % repariert. Die Entfernung der oxidativer Basenmodifikationen verläuft jedoch nicht direkt linear, sondern ist anfangs deutlich schneller. In den ersten zwei Stunden werden bereits über 30 % der induzierten Schäden repariert in den folgenden 22 Stunden nur noch etwa 20 %.

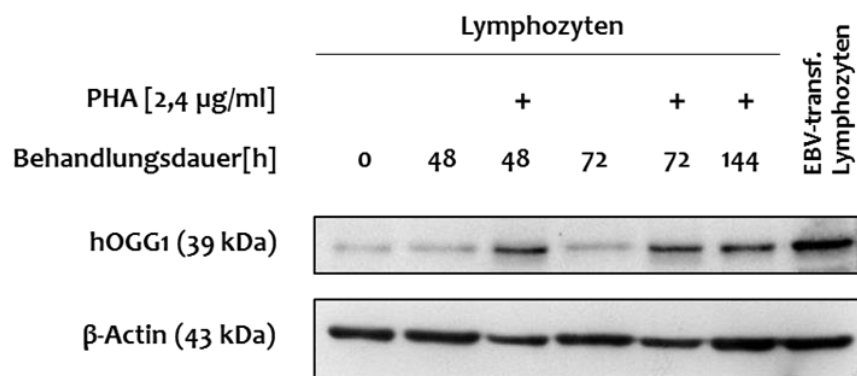
Die Reparatur der EBV-transformierten Lymphozyten erfolgt nahezu linear und ist über den gesamten Reparaturzeitraum nochmals schneller als die der PHA-stimulierten Lymphozyten. Innerhalb der betrachteten 24 Stunden werden die induzierten DNA-Schäden vollständig repariert.

## 4.4 Einfluss der PHA-Stimulation auf die Expression von OGG1

Nachdem ein deutlicher Unterschied bezüglich der Reparatur oxidativer Basenmodifikationen zwischen primären und PHA-stimulierten Lymphozyten nachgewiesen werden konnte, sollte als mögliche Ursache die Expression von OGG1 (8-Hydroxyguanin-DNA-Glykosylase) untersucht werden.

### 4.4.1 Einfluss der PHA-Stimulation auf die Proteinmenge von OGG1

Zunächst sollte überprüft werden, ob eine PHA-Stimulation von Lymphozyten zu gesteigerten OGG1-Proteinmengen führt. Für eine zeitabhängige Untersuchung der OGG1-Spiegel wurden Zelllysate zu unterschiedlichen Zeiten nach PHA-Stimulation gewonnen und mittels Westen Blot analysiert.

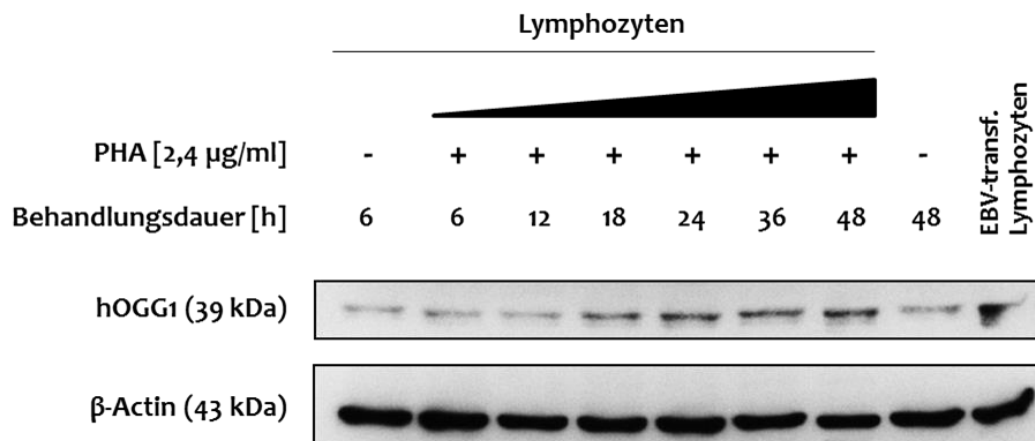


**Abbildung 4-22 Proteinexpression von OGG1 in Lymphozyten in Abhängigkeit von der PHA-Stimulation.** OGG1-Proteinmengen wurden mittels Westen Blot detektiert (siehe 3.2.11). Die Lymphozyten eines Buffy Coats wurden parallel mit oder ohne PHA kultiviert und anschließend wurden Zelllysate gewonnen (siehe 3.2.11.2.1). Die maximale PHA-Stimulationsdauer betrug 72 h. Für 144 h wurden die Lymphozyten die letzten 72 h ohne PHA kultiviert. 5 µg Gesamtproteinextrakt wurden jeweils aufgetragen. Als Ladekontrolle wurde β-Actin gewählt.

Der Western Blot in Abbildung 4-22 zeigt eindeutig eine höhere OGG1-Proteinmenge nach 48 Stunden PHA-Stimulation im Vergleich zu den gleichen Zellen ohne PHA-Stimulation (primäre Lymphozyten). Diese wird auch noch über die Stimulation hinaus (144 h) erhalten und ist vergleichbar mit der Proteinmenge in EBV-transformierten Lymphozyten. Die reine Kultivierung (ohne PHA) primärer Lymphozyten verändert die Proteinmenge von OGG1 über den beobachteten Zeitraum von 72 Stunden nicht.

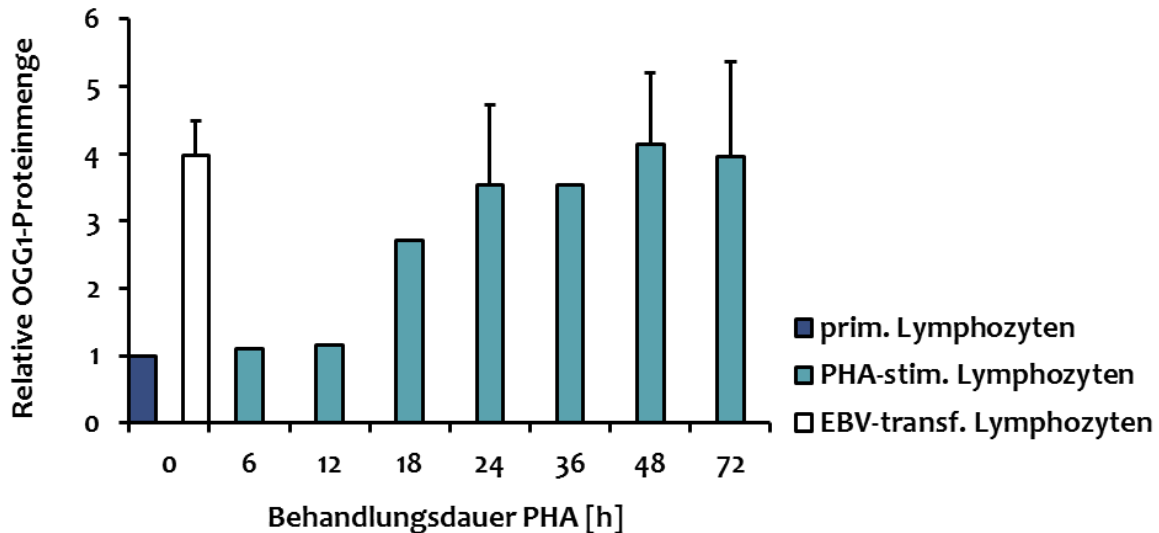


Abbildung 4-23 zeigt die OGG1-Proteinmengen nach kurzen Stimulationszeiten (6 bis 48 Stunden). Hier ist gut zu sehen, dass nach 6 und 12 Stunden PHA-stimulation noch keine Änderung der Proteinmenge von OGG1 detektierbar ist. Nach 18 Stunden lässt sich der erste Anstieg im Western Blot sehen. Dieser steigert sich mit weiterer Stimulationszeit bis zu den gezeigten 48 Stunden.



**Abbildung 4-23 Proteinexpression von OGG1 in Lymphozyten in Abhängigkeit von der PHA-Stimulation.** OGG1-Proteinmengen wurden mittels Western Blot detektiert (siehe 3.2.11). Es wurden Zelllysate aus Lymphozyten eines Buffy Coats nach unterschiedlich langen PHA-Stimulationszeiten (zwischen 6 und 48 h) und unbehandelt nach 6 und 48 h gewonnen. 5 µg Gesamtproteinextrakt wurden jeweils aufgetragen. Als Ladekontrolle wurde β-Actin gewählt.

Zur Quantifizierung der OGG1-Proteinmengen erfolgte eine densitometrische Messung relativ zu β-Actin, welche dann auf die jeweiligen primären Lymphozyten (=1) normiert wurde. Aus Abbildung 4-24 ist zu entnehmen, dass die Zunahme der OGG1-Proteinmenge zwischen 18 und 48 Stunden PHA-Stimulation stattfindet und dann ein Maximum erreicht hat. Dieses liegt etwa bei dem 4-fachen der OGG1-Proteinmenge bezogen auf die zugehörigen nicht stimulierten primären Lymphozyten.

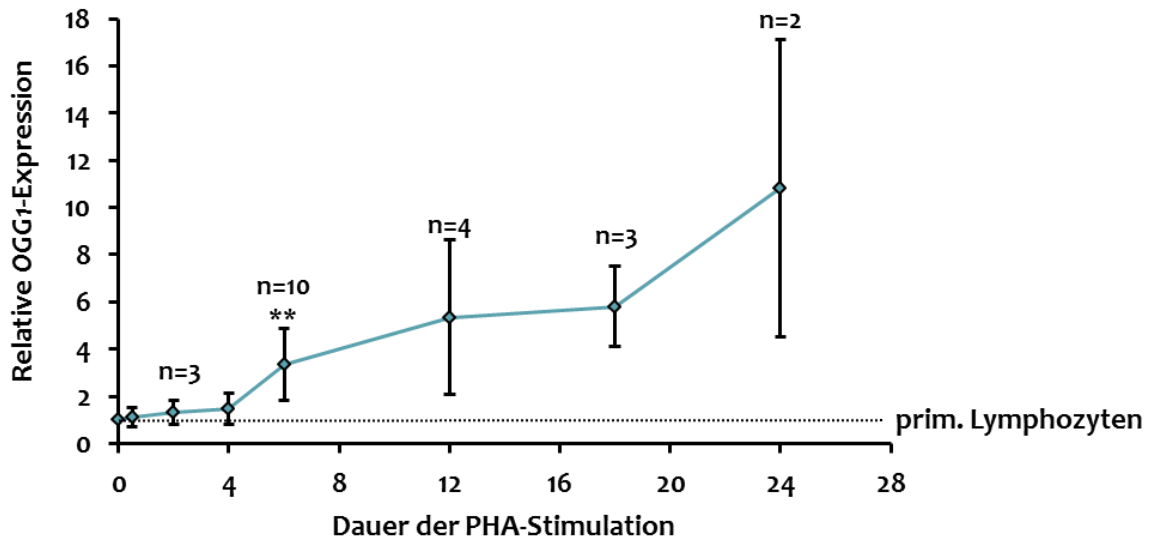


**Abbildung 4-24 Quantitative Auswertung der OGG1-Expression.** Die Proteinmengen der Western Blots (Abbildung 4-22, Abbildung 4-23 sowie ein weiterer nicht gezeigter Western Blot) wurden mittels Image Lab<sup>TM</sup> relativ zu  $\beta$ -Actin quantifiziert und auf primäre Lymphozyten normiert.  $n=1-3$ .  $MW \pm SD$ .

Die erhöhten Proteinmengen von OGG1 in PHA-stimulierten Lymphozyten im Vergleich zu primären Lymphozyten können den Unterschied in der DNA-Reparatur von oxidativen Basenmodifikationen teilweise erklären. Allerdings wurde in primären Lymphozyten immerhin noch ein Viertel der OGG1-Menge der PHA-stimulierten Lymphozyten gefunden, obwohl in den vorhergehenden Experimenten in ersteren keinerlei Reparatur gemessen wurde.

#### 4.4.2 Einfluss der PHA-Stimulation auf die mRNA-Spiegel von OGG1

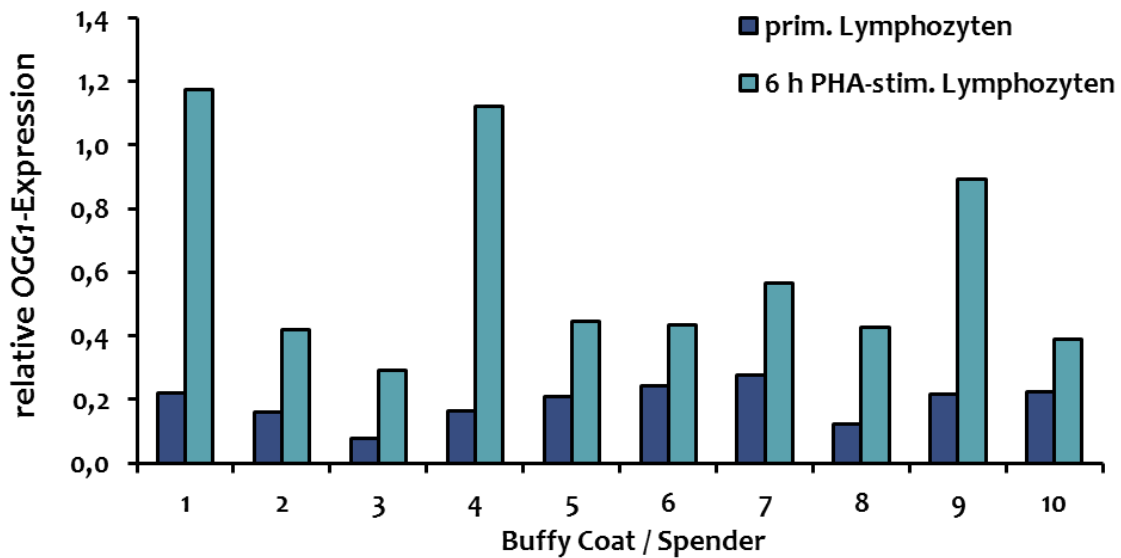
In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die detektierte Zunahme der OGG1-Proteinmenge auf einen Anstieg der zugehörigen mRNA und somit einer gesteigerten Transkription sowie Translation zurückzuführen ist. Hierfür wurde RNA von PHA-stimulierten Lymphozyten, wie bereits zur Quantifizierung der Proteinmenge, nach unterschiedlichen Stimulationszeiten isoliert und mittels quantitativer RT-PCR mit den zugehörigen primären Lymphozyten verglichen (siehe 3.2.13). Zur relativen Quantifizierung der OGG1 mRNA wurde 18S ausgewählt. Die nachfolgenden Ergebnisse in Abbildung 4-25 zeigen die OGG1 mRNA-Menge relativ zu 18s und schließlich normiert auf die zugehörigen unstimulierten primären Lymphozyten ( $OGG1/18S=1$ ). Die mRNA-Menge wurde zwischen 30 Minuten und 24 Stunden PHA-Stimulation quantifiziert.



**Abbildung 4-25 OGG1-Genexpression in Abhängigkeit von der PHA-Stimulation.** Die OGG1-Genexpression wurde mit Hilfe der quantitativen RT-PCR nach unterschiedlichen PHA-Stimulationszeiten untersucht (siehe 3.2.13). Zur Normierung wurde 18S als Referenzgen eingesetzt. Zusätzlich wurden die OGG1-Mengen auf die jeweiligen unbehandelten Lymphozyten normiert. MW  $\pm$  SD; bei n=2 MW  $\pm$  Diff. vom MW. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines zweiseitigen T-Tests mit Welchkorrektur (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) bezogen auf die primären Lymphozyten berechnet.

Nach 6 Stunden PHA-Stimulation ist bereits ein signifikanter Anstieg der OGG1 mRNA-Spiegel ersichtlich (Abbildung 4-25). Über den erfassten Zeitraum von 24 Stunden nimmt die mRNA-Menge stetig zu. Somit ist die zuvor gezeigte erhöhte Menge an OGG1-Protein auf eine erhöhte mRNA-Menge und somit auf eine gesteigerte Transkription mit nachfolgender Translation zurückzuführen.

Teilweise sind allerdings große Unterschiede zwischen den verschiedenen Spendern / Buffy Coats erkennbar. Abbildung 4-26 zeigt noch einmal die relativen OGG1 mRNA-Mengen nach 6 Stunden Stimulation allerdings ohne Normierung auf die primären Lymphozyten.

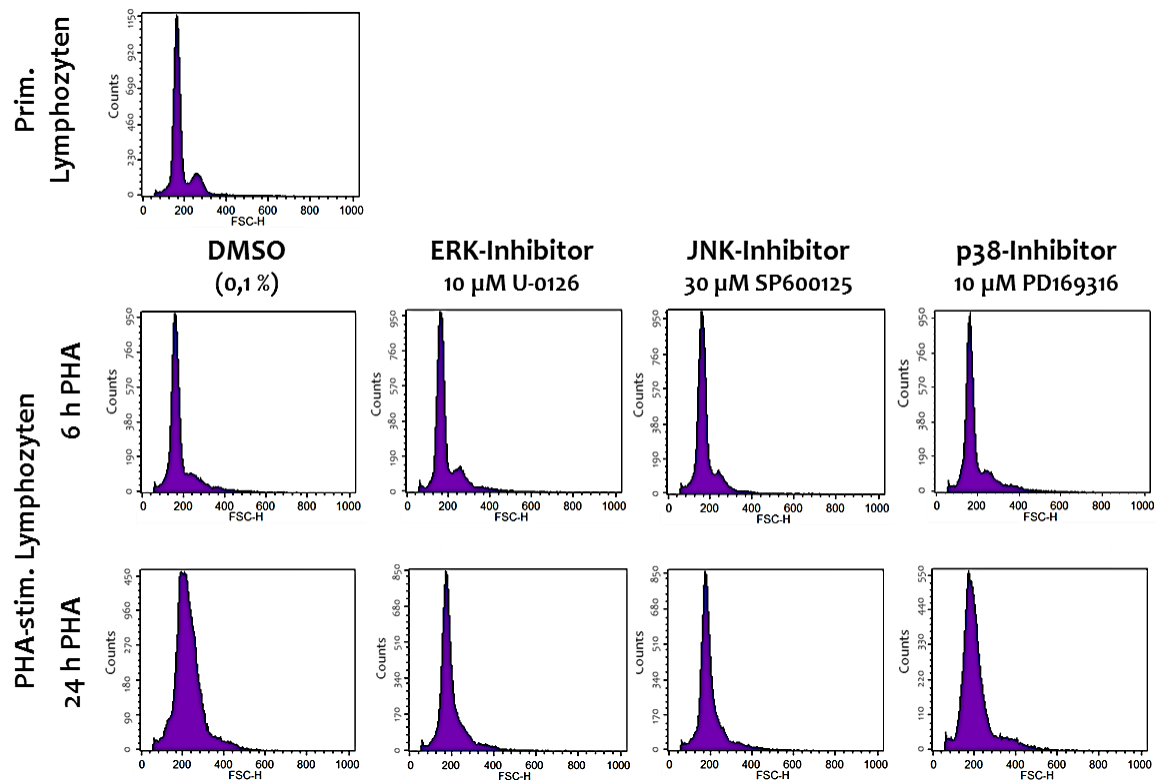


**Abbildung 4-26** Vergleich der relativen OGG1-Genexpression in primären und PHA-stimulierten Lymphozyten (6 h) verschiedener Spender. Die OGG1-Genexpression wurde mit Hilfe der quantitativen RT-PCR quantifiziert und auf das Referenzgen 18s normiert (siehe 3.2.13).

