

DNA-Reparatur und Zelltod nach genotoxischem Stress in Monozyten, dendritischen Zellen und Makrophagen

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Martina Bauer

geb. in Darmstadt

Mainz, 2012

Der Mensch hat dreierlei Wege, klug zu Handeln; erstens durch Nachdenken, das ist das Edelste, zweitens durch Nachahmen, das ist das Leichteste, und drittens durch Erfahrung, das ist das Bitterste.

Konfuzius

chinesischer Philosoph und Staatsmann (551 v. Chr. - 479 v. Chr.)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	15
Tabellenverzeichnis	19
1 Einleitung	21
1.1 Die weißen Blutzellen des Immunsystems	21
1.1.1 Monozyten	21
1.1.2 Makrophagen	23
1.1.3 Dendritische Zellen	25
1.2 Induktion von DNA-Schäden	27
1.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress	27
1.2.1.1 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies	27
1.2.1.2 Biologische Konsequenzen der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies	30
1.2.1.3 Generierung reaktiver Sauerstoffspezies <i>in vitro</i>	31
1.2.2 Ionisierende Strahlung	31
1.2.3 Temozolomid	33
1.3 Reparatur von DNA-Schäden	35
1.3.1 O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase	35
1.3.2 Basenexzisions- und DNA-Einzelstrangbruchreparatur	36
1.3.2.1 Basenexzisionsreparatur	36
1.3.2.2 DNA-Einzelstrangbruchreparatur	40
1.3.3 DNA-Doppelstrangbruchreparatur	41
1.3.3.1 Kanonische nicht-homologe Endverknüpfung	41
1.3.3.2 Alternative nicht-homologe Endverknüpfung	43
1.4 Signaltransduktion zwischen DNA-Schaden und Apoptose	45
1.5 Apoptose	47
1.5.1 Intrinsischer Signalweg	49
1.5.2 Extrinsischer Signalweg	50
1.6 Zielsetzung der Arbeit	51
2 Material und Methoden	55
2.1 Material	55

Inhaltsverzeichnis

2.1.1	Geräte	55
2.1.2	Chemikalien	57
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	60
2.1.4	Kits	61
2.1.5	Zytokine	62
2.1.6	Chemotherapeutika/Zytostatika	62
2.1.7	Software	62
2.1.8	Medien und Komponenten für Zellkultur	63
2.1.9	Zelllinien	63
2.1.9.1	Adhärente Zelllinien	63
2.1.9.2	Suspensionszelllinien	63
2.1.10	Proteine	64
2.1.10.1	Proteinmarker	64
2.1.10.2	Enzyme	64
2.1.10.3	Primärantikörper	64
2.1.10.4	Sekundäre Detektionsantikörper	66
2.1.11	Synthetische Oligonukleotide	67
2.1.12	DNA-Marker – und Ladepuffer	68
2.1.13	Puffer und Lösungen	68
2.2	Methoden	75
2.2.1	Zellkultur	75
2.2.1.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	75
2.2.1.2	Isolierung humaner mononukleärer Zellen (PBMCs) aus peripherem Blut	75
2.2.1.3	Anreicherung von Monozyten aus PBMCs	76
2.2.1.4	Generierung von dendritischen Zellen aus humanen Monozyten	77
2.2.1.5	Generierung von Makrophagen aus humanen Monozyten	77
2.2.1.6	Vitalitätsermittlung durch Trypan-Blau-Detektion	77
2.2.2	Phänotypcharakterisierung	78
2.2.3	Behandlung der Zellen mit <i>tert</i> -BOOH und H ₂ O ₂	78
2.2.4	Behandlung der Zellen mit oxLDL	79
2.2.5	Behandlung der Zellen mit ionisierender Strahlung	79
2.2.6	Behandlung von Zellen mit Zytostatika	79
2.2.7	Zytotoxizitätsuntersuchungen	80
2.2.7.1	Bestimmung der metabolischen Zellaktivität	80
2.2.7.2	Bestimmung der Apoptosefrequenz durch SubG1-Messung	80
2.2.7.3	AnnexinV-PI Doppelfärbung	81
2.2.8	Quantifizierung von Reaktiven Sauerstoffspezies (CM-H ₂ DCFDA-Test)	81

2.2.9	Bestimmung von DNA-Strangbrüchen mittels Einzelzellgelelektrophorese (SCGE; ‚Comet-Assay‘)	82
2.2.9.1	Neutrale Einzelzellgelelektrophorese	83
2.2.9.2	Alkalische Einzelzellgelelektrophorese	83
2.2.9.3	Auswertung	83
2.2.10	Arbeiten mit Nukleinsäuren	83
2.2.10.1	Konzentrationsbestimmung	83
2.2.10.2	Agarose-Gelelektrophorese	84
2.2.10.3	RNA-Isolation	84
2.2.10.4	Synthese von cDNA mittels Reverser Transkriptase	84
2.2.10.5	Semiquantitative Endpunkt-RT-PCR	85
2.2.10.6	Semiquantitative Real-Time-RT-PCR	85
2.2.10.6.1	PCR-Array	86
2.2.10.6.2	Semiquantitative Real-Time-RT-PCR zur Analyse einzelner Genen	86
2.2.11	Untersuchung der Proteinexpression	87
2.2.11.1	Herstellung von Gesamtzellextrakten	87
2.2.11.2	Herstellung von Gesamtzellextrakten für den MGMT-Assay	87
2.2.11.3	Herstellung von Gesamtzellextrakten für den BER-Assay	87
2.2.11.4	Herstellung von Gesamtzellextrakten für den 8-oxoG-Assay	88
2.2.11.5	Herstellung von Kernextrakten für den DNA-PK-Aktivitäts-Assay	89
2.2.11.6	Proteinbestimmung nach Bradford	89
2.2.11.7	Western Blot-Analyse	89
2.2.11.7.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	90
2.2.11.7.2	Western Blot-Transfer	90
2.2.11.7.3	Detektion von Proteinen mittels Antikörpern	90
2.2.11.8	Immunfluoreszenz (γ H2AX-Foci)	91
2.2.11.8.1	Vorbereitung der Deckgläser und Ansetzen des Versuchs	91
2.2.11.8.2	Antikörper- und ToPro3-Färbung	91
2.2.11.8.3	Versiegelung der Proben und Auswertung	92
2.2.12	Aktivitäts-Assays	92
2.2.12.1	Messung der O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Aktivität (MGMT-Assay)	92
2.2.12.2	Messung der BER-Aktivität (<i>in vitro</i> BER-Assay)	93
2.2.12.2.1	Radioaktive 5 ¹ -Markierung mit T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK)	93
2.2.12.2.2	Hybridisierung der ssOligonukleotide	93
2.2.12.2.3	Präparation einer AP-Stelle mittels Uracil-DNA Glykosylase	94
2.2.12.2.4	Reparaturreaktion	94
2.2.12.3	Messung der 8-oxoG-Spaltungsaktivität	95
2.2.12.3.1	Radioaktive 5 ¹ -Markierung mit T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) und Hybridisierung der ssOligonukleotide	95

2.2.12.3.2 Reparaturreaktion	95
2.2.12.4 Messung der enzymatischen DNA-PK-Aktivität	95
2.2.13 Bestimmung der Konzentration von IL-1, TNF- α und TGF β in Monozyten und Makrophagen nach Behandlung mit <i>tert</i> -BOOH	96
2.2.13.1 Behandlung der Zellen mit LPS und <i>tert</i> -BOOH	96
2.2.13.2 Ernten der Proben und Bestimmung der Zellvitalität	96
2.2.13.3 Zytokin-ELISA	96
3 Ergebnisse	99
3.1 Generierung von DCs und Makrophagen aus Monozyten durch Zytokin-Behandlung	99
3.1.1 Morphologie von Monozyten und daraus differenzierten DCs und Makrophagen	99
3.1.2 Phänotypcharakterisierung von Monozyten, DCs und Makrophagen	100
3.2 Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber oxidativem Stress	101
3.2.1 Apoptoseinduktion in Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit H ₂ O ₂ und <i>tert</i> -BOOH	102
3.2.2 Bestimmung der ROS-Bildung in Monozyten, DCs und Makrophagen nach <i>tert</i> -BOOH	104
3.2.3 Entstehung von ESBs und DSBs in Monozyten, DCs und Makrophagen nach <i>tert</i> -BOOH	106
3.2.4 Bestimmung von γ H2AX in Monozyten, DCs und Makrophagen nach <i>tert</i> -BOOH	107
3.2.5 DNA-Schadensantwort nach <i>tert</i> -BOOH-Behandlung in DCs und Makrophagen	108
3.2.6 Untersuchung des apoptotischen Signalwegs nach <i>tert</i> -BOOH-Behandlung in Monozyten	110
3.2.7 Untersuchung der Sensitivität gegenüber endogen gebildetem ROS	112
3.3 Untersuchung der BER-Reparaturkapazität humaner Monozyten, DCs und Makrophagen	114
3.3.1 Bestimmung der BER-Kapazität durch einen <i>in vitro</i> BER-Assay	114
3.3.2 Expression von Proteinen der BER	117
3.3.3 Bestimmung der 8-oxoG-Spaltungsaktivität in Monozyten, DCs und Makrophagen	120
3.3.4 Expression von XRCC1, Ligase III α und PARP-1 während der Differenzierung von Monozyten zu DCs und Makrophagen	121

3.4 Einfluss des BER-Defekts auf die immunstimulatorische Funktion von Monozyten	123
3.5 Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber IR	125
3.5.1 Apoptoseinduktion in Monozyten, DCs und Makrophagen nach IR	125
3.5.2 Entstehung von ESBs und DSBs in Monozyten, DCs und Makrophagen nach IR	126
3.5.3 Bestimmung von γ H2AX in Monozyten, DCs und Makrophagen nach IR	128
3.6 Untersuchung der DSB-Reparaturkapazität	130
3.6.1 Expression von Proteinen des C-NHEJ	131
3.6.2 Bestimmung der DNA-PK-Aktivität in Monozyten, DCs und Makrophagen	132
3.7 Expressionsanalyse von weiteren gentoxischen „Stress“-Genen in Monozyten, DCs und Makrophagen	133
3.8 Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber Temozolomid	138
3.8.1 Apoptoseinduktion in Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit Temozolomid	138
3.8.2 Proteinexpression und Aktivität von MGMT in Monozyten, DCs und Makrophagen	140
3.8.3 Einfluss von Temozolomid auf die BER-Kapazität von Monozyten, DCs und Makrophagen	141
3.8.4 DNA-Schaden nach Temozolomid-Behandlung in Monozyten, DCs und Makrophagen	143
3.8.5 DNA-Schadensantwort nach Temozolomid-Behandlung in Monozyten	144
3.8.6 Untersuchung des apoptotischen Signalwegs nach Temozolomid-Behandlung in Monozyten	146
3.9 Vergleich von Monozyten mit Zelllinien myeloiden Ursprungs	147
3.9.1 Expression der BER-Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 in MM6-, THP-1- und U937-Zellen	148
3.9.2 Sensitivität von MM6-, THP-1- und U937-Zellen gegenüber Alkylantien	149
3.9.2.1 Apoptoseinduktion in MM6-, THP-1- und U937-Zellen nach Behandlung mit Temozolomid	149
3.9.2.2 Apoptoseinduktion in MM6-, THP-1- und U937-Zellen nach Behandlung mit MMS	150
3.9.3 Proteinexpression und Aktivität von MGMT in MM6-, THP-1- und U937-Zellen	151

3.9.4	Expression von XRCC1, Ligase III α und PARP-1 in MM6-, THP-1- und U937-Zellen nach Behandlung mit IL-4 und GM-CSF _____	152
3.9.5	Einfluss von IL-4 und GM-CSF auf die Sensitivität von MM6-Zellen gegenüber Alkylantien _____	153
3.9.6	Einfluss der Stimulation mit IL-4 und GM-CSF auf die MGMT-Aktivität von MM6-Zellen _____	154
3.9.7	Einfluss der Stimulation mit IL-4 und GM-CSF auf die BER-Kapazität von MM6-Zellen _____	155
4	Diskussion _____	159
4.1	Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber oxidativem Stress _____	160
4.1.1	Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber <i>tert</i> -BOOH _____	160
4.1.2	Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber endogen gebildetem ROS _____	163
4.2	BER-Kapazität humaner Monozyten und <i>in vitro</i> daraus abgeleiteter DCs und Makrophagen _____	164
4.3	Einfluss des BER-Defekts auf die immunstimulatorische Funktion von Monozyten _____	169
4.4	Sensitivität humaner Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber IR _	170
4.5	DSB-Reparatur in Monozyten, DCs und Makrophagen _____	172
4.6	Expressionsanalysen von weiteren gentoxischen „Stress“-Genen in Monozyten, DCs und Makrophagen _____	173
4.7	Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber Temozolomid _____	174
4.8	Vergleich humaner Monozyten mit Zelllinien myeloiden Ursprungs _____	178
5	Zusammenfassung _____	183
6	Anhang _____	185
6.1	CD-Antigene _____	185
6.2	Primer des PCR-Arrays _____	187
6.3	Ergebnis des PCR-Arrays _____	191
7	Literatur _____	197

Veröffentlichungen	223
Kongressteilnahmen	225

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AA/BA	Acrylamid/Bisacrylamid
Abb.	Abbildung
ABH2/3	<i>alkylation repair homolog 2/3</i>
<i>A.bidest</i>	<i>aqua bidestillata</i> ; zweifach destilliertes Wasser
ACTB	β -Actin
ADP	Adenosin-5'-Triphosphat
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
AKT1	<i>a-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
AML	akute myeloische Leukämie
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APAF1	<i>Apoptotic protease-activating factor 1</i>
APE	AP-Endonuklease
APS	Ammoniumpersulfat
ARHGDI A	<i>Rho GDP dissociation inhibitor alpha</i>
ATG3/7	<i>Autophagy-related 3/7 (yeast)</i>
ATM	<i>ataxia-telangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ATM- und Rad3-related</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AP-Stellen	apurine/apyrimidine Stellen
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Bad	<i>Bcl-2 antagonist of cell death</i>
Bak	<i>Bcl2-antagonist/killer</i>

Abkürzungsverzeichnis

Bax	<i>Breakpoint cluster-2-associated x protein</i>
Bcl-2	<i>B-Cell CLL/lymphoma 2</i>
Bcl-XL	<i>BCL2-like 1, lange Isoform</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BECN1	Beclin1
BER	<i>Base excision repair</i> ; Basenexzisionsreparatur
Bim	<i>B-cell lymphoma 2 interacting mediator of cell death</i>
BID	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BIRC3	<i>baculoviral IAP repeat containing 3</i>
B-NHEJ	<i>backup-NHEJ</i> ; alternative NHEJ
bp	Basenpaare
BRCA1/2	<i>Breast cancer 1/2</i>
BSA	<i>bovine serum albumine</i> ; Rinderalbumin
C	Cytosin
Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CAD	Caspase-aktivierte DNase
CASP	Caspase
CCNA1	Cyclin A1
CCNB1	Cyclin B1
CCNE1	Cyclin E1
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CDC25A/B	<i>Cell division cycle 25 homolog A/B</i>
CDKN1A	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1A</i> = p21
CDKN1B	<i>Cyclin dependent kinase inhibitor 1B</i> = p27(KIP1)
cDNA	<i>complementary DNA</i>

Abkürzungsverzeichnis

Cdk	<i>Cyclin dependent kinase</i>
CH ₃ COOH	Essigsäure
Chk1/2	<i>Checkpoint Kinase 1/2</i>
cm	Zentimeter
CM-H ₂ DCFDA	5-(und 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein-Diazetat
C-NHEJ	<i>canonical-NHEJ</i> ; kanonische NHEJ
CPD	Cyclobutan-Pyrimidindimer
Cs	Cäsium
CSR	<i>class switch recombination</i> ; Klassenwechsel
cpm	<i>counts per minute</i>
Cu	Kupfer
CXCR4	Chemokin (C-X-C motif) Rezeptor 4
CYP1A1	Cytochrom P450 1A1
CYP1B1	Cytochrom P450 1B1
Da	Dalton
DAPCO/DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane
DC	<i>Dendritic cells</i> , Dendritische Zellen
DDB2	<i>DNA-damage binding protein 2</i> , XPE
DDIT3	<i>DNA-damage-inducible transcript 3</i>
DDR	<i>DNA damage response</i> ; DNA-Schadensantwort
DED	<i>death effector domain</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-PK-Holoenzym
DNA-PKcs	katalytischen Untereinheit der DNA-Proteinkinase
DNTPs	Deoxynukleosidtriphosphate

Abkürzungsverzeichnis

dRp	5'-Desoxyribose-5-Phosphat
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DSB	DNA-Doppelstrangbruch
dsDNA	doppelsträngige DNA
DSMZ	Leibniz Institut-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTIC	Dacarbazin
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E2F-1	<i>E2F transcription factor 1</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> ; enzymgekoppelter Immunabsorptionstest
ERCC1	<i>Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1</i>
ERK2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 2</i>
ESB	DNA-Einzelstrangbruch
ESBR	DNA-Einzelstrangbruchreparatur
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol absolut
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FANCC	Fanconi-Protein, Komplementationsgruppe C
FasR	Fas Rezeptor; <i>TNF receptor superfamily member 6</i> ; CD95/APO-1
FasL	FAS Ligand; <i>Tumor necrosis factor ligand superfamily</i> ; CD95-L
FCS	Fötale Kälberserum

Abkürzungsverzeichnis

Fe	Eisen
Fen-1	<i>Flap structure-specific endonuclease 1</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FOS	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
FPG	Formamidopyrimidine [fapy]-DNA Glykosylase (<i>E. coli</i>)
FoxM1	Forkhead box M-1
g	Gramm
G	Guanin
GADD45A	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible alpha</i>
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GPX1	Glutathion-Peroxidase 1
GSTM1	Glutathion S-Transferase mu 1
Gy	Gray
h	Stunde
H	Wasserstoff
H2AX	Histon 2AX
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HIF1A	<i>Hypoxia-inducible factor-1α</i>
HMOX1	Hämoxygenase 1
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HR	<i>Homologous recombination</i> ; homologe Rekombination
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> ; Meerrettich-Peroxidase
HSP1B	Heatshock protein 1B

Abkürzungsverzeichnis

HSP90AA1	Heatshock protein 90AA1
HUS1	HUS1 <i>checkpoint</i> Homolog
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis</i>
ICAM1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
iDC	<i>immature D</i> ;, unausgereifte DC
IFN	Interferon
IgG	Immunoglobulin G
IL	Interleukin
IR	<i>Ionizing radiation</i> ; Ionisierende Strahlung
ITGB1	Integrin beta1
k	kilo
KCl	Kaliumchlorid
KU	Ku70/Ku80 Heterodimer
Ku70	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 5; XRCC6
Ku80	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 6</i> ; XRCC5
LAMP1	<i>Lysosomal-associated membrane protein 1</i>
LDL	<i>low density lipoprotein</i> ; Lipoprotein niederer Dichte
Lig	Ligase
LMDS	<i>locally-multiply-damaged-sites</i>
LMP-Agarose	<i>low melting point Agarose</i> ; Agarose mit niederem Schmelzpunkt
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	Laser Scanning Mikroskop
m	milli
M	molar (mol/l)
Mcl-1	<i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein</i>
mDC	<i>mature DC</i> ; ausgereifte DC

Abkürzungsverzeichnis

MDC	myeloide DC
MDM2	<i>Mouse double minute 2</i>
Me	Methyl
mFasL	membranständige Form des FasL
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> ; Haupthistokompatibilitätskomplex
μl	Mikroliter
min	Minute
ml	Milliliter
μM	Mikromolar
mm	Millimeter
MM6	Mono Mac 6
MMP3/7/13	Matrixmetallopeptidase 3/7/13
MMR	<i>Mismatch repair</i> ; Fehlpaarungsreparatur
MMS	Methylmethansulfonat
MNNG	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanin
MOMP	<i>mitochondrial outer membrane permeabilisation</i>
MPG	Methylpurin-DNA-Glykosylase
Mph	Makrophage
MPS	mononukleäres Phagozytensystem
MRE11	<i>Meiotic recombination 11 homolog 1</i>
MTIC	5-(3-Methyltriazin-1-yl)imidazol-4-Carboxamid
MSH2	<i>MutS Homolog 2</i>
MWCO	<i>molecular weight cut off</i>
N	Stickstoff

Abkürzungsverzeichnis

NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natronlauge
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NBN	Nibrin, NBS-1
NER	<i>Nucleotide excision repair</i> ; Nukleotidexzisionsreparatur
ng	Nanogramm
NHEJ	<i>Non-homologous end joining</i> ; nicht-homologe Endverknüpfung
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nLDL	native Form des LDL
nm	Nanometer
NO [•]	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NOX	NADPH Oxidase 1
Noxa	Latein für ‚Schaden‘
NP-40	Nonidet P-40; Igepal
O ₂ ^{-•}	Superoxidanionradikal
¹ O ₂	Singulett-Sauerstoff
O ⁶ BG	O ⁶ -Benzylguanin
OD	Optische Dichte
OGG1	8-oxoG-DNA-Glykosylase 1
OH [•]	Hydroxyl-Radikal
O ⁶ -MeG	O ⁶ -Methylguanin
ONOO ⁻	Peroxynitrit
OTM	<i>olive tail moment</i>

Abkürzungsverzeichnis

oxLDL	oxidierte Form des LDL
8-oxoG	8-oxo-7,8-Dihydroguanin
P	Phosphor
p-	Phospho- [stellvertretend für eine Phosphatgruppe (PO ₃ ⁻)]
p21/53	Tumor Protein 21/53
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PARP-1/2	Poly-ADP-Ribose-Polymerase-1/2
PBMCs	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> ; Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PCZ	Procarbazin
PDC	plasmazytoide DC
PE	Phycoerythrin
PEG	Polyethylenglykol 400
PGE	Prostaglandin E
PI	Propidiumiodid
pmol	pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
Pol	Polymerase
POLD1	DNA-Polymerase delta1
POLE	DNA-Polymerase epsilon
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
Puma	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
6-4PP	6-4-Photoprodukt

Abkürzungsverzeichnis

R [•]	Alkylradikal
RAC1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
RAD50/51	RAD50/51 Homolog
REV1	REV1 Homolog
REV3L	<i>REV3-like, catalytic subunit of DNA polymerase zeta</i>
RF-C	Replikationsfaktor C
RHOA/B	<i>Ras homolog gene family, member A/B</i>
RO [•]	Alkoxyradikal
ROO [•]	Peroxyradikal
ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; Reaktive Sauerstoffspezies
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> ; Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
mRNA	<i>messenger RNA</i>
rRNA	ribosomale RNA
RNS	<i>reactive nitrogen species</i> ; Reaktive Stickstoffspezies
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCGE	Einzelzellgelelektrophorese
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i> ; Natriumdodecylsulfat
SELE	E-Selektin
Ser	Serin
sFasL	gelöste Form des FasL
smac/DIABLO	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase/Direct IAP-binding protein with low pI</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
SOD1	Superoxid-Dismutase 1
ssDNA	einzelsträngige DNA

Abkürzungsverzeichnis

STZ	Streptozotocin
t	Zeit
T	Thymin
Tab.	Tabelle
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> ; Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	TBS mit 0,2% (v/v) Tween
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylethylendiamin
<i>tert</i>	<i>tertiär</i>
<i>tert</i> -BOOH	<i>tert</i> -Butylhydroperoxid
Thr	Threonin
TIAM1	<i>T-cell lymphoma invasion and metastasis 1</i>
TIMP2	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinases 2</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i> ; transformierender Wachstumsfaktor
T _m	Schmelztemperatur
TMZ	Temozolomid; Temodal®
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR1	TNF Rezeptor 1
TOPO2A/B	Topoisomerase 2A/B
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor</i>
TREX1	<i>Three prime repair exonuclease 1</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TWEAK	<i>tumor necrosis like weak inducer of apoptosis</i>

Abkürzungsverzeichnis

TXNRD1	Thioredoxin-Reduktase 1
TP53/63/73	Gen des Tumor Proteins 53/63/73
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolette Strahlung
UV-C	Ultraviolette Strahlung der Wellenlänge 200-290 nm
Upm	Umdrehungen pro Minute
VCAM1	<i>Vascular cell adhesion protein 1</i>
v/v	Volumen pro Volumen
WEE1	Wee1 Homolog
WRN	Werner-Syndrom ATP-abhängige Helikase
WRNIP	<i>Werner helicase interacting protein 1</i>
WST-1	<i>Water soluble tetrazolium 1</i>
w/v	Gewicht pro Volumen
x	-mal/-fach
XLF/Cer	<i>XRCC4-like factor/Cernunnos</i>
XPA/C	Xeroderma pigmentosum, Komplementationsgruppe A/C
XRCC1/3/4	<i>X-ray repair cross complementing protein 1/3/4</i>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	<i>In vitro</i> Generierung von DCs und Makrophagen. _____	22
Abb. 1.2:	Sequentielle Reduktion von molekularem Sauerstoff über Superoxidanion-Radikal, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikal zu Wasser. _____	28
Abb. 1.3:	Spontane Dismutation von Superoxidanion-Radikalen. _____	29
Abb. 1.4:	Metallkatalysierte Bildung von Hydroxylradikalen. _____	29
Abb. 1.5:	Mechanismus der BER und DNA-Einzelstrangbruchreparatur. _____	38
Abb. 1.6:	Mechanismus des C-NHEJ. _____	42
Abb. 1.7:	Möglicher Mechanismus des B-NHEJ. _____	44
Abb. 2.1:	5-(und 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein-Diazetat (CM-H ₂ DCFDA). _____	82
Abb. 3.1:	Ausreifung von Monozyten zu DCs und Makrophagen. _____	100
Abb. 3.2:	Phänotypisierung von Monozyten, DCs und Makrophagen mittels Durchflusszytometrie. _____	101
Abb. 3.3:	Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber H ₂ O ₂ . ____	102
Abb. 3.4:	Messung der SubG1-Fraktion von Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit <i>tert</i> -BOOH. _____	103
Abb. 3.5:	AnnexinV/PI Messung von Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit <i>tert</i> -BOOH. _____	104
Abb. 3.6:	Bildung von ROS in Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit <i>tert</i> -BOOH. _____	105
Abb. 3.7:	Entstehung von ESBs in Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit <i>tert</i> -BOOH. _____	106
Abb. 3.8:	Entstehung von DSBs in Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit <i>tert</i> -BOOH. _____	107
Abb. 3.9:	γ H2AX in Monozyten, DC und Makrophagen nach Behandlung mit <i>tert</i> -BOOH. _____	108
Abb. 3.10:	DNA-Schadensantwort von Monozyten gegenüber <i>tert</i> -BOOH. _____	109
Abb. 3.11:	DNA-Schadensantwort von DCs und Makrophagen gegenüber <i>tert</i> -BOOH. _____	110
Abb. 3.12:	Expression der <i>FASR</i> -mRNA in Monozyten nach Behandlung mit <i>tert</i> -BOOH. _____	111
Abb. 3.13:	Beteiligung von Caspasen am Apoptose-Signalweg in Monozyten nach Behandlung mit <i>tert</i> -BOOH. _____	111
Abb. 3.14:	Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber oxLDL. ____	112

Abb. 3.15: Induktion von ESBs in Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit oxLDL. _____	113
Abb. 3.16: Modell des <i>in vitro</i> BER-Assays. _____	114
Abb. 3.17: Bestimmung der BER-Kapazität von CD34 ⁺ Stammzellen, Monozyten, DCs und Makrophagen mittels <i>in vitro</i> BER-Assay. _____	115
Abb. 3.18: Quantifizierung der Religationskapazität von CD34 ⁺ Stammzellen, Monozyten, DCs und Makrophagen während des <i>in vitro</i> BER-Assays. _____	116
Abb. 3.19: Bestimmung der BER-Kapazität von CD34 ⁺ Stammzellen im Vergleich zu Monozyten mittels <i>in vitro</i> BER-Assay. _____	117
Abb. 3.20: Expression von BER-Proteinen in Monozyten, DCs und Makrophagen. ____	118
Abb. 3.21: Bestimmung der mRNA Menge der BER-Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 in Monozyten, DCs und Makrophagen. _____	119
Abb. 3.22: Expression von an der Regulation von BER-Proteinen beteiligten Transkriptionsfaktoren in Monozyten, DCs und Makrophagen. _____	120
Abb. 3.23: Bestimmung der 8-oxoG-Spaltungsaktivität mittels <i>in vitro</i> Assay. _____	121
Abb. 3.24: Expression von BER-Proteinen während der Ausreifung von Monozyten zu DCs. _____	122
Abb. 3.25: Expression von BER-Proteinen während der Ausreifung von Monozyten zu Makrophagen. _____	123
Abb. 3.26 : Einfluss von <i>tert</i> -BOOH auf die durch LPS induzierte Produktion der Zytokine IL-1, TNF α und TGF- β in Monozyten. _____	124
Abb. 3.27: Einfluss von <i>tert</i> -BOOH auf die durch LPS induzierte Produktion der Zytokine IL-1, TNF α und TGF- β in Makrophagen. _____	124
Abb. 3.28: Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber IR. _____	125
Abb. 3.29: Entstehung von ESBs und DSBs in Monozyten, DCs und Makrophagen nach IR. _____	126
Abb. 3.30: Reparatur von IR-induzierten ESBs in Monozyten, DCs und Makrophagen. _____	127
Abb. 3.31: Reparatur von IR-induzierten DSBs in Monozyten, DCs und Makrophagen. _____	128
Abb. 3.32: Entstehung von γ H2AX Foci in Monozyten, DCs und Makrophagen nach IR. _____	129
Abb. 3.33: Relative Signalintensität von γ H2AX in Monozyten, DCs und Makrophagen nach IR. _____	130
Abb. 3.34: Expression von C-NHEJ-Proteinen in Monozyten, DCs und Makrophagen. _____	131
Abb. 3.35: Bestimmung der mRNA Menge von DNA-PKcs in Monozyten, DCs und Makrophagen. _____	132
Abb. 3.36: Bestimmung der DNA-PK-Aktivität in Monozyten, DCs und Makrophagen. _____	133

Abb. 3.37: Verifizierung von regulierten Genen des PCR-Arrays von Monozyten im Vergleich zu DCs und Makrophagen. _____	135
Abb. 3.38: Expression des XPC-Proteins in Monozyten, DCs und Makrophagen. ____	137
Abb. 3.39: Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber Temozolomid. _____	139
Abb. 3.40: Expression des MGMT-Proteins in Monozyten, DCs und Makrophagen. _	140
Abb. 3.41: MGMT-Aktivität von Monozyten, DCs und Makrophagen. _____	141
Abb. 3.42: Einfluss der Temozolomid-Behandlung auf die Expression von BER-Proteinen. _____	142
Abb. 3.43: Einfluss der Temozolomid-Behandlung auf die BER-Kapazität von Monozyten. _____	143
Abb. 3.44: γ H2AX in Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit Temozolomid. _____	144
Abb. 3.45: Phosphorylierung der PI3-Kinasen ATM und ATR in Monozyten, DCs und Makrophagen nach Temozolomid-Behandlung. _____	145
Abb. 3.46: DNA-Schadensantwort von Monozyten gegenüber Temozolomid. _____	145
Abb. 3.47: Bestimmung der <i>FASR</i> -mRNA Menge in Monozyten nach Behandlung mit Temozolomid. _____	146
Abb. 3.48: Expression des FasL in Monozyten nach Behandlung mit Temozolomid. _	147
Abb. 3.49: Expression der BER-Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 in humanen monozytären Zelllinien. _____	148
Abb. 3.50: Sensitivität von Monozyten, MM6-, THP-1- und U937-Zellen gegenüber Temozolomid. _____	149
Abb. 3.51: Sensitivität von Monozyten, MM6, THP-1 und U937-Zellen gegenüber MMS. _____	150
Abb. 3.52: Expression des MGMT-Proteins in MM6, THP-1 und U937-Zellen. _____	151
Abb. 3.53: MGMT-Aktivität von MM6, THP-1 und U937-Zellen. _____	151
Abb. 3.54: Expression der BER-Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 in MM6, THP-1 und U937-Zellen nach Behandlung mit IL-4 und GM-CSF. _____	153
Abb. 3.55: Einfluss von IL-4 und GM-CSF auf die Sensitivität von MM6-Zellen gegenüber Alkylantien. _____	154
Abb. 3.56: Einfluss von IL-4 und GM-CSF auf die MGMT-Aktivität von MM6-Zellen. _	155
Abb. 3.57: Bestimmung der BER-Kapazität von MM6- und mit IL-4 und GM-CSF-behandelten MM6-Zellen mittels <i>in vitro</i> BER-Assay. _____	156
Abb. 3.58: Bestimmung der Spaltung und Religation der AP-Stelle von MM6- und mit IL-4 und GM-CSF-behandelten MM6-Zellen. _____	156

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Übersicht verschiedener ROS. _____	28
Tabelle 2.1: Liste der zur Phänotypisierung von Monozyten, DCs und Makrophagen verwendeten Antikörper. _____	78
Tabelle 6.1: CD-Antigene humaner Monozyten, DCs und Makrophagen. _____	185
Tabelle 6.2: Liste der auf dem PCR-Array untersuchten Gene mit jeweiligem Primerpaar. ____	187
Tabelle 6.3: Ergebnis des PCR-Arrays von Monozyten, DCs und Makrophagen. _____	191

1 Einleitung

1.1 Die weißen Blutzellen des Immunsystems

Die weißen Blutzellen des Immunsystems, auch als Leukozyten bezeichnet, unterscheiden sich von den roten Blutzellen, den Erythrozyten dadurch, dass sie einen Zellkern besitzen und den roten Sauerstoff bindenden Blutfarbstoff Hämoglobin nicht enthalten. Leukozyten sind sowohl an der angeborenen unspezifischen als auch an der erworbenen spezifischen Immunabwehr beteiligt. Alle Leukozyten stammen von Vorläuferzellen im Knochenmark ab, den hämatopoetischen Stammzellen. Aus diesen entwickelt sich ein gemeinsamer lymphatischer und myeloider Vorläufer. Dieser Prozess wird durch Wachstumsfaktoren und Zytokine reguliert (DiJulio, 1991). Aus der gemeinsamen lymphatischen Vorläuferzelle differenzieren alle Lymphozyten, welche in T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und NK-Zellen unterteilt werden. Treffen Lymphozyten auf ein Antigen werden sie zur Proliferation und Ausdifferenzierung ihrer speziellen Funktionsmerkmale aktiviert. Eine besondere Fähigkeit dieser Zellen ist, dass sie auf praktisch jedes Antigen eine spezifische Immunantwort entwickeln (adaptive Immunantwort). Aus der gemeinsamen myeloiden Vorläuferzelle gehen Monozyten, die Vorläufer der Makrophagen, sowie dendritische Zellen (DCs), Mastzellen und Granulozyten hervor. Granulozyten werden weiter unterteilt in neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Auch Erythrozyten und Blutplättchen entwickeln sich aus dem myeloiden Vorläufer, werden aber nicht den Leukozyten zugeteilt. In den folgenden Abschnitten wird insbesondere auf die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Monozyten, DCs und Makrophagen eingegangen.