Abbildung 4-26 ist zu entnehmen, dass die OGG1 mRNA-Mengen der primären Lymphozyten von verschiedenen Spendern um einen Faktor von bis zu 4 variieren (OGG1 mRNA relativ zu 18S zwischen 0,07 und 0,28). Die Zunahme der OGG1 mRNA-Mengen nach 6 Stunden war deutlich unterschiedlich und unabhängig von der Ausgangsmenge (zwischen dem 1,7- und 6,8-fachen der primären Lymphozyten).

#### 4.4.3 Einfluss von MAP-Kinasen auf die Induktion der OGG1-Expression nach PHA-Stimulation

Der Ablauf der Stimulation primärer Lymphozyten mit PHA ähnelt einer physiologischen Stimulation über ein Antigen (vergleiche 1.1.2 und 1.1.3). In beiden Fällen wird der T-Zellrezeptor/CD3-Komplex aktiviert. Dessen bekannte Signalkaskade ist schematisch Abbildung 1-3 zu entnehmen. Die MAP-Kinasen ERK, JNK sowie p38 sind in diese Signaltransduktion involviert. Mit den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, inwiefern der beobachtete Effekt der PHA-Stimulation auf die OGG1-Expression abhängig von einer oder mehrerer MAP-Kinasen ist. Hierfür wurde die PHA-Stimulation gleichzeitig in Anwesenheit von einem der drei MAP-Kinase-Inhibitoren vorgenommen (siehe 3.2.12). Da die Stabilität und damit der Zeitraum der Aktivität der Kinase-Inhibitoren bei einmaliger Zugabe nicht bekannt waren, wurden keine längeren Zeitpunkte als 24 Stunden beobachtet. Initial sollte zunächst überprüft werden, ob die Inhibierung einer der genannten MAP-Kinasen einen Einfluss auf die Änderung des FSC und SSC nach PHA-Stimulation (siehe 4.2.1) hat.

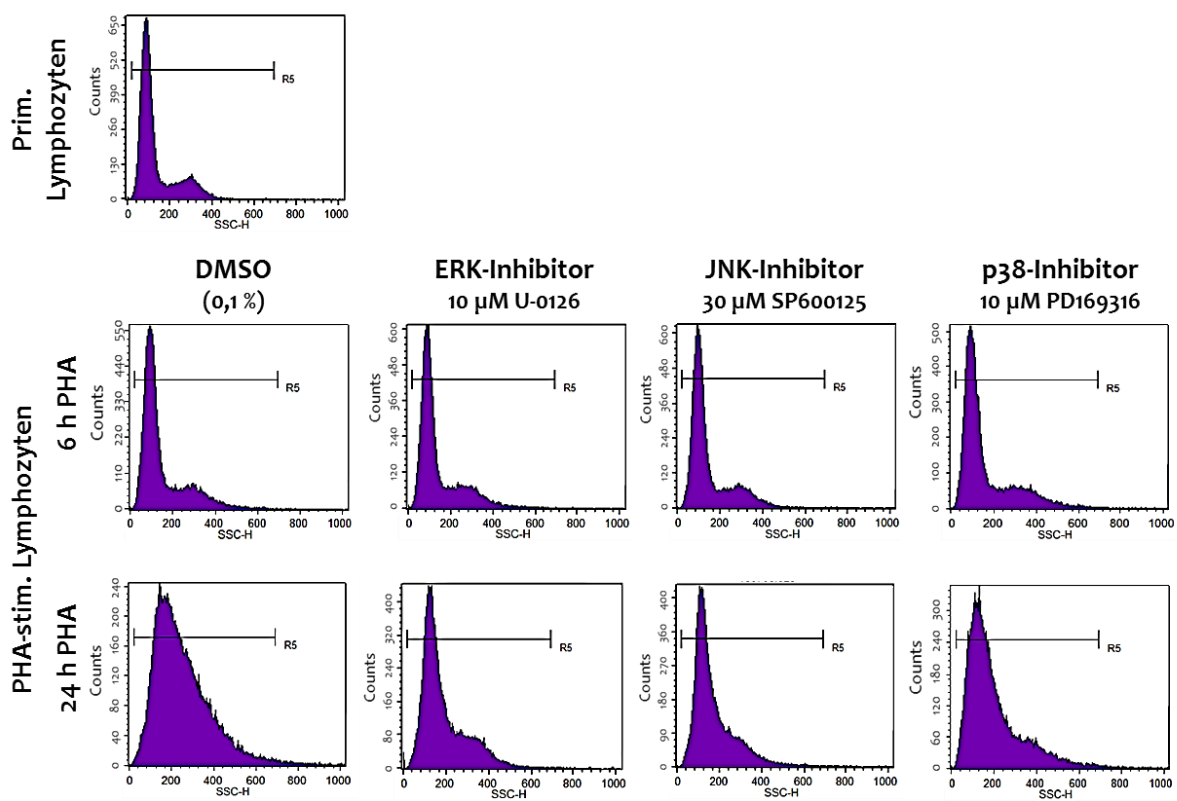


**Abbildung 4-27** Histogramm des FSC in primären und PHA-stimulierten Lymphozyten  $\pm$  MAP-Kinase-Inhibitoren (ERK-, JNK- & p38-Inhibitor). Die Lymphozyten wurden aus Buffy Coats isoliert (siehe 3.2.2.1) und direkt (primäre Lymphozyten) oder nach PHA-Stimulation (6 oder 24 h) mit Ethanol fixiert (siehe 3.2.6). Die Zugabe der Inhibitoren / DMSO erfolgte 30 min vor der PHA-Stimulation. Je Histogramm wurden 50.000 Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Exemplarisches Histogramm von  $n=2$ .

In Abbildung 4-27 ist gut erkenntlich, dass die primären Zellen zwei unterschiedlich große Zellpopulationen zeigen. Bei den größeren Zellen (höherer FSC) handelt es sich um verbliebene Monozyten (bereits unter 4.2.1 gezeigt). Durch die PHA-Stimulation werden die Zellen bereits innerhalb von 6 Stunden größer, so dass die vorher gut erkennbare Trennung von zwei unterschiedlich großen Populationen langsam verschwindet. Nach 24 Stunden PHA-Stimulation ist nur noch ein breiter Peak erkennbar, der eine Population aus verschieden großen Zellen darstellt. Im Vergleich zur PHA-Stimulation über 24 Stunden in Anwesenheit von MAP-Kinase-Inhibitoren sind eindeutig Unterschiede feststellbar. Bei Inhibierung von ERK oder JNK ist die Peakverbreiterung deutlich geringer als nach reiner PHA-Stimulation. Zwar sind nach 24 Stunden ebenfalls keine zwei Populationen mehr zu erkennen, aber es sind deutlich mehr Zellen in der Ausgangsgröße der primären Lymphozyten vorhanden (Maximum des Peaks bei gleicher Gesamtzahl ausgewerteter Zellen: 450 PHA und 850 ERK- oder

JNK-Inhibitor). Für die Kinase p38 konnte kaum ein Einfluss auf den FSC detektiert werden.

Für den SSC ergibt sich ein ähnliches Bild (siehe Abbildung 4-28). In primären Lymphozyten sind wiederum zwei Populationen mit unterschiedlicher Granularität zu erkennen. Innerhalb von 24 Stunden PHA-Stimulation kommt es zu einer deutlichen Änderung des SSC und somit einer starken Peakverbreiterung. Analog zum FSC kann dieser Effekt durch Inhibierung von ERK oder JNK reduziert werden. Ein Effekt einer p38-Inhibierung ist wiederum kaum erkennbar.

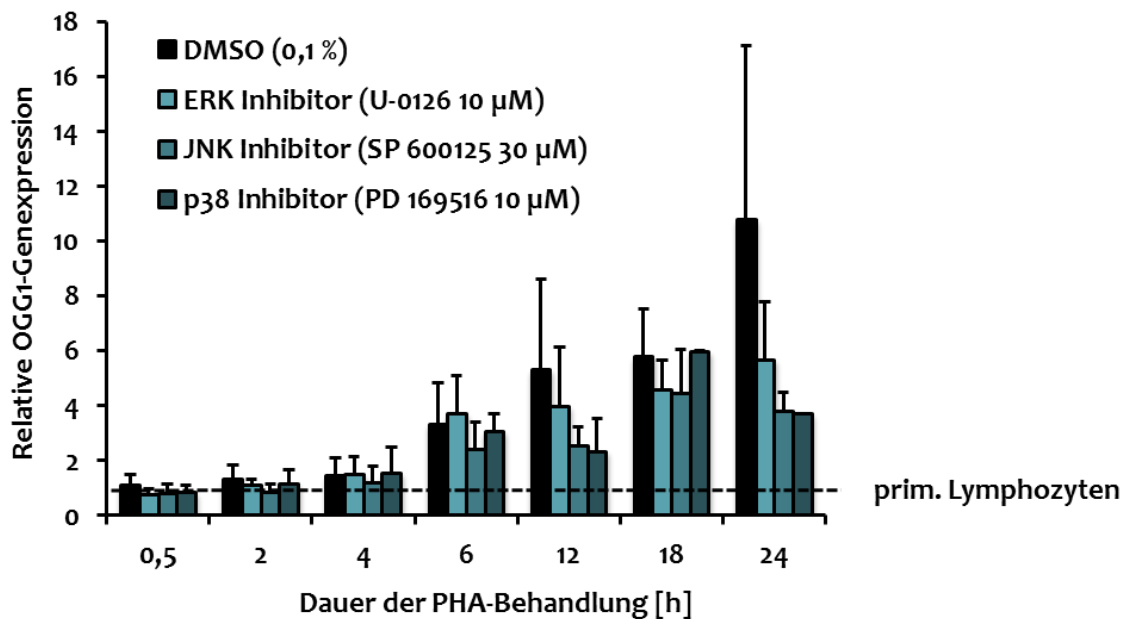


**Abbildung 4-28** Histogramm des SSC in primären und PHA-stimulierten Lymphozyten ± MAP-Kinase-Inhibitoren (ERK-, JNK- & p38-Inhibitor). Lymphozyten wurden aus Buffy Coats isoliert (siehe 3.2.2.1) und direkt (primäre Lymphozyten) oder nach PHA-Stimulation (6 oder 24 h) mit Ethanol fixiert (siehe 3.2.6). Die Zugabe der Inhibitoren / DMSO erfolgte 30 min vor der PHA-Stimulation. Pro Histogramm wurden 50.000 Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Exemplarisches Histogramm von n=2.

Aus diesen Ergebnissen ist abzuleiten, dass eine Änderung von FSC (Größe) und SSC (Granularität) primärer Lymphozyten durch PHA-Stimulation über eine Aktivierung von sowohl ERK als auch JNK abläuft. Die Veränderungen konnten allerdings in beiden

Fällen nicht komplett verhindert werden, sondern nur vermindert. Wenn davon ausgegangen wird, dass die jeweilige Kinase-Inhibierung vollständig war, ist somit keine der Kinasen alleine für diese PHA-Signalweiterleitung zuständig.

Um den Einfluss der MAP-Kinasen auf einen weitaus interessanteren Endpunkt, den Anstieg der OGG1 Expression unter PHA-Stimulation, untersuchen zu können, wurden die OGG1 mRNA-Mengen in Anwesenheit der MAP-Kinase-Inhibitoren gegen ERK, JNK oder p38 quantifiziert.

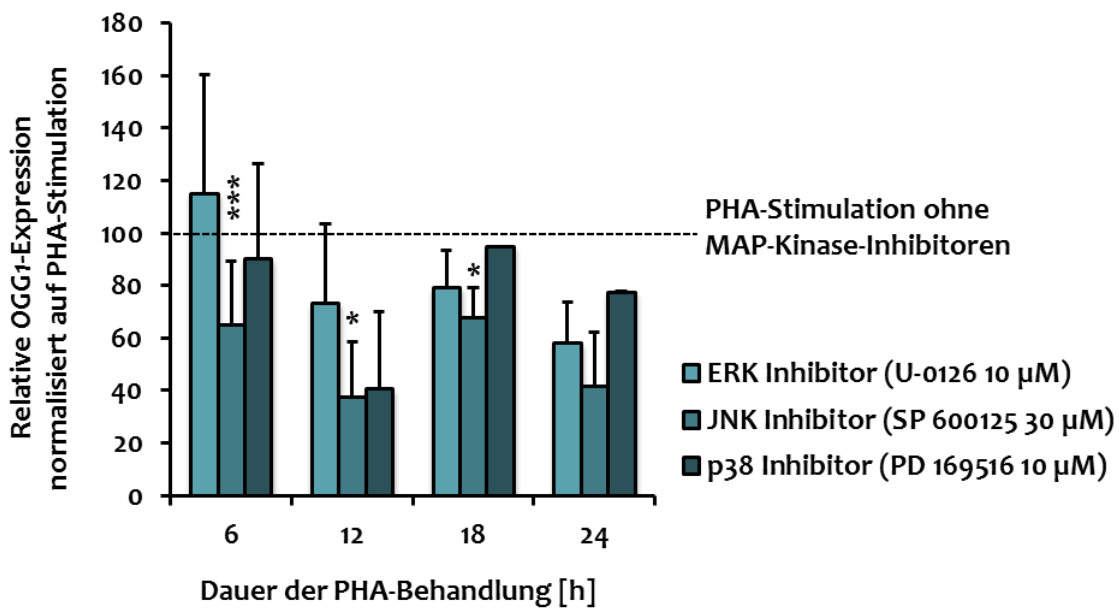


**Abbildung 4-29 Einfluss von MAP-Kinase-Inhibitoren auf die relative OGG1-Genexpression nach PHA-Stimulation.** Die OGG1-Genexpression wurde mit Hilfe der quantitativen RT-PCR relativ zum Referenzgen 18s untersucht und auf die jeweiligen primären Lymphozyten normiert (siehe 3.2.13). Zugabe der MAP-Kinase-Inhibitoren erfolgte 30 min vor Beginn der PHA-Stimulation. Anzahl der Versuche nach Zeitpunkten geordnet: DMSO (n=3, 3, 3, 10, 4, 3, 2); ERK-Inhibitor (n=3, 3, 3, 5, 4, 3, 2); JNK-Inhibitor (n=3, 3, 3, 9, 2, 3, 2); p38-Inhibitor (n=3, 3, 3, 4, 2, 1, 1). MW  $\pm$  SD; bei n=2 MW  $\pm$  Diff. vom MW.

Die Expression der OGG1 mRNA nach PHA-Stimulation in Anwesenheit von einer der drei MAP-Kinase-Inhibitoren ist in Abbildung 4-29 dargestellt. Wie bereits schon zuvor gezeigt wurde, ist ein Anstieg der OGG1-Expression ab 6 Stunden messbar. Durch Inhibierung von JNK wird die PHA bedingte Steigerung der OGG1-Expression reduziert. Zwischen 6 und 24 Stunden wird eine Verminderung der OGG1-Expression zwischen 32 % (nach 18 Stunden) und 62 % (nach 12 Stunden) (siehe Abbildung 4-30) der PHA-Stimulation erreicht. Eine Hemmung von ERK lässt ebenfalls den Trend erkennen, dass

nach 12, 18 und 24 Stunden die OGG1-Expression vermindert ist. Ein Einfluss von p38 konnte nur nach 12 Stunden gezeigt werden. Da die späteren Zeitpunkte nur einmal quantifiziert wurden, sind die Ergebnisse nicht ausreichend valide um sie bewerten zu können.

Als eine andere Darstellung der Ergebnisse zeigt Abbildung 4-30 die Expression der OGG1-mRNA unter Einfluss der Kinase-Inhibitoren nicht auf primäre Lymphozyten bezogen, sondern auf die entsprechenden PHA-stimulierten Lymphozyten im gleichen Versuch zum jeweiligen Zeitpunkt. Es sind hier nur die Stimulationszeiten ab 6 Stunden dargestellt, da vorher kein Effekt messbar war. Die jeweilige Induktion der OGG1-Expression (Differenz zwischen primären Lymphozyten und PHA-stimulierten Lymphozyten) nach 6, 12, 18 und 24 Stunden PHA-Stimulation wurde in jedem Versuch auf 100 % gesetzt und der Effekt durch die MAP-Kinase-Inhibitoren relativ dazu dargestellt.



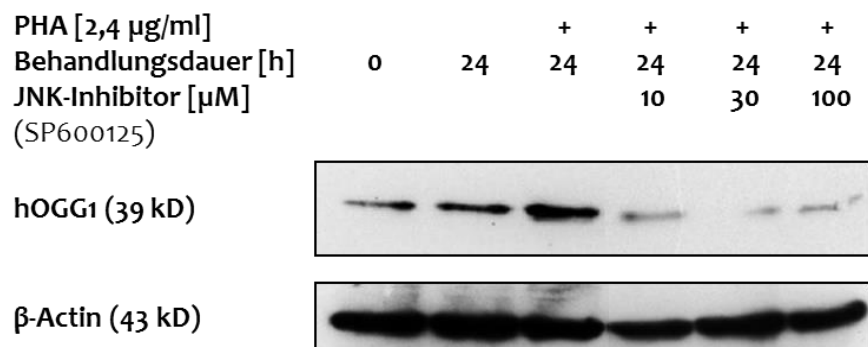
**Abbildung 4-30 Einfluss von MAP-Kinase-Inhibitoren auf die relative OGG1-Genexpression nach PHA-Stimulation.** Die OGG1-Genexpression wurde mit Hilfe der quantitativen RT-PCR relativ zum Referenzgen 18s untersucht und auf die jeweiligen primären Lymphozyten normiert (siehe 3.2.13). Die Differenz der OGG1-Genexpression zwischen PHA-stimulierten und primären Lymphozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde als 100 % definiert. Der Effekt der MAP-Kinase-Inhibitoren wurde darauf bezogen. Zugabe der MAP-Kinase-Inhibitoren erfolgte 30 min vor Beginn der PHA-Stimulation. Anzahl der Versuche nach Zeitpunkten geordnet: ERK-Inhibitor (n=5, 4, 3, 2); JNK-Inhibitor (n=9, 3, 3, 2). P38-Inhibitor (4, 2, 1, 1). MW  $\pm$  SD; bei n=2 MW  $\pm$  Diff. vom MW. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines zweiseitigen T-Tests mit Welchkorrektur (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001) bezogen auf die PHA-Stimulation ohne MAP-Kinase-Inhibitoren (100 %), zum jeweiligen Zeitpunkt, berechnet.



Eine vollständige Hemmung der PHA bedingten OGG1-Expressionssteigerung konnte durch keinen Kinase-Inhibitor erreicht werden. Den größten Effekt zeigte die Inhibierung von JNK. Relativ zur reinen PHA-Stimulation ohne MAP-Kinase-Inhibitoren reduziert eine Inhibierung von JNK die OGG1-Expression signifikant nach 6, 12 und 18 Stunden PHA-Stimulation.

#### 4.4.4 Einfluss der Inhibition von JNK auf die Induktion der OGG1 Protein-Expression nach PHA-Stimulation

Da der Effekt der Inhibition von JNK auf die OGG1-Expression am größten war, sollte dieses Ergebnis auf Proteinebene zusätzlich überprüft werden. Hierzu wurden Zelllysate zum einen von primären Lymphozyten direkt nach der Isolation oder nach 24 Stunden Kultivierung im Brutschrank in RPMI-Medium (20 % FCS) und zum anderen von den gleichen Lymphozyten nach einer 24-stündigen PHA-Stimulation  $\pm$  JNK-Inhibitor hergestellt.

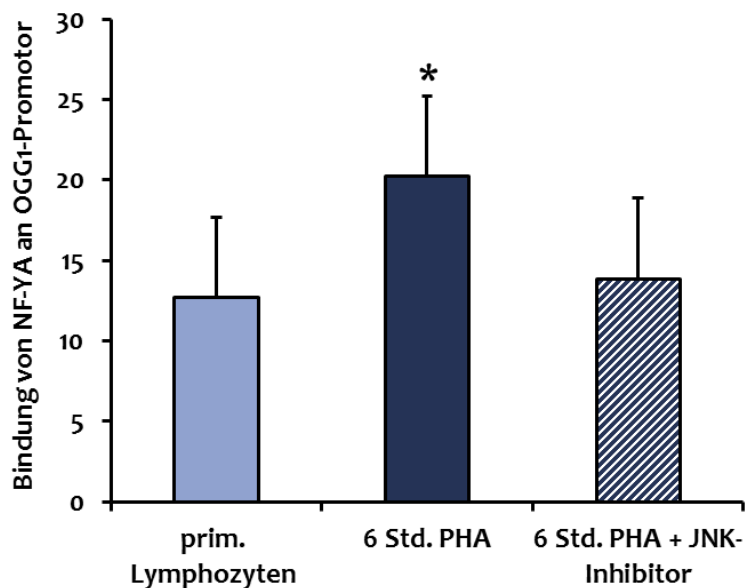


**Abbildung 4-31 Einfluss des JNK-Inhibitors SP600125 auf die Proteinexpression von OGG1 nach PHA-Stimulation in Lymphozyten.** OGG1-Proteinmengen wurden mittels Western Blot detektiert (siehe 3.2.11). Die Lymphozyten eines Buffy Coats wurden 24 h mit PHA stimuliert +/- JNK-Inhibitor SP600125. Die Zugabe des Inhibitors erfolgte 30 min vor Beginn der PHA-Stimulation. 5  $\mu$ g Gesamtproteinextrakt wurden jeweils aufgetragen. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Actin gewählt. Exemplarischer Blot von n=2.

In Abbildung 4-31 ist wiederum zu sehen, dass nach 24 Stunden PHA-Stimulation eine Zunahme der OGG1 Proteinmenge messbar ist. Bei gleichzeitiger Inhibierung der JNK wird die beobachtete PHA-abhängige Zunahme der OGG1-Expression vermindert. Dies ist bereits mit 10  $\mu$ M JNK-Inhibitor SP600125 im Western Blot zu sehen. Somit kann darauf geschlossen werden, dass das Signal der PHA-Stimulation, welches zur Induktion der OGG1-Expression notwendig ist, wesentlich über JNK läuft.

#### 4.4.5 Einfluss einer JNK-Inhibition auf die Bindung des Transkriptionsfaktors NF-YA an den OGG1-Promotor

Zur weiteren mechanistischen Untersuchung der transkriptionellen Regulation von OGG1 nach PHA-Stimulation sollte die Rolle von NF-YA als potentieller Transkriptionsfaktor untersucht werden (siehe 1.5.2.1). Da bereits eine Abhängigkeit des PHA-Signals bezüglich der OGG1-Expression, auf mRNA- sowie auf Proteinebene, von JNK eindeutig gezeigt werden konnte, sollte zusätzlich geprüft werden, ob JNK bereits einen Einfluss auf die Bindung des Transkriptionsfaktors hat. Um diese Frage zu adressieren, wurden ChIP (Chromatin-Immunpräzipitation) Versuche in Kooperation mit dem Labor von V.K. Tiwari (Institut für Molekulare Biologie, Mainz) durchgeführt. Hierfür wurde das Chromatin aus Lymphozyten direkt oder nach 6 Stunden PHA-Stimulation in An- oder Abwesenheit des JNK-Inhibitors SP600125 isoliert und die Bindung des Transkriptionsfaktors NF-YA an dem OGG1-Promotor untersucht (siehe Abbildung 4-32).



**Abbildung 4-32 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP): Bindung des Transkriptionsfaktors NF-YA an den OGG1-Promotor.** Die Lymphozyten wurden aus Buffy Coats isoliert (siehe 3.2.2.1). Die Chromatinisolation wurde direkt (primäre Lymphozyten) oder nach 6 Stunden PHA-Stimulation ± JNK-Inhibitor (SP600125, 30 µM) vorgenommen. Die Zugabe des Inhibitors erfolgte 30 min vor Beginn der PHA-Stimulation. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines zweiseitigen T-Tests mit Welchkorrektur (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) bezogen auf die primären Lymphozyten berechnet.

Die Durchführung der ChIP-Versuche erfolgte durch [REDACTED], Arbeitsgruppe [REDACTED], Institut für Molekulare Biologie (IMB), Mainz (n=7).

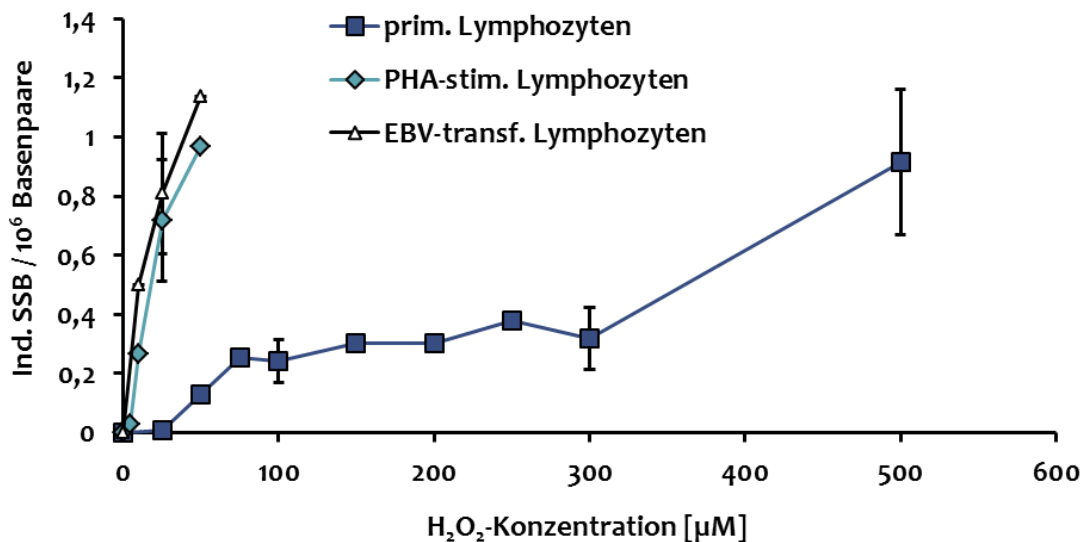
Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Induktion der Bindung des Transkriptionsfaktors NF-YA nach 6-stündiger PHA-Stimulation an den OGG1-Promotor. Diese Bindung wird bei gleichzeitiger Hemmung von JNK wieder abgeschwächt (siehe Abbildung 4-32). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass nach PHA-Stimulation der Transkriptionsfaktors NF-YA verantwortlich für die Transkription von OGG1 ist und dass dessen Bindung an den OGG1-Promotor abhängig von JNK ist.

## 4.5 Induktion und Reparatur von Einzelstrangbrüchen in Lymphozyten nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Behandlung

Mit den folgenden Experimenten sollte überprüft werden, ob die Reparatur von Einzelstrangbrüchen ebenfalls wie die Reparatur von oxidativen DNA-Schäden zwischen primären und PHA-stimulierten Lymphozyten differiert. Um diese Fragestellung zu adressieren, wurden in primären, PHA-stimulierten und EBV-transformierten Lymphozyten Einzelstrangbrüche durch Wasserstoffperoxid induziert und mit Hilfe der Alkalischen Elution quantifiziert.

### 4.5.1 Schadensinduktion durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in humanen Lymphozyten

Um die Reparatur der induzierten Einzelstrangbrüche gut vergleichen zu können, wurde zunächst für primäre, PHA-stimulierte sowie EBV-transformierte Lymphozyten jeweils eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration ermittelt, mit der ein ähnliches Schadensausmaß in den verschiedenen Lymphozyten erreicht wurde. Hierfür wurden die induzierten Einzelstrangbrüche nach Schädigung mit anfänglich 5 bis 50 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quantifiziert (siehe 3.2.9.3). Für die primären Lymphozyten wurde nach dem ersten Versuch die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration auf bis zu 500 µM erhöht.



**Abbildung 4-33 Induktion von Einzelstrangbrüchen (SSB) durch Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) in Lymphozyten.** Die Quantifizierung der induzierten SSB wurde mit Hilfe der Alkalischen Elution durchgeführt (siehe 3.2.7). Die Schadensinduktion erfolgte durch Zugabe verschiedener Konzentrationen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zur Zellsuspension für 15 min bei 37 °C. Die Reaktion wurde mittels Katalase (315 U/ml) abgestoppt (siehe 3.2.9.3). Primäre (n=1-3), PHA-stimulierte (n=1-3) und EBV-transformierte (n=1-3) Lymphozyten. MW ± SD.

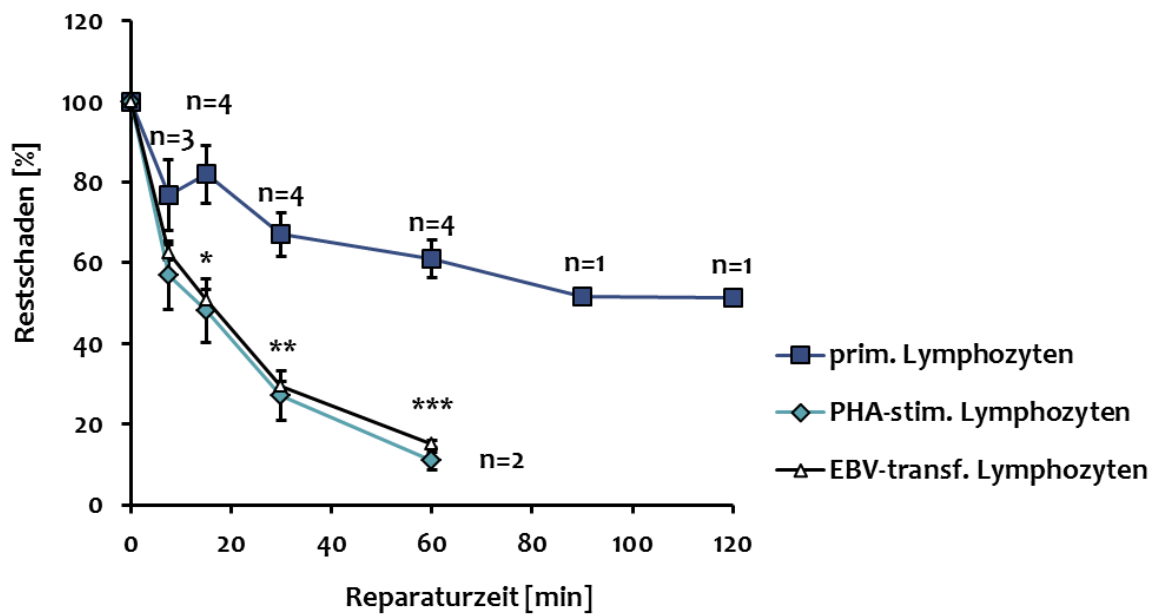
Abbildung 4-35 zeigt einen klaren Unterschied in der Induzierbarkeit von Einzelstrangbrüchen zwischen den verschiedenen Lymphozyten. EBV-transformierte sowie PHA-stimulierte Lymphozyten reagieren deutlich sensibler gegenüber H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als primäre Lymphozyten. Während sich für PHA-stimulierte und EBV-transformierte Lymphozyten jeweils eine steile, lineare Dosis-Wirkungskurve ergibt, ist für die primären Lymphozyten eine deutlich flacher verlaufende Dosis-Wirkungskurve ohne direkte Linearität festzustellen. Da die Schadensinduktion durch Wasserstoffperoxid nicht direkt abläuft, sondern abhängig von Übergangsmetallen ist (vergleiche 1.4.2), ist ein Unterschied in den verschiedenen Lymphozyten nicht unerwartet. Nicht nur ein variierendes Verhältnis von zum Beispiel Fe<sup>2+</sup> zu Fe<sup>3+</sup>, sondern auch ein unterschiedliches Vorkommen von Antioxidantien können das Ausmaß der Schädigung verändern. Zur Untersuchung der Reparatur von Einzelstrangbrüchen wurden PHA-stimulierte und EBV-transformierte Lymphozyten mit 25 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> behandelt, während bei primären Lymphozyten für ein vergleichbares Ergebnis 500 µM eingesetzt wurden (siehe Abbildung 4-33).

#### 4.5.2 Reparatur von durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierten Einzelstrangbrüchen

Für die unter 4.5.1 ermittelten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen wurde in den folgenden Experimenten die Reparatur der induzierten Einzelstrangbrüche mit Hilfe der Alkalischen Elution gemessen (siehe 3.2.9.3). Die induzierten Einzelstrangbrüche, welche zur Normierung auf 100 % gesetzt wurden, lagen im Mittel bei etwa 0,8 SSB / 10<sup>6</sup> Basenpaare.

In Abbildung 4-34 sind die Reparaturkinetiken in primären, PHA-stimulierten und EBV-transformierten Lymphozyten dargestellt. PHA-stimulierte und EBV-transformierte Lymphozyten zeigen eine schnelle Reparatur der induzierten Einzelstrangbrüche, die identisch verläuft. Bereits nach 15 Minuten ist die Hälfte der Einzelstrangbrüche repariert. Im Vergleich dazu werden in primären Lymphozyten induzierte Einzelstrangbrüche deutlich langsamer repariert. Nach 60 Minuten Reparaturzeit sind noch über 60 % der Einzelstrangbrüche verblieben. Innerhalb von einer weiteren Stunde (120 Minuten) können die induzierten Strangbrüche nur auf 50 % reduziert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass neben der Reparatur oxidativer DNA-Schäden (siehe 4.3.4) ebenfalls die Reparatur von Einzelstrangbrüchen durch Stimulation mit PHA induziert wird. Während jedoch in primären Lymphozyten keine Reparatur von oxidativen DNA-Schäden messbar war, wurden Einzelstrangbrüche zumindest teilweise repariert.



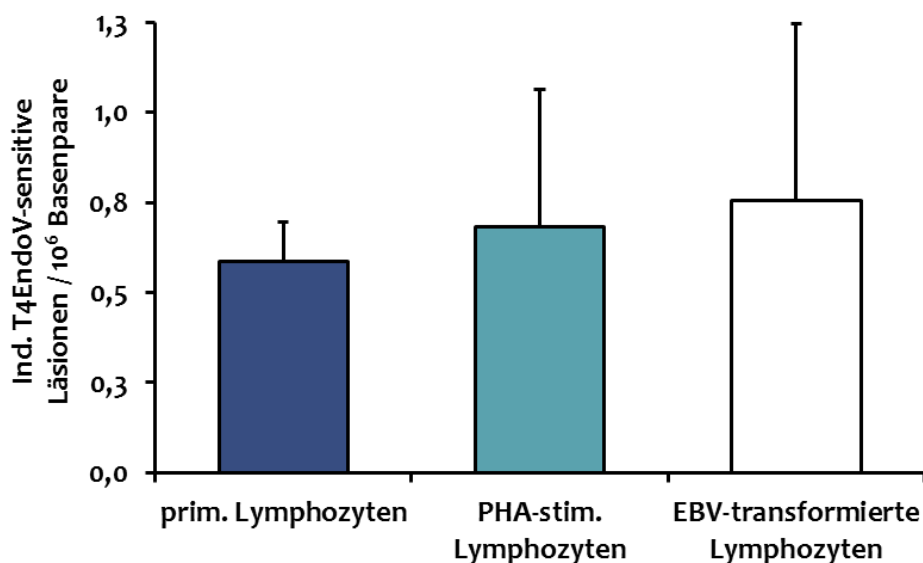
**Abbildung 4-34** Reparatur von durch Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) induzierten Einzelstrangbrüchen (SSB) in primären, PHA-stimulierten und EBV-transformierten Lymphozyten. Die Quantifizierung der SSB wurde mit Hilfe der Alkalischen Elution durchgeführt (siehe 3.2.7). Die Schadensinduktion erfolgte mit  $25 \mu M$  (PHA-stimulierte und EBV-transformierte Lymphozyten) oder  $500 \mu M$  (primäre Lymphozyten)  $H_2O_2$  für 15 min im Wasserbad ( $37^\circ C$ ) (siehe 3.2.9.3). MW  $\pm$  SD; bei  $n=2$  MW  $\pm$  Diff. vom MW. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines zweiseitigen T-Tests mit Welchkorrektur bezogen auf die primären Lymphozyten berechnet (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

## 4.6 Induktion und Reparatur von CPDs in Lymphozyten nach UV-B-Bestrahlung

Zur Komplettierung der vergleichenden Reparaturdaten in primären und PHA-stimulierten Lymphozyten sollte nun die Nukleotidexzisionsreparatur (vergleiche 1.5.3) genauer untersucht werden.

### 4.6.1 Schadensinduktion durch UV-B Strahlung in humanen Lymphozyten

Primäre, PHA-stimulierte und EBV-transformierte Lymphozyten wurden zur Induktion von CPDs im Abstand von 1 m für 8 sec mit UV-B bestrahlt (entsprechend  $2,88 \text{ J/m}^2$ ) (siehe 3.2.9.2 und 1.4.3). Die Quantifizierung erfolgte über die Alkalische Elution mittels der Reparaturoendonuklease T4EndoV, welche CPDs erkennt und einschneidet.