1.1.1 Monozyten

Monozyten bilden 3 bis 8% der Leukozyten und sind mit einem Durchmesser von 12 bis 25 μm die größten im Blut zirkulierenden Zellen des menschlichen Organismus. Sie haben einen vielgestaltigen Zellkern, welcher sich kugel-, bohnen- oder nierenförmig darstellen kann. Im Zytoplasma ist eine Vielzahl von Lysosomen zu finden, die dem intrazellulären Abbau aufgenommener Mikroorganismen und Gewebetrümmern dienen (Phagozytose), wodurch Monozyten zur Präsentation dieser Abbauprodukte (Antigenpräsentation) befähigt werden. Zur Erkennung dieser körperfremden Partikel dienen den Monozyten verschiedene Oberflächenrezeptoren. Der wohl bekannteste ist der CD14-Rezeptor, der an Lipopolysaccharide (LPS) bindet, welche in der äußeren Zellmembran gramnegativer Bakterien verankert sind. Zusammen mit der Sekretion von

Zytokinen, welche als intrazelluläre Mediatoren die Immunantwort modulieren, bilden diese Eigenschaften der Monozyten einen wichtigen Bestandteil der angeborenen unspezifischen Immunantwort. Zu den von Monozyten sezernierten Zytokinen gehören die Interleukine-1, -6, -10 und -12, der Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und der transformierende Wachstumsfaktor- β (TGF- β).

Mittels Zytokinen ist es möglich *in vitro* aus Monozyten DCs und Makrophagen zu generieren (Abb. 1.1). Nach Separation der Monozyten aus dem peripheren Blut können diese mittels der Zytokine GM-CSF und IL-4 zu unreifen DCs differenziert werden (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Hierbei stimuliert GM-CSF die Expression von für DCs charakteristischen Oberflächenmarkern (siehe Anhang 6.1) und IL-4 inhibiert die Expression von CD14, was zur Suppression der Makrophagendifferenzierung führt (Jansen et al., 1989). Zur vollständigen Ausreifung der DCs werden noch weitere proinflammatorische Zytokine benötigt, wie IL-1 β , IL-6, PGE und TNF- α (Jonuleit et al., 1997). Im Zuge dieser Ausreifung werden auch die Oberflächenmarker CD80, CD83 und CD86 hochreguliert, welche zur Phänotypisierung von DCs mittels Durchflusszytometrie verwendet werden können (Aiba, 1998). Weitere zellspezifische Oberflächenmarker, sogenannte ‚Cluster of Differentiation‘ (engl.; CD), humaner Monozyten, DCs und Makrophagen sind in Tabelle 6.1 im Anhang zusammengefasst. Einer der Hauptfaktoren der Makrophagen-Generierung ist GM-CSF (Bender et al., 2005). Die Stimulation der Monozyten mit GM-CSF *in vitro* induziert die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen, was eine vermehrte Adhärenz von Makrophagen bewirkt.

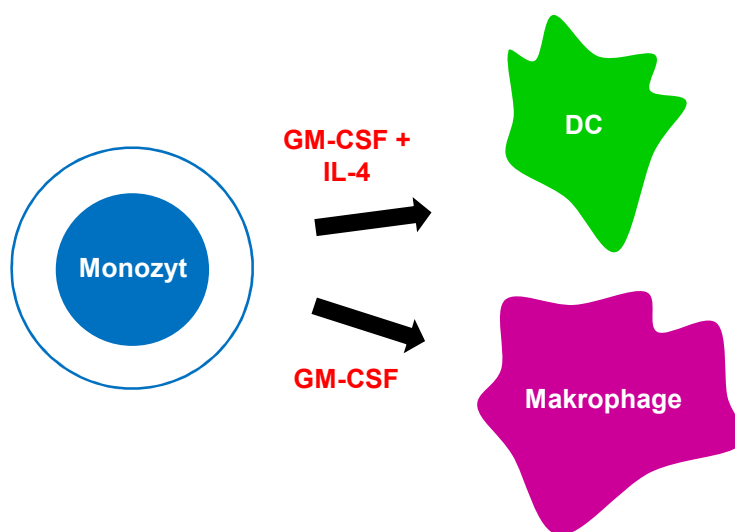


Abb. 1.1: *In vitro* Generierung von DCs und Makrophagen. Humane Monozyten können mittels der Zytokine GM-CSF und IL-4 oder GM-CSF allein zu unreifen DCs oder Makrophagen differenziert werden.

1.1.2 Makrophagen

Monozyten zirkulieren nur kurzzeitig für 1 bis 3 Tage im Blut. Sie zirkulieren im gesamten Körper, um anschließend in verschiedene Gewebe einzuwandern (Diapedese). Dort differenzieren diese hauptsächlich zu residenten Makrophagen, die in den verschiedenen Zielgeweben verbleiben. Typische Gewebsmakrophagen sind beispielsweise die Kupffer'schen Sternzellen in der Leber, die Alveolarmakrophagen in der Lunge oder die Mikrogliazellen im zentralen Nervensystem. Makrophagen sind aber auch in Organen wie der Niere und Lymphknoten zu finden, was diese Organe zu Filterstationen macht, die dem Abfangen von Mikroorganismen aus der Blut- und Lymphzirkulation dienen. Die charakteristische Grundeigenschaft der Makrophagen ist die Phagozytose (Coleman, 1986). Dabei nehmen sie fremde Partikel und Pathogene unspezifisch auf und zerstören diese, was sie mitunter zu den wichtigsten Effektorzellen der angeborenen unspezifischen Immunantwort macht. Im Anschluss an die Phagozytose werden die prozessierten Antigene auf der Zelloberfläche der Makrophagen für die CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten präsentiert, um so auch die spezifische Immunantwort zu aktivieren. Zusätzlich produzieren auch Makrophagen Zytokine wie das Interleukin-1, -6, -8, -10 und -12, sowie den TNF- α . Zur Abtötung von Mikroorganismen nutzen Makrophagen auch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS/RNS), wie das Superoxidanion-Radikal ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Stickstoffmonoxid (NO) sowie Peroxynitrit ($ONOO^-$; durch Kombination von $O_2^{\cdot-}$ und NO) (Forman and Torres, 2001). Peroxynitrit ist ein sehr kurzlebiges Oxidans, was die Zelle stark schädigen kann und so Zelltod induziert (Szabo et al., 2007). Stickstoffmonoxid wird von der NO-Synthase aus L-Arginin synthetisiert und wirkt antibakteriell (Fang and Vazquez-Torres, 2002). ROS entstehen durch die NADPH-Oxidase, die Superoxidanion-Radikale in den Zellen erzeugt, was die Synthese weiterer ROS verursacht, die Mikroorganismen abtöten (Babior, 1999). Das Superoxidanion-Radikal wird sowohl durch spontane Dismutation als auch enzymatisch durch die Superoxid-Dismutase (SOD) zu H_2O_2 umgebildet. H_2O_2 ist stabiler als das Superoxidanion-Radikal und kann leicht die Zellmembran durchdringen. Aus H_2O_2 kann wiederum das hochreaktive Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) entstehen, welches eine Vielzahl zellulärer Makromoleküle, wie die DNA, angreifen kann (Gwinn and Vallyathan, 2006). Je nachdem, ob der Erreger bereits von der Zelle aufgenommen wurde oder sich noch außerhalb der Zelle befindet, werden ROS intrazellulär freigesetzt oder nach außen an das umgebene Gewebe abgegeben. Im Fall von chronischen Entzündungen und Infekten kann dies ein permanenter oxidativer „Stress“ für den Körper bedeuten. Es werden immer mehr Makrophagen und andere Immunzellen vom Immunsystem zum Ort der Entzündung rekrutiert, so dass immer mehr ROS ins Gewebe abgegeben werden. Diese explosionsartigen Freisetzung von freien Radikalen wird als ‚Oxidative Burst‘ (engl.)

bezeichnet. Dieser kann Gewebezellen ohne ausreichendes antioxidatives Schutzsystem dermaßen schädigen, dass diese ihre Funktionen nicht mehr erfüllen oder sogar zu Krebszellen werden.

Makrophagen spielen desweiteren eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Atherosklerose. Atherosklerose ist eine Erkrankung des arteriellen Systems, welche über viele Jahre symptomlos entsteht, bis sie sich durch Ischämie, Thrombose, Angina pectoris, Herzinfarkt, Schlaganfall und/oder plötzlichen Tod offenbart. Der Krankheitsverlauf ist gekennzeichnet durch eine fortschreitende Degeneration der großen Arterien mit progressiver Veränderung der Gefäßwand. Dabei führen Bindegewebewucherung, intra- und extrazelluläre Einlagerungen von Cholesterin, Fettsäuren und Kalk sowie Akkumulation von Kollagen und Proteoglykanen zu einer Verhärtung und Verdickung der Gefäße, welche mit Verengungen und Elastizitätsverlust einhergehen. Für die Entstehung atherosklerotischer Gefäßkrankheiten gelten als Risikofaktoren heute Hypertonie, Übergewicht, Hyperlipidämie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, männliches Geschlecht, Alter, aber auch die Lebensweise, wie kalorien- und fettreiche Ernährung, Rauchen, Stress sowie genetische und konstitutionelle Faktoren. Dem Cholesterin fällt bei dieser Aufzählung eine herausragende Rolle zu. Hinsichtlich der Frage welche Mechanismen zur Initiierung des komplexen atherosklerotischen Geschehens führen, haben sich in den letzten Jahrzehnten zwei zentrale Hypothesen herauskristallisiert. Laut der ‚*response to injury*‘-Hypothese von Ross *et al.* stellt die Verletzung der an das Blut grenzenden Endothelschicht den Auslöser für die Entstehung des atherosklerotischen Geschehens dar (Ross *et al.*, 1977). Hingegen berichtet Goldstein *et al.* in seiner ‚*lipoprotein-induced atherosclerosis*‘-Hypothese von einer raschen Aufnahme chemisch modifizierten LDLs (*engl. low density lipoprotein*) durch Makrophagen und der darauf folgenden Entwicklung zu Schaumzellen (Goldstein and Brown, 1977a; Goldstein and Brown, 1977b). Hierbei wird die modifizierte (oxidierte) Form des LDL, das sogenannte oxLDL, als Ursache für die Initiierung der Atherosklerose angesehen. OxLDL hat eine chemotaktische Wirkung auf die im Blut zirkulierenden Monozyten. Sowohl die Adhärenz am Endothel als auch die anschließende Penetration der Monozyten in den subendothelialen Raum wird durch oxLDL gefördert (Erl *et al.*, 1998; Ang *et al.*, 2011). Im Subendothelium erfolgt die Differenzierung zu Makrophagen. Makrophagen erkennen über sogenannte ‚*Scavenger*‘-Rezeptoren oxLDL, nehmen mehr und mehr LDL-Cholesterin-Partikel ungehemmt auf und entwickeln sich zu mit LDL übersättigten Schaumzellen (Hofnagel *et al.*, 2007). Kommt es zum Sterben und Auflösen der Schaumzellen, werden Lipide, LDL-Cholesterin und Kalk in den subendothelialen Raum entlassen. Diese erneute Freisetzung von LDL-Cholesterin rekrutiert erneut

Makrophagen zum Ort der Entzündung, so dass es vermehrt zur Bildung von Schaumzellen kommt und letztendlich zur Entstehung atherosklerotischer Plaques.

1.1.3 Dendritische Zellen

DCs werden auch als Wächter des Immunsystems bezeichnet. Sie können eine durch CD4⁺- und CD8⁺-T-Lymphozyten vermittelte Immunantwort initiieren, die Immunantwort durch Stimulation von T-Gedächtniszellen verstärken sowie immunologische Toleranz gegenüber Selbstantigenen vermitteln (Banchereau and Steinman, 1998). Somit stellen sie einen wichtigen Bestandteil des adaptiven Immunsystems dar.

Bereits 1868 berichtete Paul Langerhans von vermeintlichen Nervenzellen in der Haut mit zytoplasmatischen Ausläufern, welche nach ihm benannt wurden. 1973 wurden DCs erstmals von R. M. Steinman und Z. A. Cohn als Zellen mit Bäumchen-artige Cytoplasma-Ausläufern (*lat. Dendros*; Baum) in der Milz von Mäusen beschrieben (Steinman and Cohn, 1973). Ihrem Namen entsprechend verleihen diese Dendriten den Zellen ihre charakteristische sternförmige Gestalt. Die Funktion der DCs wurde allerdings erst Jahre später aufgeklärt (Steinman and Witmer, 1978). Es existieren verschiedene Typen von DCs. Zwar gehen alle aus einer pluripotenten CD34⁺ Stammzelle hervor, unterscheiden sich aber in ihrem Weg der Differenzierung (Shortman and Naik, 2007). Grundsätzlich sind im humanen System zwei Formen der DCs zu unterscheiden: die CD11c⁻ plasmazytoiden DCs (PDCs) und die CD11c⁺ myeloiden DCs (MDCs). Die PDC geht aus dem lymphoiden Entwicklungsweg hervor und ist im Blut und peripheren Lymphorganen lokalisiert. Sie weist keine Dendriten auf, hat eine lange Lebensdauer und stellt eine zirkulierende Zelle dar, welche nach Aktivierung Interferon- α (IFN- α) bildet (O'Keeffe et al., 2002; Liu et al., 2005). Zu den MDCs zählen die interstitiellen DCs und die Langerhans Zellen, die beide myeloiden Ursprungs sind. Interstitielle DCs sind im Interstitium der meisten Organe wie Herz, Leber, Niere, Pankreas, Darm, Haut, Urogenitaltrakt und Schilddrüse zu finden (Hart and Fabre, 1981). Langerhans Zellen befinden sich in der Haut und der Mukosa (Fahrback et al., 2007) und sind durch eine hohe Expression von Langerin in ihrer Plasmamembran und Birbeck-Granula im Zytoplasma ausgezeichnet (Shortman and Naik, 2007). In der vorliegenden Arbeit wurden lediglich Monozyten-abgeleitete DCs untersucht, welche den MDCs entsprechen.

MDCs kommen in großer Zahl als unreife Zellen in peripheren Geweben vor. Sie besitzen Dendriten, welche als Ausläufer in alle Raumrichtungen austrahlen, wodurch sie optimal darauf angepasst sind eindringende Pathogene und Antigene aufzunehmen. Die Aufnahme findet mittels Makropinozytose, Endozytose oder Phagozytose statt (Xiang et

al., 2006). Die Antigenaufnahme induziert zusammen mit inflammatorischen Zytokinen die Reifung und Migration der unreifen DC vom peripheren Gewebe zu den entsprechenden lymphatischen Organen. Dort werden die aufgenommenen Antigene intrazellulär zu Peptiden prozessiert, an Haupthistokompatibilitätskomplexe (*engl. major histocompatibility complex*; MHC) gebunden und an der Zelloberfläche präsentiert, so dass diese spezifisch von T-Lymphozyten erkannt werden. DCs exprimieren neben einer großen Menge von MHC-Antigen-Komplexen weitere kostimulatorische Moleküle, die zur T-Zellaktivierung notwendig sind, beispielsweise CD86. Die Interaktion zwischen DC und T-Zelle erfolgt zwar durch die Bindung des T-Zellrezeptors an den MHC-Klasse II-Antigen-Komplex, jedoch ist ein zweites Signal zur T-Zellaktivierung notwendig. Dieses Signal besteht aus der Interaktion von B7-Molekülen (CD80, CD86) auf der DC mit CD28 auf T-Lymphozyten. Bezüglich der Zytokinfreisetzung sind MDCs potente Produzenten von IL-12 und TNF- α , sowie IFN- α . Dabei ist lediglich eine DC notwendig, um bis zu 3000 T-Zellen zu aktivieren, wobei diese Interaktion zwischen 15 Stunden und 2 Tagen andauern kann (Moser, 2004). Der MHC-Klasse II-Antigen-Komplex aktiviert naive CD4⁺-T-Zellen, welche durch Zytokine induziert zu T_{H1}- oder T_{H2}-Zellen differenzieren. T_{H1}-Zellen sezernieren Zytokine, die zur Aktivierung von Makrophagen führen. T_{H2}-Zellen aktivieren B-Zellen. Der MHC-Klasse I-Antigen-Komplex interagiert hingegen mit naiven CD8⁺-T-Zellen. Diese werden zur Proliferation stimuliert und differenzieren zu zytotoxischen T-Zellen, welche in Tumorzellen oder mikrobiell befallenen Zellen Apoptose induzieren. Reife DCs haben eine Lebensdauer von 3 bis 4 Tagen, was die T-Zellaktivierung zeitlich begrenzt. Sie sterben durch Induktion von Apoptose über Hochregulation der Expression eines pro-apoptischen Proteins der Bcl-2 Familie, Bim (Hou and Van Parijs, 2004), und der Herabregulation der Expression des anti-apoptischen Proteins Bcl-2 (Moser, 2004).

DCs sind nicht nur eine wichtige Komponente des Immunsystems, sondern spielen auch in der Tumorbekämpfung eine große Rolle. Durch Vakzinierung mit *ex vivo* aus Monozyten generierten und mit Tumorantigen-beladenen DCs können *in vivo* zytotoxische T-Zellen aktiviert werden (Gong et al., 2000), welche sich gegen die Tumorantigene richten und so gezielt Apoptose in den Tumorzellen induzieren. Die Wirksamkeit einer solchen Immuntherapie konnte in verschiedenen Studien durch Kombination mit Zytostatika gesteigert werden, was sowohl im Mausmodell (Tanaka et al., 2002; Shin et al., 2003; Ramanathapuram et al., 2005) als auch im Menschen (Morisaki et al., 2003; Kashimura et al., 2004; Holtl et al., 2005) gezeigt wurde.

Diesbezüglich wurde bereits die Sensitivität gegenüber alkylierenden Agenzien, welche auch in der Tumorthherapie eingesetzt werden, sowie die Reparaturkapazität von Monozyten und daraus abgeleiteten DCs untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Zytokin-

gesteuerte Differenzierung von Monozyten zu DCs die Sensitivität der Zellen gegenüber Alkylantien und auch deren Reparaturkapazität beeinflusst (Briegert et al., 2007; Briegert and Kaina, 2007). Monozyten haben im Vergleich zu DCs eine hohe Sensitivität gegenüber alkylierenden Agenzien, wie Temozolomid, MMS oder MNNG, was durch einen Defekt in der Basenexzisionsreparatur (*engl. Base excision repair*; BER) erklärt wird. Dieser Defekt wird durch die Zytokin-gesteuerte Differenzierung zu DCs aufgehoben, was die Zellen resistenter gegenüber Alkylantien macht.

1.2 Induktion von DNA-Schäden

DNA-Schäden entstehen täglich in großer Menge und spielen eine bedeutende Rolle während der Mutagenese, Karzinogenese und während des Alterungsprozesses. Sowohl durch exogene als auch durch endogene Faktoren können Schäden in der DNA induziert werden. Zu den exogenen Faktoren gehören physikalische Mutagene wie UV-Licht und ionisierende Strahlung sowie chemische Mutagene wie polyzyklische Kohlenwasserstoffe (z.B. Benzpyren), welche im Zigarettenrauch vorkommen oder alkylierende Substanzen (z.B. Nitrosamine), die in der Nahrung enthalten sein können. Endogene Faktoren sind chemische Genotoxine, welche während des Stoffwechsels entstehen. Dazu gehören reaktive Sauerstoffspezies (*engl. reactive oxygen species*; ROS) oder spontane chemische Reaktionen wie die hydrolytische Desaminierung (Entstehung einer anderen Base durch Abspaltung von Ammoniak, z.B. Cytosin wird zu Uracil) und die hydrolytische Depurinierung (die Base wird vollständig vom Zucker abgespalten). Nicht repariert können solche DNA-Schäden zu einer dauerhaften Veränderung des Erbguts in Form von Mutationen und chromosomalen Aberrationen führen, welche zu Krebs, Zelltod oder zellulärer Seneszenz und damit zum Alterungsprozess des Organismus beitragen.

1.2.1 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress

1.2.1.1 Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies

ROS (siehe Tab. 1.1) entstehen in allen aeroben Organismen während des mitochondrialen Stoffwechsels, während molekularer Sauerstoff sequentiell zu Wasser reduziert wird. ROS sind an der Entstehung von Krebs, an Alterungsprozessen, an Entzündungsreaktionen sowie vielen zellulären Prozessen wie der Signaltransduktion beteiligt.

Tabelle 1.1: Übersicht verschiedener ROS.

Bezeichnung	Formel
Superoxidanion-Radikal	$O_2^{\cdot-}$
Wasserstoffperoxid	H_2O_2
Hydroxylradikal	OH^{\cdot}
Singulett-Sauerstoff	1O_2
Alkylradikal	R^{\cdot}
Alkoxyradikal	RO^{\cdot}
Peroxyradikal	ROO^{\cdot}
Stickstoffmonoxid	NO
Peroxynitrit	$ONOO^{\cdot-}$

Superoxidanion-Radikale ($O_2^{\cdot-}$) sind die am häufigsten endogen gebildeten ROS, da in der mitochondrialen Atmungskette etwa 1 bis 3% des gesamten Sauerstoffs unvollständig, lediglich bis zum Superoxidanion-Radikal reduziert wird. Die sequentielle Reduktion von Sauerstoff ist in Abb. 1.2 dargestellt.

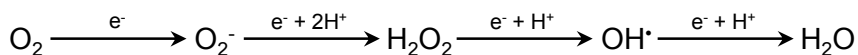


Abb. 1.2: Sequentielle Reduktion von molekularem Sauerstoff über Superoxidanion-Radikal, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikal zu Wasser.

Neben der Atmungskette werden Superoxidanion-Radikale auch im Zuge anderer Enzymreaktionen gebildet. Beispiele hierfür sind der Arachidonsäuremetabolismus, der ‚respiratory burst‘ von Abwehrzellen sowie der Purinabbau durch das Xanthinoxidase-System. Aufgrund seiner Ladung ist es dem Superoxidanion-Radikal nicht möglich, biologische Membranen zu durchdringen. Unter physiologischen Bedingungen unterliegt es einer spontanen Dismutation zu H_2O_2 und molekularem Sauerstoff (O_2) (Abb. 1.3), wobei diese Reaktion auch enzymatisch katalysiert über die SOD erfolgt.

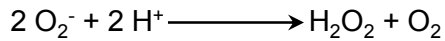


Abb. 1.3: Spontane Dismutation von Superoxidanion-Radikalen.

H_2O_2 kann zusätzlich zur bivalenten Reduktion von Sauerstoff und der spontanen Dismutation von Superoxidanion-Radikalen auch durch spezifische, vor allem in der Leber lokalisierte Oxidasen gebildet werden. Aufgrund seiner geringen Polarität kann H_2O_2 im Gegensatz zu Superoxidanion-Radikalen biologische Membranen durchdringen. Beide Radikalspezies sind Vorstufen weitaus aggressiverer Radikalspezies. Durch Superoxidanion-Radikale erfolgt eine Reduktion von Metallionen, insbesondere Eisen und Kupfer. Die reduzierten Metallionen können wiederum H_2O_2 in der sogenannten Fenton-Reaktion zu Hydroxylradikalen (OH^\bullet) und deren Anionen umsetzen. Insgesamt wird dabei von der metallkatalysierten Haber-Weiss-Reaktion gesprochen (Abb. 1.4) (Halliwell and Gutteridge, 1984; Halliwell and Aruoma, 1991).

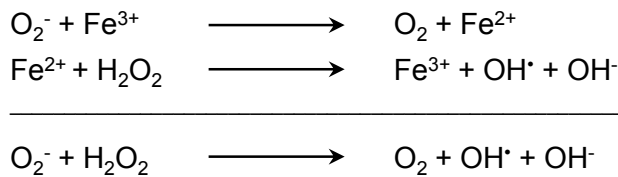


Abb. 1.4: Metallkatalysierte Bildung von Hydroxylradikalen.

Zusätzlich zur Bildung von Hydroxylradikalen ist die Toxizität von Superoxid auch auf die Reaktion mit Stickstoffmonoxid (NO) unter Entstehung von Peroxynitrit (ONOO^-) zurückzuführen (Duchstein et al., 1999). Die in der Haber-Weiss-Reaktion entstehenden Hydroxylradikale besitzen eine sehr hohe Reaktivität. Sie reagieren mit nahezu allen zellulären Molekülen wie Lipiden, Proteinen, Nukleinsäuren und Kohlenhydraten, wodurch sie für die Zelle äußerst toxisch sind (Halliwell and Gutteridge, 1984; Halliwell and Aruoma, 1991).

Eine weitere ROS, die mit der DNA reagieren kann, ist der Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$). Dieser kann sowohl photochemisch durch Photosensibilisierung als auch chemisch durch enzymatische Oxidationen in der Zelle gebildet werden (Epe, 1991). Desweiteren werden auch Alkyl- (R^\bullet), Alkoxy- (RO^\bullet) und Peroxylradikale (ROO^\bullet) zu den ROS gezählt. Diese entstehen aus ungesättigten Fettsäuren in Lipidmembranen, insbesondere bei

Anwesenheit von katalysierenden Metallionen durch Angriff von ROS oder RNS und durch die Enzyme Cyclooxygenase und Lipoxygenase (Marnett and Plataras, 2001). Folgeprodukte der Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind reaktive elektrophile Verbindungen wie Acrolein, Crotonaldehyd, Malondialdehyd und 4-Hydroxynonenal, welche die DNA angreifen und zur Bildung von Ethenoaddukten führen (Bartsch and Nair, 2000; Marnett, 2000; Marnett and Plataras, 2001).

Zum Abfangen dieser freien Radikale stehen der Zelle als primärer Schutz sowohl enzymatische als auch nicht-enzymatische Radikalfänger und Antioxidantien zur Verfügung. Zu diesem antioxidativem Schutzsystem gehören Enzyme wie die SOD, Katalasen und Peroxidasen. Diese Enzyme enthalten als essentielle Cofaktoren die Mineralstoffe Eisen und Zink sowie die Spurenelemente Kupfer, Mangan und Selen. Als zusätzliche Radikalfänger dienen der Zelle Vitamin C und E, Ubichinone (Coenzym Q10) und Glutathion. Auch in der Nahrung sind natürliche Antioxidantien wie Carotinoide und Resveratrol enthalten, welche für das detoxifizierende System nicht notwendig sind, es aber unterstützen können.

1.2.1.2 Biologische Konsequenzen der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

Kommt es zu einer Schädigung oder Überlastung des antioxidativen Schutzsystems, entsteht zwischen der Bildung und dem Abbau freier Radikale bzw. ROS ein Ungleichgewicht. Die daraus resultierende vermehrte Bildung von ROS wird als oxidativer Stress bezeichnet. Biologische Konsequenzen des oxidativen Stresses für eine Zelle sind Lipidperoxidation, Proteinoxidation und Schädigung der DNA.

Als Lipidperoxidation wird die radikalische Oxidation ungesättigter Fettsäuren bezeichnet. Dabei entstehen verschiedenen reaktive Aldehyde, wie Malondialdehyd und Radikale, die die DNA angreifen und diese chemisch modifizieren. Zusätzlich führt die Lipidperoxidation auch direkt zur Schädigung von Phospholipiden der Zellmembran.

Werden Proteine durch ROS oxidiert, kommt es zu Störungen bzw. Verlust der Struktur sowie der enzymatischen Aktivität der Proteine.

Zu den oxidativen DNA-Schäden zählen Strangbrüche im Zucker-Phosphat-Rückgrat bei einem oder beiden DNA-Strängen, oxidierte Basen, apurine/apyrimidine Stellen (AP-Stellen) durch Hydrolyse der glycosidischen Bindung zwischen Base und Zucker der DNA, sowie DNA-DNA- und DNA-Protein-Quervernetzungen (Halliwell and Aruoma, 1991; Epe, 1996; Marnett, 2000).

Aufgrund des niedrigen Oxidationspotentials von Guanin (Huttermann, 1982) ist 8-oxo-7,8-Dihydroguanin (8-oxoG) die dominierende oxidative DNA-Läsion. Während der Replikation kommt es zur Fehlpaarung zwischen 8-oxoG und Adenin, wodurch dieser Läsion ein hohes promutagenes Potenzial zugesprochen wird (Tchou and Grollman, 1993).

1.2.1.3 Generierung reaktiver Sauerstoffspezies in vitro

Experimentell können ROS beispielsweise durch *tert*-Butylhydroperoxid (*tert*-BOOH) oder H₂O₂ induziert werden. Zum Mechanismus der *tert*-BOOH-vermittelten Schadensinduktion ist nur wenig bekannt. In U937-Zellen (humane myeloische Leukemiezellen) induzierte *tert*-BOOH Strangbrüche, wobei eine Ca²⁺-abhängige Bildung von H₂O₂ in den Mitochondrien beteiligt zu sein scheint (Guidarelli et al., 1997b). Die durch *tert*-BOOH erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration führt möglicherweise zur Aktivierung von Endonukleasen, was letztendlich die Entstehung der DNA-Strangbrüche erklären würde (Latour et al., 1995; Guidarelli et al., 1997a). Zusätzlich scheinen auch Eisenionen am Mechanismus der Strangbruchbildung über Fentonkatalyse beteiligt zu sein (Latour et al., 1995). Desweiteren führte die Behandlung mit *tert*-BOOH zu Lipidperoxidation, Glutathiondepletion und Inhibition der ATP-Synthese (Guidarelli et al., 1997b).

H₂O₂ führt zur Induktion oxidativer DNA-Schäden (Epe, 1996), wobei der Mechanismus der DNA-Schädigung durch H₂O₂ nicht vollständig aufgeklärt ist. Eine Möglichkeit stellt die Bildung von Hydroxylradikalen durch intrazelluläre Reaktionen von H₂O₂ mit Übergangsmetallen wie Eisen- und Kupferionen, dar. Dabei scheinen die reduzierten Formen der Übergangsmetalle Fe²⁺ und Cu⁺ eine höhere katalytische Aktivität zu besitzen als die oxidierten Formen (Halliwell and Gutteridge, 1990). Experimente mit der SOD zeigten, dass unter bestimmten Umständen teilweise auch das Superoxidation-Radikal an der Hydroxylradikalbildung durch H₂O₂ beteiligt sein kann (Aruoma et al., 1989).

1.2.2 Ionisierende Strahlung

Ionisierende Strahlung (IR) ist eine Bezeichnung für Strahlung, die beim Durchdringen von Materie so viel Energie abgibt, dass es dabei zur Ionisation von Atomen kommt. Dies bewirkt Freisetzung von Elektronen aus Atomen oder Molekülen, wodurch positiv

geladenen Ionen oder Molekülreste entstehen (Ionisation). Generell wird die IR in direkt oder indirekt ionisierende Strahlung unterteilt.

Zur direkt ionisierenden Strahlung werden α -, β^+ -, β^- -Teilchen, Elektronen und Protonen gezählt. Beim Durchdringen von Materie treten diese geladenen Teilchen aufgrund ihrer Ladung direkt mit den Atomen in Wechselwirkung. Dabei werden beim Auftreffen auf Materie die energiereichen Teilchen abgebremst, so dass Energie über Ionisierungs- oder Anregungsprozesse abgegeben wird. Zur indirekt ionisierenden Strahlung gehören neben Neutronen auch Photonen, wie Röntgen und γ -Strahlung, welche aufgrund ihrer fehlenden Ladung nicht direkt mit den Atomen wechselwirken können.

Die indirekte Ionisierung erfolgt über die Bildung geladener Sekundärteilchen. Zusätzlich sei zu erwähnen, dass sich Röntgen- und γ -Strahlung nicht in ihren Eigenschaften, sondern in ihrer Entstehungsweise unterscheiden. Röntgenstrahlung entsteht durch die Erzeugung beschleunigter Elektronen, γ -Strahlung hingegen durch den Zerfall radioaktiver Elemente z.B. Cäsium.

Die durch Strahlung beim Durchgang durch Materie abgegebene Energie wird als Dosis quantifiziert und als absorbierte Energie pro Masse definiert. Die absorbierte Dosis wird in der Einheit Gray (Gy) angegeben.