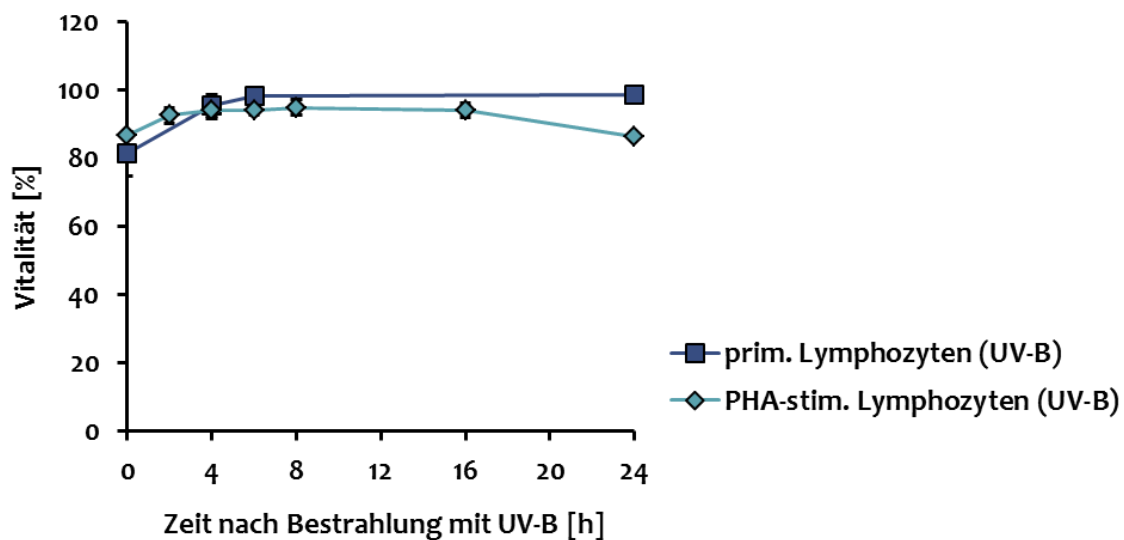
**Abbildung 4-35 Induktion von T4EndonukleaseV-sensitiven Basenmodifikationen nach Bestrahlung mit UV-B in Lymphozyten.** Die Quantifizierung der T4EndoV-sensitiven Basenmodifikationen wurde mit Hilfe der Alkalischen Elution durchgeführt (siehe 3.2.7). Die Schadensinduktion erfolgte durch Bestrahlung mit UV-B (8 sec,  $2,88 \text{ J/m}^2$  zwischen 280 und 315 nm) (siehe 3.2.9.2). Primäre (n=6), PHA-stimulierte (n=7) und EBV-transformierte (n=4) Lymphozyten. MW  $\pm$  SD.

Abbildung 4-35 sind die induzierten CPDs (T4EndoV-sensitive Läsionen) in primären, PHA-stimulierten sowie EBV-transformierten Lymphozyten zu entnehmen. Die ermittelten Werte liegen zwischen 0,6 (primäre Lymphozyten) und 0,8 (EBV-

transformierte Lymphozyten) CPDs pro  $10^6$  Basenpaare und sind somit erwartungsgemäß statistisch nicht signifikant unterschiedlich.

#### 4.6.2 Einfluss der Schadensinduktion durch UV-B Strahlung auf die Vitalität

Bevor eine Untersuchung der Reparatur induzierter CPDs über einen Zeitraum von 24 Stunden vorgenommen wurde, sollte überprüft werden, ob unter den gewählten Schädigungsbedingungen die Vitalität beeinflusst wird. Hierzu wurden die Zellen mit UV-B bestrahlt und anschließend die Vitalität mittels Trypanblau nach den entsprechend gewählten Reparaturzeiten ermittelt.



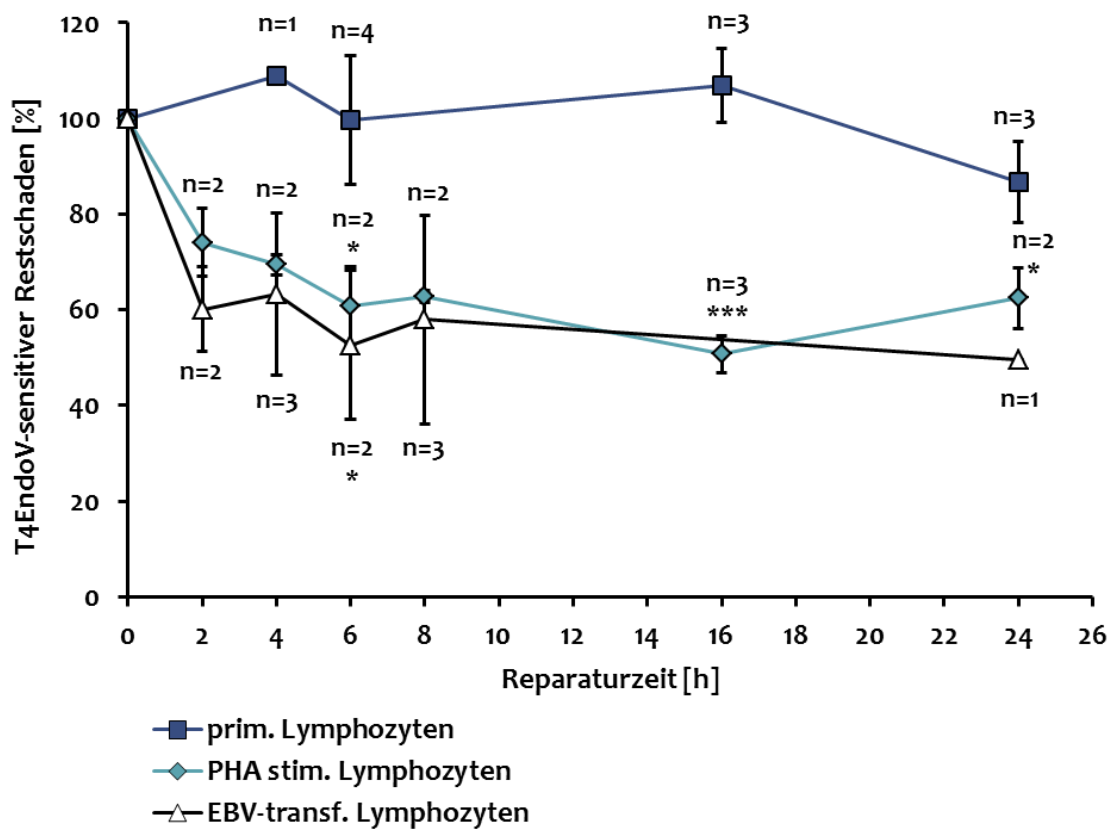
**Abbildung 4-36 Zellvitalität nach UV-B-Bestrahlung in Lymphozyten.** Die Schadensinduktion erfolgte durch Bestrahlung mit UV-B (8 sec,  $2,88 \text{ J/m}^2$  zwischen 280 und 315 nm) (siehe 3.2.9.2). Die Vitalität wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Bestrahlung mittels Trypanblau und Neubauer-Zählkammer untersucht (siehe 3.2.5). Die mittlere Zellvitalität der jeweiligen Kontrollen lag bei 94% (primäre Lymphozyten;  $n=4$ ) und 95,5% (PHA-stimulierte Lymphozyten;  $n=4-5$ ).  $MW \pm SD$ .

Wie in Abbildung 4-36 gut zu erkennen ist, bleibt die Vitalität nach Bestrahlung mit UV-B innerhalb von 24 Stunden stets über 80%. Es ist keine Toxizität erkennbar.



### 4.6.3 Reparatur oxidativer DNA-Schäden induziert UV-B Strahlung

Im Folgenden sollte nun die Reparatur der induzierten CPDs in den verschiedenen Lymphozyten untersucht werden. Hierzu wurden alle Lymphozyten wie unter 3.2.9.2 beschrieben mit UV-B bestrahlt. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten im Anschluss an die Schädigung wurden die CPDs mittels Alkalischer Elution quantifiziert. Die induzierten CPDs, welche im Zuge der Normierung auf 100 % gesetzt wurden, lagen im Mittel bei ca. 0,7 Läsionen pro  $10^6$  Basenpaare.



**Abbildung 4-37** Reparatur T4EndoV-sensitiver Basenmodifikationen, induziert durch UV-B-Bestrahlung in primären, PHA-stimulierten und EBV-transformierten Lymphozyten. Schadensinduktion erfolgte durch UV-B-Bestrahlung (8 sec, 2,88 J/m<sup>2</sup> zwischen 280 und 315 nm) (siehe 3.2.9.2). Die Quantifizierung der T4EndoV-sensitiven Basenmodifikationen wurde mit Hilfe der Alkalischen Elution vorgenommen (siehe 3.2.7). MW  $\pm$  SD; bei n=2 MW  $\pm$  Diff. vom MW. Die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines zweiseitigen T-Tests mit Welchkorrektur (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) bezogen auf die primären Lymphozyten berechnet.

Wie bereits für die Reparatur von oxidativen Basenmodifikationen und Einzelstrangbrüchen gezeigt werden konnte, gibt es auch hinsichtlich der Entfernung induzierter CPDs deutliche Unterschiede zwischen primären und PHA-stimulierten

Lymphozyten. Innerhalb der betrachteten 24 Stunden ist fast keine Abnahme der CPDs in primären Lymphozyten detektierbar. Ein Restschaden von  $86,8\% + 8,4\%$  wurde nach 24 Stunden gemessen. Im Vergleich dazu zeigen die PHA-stimulierten Lymphozyten eine signifikante, aber unvollständige Reparatur. Diese ist vollkommen vergleichbar mit der Reparatur in immortalisierten EBV-transformierten Lymphozyten.

Mit den Ergebnissen zur NER nach UV-B-Bestrahlung kann nun für einen dritten DNA-Reparaturweg, neben BER und Einzelstrangbruchreparatur, ein Defizit in primären Lymphozyten festgestellt werden. Wiederum kann durch eine 72-stündige PHA-Stimulation eine Reparatur auf ein zu immortalisierten Lymphozyten vergleichbares Niveau hergestellt werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Hat eine PHA-Stimulation humaner Lymphozyten Einfluss auf basale oxidative DNA-Schäden?

Durch Stimulation primärer Lymphozyten mit Phytohämagglutinin (PHA) wird eine physiologische Aktivierung der T-Lymphozyten nachgeahmt, welche in einer polyklonalen Expansion endet (siehe 1.1.3). Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses dieser Stimulation auf eine mögliche Modulation der Reparatur oxidativer DNA-Schäden in humanen Lymphozyten.

Um einen generellen Einfluss der Aktivierung von Lymphozyten mittels PHA auf oxidative DNA-Schäden zu untersuchen, wurden zunächst die basalen Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Schäden verglichen. Hierfür wurden primäre Lymphozyten verschiedener Spender aus Buffy Coats isoliert und anschließend mit PHA, wie in Abschnitt 3 beschrieben, stimuliert. Mit Hilfe der Alkalischen Elution wurden die oxidativen DNA-Schäden (Fpg-sensitive Schäden) quantifiziert (siehe 3.2.8). Die gewählten Stimulationsbedingungen hatten keinen Einfluss auf die Vitalität der Lymphozyten (siehe Abbildung 4-10). Nach 24 Stunden PHA-Stimulation konnte bereits eine Änderung der Morphologie gezeigt werden. Im Vergleich zu den Ausgangszellen waren PHA-stimulierte Lymphozyten deutlich größer und hatten eine höhere Granularität (vergleiche Abbildung 4-7). Eine 72-stündige PHA-Stimulation mit anschließender Kultivierung über weitere 72 Stunden reduzierte im Durchschnitt die basalen Spiegel oxidativer DNA-Schäden im Vergleich zu unstimulierten primären Lymphozyten signifikant (siehe Abbildung 4-11). Beim direkten Vergleich primärer und PHA-stimulierter Lymphozyten jeweils eines Spenders konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Die Stimulation über 72 Stunden mit PHA, ohne nachfolgende Kultivierung, reduzierte die basalen oxidativen DNA-Schäden signifikant um 27 bis 48 % der frisch isolierten zugehörigen Lymphozyten. Eine 72-stündige Kultivierung primärer Lymphozyten ohne PHA führte hingegen nur zu einer leichten, nicht signifikanten Reduktion der basalen oxidativen DNA-Schäden (siehe Abbildung 4-12).

Als ein wichtiger Faktor, der eine Reduktion der basalen oxidativen DNA-Schäden bedingen kann, ist sicherlich die einsetzende Proliferation zu sehen. Diese war anhand der Änderung der Zellzyklusverteilung nach 48 Stunden PHA-Stimulation nachweisbar (siehe Abbildung 4-8 und Abbildung 4-9). Grundsätzlich kann davon ausgegangen werden, dass bei der Replikation durch den Einbau ungeschädigter Nukleotide der Gesamtschaden verringert werden kann.

Als weitere Ursachen für eine Senkung der basalen oxidativen DNA-Schäden durch PHA-Stimulation können eine verringerte Induktion, durch beispielsweise ein erhöhtes zelluläres antioxidatives Abwehrsystem, oder aber eine beschleunigte DNA-Reparatur in Betracht gezogen werden (vergleiche hierzu Abbildung 1-1). Gegen ersteres spricht, dass keine verminderte Suszeptibilität durch eine PHA-Stimulation gezeigt werden konnte. Die Induktion oxidativer DNA-Schäden mittels Acridinorange und sichtbares Licht war in primären und PHA-stimulierten Lymphozyten vergleichbar (siehe Abbildung 4-16). Zusätzlich ist in der Literatur eine erhöhte Bildung von ROS, bedingt durch eine beispielsweise gesteigerte Mitochondrienaktivität während der PHA-Stimulation beschrieben (DARZYNKIEWICZ et al. 1981; TANAKA et al. 2007; CHANG et al. 1999; BENKE et al. 1991). Gleichzeitig ist keine Hochregulation des antioxidativen Systems, welches ausgleichend auf die erhöhte ROS-Produktion nach PHA-Stimulation wirken könnte, bekannt. Die HO-1 bleibt von einer Stimulation der Lymphozyten mit PHA unbeeinflusst (MARTIN-CHOULY et al. 2011), demgegenüber wird für Glutathion sogar ein initialer Abfall beschrieben (KAVANAGH et al. 1990; CHANG et al. 1999). Aus diesen Daten wären somit sogar erhöhte Spiegel oxidativer DNA-Schäden nach PHA-Stimulation zu erwarten gewesen. Basierend auf dem Hintergrund, dass keine erniedrigte Suszeptibilität durch eine PHA-Stimulation erreicht wird und dass sogar mit einer erhöhten ROS-Produktion und somit eher mit einer Erhöhung der basalen oxidativen DNA-Schäden zu rechnen ist, stellt sich die Frage, ob die einsetzende Proliferation als alleiniger ursächlicher Faktor für eine Reduktion der DNA-Schäden ausreichend ist. Eine zusätzliche Beschleunigung der DNA-Reparatur als Modulator für basale DNA-Schäden ist gut vorstellbar.

Insgesamt lagen die gemessenen basalen Spiegel oxidativer DNA-Schäden primärer Lymphozyten im Bereich früherer Untersuchungen mit der Alkalischen Elution (HOMBURG 2001). Die detektierten Schwankungen innerhalb der 31 untersuchten Spender (vergleiche Abbildung 4-4) waren im Vergleich etwas größer. Dies kann zum Teil durch eine deutlich geringere Probandenanzahl bei M. Homburg erklärt werden, was zu einer geringeren Streuung der Ergebnisse geführt haben kann. Neben einem experimentellen Einfluss auf die Variabilität der Messungen (siehe Abbildung 4-5) wurde bereits ein signifikanter Einfluss vom Geschlecht und vom jeweiligen Wohnort des Spenders auf die basalen Spiegel von 8-oxoG gezeigt (COLLINS et al. 1998), welcher die Unterschiede erklären kann.

Der intraindividuelle Vergleich der basalen oxidativen DNA-Schäden in primären Lymphozyten direkt nach verschiedenen Isolationen im Abstand von mehreren Tagen zeigte ebenfalls Schwankungen (siehe Abbildung 4-6), welche nicht allein durch die experimentelle Variabilität erklärbar sind und auch in Studien von M. Homburg gezeigt wurden. Gründe für diese Schwankungen können in intraindividuell unterschiedlichem

oxidativen Stress gesehen werden. Eine Reihe von Untersuchungen konnte bereits einen Zusammenhang zwischen Fpg-sensitiven Basenmodifikationen und dem individuellen Lebensstil herstellen. So senken täglicher Konsum von Kiwis (BREVIK et al. 2011), Rosenkohl (HOELZL et al. 2008), Brunnenkresse (GILL et al. 2007) oder beispielsweise Olivenöl (SALVINI et al. 2006) die basalen oxidativen DNA-Schäden (gemessen als Fpg-sensitive Basenmodifikationen mit Hilfe des Comet-Assays). Je nach Studiendesign und Zusammensetzung der Nahrung kann eine vegetarische Ernährung die Anzahl der basalen oxidativen DNA-Schäden reduzieren (KRAJCOVICOVÁ-KUDLÁCKOVÁ et al. 2008; PRADO et al. 2010) oder aber auch unbeeinflusst lassen (BRIVIBA et al. 2008). Exzessiver Sport zeigt demgegenüber eine Erhöhung basaler DNA-Schäden (HARTMANN et al. 1994; MØLLER et al. 2001) wie auch das Rauchen (EL-ZEIN et al. 2010; MOHANKUMAR et al. 2002; SARDAŞ et al. 2001).

## **5.2 Beeinflusst eine PHA-Stimulation die Reparatur oxidativer DNA-Schäden in humanen Lymphozyten?**

Wie oben bereits beschrieben lässt die gezeigte Reduktion der basalen oxidativen DNA-Schäden nach PHA-Stimulation neben der einsetzenden Proliferation ebenfalls eine gesteigerte DNA-Reparatur als ursächlich vermuten. Um zu überprüfen ob eine PHA-Stimulation auch die Reparatur von oxidativen DNA-Schäden moduliert, wurde in primären und PHA-stimulierten Lymphozyten die Reparatur induzierter DNA-Schäden mit Hilfe der Alkalischen Elution vergleichend untersucht. Zur Induktion oxidativer DNA-Schäden wurden die Lymphozyten in Anwesenheit von Acridinorange bestrahlt (siehe 1.4.1 und 3.2.9.1).

Während der betrachteten 24-stündigen Reparaturzeit nach Schadensinduktion konnte keine Abnahme der induzierten oxidativen DNA-Schäden in primären Lymphozyten detektiert werden (Abbildung 4-21), obwohl die Vitalität der Zellen von der Behandlung unbeeinflusst blieb (Abbildung 4-20). Eine Stimulation primärer Lymphozyten mit PHA führte zu einer Aufnahme der Reparatur. Innerhalb von 24 Stunden wurden in PHA-stimulierten Zellen über 50 % der induzierten oxidativen DNA-Schäden entfernt (Abbildung 4-21).

Direkte Messungen der Reparatur in primären Lymphozyten wurden bisher noch nicht beschrieben. In mehreren Studien wurde jedoch die Aktivität von Extrakten aus Lymphozyten bestimmt, oxidative DNA-Modifikationen zu erkennen und einzuschneiden. Mittels Cleavage-Assay (PAZ-ELIZUR et al. 2007; MAZZEI et al. 2011),

Relaxationsassay und einem modifizierten Comet-Assay (COLLINS et al. 2001; COLLINS & GAIVÃO 2007; CAPLE et al. 2010) (siehe 1.6.1) konnte so eine Glykosylaseaktivität für 8-oxoG in Zellextrakten nachgewiesen werden. Dies steht in Einklang mit dem Nachweis von OGG1 auch in unstimulierten Lymphozyten (siehe Abbildung 4-22, Abbildung 4-23 und Abbildung 4-26). Das Fehlen einer funktionierenden DNA-Reparatur in primären Lymphozyten trotz der Anwesenheit von OGG1 ist somit überraschend. Es ist allerdings hervorzuheben, dass alle aufgeführten Studien ausschließlich mit Zellextrakten aus Lymphozyten durchgeführt wurden und nicht wie in dieser Arbeit mit vitalen Lymphozyten. Beim Arbeiten mit Zellextrakten wird die äußerst kompakte Chromatinstruktur primärer Lymphozyten vollkommen außen vorgelassen. Der Aspekt, dass in kondensiertem Chromatin im Vergleich zu offenem Chromatin DNA-Schäden deutlich schwerer zugänglich für Reparaturenzyme sind (AMOUROUX et al. 2010; KEUSER et al. 2013), wurde in diesen Studien somit nicht betrachtet. Auch wird beim Einsatz von Zellextrakten die Lokalisation von OGG1, nukleär oder mitochondrial, wie sie in vitalen Zellen vorkommt, nicht berücksichtigt. Daher ist eine absolute Aussage über die Reparatur oxidativer DNA-Schäden in Lymphozyten nur anhand von Glykosylaseaktivitäten nicht treffbar.

Die Gruppe um A. Collins untersuchte die Reparatur oxidierter Pyrimidine (EndoIII-sensitiver DNA-Schäden) in isolierten Lymphozyten mittels Comet Assay. Für EndoIII-sensitive oxidative DNA-Schäden, nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid, wurde über den betrachteten Zeitraum von 24 Stunden keine Reparatur gemessen (FILLION et al. 1998). Dieser Befund für oxidierte Pyrimidine scheint demnach ähnlich zu sein wie für die hier gezeigten Daten zu Fpg-sensitiven DNA-Schäden (oxidierte Purine). Als Ursache für die schlechte Reparatur oxidativer DNA-Schäden vermutete Collins, dass oxidative DNA-Schäden unter Kulturbedingungen zunächst induziert werden und somit eine fehlende Reparatur vortäuschen. Diese Vermutung kann für diese Arbeit nicht bestätigt werden. Zum einen zeigen die Gleichgewichtsspiegel nach 72 Stunden Kultivierung der Lymphozyten (siehe Abbildung 4-12) keine Erhöhung. Zum anderen wurden die Reparaturversuche in Anwesenheit von Katalase durchgeführt, welche zumindest exogenes Wasserstoffperoxid abfängt.

Das nachgewiesene Fehlen einer Reparatur oxidativer DNA-Schäden in primären Lymphozyten (Abbildung 4-21) ist unerwartet, weil so die endogen in allen Zellen gebildeten oxidativen DNA-Schäden akkumulieren und dadurch vitale Funktionen, wie z.B. die Transkription, auch in nicht proliferierenden Zellen negativ beeinflusst werden. Als besonders kritisch sind somit DNA-Schäden in aktiven Genen anzusehen, die einen Funktionsverlust bedeuten könnten. Eine Bewahrung der Integrität von aktiven Genen, die für entsprechende, spezialisierte Zellfunktionen notwendig ist, ist für ein funktionsfähiges Immunsystem somit unabdingbar. Im Zusammenhang mit der

Nukleotidexzisionsreparatur (NER) wurde dieser Aspekt in enddifferenzierten Zellen bereits mehrfach beleuchtet. In enddifferenzierten Zellen werden DNA-Schäden, die Substrate der NER darstellen, hauptsächlich nur in aktiven Genen repariert (NOUSPIKEL 2007). Im transkribierten Strang (TS) erfolgt dies über die transkriptionsgekoppelte NER (TCR) oder wie im nicht-transkribierten Strang (NTS) über DAR (*differentiation associated repair* oder *transcription domain-associated repair*) (NOUSPIKEL 2009). DAR ist zwar abhängig von einer Transkription allerdings weder von der RNA Polymerase II noch von CSB, sondern von XPC (NOUSPIKEL et al. 2006).

Ob oxidative DNA-Schäden, wie 8-oxoG, allerdings auch transkriptionsabhängig repariert werden und somit Substrate der transkriptionsgekoppelten Nukleotidexzisionsreparatur (TCR siehe 1.5.3) darstellen, ist bisher nicht ausreichend geklärt (HANAWALT & SPIVAK 2008). Unterstützer dieser Annahme berufen sich auf die Tatsache, dass Zellen mit einer defekten TCR (Cockayne-Syndrom) eine erhöhte Sensitivität gegenüber Agenzien zeigen, die oxidative DNA-Schäden induzieren; z.B.  $\gamma$ -Strahlen (COOPER & LEADON 1994), Wasserstoffperoxid (SPIVAK & HANAWALT 2006) oder Kaliumbromat (ROPOLO et al. 2007). Voraussetzung für diese Annahme wäre eine Blockierung der Transkription durch oxidative DNA-Schäden. Bis jetzt gibt es in der Literatur keinen direkten Beweis für eine TCR von 8-oxoG. Daten für eine als grundlegend anzusehende Blockierung der RNA Polymerase II (RNAPII) durch oxidative Basenmodifikationen sind nicht eindeutig. In vitro Tests mit aufgereinigter RNAPII konnten für 8-oxoG im transkribierten Strang nur teilweise eine Blockierung aufweisen (KURAOKA et al. 2003; TORNALETTI et al. 2004). Arbeiten mit Kernextrakten aus HeLa-Zellen zeigten hingegen keine (KATHE 2004) bzw. nur eine geringfügige (LARSEN et al. 2004) Arretierung der RNAPII durch oxidative Basenmodifikationen. Den Arbeiten von Kitsera et al ist zu entnehmen, dass 8-oxoG alleine keinerlei blockierende Eigenschaften aufweist. Hierfür wurden speziell Plasmide mit einem EGFP-Reportergen konstruiert, die nur ein einzelnes 8-oxoG enthielten. Durch die Transfektion in OGG1-kompetente sowie -defiziente Zellen konnte die Transkription anhand der Expression von EGFP in Abhängigkeit von OGG1 untersucht werden. Hier konnte gezeigt werden, dass erst die Generierung eines Einzelstrangbruchs durch die Initiierung der Reparatur durch OGG1 blockierend auf die Transkription wirkt (KITSERA et al. 2011); siehe auch (KATHE 2004) und (LARSEN et al. 2004). Zuletzt versuchten Guo et al eine transkriptionsgekoppelte Reparatur von 8-oxoG im ATM-Gen zu zeigen. Die Daten liefern die Annahme, dass OGG1 und XPA essentiell für die TCR von 8-oxoG sind und implizieren somit einen Crosstalk zwischen BER und NER (GUO et al. 2013). Eine direkte Verknüpfung der beiden Reparaturwege konnte aber auch hier nicht eindeutig gezeigt werden. Sollte eine TCR der induzierten oxidativen DNA-Schäden in den für diese Arbeit untersuchten Lymphozyten tatsächlich stattfinden, wäre dies wahrscheinlich mit der eingesetzten Methode, der Alkalischen Elution, nicht detektierbar. Denn der

Anteil transkribierter, aktiver Gene in primären Lymphozyten ist vermutlich zu gering um bei der Messung des Gesamtschadens mit der Alkalischen Elution zu Buche zu schlagen. Inwiefern also induzierte oxidative DNA-Schäden in primären Lymphozyten transkriptionsabhängig repariert werden, bleibt Untersuchungsgegenstand. Was jedoch eindeutig aus den durchgeführten Experimenten hervorgeht ist, dass eine Stimulation mit PHA die Reparatur oxidativer DNA-Schäden signifikant steigert.

### **5.3 Welche Mechanismen liegen einer beschleunigten Reparatur oxidativer DNA-Schäden nach PHA-Stimulation zu Grunde?**

Um die Ursachen der verbesserten Reparatur oxidativer DNA-Schäden nach PHA-Stimulation zu ermitteln, wurde untersucht, ob erhöhte Proteinmengen von OGG1 unter PHA-Stimulation dafür verantwortlich gemacht werden können. Nach bereits 18 Stunden, der insgesamt 72-stündigen PHA-Stimulation, ist eine deutliche Erhöhung von OGG1 auf Proteinebene mittels Western Blot messbar. Diese erreicht ihr Maximum nach 48 Stunden und bleibt dann auch nach Ablauf der Stimulation und anschließender Kultivierung ohne PHA erhalten (siehe Abbildung 4-22, Abbildung 4-23 und Abbildung 4-24). Insgesamt konnte eine Erhöhung um das 4-fache der OGG1-Proteinmenge im Vergleich zu den zugehörigen primären Lymphozyten detektiert werden. Eine reine Kultivierung primärer Lymphozyten führte zu keiner Änderung der OGG1-Proteinmengen (siehe Abbildung 4-22). Die gesteigerten OGG1 Proteinmengen durch PHA-Stimulation konnten auf eine erhöhte Transkription zurückgeführt werden. Die Analyse der OGG1 mRNA über quantitative RT-PCR zeigte bereits nach einer PHA-Stimulationszeit von 6-Stunden einen 4-fachen Anstieg. Dieser nahm über die beobachteten 24 Stunden weiter zu (siehe Abbildung 4-25). Durch eine Erhöhung der Proteinmenge von OGG1 ist erklärbar, dass die Basenexzisionsreparatur deutlich effektiver verlaufen kann, denn die Erkennung durch OGG1 gilt als geschwindigkeitsbestimmender Schritt der Reparatur von 8-oxoG.

Mazzei et al konnten ebenfalls eine Zunahme der OGG1 mRNA nach PHA-Stimulation zeigen (MAZZEI et al. 2011), die wie auch in Abbildung 4-26 gezeigt individuell verschieden ist. Das Ausmaß dieses Anstiegs der OGG1 mRNA nach PHA-Stimulation ist unabhängig von der Ausgangsmenge der jeweiligen primären Lymphozyten gewesen und wahrscheinlich auf eine unterschiedlich starke Reaktion auf die PHA-Behandlung zurückzuführen. Arbeiten von Pieri zeigten beispielsweise, dass die Reaktion auf eine PHA-Behandlung abhängig vom Alter ist (PIERI et al. 1992). Die unterschiedliche Menge



an OGG1 nach der PHA-Stimulation ist höchstwahrscheinlich auch ursächlich für die vergleichsweise hohen Standardabweichungen der Reparatur nach PHA-Stimulation.

Neben einer erhöhten OGG1-Expression ist anzunehmen, dass ebenfalls die Änderung der Chromatinstruktur durch eine PHA-Stimulation sich unterstützend auf eine gesteigerte Reparatur auswirkt. Durch Aktivierung primärer Lymphozyten mittels PHA wird kompaktes Heterochromatin in das offene Euchromatin umgewandelt (TOKUYASU et al. 1968; HIRSCHHORN et al. 1971). Eine offene Chromatinstruktur bedeutet gleichzeitig eine bessere Zugänglichkeit für OGG1 zum DNA-Schaden (AMOUROUX et al. 2010). Umgekehrt verlangsamt eine kondensierte Chromatinstruktur die Reparatur von sowohl oxidativen DNA-Schäden als auch von Einzelstrangbrüchen und CPDs (KEUSER et al. 2013).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass durch PHA die Transkription von OGG1 gesteigert wird und somit die Proteinmenge erhöht wird. Gleichzeitig kann vermutet werden, dass eine offenere Chromatinstruktur die Zugänglichkeit für OGG1 zum DNA-Schaden erleichtert, woraus eine beschleunigte Reparatur resultiert.

#### **5.4 Welche Mechanismen bedingen eine Änderung der OGG1 Expression nach PHA-Stimulation?**

Die Stimulation mit PHA erfolgt u.a. über den T-Zell-Rezeptor/CD3-Komplex, dessen Signaltransduktion ist schematisch Abbildung 1-2 zu entnehmen. Die MAP-Kinasen ERK, JNK und p38 sind in diesem Signalweg involviert. Zur weiteren mechanistischen Aufklärung der gezeigten gesteigerten Transkription von OGG1 und somit auch erhöhten DNA-Reparatur wurde der Einfluss der MAP-Kinasen auf das PHA-Signal untersucht.

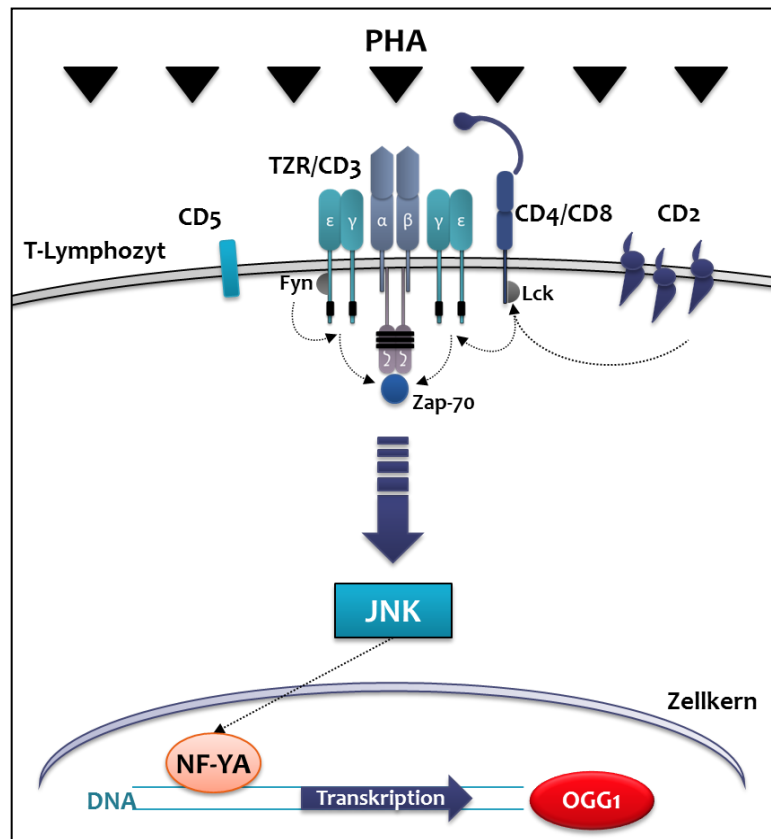
Durch den Einsatz spezifischer Inhibitoren der einzelnen Kinasen konnte gezeigt werden, dass sowohl ERK als auch JNK notwendig für eine PHA-vermittelte Änderung von Zellgröße und Granularität (FSC und SSC) sind (Abbildung 4-27 und Abbildung 4-28). Eine Hemmung von ERK oder JNK verminderte die Änderung der Zellgröße und Granularität nach PHA-Stimulation in vergleichbarem Maße. Der PHA-Effekt konnte jedoch nicht komplett unterdrückt werden. Eine Inhibierung von p38 hatte hingegen kaum einen Effekt. Der stimulierende Effekt von PHA auf die OGG1 mRNA sowie die Proteinmenge konnte durch Inhibierung von JNK deutlich reduziert werden (Abbildung 4-29, Abbildung 4-30 und Abbildung 4-31). Die Inhibierung von ERK führte

ebenfalls zu einer reduzierten OGG1 mRNA Produktion. Diese war allerdings weniger stark ausgeprägt wie nach JNK-Inhibierung.

Die Frage nach einem verantwortlichen Transkriptionsfaktor für die Regulierung von OGG1 nach PHA-Stimulation, konnte bisher noch nicht eindeutig beantwortet werden. Bisher konnten die Transkriptionsfaktoren NF-YA (Nukleärer Transkriptionsfaktor Y Untereinheit Alpha) (HABIB et al. 2008; LEE et al. 2004), AP4 (*activator protein 4*) (HABIB et al. 2010) sowie Nrf2 (*nuclear respiratory factor 2*) (SINGH et al. 2013; PIAO et al. 2011) mit einer Regulierung von OGG1 in Zusammenhang gebracht werden. Der TSC1/TSC2-Komplex (Harmartin/Tuberin) scheint „upstream“ von NF-YA dabei maßgeblich für die Regulation von OGG1 zu sein. Tuberin-defiziente Zellen zeigen verminderte NF-YA-Proteinspiegel, eine reduzierte Lokalisation von NF-YA im Zellkern, sowie eine geringere Bindung an den OGG1-Promoter und somit weniger OGG1-Protein (HABIB et al. 2008; HABIB 2009). Für AP4 konnte ein ähnlicher Zusammenhang gefunden werden (HABIB et al. 2010). Als Antwort auf oxidativen Stress konnte über den Transkriptionsfaktor Nrf2 zum einen eine Hochregulation von OGG1 durch Estrogen (SINGH et al. 2013) und zum anderen eine Reduktion von OGG1 durch Silbernanopartikel (PIAO et al. 2011) gezeigt werden. Eine MMS-abhängige OGG1-Induktion in HCT116-Zellen wurde über eine NF-YA abhängige Regulation gezeigt (LEE et al. 2004). In Mausembryofibroblasten konnte hingegen bezüglich der Cleavage-Aktivität von OGG1 nach MMS-Behandlung keine Induktion gemessen werden (BERCHT et al. 2007). Anhand der publizierten Daten ist davon auszugehen, dass die Regulation von OGG1 zum einen über verschiedene Transkriptionsfaktoren in Abhängigkeit vom jeweiligen Trigger reguliert werden kann und zum anderen zellspezifisch ist.

Ein spannender Kandidat für die Regulation der OGG1 Expression nach PHA ist NF-YA. Für diesen Transkriptionsfaktor ist eine Abhängigkeit von JNK bereits gezeigt worden. Während der Differenzierung von Stammzellen zu Neuronen rekrutiert NF-YA JNK zu dem jeweilig besetzten Promotor. Dort phosphoryliert JNK dann das Histon H3S10, wodurch der Transkriptionsfaktor aktiviert wird und es zur Transkription kommt (TIWARI et al. 2012). Da eine Abhängigkeit des PHA-Signals bezüglich der OGG1-Expression, auf mRNA- sowie auf Proteinebene, von JNK eindeutig gezeigt werden konnte, war es spannend zu untersuchen inwieweit dieser Mechanismus mit dem Transkriptionsfaktor NF-YA auch für PHA zutreffend ist. CHIP (Chromatin-Immunpräzipitation) Versuche in Kooperation mit dem Labor von V.K. Tiwari (Institut für Molekulare Biologie, Mainz) zeigten, dass nach einer 6-stündiger PHA-Stimulation die Bindung des Transkriptionsfaktors NF-YA an den OGG1-Promotor signifikant erhöht war. Diese Bindung wurde durch die Inhibierung von JNK wieder abgeschwächt (siehe Abbildung 4-32). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass nach PHA-Stimulation JNK für

die Bindung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B an den OGG1-Promotor notwendig ist und dies die Transkription von OGG1 bedingt.