Aufgrund der Ionisation kommt es zur Veränderung der Energieverhältnisse innerhalb eines Moleküls. Dies führt zur Dissoziation des Moleküls und es kommt zur Entstehung freier Radikale. Freie Radikale, Ionen und angeregte Atome reagieren untereinander sowie mit ihrer direkten Umgebung, es kommt zur Schädigung biologischer Moleküle wie der Zellmembran, von Enzymen und der DNA. Die Schädigung der DNA wird als Hauptursache für die Induktion von Zelltod nach Behandlung mit IR angesehen (Munro, 1970). DNA-Schäden können entweder direkt oder indirekt durch IR hervorgerufen werden. Die Schädigung erfolgt direkt, wenn ein Strahlungsteilchen selbst oder ein Sekundärteilchen seine Energie direkt an die DNA abgeben, was zur Bildung von DNA-Einzelstrangbrüchen (ESBs) und DNA-Doppelstrangbrüchen (DSBs) führt. Bei der indirekten Strahlungswirkung trifft die ionisierende Strahlung zunächst auf ein Wassermolekül, es kommt zur Radiolyse des Wassers, dem Hauptbestandteil einer Zelle. Die Wassermoleküle werden gespalten. Dabei entstehen oxidierende Hydroxylradikale und reduzierende H-Radikale (H^\cdot). Diese hoch reaktiven Hydroxylradikale reagieren mit annähernd allen Molekülen der Zelle (Kohlenhydrate, Lipide, Proteine, Nukleinsäuren). Aufgrund dieser hohen Toxizität wird vermutet, dass zweidrittel der durch IR-induzierten DNA-Schäden durch Hydroxylradikale verursacht werden (Ward, 1985; Dahm-Daphi et al., 2000). Allerdings sind diese Radikale nur kurzlebig, weswegen sie im Umkreis

weniger Nanometer um die DNA entstehen müssen, um diese zu schädigen (Ward, 1985; Ward et al., 1987). Letztendlich werden durch IR verschiedene Arten von DNA-Schäden erzeugt: ESBs und DSBs, ‚*locally-multiply-damaged-sites*‘ (LMDS), Basenfreisetzung durch Spaltung von Zucker-Basen-Bindungen, Basenfehlpaarungen, Basendefekte durch Desaminierung und Oxidierung des Pyrimidinringes und Spaltung des Purinringes, DNA-Protein-Vernetzungen und Quervernetzungen der DNA durch Bildung intra- und intermolekularer Bindungen. Die bedeutendste Basenveränderung ist hierbei das 8-oxoG (Tchou and Grollman, 1993). Zum einen wegen ihrer Häufigkeit, zum anderen wegen ihres mutagenen Potentials. Als LMDS werden Stellen bezeichnet, an denen innerhalb eines begrenzten Bereichs von bis zu 10 Basenpaaren mehrfache Schäden am Zucker-Phosphat-Rückgrat oder Basenschäden auftreten (Ward, 1985). Eine örtliche Ansammlung von Radikalen kann auf den Umstand zurückgeführt werden, dass die Abgabe der Strahlungsenergie an die Materie nicht homogen erfolgt. Durch die Reaktion eines Hydroxylradikals mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA kommt es zur Spaltung der Phosphodiesterbindung und zur Entstehung eines ESBs. Kommt es zur Schädigung des Zucker-Phosphat-Rückgrats beider DNA-Einzelstränge innerhalb von 10 Basenpaaren, so dass auf beiden Seiten jeweils ein Einzelstrangbruch gebildet wird, entsteht ein DSB (Friedland et al., 1999). Die Bestrahlung mit 1 Gy führt pro Zelle zu etwa 1000 Basenschäden, 1000 ESBs und 20 bis 40 DSBs (Ward, 1988; Lobrich et al., 1995; Rogakou et al., 1998; Dahm-Daphi et al., 2000; Golden et al., 2012). Trotz ihrer geringen Häufigkeit im Vergleich zu Basenschäden und ESBs stellen DSBs eine der schwerwiegendsten Läsionen für Zellen dar. Bereits ein einziger DSB kann für einen mehrzelligen Organismus tödlich sein, insofern ein essentielles Gen betroffen ist (Khanna and Jackson, 2001). Im Fall einer nicht-korrekten Reparatur können DSBs auch zu Mutationen, chromosomalen Aberrationen und zur Entstehung von Krebs führen (Zhang et al., 2007). Zu deren Vermeidung haben Zellen sehr effiziente und komplexe Reparaturmechanismen entwickelt.

1.2.3 Temozolomid

Temozolomid (TMZ, Temodal[®]) gehört zur Gruppe der monofunktionellen methylierenden Agenzien. In der Chemotherapie wird es peroral angewendet und zur Therapie von Glioblastomen und malignen Melanomen eingesetzt (Stupp et al., 2005b; Bei et al., 2010). Es bildet durch spontane Hydrolyse bei physiologischem pH den aktiven Metaboliten 5-(3-Methyltriazin-1-yl)imidazol-4-Carboxamid (MTIC), welcher mit der DNA reagiert (Newlands et al., 1997). Weitere Vertreter der in der Chemotherapie verwendeten monofunktionellen Agenzien sind Procarbazin (PCZ), Dacarbazin (DTIC) und

Streptozotocin (STZ). Während PCZ und DTIC metabolisch aktiviert werden müssen (Goria-Gatti et al., 1992; Reid et al., 1999), kann STZ ohne metabolische Aktivierung die DNA methylieren (Bolzan and Bianchi, 2002).

Die zytotoxische Wirkung dieser Tumorchemotherapeutika wird durch Methylierung der DNA hervorgerufen. Diese erfolgt über eine nukleophile Substitution nach dem S_N1 -Mechanismus, weshalb sie den S_N1 -Alkylanzien zugeordnet werden. Dabei wird eine Methylgruppe vor allem an die Ringstickstoff- oder Ringsauerstoffatome der DNA-Basen angehängt. Die Methylierung der DNA erfolgt an insgesamt 13 Stellen. Mit einem Anteil von 80 bis 95% stellt die N7-Position des Guanins (N7-MeG) die am häufigsten methylierte Stelle der DNA dar. Die zweithäufigste Methylierung erfolgt an der N3-Position des Adenins (N3-MeA). Die Reparatur dieser zwei Läsionen sowie des N3-Methylguanins (N3-MeG) erfolgt über die BER. N3-MeA und N3-MeG sind instabile Läsionen, welche zusätzlich durch spontane Hydrolyse von der Base abgespalten werden können. N1-Methyladenin (N1-MeA) und N3-Methylcytosin (N3-MeC) werden durch die Reparaturproteine ABH2 und ABH3 entfernt. Desweiteren erfolgen Methylierungen an den Positionen N3-Methylthymine (N3-MeT), N1-Methylguanin (N1-MeG), N7-Methyladenin (N7-MeA), O⁴-Methylthymine (O⁴-MeT) und O²-Methylcytosin (O²-MeC) sowie am Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA. Auf welche Weise diese Methylierungen repariert werden, konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Die größte Mutagenität kommt jedoch der Methylierung an der O⁶-Position des Guanins (O⁶-MeG) zu. Diese ist mit einem maximalen Anteil von lediglich 8% für Temozolomid und 0,3% für das experimentell häufig verwendete Methylanz MMS, welches zu den S_N2 -Alkylanzien gehört und eine hohe Affinität zum Stickstoff der DNA Basen hat, vergleichsweise selten (Beranek, 1990). Wie O⁴-Methylthymine (O⁴-MeT) ist auch O⁶-MeG ein Substrat der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT). Wird O⁶MeG jedoch nicht repariert, kommt es im Verlauf der DNA-Replikation zu einer Fehlpaarung mit Thymin anstelle von Cytosin (Toorchen and Topal, 1983). Diese Basenfehlpaarung wird von der Fehlpaarungsreparatur (*engl. Mismatch repair*; MMR) erkannt und prozessiert. Dieser Prozess ist proliferationsabhängig (Roos et al., 2004) und kann zur Induktion von Sekundärläsionen in Form von DSBs sowie zu Mutationen und Zelltod führen. In nicht-proliferierenden Zellen wird die Toxizität von Temozolomid hauptsächlich über die Induktion von N-Methylierungen vermittelt (Lindahl, 2000; Briegert and Kaina, 2007).

Neben seiner Zytotoxizität zeichnet sich Temozolomid als Nitrosoharnstoffverbindung auch durch seine hohe Lipophilie aus. Die dadurch bedingte hohe Liquorgängigkeit sowie seine hohe Bioverfügbarkeit scheinen zur Wirksamkeit bei der Chemotherapie von Gliomen beizutragen. Zu den unerwünschten Wirkungen von Temozolomid gehören eine

verzögerte Knochenmarksdepression, Thrombozytopenie und Leukozytopenie, die 3 bis 5 bzw. 4 bis 6 Wochen nach Therapiebeginn auftreten und bis zu 60 Tage andauern können sowie Hepato- und Lungentoxizität.

1.3 Reparatur von DNA-Schäden

Eukaryotische Zellen besitzen eine Vielfalt von DNA-Reparaturmechanismen, welche ihnen die Prozessierung unterschiedlichster DNA-Läsionen ermöglicht (Yu et al., 1999; Christmann et al., 2003). Hierzu zählen die Schadensreversion von O⁶-Alkylguanin durch MGMT, die Exzision von Basenfehlpaarungen der DNA durch die MMR, die Exzision von grösseren Basenschäden wie 6–4-Photoproducte (6-4PPs) oder Cyclobutan-Pyrimidindimere (CPDs) durch die Nukleotidexzisionsreparatur (*engl. Nucleotide excision repair*, NER), die Exzision kleiner DNA-Schäden wie alkylierte oder oxidierte Basen durch die BER, sowie die Prozessierung von DNA-Doppelstrangbrüchen über die homologe Rekombination (*engl. Homologous recombination*; HR) oder die nicht-homologe Endverknüpfung (*engl. Non-homologous end joining*; NHEJ).

1.3.1 O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase

Das humane MGMT-Gen ist auf dem Chromosom 10q26 lokalisiert und kodiert für ein 207 Aminosäure großes Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 24 kDa (Margison et al., 2003). MGMT repariert O⁶-Alkylierungen des Guanins und Thymins, wie beispielsweise O⁶-MeG, das durch die Chemotherapeutika Temozolomid, PCZ und DTIC induziert wird. Die Reparatur erfolgt durch eine Ein-Schritt-Reaktion, in der die Alkylgruppe von der Base auf einen Cystein-Rest im aktiven Zentrum des MGMT-Suizid-Enzyms übertragen wird (Pegg et al., 1993; Pegg et al., 1995); (Xu-Welliver and Pegg, 2002). Dies führt zur irreversiblen Inaktivierung und Degradierung (durch Ubiquitinierung und anschließendem proteosomalen Abbau) des MGMT-Proteins (Xu-Welliver and Pegg, 2002). Daher wird MGMT auch als „Suizidenzym“ bezeichnet.

Eine Induktion der MGMT-Expression konnte nach genotoxischen Stress erstmals in Ratten-Hepatozyten nachgewiesen werden (Fritz et al., 1991). Diese zeigte eine adaptive zelluläre Antwort auf mutagenen und zytotoxischen Stress. Die Regulation der Expression von MGMT wird durch Gen- und Promotormethylierung gesteuert. Durch Methylierung des MGMT-Promotors kommt es zur Inhibierung der Expression des MGMT-Gens (Qian

and Brent, 1997; Watts et al., 1997). Hingegen nimmt durch Methylierung des MGMT-Gens die Expression von MGMT zu (Pieper et al., 1991; Christmann et al., 2001).

Die Regulation der MGMT Expression und Aktivität kann auch transkriptionell durch das Tumorsuppressorprotein p53 erfolgen. Eine p53-abhängige Induktion der MGMT Aktivität sowie der Expression nach γ -Bestrahlung konnte *in vivo* bei Mäusen bzw. *in vitro* bei Mausfibroblasten und Rattenhepatomzellen beobachtet werden (Rafferty et al., 1996; Grombacher et al., 1998). Dementgegen wurde mittels Transfektion *in vitro* auch gezeigt, dass funktionelles p53 zu einer Herabregulation der MGMT-Promotoraktivität führt (Harris et al., 1996; Grombacher et al., 1998). Zusätzlich wurde auch *in vivo* in Tumoren mit funktionellem p53 eine Abnahme der MGMT Aktivität beobachtet (Hengstler et al., 1999). Es scheint, dass p53 sowohl die basale MGMT Expression inhibieren als auch nach DNA-Schädigung induzieren kann.

1.3.2 Basenexzisions- und DNA-Einzelstrangbruchreparatur

1.3.2.1 Basenexzisionsreparatur

Die Hauptaufgabe der BER ist die Reparatur sogenannter ‚*non-bulky*‘ Basenmodifikationen, welche die DNA-Struktur nur gering verändern (Yu et al., 1999). Häufig entstehen diese während des normalen Zellmetabolismus durch Alkylierungen oder Desaminierungen. Sie entstehen aber auch durch ROS-induzierte oxidative Schädigungen oder durch Replikationsfehler (Krokan et al., 2000). Beispiele solcher DNA-Schäden sind N-Alkylierungen an Purinbasen (N7-MeG, N3-MeA, N3-MeG), deaminierte Basen (das über Deaminierung aus Cytosin entstandene Uracil), oxidative Läsionen (8-oxoG und Thyminglykol) und durch spontane Hydrolyse entstandene AP-Stellen. Viele dieser Läsionen werden durch Umweltmutagene, im Tabak enthaltene Schadstoffe (Nitrosamine), und durch IR induziert.

Die BER unterteilt sich in ‚*short-patch*‘ und ‚*long-patch*‘ BER (Christmann et al., 2003). Während der ‚*short-patch*‘ BER kommt es zur Exzision und zum Einbau eines Nukleotides, was die häufigste Form der BER darstellt. Hingegen werden bei der ‚*long-patch*‘ BER mehrerer Nukleotide (10-12 bp) ersetzt. Der Mechanismus der BER ist in Abb. 1.5 dargestellt und wird im folgenden Text erläutert. Die Erkennung und Exzision der modifizierten DNA-Base erfolgt zunächst über DNA-Glykosylasen. Durch hydrolytische Spaltung der N-glykosidischen Bindung zwischen Base und Desoxyribose wird die geschädigte Base entfernt und es entsteht eine AP-Stelle in der DNA. Es sind bis zu 12 verschiedene Glykosylasen beschrieben worden. Abhängig von ihrer Enzymaktivität

werden sie in Typ I- und Typ II-Glykosylasen unterteilt und unterscheiden sich generell durch unterschiedliche Substratspezifitäten (Christmann et al., 2003). Monofunktionale Typ I-Glykosylasen entfernen lediglich die geschädigte Base. Ein Beispiel hierfür ist die *N*-Methylpurin-DNA-Glykosylase (MPG) (O'Connor and Laval, 1991), welche *N*-alkylierte Basen wie das N7-MeG erkennt und entfernt. Neben den monofunktionalen Glykosylasen existieren auch bifunktionale Typ II-Glykosylasen. Diese besitzen zusätzlich eine AP-Lyaseaktivität, wodurch sie fähig sind die DNA an der AP-Stelle einzuschneiden. Zu den Typ II-Glykosylasen gehört beispielsweise die 8-oxoG-DNA-Glykosylase 1 (OGG1) (Rosenquist et al., 1997), welche die oxidative DNA-Läsion 8-oxoG erkennt, entfernt und die DNA an der entstandenen AP-Stelle einschneidet. Dieser Einschnitt erfolgt im Fall der Typ I-Glykosylasen durch die AP-Endonuklease (APE alias HAP1, BAP1, APEX, REF1). Der durch APE erfolgte hydrolytische Einschnitt am 5'-Ende der basenfreien Desoxyribose (AP-Stelle) führt zur Bildung von 5'-Desoxyribose-5-Phosphat (dRP) und einem 3'-OH Rest. Es entsteht ein ESB in 5'-Richtung der AP-Stelle (Robson and Hickson, 1991; Wilson and Barsky, 2001). Analog hierzu entsteht durch das Einschneiden der DNA durch die die Typ II-Glykosylasen ein ESB in 3'-Richtung zur AP-Stelle. Der 5'-dRP-Rest wird anschließend durch die Lyaseaktivität der Pol β mittels β -Elimination entfernt (Sobol et al., 2000) und es erfolgt der Einbau eines neuen Nukleotids durch die Polymerase β (Pol β) (Sobol et al., 1996). Nicht-ligierbare Enden werden beispielsweise durch Aprataxin (Ahel et al., 2006) oder die Polynukleotidkinase (PNK) (Breslin and Caldecott, 2009) für die weitere Prozessierung vorbereitet. Abschließend erfolgt die Ligation der DNA durch den XRCC1/Ligase III α -Komplex (Tomkinson et al., 2001).

Bei der ‚*long-patch*‘ BER erfolgt der Austausch mehrerer Nukleotide. Nach dem Einbau eines Nukleotids durch die Pol β und deren Dissoziation erfolgt die Strangverdrängung und der Einbau weiterer Nukleotide durch die Pol δ oder ϵ , zusammen mit PCNA (*engl. proliferating cell nuclear antigen*) und dem Replikationsfaktor C (RF-C) (Stucki et al., 1998). PCNA stimuliert zusätzlich Fen-1 (*engl. Flap structure-specific endonuclease 1*), welches über seine Endonuklease-Aktivität die verdrängten Oligonukleotide des 5'-Desoxynukleotid-5-Phosphatendes, auch 5'-dRPflap genannt, entfernt (Klungland and Lindahl, 1997; Dianova et al., 2001). Die Ligation erfolgt durch die Ligase I, welche ebenfalls mit PCNA interagiert (Tomkinson et al., 2001).

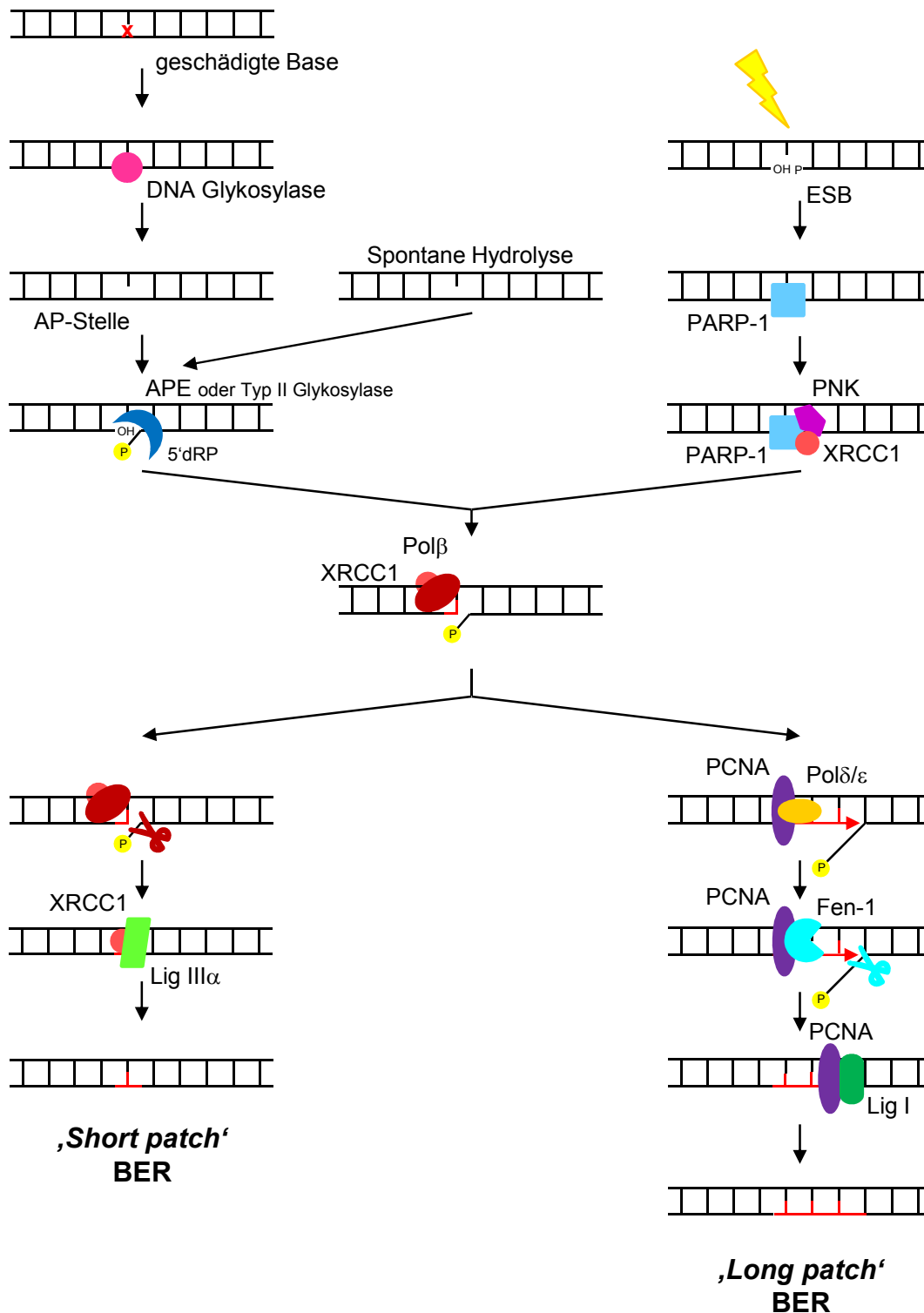


Abb. 1.5: Mechanismus der BER und DNA-Einzelstrangbruchreparatur. Reparatur eines Basenschadens, einer durch spontane Hydrolyse entstandenen AP-Stelle, sowie eines ESBs durch das System der BER.

Welcher Mechanismus der BER, ob ‚short‘- oder ‚long-patch‘, zur Prozessierung einer AP-Stelle verwendet wird, ist noch nicht vollständig geklärt. Sowohl die chemische Struktur der AP-Stelle, als auch Läsionsspezifitäten oder auch Protein-Protein-Interaktionen

beeinflussen den Verlauf der Reparatur (Fortini and Dogliotti, 2007). AP-Stellen liegen entweder als ringförmige α,β -Hemiazetat oder als offenkettige oder hydratisierte Aldehyde vor (Beger and Bolton, 1998). AP-Stellen weisen regulär die hemiazetale Form auf, welche über die ‚*short-patch*‘ BER prozessiert wird. 8-oxoG ist beispielsweise eine Läsion, die überwiegend über die ‚*short-patch*‘ BER repariert wird (Fortini and Dogliotti, 2007). Hingegen sind oxidierte oder reduzierte Aldehyde resistent gegenüber der Pol β vermittelten β -Elimination des 5'-dRP Rests und werden daher über die ‚*long-patch*‘ BER repariert (Christmann et al., 2003). Ebenso werden Läsionen wie Tetrahydrofuran (Matsumoto et al., 1994), Uracil (Bennett et al., 2001) oder C1-oxidierte AP-Stellen (Sung et al., 2005) über die ‚*long-patch*‘ BER prozessiert. Desweiteren bestimmen auch Protein-Protein-Interaktionen der BER-Komponenten, ob die Prozessierung über die ‚*short patch*‘- oder die ‚*long-patch*‘ BER erfolgt.

Ein Protein mit einer bedeutenden Rolle in der Koordination der BER ist XRCC1 (*engl. X-ray repair cross complementing protein 1*) (Thompson et al., 1990). XRCC1 besitzt zwar keine katalytische Aktivität, beeinflusst aber als Gerüstprotein die Stabilität und Aktivität anderer Proteine. So ist die Interaktion mit XRCC1 für die *in vivo* Stabilität der DNA Ligase III α und somit auch für die ‚*short-patch*‘ BER entscheidend (Caldecott et al., 1994). Neben Ligase III α interagiert XRCC1 auch mit weiteren Proteinen der BER wie APE (Vidal et al., 2001), Pol β (Kubota et al., 1996), PCNA (Fan et al., 2004), Aprataxin (Date et al., 2004; Gueven et al., 2004), PNK (Whitehouse et al., 2001) und der Poly-ADP-Ribose-Polymerase-1 und 2 (PARP-1, PARP-2) (Caldecott et al., 1996; Leppard et al., 2003). Kann Pol β durch Mutationen im XRCC1/Ligase III α -Komplex keine Interaktion mit diesem Komplex mehr eingehen, führt dies zum Abbruch der ‚*short-patch*‘ BER (Dianova et al., 2004). Die Interaktion von XRCC1 mit PCNA ist hingegen für die ‚*long-patch*‘-BER von Bedeutung (Matsumoto, 2001; Fan et al., 2004). Somit spielt XRCC1 sowohl in der ‚*short-patch*‘ als auch in der ‚*long-patch*‘ BER eine kritische Rolle.

Ein weiterer entscheidender Faktor für den Ablauf der BER ist die ATP Konzentration. Bei niedriger ATP Konzentration stimuliert die Interaktion von Pol β mit XRCC1 die Strangverdrängung durch Pol β , was zur ‚*long-patch*‘ BER führt. Bei einem Überschuß an ATP verhindert die Ligation durch Ligase III α die Strangverdrängung und bewirkt so die Reparatur über die ‚*short-patch*‘ BER (Petermann et al., 2006).

Desweiteren scheint auch der Differenzierungs- und Proliferationsstaus der Zelle einen Einfluß auf deren BER-Kapazität zu haben. Ein Vergleich der BER-Kapazität von proliferierenden Maus-Myoblasten und deren ausdifferenzierten nicht-proliferierenden Pendant den Myotuben zeigte, dass mit Abnahme der Proliferation während der

Muskelzellendifferenzierung sowohl die ‚*long-patch*‘ als auch die ‚*short-patch*‘ BER-Kapazität dramatisch abnimmt (Narciso et al., 2007). Dies wird durch die in Myotuben fehlende Expression von Ligase I und die während der Differenzierung abnehmende Expression von XRCC1 und Ligase III α erklärt. Im Gegensatz hierzu konnte während der *in vitro* Differenzierung von humanen Monozyten zu DCs eine Steigerung der BER-Kapazität beobachtet werden (Briegert and Kaina, 2007). Menschliche Monozyten zeigten keine Expression von XRCC1 und Ligase III α . Diese werden während der Differenzierung zu DCs in messbaren Mengen hochreguliert. Dabei ist zu erwähnen, dass sich Monozyten und DCs in der G1-Phase des Zellzyklusses befinden, demnach nicht proliferieren und somit der Proliferationsstatus der Zelle in diesem Modellsystem keine Rolle spielt.

1.3.2.2 DNA-Einzelstrangbruchreparatur

Zusätzlich zu den Basenmodifikationen werden auch ESBs über die BER repariert (Abb. 1.5), wenn diese nicht direkt durch DNA-Ligasen verschlossen werden können. ESBs zählen zu den durch ROS induzierten DNA-Schäden, entstehen aber auch als enzymatische Intermediate während der BER, Replikation oder Transkription (Caldecott, 2003). Werden ESBs nicht repariert, können sie in DSBs überführt werden, welche ein großes mutagenes und zytotoxisches Potenzial haben. Die Initiation der DNA-Einzelstrangbruchreparatur (ESBR) erfolgt durch die Bindung von PARP-1 an den ESB. Dadurch wird PARP-1 aktiviert und beginnt daraufhin mit der Synthese von ADP-Ribose-Polymeren (de Murcia and Menissier de Murcia, 1994). Mittels dieser negativ geladenen Polymere erfolgt die Rekrutierung des XRCC1/Ligase III α -Komplexes an den DNA-Schaden (Leppard et al., 2003). PARP-1 dissoziiert und XRCC1 rekrutiert weitere Reparaturproteine zum ESB. Liegt der ESB ohne 3'-OH-Gruppe und 5'-Phosphatrest vor, müssen diese Gruppen zuerst prozessiert werden. Dies kann durch die Lyase-Funktion der Pol β oder durch APE, PNK oder Aprataxin erfolgen (Jilani et al., 1999; Karimi-Busheri et al., 1999; Date et al., 2004; Gueven et al., 2004). Ist die 3'-OH-Konformation des ESBs hergestellt, kann die Reparatur durch die Pol β über ‚*short-patch*‘ oder ‚*long-patch*‘ BER, oder aber durch die Pol δ bzw. ϵ über ‚*long-patch*‘ BER eingeleitet werden (Caldecott, 2003).

1.3.3 DNA-Doppelstrangbruchreparatur

Die Generierung von DSBs erfolgt durch endogene zelluläre Prozesse wie der V(D)J-Rekombination, dem Klassenwechsel (*engl. class switch recombination*; CSR), während des oxidativen Stoffwechsels, durch kollabierte Replikationsgabeln und Nukleasen, exogen durch IR und direkt oder indirekt DNA-schädigende Mutagene wie Topoisomerase II-Inhibitoren sowie durch weitere in der Krebstherapie eingesetzte Chemotherapeutika (Shrivastav et al., 2008; Cheng et al., 2011). Für eine eukaryotische Zelle stellen DSBs besonders toxische Läsionen dar. Nicht-repariert führen DSBs zu chromosomalen Aberrationen und Zelltod (O'Driscoll and Jeggo, 2006). Die Reparatur der DSBs findet in der Zelle über zwei verschiedene Mechanismen statt: die HR und das NHEJ (Jackson, 2002). Die HR gilt als der Reparaturweg mit der geringeren Fehleranfälligkeit. Sie benötigt jedoch eine homologe Sequenz der Schadensregion, weshalb sie lediglich in der späten S-Phase und der G2-Phase des Zellzyklus stattfinden kann (Takata et al., 1998; Johnson and Jasin, 2000). Hingegen steht das NHEJ während des gesamten Zellzyklus der Zelle zur Verfügung und dominiert somit in der G1- und der G0-Phase des Zellzyklus (Shrivastav et al., 2008). Das NHEJ wird unterteilt in das kanonische NHEJ (*engl. canonical-NHEJ*; C-NHEJ), bei der die DSB-Enden nur minimal prozessiert werden, und das alternative NHEJ (*engl. backup-NHEJ*; B-NHEJ; auch als DNA-PK abhängige Endverknüpfung (D-NHEJ) bezeichnet), bei dem größere Modifikationen der DSB-Enden stattfinden (Lamarche et al., 2010). Allerdings erfolgt bei beiden Prozessen eine direkte Verknüpfung der getrennten DSB-Enden ohne die Verwendung einer homologen DNA-Sequenz als intakte Matrize (Critchlow and Jackson, 1998). Dies erklärt die Fehleranfälligkeit des NHEJ, bei dem es im Fall einer Verknüpfung von unterschiedlichen Chromosomen zu Deletionen bzw. Insertionen oder zu Chromosomen-Translokationen kommen kann.

1.3.3.1 Kanonische nicht-homologe Endverknüpfung

Die Reparatur eines DSBs durch das C-NHEJ (Abb. 1.6) beginnt mit der Bindung der Proteine Ku70 (XRCC6) und Ku80 (XRCC5) an die beiden offenen Enden der DNA, um diese vor einem Abbau durch Exonukleasen zu schützen (Reeves and Stoeber, 1989; Jeggo et al., 1992). Das gebildete Ku70/Ku80 Heterodimer (KU) assoziiert nun mit der katalytischen Untereinheit der DNA-Proteinkinase (DNA-PKcs), welche zuvor zum DSB rekrutiert wurde, welche nun zusammen das aktive DNA-PK-Holoenzym (DNA-PK) bilden

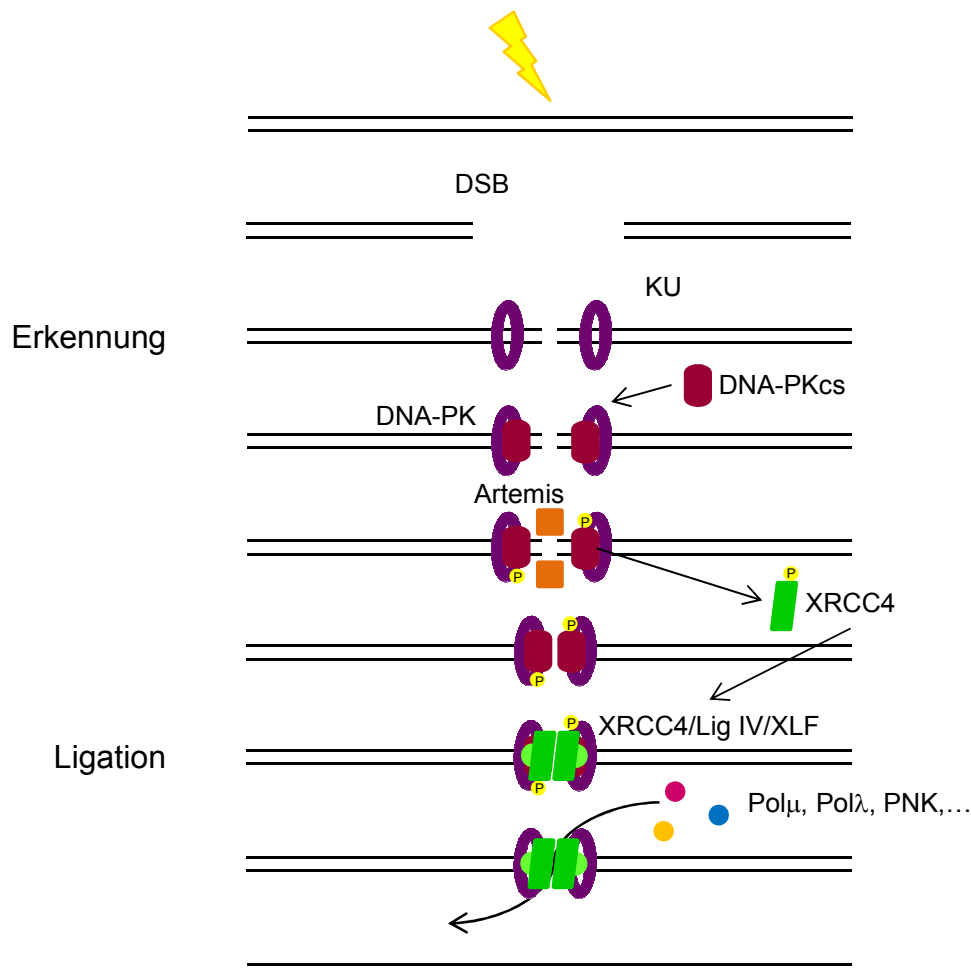


Abb. 1.6: Mechanismus des C-NHEJ. Ionisierende Strahlung bewirkt die Entstehung von DSBs in der DNA. Die Enden des entstandenen DSBs werden durch KU gebunden, was mit der DNA-PKcs assoziiert. Es entsteht das DNA-PK Holoenzym. Die beiden gegenüberliegenden DNA-PKs lagern sich aneinander und phosphorylieren sich und andere Proteine, wie XRCC4. Falls notwendig, werden die DSB-Enden durch Artemis modifiziert. Der XRCC4/Lig IV/XLF-Komplex wird rekrutiert. Die Enden werden gegebenenfalls durch verschiedene Proteine, wie Pol μ , Pol λ , PNK, ... prozessiert und durch Lig IV ligiert. Die wieder intakte DNA wird freigegeben.

(Gottlieb and Jackson, 1993; Smith and Jackson, 1999). Auf diese Weise werden beide Enden des DSBs bis zur abschließenden Ligation in räumlicher Nähe fixiert. Die Aktivierung der Ser/Thr-Kinaseaktivität der DNA-PK erfolgt durch die einzelsträngigen DNA-Überhänge des DSBs, was zur Phosphorylierung von XRCC4 (*engl. X-ray repair cross-complementing protein 4*) führt (Critchlow and Jackson, 1998; Ding et al., 2003). Desweiteren phosphoryliert die aktive DNA-PK zahlreiche Zielproteine, welche für die Kontrolle des Zellzyklus, Apoptose und auch DNA-Reparatur von Bedeutung sind (Meek et al., 2004). Die abschließende Ligation der beiden DNA-Enden erfolgt durch den XRCC4/Ligase IV-Komplex (Lee et al., 2003). Dieser Komplex fördert wiederum die Akkumulierung des Proteins XRCC4-like factor/Cernunnos (XLF/Cer) am DSB. XLF/Cer unterstützt die Ligation der DNA-Enden indem er den XRCC4/Ligase IV-Komplex an den

DNA-Enden stabilisiert, die Effizienz und/oder Spezifität der Ligase IV moduliert und stumpfe (*engl. blunt*) oder nicht-komplementären DNA-Enden für die Ligation ausrichtet (Dahm, 2008). Sind die DNA-Enden des DSBs nicht direkt ligierbar, da sie aufgrund von Überhängen nicht kompatibel sind, müssen diese prozessiert werden. Terminale Nukleotide werden durch Phosphokinasen oder Nukleasen wie die PNK oder Artemis modifiziert oder abgebaut und Lücken in der DNA-Sequenz durch die Pol λ oder μ aufgefüllt (Moshous et al., 2001; Chappell et al., 2002; Ma et al., 2005; Audebert et al., 2006). Artemis besitzt sowohl Exo- als auch Endonukleaseaktivität und glättet die DNA-Enden durch den Abbau von Einzelstrang-Überhängen (Yannone et al., 2008). Ebenfalls an der Prozessierung nicht kompatibler DNA Enden beteiligt ist der MRN-Komplex (Maser et al., 1997; Nelms et al., 1998). Dieser besteht aus den Proteinen MRE11 (*engl. Meiotic recombination 11 homolog 1*), RAD50 (RAD50 Homolog) und Nibrin (NBN, alias NBS-1) (Lamarche et al., 2010) und verfügt wie Artemis über Endo- und Exonukleaseaktivität.