**Abbildung 5-1** Möglicher Regulationsmechanismus für OGG1 nach PHA-Stimulation in humanen Lymphozyten

In Abbildung 5-1 ist ein möglicher Mechanismus für die transkriptionelle Regulation von OGG1 nach PHA-Stimulation dargestellt. Die Stimulation über PHA erfolgt, wie dargestellt, über verschiedene Angriffspunkte (siehe hierzu auch 1.1.3). Die genaue Signaltransduktion bis zur Aktivierung von JNK ist bisher nicht bekannt. Es ist denkbar, dass dies ähnlich wie bei einer Antigen vermittelten Stimulation über die Aktivierung von Ras über den TZR/CD3-Komplex geschieht (siehe Abbildung 1-3). Die aktivierte, phosphorylierte Kinase JNK ist im weiteren Verlauf der Signaltransduktion verantwortlich für die Bindung von NF- $\kappa$ B an den OGG1-Promotor (Abbildung 5-1). Inwiefern JNK nicht nur die Bindung von NF- $\kappa$ B an den Promotor sondern auch dessen Aktivität beeinflusst (vergleiche hierzu TIWARI et al. 2012), wurde bisher nicht untersucht.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse eine deutliche Abhängigkeit des PHA-Signals in Bezug auf die OGG1 Expression von JNK. Die CHIP-Experimente identifizieren NF-YA als einen Transkriptionsfaktor, welcher in Abhängigkeit von JNK während der PHA-Stimulation vermehrt am OGG1-Promotor gebunden wird. Ob NF-YA der einzige verantwortliche Transkriptionsfaktor ist und ob ERK einen additiven oder unabhängigen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von OGG1 hat, kann letztendlich noch nicht beantwortet werden.

## **5.5 Gibt es weitere DNA-Reparaturwege, die Unterschiede in primären und PHA-stimulierten Lymphozyten aufweisen?**

Neben der Untersuchung der Bedeutung einer Aktivierung von Lymphozyten mittels PHA für die Reparatur oxidativer DNA-Schäden wurde zusätzlich ein Einfluss auf die Reparatur von Einzelstrangbrüchen sowie die Nukleotidexzisionsreparatur überprüft.

In dieser Arbeit wurde die Reparatur von durch Wasserstoffperoxid induzierten Einzelstrangbrüchen untersucht. Es konnte ein deutlicher Unterschied zwischen primären und PHA-stimulierten Lymphozyten detektiert werden. PHA-stimulierte Lymphozyten reparierten die induzierten Einzelstrangbrüche innerhalb von 60 Minuten fast komplett (siehe Abbildung 4-34). Die Halbwertszeit lag bei etwa 15 Minuten. Im Vergleich dazu konnten die primären Lymphozyten innerhalb der betrachteten 60 Minuten nur 40 % der induzierten Einzelstrangbrüche reparieren. Somit induziert eine PHA-Stimulation ebenfalls die Reparatur von Einzelstrangbrüchen. Während oxidative DNA-Schäden in primären Lymphozyten überhaupt nicht repariert werden, zeigen die Ergebnisse, dass Einzelstrangbrüche zumindest teilweise repariert werden. Einzelstrangbrüche können ohne Reparatur in Doppelstrangbrüche umgewandelt werden, die ein hohes zytotoxisches Potential haben. Daher scheint die Reparatur von Einzelstrangbrüchen von größerer Bedeutung zu sein als die von oxidativen Basenmodifikationen. In der Literatur sind für die Reparatur von Einzelstrangbrüchen in Lymphozyten widersprüchliche Daten zu finden. So konnten Lavin und Boerrigter eine schnellere Reparatur von durch  $\gamma$ -Strahlung induzierten Einzelstrangbrüchen in PHA-stimulierten Lymphozyten zeigen (LAVIN & KIDSON 1977; BOERRIGTER & VIJG 1992), während Mayer keinen Unterschied zwischen primären und PHA-stimulierten Lymphozyten detektieren konnte (MAYER et al. 2002). In Anbetracht der Modulation der Reparatur oxidativer DNA-Schäden ist auch eine beschleunigte Reparatur von Einzelstrangbrüchen nach PHA-Stimulation plausibel.

Bezüglich der Nukleotidexzisionsreparatur konnte in dieser Arbeit ebenfalls ein deutlicher Unterschied zwischen primären und PHA-stimulierten Lymphozyten gezeigt werden. Dazu wurden primäre und PHA-stimulierte Lymphozyten mit UV-B bestrahlt und die Entfernung induzierter CPDs mittels Alkalischer Elution unter Zuhilfenahme der Reparaturenendonuklease T4EndoV quantifiziert. Innerhalb der betrachteten 24 Stunden ist fast keine Abnahme der CPDs in primären Lymphozyten, vergleichbar mit der Reparatur von oxidativen DNA-Schäden, detektierbar gewesen. Ein Restschaden von 86,8 % + 8,4 % wurde nach 24 Stunden gemessen. Im Vergleich dazu zeigten die PHA-stimulierten Lymphozyten eine signifikante Erniedrigung der CPD-Level. Dies bestätigt die Daten von (FREEMAN & RYAN 1988; GENTER et al. 1984), die ebenfalls eine beschleunigte Reparatur nach PHA-Stimulation fanden.

Die Nukleotidexzisionsreparatur teilt sich in zwei Hauptwege: die globale (GGR) sowie die transkriptionsgekoppelte (TCR) NER (siehe hierzu detailliert 1.5.3). Enddifferenzierte Zellen haben eine verminderte GGR (NOUSPIKEL 2007). Wie unter 5.2 schon dargelegt, wird davon ausgegangen dass eine DNA-Reparatur hier nur in aktiven Genen stattfindet. Diese ist im transkribierten Strang (TS) effektiver als im nicht transkribierten Strang (NTS) da hier eine Reparatur über TCR und DAR (*transcription domain-associated repair*) stattfindet, während im NTS nur über DAR repariert wird (NOUSPIKEL et al. 2006). Hyka-Nouspikel et al konnten für B-Lymphozyten bereits zeigen, dass eine Aktivierung die Reparatur von CPDs über die globale NER (GGR) ermöglicht, während in primären unstimulierten B-Lymphozyten nur eine Reparatur in konstitutiv exprimierten Genen, also transkriptionsabhängig, stattfindet (HYKA-NOUSPIKEL et al. 2011). Diese Daten bestätigen die gemessene schnellere Reparatur für PHA-stimulierte T-Lymphozyten. Wie bei der Untersuchung der oxidativen DNA-Schäden muss für die eingesetzte Methode, die Alkalische Elution, wiederum eingeräumt werden, dass eine transkriptionsabhängige Reparatur, die in primären Lymphozyten nur in aktiven Genen stattfindet, wahrscheinlich nicht erfasst werden kann. Die Ergebnisse, die mit Hilfe der Alkalischen Elution erzielt wurden, zeigen eine eingeschränkte globale NER in primären Lymphozyten. Durch PHA-Stimulation der Lymphozyten wird diese aber wieder hergestellt. Inwiefern die TCR beeinflusst ist, kann aus diesen Ergebnissen nicht abgeleitet werden.

Insgesamt konnte für drei unterschiedliche Reparaturwege gezeigt werden, dass primäre Lymphozyten eine deutlich geringe Reparaturkapazität aufweisen als nach einer 72-stündigen PHA-Stimulation. Interessanterweise wurde sogar kaum eine Reparatur oxidativer Basenmodifikationen sowie CPDs innerhalb der betrachteten 24 Stunden in primären Lymphozyten detektiert. Nur eine Abnahme induzierter Einzelstrangbrüche (durch Wasserstoffperoxid) war in primären Lymphozyten detektierbar. Diese war dennoch im Vergleich zu PHA-stimulierten Lymphozyten

deutlich langsamer. Für die Basenexzisionsreparatur (BER) konnte gezeigt werden, dass eine transkriptionelle Regulation von OGG1 über JNK mechanistisch für eine gesteigerte Reparatur oxidativer DNA-Schäden nach PHA-Stimulation verantwortlich gemacht werden kann. Inwieweit auch andere Reparaturenzyme, welche für die Reparatur von Einzelstrangbrüchen oder CPDs verantwortlich sind, ebenfalls wie für OGG1 gezeigt über eine PHA-Stimulation reguliert werden, bleibt zu untersuchen.

## 6 Zusammenfassung

Oxidative DNA-Schäden werden kontinuierlich in allen Zellen durch endogene und exogene Noxen gebildet. Ohne eine effektive Reparatur können DNA-Schäden nach erfolgter Replikation als Mutationen fixiert werden und somit die Kanzerogenese initiieren. 7,8-Dihydro-8-oxoguanin (8-oxoG) ist die wohl am häufigsten gebildete oxidative DNA-Basenmodifikation mit einem hohen mutagenen Potential. Die Reparatur von 8-oxoG wird durch OGG1 (7,8-Dihydro-8-oxoguanin-DNA-Glykosylase) initiiert.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Reparatur, vorrangig von oxidativen DNA-Schäden, in humanen Lymphozyten. Dabei sollte auch überprüft werden, inwiefern eine Aktivierung dieser Immunzellen, die u.a. zu einer Initiierung der Proliferation führt, modulierend auf die DNA-Reparatur wirkt. Für diese Untersuchungen wurden primäre Lymphozyten aus Buffy Coats der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz eingesetzt. Eine Aktivierung von T-Lymphozyten, welche physiologisch Antigen-vermittelt über den T-Zell-Rezeptor verläuft, wurde durch eine *ex vivo* Stimulation mit Phytohämagglutinin (PHA) nachgeahmt. Die Induktion oxidativer DNA-Schäden erfolgte mit Hilfe des Photosensibilisators Acridinorange in Kombination mit sichtbarem Licht. Das Schadensausmaß sowie die Reparatur wurden mittels der Alkalischen Elution unter Nutzung der Reparaturoendonuklease Fpg bestimmt.

Die Ergebnisse zeigen, dass global keine Reparatur induzierter oxidativer DNA-Schäden in primären Lymphozyten stattfindet. Eine Aktivierung der Lymphozyten mittels PHA führt hingegen zu einer deutlichen Reduktion der induzierten DNA-Schäden auf ca. 50 % des induzierten Schadens nach 24-stündiger Reparaturzeit. Weiterführende mechanistische Untersuchungen zeigten, dass die Aktivierung mittels PHA zu einer direkten Modulation der DNA-Reparatur führt. Die verbesserte Reparatur konnte auf eine Steigerung der Transkription und somit eine erhöhte Proteinmenge von OGG1, der initiierenden Reparaturoendonuklease von 8-oxoG, zurückgeführt werden. Die Initiierung der Transkription und Translation von OGG1 über PHA konnte durch Inhibierung der c-Jun Kinase (JNK) reduziert werden. Dies deutet darauf hin, dass eine Aktivierung der JNK-Signalkaskade als Mechanismus für die transkriptionelle Regulation von OGG1 unter den Bedingungen einer PHA-Stimulation zugrunde liegt. Als ein verantwortlicher Transkriptionsfaktor konnte NF-

YA identifiziert werden. Dessen erhöhte Bindung am OGG1-Promotor in Folge einer PHA-Stimulation durch eine JNK-Hemmung reduziert werden konnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Aktivierung von Lymphozyten, welche die Proliferation initiiert, die wiederum mit dem Risiko für die Entstehung von Mutationen und malignen Entartungen verknüpft ist, gleichzeitig aber auch über eine transkriptionelle Hochregulation von OGG1 die Reparatur oxidativer DNA-Schäden sicherstellt. Es konnte ebenfalls in dieser Arbeit gezeigt werden, dass auch die Reparatur von Einzelstrangbrüchen und Cyclobutanpyrimidin-Dimeren nach einer Aktivierung beschleunigt ist. Die Fähigkeit zur Modulation der DNA-Reparatur unter den gezeigten Bedingungen bietet den proliferierenden Zellen einen Schutzmechanismus zur Erhaltung ihrer genomischen Stabilität. Die genaue Signaltransduktion, welche zu einer Hochregulation der DNA-Reparatur führt, sowie ein Einfluss auf weitere DNA-Reparatur-Proteine bleibt zu untersuchen.



## 7 Literaturverzeichnis

- ABURATANI, H., HIPPO, Y., ISHIDA, T., TAKASHIMA, R., MATSUBA, C., KODAMA, T., TAKAO, M., YASUI, A., YAMAMOTO, K. & ASANO, M. (1997): Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue. *Cancer Res.* 57 (11), 2151-2156
- AHEL, I., RASS, U., EL-KHAMISY, S.F., KATYAL, S., CLEMENTS, P.M., MCKINNON, P.J., CALDECOTT, K.W. & WEST, S.C. (2006): The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature* 443 (7112), 713-716
- AKBARI, M., PEÑA-DÍAZ, J., ANDERSEN, S., LIABAKK, N.-B., OTTERLEI, M. & KROKAN, H.E. (2009): Extracts of proliferating and non-proliferating human cells display different base excision pathways and repair fidelity. 11. *DNA Repair* 8 (7), 834-843
- ALLGAYER, J., KITSER, N., LIPPEN, C. VON DER, EPE, B. & KHOBT, A. (2013): Modulation of base excision repair of 8-oxoguanine by the nucleotide sequence. *Nucleic Acids Res.* 41 (18): 8559-8571
- AL-TASSAN, N., CHMIEL, N.H., MAYNARD, J., FLEMING, N., LIVINGSTON, A.L., WILLIAMS, G.T., HODGES, A.K., DAVIES, D.R., DAVID, S.S., SAMPSON, J.R. & CHEADLE, J.P. (2002): Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors. *Nat. Genet.* 30 (2), 227-232
- AMES, B.N. & GOLD, L.S. (2000): Paracelsus to parascience: the environmental cancer distraction. *Mutat. Res.* 447 (1), 3-13
- AMOUROUX, R., CAMPALANS, A., EPE, B. & RADICELLA, J.P. (2010): Oxidative stress triggers the preferential assembly of base excision repair complexes on open chromatin regions. *Nucleic Acids Res.* 38 (9), 2878-2890
- APPLEGATE, L.A., LUSCHER, P. & TYRRELL, R.M. (1991): Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. *Cancer Res.* 51 (3), 974-978
- ARAKI, M., MASUTANI, C., TAKEMURA, M., UCHIDA, A., SUGASAWA, K., KONDOH, J., OHKUMA, Y. & HANAOKA, F. (2001): Centrosome protein centrin 2/caltractin 1 is part of the xeroderma pigmentosum group C complex that initiates global genome nucleotide excision repair. *J. Biol. Chem.* 276 (22), 18665-18672

- ASTLEY, S.B., ELLIOTT, R.M., ARCHER, D.B. & SOUTHON, S. (2004):** Evidence that dietary supplementation with carotenoids and carotenoid-rich foods modulates the DNA damage: repair balance in human lymphocytes. *Br J Nutr* 91 (1), 63-72
- BALLMAIER, D. (1997):** Oxidative DNA-Modifikationen durch extrazellulär und intrazellulär gebildete reaktive Sauerstoffspezies. Dissertation, Würzburg
- BARNES, D.E. & LINDAHL, T. (2004):** Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Annu. Rev. Genet.* 38, 445-476
- BENKE, P.J., DRISKO, J. & AHMAD, P. (1991):** Increased oxidative metabolism in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus is associated with serum SSA antibody. *Biochem. Med. Metab. Biol.* 45 (1), 28-40
- BERCHT, M., FLOHR-BECKHAUS, C., OSTEROD, M., RÜNGER, T.M., RADICELLA, J.P. & EPE, B. (2007):** Is the repair of oxidative DNA base modifications inducible by a preceding DNA damage induction? *DNA Repair (Amst.)* 6 (3), 367-373
- BERNSTEIN, C. & BERNSTEIN, H. (2006):** Aging and Sex, DNA Repair in. In: MEYERS, R. A. (Hrsg.): Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany
- BEVERLEY, P.C., DASER, A., MICHIE, C.A. & WALLACE, D.L. (1992):** Functional subsets of T cells defined by isoforms of CD45. *Biochem Soc Trans* 20 (1), 184-187
- BJELLAND, S. & SEEBERG, E. (2003):** Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat. Res.* 531 (1-2), 37-80
- BJORÅS, M., LUNA, L., JOHNSEN, B., HOFF, E., HAUG, T., ROGNES, T. & 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
- BOERRIGTER, M.E. & VIJG, J. (1992):** Single-strand break disappearance in quiescent and phytohaemagglutinin-stimulated human peripheral blood lymphocytes exposed to a single low dose of gamma-radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 61 (1), 95-101
- BOITEUX, S., O'CONNOR, T.R. & LAVAL, J. (1987):** Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli*: cloning and sequencing of the *fpg* structural gene and overproduction of the protein. *EMBO J.* 6 (10), 3177-3183
- BOITEUX, S., O'CONNOR, T.R., LEDERER, F., GOUYETTE, A. & 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

**BRADFORD, M.M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254

**BRAVARD, A., VACHER, M., MORITZ, E., VASLIN, L., HALL, J., EPE, B. & RADICELLA, J.P. (2009):** Oxidation status of human OGG1-S326C polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity. *Cancer Res.* 69 (8), 3642-3649

**BREVIK, A., GAIVÃO, I., MEDIN, T., JØRGENSEN, A., PIASEK, A., ELILASSON, J., KARLSEN, A., BLOMHOFF, R., VEGGAN, T., DUTTARROY, A.K. & COLLINS, A.R. (2011):** Supplementation of a western diet with golden kiwifruits (*Actinidia chinensis* var. 'Hort 16A') effects on biomarkers of oxidation damage and antioxidant protection. *Nutr J* 10, 54

**BRIVIBA, K., BUB, A., MÖSENER, J., SCHWERDTLE, T., HARTWIG, A., KULLING, S. & WATZL, B. (2008):** No differences in DNA damage and antioxidant capacity between intervention groups of healthy, nonsmoking men receiving 2, 5, or 8 servings/day of vegetables and fruit. *Nutr Cancer* 60 (2), 164-170

**BROSH, R.M. & BOHR, V.A. (2007):** Human premature aging, DNA repair and RecQ helicases. *Nucleic Acids Res.* 35 (22), 7527-7544

**BROWN, M.H., CANTRELL, D.A., BRATTSAND, G., CRUMPTON, M.J. & GULLBERG, M. (1989):** The CD2 antigen associates with the T-cell antigen receptor CD3 antigen complex on the surface of human T lymphocytes. *Nature* 339 (6225), 551-553

**BRYANT, H.E., SCHULTZ, N., THOMAS, H.D., PARKER, K.M., FLOWER, D., LOPEZ, E., KYLE, S., MEUTH, M., CURTIN, N.J. & HELLEDAY, T. (2005):** Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature* 434 (7035), 913-917

**CALDECOTT, K.W. (2001):** Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. *Bioessays* 23 (5), 447-455

**CALDECOTT, K.W. (2003):** XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst.)* 2 (9), 955-969

**CAPLE, F., WILLIAMS, E.A., SPIERS, A., TYSON, J., BURTLE, B., DALY, A.K., MATHERS, J.C. & HESKETH, J.E. (2010):** Inter-individual variation in DNA damage and base excision repair in young, healthy non-smokers: effects of dietary supplementation and genotype. *Br J Nutr* 103 (11), 1585-1593

**CHANG, W.K., YANG, K.D. & SHAIQ, M.F. (1999):** Lymphocyte proliferation modulated by glutamine: involved in the endogenous redox reaction. *Clin. Exp. Immunol.* 117 (3), 482-488

**CHILSON, O.P. & KELLY-CHILSON, A.E. (1989):** Mitogenic lectins bind to the antigen receptor on human lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 19 (2), 389-396

**CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. (2006):** The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc* 1 (2), 581-585

**COLLINS, A.R., DUSINSKÁ, M., HORVÁTHOVÁ, E., MUNRO, E., SAVIO, M. & STĚTINA, R. (2001):** Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured in vitro with the comet assay. *Mutagenesis* 16 (4), 297-301

**COLLINS, A.R. & GAIVÃO, I. (2007):** DNA base excision repair as a biomarker in molecular epidemiology studies. *Mol. Aspects Med.* 28 (3-4), 307-322

**COLLINS, A.R., GEDIK, C.M., OLMEDILLA, B., SOUTHON, S. & BELLIZZI, M. (1998):** Oxidative DNA damage measured in human lymphocytes: large differences between sexes and between countries, and correlations with heart disease mortality rates. *FASEB J.* 12 (13), 1397-1400

**COOPER, P.K. & LEADON, S.A. (1994):** Defective repair of ionizing radiation damage in Cockayne's syndrome and xeroderma pigmentosum group G. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 726, 330-332

**DANIELS, D.S., WOO, T.T., LUU, K.X., NOLL, D.M., CLARKE, N.D., PEGG, A.E. & TAINER, J.A. (2004):** DNA binding and nucleotide flipping by the human DNA repair protein AGT. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 (8), 714-720

**DARZYNKIEWICZ, Z., KRASSOWSKI, T. & SKOPIŃSKA, E. (1965):** Effect of phytohemagglutinin on synthesis of "rapidly-labelled" ribonucleic acid in human lymphocytes. *Nature* 207 (5004), 1402-1403

**DARZYNKIEWICZ, Z., STAIANO-COICO, L. & MELAMED, M.R. (1981):** Increased mitochondrial uptake of rhodamine 123 during lymphocyte stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78 (4), 2383-2387

**DARZYNKIEWICZ, Z., TRAGANOS, F., SHARPLESS, T. & MELAMED, M.R. (1976):** Lymphocyte stimulation: a rapid multiparameter analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73 (8), 2881-2884

**DAVID, S.S., O'SHEA, V.L. & KUNDU, S. (2007):** Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* 447 (7147), 941-950

**DEMPLE, B. & HARRISON, L. (1994):** Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu. Rev. Biochem.* 63, 915-948

**DHÉNAUT, A., BOITEUX, S. & RADICELLA, J.P. (2000):** Characterization of the hOGG1 promoter and its expression during the cell cycle. *Mutat. Res.* 461 (2), 109-118

**DIANOV, G.L. & HÜBSCHER, U. (2013):** Mammalian Base Excision Repair: the Forgotten Archangel. *Nucleic Acids Res.*

**DIZDAROGLU, M. (1992):** Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat. Res.* 275 (3-6), 331-342

**DUNCAN, T., TREWICK, S.C., KOIVISTO, P., BATES, P.A., LINDAHL, T. & SEDGWICK, B. (2002):** Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99 (26), 16660-16665

**DWYER, J.M., JOHNSON, C. & DESAULES, M. (1979):** Behaviour of human immunoregulatory cells in culture. I. Variables requiring consideration for clinical studies. *Clin. Exp. Immunol.* 38 (3), 499-513

**EL-ZEIN, R.A., MONROY, C.M., CORTES, A., SPITZ, M.R., GREISINGER, A. & ETZEL, C.J. (2010):** Rapid method for determination of DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes amongst smokers. *BMC Cancer* 10, 439

**EPE, B. (1991):** Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem. Biol. Interact.* 80 (3), 239-260

**EPE, B. (1996):** DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 127, 223-249

**EPE, B. (2002):** Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice? *Biol Chem* 383 (3-4), 467-475

**EPE, B. & HEGLER, J. (1994):** [12] Oxidative DNA damage: Endonuclea

e fingerprinting. In: EPE, B. & J. HEGLER (Hrsg.): Oxygen Radicals in Biological Systems Part D, 122-131. Elsevier

**EPE, B., MÜTZEL, P. & ADAM, W. (1988):** DNA damage by oxygen radicals and excited state species: a comparative study using enzymatic probes in vitro. *Chem. Biol. Interact.* 67 (1-2), 149-165

**EPE, B., PFLAUM, M. & BOITEUX, S. (1993a):** DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems. *Mutat. Res.* 299 (3-4), 135-145

**EPE, B., PFLAUM, M., HÄRING, M., HEGLER, J. & RÜDIGER, H. (1993b):** 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

ESSEN, L.O. & KLAR, T. (2006): *Light-driven DNA repair by photolyases*. Cell. Mol. Life Sci. 63 (11), 1266-1277

FARMER, H., MCCABE, N., LORD, C.J., TUTT, A.N.J., JOHNSON, D.A., RICHARDSON, T.B., SANTAROSA, M., DILLON, K.J., HICKSON, I., KNIGHTS, C., MARTIN, N.M.B., JACKSON, S.P., SMITH, G.C.M. & ASHWORTH, A. (2005): *Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy*. Nature 434 (7035), 917-921

FILLION, L., COLLINS, A. & SOUTHON, S. (1998): *Beta-carotene enhances the recovery of lymphocytes from oxidative DNA damage*. Acta Biochim. Pol. 45 (1), 183-190

FREEMAN, S.E. & RYAN, S.L. (1988): *Excision repair of pyrimidine dimers in human peripheral blood lymphocytes: comparison between mitogen stimulated and unstimulated cells*. Mutat. Res. 194 (2), 143-150

FRIDOVICH, I. (1995): *Superoxide radical and superoxide dismutases*. Annu. Rev. Biochem. 64, 97-112

FROSINA, G., FORTINI, P., ROSSI, O., CARROZZINO, F., RASPAGLIO, G., COX, L.S., LANE, D.P., ABBONDANDOLO, A. & DOGLIOTTI, E. (1996): *Two pathways for base excision repair in mammalian cells*. J. Biol. Chem. 271 (16), 9573-9578

FUSSER, M., NESSE, G.J., KHOBT, A., XIA, N., LI, H., KLUNGLAND, A. & EPE, B. (2011): *Spontaneous mutagenesis in *Csb(m/m)Ogg1(-/-)* mice is attenuated by dietary resveratrol*. Carcinogenesis 32 (1), 80-85

GALIATSATOS, P. & FOULKES, W.D. (2006): *Familial adenomatous polyposis*. Am. J. Gastroenterol. 101 (2), 385-398

GALLÉ, K., FUSSER, M., LIEBL, M., CLEMENT ALBRECHT M. & 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

GENTER, E.I., ZHESTIANIKOV, V.D., MIKHEL'SON, V.M. & PROKOF'EVA, V.V. (1984): *DNA repair in the UV irradiation of human peripheral blood lymphocytes (healthy donors and xeroderma pigmentosum patients) in relation to the dedifferentiation process in phytohemagglutinin exposure*. Tsitologija 26 (5), 599-604

GILL, C.I.R., HALDAR, S., BOYD, L.A., BENNETT, R., WHITEFORD, J., BUTLER, M., PEARSON, J.R., BRADBURY, I. & ROWLAND, I.R. (2007): *Watercress supplementation in diet reduces lymphocyte DNA damage and alters blood antioxidant status in healthy adults*. Am. J. Clin. Nutr. 85 (2), 504-510

- GUO, J., HANAWALT, P.C. & SPIVAK, G. (2013):** Comet-FISH with strand-specific probes reveals transcription-coupled repair of 8-oxoGuanine in human cells. *Nucleic Acids Res*
- HABIB, S.L. (2009):** Molecular mechanism of regulation of OGG1: tuberin deficiency results in cytoplasmic redistribution of transcriptional factor NF-YA. *J Mol Signal* 4, 8
- HABIB, S.L., BHANDARI, B.K., SADEK, N., ABOUD-WERNER, S.L. & ABOUD, H.E. (2010):** Novel mechanism of regulation of the DNA repair enzyme OGG1 in tuberin-deficient cells. *Carcinogenesis* 31 (11), 2022-2030
- HABIB, S.L., RILEY, D.J., MAHIMAINATHAN, L., BHANDARI, B., CHOUDHURY, G.G. & ABOUD, H.E. (2008):** Tuberin regulates the DNA repair enzyme OGG1. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 294 (1), F281-90
- HALLIWELL, B. (1989):** Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med* 82 (12), 747-752
- HALLIWELL, B. (1996):** Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 24 (4), 1023-1027
- HALLIWELL, B. & ARUOMA, O.I. (1991):** DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* 281 (1-2), 9-19
- HAMASAKI, K., IMAI, K., NAKACHI, K., TAKAHASHI, N., KODAMA, Y. & KUSUNOKI, Y. (2007):** Short-term culture and gammaH2AX flow cytometry determine differences in individual radiosensitivity in human peripheral T lymphocytes. *Environ. Mol. Mutagen.* 48 (1), 38-47
- HANAWALT, P.C. (2002):** Subpathways of nucleotide excision repair and their regulation. *Oncogene* 21 (58), 8949-8956
- HANAWALT, P.C. & SPIVAK, G. (2008):** Transcription-coupled DNA repair: two decades of progress and surprises. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 (12), 958-970
- HARTMANN, A., PLAPPERT, U., RADDATZ, K., GRÜNERT-FUCHS, M. & SPEIT, G. (1994):** Does physical activity induce DNA damage? *Mutagenesis* 9 (3), 269-272
- HASHIGUCHI, K., STUART, J.A., SOUZA-PINTO, N.C. DE & BOHR, V.A. (2004):** The C-terminal alphaO helix of human Ogg1 is essential for 8-oxoguanine DNA glycosylase activity: the mitochondrial beta-Ogg1 lacks this domain and does not have glycosylase activity. *Nucleic Acids Res.* 32 (18), 5596-5608
- HELLEDAY, T., PETERMANN, E., LUNDIN, C., HODGSON, B. & SHARMA, R.A. (2008):** DNA repair pathways as targets for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 8 (3), 193-204

- HIRSCHHORN, R., DECSY, M.I. & TROLL, W. (1971):** *The effect of PHA stimulation of human peripheral blood lymphocytes upon cellular content of euchromatin and heterochromatin.* Cell. Immunol. 2 (6), 696-701
- HOEIJMAKERS, J.H. (2001):** *Genome maintenance mechanisms for preventing cancer.* Nature 411 (6835), 366-374
- HOELZL, C., GLATT, H., MEINL, W., SONTAG, G., HAIDINGER, G., KUNDI, M., SIMIC, T., CHAKRABORTY, A., BICHLER, J., FERK, F., ANGELIS, K., NERSESYAN, A. & KNASMÜLLER, S. (2008):** *Consumption of Brussels sprouts protects peripheral human lymphocytes against 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and oxidative DNA-damage: results of a controlled human intervention trial.* Mol Nutr Food Res 52 (3), 330-341
- HOLMGREN, A. & LU, J. (2010):** *Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 396 (1), 120-124
- HOMBURG, M.I. (2001):** *Einfluß von Ernährung und Umweltfaktoren auf oxidative DNA-Schäden.* Dissertation, Mainz
- HUANG, S., LI, B., GRAY, M.D., OSHIMA, J., MIAN, I.S. & CAMPISI, J. (1998):** *The premature ageing syndrome protein, WRN, is a 3'→5' exonuclease.* Nat. Genet. 20 (2), 114-116
- HUGGETT, J., DHEDA, K., BUSTIN, S. & ZUMLA, A. (2005):** *Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations.* Genes Immun. 6 (4), 279-284
- HYKA-NOUSPIKEL, N., LEMONIDIS, K., LU, W.-T. & NOUSPIKEL, T. (2011):** *Circulating human B lymphocytes are deficient in nucleotide excision repair and accumulate mutations upon proliferation.* Blood 117 (23), 6277-6286
- JEPPESEN, D.K., BOHR, V.A. & STEVNSNER, T. (2011):** *DNA repair deficiency in neurodegeneration.* Prog. Neurobiol. 94 (2), 166-200
- JEZOWSKA-BOJCZUK, M., SZCZEPANIK, W., LEŚNIAK, W., CIESIOŁKA, J., WRZESIŃSKI, J. & BAL, W. (2002):** *DNA and RNA damage by Cu(II)-amikacin complex.* Eur. J. Biochem. 269 (22), 5547-5556
- KARAHALIL, B., BOHR, V. & WILSON, D. (2012):** *Impact of DNA polymorphisms in key DNA base excision repair proteins on cancer risk.* Human & Experimental Toxicology 31 (10), 981-1005



**KATHE, S.D. (2004):** *Single-Stranded Breaks in DNA but Not Oxidative DNA Base Damages Block Transcriptional Elongation by RNA Polymerase II in HeLa Cell Nuclear Extracts.* Journal of Biological Chemistry 279 (18), 18511-18520

**KAVANAGH, T.J., GROSSMANN, A., JAECKS, E.P., JINNEMAN, J.C., EATON, D.L., MARTIN, G.M. & RABINOVITCH, P.S. (1990):** *Proliferative capacity of human peripheral blood lymphocytes sorted on the basis of glutathione content.* J. Cell. Physiol. 145 (3), 472-480

**KERSH, E.N., SHAW, A.S. & ALLEN, P.M. (1998):** *Fidelity of T cell activation through multistep T cell receptor zeta phosphorylation.* Science 281 (5376), 572-575

**KEUSER, B., KHOBTA, A., GALLÉ, K., ANDERHUB, S., SCHULZ, I., PAULY, K. & EPE, B. (2013):** *Influences of histone deacetylase inhibitors and resveratrol on DNA repair and chromatin compaction.* Mutagenesis 28 (5), 569-576

**KHANNA, K.K. & JACKSON, S.P. (2001):** *DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection.* Nat. Genet. 27 (3), 247-254

**KIM, J.K., PATEL, D. & CHOI, B.S. (1995):** *Contrasting structural impacts induced by cis-syn cyclobutane dimer and (6-4) adduct in DNA duplex decamers: implication in mutagenesis and repair activity.* Photochem. Photobiol. 62 (1), 44-50

**KITSERÁ, N., STATHIS, D., LÜHNSDORF, B., MÜLLER, H., CARELL, T., EPE, B. & KHOBTA, A. (2011):** *8-Oxo-7,8-dihydroguanine in DNA does not constitute a barrier to transcription, but is converted into transcription-blocking damage by OGG1.* Nucleic Acids Res. 39 (14), 5926-5934

**KLUNGLAND, A. (1997):** *Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1).* The EMBO Journal 16 (11), 3341-3348

**KLUNGLAND, A., ROSEWELL, I., HOLLENBACH, S., LARSEN, E., DALY, G., EPE, B., SEEBERG, E., LINDAHL, T. & BARNES, D.E. (1999):** *Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96 (23), 13300-13305

**KOHN, K.W., ERICKSON, L.C., EWIG, R.A. & FRIEDMAN, C.A. (1976):** *Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution.* Biochemistry 15 (21), 4629-4637

**KRAJCOVICOVÁ-KUDLÁCKOVÁ, M., VALACHOVICOVÁ, M., PAUKOVÁ, V. & DUSINSKÁ, M. (2008):** *Effects of diet and age on oxidative damage products in healthy subjects.* Physiol Res 57 (4), 647-651

**KUNZ, C., SAITO, Y. & SCHÄR, P. (2009):** DNA Repair in mammalian cells: Mismatched repair: variations on a theme. *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (6), 1021-1038

**KURAOKA, I., ENDOU, M., YAMAGUCHI, Y., WADA, T., HANDA, H. & TANAKA, K. (2003):** Effects of endogenous DNA base lesions on transcription elongation by mammalian RNA polymerase II. Implications for transcription-coupled DNA repair and transcriptional mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 278 (9), 7294-7299

**LAINÉ, J.-P. & EGLY, J.-M. (2006):** Initiation of DNA repair mediated by a stalled RNA polymerase II. *EMBO J.* 25 (2), 387-397

**LARSEN, E., KWON, K., COIN, F., EGLY, J.-M. & KLUNGLAND, A. (2004):** Transcription activities at 8-oxoG lesions in DNA. *DNA Repair* 3 (11), 1457-1468

**LAVIN, M.F. & KIDSON, C. (1977):** Repair of ionizing radiation induced DNA damage in human lymphocytes. *Nucleic Acids Res.* 4 (11), 4015-4022

**LEE, M.-R., KIM, S.-H., CHO, H.-J., LEE, K.-Y., MOON, A.R., JEONG, H.G., LEE, J.-S., HYUN, J.-W., CHUNG, M.-H. & YOU, H.J. (2004):** Transcription factors NF-YA regulate the induction of human OGG1 following DNA-alkylating agent methylmethane sulfonate (MMS) treatment. *J. Biol. Chem.* 279 (11), 9857-9866

**LEPPARD, J.B., DONG, Z., MACKEY, Z.B. & TOMKINSON, A.E. (2003):** Physical and functional interaction between DNA ligase III $\alpha$  and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol. Cell. Biol.* 23 (16), 5919-5927

**LINDAHL, T. (1993):** Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362 (6422), 709-715

**LINGG, T. (2009):** Mechanistische Untersuchungen zur Inaktivierung der Genexpression durch DNA-Einzelstrangbrüche. Diplomarbeit, Mainz

**LIPPKE, J.A., GORDON, L.K., BRASH, D.E. & HASELTINE, W.A. (1981):** Distribution of UV light-induced damage in a defined sequence of human DNA: detection of alkaline-sensitive lesions at pyrimidine nucleoside-cytidine sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78 (6), 3388-3392

**LOEB, L.A., LOEB, K.R. & ANDERSON, J.P. (2003):** Multiple mutations and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (3), 776-781

**LU, R., NASH, H.M. & VERDINE, G.L. (1997):** A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer. *Curr. Biol.* 7 (6), 397-407