1.3.3.2 Alternative nicht-homologe Endverknüpfung

Ist das C-NHEJ System durch einen Defekt beeinträchtigt oder nicht funktionsfähig, stellt das B-NHEJ eine alternative Form der Endverknüpfung dar (Iliakis et al., 2004). Die Aktivität des B-NHEJ ist normalerweise durch das C-NHEJ unterdrückt (Perrault et al., 2004). Im Vergleich zum C-NHEJ ist das B-NHEJ wesentlich langsamer und vergleichsweise fehleranfällig (Iliakis et al., 2004; Bennardo et al., 2008). Werden DSBs über das B-NHEJ repariert hat dies häufig kleine Deletionen, Mikrohomologien an den Bruchpunkten und Translokationen zur Folge (Yan et al., 2007; Mansour et al., 2010). Sie dient der Aufrechterhaltung des Genoms und der Sicherung des zellulären Überlebens. Jedoch führen die Fehler, welche durch das B-NHEJ auftreten, zu genomischer Instabilität und können eine maligne Entartung auslösen (Nussenzweig and Nussenzweig, 2007). In Studien wurde gezeigt, dass das B-NHEJ auf Resektion der Bruchenden oder durch Mikrohomologien (>4 bp) begünstigtes ‚*Annealing*‘ der DNA-Enden angewiesen ist (Guirouilh-Barbat et al., 2004; Guirouilh-Barbat et al., 2007; Kuhfittig-Kulle et al., 2007; Schulte-Uentrop et al., 2008). Andererseits konnte diese Abhängigkeit von Mikrohomologien widerlegt werden, denn B-NHEJ funktioniert auch ohne vorhandene Mikrohomologien (Mansour et al., 2010).

Das B-NHEJ-System besteht aus den Proteinen Histon H1, PARP-1 und Ligase III α mit ihrem Kofaktor XRCC1 (Audebert et al., 2004; Wang et al., 2005; Wang et al., 2006; Rosidi et al., 2008), wobei die Aktivität des B-NHEJ ausschließlich von PARP-1 abhängt (Mansour et al., 2010) (Abb. 1.7). PARP-1 besitzt eine hohe Bindungsaffinität gegenüber

DSBs und wird durch diese aktiviert (Brown et al., 2002). Auch der MRN-Komplex scheint im B-NHEJ involviert zusein. MRE11 fördert das B-NHEJ über seine Nuklease-Aktivität, welche die DSB-Enden prozessiert, was im B-NHEJ, im Vergleich zum C-NHEJ, vermehrt stattfindet (Rass et al., 2009; Xie et al., 2009; Zha et al., 2009). Die grundlegenden Mechanismen des B-NHEJ konnten bisher nicht vollständig geklärt werden. Ein Modell, beschreibt, dass im Normalfall beide Ku-Proteine aufgrund ihrer höheren Affinität an die DNA-Enden binden und somit die DSB-Reparatur via C-NHEJ eingeleitet wird. PARP-1 und Histon H1 können nicht mehr binden oder werden verdrängt (Wang et al., 2006). KU ist der Hauptfaktor, der einer Mobilisation von PARP-1 und auch des MRN-Komplexes an den DSB entgegenwirkt (Cheng et al., 2011). Wenn jedoch Proteine des C-NHEJ fehlen oder einen funktionellen Defekt aufweisen, binden PARP-1 und Histon H1 an die DNA-Enden des DSBs und leiten somit das B-NHEJ ein. Histon H1 fördert die Ligase-Aktivität von Ligase IV und insbesondere von Ligase III α . Desweiteren richtet es die DNA-Enden zueinander aus, bevor der PARP-1/XRCC1/Ligase III α -Komplex diese ligiert (Rosidi et al., 2008). Eine weitere Möglichkeit ist, dass das Histon H1 die Ku-Proteine daran hindert,

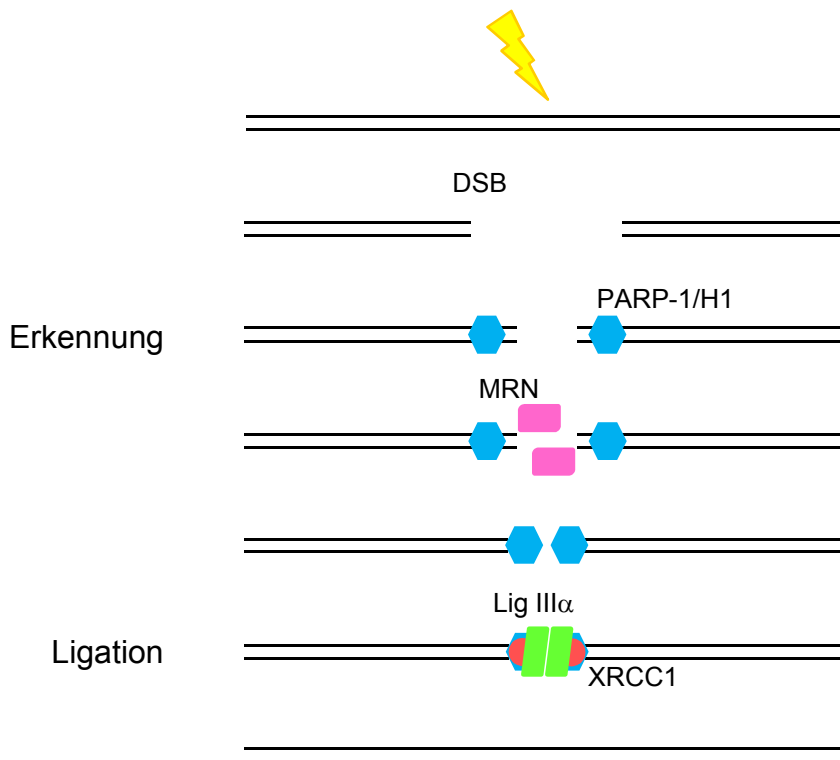


Abb. 1.7: Möglicher Mechanismus des B-NHEJ. Ionisierende Strahlung bewirkt die Entstehung von DSBs in der DNA. PARP-1 und Histon H1 binden an die Enden des entstandenen DSBs. Die Prozessierung der DSB-Enden erfolgt durch den MRN-Komplex. Die Enden finden zueinander. Der XRCC1/Lig III α -Komplex wird zum fixierten DSB rekrutiert. Die Enden werden vom PARP-1/XRCC1/Lig III α -Komplex ligiert und die intakte DNA wieder freigegeben.

weitere Faktoren des C-NHEJ zu rekrutieren, indem es ihre Fortbewegung von den DNA-Enden blockiert. Wird das Histon H1 jedoch durch die DNA-PK phosphoryliert, so wird dessen Affinität zu den DNA-Enden verringert, was möglicherweise eine Entfernung des Histons H1 und damit eine Förderung des C-NHEJ zur Folge hat (Kysela et al., 2005).

1.4 Signaltransduktion zwischen DNA-Schaden und Apoptose

Die Entstehung, Prozessierung und Reparatur verschiedenster DNA-Läsionen sowie der daraufhin ausgelöste Weg der Apoptose sind weitestgehend aufgeklärt und in Modellen beschrieben (Joza et al., 2002; Siegel and Lenardo, 2002; Adams, 2003; Christmann et al., 2003; Kaina, 2003; Roos and Kaina, 2006; Cotter, 2009). Die Signaltransduktionskaskade zwischen DNA-Schaden und Apoptoseinduktion hingegen ist bis heute nicht endgültig geklärt. Zelltypspezifität sowie die Art der Schäden spielen für die Signaltransduktion eine bedeutende Rolle. Für IR und methylierende Agenzien ist beschrieben, dass DSBs für das Auslösen von Apoptose verantwortlich sind (Frankenberg-Schwager and Frankenberg, 1990; Lips and Kaina, 2001; Naumann et al., 2009; Roos et al., 2009). Auch die Toxizität von ESBs, welche durch ROS induziert werden oder als Reparaturintermediate während der BER auftreten, beruht auf deren Umwandlung in DSBs. Daher soll im Folgenden die Signalkaskade zur Induktion von Apoptose ausgehend von DSBs näher betrachtet werden.

Die zelluläre Schadensantwort auf einen DSB beginnt mit dessen Erkennung. Zunächst wird der MRN-Komplex bestehend aus den Proteinen Mre11, Rad50 und NBN in die unmittelbare Nähe der Bruchstelle rekrutiert und bindet anschließend an das Histon 2AX (H2AX), wodurch die beiden Bruchenden räumlich nah fixiert werden (Kobayashi et al., 2002). Um den MRN-Komplex zum DSB zu rekrutieren, wird der Komplex zunächst vom Zytoplasma in den Nukleus transloziert. Dieser Vorgang ist abhängig von NBN, da ohne funktionelles NBN keine nukleäre Translokation stattfindet (Desai-Mehta et al., 2001). Desweiteren spielt auch PARP-1 eine Rolle in der frühen Detektion von DSBs (Haince et al., 2007). PARP-1 katalysiert die Formation von ADP-Ribose-Polymeren, welche die Bindung des MRN-Komplexes an den DSB ermöglicht (Haince et al., 2008).

Die ersten Signalproteine, welche durch DSBs aktiviert werden sind die zur Familie der Phosphatidylinositol 3-Kinasen gehörenden Proteine ‚*ataxia-telangiectasia mutated*‘ (engl.; ATM) und ‚*ATM- und Rad3-related*‘ (engl.; ATR) sowie die DNA-PK (Ismail et al., 2005). Durch den MRN-Komplex wird ATM zum DSB rekrutiert und über

Autophosphorylierung am Serin 1981 aktiviert (Bakkenist and Kastan, 2003; Carson et al., 2003; Uziel et al., 2003; Lee and Paull, 2005). Durch die Aktivierung dissoziieren die zuvor inaktiven Homodimere in ihre Monomere (Bakkenist and Kastan, 2003). Das aktivierte ATM bindet nun an den MRN-Komplex und phosphoryliert eine Vielzahl von Zielproteinen mit verschiedensten biologischen Funktionen. ATR wird hingegen durch blockierte DNA-Replikationsgabeln aktiviert (Dart et al., 2004) und weist anders als ATM eine hohe Affinität zu ESBs auf. Vermutlich ist ATR auch an der Detektion von DSBs beteiligt (Roos and Kaina, 2006), welche ATM-abhängig vermittelt wird (Tomimatsu et al., 2007).

ATM und ATR phosphorylieren und aktivieren eine Vielzahl nachgeschalteter Signalproteine. Beide Proteine teilen sich eine große Anzahl von Substraten, u.a. die an Zellzyklusarrest und Apoptose beteiligten Proteine p53 (Tibbetts et al., 1999; Saito et al., 2002), Chk1 (*engl. Checkpoint Kinase 1*) (Gatei et al., 2003), Chk 2 (*engl. Checkpoint Kinase 2*) (Matsuoka et al., 1998; Ahn et al., 2002), E2F-1 (Lin et al., 2001) wie auch das Histon H2AX (Burma et al., 2001; Ward and Chen, 2001). Folglich haben ATM und ATR drei wichtige Funktionen: Reparatur der DSBs, Aktivierung von Zellzyklus-Kontrollpunkten und Apoptoseinduktion über p53 (Lavin et al., 2005). Als Marker für DSBs dient die Phosphorylierung des Histons H2AX am Serin 139 (γ H2AX genannt), die besonders für die experimentelle Bestimmung von DSBs eine große Rolle spielt (Ismail and Hendzel, 2008). Ausgehend von DSBs wird über ATM/ATR die Phosphorylierung des Tumorsuppressorgens p53 vermittelt und somit Apoptose induziert (siehe Kapitel 1.5). p53 fungiert dabei überwiegend als Transkriptionsfaktor und reguliert die Expression von Genen, welche an der Zellzyklusregulation, DNA-Reparatur und Apoptose beteiligt sind (Lavin and Gueven, 2006). Erfolgt eine DNA-schadensabhängige Phosphorylierung von p53 durch ATM/ATR (am Serin 15) (Banin et al., 1998) oder Chk2 (am Serin 20) (Chehab et al., 2000), wird das p53 Protein stabilisiert und p53 abhängige Gene transkribiert (Unger et al., 1999). Zu diesen Genen zählen das Reparaturenzym MGMT (Harris et al., 1996; Grombacher et al., 1998), der für die Arretierung des Zellzyklus wichtige Cdk-Inhibitor p21 (el-Deiry et al., 1993) und die pro-apoptotischen Proteine Bax, Puma, Noxa (Wu and Deng, 2002), Apaf1 (Robles et al., 2001) sowie der Fas-Rezeptor (FasR; Müller et al., 1998). Hingegen wird die Expression anti-apoptotischer Proteine wie Bcl-2 durch Bindung von p53 am entsprechenden Promotor inhibiert (Wu et al., 2001). Eine weitere Art der Hemmung der anti-apoptotischen Funktion von Proteinen, wie Bcl-2 oder Bcl-XL, erfolgt durch direkte Protein-Protein-Interaktion mit p53 (Mihara et al., 2003). Desweiteren kann p53 die Oligomerisierung von Bak und Bax initiieren, was zur Cytochrom C-Freisetzung aus dem Mitochondrium führt und somit Apoptose auslöst.

1.5 Apoptose

Apoptose (*griechisch* für „fallende Blätter“) ist ein aktiver, genetisch regulierter Prozess, welcher zum Absterben eukaryotischer Zellen führt. Er wird daher auch als programmierter Zelltod bezeichnet. Für vielzellige Organismen ist Apoptose lebensnotwendig und spielt bereits während der Embryonalentwicklung eine bedeutende Rolle (Saunders, 1966; Truman, 1984). Apoptose dient hierbei hauptsächlich der Formbildung. So werden durch Apoptose die Interdigitalzellen der Finger und Zehen entfernt oder die Nasenlöcher gebildet. In Geweben adulter Organismen ist die primäre Aufgabe der Apoptose die Aufrechterhaltung der Homöostase (Jacobson et al., 1997). Solch ein reguliertes Gleichgewicht zwischen Zellteilung (Mitose) und Zellsterben (Apoptose) ist in sich ständig erneuernden Geweben, wie dem Darmepithel oder den oberen Hautschichten, zu beobachten. Auch bei der Entwicklung eines effektiven Immunsystems spielt die Apoptose eine zentrale Rolle (Giovannetti et al., 2008).

Eine besondere Rolle kommt der Apoptose bei der Vernichtung geschädigter Zellen zu. Solche Schädigungen können beispielsweise durch Mutationen, virale Infektionen sowie durch Genotoxine entstehen (Roos and Kaina, 2006). Meist können sich solch entartete Zellen selbst töten oder sie werden durch Zellen des Immunsystems beseitigt. Kommt es in der Apoptosemaschinerie jedoch zu einem Defekt, so kann dies für den Organismus folgenschwere Konsequenzen haben. Es können Krebs- oder Autoimmunerkrankungen entstehen (Thompson, 1995). Gehen indes gesunde Zellen in die Apoptose, ist dies mit neurodegenerativen Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson oder Osteoporose assoziiert.

Der Prozess der Apoptose ist durch verschiedene Merkmale charakterisiert. Es handelt sich einerseits um einen aktiven, energieverbrauchenden Prozess, welcher zellulär auf transkriptioneller, proteosomaler und enzymatischer Ebene reguliert wird. In apoptotischen Zellen sind mehrere morphologische Veränderungen zu beobachten. Anfangs kommt es zu einer Abrundung der Zellen und einem Ablösen aus dem normalen Gewebe. Zytoplasma und Zellkern der Zellen schrumpfen, das Volumen der Zellen nimmt ab. Das Chromatin wird kondensiert und es bilden sich Ausstülpungen der Plasma- und Kernmembran, welche sich später als Vesikel (sogenannte ‚apoptotische Körperchen‘) abschnüren (Wyllie, 1980). Letztendlich wird die DNA durch Endonukleasen fragmentiert (Wyllie, 1980). Ein besonderes Merkmal der Apoptose ist, dass durch sie im umliegenden Gewebe keine Entzündungen auftreten. Sowohl die schrumpfenden Zellen als auch die Vesikel werden von Phagozyten des Immunsystems an Membranveränderungen, wie der Umlagerung von Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Plasmamembran, erkannt und beseitigt. Die Fragmentierung der DNA stellt das wichtigste Charakteristikum apoptotischer Zellen dar und wird *in vitro* für deren Nachweis verwendet.

Zusätzlich zu der kontrolliert ablaufenden Apoptose gibt es noch einen weiteren Weg des Zelltods: die Nekrose. In der Nekrose kommt es zu einem frühen Funktionsverlust der Organellen. Das mitochondriale Membranpotenzial bricht zusammen und die äußere Zellwand wird durchlässig. Dies bedingt ein Anschwellen der Zellen und führt letztlich zum Platzen der Zellen. Die Freisetzung der intrazellulären Bestandteile (lysosomale Enzyme) lockt Immunzellen an, was eine Entzündungsreaktion zur Folge hat. Im Vergleich zur Apoptose wird die DNA erst zu einem relativ späten Zeitpunkt abgebaut. Lange Zeit galt die Nekrose als nicht-regulierte pathologische Form des Zelltods. Mittlerweile konnte jedoch gezeigt werden, dass auch die Nekrose durch verschiedene Signalwege reguliert wird.

Der Prozess der Apoptose kann in drei Phasen unterteilt werden: 1) Die Initiatorphase, 2) die Effektorphase und 3) die Degradationsphase (Allen et al., 1998). In der Initiatorphase wird Apoptose durch interne Signale, wie dem Tumorsuppressor p53, oder externe Signale, wie DNA-schädigende Substanzen oder Zellen des Immunsystems, ausgelöst. Verschiedene Stimuli aktivieren verschiedene Wege der Apoptose, führen aber letzten Endes zu einem gemeinsamen Suizidprogramm (Chinnaiyan and Dixit, 1996; Vaux and Strasser, 1996). Die Effektorphase ist durch die Aktivität von Caspasen charakterisiert (Fuentes-Prior and Salvesen, 2004). Caspasen sind Aspartat spezifische Cystein-Proteasen, welche ein Cystein im aktiven Zentrum haben und im aktiven Zustand ihre Substrate hinter einem Aspartatrest spalten. In jeder Zelle kommen diese Caspasen in ihrer inaktiven Form vor, den Pro-Caspasen. Werden diese durch heterologe Caspasen, Auto-Proteolyse oder Dimerisierung aktiviert, aggregieren sie, schneiden sich gegenseitig und fügen sich zu einem aktiven Tetramer mit je zwei katalytischen Zentren zusammen. Entsprechend ihrer Aktivierungsweise und Substratspezifität werden Initiator- und Effektorcaspasen unterschieden. Initiatorcaspasen, wie die Caspase-8 und -9, werden nach äußeren (extrinsische) oder inneren (intrinsische) Signalen mittels Oligomerisierung und Spaltung aktiviert. Anschließend aktivieren sie ihrerseits Effektorcaspasen, wie die Caspasen-3, -6 und -7. In der Degradationsphase sind die Effektorcaspasen entscheidend an der Fragmentierung von Zellbestandteilen wie dem Cytoskelett, zellulären Proteinen, Transkriptionsfaktoren sowie anti-apoptotischen Proteinen beteiligt. Auch die Fragmentierung der DNA wird indirekt durch Effektorcaspasen vermittelt. Dabei wird das DEF-Protein, Inhibitor einer Desoxyribonuklease (*engl. caspase activated DNase; CAD*), von Caspase-3 geschnitten und inaktiviert. Dies ermöglicht CAD die Fragmentierung der DNA, welches ein Charakteristikum der Apoptose darstellt (Liu et al., 1997; Enari et al., 1998).

Die Initiatorphase kann im Wesentlichen über zwei Signalwege initiiert werden: Über den intrinsischen mitochondrial vermittelten Signalweg oder über den extrinsischen Rezeptor vermittelten Signalweg. Diese beiden Signalwege werden in den nächsten beiden Abschnitten näher erläutert.

1.5.1 Intrinsischer Signalweg

Das Mitochondrium ist die zentrale Regulationsstelle des intrinsischen Signalweges. Durch einen intrinsischen apoptotischen Stimulus verändert sich die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran (*engl. mitochondrial outer membrane permeabilisation; MOMP*). Deren Regulation erfolgt durch die Konkurrenz zwischen anti- und pro-apoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie. Dabei sind als pro-apoptotische Proteine die Bcl-2-Familienmitglieder Bax und Bak von großer Bedeutung, da sie als Effektorproteine die MOMP direkt beeinflussen können (Hacker and Weber, 2007; Kepp et al., 2007). Wird beispielsweise Bax im Zytoplasma aktiviert, erfolgt eine Konformationsänderung sowie Translokation von Bax in die äußere Mitochondrienmembran (Gross et al., 1998). Bax oligomerisiert und bildet Poren, wodurch die MOMP erhöht wird und pro-apoptotische Faktoren wie das Cytochrom C freigesetzt werden (Hacker and Weber, 2007; Kepp et al., 2007). Nach der Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien bildet dieses zusammen mit der Pro-Caspase-9 und Apaf-1 einen Komplex, das Apoptosom. In diesem erfolgt über autokatalytische Spaltung die ATP-abhängige Aktivierung der Pro-Caspase-9 (Acehan et al., 2002; Pop et al., 2006). Die aktive Caspase-9 aktiviert nun Effektorcaspasen wie die Caspase-3 (Li et al., 1997; Srinivasula et al., 1998), was über CAD die Fragmentierung der DNA bewirkt. Neben Cytochrom C werden Smac/DIABLO und AIF (*engl. apoptosis inducing factor*) als weitere pro-apoptotische Faktoren aus dem Mitochondrium freigesetzt (Susin et al., 1999; Chai et al., 2000; Du et al., 2000). Smac/DIABLO inaktiviert Proteine der Familie der ‚Inhibitoren der Apoptose‘ (IAPs), welche die Inhibition von Caspasen bewirken (Chai et al. 2000; Du et al. 2000). Hingegen führt AIF zusammen mit der Endonuklease G in einer Caspase-unabhängigen Weise im Zellkern zur Fragmentierung der DNA (Cregan et al., 2004). In nicht-apoptotischen Zellen wird die Kanalbildung in der äußeren Mitochondrienmembran durch Bax, durch dessen Interaktion mit dem anti-apoptotischen Protein Bcl-2 verhindert (Oltvai et al., 1993; Nomura et al., 1999). Pro-apoptotische Proteine wie Bad und Puma fungieren hier als Gegenspieler von Bcl-2, was die Bax-vermittelte Kanalbildung fördert (Gillissen et al., 2003; Chen et al., 2005). Zudem kann gentoxischer Stress durch Spaltung und proteosomaler Degradation nach Ubiquitinierung zu Inaktivierung und Abbau von Bcl-2 führen (Dimmeler et al., 1999; Tomicic and Kaina, 2001). Bak als weiterer pro-

apoptotischer Faktor ist in nicht-apoptotischen Zellen zwar auch in der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert, wird aber durch die anti-apoptotischen Proteine der Bcl-2-Familie Bcl-XL und Mcl-1 (nicht aber Bcl-2) inaktiv gehalten (Willis et al., 2005). Der Hemmung von Bak durch diese anti-apoptotischen Proteine wirken die pro-apoptotischen Proteine Bim, Puma, Noxa und Bad entgegen (Hacker and Weber, 2007), welche die anti-apoptotischen Proteine hemmen und somit zur Aktivierung von Bak beitragen. Insgesamt ist die Regulation der beiden pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak nicht vollständig geklärt.

1.5.2 Extrinsischer Signalweg

Die extrinsisch vermittelte Apoptose erfolgt über die Bindung trimerer Liganden an membranständige spezifische Rezeptoren. Zu diesen sogenannten Todesrezeptoren gehören der FasR (CD95/APO-1), der TNF-Rezeptor 1, TRAIL-Rezeptor 1 und 2 (DR4 und DR5), der Todesrezeptor-3 und -6 (DR3 und DR6), sowie deren Liganden FasL (CD95-L), TNF α , Lymphotoxin- α , TRAIL und TWEAK (Fulda and Debatin, 2006). Nach genotoxischem Streß wird beispielsweise die Expression des FasL durch AP-1 Bindungsproteine indiziert (Faris et al., 1998). Auch die Expression des FasR selbst erfolgt stress-abhängig über p53 (Müller et al., 1998).

Der rezeptorvermittelte Apoptoseweg wird im Folgenden am Beispiel des FasR beschrieben. Nach Aktivierung des FasR durch Bindung des FasL an die extrazelluläre Domäne des FasR kommt es zur Trimerisierung des Komplexes. Diese Trimerisierung bewirkt eine Autophosphorylierung der Todesdomäne, der intrazellulären Domäne der FasR-Moleküls. Infolgedessen bindet das Adaptermolekül FADD (*engl. Fas-associated death domain*) an die Todesdomäne. Die Todeseffektor-Domäne (*engl. death effector domain*; DED) von FADD gehört zu den Caspaserekrutierungs-Domänen und rekrutiert Pro-Caspasen (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996). Für den FasR und auch TRAIL-Rezeptor erfolgt spezifisch die Rekrutierung der Pro-Caspase-8. Der gebildete Komplex aus FasR, FADD und Pro-Caspase-8 wird DISC (*engl. death inducing signaling complex*) genannt (Boldin et al., 1995; Medema et al., 1997; Muzio et al., 1997). In diesem Komplex erfolgt durch Dimerisierung und autoproteolytische Spaltung die Aktivierung der Pro-Caspase-8 (Muzio et al., 1998). Die aktive Caspase-8 aktiviert nun ihrerseits die Effektorcaspasen-3 und -7, was die Degradationsphase der Apoptose einleitet (Srinivasula et al., 1996; Muzio et al., 1997). Die aktive Caspase-8 verbindet auch den extrinsischen mit dem intrinsischen Apoptoseweg. Dies erfolgt dadurch, dass Caspase-8 Bid in die verkürzte Form tBid spaltet, was eine Aktivierung von Bax bewirkt (Chou et al.,

1999). Dies führt letzten Endes über Caspase-9 zur Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6 und -7.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Monozyten stellen eine bedeutende Komponente des Immunsystems dar. Sie zirkulieren im Blutkreislauf, wandern in verschiedene Gewebe ein und differenzieren dort zu residenten Makrophagen sowie DCs. Makrophagen sind mitunter die wichtigsten Effektorzellen der angeborenen unspezifischen Immunantwort. DCs, die auch als ‚Wächter des Immunsystems‘ bezeichnet werden, sind für die adaptive Immunantwort von besonderer Bedeutung. Ein Kennzeichen von Monozyten und Makrophagen ist die Produktion von ROS, welche der Abtötung von Mikroorganismen dienen.

Aus vorangegangenen Untersuchungen war bekannt, dass die Expression der BER-Proteine XRCC1 und Ligase III α in menschlichen Monozyten nicht detektierbar ist und während der Ausreifung zu DCs induziert wird (Briegert and Kaina, 2007). Diese Untersuchungen sollten in der vorliegenden Arbeit auf Makrophagen ausgeweitet werden, wobei folgende Fragen gestellt werden: 1) Gibt es Unterschiede in der Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber ROS? 2) Welche DNA-Schäden werden in den Zellen gegebenenfalls durch ROS induziert? 3) Wie erfolgt die Signaltransduktion zwischen DNA-Schäden und Zelltod? Wie ist der Mechanismus des Zelltods durch ROS? 4) Unterscheidet sich die BER-Kapazität von Monozyten, DCs und Makrophagen? 5) Beeinflusst die DNA-Reparaturkapazität die immunstimulatorische Kapazität myeloider Zellen? 6) Beeinflussen Unterschiede in der Reparaturkapazität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegebenenfalls auch die Sensitivität gegenüber IR, das wie ROS zu Basenschäden in der DNA führt? 6) Sind aufgrund der Beteiligung der BER-Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 am B-NHEJ auch Unterschiede in der DSB-Reparaturkapazität in Monozyten, DCs und Makrophagen vorhanden?

Die Suppression des Immunsystems ist eine der schwerwiegendsten Nebenwirkungen in der Tumor-Chemotherapie. Generell wird die hohe Proliferationsrate von Vorläuferzellen des Immunsystems als Erklärung für die hohe Sensitivität gegenüber DNA-schädigenden Agenzien angesehen. Hier stellt sich die Frage, ob Chemotherapeutika auch für ausdifferenzierte, nicht-proliferierende Immunzellen toxisch sind? Temozolomid ist ein breit eingesetztes Zytostatikum, das beispielsweise zur Therapie von Glioblastomen und Melanomen eingesetzt wird. Es ist bekannt, dass Monozyten im Vergleich zu DCs eine höhere Sensitivität gegenüber Temozolomid aufweisen (Briegert et al., 2007; Briegert and

Kaina, 2007). Daher soll neben der Wirkung von ROS auch die Wirkung des Zytostatikums Temozolomid auf Monozyten, DCs und Makrophagen untersucht werden und dabei folgende Fragen beantwortet werden: 1) Wie ist die Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber Temozolomid? 2) Welche DNA-Schäden induziert Temozolomid? 4) Wie erfolgt die DNA-Schadensantwort nach Temozolomid-Behandlung? 5) Über welchen Mechanismus induziert Temozolomid Zelltod in Monozyten?

Im letzten Teil dieser Arbeit soll geprüft werden, ob die Befunde der *ex vivo* isolierten Primärzellen auf ein *in vitro* Zellsystem übertragbar sind. Zur Untersuchung sollen mit MM6 und THP-1 zwei akute myeloische Leukämie-Zelllinien und mit U937 eine histiozytische Lymphomzelllinie mit humanen Monozyten verglichen und folgende Fragen untersucht werden: 1) Wie ist die Expression der für Monozyten charakteristischen BER-Proteine in den myeloischen Zelllinien? 2) Ist die Sensitivität der Zelllinien gegenüber Alkylantien sowie die MGMT-Aktivität mit der von Monozyten vergleichbar? 3) Beeinflussen die für die Ausreifung in DCs und Makrophagen verantwortlichen Zytokine IL-4 und GM-CSF die Expression von BER-Proteinen in den Zelllinien? 4) Hat eine Veränderung der Proteinexpression gegebenenfalls Auswirkung auf die Sensitivität gegenüber Alkylantien, die MGMT-Aktivität oder die BER-Kapazität der Zelllinien?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

[³² P]-Detektionsschirm	Molecular Dynamics, Sunnyvale, Kalifornien
[³² P]-Dokumentationsanlage Typ Storm B40	Molecular Dynamics, Sunnyvale, Kalifornien
[¹³⁷ Cs]-Quelle Gammacell 2000	Molsgaard Medical, Dänemark
Blot-Kammer, Mini Trans Blot Cell	Bio-Rad, München
Brutschrank, Hera cell 150	Heraeus, München
Durchflusszytometer, FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Einfrier-Box Typ Cryo 1°C Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Elektrophoreseapparaturen	Bio-Rad, München
Feinwaage	Satorius, Göttingen
Flüssigszintillationszähler Typ Tri-Carb 2100TR	Canberra Packard Central Europe, Schwadorf, Österreich
Fluoreszenzeinrichtung BX-FLA	Olympus, Hamburg
Geldokumentation, InGenius	Syngene, Cambridge UK
Infrarot-Abbildungsanlage, Typ Odyssey	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
Laser Scanning Mikroskop, LSM710	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroplatten Reader Sunrise RC	Tecan, Crailsheim
Mikroskop TMS-F	Nikon, Düsseldorf

Mikroskop Axiovert 35	Zeiss, Jena
Mikroskop BX 50	Olympus, Hamburg
Mikroskop Wilovert A	Hund, Wetzlar
Mikro-Ultrazentrifuge, CS 120GX	Hitachi, Japan
MyCycler™ Thermal Cycler	Bio-Rad, München
MyiQ Single Color RealTime PCR Detection System	Bio-Rad, München
NanoDrop®-ND-1000-Spektrophotometer	Fa. NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA
Neubauer-Zählkammer	Hecht-Assistent, Sondheim
Nitrozellulosemembran (Protan)	Schleicher & Schuell, Dassel
pH-Meter, Typ pH525	WTW, Weilheim
Phospho Imager, Storm 860 Molecular Imager	Amersham Pharmacia, Freiburg
Pipetten (Pipetman)	Gilson, Middleton
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra biosciences, Landquart
Röntgenfilme (Hyperfilm MP)	Kodak, USA
Spannungsquelle 200/2.0 Power Supply	Bio-Rad, München
Spannungsquelle Power Pac 200/300	Bio-Rad, München
Sterilbank, Lamin Air 1.2	Heto-Holten A/S, Allerød, DK
Tiefkühler (- 20°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Tiefkühler (- 80°C)	Sanyo, München

Tischzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät Typ Sonifier Cell Disruptor B15	Branson Ultraschall, Dietzenbach
Vakuumpumpe N022 AN.18	KNF Neuberger, Freiburg
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein, Zürich
Wasserbad	Grant Instruments Ltd, Cambridge, UK
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, München
Zentrifuge, Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zelltank (N ₂) Locator 6+	Thermo Fisher Scientific, Waltham

2.1.2 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BA) 40%ig	Roth, Karlsruhe
Agarose	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Agarose 'low melting point (LMP)'	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Annexin V-FITC	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
ATP	Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Boc-VAD-fmk	Merck (Calbiochem), Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe

Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
CM-H ₂ DCFDA	Molecular Probes, Oregon, USA
Coomassie Brilliant Blue R-250	Serva, Heidelberg
Phosphocreatin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
dNTPs	New England Biolabs
ECL- und ECL-Plus-Kit	Pharmacia/Amersham, Braunschweig
Entwicklerlösung	Kodak GBX, Rochester, USA
Essigsäure (CH ₃ COOH)	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut (EtOH)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung 1%ig	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Fixiererlösung	Kodak GBX, Rochester, USA
Formaldehyd ~37%	Roth, Karlsruhe
Formamid	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Glycerin ~87%	Roth, Karlsruhe
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Hepes	Sigma-Aldrich, Steinheim
Igepal (NP-40)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kupfer-(II)-Sulfat	Roth, Karlsruhe
Ladepuffer (für SDS-PAGE) RotiLoad1	Roth, Karlsruhe
LDL (human Plasma)	Merck (Calbiochem), Darmstadt

LPS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Luminol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
Milchpulver	Fa. Heirler, Reformhaus Mainz
NAD	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Sigma-Aldrich, Steinheim
O ⁶ -Benzylguanin (O ⁶ BG)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS	Biochrom, Berlin
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phosphocreatin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Polyethylenglykol 400 (PEG)	Roth, Karlsruhe
Ponceau S	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid (PI)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinase Inhibitor Cocktail Complete™, Mini, EDTA-frei	Roche, Mannheim
Radioaktiv markiertes [γ ³² P]-ATP	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Radioaktiv markiertes [³ H]-Uridin	NEN Dupont, Zaventem, Belgien
Szintillationslösung	Roth, Karlsruhe
<i>tert</i> -Butylhydroperoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetramethylethylenylendiamin (TEMED)	Roth, Karlsruhe
TO-PRO-3	Invitrogen, Darmstadt
Tween 20 (Polysorbat 20)	Roth, Karlsruhe
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid (H_2O_2)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Xylencyanol FF Sigma-Aldrich, Steinheim

Alle nicht aufgelisteten Chemikalien wurden von den Firmen Fluka (Buchs; CH), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), und Sigma-Aldrich (München) in der Qualitätsstufe p. a. bezogen.