- MARTIN-CHOULY, C., MORZADEC, C., BONVALET, M., GALIBERT, M.-D., FARDEL, O. & VERNHET, L. (2011):** *Inorganic arsenic alters expression of immune and stress response genes in activated primary human T lymphocytes.* Mol. Immunol. 48 (6-7), 956-965
- MARTI, T.M., KUNZ, C. & FLECK, O. (2002):** *DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways.* J. Cell. Physiol. 191 (1), 28-41
- MATSUMOTO, Y. & KIM, K. (1995):** *Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair.* Science 269 (5224), 699-702
- MAYER, C., POPANDA, O., ZELEZNY, O., BREVERN, M.-C. VON, BACH, A., BARTSCH, H. & SCHMEZER, P. (2002):** *DNA repair capacity after gamma-irradiation and expression profiles of DNA repair genes in resting and proliferating human peripheral blood lymphocytes.* DNA Repair (Amst.) 1 (3), 237-250
- MAZZEI, F., GUARRERA, S., ALLIONE, A., SIMONELLI, V., NARCISO, L., BARONE, F., MINOPRIO, A., RICCI, F., FUNARO, A., D'ERRICO, M., VOGEL, U., MATULLO, G. & DOGLIOTTI, E. (2011):** *8-Oxoguanine DNA-glycosylase repair activity and expression: A comparison between cryopreserved isolated lymphocytes and EBV-derived lymphoblastoid cell lines.* Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 718 (1-2), 62-67
- MCCULLOUGH, A.K., DODSON, M.L. & LLOYD, R.S. (1999):** *Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures.* Annu. Rev. Biochem. 68, 255-285
- MITCHELL, D.L., JEN, J. & CLEAVER, J.E. (1991):** *Relative induction of cyclobutane dimers and cytosine photohydrates in DNA irradiated in vitro and in vivo with ultraviolet-C and ultraviolet-B light.* Photochem. Photobiol. 54 (5), 741-746
- MOHANKUMAR, M.N., JANANI, S., PRABHU, B.K., KUMAR, P.R.V. & JEEVANRAM, R.K. (2002):** *DNA damage and integrity of UV-induced DNA repair in lymphocytes of smokers analysed by the comet assay.* Mutat. Res. 520 (1-2), 179-187
- MØLLER, P., LOFT, S., LUNDBY, C. & OLSEN, N.V. (2001):** *Acute hypoxia and hypoxic exercise induce DNA strand breaks and oxidative DNA damage in humans.* FASEB J. 15 (7), 1181-1186
- MORGAN, D.A., RUSCETTI, F.W. & GALLO, R. (1976):** *Selective in vitro growth of T lymphocytes from normal human bone marrows.* Science 193 (4257), 1007-1008
- MORIYA, M. (1993):** *Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C-T.A transversions in simian kidney cells.* Proc Natl Acad Sci U S A 90 (3), 1122-1126

**MOSER, J., KOOL, H., GIAKZIDIS, I., CALDECOTT, K., MULLENDERS, L.H.F. & FOUSTERI, M.I. (2007):** Sealing of chromosomal DNA nicks during nucleotide excision repair requires XRCC1 and DNA ligase III alpha in a cell-cycle-specific manner. *Mol. Cell* 27 (2), 311-323

**MURCIA, G. DE & MÉNISSIER DE MURCIA, J. (1994):** Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem. Sci.* 19 (4), 172-176

**NAKABEPPU, Y., YAMASHITA, K. & SEKIGUCHI, M. (1982):** Purification and characterization of normal and mutant forms of T4 endonuclease V. *J. Biol. Chem.* 257 (5), 2556-2562

**NASH, H.M., LU, R., LANE, W.S. & VERDINE, G.L. (1997a):** The critical active-site amine of the human 8-oxoguanine DNA glycosylase, hOgg1: direct identification, ablation and chemical reconstitution. *Chem. Biol.* 4 (9), 693-702

**NASH, R.A., CALDECOTT, K.W., BARNES, D.E. & LINDAHL, T. (1997b):** XRCC1 protein interacts with one of two distinct forms of DNA ligase III. *Biochemistry* 36 (17), 5207-5211

**NISHIOKA, K., OHTSUBO, T., ODA, H., FUJIWARA, T., KANG, D., SUGIMACHI, K. & NAKABEPPU, Y. (1999):** Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. *Mol. Biol. Cell* 10 (5), 1637-1652

**NOUSPIKEL, T. (2007):** DNA repair in differentiated cells: some new answers to old questions. *Neuroscience* 145 (4), 1213-1221

**NOUSPIKEL, T. (2009):** Nucleotide excision repair: variations on versatility. *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (6), 994-1009

**NOUSPIKEL, T.P., HYKA-NOUSPIKEL, N. & HANAWALT, P.C. (2006):** Transcription domain-associated repair in human cells. *Mol. Cell. Biol.* 26 (23), 8722-8730

**NOWELL, P.C. (1960):** Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 20, 462-466

**O'DRISCOLL, M. & JEGGO, P.A. (2006):** The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat. Rev. Genet.* 7 (1), 45-54

**O'SHAUGHNESSY, J., OSBORNE, C., PIPPEN, J.E., YOFFE, M., PATT, D., ROCHA, C., KOO, I.C., SHERMAN, B.M. & BRADLEY, C. (2011):** Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 364 (3), 205-214

**OSMAN, N., LEY, S.C. & CRUMPTON, M.J. (1992):** Evidence for an association between the T cell receptor/CD3 antigen complex and the CD5 antigen in human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 22 (11), 2995-3000

**OSTEROD, M., HOLLENBACH, S., HENGSTLER, J.G., BARNES, D.E., LINDAHL, T. & EPE, B. (2001):** Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1) deficient mice. *Carcinogenesis* 22 (9), 1459-1463

**OSTEROD, M., LARSEN, E., LE PAGE, F., HENGSTLER, J.G., VAN DER HORST, G.T.J., BOITEUX, S., KLUNGLAND, A. & EPE, B. (2002):** A global DNA repair mechanism involving the Cockayne syndrome B (CSB) gene product can prevent the *in vivo* accumulation of endogenous oxidative DNA base damage. *Oncogene* 21 (54), 8232-8239

**PARDO, B., GÓMEZ-GONZÁLEZ, B. & AGUILERA, A. (2009):** DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship. *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (6), 1039-1056

**PAZ-ELIZUR, T., ELINGER, D., LEITNER-DAGAN, Y., BLUMENSTEIN, S., KRUPSKY, M., BERREBI, A., SCHECHTMAN, E. & LIVNEH, Z. (2007):** Development of an enzymatic DNA repair assay for molecular epidemiology studies: distribution of OGG activity in healthy individuals. *DNA Repair (Amst)* 6 (1), 45-60

**PELTOMÄKI, P. (2003):** Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J. Clin. Oncol.* 21 (6), 1174-1179

**PETERMANN, E., ZIEGLER, M. & OEI, S.L. (2003):** ATP-dependent selection between single nucleotide and long patch base excision repair. *DNA Repair (Amst.)* 2 (10), 1101-1114

**PFLAUM, M. (1996):** Oxidative DNA-Modifikationen durch langwelliges UV-Licht und sichtbares Licht - Untersuchungen mit DNA-Reparaturenukleasen in Säugerzellen. Dissertation, Würzburg

**PFLAUM, M., WILL, O. & EPE, B. (1997):** Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis* 18 (11), 2225-2231

**PIAO, M.J., KIM, K.C., CHOI, J.-Y., CHOI, J. & HYUN, J.W. (2011):** Silver nanoparticles down-regulate Nrf2-mediated 8-oxoguanine DNA glycosylase 1 through inactivation of extracellular regulated kinase and protein kinase B in human Chang liver cells. *Toxicol. Lett.* 207 (2), 143-148

**PIERI, C., RECCHIONI, R., MORONI, F., MARCHESELLI, F. & DAMJANOVICH, S. (1992):** The response of human lymphocytes to phytohemagglutinin is impaired at different levels during aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 673, 110-119

**PODLUTSKY, A.J., DIANOVA, I.I., PODUST, V.N., BOHR, V.A. & DIANOV, G.L. (2001):** Human DNA polymerase beta initiates DNA synthesis during long-patch repair of reduced AP sites in DNA. *EMBO J.* 20 (6), 1477-1482

**POPANDA, O. & THIELMANN, H.W. (1992):** The function of DNA polymerases in DNA repair synthesis of ultraviolet-irradiated human fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta* 1129 (2), 155-160

**PRADO, R.P., DOS SANTOS, B.F., PINTO, C.L.D.S., ASSIS, K.R.C. DE, SALVADORI, D.M.F. & LADEIRA, M.S.P. (2010):** Influence of diet on oxidative DNA damage, uracil misincorporation and DNA repair capability. *Mutagenesis* 25 (5), 483-487

**RADICELLA, J.P., DHERIN, C., DESMAZE, C., FOX, M.S. & BOITEUX, S. (1997):** Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (15), 8010-8015

**RANSON, M., MIDDLETON, M.R., BRIDGEWATER, J., LEE, S.M., DAWSON, M., JOWLE, D., HALBERT, G., WALLER, S., MCGRATH, H., GUMBRELL, L., MCELHINNEY, R.S., DONNELLY, D., MCMURRY, T.B.H. & MARGISON, G.P. (2006):** Lomeguatrib, a potent inhibitor of O6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase: phase I safety, pharmacodynamic, and pharmacokinetic trial and evaluation in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* 12 (5), 1577-1584

**RAO, K.S. (2009):** Free radical induced oxidative damage to DNA: relation to brain aging and neurological disorders. *Indian J. Biochem. Biophys.* 46 (1), 9-15

**REDAELLI, A., MAGRASSI, R., BONASSI, S., ABBONDANDOLO, A. & FROSINA, G. (1998):** AP endonuclease activity in humans: development of a simple assay and analysis of ten normal individuals. *Teratog Carcinog Mutagen* 18 (1), 17-26

**RISOM, L., MOLLER, P., VOGEL, U., KRISTJANSEN, P.E.G. & LOFT, S. (2003):** X-ray-induced oxidative stress: DNA damage and gene expression of HO-1, ERCC1 and OGG1 in mouse lung. *Free Radic Res* 37 (9), 957-966

**ROBERTSON, A.B., KLUNGLAND, A., ROGNES, T. & LEIROS, I. (2009):** DNA Repair in Mammalian Cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (6), 981-993

**ROLDÁN-ARJONA, T., WEI, Y.F., CARTER, K.C., KLUNGLAND, A., ANSELMINO, C., WANG, R.P., AUGUSTUS, M. & LINDAHL, T. (1997):** Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94 (15), 8016-8020

**ROPOLO, M., DEGAN, P., FORESTA, M., D'ERRICO, M., LASIGLIÈ, D., DOGLIOTTI, E., CASARTELLI, G., ZUPO, S., POGGI, A. & FROSINA, G. (2007):** *Complementation of the oxidatively damaged DNA repair defect in Cockayne syndrome A and B cells by Escherichia coli formamidopyrimidine DNA glycosylase.* Free Radic. Biol. Med. 42 (12), 1807-1817

**ROSENQUIST, T.A., ZHARKOV, D.O. & GROLLMAN, A.P. (1997):** *Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 94 (14), 7429-7434

**RUSSO, M.T., LUCA, G. DE, DEGAN, P., PARLANTI, E., DOGLIOTTI, E., BARNES, D.E., LINDAHL, T., YANG, H., MILLER, J.H. & 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

**RUSTGI, A.K. (2007):** *The genetics of hereditary colon cancer.* Genes Dev. 21 (20), 2525-2538

**SALDITT, M., BRAUNSTEIN, S.N., CAMERINI-OTERO, R.D. & FRANKLIN, R.M. (1972):** *Structure and synthesis of a lipid-containing bacteriophage. X. Improved techniques for the purification of bacteriophage PM2.* Virology 48 (1), 259-262

**SALVINI, S., SERA, F., CARUSO, D., GIOVANNELLI, L., VISIOLI, F., SAIÉVA, C., MASALA, G., CEROTI, M., GIOVACCHINI, V., PITOZZI, V., GALLI, C., ROMANI, A., MULINACCI, N., BORTOLOMEAZZI, R., DOLARA, P. & PALLI, D. (2006):** *Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women.* Br. J. Nutr. 95 (4), 742-751

**SAMSON, L. (1992):** *The suicidal DNA repair methyltransferases of microbes.* Mol. Microbiol. 6 (7), 825-831

**SANCAR, A., LINDSEY-BOLTZ, L.A., ÜNSAL-KAÇMAZ, K. & LINN, S. (2004):** *MOLECULAR MECHANISMS OF MAMMALIAN DNA REPAIR AND THE DNA DAMAGE CHECKPOINTS.* Annu. Rev. Biochem. 73 (1), 39-85

**SANCAR, A. & RUPP, W.D. (1983):** *A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of Escherichia coli cuts a DNA strand on both sides of the damaged region.* Cell 33 (1), 249-260

**SANDERSON, B.J. & MORLEY, A.A. (1986):** *Mitogenic stimulation may induce an anti-mutagenic repair system in human lymphocytes.* Mutagenesis 1 (2), 131-133

**SARAN, M. & BORS, W. (1989):** *Oxygen radicals acting as chemical messengers: a hypothesis.* Free Radic. Res. Commun. 7 (3-6), 213-220

- SARDAŞ, S., YILMAZ, M., OZTOK, U., ÇAKIR, N. & KARAKAYA, A.E. (2001):** Assessment of DNA strand breakage by comet assay in diabetic patients and the role of antioxidant supplementation. *Mutat. Res.* 490 (2), 123-129
- SEGEL, G.B. & LICHTMAN, M.A. (1976):** Potassium transport in human blood lymphocytes treated with phytohemagglutinin. *J. Clin. Invest.* 58 (6), 1358-1369
- SEGEL, G.B., SIMON, W. & LICHTMAN, M.A. (1979):** Regulation of sodium and potassium transport in phytohemagglutinin-stimulated human blood lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 64 (3), 834-841
- SHARPE, A.H. (2009):** Mechanisms of costimulation. *Immunological Reviews* 229 (1), 5-11
- SHIBUTANI, S., TAKESHITA, M. & GROLLMAN, A.P. (1991):** Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349 (6308), 431-434
- SHRIVASTAV, M., HARO, L.P. DE & NICKOLOFF, J.A. (2008):** Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.* 18 (1), 134-147
- SIES, H. (1991):** Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin. Wochenschr.* 69 (21-23), 965-968
- SIES, H. (1993):** Strategies of antioxidant defense. *Eur. J. Biochem.* 215 (2), 213-219
- SINGH, B., CHATTERJEE, A., RONGHE, A.M., BHAT, N.K. & BHAT, H.K. (2013):** Antioxidant-mediated up-regulation of OGG1 via NRF2 induction is associated with inhibition of oxidative DNA damage in estrogen-induced breast cancer. *BMC Cancer* 13, 253
- SMITH-GARVIN, J.E., KORETZKY, G.A. & JORDAN, M.S. (2009):** T Cell Activation. *Annu. Rev. Immunol.* 27 (1), 591-619
- SPIVAK, G. & HANAWALT, P.C. (2006):** Host cell reactivation of plasmids containing oxidative DNA lesions is defective in Cockayne syndrome but normal in UV-sensitive syndrome fibroblasts. *DNA Repair (Amst.)* 5 (1), 13-22
- SUGASAWA, K. (2011):** Multiple DNA damage recognition factors involved in mammalian nucleotide excision repair. *Biochemistry Mosc.* 76 (1), 16-23
- SUZUKI, S., KUPSCH, J., EICHMANN, K. & SAIZAWA, M.K. (1992):** Biochemical evidence of the physical association of the majority of CD3 delta chains with the accessory/co-receptor molecules CD4 and CD8 on nonactivated T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 22 (10), 2475-2479



**TAKATA, M., SASAKI, M.S., SONODA, E., MORRISON, C., HASHIMOTO, M., UTSUMI, H., YAMAGUCHI-IWAI, Y., SHINOHARA, A. & TAKEDA, S. (1998):** Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* 17 (18), 5497-5508

**TANAKA, T., KAJSTURA, M., HALICKA, H.D., TRAGANOS, F. & DARZYNKIEWICZ, Z. (2007):** Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation are strongly amplified during mitogenic stimulation of lymphocytes. *Cell Prolif* 40 (1)

**TANG, J.Y., HWANG, B.J., FORD, J.M., HANAWALT, P.C. & CHU, G. (2000):** Xeroderma pigmentosum p48 gene enhances global genomic repair and suppresses UV-induced mutagenesis. *Mol. Cell* 5 (4), 737-744

**TIWARI, V.K., STADLER, M.B., WIRBELAUER, C., PARO, R., SCHÜBELER, D. & BEISEL, C. (2012):** A chromatin-modifying function of JNK during stem cell differentiation. *Nat. Genet.* 44 (1), 94-100

**TOKUYASU, K., MADDEN, S.C. & ZELDIS, L.J. (1968):** Fine structural alterations of interphase nuclei of lymphocytes stimulated to growth activity in vitro. *J. Cell Biol.* 39 (3), 630-660

**TORNALETTI, S., MAEDA, L.S., KOLODNER, R.D. & HANAWALT, P.C. (2004):** Effect of 8-oxoguanine on transcription elongation by T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymerase II. *DNA Repair (Amst.)* 3 (5), 483-494

**TRAPP, C., REITE, K., KLUNGLAND, A. & EPE, B. (2007a):** Deficiency of the Cockayne syndrome B (CSB) gene aggravates the genomic instability caused by endogenous oxidative DNA base damage in mice. *Oncogene* 26 (27), 4044-4048

**TRAPP, C., SCHWARZ, M. & EPE, B. (2007b):** The peroxisome proliferator WY-14,643 promotes hepatocarcinogenesis caused by endogenously generated oxidative DNA base modifications in repair-deficient *Csbm/m/Ogg1-/-* mice. *Cancer Res.* 67 (11), 5156-5161

**URA, K. & HAYES, J.J. (2002):** Nucleotide excision repair and chromatin remodeling. *European Journal of Biochemistry* 269 (9), 2288-2293

**VALKO, M., RHODES, C.J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M. & MAZUR, M. (2006):** Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160 (1), 1-40

**VILASOVÁ, Z., REZÁCOVÁ, M., VÁVROVÁ, J., TICHÝ, A., VOKURKOVÁ, D., ZOELZER, F., REHÁKOVÁ, Z., OSTERREICHER, J. & LUKÁSOVÁ, E. (2008):** Changes in phosphorylation of histone H2A.X and p53 in response of peripheral blood lymphocytes to gamma irradiation. *Acta Biochim. Pol.* 55 (2), 381-390

**WEINFELD, M., MANI, R.S., ABDOU, I., ACEYTUNO, R.D. & GLOVER, J.N.M. (2011):** *Tidying up loose ends: the role of polynucleotide kinase/phosphatase in DNA strand break repair.* Trends Biochem. Sci. 36 (5), 262-271

**WEISSBACH, H., ETIENNE, F., HOSHI, T., HEINEMANN, S.H., LOWTHER, W.T., MATTHEWS, B., ST JOHN, G., NATHAN, C. & BROT, N. (2002):** *Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function.* Arch. Biochem. Biophys. 397 (2), 172-178

**WINKLER, G.S., SUGASAWA, K., EKER, A.P., LAAT, W.L. DE & HOEIJMAKERS, J.H. (2001):** *Novel functional interactions between nucleotide excision DNA repair proteins influencing the enzymatic activities of TFIIH, XPG, and ERCC1-XPF.* Biochemistry 40 (1), 160-165

**XIE, Y., YANG, H., CUNANAN, C., OKAMOTO, K., SHIBATA, D., PAN, J., BARNES, D.E., LINDAHL, T., MCLHATTON, M., FISHEL, R. & MILLER, J.H. (2004):** *Deficiencies in mouse Myh and Ogg1 result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors.* Cancer Res. 64 (9), 3096-3102

## 8 Lebenslauf