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

6/24/48/96-well-Zellkulturplatten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
6-well, Mehrfachkulturschalen	Corning, Kaiserslautern
Blut Separations Röhrchen	PAA, Pasching, Österreich
DEAE Sepharose Fast Flow	GE Healthcare, München
Deckgläser	Roth, Karlsruhe
Dialyseschlauch, ZelluTrans 6.0 (8.0000 – 10.0000 MWCO)	Roth, Karlsruhe
Einmalspritzen	Norm-Ject, Tuttlingen
Einmalpipetten	Greiner Bio-One, Frickenhausen
FACS-Analyseröhrchen	Sarstedt, Nürnberg
Kryoröhrchen (2 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Micro Bio-Spin P-30 Tris Chromatographie Säulen	Bio-Rad, München
Micro Bio-Spin 6 Tris Chromatographie Säulen	Bio-Rad, München
Microcon YM-10 Filtereinheit (10 000 MWCO)	Millipore, Bedford, MA, USA
Microseal [®] B Adhesive Sealer	Bio-Rad, München
Nitrozellulose-Membran Protran [®]	Whatman, Dassel
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Company (USA)
Pasteurpipetten	Roth, Karlsruhe
PCR Platten (96-well)	Bio-Rad, München

PCR-Reaktionsgefäße (0,2 ml) MultiUltra Tubes	Roth, Karlsruhe
Petrischalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Polypropylen-Reaktionsgefäße 15 ml/50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,5 ml/1,5 ml/2 ml	Eppendorf, Hamburg
Röntgenfilme Hyperfilm MP	Kodak, USA
Spritzenfilter steril Rotilabo®	Roth, Karlsruhe
Whatman-Filterpapier	Schleicher und Schuell, Dassel
Zellkulturmaterial	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschale, 6 mm x 15 mm	Corning, Kaiserslautern

2.1.4 Kits

Human IL-1 beta Quantikine ELISA Kit	R & D systems, Wiesbaden
Human TGF-beta1 Quantikine ELISA Kit	R & D systems, Wiesbaden
Human TNF-alpha/TNFSF2 Quantikine Kit	R & D systems, Wiesbaden
Mykoplasmen-Detektionskit (PCR-basiert)	Minerva Biolabs, Berlin
Nucleobond AX 100	Macherey-Nagel, Düren
Nucleospin® RNA II	Macherey-Nagel, Düren
SensiMix Plus SYBR & Fluorescein Kit	Bioline, Luckenwalde
Signa TECT® DNA-Dependent Protein Kinase Assay System	Promega, Mannheim
Verso™ cDNA Kit	ABgene, Hamburg
Zell-Proliferations-Reagenz WST-1 (Water soluble tetrazolium 1)	Roche, Mannheim

Die Anwendung der aufgelisteten Systeme fand, falls nicht besonders vermerkt, nach den angegebenen Herstellerdaten statt.

2.1.5 Zytokine

IL-4	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
GM-CSF	Bayer, Leverkusen

2.1.6 Chemotherapeutika/Zytostatika

Methylmethansulphonat (MMS) Sigma-Aldrich, München

Temozolomid (TMZ; Temodal®)
3-methyl-4-oxoimidazo[5,1-d][1,2,3,5]tetrazine-8-carboxamide (IUPAC-Nomenklatur) Schering-Plough, München

2.1.7 Software

Ascent Software 2.6	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts
Bio-Rad iQ5 2.0	Bio-Rad, München
CellQuest Pro	BD Pharmingen, Heidelberg
EndNote 9.0.0	Thomson Reuters, New York City, New York
GeneSnap 6.0.5	Syngene, Cambridge, UK
GeneTools	Syngene, Cambridge, UK
Graph Pad Prism 3.0.2	Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA
iCycler™ Software	Bio-Rad, München
ImageJ Software	http://rsb.info.nih.gov/ij/
Image Quant 5.2	Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA
Kinetic Imaging Komet 4.0.2	BFI-Optilas, Puchheim
Komet 4.20.2	Kinetic Imaging, Liverpool, UK
MS Office 2003	Microsoft, Unterschleißheim
Multi-Analyst 1.0.1	Bio-Rad, München
Odyssey 3.0	LI-COR Biosciences, Bad Homburg

Photoshop 7.0	Adobe Systems, München
Scanner Control 4.0	Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA
WinMDI 2.9	http://facs.scripps.edu/software.html
Zen 2008	Carl Zeiss, Oberkochen

2.1.8 Medien und Komponenten für Zellkultur

Accutase	PAA, Pasching, Österreich
DMEM	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Fötale Kälberserum (FCS)	Biowest, Nuaille, Frankreich
LSM 1077 Lymphozyten Separations Medium	PAA, Pasching, Österreich
RPMI 1640 plus L- Gutamin	Gibco Life Technologies, Karlsruhe
Trypsin-EDTA (10x)	PAA, Pasching, Österreich
X-Vivo 15	Lonza, Basel, Schweiz

2.1.9 Zelllinien

2.1.9.1 Adhärenz Zelllinien

HeLa MR	humane Zelllinie eines Cervix-karzinoms (Mex-)	DMEM + 5% FCS
HeLa S3	humane Zelllinie eines Cervix-karzinoms (Mex+)	DMEM + 5% FCS

2.1.9.2 Suspensionszelllinien

Mono Mac 6	humane AML Zelllinie	(*)	RPMI + 10% FCS
THP-1	humane AML Zelllinie	(DSMZ)	RPMI + 10% FCS
U937	humane histiozytische Lymphomazelllinie	(*)	DMEM + 5% FCS

*: die Zelllinien wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Kleinert (Institut für Pharmakologie; Mainz) zur Verfügung gestellt.

2.1.10 Proteine

2.1.10.1 Proteinmarker

peqGold Proteinmarker II, 10 - 200 kDa PEQLAB, Erlangen

2.1.10.2 Enzyme

Aprotinin	Merck, Darmstadt
Chymnostatin	Merck, Darmstadt
Creatin Kinase	Roche, Mannheim
FPG	Prof. Dr. Epe, Mainz
Leupeptin	Merck, Darmstadt
Pepstatin A	Merck, Darmstadt
T4-Polynukleotidkinase	Roche, Mannheim
RNase A	Sigma-Aldrich, München
Taq DNA Pol, Master Mix Red	Ampliqon, Hamburg
Uracil-DNA Glycosylase	Roche, Mannheim

2.1.10.3 Primärantikörper

anti-APE1	mAb (1:2000)	Novus Biologicals, Littleton UK
anti-Caspase-3	pAb (1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Caspase-7	pAb (1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Caspase-8	mAb (1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Caspase-9	pAb (1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Chk1	pAb (1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-Chk2	pAb (1:1000)	Cell Signaling Technology, Frankfurt

anti-DNA Ligase I	mAb (1:500)	Abcam, Cambridge, UK
anti-DNA Ligase III	mAb (1:500)	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-DNA Ligase IV	pAb (1:500)	Biozol Diagnostica (GeneTex Inc.), Eching
anti-DNA-PKcs	pAb (1:500)	Merck, Darmstadt
anti-E2F-1	pAb (1:500)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-ERK2	pAb (1:6000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Anti-FasL	mAb (1:500)	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-FEN-1	mAb (1:1000)	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-FOXM1	pAb (1:500)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-phospho-Histon H2A.X (Ser139) (γ H2AX)	mAb (1:100)	Millipore, Billerica MA, USA
anti-Ku70	mAb (1:200)	Biozol Diagnostica (GeneTex Inc.), Eching
anti-Ku80	mAb (1:50)	Biozol Diagnostica (GeneTex Inc.), Eching
anti-MGMT	pAb (1:1000)	Institut für Toxikologie, Mainz
anti-MPG	mAb (1:500)	Biozol Diagnostica (Abnova), Eching
anti-OGG1	pAb (1:200)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-p53	mAb (1:500)	Dianova, Hamburg
anti-PARP	mAb (1:1000)	BD Pharmingen, Heidelberg
anti-PCNA	mAb (1:1000)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-Pol β	mAb (1:500)	Thermo Scientific, Dreieich
anti-phospho-ATM (Ser1981)	mAb (1:500)	Millipore, Schwalbach
anti-phospho-ATR (Ser428)	pAb (1:500)	Cell Signaling Technology, Frankfurt
anti-phospho-Chk1 (Ser317)	pAb (1:1000)	Biomol (Bethyl), Hamburg
anti-phospho-Chk2(T68)	pAb (1:1000)	Biomol (Epitomics), Hamburg
anti-XPC	mAb (1:2000)	Sigma-Aldrich, München

anti-XRCC1	pAb (1:1000)	Abcam, Cambridge, UK
anti-XRCC4	pAb (1:500)	Biozol Diagnostica (GeneTex Inc.), Eching
anti-human CD3-PE	mAb	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-human CD14-PE	mAb	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-human CD19-PE	mAb	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-human CD80-PE	mAb	NatuTec, Frankfurt
anti-human CD86-PE	mAb	NatuTec, Frankfurt
anti-human HLA-DR	mAb	NatuTec, Frankfurt
anti-maus IgG1-FITC	mAb	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
anti-maus IgG2a-PE	mAb	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2.1.10.4 Sekundäre Detektionsantikörper

Peroxidase-konjugiert

IgG Kaninchen (HRP-konjugiert)	(1:4000)	Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, USA
IgG Maus (HRP-konjugiert)	(1:2000)	Rockland Immunochemicals, Gilbertsville, USA

HRP: Meerrettich-Peroxidase (*Horseradish peroxidase*)

Infrarot-Farbstoff-konjugiert

IgG Kaninchen IRDye 800CW	(1:10 000)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
IgG Maus IRDye 800CW	(1:10 000)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
IgG Kaninchen IRDye 680	(1:10 000)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg
IgG Maus IRDye 680	(1:10 000)	LI-COR Biosciences, Bad Homburg

Fluorophor-konjugiert

AlexaFluor 488 Ziege-anti-Maus	(γ H2AX: 1:300)	Invitrogen, Karlsruhe
--------------------------------	-------------------------	-----------------------

2.1.11 Synthetische Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'→3'	Verwendung
ABP	AATAAGCTTGATCGGCCGGCCGCGGTATAT	BER-Assay
2GScomp	TCGGTAGCCAATAAGCGTGGTCGGACGGACTCGGTAGAT	BER-Assay
2GSU	ATCTACCGAGTCCGTCCGA <u>U</u> CACGCTTATTGGCTACCGA U = Uracil	BER-Assay
8-oxoG	CCAGTGAATTC ¹ CCGGG ¹ ATCCGTGCACCTGCAGCCAAGCT 1 = 8-oxoG	8-oxoG Assay
8-oxoGcompl	AGCTTGGCTGCAGGTTCGACGGATCCCCGGGAATTCAGTGG	8-oxoG Assay
<i>β</i> -ACTIN up	TGGCATCCACGAAACTACC	Real-Time RT-PCR
<i>β</i> -ACTIN low	GTGTTGGCGTACAGGTCTT	Real-Time RT-PCR
DNA-PKCS II up	CTTTGTCGTGTGGAGGGAT	Real-Time RT-PCR; RT-PCR
DNA-PKCS II low	CACAACGGGGTTCAGAAGTT	Real-Time RT-PCR; RT-PCR
LIG III α up	GCTATATGTCTTTGGCTTTC	Real-Time RT-PCR; RT-PCR
LIG III α low	GGAATAGGCACAGTTCTT	Real-Time RT-PCR; RT-PCR
PARP-1 up	GAACGACCTGATCTGGAA	Real-Time RT-PCR
PARP-1 low	CACTTGCTGCTTGTTGAA	Real-Time RT-PCR
XRCC1 up	GAGGAAGTTGGATTTGAA	Real-Time RT-PCR
XRCC1 low	ATTTAGGTCTCTTGGGAA	Real-Time RT-PCR
<i>β</i> -ACTIN up	TCCGCTGCCCTGAGGCACTC	RT-PCR
<i>β</i> -ACTIN low	GAGCCGCCGATCCACACGGA	RT-PCR
FASR up	AAGGGATTGGAATTGAGGAAGACTG	RT-PCR
FASR low	GTGGAATTGGCAAAAAGAAGAAGACA	RT-PCR

<i>GAPDH</i> up	GAAGATGGTGATGGGATTTTC	RT-PCR
<i>GAPDH</i> low	GAAGGTGAAGGTCGGATG	RT-PCR
<i>PARP-1</i> up	GGCCGCATACTCCATCCTCA	RT-PCR
<i>PARP-1</i> low	CATTTCGCCTTCACGCTCTATCTTA	RT-PCR
<i>XRCC1</i> up	ACGAATGCCAGGGAGGGGTTGTC	RT-PCR
<i>XRCC1</i> low	AGCGGTGGCAGCGGAGATGAAG	RT-PCR

Die verwendeten Primer wurden von Genterprise (Mainz), Eurofins MWG Operon (Ebersberg) und Eurogentec (Belgien) käuflich erworben.

2.1.12 DNA-Marker – und Ladepuffer

λ DNA/EcoRI+HindIII Marker	Fermentas, St. Leon-Rot
Gel loading Dye Blue (6x)	New England Biolabs

2.1.13 Puffer und Lösungen

Es folgt eine Auflistung aller verwendeten Puffer und Lösungen. Falls nicht besonders vermerkt wurden diese in *A.bidest* angesetzt.

AnnexinV-Bindepuffer	10 mM HEPES 140 mM NaCl 2,5 mM CaCl ₂ 0,1% BSA pH 7,4
Anti-fade Medium	2.5% DAPCO PBS:Glycerin (1:1) pH 8,6
APS-Lösung 10%ig (w/v)	1 g APS ad 10 ml H ₂ O

BER-Zellysepuffer I	10 mM Tris 200 mM KCl pH 7.8
BER-Zellysepuffer II	10 mM Tris 600 mM KCl 2 mM EDTA 40% Glycerin 0,2% NP-40 pH 7.8
BER-Reaktionspuffer (20x)	800 mM HEPES 100 mM MgCl ₂ 2 mM EDTA 10 mM DTT pH 7,9
Bradford-Reagenz	8,5% Phosphorsäure 4,75% EtOH 1% Commasie blue G250 (anschließend gefiltert)
CM-H ₂ DCFDA (10/100 µM)	50 µg in 8,65/856 µl DMSO Weiterverdünnung in PBS
DTT-Stammlösung (1M)	154,25 mg ad 1 ml H ₂ O
Elektrophorese-Puffer (alkalische SCGE)	300 mM NaOH 1 mM EDTA pH ≥ 13
Elektrophorese-Puffer (neutrale SCGE)	90 mM Tris

Material und Methoden

	90 mM Borsäure
	2 mM EDTA
	pH 7,5
Extraktionspuffer (DNA-PK-Aktivitäts-Assay)	50 mM NaF
	20 mM HEPES
	450 mM NaCl
	25% Glycerin
	0,2 mM EDTA
	0,5 mM DTT
	pH 7,8
FACS-Puffer	PBS
	0,1% BSA
FACS-Fixans	PBS
	1% Formaldehyd
Lysepuffer (Gesamtzellextrakte)	50 mM Tris, pH 7,5
	250 mM NaCl
	1 mM EDTA
	0,1% Triton X-100
NaF-Stammlösung (500 mM)	20,95 mg ad 1 ml H ₂ O
Na ₃ VO ₄ -Stammlösung (200 mM)	36,78 mg ad 1 ml H ₂ O
Neutralisations-Puffer (alkalische & neutrale SCGE)	0.4 M Tris
	pH 7,5
O ⁶ BG-Stammlösung (10 mM)	50 mg ad 20,72 ml DMSO
8-oxoG-Extraktionspuffer	50 mM Tris-HCl

	250 mM NaCl
	20% Glycerin
	1 mM EDTA
	0,5 mM DTT
	0,5 mM PMSF
	10 µg/ml Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin
	50 mM NaF
	1 mM Na ₃ VO ₄
	pH 7,1
8-oxoG-Verdünnungspuffer	50 mM Tris-HCL
	20% Glycerin
	1 mM EDTA
	0,5 mM DTT
	pH 7,7
PAGE (20%)	4 ml Acrylamid (19:1)
	0,8 ml TBE (5x)
	3,2 ml H ₂ O
	56 µl APS (10%)
	2,8 µl TEMED
PAGE (denaturierend; 20%)	20 ml Acrylamid (19:1)
	16,8 g Harnstoff (7 M)
	8 ml TBE (5x)
	280 µl APS (10%)
	14 µl TEMED

PBS (pH 7,4)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 0,7 mM CaCl ₂ 6 mM MgCl ₂
PMSF-Stammlösung (200 mM)	34,84 mg ad 1 ml Isopropanol
Ponceau S-Lösung	0,1% Ponceau 5% CH ₃ COOH
Propidiumiodid-Lösung	50 µg/ml in ddH ₂ O
Protease Inhibitor Cocktail 14x	1 Tablette in 500 µl H ₂ O
Reaktionspuffer (MGMT-Assay)	70 mM Hepes-KOH (pH 7,8) 1 mM DTT 5 mM EDTA
RNA-Probenpuffer	97% Formamid 10 mM EDTA 0,025% Bromphenolblau 0,025% Xylencyanol F
RWDB	25 mM HEPES 10 mM KCl 12 mM MgCl ₂ 1 mM EDTA 1 mM DTT 17% Glycerin pH 7,9

SDS-PAGE-Laufpuffer	0,25 M Tris 1,92 M Glycin
SDS-PAGE-Trenngel (5; 7,5; 10; 12; 15%)	(7,2; 6,5; 5,7; 5,1; 4,3) ml ddH ₂ O 3 ml Tris-HCl (pH 8,8) 120 µl SDS (10%) (1,5; 2,3; 3,0; 3,6; 4,5) mL AA/BA (40%) 60 µl APS (10%) 6 µl TEMED
SDS-PAGE-Sammelgel (4%)	4,4 ml ddH ₂ O 0,76 ml Tris-HCl (pH 6,8) 60 µl SDS 0,76 ml AA/BA(40%) 60 µl APS (10%) 6 µl TEMED
TBE-(Tris-Borat-EDTA)-Puffer (5x)	450 mM Tris 450 mM Borsäure 6,25 mM EDTA
TBS (<i>Tris-buffered saline</i>)	10 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl
TBS-T	TBS mit 0,2% (v/v) Tween-20
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA
Transferpuffer (Western Blot)	50 mM Tris 384 mM Glycin 20% Methanol
Zelllysepuffer (alkalische SCGE)	2.5 M NaCl

	100 mM EDTA
	10 mM Tris
	1% Na-Laurylsarcosinat
	1% Triton X100
	10% DMSO
	pH 10
Zellysepuffer (neutrale SCGE)	2.5 M NaCl
	100 mM EDTA
	10 mM Tris
	1% Na-Laurylsarcosinat
	1% Triton X100
	10% DMSO
	pH 7,5
Zellysepuffer (MGMT-Assay)	20 mM Tris-HCl
	1 mM EDTA
	1 mM β -Mercaptoethanol
	5% Glycerin
	100 mM PMSF
	pH 8,5

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Zellkulturflaschen oder –schalen im jeweiligen Kulturmedium (siehe 2.1.9) im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre. Das Passagieren der adhärent wachsenden Zellen wurde im subkonfluenten Stadium durch Absaugen des Mediums, Waschen mit PBS und Ablösen der Zellen durch die Zugabe von Trypsin (0,25% (w/v) in PBS) durchgeführt. Suspensionszelllinien wurden zum Passagieren mit PBS gewaschen, in frischem Medium aufgenommen und nach Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer Zählkammer in einer entsprechenden Dichte (MM6: 0,2 x 10⁶; THP-1: 0,1 x 10⁶; U937: 0,1 x 10⁶) wieder in frischem Medium ausgesät.

Zur Zellkryokonservierung wurden exponentiell wachsende Zellen verwendet. Diese wurden geerntet, in frischem Medium aufgenommen und in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 1000 Upm für 5 min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in 1 ml Einfriereserum (90% FCS + 10% DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Diese Röhrchen wurden mithilfe einer isopropanolhaltigen Einfrierbox auf - 80°C abgekühlt. Am nächsten Tag wurden die Kryoröhrchen zur Langzeit-Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt. Das Auftauen von kryokonservierten Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37°C. Um das verbleibende DMSO zu entfernen, wurden die aufgetauten Zellen sofort im Kulturmedium gewaschen (1000 Upm, 5 min, RT). Danach wurden die Zellen in frischem 37°C warmen Kulturmedium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt.

Alle etablierten Zelllinien wurden durch das Mykoplasma-Detektions-Kit (Minerva Biolabs, Berlin) regelmäßig auf eine Kontamination mit Mykoplasmen untersucht.

Primäre Blutzellen, welche stets frisch isoliert wurden, wurden nicht konserviert, da diese Zellen zu empfindlich auf das Einfrieren mit DMSO reagieren. Die Zelldichte dieser Suspensionszellen für die folgenden Untersuchungen betrug 0,5-1x10⁶ Zellen/ml.

2.2.1.2 Isolierung humaner mononukleärer Zellen (PBMCs) aus peripherem Blut

Die Isolation humaner mononukleärer Zellen des peripheren Blutes (PBMCs, *engl. peripheral blood mononuclear cells*) erfolgte aus ‚Buffy Coat‘-Präparationen, die bei der Aufarbeitung von Blutkonserven gesunder Spender in Blutbanken anfallen. Die ‚Buffy

Coats' wurden von der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz bezogen. Diese mit Leukozyten angereicherte Fraktion enthält neben Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten auch PBMCs, welche sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichten durch Dichtezentrifugation separieren lassen. Zellen mit einer Dichte über 1,077 g/ml, wie z.B. Erythrozyten und Granulozyten, befinden sich nach einer Zentrifugation unterhalb der Ficoll-Schicht, während PBMCs und Thrombozyten als Interphase auf der Ficoll-Schicht aufliegen. Zur weiteren Aufreinigung der PBMCs wurde die Interphase abgenommen und die Thrombozyten durch mehrfaches Waschen entfernt. Zur Separation wurden sterile 50 ml Blut Separationsröhrchen benutzt, welche eine poröse Membran enthalten, die sowohl eine Mischung der Blutprobe mit dem Separationsmedium verhindert als auch nach der Zentrifugation eine Rekontamination der angereicherten PBMC Fraktion mit unerwünschten Blutkomponenten ausschließt. Es wurden 15 ml LSM 1077 Lymphozyten Separations Medium (1,077 g/ml) auf die Membran gegeben und mittels kurzer Zentrifugation (30 s, 1500 Upm, 20°C) unter die Membran gebracht. Das Röhrchen wurde nun mit etwa 30 ml *'Buffy Coat'*-Blut gefüllt. Nach Dichtezentrifugation (45 min, 2500 Upm, 4°C, ohne Bremse) wurde das Serum/Plasma abgenommen und für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert. Durch zweimalige hochtourige Zentrifugation von 4000 Upm für 5 min bei 4°C wurde das Serum von ausgefällten Proteinen befreit und für die Kultivierung der Monozyten, DCs, Makrophagen und weiterer Immunzellen bei 4°C aufbewahrt. Die Interphase wurde in neue 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und auf 50 ml mit kaltem PBS + 2 mM EDTA aufgefüllt. Die PBMCs wurden bei 1800 Upm für 10 min und 4°C abzentrifugiert und der thrombozytenhaltige Überstand entfernt. Anschließend erfolgten zwei weitere Waschschrte, der erste bei einer Zentrifugation von 1200 Upm für 10 bis 15 min und der zweite bei 1000 Upm für 15 bis 20 min, jeweils bei 4°C. Die isolierten PBMC wurden in RPMI mit 1,5% autologem Plasma aufgenommen, mit Trypan-Blau angefärbt und ausgezählt.

2.2.1.3 Anreicherung von Monozyten aus PBMCs

Zur Separation der Monozyten wurde deren Adhärenzfähigkeit auf Polystyrol-Platten genutzt. Für die Anreicherung der Monozyten und auch die DC oder Makrophagen Generierung aus Monozyten wurden 6-well-Mehrfachkulturschalen bzw. 3 cm-Schalen (Corning) verwendet. Bei den 6-well-Mehrfachkulturschalen wurden 15 bis 25 $\times 10^6$ der aufgereinigten PBMCs in 2 ml RPMI + 1,5% autologes Serum pro Well pipettiert und 45 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die nicht-adhärenenten Zellen durch mehrfaches, vorsichtiges Abspülen mit vorgewärmten PBS (37°C) entfernt. Wenn

Monozyten in großer Zahl angereichert werden sollten, wurden 150×10^6 Zellen in 15 ml RPMI + 1,5% autologes Plasma in 14 cm-Schalen inkubiert und diese ebenso gespült. Zum zügigen Ablösen der Monozyten von den Zellkulturschalen wurden die Monozyten, je nach Versuchsablauf, entweder über Nacht in RPMI + 10% autologem Plasma kultiviert oder mittels Accutase unverzüglich nach dem Abspülen nicht-adhärenter Zellen abgelöst.

2.2.1.4 Generierung von dendritischen Zellen aus humanen Monozyten

Zur Generierung von DCs aus Monozyten wurde das Protokoll von Jonuleit *et al.* (1997) angewendet. Für die Differenzierung von Monozyten in unausgereifte DCs wurden adhärenente Monozyten mit 3 ml X-Vivo 15, 1,5% autologem Serum, 800 U/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4 versetzt. Die Zellen wurden alle 3 Tage mit frischem Medium und Zytokinen versorgt, indem 900 µl pro Well abgenommen und verworfen wurden und mit frischem 1 ml X-Vivo 15 Medium mit 1,5% autologem Serum, 1600 U/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4 versetzt wurden. Nach einer Kultivierung über insgesamt 7 Tage wurden die in Suspension befindlichen unausgereiften DCs geerntet.

2.2.1.5 Generierung von Makrophagen aus humanen Monozyten

Für die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen wurden adhärenente Monozyten mit 2 ml X-Vivo 15 + 1,5% autologem Serum mit 800 U/ml GM-CSF versetzt. GM-CSF verstärkt die Induktion der Makrophagenausreifung. Die Zellen wurden alle 3 Tage mit frischem Medium und Zytokinen versorgt, indem 900 µl pro Well abgenommen und verworfen wurden und mit frischem 1 ml X-Vivo 15 Medium + 1,5% autologem Serum und 1600 U/ml GM-CSF versetzt. Nach 6 Tagen wurden die adhärenenten Makrophagen für Experimente eingesetzt und mittels Accutase von der Zellkulturplatte abgelöst.

2.2.1.6 Vitalitätsermittlung durch Trypan-Blau-Detektion

Zur Ermittlung der Zellvitalität von Primärzellen nach Isolierung aus dem Blut wurden diese mit einem Volumen Trypan-Blau (0,04%) versetzt und die vitalen und leuchtenden Zellen in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und sind im Mikroskop durch ihre Blaufärbung zu erkennen.

2.2.2 Phänotypcharakterisierung

Um die Reinheit der isolierten Monozyten bzw. die Ausreifung der kultivierten DCs und Makrophagen zu ermitteln, wurden die Zellen einer Markierung zur Phänotypisierung und anschließender FACS-Analyse unterzogen. Dazu wurden je 0,5 bis 1 x10⁵ Zellen eingesetzt und nach folgendem Schema gefärbt:

Tabelle 2.1: Liste der zur Phänotypisierung von Monozyten, DCs und Makrophagen verwendeten Antikörper.

Antikörper	Isotyp	Farbstoff
maus IgG1 (Isotypkontrolle FL-1)	maus IgG1	FITC
maus IgG2a (Isotypkontrolle FL-2)	maus IgG2a	PE
human HLA-DR	maus IgG2b	FITC
human CD3	maus IgG2a	PE
human CD14	maus IgG2a	PE
human CD19	maus IgG1	PE
human CD80	maus IgG1	PE
human CD86	maus IgG2b	PE

Die Zellen wurden mit FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert (5 min, 1500 Upm, 4°C) und anschließend mit je 5 µl der Antikörper für 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Zur Entfernung überschüssiger Antikörper wurden alle Ansätze erneut in FACS-Puffer gewaschen und zur Fixierung in 200 bis 500 µl FACS-Fixans aufgenommen. In der Analyse am Durchflusszytometer FACSCalibur wurden HLA-DR positive Zellen im FL-1-Kanal dargestellt, während CD3⁺, CD14⁺, CD19⁺, CD80⁺, CD86⁺ und Zellen im FL-2-Kanal gemessen wurden. Zur Auswertung wurde die CellQuest Pro und WinMDI Software verwendet. Die Zellen wurden im ‚Density-Blot‘ (FL-1 gegen FL-2) dargestellt und mit Quadrantenstatistik der Prozentsatz der einzelnen Zellpopulationen bestimmt.

2.2.3 Behandlung der Zellen mit *tert*-BOOH und H₂O₂

Die Behandlung mit *tert*-Butylhydroperoxid (*tert*-BOOH) und Wasserstoffperoxid (H₂O₂) erfolgte durch Zugabe einer bestimmten Konzentration der jeweiligen Lösung in das Medium der Zellen. Hierfür wurde von beiden Stoffen eine Stammlösung hergestellt. Sowohl *tert*-BOOH als auch H₂O₂ wurde mit *A.bidest* auf eine Stock-Konzentration von

10 mM verdünnt und bei 4°C gelagert. Die Lagerung von H₂O₂ erfolgt lichtgeschützt. Danach wurden die Zellen bis zum gewünschten Zeitpunkt kultiviert.

2.2.4 Behandlung der Zellen mit oxLDL

Zur Oxidation von LDL (*engl. ‚low density lipoprotein‘*) muß zuvor das im LDL enthaltene EDTA entfernt werden. Hierzu wurde das LDL über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert. Zur Vermeidung von größeren Verdünnungseffekten soll anschließend die LDL-Fraktion möglichst konzentriert in ein Well einer 24-well-Zellkulturplatte überführt werden, um eine große Oberfläche für die Oxidation zu erhalten. Als Oxidationsmittel dient Kupfersulfat in einer Endkonzentration von 25 µM. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C. Am nächsten Tag sollte die Probe hellgelb bis weißlich und trüb aussehen. Zur Entfernung des Kupfersulfats wurde die LDL-Probe nochmals über Nacht bei 4°C gegen PBS dialysiert. Anschließend wurde die trübe Hauptfraktion möglichst konzentriert in ein Reaktionsgefäß überführt. Zur Kontrolle wurde natives LDL verwendet, das bis auf die Oxidation mittels Kupfersulfat wie das oxidierte LDL behandelt wurde. Um nun Zellen behandeln zu können, wurde zuvor oxLDL über einen 0,4 µM und nLDL über einen 0,2 µM Spitzenfilter sterilfiltriert. Anschließend wurde die Proteinkonzentration nach Bradford (siehe 2.2.11.6) bestimmt. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei 4°C.

2.2.5 Behandlung der Zellen mit ionisierender Strahlung

Die Behandlung mit ionisierender Strahlung (IR) erfolgte in Zellkulturschalen (3 cm). Die Bestrahlung erfolgte mit einer Dosis von 3,75 Gy/min einer Cäsium 137 Quelle.

2.2.6 Behandlung von Zellen mit Zytostatika

Die Behandlung mit Temozolomid und Methylmethansulfonat (MMS) erfolgte durch Zugabe einer bestimmten Konzentration der jeweiligen Lösung in das Medium der Zellen. Hierfür wurde von beiden Stoffen eine Stammlösung hergestellt. Temozolomid wurde mit einer Konzentration von 35 mM in DMSO gelöst, aliquotiert und bei -80°C gelagert. MMS wurde zuvor mit *A.bidest* auf eine Stock-Konzentration von 100 mM verdünnt. Wurden die Zellen mit O⁶BG (Endkonzentration 10 µM) Co-behandelt, erfolgte dies 1 h vor der Zytostatikagabe. Danach wurden die Zellen bis zum gewünschten Zeitpunkt kultiviert.

2.2.7 Zytotoxizitätsuntersuchungen

2.2.7.1 Bestimmung der metabolischen Zellaktivität

Durch einen kolorimetrischen Assay mit dem WST-1-Reagenz (Roche, Mannheim) kann die Vitalität von Zellen bestimmt werden. Grundlage dieser Untersuchung ist, dass das Tetrazoliumsalz WST-1 von mitochondrialen Dehydrogenasen je nach metabolischer Aktivität (Vitalität) der Zellen zu dunkelrotem Formazan reduziert und gespalten wird. Dies kann photometrisch durch einen Mikrotiterplatten-Reader detektiert werden. Entsprechend in 96-well-Mikrotiterplatten ausgesäte und behandelte Zellen wurden mit WST-1 (1:10) versetzt. Nach 30 bis 60-minütiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Bestimmung der Absorption bei 450 nm und 600 nm als Referenzwellenlänge. Die Ergebnisse zeigen die Vitalitäten (%) der behandelten Zellen als Verhältnis der Absorption der Kontrolle zur behandelten Zelle.

2.2.7.2 Bestimmung der Apoptosefrequenz durch SubG1-Messung

Die Bestimmung der Apoptosefrequenz erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Apoptotische Zellen schnüren membranumhüllte Chromatinfragmente ab und besitzen im Vergleich zu G1-Phase-Zellen einen reduzierten DNA-Gehalt. Somit basiert die Messung der SubG1-Zellfraktion darauf, dass der DNA-Gehalt apoptotischer Zellen unterhalb des DNA-Gehalts einer Zelle in der G1-Phase liegt (Huschtscha et al., 1994; Nicoletti et al., 1991). Zusätzlich lässt sich mit dieser Methode die Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen ermitteln.

Die behandelten Zellen wurden geerntet und mit PBS gewaschen. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in 200 µl kaltem PBS aufgenommen und durch tropfenweise Zugabe von 70%igen (v/v) EtOH mindestens 30 min bei -20°C fixiert. Nach erneuter Zentrifugation (1500 Upm, 4°C) wurden die Zellen in PBS aufgenommen und mit RNase A (Konz._{End}: 100 µg/ml) für 30 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von PI (Konz._{End}: 20 µg/ml), die Analyse am Durchflusszytometer FACSCalibur und die Quantifizierung der apoptotischen SubG1-Fraktion mittels CellQuest Pro Software und der WinMDI Software.

2.2.7.3 AnnexinV-PI Doppelfärbung

Diese Methode basiert auf einer Umlagerung der Phosphatidylserin-Reste von der Innenseite auf die Außenseite der Zellmembran, was ein frühes Ereignis der Apoptose darstellt (Vermees et al., 1995). Durch AnnexinV-FITC können diese umgelagerten Serinreste nachgewiesen werden. In 24-well-Zellkulturplatten wurden 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen ausgesät und beim Ernten der Überstand und die durch Trypsin abgelösten Zellen vereinigt. Nach dem Waschen der Zellen mit kaltem PBS und einem Zentrifugationsschritt (1000 Upm, 5 min, 4°C) wurde das Zellpellet in 50 µl Annexin-Bindungspuffer (10 mM HEPES (pH 7,4), 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, 0,1% BSA) aufgenommen und auf Eis gestellt. Anschließend wurden 2,5 µl Annexin V-FITC zu den Zellen gegeben und 15 min auf Eis inkubiert. Um die DNA anzufärben wurden pro Ansatz 430 µl Bindungspuffer und 10 µl PI (50 µg/µl) zugegeben. Die Messung am Durchflusszytometer FACSCalibur erfolgte direkt im Anschluss und wurde mithilfe der CellQuest Pro und der WinMDI Software quantifiziert. Die Zellpopulation, welche weder für AnnexinV noch für PI positiv ist, beschreibt die lebende Population. Die nur AnnexinV positiven Zellen stellen die früh apoptotische Population dar, die AnnexinV und PI positiven Zellen die spät apoptotischen und nekrotischen Zellen.

2.2.8 Quantifizierung von Reaktiven Sauerstoffspezies (CM-H₂DCFDA-Test)

Um die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu quantifizieren, wurde das von Wang et al. (1999) entwickelte Verfahren für Microtiter-Patten leicht modifiziert verwendet. 5-(und 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein-Diazetat (CM-H₂DCFDA; Abb. 2.1) kann aufgrund seiner fehlenden Polarität die Membran der Zellen passiv durchdringen. In den Zellen wird der chemisch reduzierte, acetylierte und nicht-fluoreszierende CM-H₂DCFDA-Farbstoff in Gegenwart von ROS durch intrazelluläre Esterasen und Oxidation deacetyliert und zu fluoreszierenden CMDCF umgesetzt. Aufgrund der Polarität des Reaktionsproduktes kann dies die Zellen nicht mehr verlassen. Durch Messung der Fluoreszenz-Intensität mithilfe des Durchflusszytometers FACSCalibur und der CellQuest Pro und WinMDI Software ist es möglich, die entstandenen ROS in den Zellen zu quantifizieren und zu vergleichen.

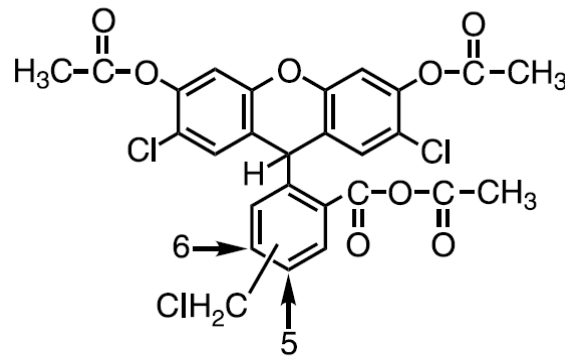


Abb. 2.1: 5-(und 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein-Diazetat (CM-H₂DCFDA).

Der CM-H₂DCFDA-Test wurde folgendermaßen durchgeführt: Die 10 µM CM-H₂DCFDA Stammlösung wurde jeweils kurz vor Beendigung der Behandlung mit *tert*-BOOH frisch angesetzt und 1:100 in PBS weiterverdünnt (Endkonzentration 0,1 µM). Nach Beendigung der Behandlung wurde das Zellkulturmedium durch 50 µl der 0,1 µM CM-H₂DCFDA-Lösung ersetzt. Nach der Inkubation (1 h, 37°C) wurde die CM-H₂DCFDA-Lösung wieder entfernt, die Wells wurden 3x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 70%igen EtOH für mindestens 20 min bei -20°C fixiert und vor der Messung in PBS aufgenommen. Die Fluoreszenz-Intensität der Zellen wurde im Durchflusszytometer im FL-1 Kanal bestimmt.

2.2.9 Bestimmung von DNA-Strangbrüchen mittels Einzelzellgelelektrophorese (SCGE; ‚Comet-Assay‘)

Mittels SCGE können DNA-Strangbrüche auf Einzelzellebene detektiert werden. In Agarose eingebettete Zellkerne wurden einer Elektrophorese unterzogen, wobei die durch Strangbrüche fragmentierte DNA im elektrischen Feld aus dem Zellkern herauswandert und einen Kometenschweif bildet. Die Länge und Intensität der Kometen korreliert mit der Menge an DNA-Strangbrüchen. Zur Detektion von Doppelstrangbrüchen wurden neutrale Pufferbedingungen, zur Detektion von ESBs, DSBs sowie alkalilabiler Stellen wurden alkalische Bedingungen nach einer modifizierten Methode von Singh *et al.* (1988) und Klaude *et al.* (1996) verwendet.

2.2.9.1 Neutrale Einzelzellelektrophorese

20 µl der zu untersuchenden Zellsuspension (1×10^6 ml) wurden in 120 µl LMP-Agarose (0,5% (w/v) in *A. bidest*, 37°C) auf Agarose-beschichteten Objektträgern (1,5% (w/v) in PBS) aufgetragen und mit einem Deckglas bedeckt. Nach 5 min Lagerung bei 4°C wurde das Deckglas abgezogen und die Präparate für 1 h bei 4°C in neutralem Lysepuffer inkubiert. Danach erfolgte direkt die Elektrophorese in 4°C kaltem Elektrophoresepuffer bei 25 V für 15 min mit anschließendem Waschen in *A. bidest*, Fixierung für 5 min in 98% EtOH und Trocknung bei RT für mindestens 2 h.

2.2.9.2 Alkalische Einzelzellelektrophorese

Bei der alkalischen SCGE erfolgte die Lyse im alkalischen Puffer. Vor der Elektrophorese wurde die DNA durch eine 25-minütige Inkubation im alkalischen Elektrophoresepuffer denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 25 V mit 300 mA für 25 min. Anschliessend wurden die Präparate 3 x 5 min in Neutralisationspuffer gewaschen, in 98% EtOH fixiert und getrocknet.

2.2.9.3 Auswertung

Zur Auswertung wurden die Objektträger mit 50 µl PI (50 µg/ml) gefärbt und bei 20-facher Vergrößerung am Fluoreszenzmikroskop Olymp mit einer CCD-Kamera ausgewertet. Pro Messpunkt wurden 50 Zellen ausgewertet und die relative Kometlänge (*engl. Olive Tail Moment*, OTM) als das Produkt der DNA-Menge (%) im Komet-Schwanz und der Distanz zwischen den Zentren der Masse vom Komet-Kopf und Komet-Schwanz definiert (Olive et al., 1991). Als Analysesoftware diente Kinetic Imaging Komet 4.0.2 (BFI Optilas, Puchheim).

2.2.10 Arbeiten mit Nukleinsäuren

2.2.10.1 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA in wässriger Lösung erfolgte mit dem NanoDrop®-ND-1000-Spektrophotometer (Fa. NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) bei $\lambda = 260/280/320$ nm gegen *A. bidest* als Referenz. Eine OD_{260} von 1 entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml DNA oder 40 µg/ml RNA. Das Verhältnis

OD₂₆₀/OD₂₈₀ gibt Aufschluss über Reinheit der DNA-Lösung. Sie beträgt bei reiner DNA 1,8 und bei RNA $\geq 2,0$. Verunreinigung durch Proteine können bei einer Wellenlänge von 320 nm detektiert werden.

2.2.10.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA und RNA nach Molekulargewicht wurde die DNA-haltige Lösung mit 6x Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen eines horizontalen Agarosegels (1% in TBE, 0,5 µg/ml EtBr) pipettiert. Als Molekulargewichtsstandard wurden EcoR I/Hind III-geschnittene λ-Phagen-DNA verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V. Die Visualisierung und Dokumentierung des Gels per UV-C erfolgte durch das Geldokumentationssystem GeneSnap und der GeneTools Software.

2.2.10.3 RNA-Isolation

Isolierung von Gesamt-RNA wurde mittels NucleoSpin[®]-RNA II Kit (Macherey Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Elution der RNA erfolgte mit 30 µl H₂O (RNase frei). Die RNA Konzentration im Eluat wurde spektrometrisch am Nanodrop ermittelt. Die Stabilität der RNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Hat keine Verunreinigung mit RNasen stattgefunden, was zum Abbau der RNA geführt hätte, sollten nach Ethidiumbromidfärbung des Agarosegels und Visualisierung durch das Geldokumentationssystems GeneSnap sowohl die 18S- als auch die 28S-rRNA Bande ohne Degradation zu sehen sein.

2.2.10.4 Synthese von cDNA mittels Reverser Transkriptase

Um die Expression eines Gens auf mRNA Ebene zu untersuchen, wurden zunächst die mRNA durch die enzymatische Aktivität der Reversen Transkriptase unter Verwendung eines ‚Oligo dT Primers‘ in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Diese wurde im Anschluß als Matrize für eine genspezifische PCR Reaktion verwendet. Die Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA erfolgte mittels des ‚Verso™ cDNA Kit‘ von ABGene (Hamburg) nach Angaben des Herstellers. Für die Reaktion wurde 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt.

2.2.10.5 Semiquantitative Endpunkt-RT-PCR

Diese Methode wird verwendet um zu untersuchen, in welcher Größenordnung ein bestimmtes Gen (repräsentiert durch ein Fragment dieses Gens) auf mRNA-Ebene im Vergleich zu Referenzproben transkribiert wurde. Bei der PCR handelt es sich um eine Methode, um kurze Nukleinsäurestücke zu amplifizieren. Dies kann, durch eine Denaturierung der nach jedem Zyklus neu entstandenen DNA-Doppelstränge, beliebig oft wiederholt werden. Um spezifische Nukleinsäurestücke zu vervielfältigen, sind Primer notwendig, die auf den verschiedenen Strängen der DNA binden und mit ihren 3'-Enden aufeinander zuweisen. Durch die thermostabile Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* werden die Primer an ihrem 3'-OH-Ende anhand der vorliegenden Matrize verlängert. Die neu synthetisierten Stränge dienen im nächsten Zyklus wieder als Matrize, an welche die Primer hybridisieren können. Dadurch wächst die Anzahl an DNA-Fragmente exponentiell an.

Die PCR Reaktion wurde durchgeführt mit 15 µl REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaktionsmix, 0,5 bis 4 µl cDNA, 1 µM Primer in einem Endvolumen von 30 µl. PCR Parameter waren folgende: initialer Denaturierung: 95°C, 2 min; 20-35 Amplifikationszyklen zur Vervielfältigung des gewünschten DNA-Fragments mit Denaturierung: 95°C, 30 s; Anlagerung der Primer („Annealing“): 50-65°C, 45 s; Elongation: 72°C, 1 min und terminale Elongation: 72°C, 10 min. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte über 1%iges Agarose-Gel, die Visualisierung der DNA mithilfe von EtBr-Färbung sowie des Geldokumentationssystems GeneSnap.

2.2.10.6 Semiquantitative Real-Time-RT-PCR

Sowohl der PCR-Array zur Untersuchung von 96 Genen gleichzeitig (siehe Anhang; Tab. 6.2) als auch die Quantifizierung der RNA-Expression einzelner Gene erfolgte mittels semiquantitativer Real-Time-PCR, wobei ‚SYBR Green‘ als Fluoreszenzfarbstoff verwendet wurde. Für die PCR-Reaktion wurde der 2x SYBR®GreenER™ qPCR SuperMix (Fa. Invitrogen), welcher u. a. SYBR Green, Taq-Polymerase, dNTPs und Mg²⁺ enthält, verwendet. Zur internen Normierung wurde unter Einsatz geeigneter Primer ein DNA-Fragment des *β-Actin*-Gens parallel mitamplifiziert. Die Analyse erfolgte im Bio-Rad-iCycler™ IQ mithilfe der iCycler™-Software von Bio-Rad.

2.2.10.6.1 PCR-Array

Zunächst wurde ein Mastermix bestehend aus 1 ml 2x SYBR Green Mix (s.o.), 100 µl cDNA und 100 µl H₂O vorbereitet. Je 12 µl dieser Lösung wurden in die Löcher einer 96-well-Platte pipettiert, in denen 8 µl eines genspezifischen Primerpaars (625 nM) vorlagen. Die PCR wurde unter folgenden Parametern durchgeführt:

50°C	2 min	}	Vorbereitung 2x SYBR [®] GreenER [™] qPCR SuperMix	
95°C	8 min 30 s			
95°C	15 s	}	45x	
55°C	30 s			Denaturierung des DNA-Doppelstrangs
				Anlagerung der Primer
72°C	40 s		Elongation: Temperaturoptimum der <i>Taq</i> -Polymerase	

Im Verlauf eines jeden Zyklus' wird die Fluoreszenzintensität des SYBR[®]Green, welches in der dsDNA interkaliert, gemessen. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist proportional zur Menge des PCR-Produkts. Kalibriert wurde auf einen beliebigen Messwert eines jeden PCR-Laufs. Normalisierung sowie Kalibrierung erfolgten automatisch durch die Software iQ5 2.0 Standard Edition. Wurde der Ct-Wert erst bei einer Zyklenzahl > 35 erreicht, so führte dies zu einem Ausschluss aus der Expressions-Analyse. Zur Verifizierung der spezifischen Amplifikation wurde vom Gerät eine Schmelzkurve erstellt, aus der die Schmelztemperatur T_m des/der Amplifikate ablesbar ist und die mit der theoretischen T_m des gewünschten Amplifikats verglichen werden kann. Hierzu dienten folgende Parameter:

95°C	1 min	Initiale Denaturierung
55°C	1 min	Abkühlen auf Starttemperatur
+0,5 °C in 10 s bis Erreichen von 95°C		Detektion der Fluoreszenzintensität

Wurden hierbei Primer-Dimere oder unspezifische Amplifikate detektiert, so erfolgte der Ausschluß des PCR-Laufs aus der Expressions-Analyse.

2.2.10.6.2 Semiquantitative Real-Time-RT-PCR zur Analyse einzelner Genen

Zur Analyse einzelner Gene oder Verifizierung der Ergebnisse des PCR-Arrays wurden jeweils für einen Reaktionsansatz 0,4 µl cDNA mit 1,67 µM Primer und 10 µl 2x SYBR[®]GreenER[™] qPCR SuperMix in einem Endvolumen von 20 µl versetzt. Jede Probe

wurde als Triplikate angelegt. Sollte sich eines der Triplikate deutlich von den anderen beiden unterscheiden, so wurde es aus der Genexpressions-Analyse ausgeschlossen. Das verwendete PCR-Programm und die Qualitätskontrolle (T_m , Zyklenzahl) entsprachen denen des PCR-Arrays (s.o.).

2.2.11 Untersuchung der Proteinexpression

2.2.11.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen (1500 Upm, 5 min, 4°C) und das Zellsediment in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (4000 Upm, 5 min, 4°C). Danach wurde der Überstand erneut verworfen. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Zur Herstellung der Extrakte wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und je nach Größe in einer bestimmten Menge (80 – 250 µl) Lysepuffer + 1x Protease Inhibitor Cocktail (Fa. Roche) resuspendiert. Mittels Inkubation auf Eis für 30 min wurde die Zellmembran aufgebrochen und das Proteinlysate durch Zentrifugation (14000 Upm, 25 min, 4°C) geklärt. Die Extrakte wurden bei -20°C gelagert. Eine Proteinbestimmung erfolgte nach Bradford (siehe 2.2.11.6).

2.2.11.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten für den MGMT-Assay

Die Herstellung der Proteinextrakte zur Bestimmung der MGMT-Aktivität erfolgte ebenfalls durch Resuspendieren der zuvor in flüssigem Stickstoff schockgefrorenen Zellen in Zellysepuffer und darauffolgenden Aufschluss der Zellmembran durch Ultraschall-Behandlung. Das Proteinlysate wurde im Anschluß durch Zentrifugation (14000 Upm, 15 min, 4°C) geklärt. Der Überstand, in welchem die Proteine gelöst sind, wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.11.3 Herstellung von Gesamtzellextrakten für den BER-Assay

Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und das Zellsediment in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, wie bereits unter 2.2.11.1 beschrieben. Anschließend wurden

die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für mindestens 1 h bei -80°C gelagert.

Zur Lyse wurden die Zellen in BER-Zellysepuffer I (+ 1 µg/ml Leupeptin, Chymnostatin, Pepstatin und Aprotinin, + 1 mM DTT, + 1 µM PMSF) aufgenommen und anschließend das zweifache Volumen BER-Zellysepuffer II zugegeben. Nach gründlichem Mischen wurden die Ansätze für zwei Stunden auf dem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert. Die Trennung von verbleibenden Zellfragmenten und Nukleinsäuren vom Proteinextrakt erfolgte danach durch eine Zentrifugation in der Ultrazentrifuge bei 40.000 Upm und 4°C für 20 min. Der die gelösten Proteine enthaltene Überstand wurde gesammelt und über Nacht bei 4°C gegen RWDB + 1 mM DTT dialysiert. Unlösliche Zellbestandteile und Zellmembranen wurden bei 14.000 Upm und 4°C für 10 min sedimentiert. Um eine Abnahme der Enzymaktivität bei wiederholtem Auftauen und Einfrieren zu vermeiden, wurden die Proteinsuspensionen abschließend aliquotiert und die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur Verwendung erfolgte die Lagerung bei -80 °C.

2.2.11.4 Herstellung von Gesamtzellextrakten für den 8-oxoG-Assay

Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und das Zellsediment in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, wie bereits unter 2.2.11.1 beschrieben. Anschließend wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für mindestens 1 h bei -80°C gelagert.

Bei einer Zellmenge von etwa 8×10^6 wurden die Zellen in 80 µl Extraktionspuffer aufgenommen und die mittels Ultraschall (10 Zyklen; 1s Puls + 9s Pause) die Zellmembran aufgebrochen. Nach einer Zentrifugation (14.000 Upm, 12 min, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und nochmals unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert, um unlösliche Zellfragmete komplett von der Proteinsuspension zu trennen. Anschließend wurden 80 µl des Überstandes mit 320 µl Verdünnungspuffer gemischt, um eine finale Konzentration von 50 mM Tris-HCl (pH 7.1), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTT und 20% Glycerin in den Extrakten zu erreichen. Eine Aufkonzentrierung der Proteinsuspension erfolgte durch eine Microcon YM-10 Filtereinheit (10.000 MWCO) bei 14.000 Upm für 90 bis 120 min bei 4°C. Danach wurde die Filtereinheit umgedreht und in ein frisches Reaktionsgefäß gesetzt und mittels Zentrifugation (1000 Upm, 6 min, 4°C) die konzentrierte Proteinsuspension aus der Filtereinheit gelöst. Diese wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.11.5 Herstellung von Kernextrakten für den DNA-PK-Aktivitäts-Assay

Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und das Zellsediment in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, wie bereits unter 2.2.11.1 beschrieben. Zur Lyse wurden die Zellen im zweifachen Volumen Extraktionspuffer + 1x Protease Inhibitor Cocktail (Fa. Roche) aufgenommen und anschließend dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 30°C aufgetaut. Die Trennung von verbleibenden Zellfragmenten und Nucleinsäuren vom Proteinextrakt erfolgte danach durch eine Zentrifugation bei 12.000 Upm und 4°C für 30 min. Der die gelösten Proteine enthaltende Überstand wurde gesammelt und endogene DNA mittels DEAE Sepharose® Fast Flow entfernt. Die Proteinsuspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.2.11.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Bradford-Test (Bradford, 1976) ist eine photometrische Methode zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. In saurer Lösung bildet der Farbstoff Comassie-Brilliant-Blau mit den Seitenketten der Proteine Komplexe. Hierdurch verschiebt sich das Absorptionsspektrum von 470 auf 595 nm. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist hierbei ein Maß für die Proteinkonzentration. Um den Proteingehalt der verschiedenen Extrakte zu bestimmen, wurde in einer 96-well-Platte 1 µl der Probe mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt und die Absorption nach 5 min Inkubation im Dunklen am Mikroplatten-Reader bei 600 nm bestimmt. Die Proteinkonzentration wurde anhand einer BSA-Eichkurve (0 bis 6 µg BSA) mit dem Programm Ascent Software v2.6 errechnet.

2.2.11.7 Western Blot-Analyse

Das hier verwendete Western Blot-Verfahren basiert auf der Methode von Renart et al., welche erstmals Ende der 70er Jahre beschrieben wurde (Renart et al., 1979). Sie ermöglicht die Detektion und Quantifizierung spezifischer Proteine aus einem Proteinextrakt. Dabei werden Proteine, nachdem sie in einem denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt wurden, auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend mit spezifischen Antikörpern, welche selektiv an die zu untersuchenden Proteine binden, inkubiert. Die gebundenen Primärantikörper werden anschließend mit einem Sekundärantikörper, der entweder mit

Meerrettichperoxidase oder mit einem Fluorophor gekoppelt ist, detektiert und die Proteine entsprechend sichtbar gemacht.

2.2.11.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Diese Methode beruht auf der gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Hierbei wurden, je nach Größe des zu detektierenden Proteins, denaturierende Polyacrylamidgele mit 5, 7.5, 10, 12, oder 15% Acrylamid-Anteil verwendet. Zuerst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten (Bio-Rad, München) gegossen und zum Glätten der Oberfläche mit Isopropanol überschichtet. Nach Beendigung der ca. 30-minütigen Polymerisation wurde das Isopropanol verworfen und das Trenngel mit einem Sammelgel überschichtet, in welches ein Kamm eingebracht wurde um Ladetaschen auszusparen. Nach Beendigung der Polymerisation wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit SDS-Laufpuffer ausgespült. Pro Tasche wurden zwischen 20 und 60 µg Protein geladen, was zuvor mit ¼ Volumen 4x Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert wurde. Die Auftrennung erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 80 bis 130 V.

2.2.11.7.2 Western Blot-Transfer

Nach der Auftrennung der Proteine wurden diese durch Elektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Hierfür wurde das Polyacrylamidgel auf eine in Blot-Puffer getränkte Nitrozellulosemembran gelegt. Beide Seiten wurden von einem ebenfalls mit Puffer getränktem Whatman-Papier und einem Schwammtuch umschlossen, in einer Halterung fixiert und vertikal in eine mit Blot-Puffer gefüllte Transferkammer gestellt, so dass die Nitrozellulosemembran zur Anode hin orientiert war. Die Überführung der Proteine erfolgte bei 300 mA für 1 h oder bei 100 mA und 4°C über Nacht. Nach dem Transfer wurde die Beladung der Nitrozellulosemembran durch Färbung mit Ponceau S-Lösung überprüft. Anschließend wurde die Membran mit TBS-T gespült, um die Färbelösung zu entfernen.

2.2.11.7.3 Detektion von Proteinen mittels Antikörpern

Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur mit einer Blockierungslösung (5% Magermilch in TBS-T oder 5% BSA in TBS-T; je nach Angaben des Antikörper-Herstellers) geblockt. Die Inkubation mit dem

primären Antikörper erfolgte ebenfalls in der entsprechenden Blockierungslösung über Nacht bei 4°C oder für 2 h bei RT. Am nächsten Tag wurde die Membran 3x 10 min mit TBS-T gewaschen und für 1 h mit dem entsprechendem Sekundärantikörper inkubiert. Danach wurde die Membran erneut 3x 10 min gewaschen. War der Sekundärantikörper mit Meerrettichperoxidase gekoppelt, wurde das Chemolumineszenzsignal der gebundenen Antikörper durch ein ECL-Kit auf einem ‚high performance chemoluminescence film‘ dokumentiert. Bei Verwendung von Infrarot-Farbstoffgekoppelten Sekundärantikörpern wurde die Membran nach dem letzten Waschen getrocknet und mit dem Odyssey-System gescannt. In beiden Fällen erfolgte die Bildbearbeitung mit Photoshop v7.

Sollte auf der Membran ein zweiter primärer Antikörper verwendet werden, wurde sie 2x 20 min in 100 mM Glycinlösung (pH 2,8) inkubiert, um die vorigen Antikörper zu entfernen. Danach wurde der Nitrocellulosemembranen 1x 10 min mit TBS-T gewaschen.

2.2.11.8 Immunfluoreszenz (γ H2AX-Foci)

2.2.11.8.1 Vorbereitung der Deckgläser und Ansetzen des Versuchs

Die Reinigung der Deckgläser (20 x 20 mm) erfolgte für 15 min in Diethylether und einem anschließenden Waschen für 5 min mit 100%igem EtOH, 5 min mit 70%igem Ethanol und mit *A.bidest*. Damit sich die Zellen auf den Deckgläsern anheften können, wurde ihre Oberfläche durch eine 20-minütige Behandlung mit 1 M HCl aufgeraut. Die Lagerung der Deckgläser erfolgte in 70%igem Ethanol. Für die Versuche wurde jeweils ein Deckglas in ein well einer 6-well-Mehrfachkulturschale oder 6-cm-Zellkulturschale gelegt. Nach vollständigem Verdampfen des Alkohols wurden entweder PBMCs ausgesät, 1 h bei 37°C inkubiert, zur Anreicherung von Monozyten mit PBS gewaschen (2.2.1.3) und zur Untersuchung der Makrophagen entsprechend mit GM-CSF behandelt (2.2.1.5). Dendritische Zellen wurden routinemäßig ausdifferenziert (2.2.1.4) und nach Bestimmung der Zellzahl 1×10^6 Zellen in 1 ml Methanol/Aceton aufgenommen und auf das Deckgläschen getropft. Durch das zügige Verdampfen des Alkohols konnten die eigentlichen Suspensionszellen sehr gut auf dem Deckgläschen fixiert werden.

2.2.11.8.2 Antikörper- und ToPro3-Färbung

Vor dem Fixieren von Monozyten und Makrophagen wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Das Fixieren erfolgte für in

Methanol:Aceton (7:3 v/v) bei -20°C. Danach wurden die Zellen 3x 5 min mit PBS gewaschen und 1 h in Blockierungslösung (5% BSA in PBS mit 0,1% Triton X-100) bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Blockierungslösung abgenommen wurde, wurden je 50 µl Primärantikörper in PBS mit 0,1% Triton X-100 verdünnt auf jedes Deckglas gegeben. Nach einer Inkubation von 1 h bei RT wurden die Zellen auf dem Deckglas 2x 5 min mit PBS, 1x 2 min mit PBS-*high salt* (0,4 M NaCl) und 1x 5 min mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 50 µl des in PBS mit 0,5 % BSA, 0,1% Triton X-100 verdünnten fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpers auf die Deckgläser gegeben und in Dunkelheit für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde erneut 2x 5 min mit PBS, 1x 2 min mit PBS-*high salt* (0,4 M NaCl) und 1x 5 min mit PBS gewaschen. Die Färbung des Zellkerns erfolgte mit 1 µM ToPro3 für 15 min abgedunkelt bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Deckgläschen zum Waschen kurz in PBS eingetaucht.

2.2.11.8.3 Versiegelung der Proben und Auswertung

Zum Schutz der Präparate vor Ausbleichung und Austrocknung wurden die Proben mit Anti-fade Medium versiegelt. Hierfür wurden jeweils 10 µl Anti-fade Medium auf einen Objektträger pro Deckglas aufgebracht und die beiden Deckgläser des Doppelansatzes mit der mit Zellen bewachsenen Seite nach unten in die Lösung gelegt. Nach Abtupfen der überschüssigen Flüssigkeit wurden die Deckgläser mit Nagellack versiegelt. Die Dokumentation und Auswertung der Präparate erfolgte am LSM710 (Carl Zeiss, Oberkochen) und der Software Zen 2008 (Carl Zeiss, Oberkochen). Auch die Intensität der Fluoreszenzsignals wurde mithilfe dieser Software bestimmt.

2.2.12 Aktivitäts-Assays

2.2.12.1 Messung der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Aktivität (MGMT-Assay)

Diese Methode beruht auf der Übertragung radioaktiv markierter Methylgruppen von Kalbsthymus-DNA auf das MGMT-Protein des zu untersuchenden Zellextrakts. Die Radioaktivität, die von der DNA auf das MGMT-Protein übertragen wurde, ist ein Maß für die Methyltransferase-Aktivität. Für die Messung wurden 40 µl [³H]-Methyl-N-Nitrosoharnstoff markierte Kalbsthymus-DNA (ca. 80000 cpm) mit 200 µg Gesamtprotein des zu untersuchenden Extrakts in 200 µl Reaktionspuffer aufgenommen. Nach einer

Inkubation von 90 min bei 37°C erfolgte die Zugabe von 100 µg BSA. Die DNA wurde durch Zugabe von 400 µl Trichloressigsäure (TCA; 13%) und 15-minütiges Aufkochen der Proben bei 95°C hydrolysiert. Durch ein anschließendes Abkühlen der Proben auf Eis wurden die Proteine gefällt und durch Zentrifugation (10 min, 14000 Upm) sedimentiert. Nach dreimaligem Waschen mit 5%-iger TCA-Lösung wurden sie durch Zugabe von 300 µl 0,2 N NaOH hydrolysiert. Die gebundene Radioaktivität wurde nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit im Szintillationszähler bestimmt. Die MGMT-Aktivität wurde in fmol/mg Gesamtprotein angegeben.

2.2.12.2 Messung der BER-Aktivität (in vitro BER-Assay)

2.2.12.2.1 Radioaktive 5'-Markierung mit T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK)

Diese Art der Markierung wurde zur radioaktiven Endmarkierung des 2GSU Oligonukleotids, welches die spätere apurine-Stelle (AP-Stelle) enthält, angewendet. Unter den gewählten Bedingungen wird von γ -³²P-ATP die radioaktive Phosphatgruppe auf das 5'-Hydroxylende der DNA übertragen. Dabei werden die zu markierenden Moleküle in einem ersten Schritt mittels Phosphatase dephosphoryliert und anschließend mittels Polynukleotidkinase (PNK) markiert. 60 pmol 2GSU wurden mit PNK Puffer (Roche, Mannheim), 10 Units PNK und 2 µl [γ -³²P]-ATP in einem Endvolumen von 20 µl für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 µl TE gestoppt und die Reaktionsmischung über eine Micro Bio-Spin 6 Tris Chromatographie Säule (1x TE) entsalzt. Das Endvolumen wurde mit *A. bidest* auf 100 µl aufgefüllt.

2.2.12.2.2 Hybridisierung der ssOligonukleotide

Zur Hybridisierung des [γ -³²P]-markierten 2GSU Oligonukleotids mit dem komplementären Oligonukleotid 2GScomp wurden 50 µl [γ -³²P]-GSU (30 pmol) zusammen mit 60 pmol 2GScomp in 1x TE und 200 mM NaCl in einem Volumen von 100 µl für 5 min auf 90°C erhitzt. Das Reaktionsgemisch wurde in einem Wasserbad langsam bis zum Erreichen der Hybridisierungstemperatur abgekühlt. Anschließend wurde das Hybridisierungsprodukt auf Eis oder langfristig bei -20°C gelagert. Die Hybridisierung wurde mittels nativer PAGE des Hybridisierungsprodukts im Vergleich zu [γ -³²P]-GSU überprüft. Durch die Hybridisierung sollte das dsOligonukleotid langsamer durch das Polyacrylamidgel laufen als das ssOligonukleotid. Es wurden jeweils 3 µl [γ -³²P]-GSU und [γ -³²P]-GSU + 2GScomp in 6x RNA-Probenpuffer aufgenommen und für 1,5 h bei 100 V in

einem 20% Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet. Das Polyacrylamidgel wurde mit einem Phospho-Imager-Film in einer Röntgenkassette bedeckt und über Nacht bei 4°C exponiert. Die Detektion erfolgte mittels Phospho-Imager und der Software Image Quant.

2.2.12.2.3 Präparation einer AP-Stelle mittels Uracil-DNA Glykosylase

Um nun ein geeignetes Substrat mit einer AP-Stelle für die Bestimmung der ‚short patch‘ BER-Kapazität zu erhalten, erfolgte die Behandlung des Hybridisierungsprodukts mit Uracil-DNA Glykosylase. Diese produziert durch Exzision des im 2GSU enthaltenen Uracils eine AP-Stelle in dem dsOligonukleotid. Hierfür wurden 30 µl des Hybridisierungsproduktes mit 4 Units Uracil-DNA Glycosylase in 1x BER-Reaktionspuffer in einem Endvolumen von 100 µl für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch über eine Micro Bio-Spin 30 Tris Chromatographie Säule (1xTE) entsalzt.

2.2.12.2.4 Reparaturreaktion

Hierfür wurde pro Zeitwert 5 bis 8 µg Gesamtproteinextrakt mit 600 fmol [γ -³²P] ATP-markiertes 2GSU + 2GScomp, das eine AP-Stelle enthält, 2 mM ATP, 20 µM dNTP, 250 µM NAD, 25 mM Phosphocreatine, 50 ng/µl Creatin Kinase, 20 ng/µl ABP (ein einzelsträngiges 30mer Oligonukleotid als Träger-DNA) in 1x BER-Reaktionspuffer bei 37°C inkubiert. Nach 0, 5, 10, 30, 60 und 90 min wurden aus dem Reaktionsansatz je 10 µl Aliquots entnommen und mit 10 µl RNA-Probenpuffer zum Abstoppen der Reaktion versetzt. Zur Abkühlung wurden die Proben auf Eis gestellt. Nach einer 3-minütigen Denaturierung bei 90°C, wurden zur Analyse jeweils 10 µl der Reaktionen auf ein 20%iges denaturierendes Sequenziergel aufgetragen und bei 10 Watt für 4 h bei RT aufgetrennt, auf Phospho-Imager-Film über Nacht bei 4°C exponiert und am Phospho-Imager aufgenommen und mittels der Software Image Quant ausgewertet. Die Quantifizierung erfolgte mittels Multi-Analyst v1.0.1 oder der ImageJ Software.

2.2.12.3 Messung der 8-oxoG-Spaltungsaktivität

2.2.12.3.1 Radioaktive 5'-Markierung mit T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) und Hybridisierung der ssOligonukleotide

Zur Herstellung des Substrats wurde das Oligonukleotid 8-oxoG, das den DNA-Schaden 8oxoG enthält mittels T4-PNK radioaktiv endmarkiert (2.2.12.2.1) und anschließend mit dem komplementären Oligonukleotid 8-oxoGcompl hybridisiert (2.2.12.2.2).

2.2.12.3.2 Reparaturreaktion

Hierfür wurden pro Zeitwert 18 µg Gesamtproteinextrakt mit 300 fmol [γ -³²P] ATP-markiertes 8-oxoG + 8-oxoGcompl, 0,2% BSA, 20% Glycerin in 1x Reaktionspuffer A bei 37°C inkubiert. Nach 0, 30 und 60 min wurden aus dem Reaktionsansatz je 20 µl Aliquots entnommen und mit 20 µl RNA-Probenpuffer zum Abstoppen der Reaktion versetzt. Zur Abkühlung wurden die Proben auf Eis gestellt. Nach einer 3-minütigen Denaturierung bei 90°C, wurden zur Analyse jeweils 18 µl der Reaktionen auf ein 20%iges denaturierendes Sequenziergel aufgetragen und bei 10 Watt für 2 h bei RT aufgetrennt, auf Phospho-Imager-Film über Nacht bei 4°C exponiert und am Phospho Imager aufgenommen und mittels der Software Image Quant ausgewertet. Die Quantifizierung erfolgte mit der ImageJ Software.

2.2.12.4 Messung der enzymatischen DNA-PK-Aktivität

Die Messung der enzymatischen Aktivität der DNA-PK wurde in jeweils 10 µg Proteinextrakt mithilfe des ‚*Signa TECT DNA-Dependent Protein Kinase Assay System*‘ von Promega (Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierbei wurde der jeweilige Proteinextrakt zusammen mit einem DNA-PK spezifischem biotyniliertem Substrat in Gegenwart von [γ -³²P] ATP inkubiert und anschließend nach Bindung des biotyniliertem Substrats auf einer speziellen Streptavidin Matrix, der Einbau von ³²P im Szintillationszähler bestimmt. Die DNA-PK-Aktivität wurde in cpm/µg Gesamtprotein angegeben. Als Hintergrund-Kontrolle, welche jeweils von den Messwerten abgezogen wurde, diente die Reaktion in Abwesenheit des spezifischen DNA-PK biotyniliertem Peptid Substrat.

2.2.13 Bestimmung der Konzentration von IL-1, TNF- α und TGF β in Monozyten und Makrophagen nach Behandlung mit *tert*-BOOH

2.2.13.1 Behandlung der Zellen mit LPS und *tert*-BOOH

Nach der Isolation aus ‚Buffy Coats‘ wurden die Monozyten mittels Inkubation in RPMI + 10% autologes Plasma über Nacht bei 37°C zum Ernten abgelöst. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden 1×10^6 Zellen in 1 ml X-Vivo15 in 24-well-Zellkulturplatten ausgesät. Makrophagen wurden nach 6 Tagen Ausreifung mit PBS gewaschen und in 2 ml X-Vivo15 aufgenommen. Die Zellen wurden mit 50 ng/ml LPS stimuliert, für 24 h bei 37°C inkubiert, mit 0,4 mM *tert*-BOOH behandelt und für weitere 24 h bei 37°C inkubiert.

2.2.13.2 Ernten der Proben und Bestimmung der Zellvitalität

Zur Separation des Überstandes von den Zellen wurden die Platten für 5 min bei 1500 Upm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei -20°C zur Bestimmung der Zytokinmenge mittels Zytokin-ELISA eingefroren. Die Zellen wurden mittels Accutase geerntet und mittels WST-Assay die Zellvitalität bestimmt.

2.2.13.3 Zytokin-ELISA

Eine Möglichkeit Zytokine nachzuweisen ist der enzymgekoppelte Immunabsorptionstest (engl. ‚Enzyme-linked immunosorbent assay‘; ELISA; ENGVALL und PERLMAN, 1971). Das Prinzip des hier verwendeten Sandwich-ELISAs besteht darin, dass spezifische monoklonale Antikörper, die das entsprechende Zytokin mit einer hohen Affinität binden, an eine Mikrotiterplatte als Träger gekoppelt werden. Zytokinstandards und die zu untersuchenden Zellkulturüberstände werden auf die Mikrotiterplatte gegeben. Das entsprechende Zytokin wird nun vom immobilisierten Antikörper gebunden und auf der Trägeroberfläche konzentriert. Nachdem sämtliche ungebundenen Substanzen durch Waschen entfernt wurden, bindet ein weiterer Enzym-markierter polyklonaler Antikörper, der im Vergleich zum fixierten Antikörper ein anderes Epitop auf dem Antigen erkennt, das Zytokin. Nach einem weiteren Waschschrift wird eine Substratlösung zugegeben, die die spezifische Bindung durch einen enzymatischen Farbwechsel darstellt. Die Farbentwicklung wird gestoppt und die Intensität der Farbe gemessen, wobei die Intensität der Färbung im Verhältnis zur Zytokinmenge steht.

Die Konzentrationsbestimmung der Zytokine erfolgte aus den Zellkulturüberständen nach Behandlung mit LPS und *tert*-BOOH. Für die Zytokine IL-1, TNF- α und TGF β wurden zusammengestellte ELISAs von der Firma R&D Systems verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Messung der Farbstoffreaktion erfolgte bei einer Messwellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 540 nm mittels Mikroplatten-Reader. Die Bestimmung der Zytokinproduktion erfolgte durch Verrechnung der gemessenen Zytokinkonzentration mit der im WST-Assay bestimmten Zellvitalität.

3 Ergebnisse

3.1 Generierung von DCs und Makrophagen aus Monozyten durch Zytokin-Behandlung

Zur Untersuchung der Sensitivität gegenüber oxidativem Stress, IR und alkylierenden Agenzien, sowie der Proteinexpression von DNA-Reparaturgenen und der DNA-Reparaturkapazitäten wurde das Modell der Zytokin-induzierten Differenzierung von Monozyten zu DCs und Makrophagen verwendet. Nach Isolation der Monozyten aus PBMCs (*engl. peripheral blood mononuclear cells*), die zuvor aus ‚Buffy Coat‘-Präparationen gewonnen wurden, erfolgte die Differenzierung von Monozyten zu unreifen DCs (*engl. immature DCs; iDCs*) durch die Zytokine IL-4 und GM-CSF über 8 Tage. Zur Reifung von Makrophagen wurden die Monozyten für 6 Tage mit GM-CSF stimuliert. Auf eine vollständige Ausreifung der DCs wurde in dieser Arbeit verzichtet, da iDCs und mDCs (*engl. mature DCs; reife DCs*) die gleichen Eigenschaften in der DNA-Reparatur aufweisen (Briegert et al., 2007; Briegert and Kaina, 2007).

3.1.1 Morphologie von Monozyten und daraus differenzierten DCs und Makrophagen

Nach Aufreinigung der Monozyten aus PBMCs sowie der Differenzierung von DCs und Makrophagen aus Monozyten durch die Zytokine IL-4 und GM-CSF, wiesen die Zellen jeweils eine charakteristische Morphologie auf. Mikroskopische Aufnahme der Zellen zeigten runde Monozyten mit einem großen Kern und verhältnismäßig wenig Zytoplasma (Abb. 3.1). Dagegen waren die deutlich größeren unreifen DCs durch ihre Dendriten (kleine verzweigte Ausläufer) gekennzeichnet. Makrophagen bildeten die charakteristischen Pseudopodien aus, die ihnen als Fangarme während der Phagozytose dienen.

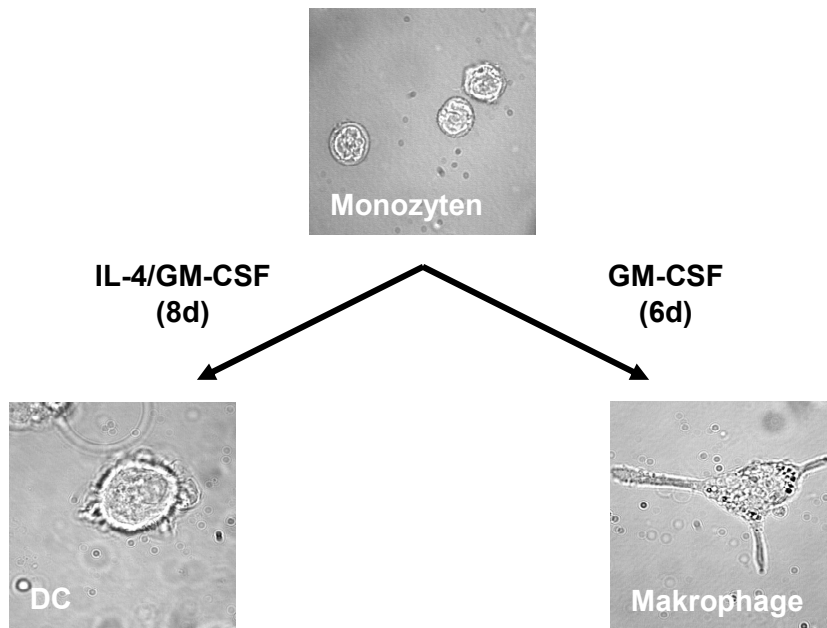


Abb. 3.1: Ausreifung von Monozyten zu DCs und Makrophagen. Lichtmikroskopische Aufnahmen (100fach) verdeutlichen die durch Zytokine induzierte morphologische Veränderung von Monozyten zu DCs und Makrophagen.

3.1.2 Phänotypcharakterisierung von Monozyten, DCs und Makrophagen

Die Reinheit der Zellpopulation wurde durchflusszytometrisch durch eine Phänotypisierung basierend auf der Expression von Oberflächenmarkern, sogenannten CD-Antigenen (*engl. 'Cluster of differentiation'*), untersucht. Für Monozyten charakteristisch ist die Expression von CD14 und CD86. Nach Anreicherung der Monozyten durch Plastikadhärenz betrug deren Reinheit zwischen 75-95%. Kostimulatorische Oberflächenmoleküle wie CD80 und CD86 wurden bei der Ausreifung von Monozyten zu DCs hochreguliert. 70% der unausgereiften DCs wiesen eine höhere Expression von CD80 und CD86 auf. Makrophagen zeigten ein vergleichbares Expressionsprofil wie Monozyten, mit einer starken Expression von CD14 und CD86, unterschieden sich jedoch morphologisch grundlegend von diesen (siehe 3.1.1). Die Expression von CD80 war im Vergleich zu Monozyten leicht erhöht. Um eine Verunreinigung mit Lymphozyten auszuschließen, wurden alle Populationen auf die Expression von CD3 und CD19 untersucht. CD3 ist auf T-Zellen und CD19 auf B-Zellen exprimiert. Alle Populationen zeigten eine marginale Kontamination von unter 10% mit T- und B-Lymphozyten. In Abb. 3.2 sind die Expressionen der verschiedenen Oberflächenmarker von Monozyten, DCs und Makrophagen von 6 verschiedenen Spendern zusammengefasst dargestellt.

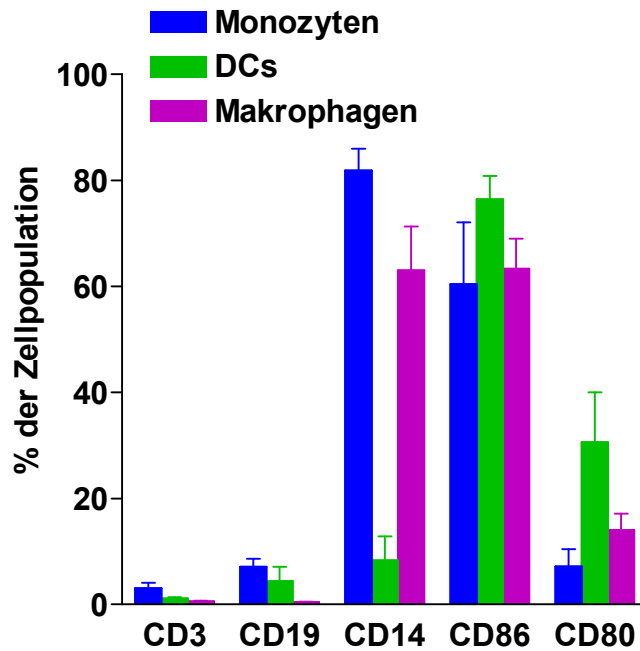


Abb. 3.2: Phänotypisierung von Monozyten, DCs und Makrophagen mittels Durchflusszytometrie. Je $0,5$ bis 1×10^6 Monozyten, DCs oder Makrophagen wurden mit PE-konjugierten Antikörpern gefärbt und die Expression der Oberflächenmarker einer Zellpopulation mittels FACS analysiert. In dem Balkendiagramm sind Daten von 6 unabhängigen Experimenten zusammengefasst.

3.2 Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber oxidativem Stress

Die besondere Eigenschaft des Monozyten/Makrophagen-Systems ist eine gesteigerte Produktion von ROS während einer Entzündungsreaktion (Durackova, 2009). Ist das antioxidative Schutzsystem einer Zelle beschädigt oder überlastet, kommt es zwischen der Bildung und dem Abbau freier Radikale bzw. ROS zu einem Ungleichgewicht. Folglich werden mehr ROS gebildet als abgebaut und es entsteht oxidativer Stress. Die Auswirkungen des oxidativen Stresses auf die Zelle sind Lipidperoxidation, Proteinoxidation und Schädigung der DNA. ROS und entstandene Sauerstoff-Radikale verursachen Strangbrüche im Zucker-Phosphat-Rückgrat in einem oder beiden der DNA-Stränge, chemische Veränderungen an den Nucleotid-Basen und AP-Stellen durch Hydrolyse der glycosidischen Bindung zwischen Base und Zucker der DNA (Marnett, 2000).

3.2.1 Apoptoseinduktion in Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit H₂O₂ und *tert*-BOOH

Zur Untersuchung der Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber oxidativen Stress wurden die Zellen mit H₂O₂ und *tert*-BOOH (Latour et al., 1995) behandelt und anschließend die Apoptose mittels SubG1-Assay bestimmt. Die dosisabhängige Behandlung mit H₂O₂ induzierte nach 24 h in DCs maximal 4%, in Makrophagen bis zu 20% und in Monozyten bis zu 50% Apoptose (Abb. 3.3 A). Nach Behandlung mit 2 mM H₂O₂ und Messung nach 8, 16 und 24 h zeigten die Monozyten die höchste Sensitivität (etwa 60% nach 24 h), Makrophagen sind geringfügig unempfindlicher und in DCs betrug die SubG1-Population nach 24 h maximal 10% (Abb. 3.3 B). Die Unterschiede zwischen den Zelltypen waren jedoch überwiegend nicht signifikant. Einzige Ausnahme war der Vergleich zwischen Monozyten und DCs nach 24 h (Abb. 3.3 B). Auch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse war insgesamt nicht zufriedenstellend, was auf die hohe Instabilität von H₂O₂ zurückzuführen sein könnte. Daher wurde zur Induktion von ROS als weiteres Agens *tert*-BOOH getestet, welches nicht wie H₂O₂ lichtempfindlich ist und so die Handhabung erleichtert. Die Behandlung mit *tert*-BOOH erfolgte sowohl dosisabhängig nach 24 h, als auch zeitabhängig nach Behandlung mit 400 µM *tert*-BOOH. Beide Messungen wie auch repräsentative Histogramme der SubG1-Messungen 24 h nach Behandlung mit 400 µM *tert*-BOOH zeigten eine signifikant

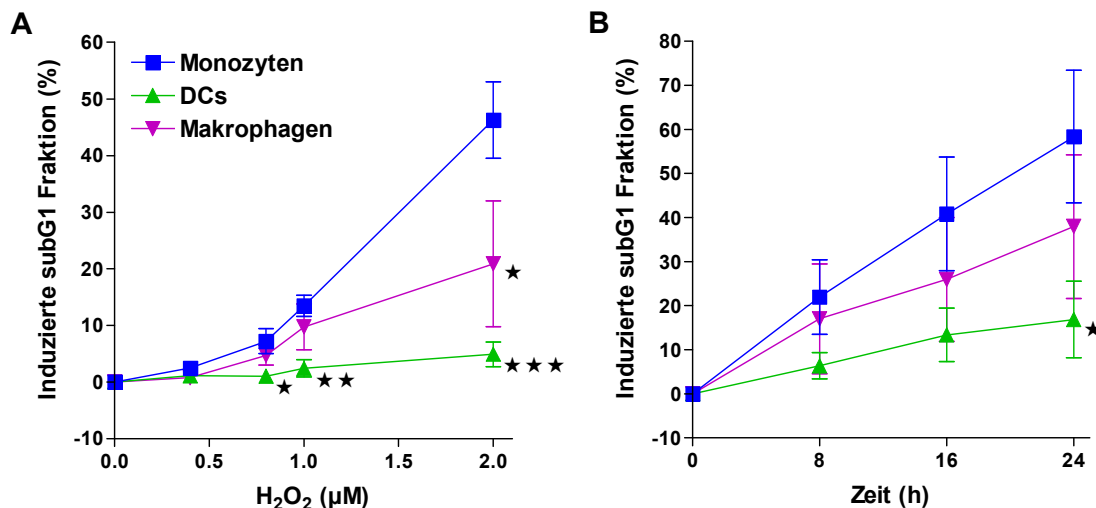


Abb. 3.3: Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber H₂O₂. Quantifizierung apoptotischer SubG1-Zellen 24 h nach Behandlung mit unterschiedlichen Dosen H₂O₂ (A) und nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung mit 2 mM H₂O₂ (B). *p<0.05, **p<0.01 und ***p<0.001 zum Vergleich von Monozyten zu DCs und Makrophagen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

höhere Sensitivität von Monozyten gegenüber *tert*-BOOH als von DCs und Makrophagen, die nahezu resistent gegenüber *tert*-BOOH waren (Abb. 3.4 A, B und C). Die Daten der einzelnen Messungen konnten erfolgreich reproduziert werden und auch die Standardabweichung der Experimente war deutlich kleiner als in den Experimenten mit H₂O₂. Das Profil der Zellzyklusverteilung in Abb. 3.4 C zeigt zusätzlich, dass Monozyten, DCs und Makrophagen nicht proliferieren und sich in der G1-Phase des Zellzyklus befinden.

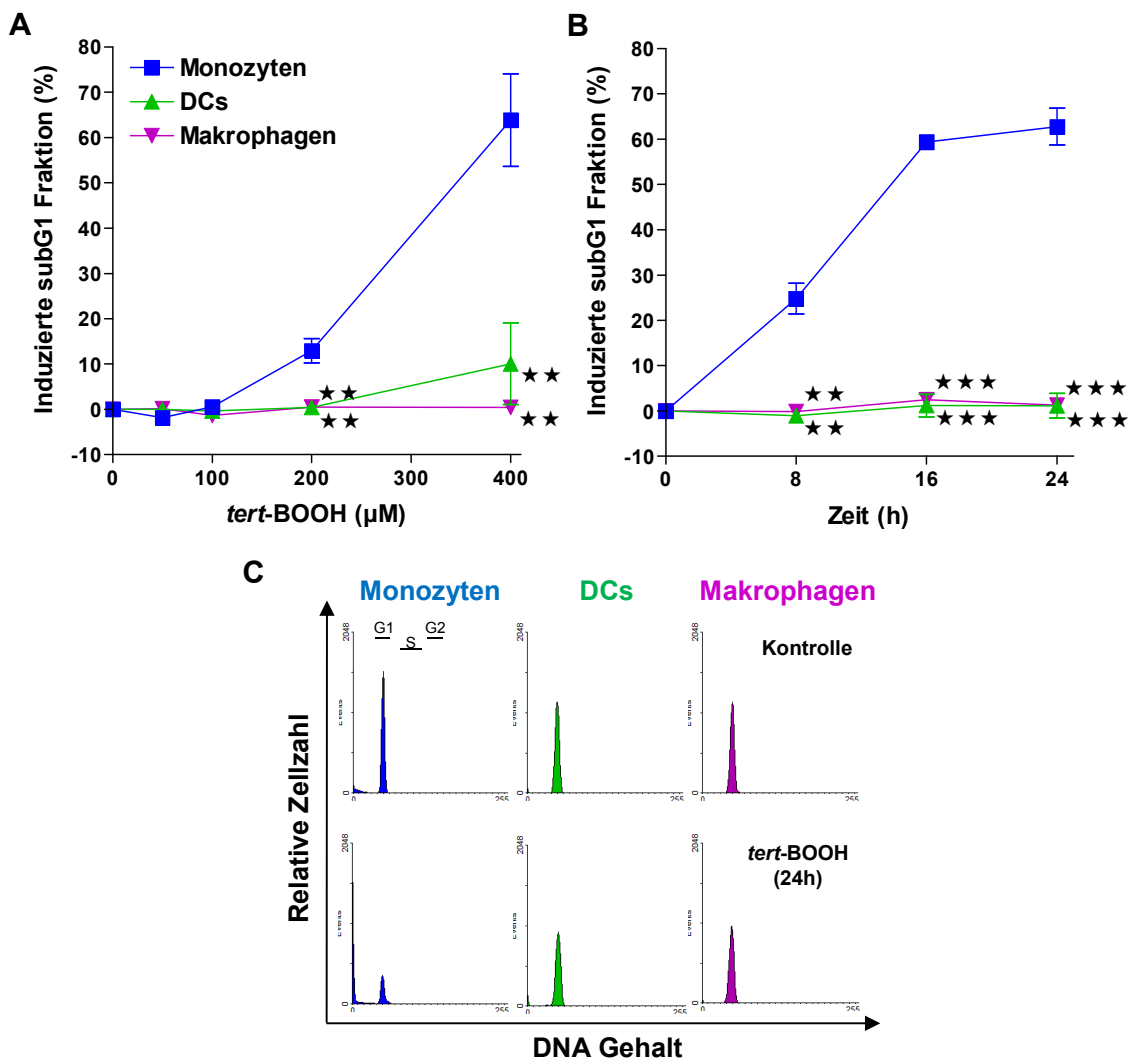


Abb. 3.4: Messung der SubG1-Fraktion von Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit *tert*-BOOH. Quantifizierung apoptotischer SubG1-Zellen 24 h nach Behandlung mit unterschiedlichen Dosen *tert*-BOOH (A) und nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach Behandlung mit 400 μM *tert*-BOOH (B). **p*<0.05, ***p*<0.01 und ****p*<0.001 zum Vergleich von Monozyten zu DCs und Makrophagen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten. (C) Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen SubG1-Messung von Monozyten, DCs und Makrophagen 24 h nach Behandlung mit 400 μM *tert*-BOOH sowie Profil der Zellzyklusverteilung.

Auch die AnnexinV/PI-Messung zum Nachweis von Apoptose und Nekrose (späte Apoptose) bestätigte, dass Monozyten, im Gegensatz zu DCs und Makrophagen, nach *tert*-BOOH-Behandlung vermehrt in die Apoptose gehen (Abb. 3.5). Zusätzlich zur frühen Apoptose nahm auch die Nekrose(späte Apoptose)-Population in Monozyten nach *tert*-BOOH-Behandlung zu. Diese betrug in Monozyten zwar lediglich 5%, was jedoch signifikant höher war als in DCs und Makrophagen (0,6% und 1,7%; $p < 0.001$ und $p < 0.01$) (Abb. 3.5).

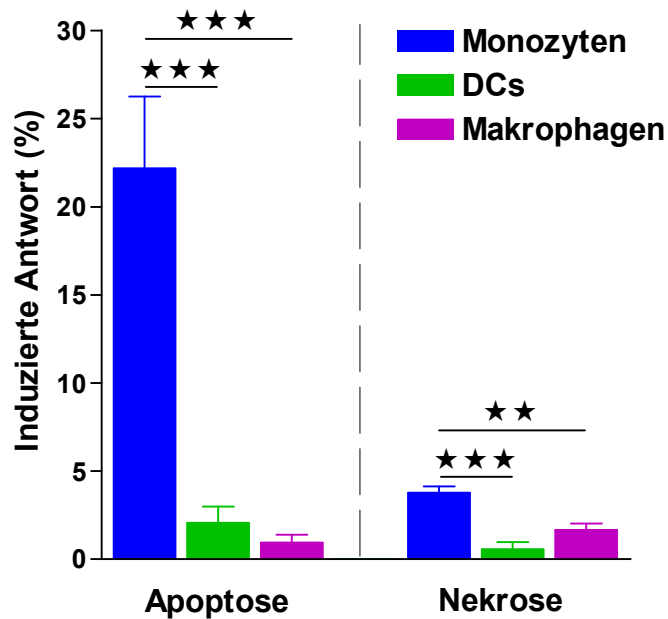


Abb. 3.5: AnnexinV/PI Messung von Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit *tert*-BOOH. AnnexinV/PI-Messung von Monozyten, DCs und Mph 24 h nach Behandlung mit 400 μ M *tert*-BOOH. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ zum Vergleich von Monozyten zu DCs und Makrophagen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

Somit konnte gezeigt werden, dass Monozyten im Vergleich zu daraus abgeleiteten DCs und Makrophagen eine erhöhte Sensitivität gegenüber *tert*-BOOH aufweisen und über Induktion von Apoptose sterben.

3.2.2 Bestimmung der ROS-Bildung in Monozyten, DCs und Makrophagen nach *tert*-BOOH

Um auszuschließen, dass die höhere Sensitivität der Monozyten nicht auf einen höheren Primärschaden, sondern auf einen Reparaturdefekt zurückzuführen ist, wurde die Menge

der induzierten ROS nach Behandlung mit *tert*-BOOH bestimmt. Hierfür wurden die Zellen vor Behandlung mit dem Fluorescein Farbstoff 5-(und 6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein-Diazetat (CM-H₂DCFDA) gefärbt, welcher in Gegenwart von ROS zu fluoreszierendem CMDCF umgesetzt wird. Dieser Farbumschlag wurde durchflusszytometrisch erfasst und die induzierten ROS-Mengen in den Zellen quantifiziert und verglichen. Die Messung erfolgte 0, 1 und 2 h nach Behandlung mit 400 μ M *tert*-BOOH. In allen Zellen erfolgte ein signifikanter Anstieg der relativen ROS-Bildung durch *tert*-BOOH, wobei der Anstieg von ROS in Monozyten am geringsten war. Die größte Zunahme von ROS erfolgte in Makrophagen (Abb. 3.6).

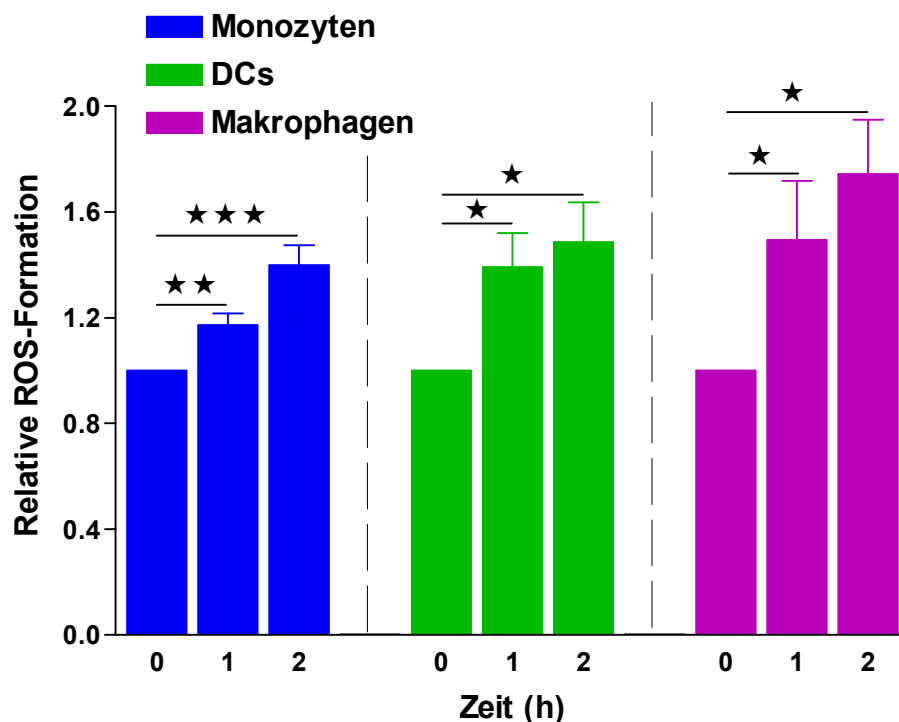


Abb. 3.6: Bildung von ROS in Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit *tert*-BOOH. Relative ROS-Bildung, ermittelt durch den Median der jeweiligen Histogramme von unbehandelten, sowie 1 h und 2 h mit 400 μ M *tert*-BOOH behandelten Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ zum Vergleich von unbehandelten und *tert*-BOOH behandelten Zellen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test.

Dadurch konnte zum einen belegt werden, dass *tert*-BOOH in allen drei Zelltypen ROS induziert, zum anderen konnte ausgeschlossen werden, dass die höhere Sensitivität der Monozyten gegenüber *tert*-BOOH auf eine höhere ROS-Menge zurückzuführen ist.

3.2.3 Entstehung von ESBs und DSBs in Monozyten, DCs und Makrophagen nach *tert*-BOOH

Als nächstes wurde die Menge der geschädigten Basen, ESBs und DSBs bestimmt, welche durch ROS in der Zelle entstehen. Die Bestimmung der ESBs erfolgte durch die alkalische Einzelzellelektrophorese (alkalische SCGE). ESBs können durch ROS sowohl indirekt während der Reparatur beschädigter Basen durch die BER als Intermediate auftreten als auch direkt durch ROS induziert werden. Abb. 3.7 zeigt, dass in Monozyten das OTM (*engl. olive tail moment*; definiert als Produkt der ‚Kometenlänge‘ und des Anteils der gesamten DNA im ‚Kometen‘), welches in der alkalischen SCGE als Maß für ESBs herangezogen wird, direkt nach Behandlung sehr stark anstieg. Das Maximum lag in Monozyten nach 30 min bei etwa 100 OTM und fiel auch nach 4 h nicht unter 70 OTM. In DCs und Makrophagen hingegen erfolgte der Anstieg langsamer. In DCs war bereits nach 10 min der höchste Wert erreicht, der bereits nach 30 min leicht und im weiteren Verlauf sehr schnell wieder fiel, so dass nach 240 min bereits alle Schäden repariert und die Werte der Kontrolle erreicht waren. In Makrophagen stieg die Menge der ESBs kontinuierlich innerhalb der ersten Stunde nach *tert*-BOOH-Gabe auf etwa 65 OTM an. Anschließend erfolgte ein rapider Abfall des OTM Wertes. Nach 240 min war ein Hauptteil der Schäden repariert. Mit 30 OTM waren zu diesem Zeitpunkt in Makrophagen weniger als die Hälfte residualer ESBs vorhanden als in Monozyten (70 OTM).

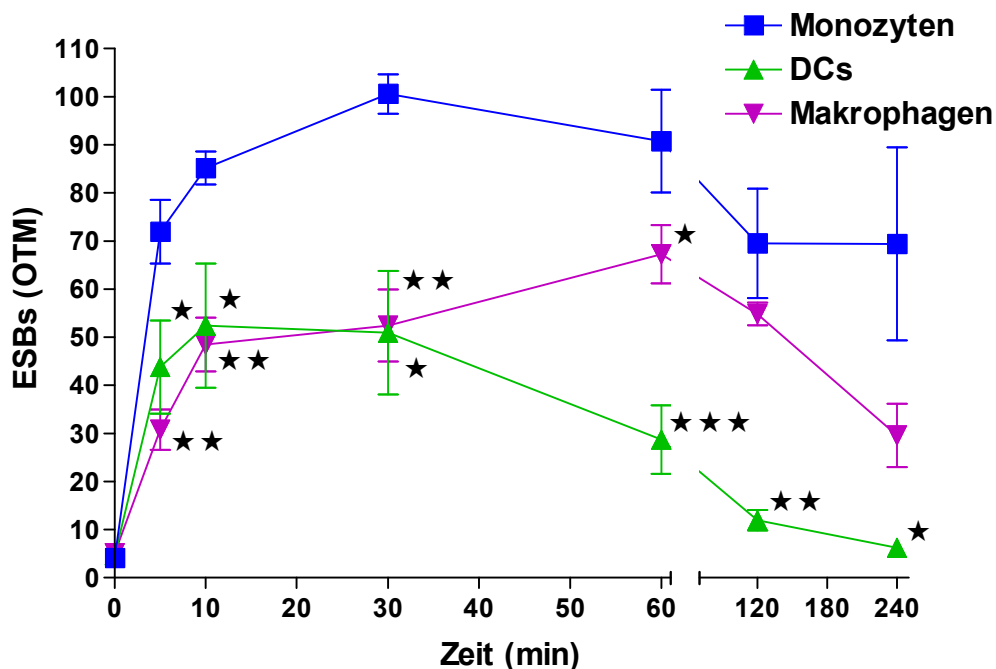


Abb. 3.7: Entstehung von ESBs in Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit *tert*-BOOH. Bestimmung der ESBs erfolgte mittels alkalischer SCGE. Entstehung von ESBs in Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit 400 μ M *tert*-BOOH. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ zum Vergleich von Monozyten zu DCs und Makrophagen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

Die in Abb. 3.8 dargestellte neutrale SCGE zeigt, dass auch die Menge der induzierten DSBs in Monozyten höher war als in DCs und Makrophagen. Das Maximum war in DCs nach 5 min, in Monozyten nach 10 min und in Makrophagen nach 30 min erreicht. Der Abfall, und somit die Reparatur der DSBs, erfolgte in DCs und Makrophagen schneller als in Monozyten, so dass 240 min nach Behandlung mit *tert*-BOOH die residuale Menge an DSBs in Monozyten signifikant höher war als in DCs und Makrophagen.

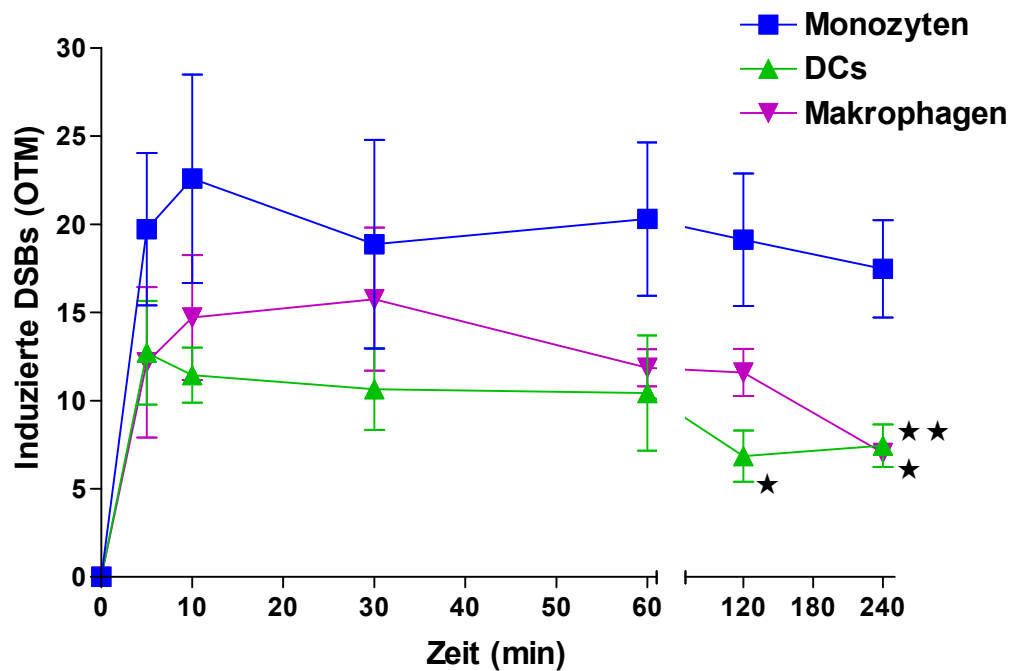


Abb. 3.8: Entstehung von DSBs in Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit *tert*-BOOH. Bestimmung der DSBs erfolgte mittels neutraler SCGE. Induktion von DSBs in Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit 400 μ M *tert*-BOOH. * $p < 0.05$ und ** $p < 0.01$ zum Vergleich von Monozyten zu DCs und Makrophagen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

3.2.4 Bestimmung von γ H2AX in Monozyten, DCs und Makrophagen nach *tert*-BOOH

Zusätzlich zur neutralen SCGE erfolgte der Nachweis von DSBs über γ H2AX, welches als Biomarker für DSBs genutzt wird (Kinner et al., 2008), mittels Immunfluoreszenz. Die in Abb. 3.9 dargestellten repräsentativen LSM-Aufnahmen zeigen, dass 1 h nach *tert*-BOOH-Behandlung in Monozyten ein intensives Signal von γ H2AX zu beobachten war. Hingegen war in DCs kein Signal und in Makrophagen nur ein schwaches Signal von γ H2AX zu erkennen.

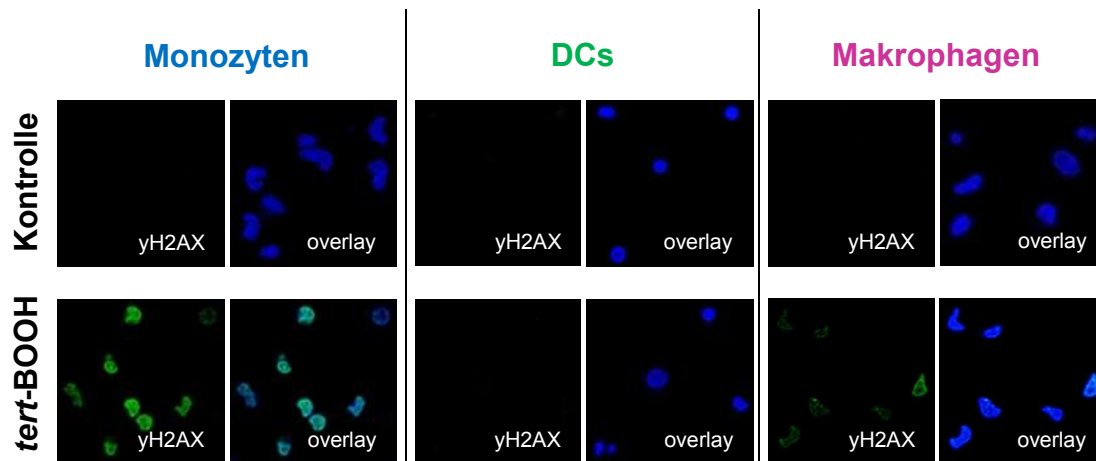


Abb. 3.9: γ H2AX in Monozyten, DC und Makrophagen nach Behandlung mit *tert*-BOOH. Repräsentative LSM-Aufnahmen der γ H2AX-Färbung 1 h nach Behandlung mit 400 μ M *tert*-BOOH.

Somit konnte das Ergebnis der neutralen SCGE, dass *tert*-BOOH einerseits DSBs induziert und andererseits die Menge der DSBs in Monozyten höher ist als in DCs und Makrophagen, bestätigt werden.

3.2.5 DNA-Schadensantwort nach *tert*-BOOH-Behandlung in DCs und Makrophagen

DNA-DSBs aktivieren eine DNA-Schadensantwort über Aktivierung der beiden Proteinkinasen ATR und ATM. Die beiden PI3-Kinasen ATR und ATM werden durch Phosphorylierung als auch über Autophosphorylierung am Serin 428 bzw. am Serin 1981 aktiviert. Durch ATR/ATM erfolgt eine direkte Phosphorylierung der abwärts agierenden Stresskinasen Chk1 und Chk2. Diese beeinflussen nicht nur den Zellzyklus in replizierenden Zellen, sondern führen über Phosphorylierung von p53 und dessen Inhibitors MDM2 auch zur Akkumulation von p53 in der Zelle, wobei p53 auch direkt durch ATR und ATM phosphoryliert werden kann.

Durch Western Blot-Analysen wurde untersucht, welche Ereignisse vom DNA-Schaden zur Induktion von Apoptose in Monozyten nach Behandlung mit *tert*-BOOH führen. Hierfür wurde die Phosphorylierung der Proteinkinasen ATM, ATR, Chk1 und Chk2 sowie die Expression von p53 untersucht. In Monozyten erfolgte nach Behandlung mit 400 μ M *tert*-BOOH eine Aktivierung von ATM, ATR, Chk1 und Chk2 sowie eine Zunahme des p53 Proteins (Abb. 3.10).



Abb. 3.10: DNA-Schadensantwort von Monozyten gegenüber *tert*-BOOH. Expression der Proteine pATR_{Ser428}, pATM_{Ser1981}, pChk1_{Ser317}, pChk2_{Thr68} und p53 in Gesamtzell-extrakten von Monozyten nach Behandlung mit 400 μ M *tert*-BOOH nach 0, 1, 3, 6 und 12 h mittels Western Blot. Für pATR_{Ser428}, pATM_{Ser1981} und p53 diente ERK2, für pChk1_{Ser317} und pChk2_{Thr68} deren unphosphorylierte Formen Chk1 bzw. Chk2 als Ladekontrolle. (Das dargestellte Experiment wurde unter Berücksichtigung meiner Vorarbeiten von Dr. Michael Goldstein durchgeführt).

Somit wurde in Monozyten durch *tert*-BOOH eine DNA-Schadensantwort über ATR-Chk1 sowie über ATM-Chk2 aktiviert, welche zu einer Akkumulation von p53 führen.

Desweiteren sollte geklärt werden, inwieweit *tert*-BOOH eine DNA-Schadensantwort in DCs und Makrophagen induziert. Im Gegensatz zu Monozyten, war in DCs und Makrophagen keine Aktivierung von ATR, ATM, Chk1 und Chk2 zu erkennen (Abb. 3.11). In DCs erfolgte nach 1 und 3 h eine schwache Zunahme von p53, wobei nach 6 h die Menge bereits wieder abnahm und nach 12 h kein Signal detektierbar war. In Makrophagen nahm die Expression des p53 Proteins nach Behandlung mit *tert*-BOOH nicht zu (Abb. 3.11).

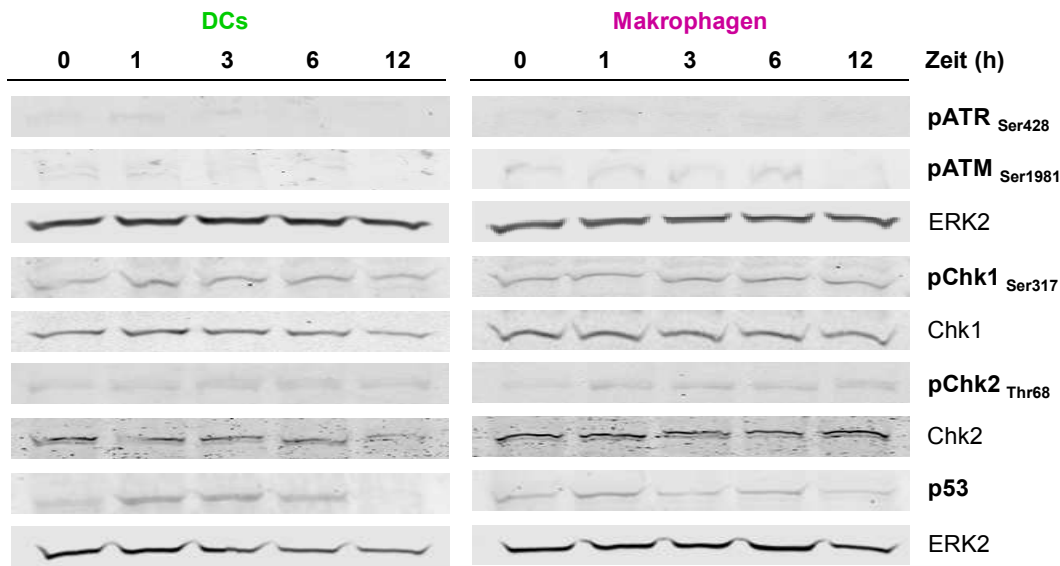


Abb. 3.11: DNA-Schadensantwort von DCs und Makrophagen gegenüber *tert*-BOOH. Expression der Proteine pATR_{Ser428}, pATM_{Ser1981}, pChk1_{Ser317}, pChk2_{Thr68} und p53 in Gesamtzellextrakten von DCs und Makrophagen nach Behandlung mit 400 μ M *tert*-BOOH nach 0, 1, 3, 6 und 12 h mittels Western Blot. Für pATR_{Ser428}, pATM_{Ser1981} und p53 diente ERK2, für pChk1_{Ser317} und pChk2_{Thr68} deren unphosphorylierte Formen Chk1 bzw. Chk2 als Ladekontrolle.

Die Western Blot-Analysen zeigten, dass in Monozyten eine starke und in DCs und Makrophagen keine messbare DNA-Schadensantwort nach Behandlung mit *tert*-BOOH erfolgt.

3.2.6 Untersuchung des apoptotischen Signalwegs nach *tert*-BOOH-Behandlung in Monozyten

Im Folgenden wurden die molekularen Mechanismen der Apoptose in Monozyten anhand des Fas-Rezeptors (FasR) sowie der Aktivierung von Caspasen untersucht.

Mittels semiquantitativer Endpunkt RT-PCR wurde die Expression der *FASR* mRNA in Monozyten nach *tert*-BOOH-Behandlung analysiert. Diese zeigte, dass 3 h nach Behandlung mit *tert*-BOOH in Monozyten die Menge der *FASR*-mRNA anstieg (Abb. 3.12). Dies bekräftigt die Beobachtung der p53-Akkumulation in Monozyten (Abb. 3.10), da die Expression des FasR durch p53 reguliert wird.



Abb. 3.12: Expression der FASR-mRNA in Monozyten nach Behandlung mit tert-BOOH. Semiquantitative Endpunkt-RT-PCR der FASR mRNA in Monozyten gemessen 0, 1, 3, 6 und 12 h nach Behandlung mit 400 μ M tert-BOOH. GAPDH-PCR diente als Abgleich der eingesetzten RNA-Menge.

Caspasen sind Cystein-Proteasen, welche in der Zelle als inaktive Proenzyme vorliegen und durch Eigenproteolyse oder Spaltung durch andere Proteasen aktiviert werden. Zur Bestimmung der Caspasen-Aktivität wurden Monozyten mit 400 μ M tert-BOOH behandelt und mittels Western Blot-Analysen die aktiven Formen (Spaltprodukte) der beiden Initiatorcaspasen-8 und -9, sowie der zwei Effektorcaspasen 3 und 7 untersucht. Nach tert-BOOH-Behandlung war in Monozyten eine Zunahme der aktiven Form der Caspase-8, Caspase-9, Caspase-3 und der Caspase-7 zu beobachten (Abb. 3.13).

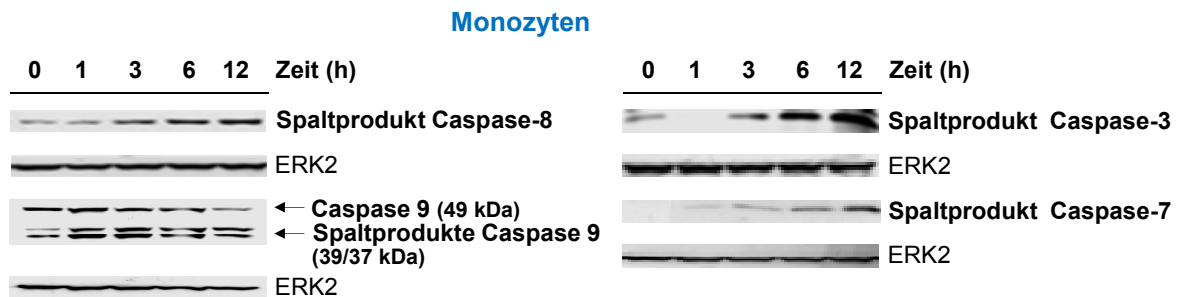


Abb. 3.13: Beteiligung von Caspasen am Apoptose-Signalweg in Monozyten nach Behandlung mit tert-BOOH. Expression der gespaltenen Caspase-8, Caspase-9, Caspase-3 und Caspase-7 in Gesamtzell-extrakten von Monozyten 0, 1, 3, 6 und 12 h nach Behandlung mit 400 μ M tert-BOOH mittels Western Blot. ERK2 diente jeweils als Ladekontrolle. (Das dargestellte Experiment wurde unter Berücksichtigung meiner Vorarbeiten von Dr. Michael Goldstein durchgeführt).

Dies deutet darauf hin, dass es sich in Monozyten nach tert-BOOH-Behandlung um eine Caspasen-abhängige Form der Apoptose handelt.

3.2.7 Untersuchung der Sensitivität gegenüber endogen gebildetem ROS

Zur Untersuchung der Frage, ob Monozyten auch gegenüber endogen gebildetem ROS sensitiv sind, wurden Monozyten sowie DCs und Makrophagen mit der oxidierten Form des ‚low density lipoproteins‘ (oxLDL) behandelt. OxLDL ist ein wichtiger pathophysiologischer Auslöser von ROS und stellt einen bedeutenden Faktor für die Entwicklung von Atherosklerose dar. Die Aufnahme von oxLDL erfolgt in Monozyten, DCs und Makrophagen über einen ‚Scavenger‘-Rezeptor/LDL-Rezeptor-Komplex (Zingg et al., 2000). Nach Aufnahme induziert oxLDL in der Zelle die Entstehung von ROS (Hsieh et al., 2001). Zur Bestimmung der Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber oxLDL wurden die Zellen mit 200 µg/ml oxLDL und als Kontrolle mit der gleichen Menge der nicht oxidierten nativen Form des LDL (nLDL) behandelt und nach 16 h Inkubation die induzierte Apoptose mittels AnnexinV/PI-Assay durchflusszytometrisch ermittelt. Die Daten in Abb. 3.14 zeigen, dass in Monozyten die Menge der durch oxLDL induzierten Apoptose signifikant größer war als in DCs und Makrophagen, während nLDL in keiner der Zellen vermehrt Apoptose induzierte (< 5%).

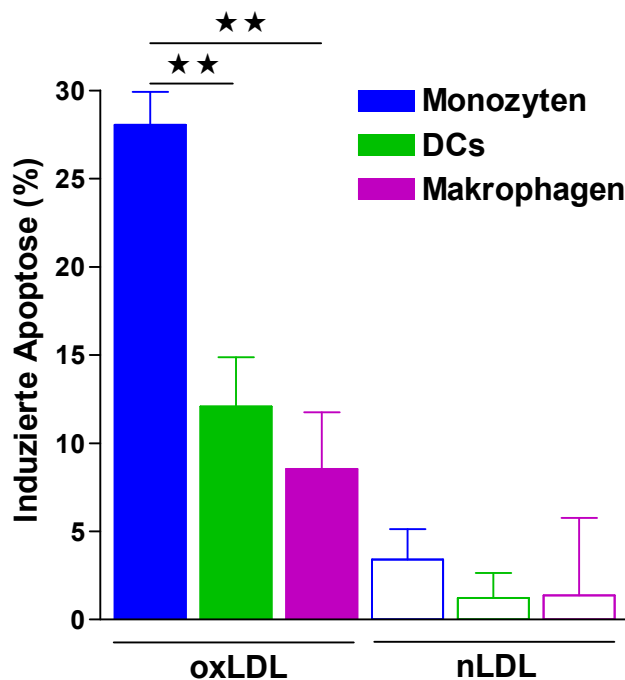


Abb. 3.14: Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber oxLDL. Induzierte Apoptose 16 h nach Behandlung mit 200 µg/ml oxLDL und nLDL. Die Bestimmung erfolgte durchflusszytometrisch mittels AnnexinV/PI. ** $p < 0.01$ zum Vergleich von Monozyten zu DCs und Makrophagen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test.

Um herauszufinden, ob die erhöhte Apoptose in Monozyten durch oxLDL auf einen Defekt in der BER bzw. DNA-Einzelstrangbruchreparatur zurückzuführen ist, wurde die Menge der durch oxLDL induzierten ESBs mittels alkalischer SCGE bestimmt. nLDL diente hierbei erneut als Kontrolle. Monozyten zeigten im Vergleich zu DCs und Makrophagen eine signifikant höhere Rate an ESBs, die mit fortwährender oxLDL-Behandlung zunahm (Abb. 3.15). Im Vergleich dazu induzierte nLDL keine wesentliche Zunahme der ESB-Bildung in den Zellen (Abb. 3.15).

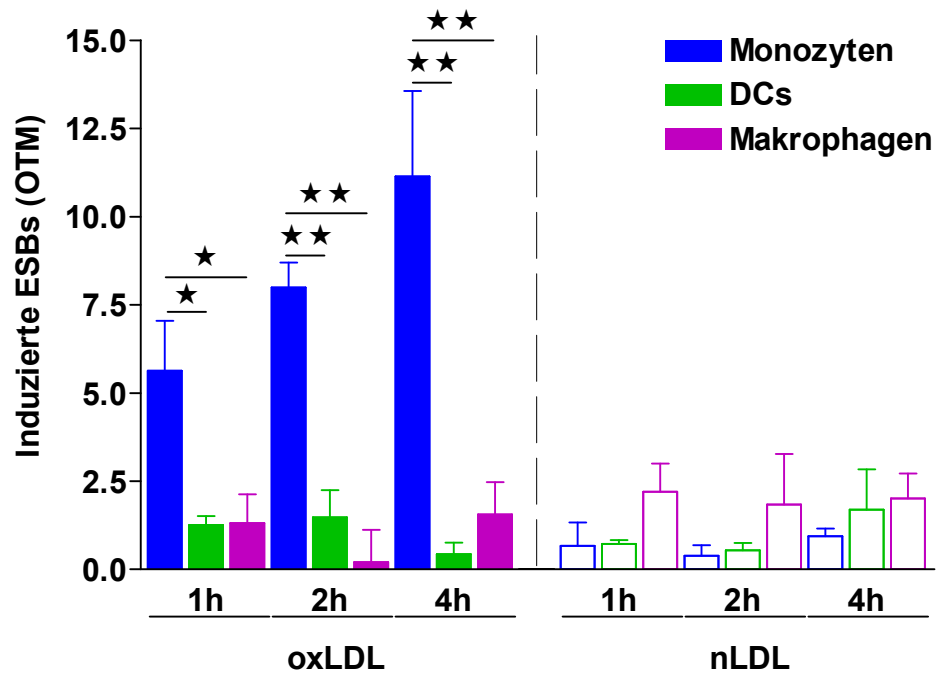


Abb. 3.15: Induktion von ESBs in Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit oxLDL. Induktion von ESBs in Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit 200 µg/ml oxLDL und nLDL mittels alkalischer SCGE. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ zum Vergleich von Monozyten zu DC und Makrophagen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test.

Die Experimente zeigten, dass Monozyten auch nach Behandlung mit einem pathophysiologischem ROS-induzierenden Agens, wie oxLDL, vermehrt in die Apoptose gehen und eine signifikant größere Menge an induzierten ESBs aufweisen als DCs und Makrophagen.

3.3 Untersuchung der BER-Reparaturkapazität humaner Monozyten, DCs und Makrophagen

tert-BOOH induzierte eine deutlich höhere Menge an ESBs in Monozyten als in DCs und Makrophagen (siehe 3.2.3). Diese ESBs könnten einerseits direkt durch ROS generiert werden, oder aber indirekt über Basenschäden aufgrund einer defekten oder überlasteten BER verursacht werden. Daher wurde im Folgenden mittels *in vitro* Reparaturassay und Western Blot-Analysen die BER, welche sowohl für die Reparatur von Basenschäden als auch für die Reparatur von ESBs (ESBR) von Bedeutung ist, näher untersucht.

3.3.1 Bestimmung der BER-Kapazität durch einen *in vitro* BER-Assay

Zur Bestimmung der BER-Kapazität von Monozyten und daraus abgeleitete DCs und Makrophagen wurde ein *in vitro* Reparaturassay (Parsons et al., 2005) durchgeführt. In dem durchgeführten Assay wurden Gesamtzellextrakte zusammen mit einem ^{32}P -markierten Oligonukleotid (ein 39 mer) inkubiert, welches eine AP-Stelle auf dem markierten DNA Strang enthält. Dies ist ein DNA-Schaden, der bevorzugt über die ‚*short patch*‘ BER repariert wird. Diese AP-Stelle wird von der APE gespalten, wodurch ein 19 mer entsteht. Durch anschließendes Anfügen eines Nukleotids durch die Pol β entsteht ein 20 mer und durch Ligation durch den XRCC1/Ligase III α -Komplex wird das 20 mer wieder zum 39 mer (Abb. 3.16).

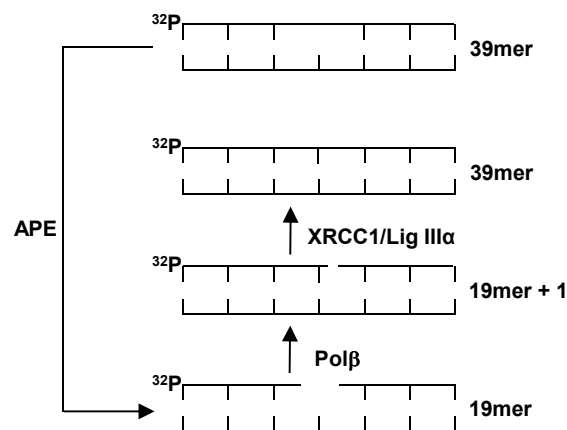


Abb. 3.16: Modell des *in vitro* BER-Assays. Schematische Darstellung der Spaltprodukte während des *in vitro* BER-Assays.

Diese Spaltprodukte wurden nach Denaturierung der dsDNA zu ssDNA mittels 20% PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Abb. 3.17 zeigt, dass

sowohl DCs als auch Makrophagen fähig waren, eine AP-Stelle innerhalb einer Stunde zu reparieren. Hingegen war in Monozyten zwar eine Spaltung der AP-Stelle (19mer) sowie ein Anfügen eines Nukleotids durch die Pol β zu erkennen (20mer). Jedoch fand keine Ligation der Fragmente statt, was durch den XRCC1/Ligase III α Komplex erfolgt.

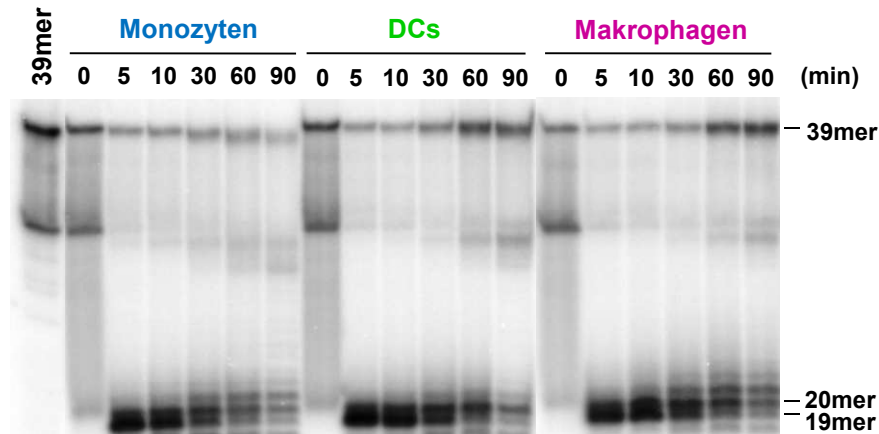


Abb. 3.17: Bestimmung der BER-Kapazität von CD34⁺ Stammzellen, Monozyten, DCs und Makrophagen mittels *in vitro* BER-Assay. 20% PAGE der Reaktionen von CD34⁺ Stammzellen, Monozyten, DCs und Makrophagen nach 0, 5, 10, 30, 60 und 90 min Inkubation. Es wurden je 8 μ g Gesamtproteinextrakt pro Reaktion eingesetzt.

Dies zeigte sich auch bei der Quantifizierung des 39mers. Nach einer Abnahme der 39mer Menge nach 30 min kam es in Monozyten nicht zur Religation und somit nicht zu einer signifikanten Zunahme des 39mers nach einer Stunde, wie es in DCs und Makrophagen zu beobachten war (Abb. 3.18). Die relative Menge des 39mers nahm in Monozyten sogar noch weiter ab (Abb. 3.18).

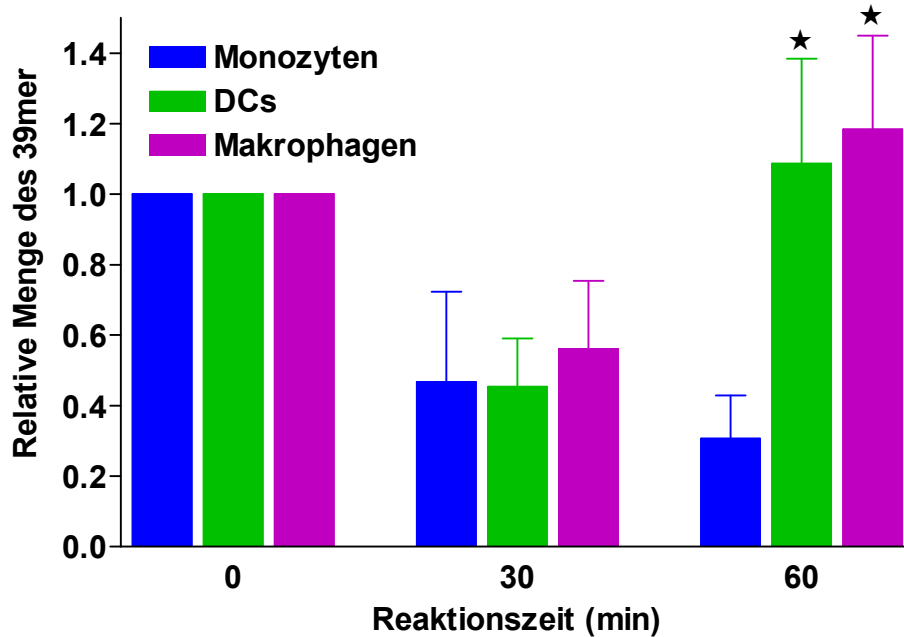


Abb. 3.18: Quantifizierung der Religationskapazität von CD34⁺ Stammzellen, Monozyten, DCs und Makrophagen während des *in vitro* BER-Assays. Quantifizierung der 39 mer Bande nach 0, 30 und 60 min Inkubation. Kontrolle (0 min) wurde gleich 1 gesetzt. * $p < 0.05$ zum Vergleich von Monozyten zu DCs und Makrophagen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

Zusätzlich wurde auch die BER-Kapazität von CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen, den Vorläuferzellen der Monozyten, bestimmt. CD34⁺ Stammzellen sind die Vorläuferzellen aller Leukozyten. Aus ihnen entwickelt sich ein gemeinsamer myeloider Vorläufer aus dem anschließend Monozyten hervorgehen. Daher stellt sich die Frage, ob auch CD34⁺ Stammzellen als Vorläufer der Monozyten eine verminderte BER-Kapazität aufweisen oder dies charakteristisch für den Differenzierungsgrad der Monozyten ist. Sowohl die in Abb. 3.19 A dargestellte Auftrennung der Spaltprodukte als auch die in Abb. 3.19 B dargestellte Quantifizierung des 39 mers zeigt, dass im Gegensatz zu Monozyten CD34⁺ Stamzellen fähig waren eine AP-Stelle innerhalb einer Stunde zu reparieren.

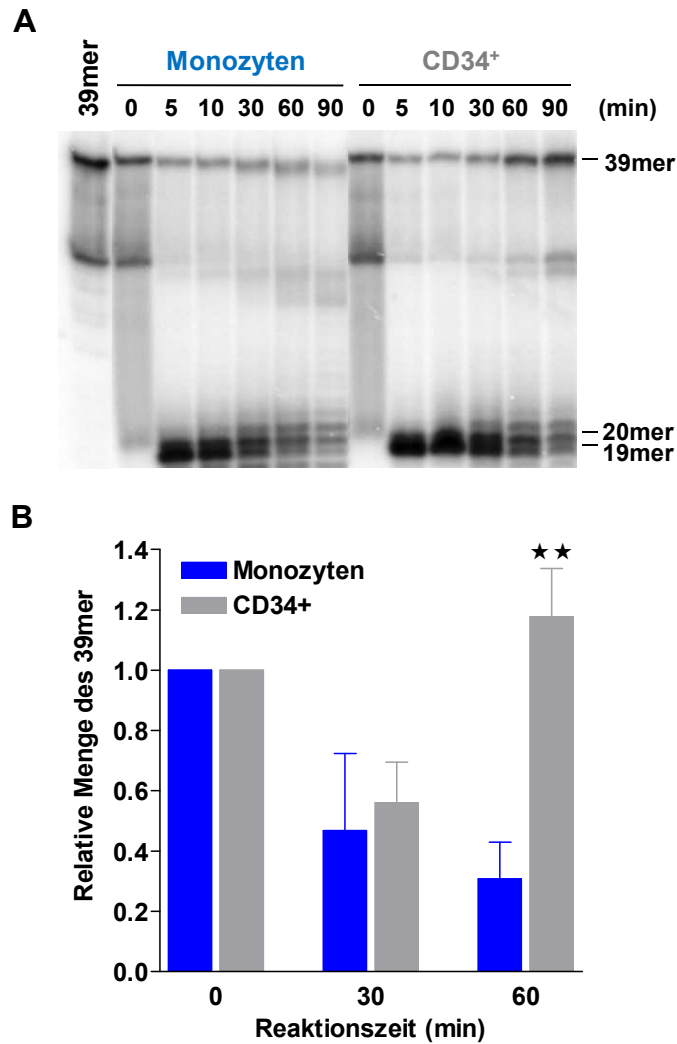


Abb. 3.19: Bestimmung der BER-Kapazität von CD34⁺ Stammzellen im Vergleich zu Monozyten mittels *in vitro* BER-Assay. (A) 20% PAGE der Reaktionen von CD34⁺ Stammzellen und Monozyten nach 0, 5, 10, 30, 60 und 90 min Inkubation. Es wurde je 8 µg Gesamtproteinextrakt pro Reaktion eingesetzt. **(B)** Quantifizierung der 39 mer Bande nach 0, 30 und 60 min Inkubation. Kontrolle (0 min) wurde gleich 1 gesetzt. **p<0.01 zum Vergleich von Monozyten zu CD34⁺ Stammzellen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

Im Vergleich von CD34⁺ Stammzellen, Monzyten, DCs und Makrophagen zeigen somit nur die Monozyten einen Defekt in der Reparatur der AP-Stelle und somit in der ‚*short-patch*‘ BER.

3.3.2 Expression von Proteinen der BER

Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass mit XRCC1 und Ligase III α Proteine der BER während der Differenzierung von Monozyten in DCs hochreguliert werden (Briegert and Kaina, 2007). Um die Expression weiterer Proteine der BER zu

betrachten, wurden in Western Blot-Analysen die Proteinspiegel verschiedener BER-Proteine in Monozyten, DCs und Makrophagen untersucht. In Abb. 3.20 A sind repräsentative Western Blot-Analysen dargestellt, die zeigten, dass die BER-Proteine APE, MPG, Pol β , Fen-1 und auch PCNA in Monozyten, DCs und Makrophagen in gleicher Intensität exprimiert wurden. Die Expression der Glykosylase OGG1, sowie der Ligase I nahm hingegen während der Ausreifung von Monozyten zu DCs und Makrophagen zu. Das Ligase I Protein war in Monozyten nicht und in DCs und Makrophagen nur sehr schwach detektierbar. Eine starke Induktion war hingegen nach Ausreifung der Monozyten zu DCs und Makrophagen von den Proteinen XRCC1, Ligase III α und PARP-1 zu beobachten (Abb. 3.20 A, B).

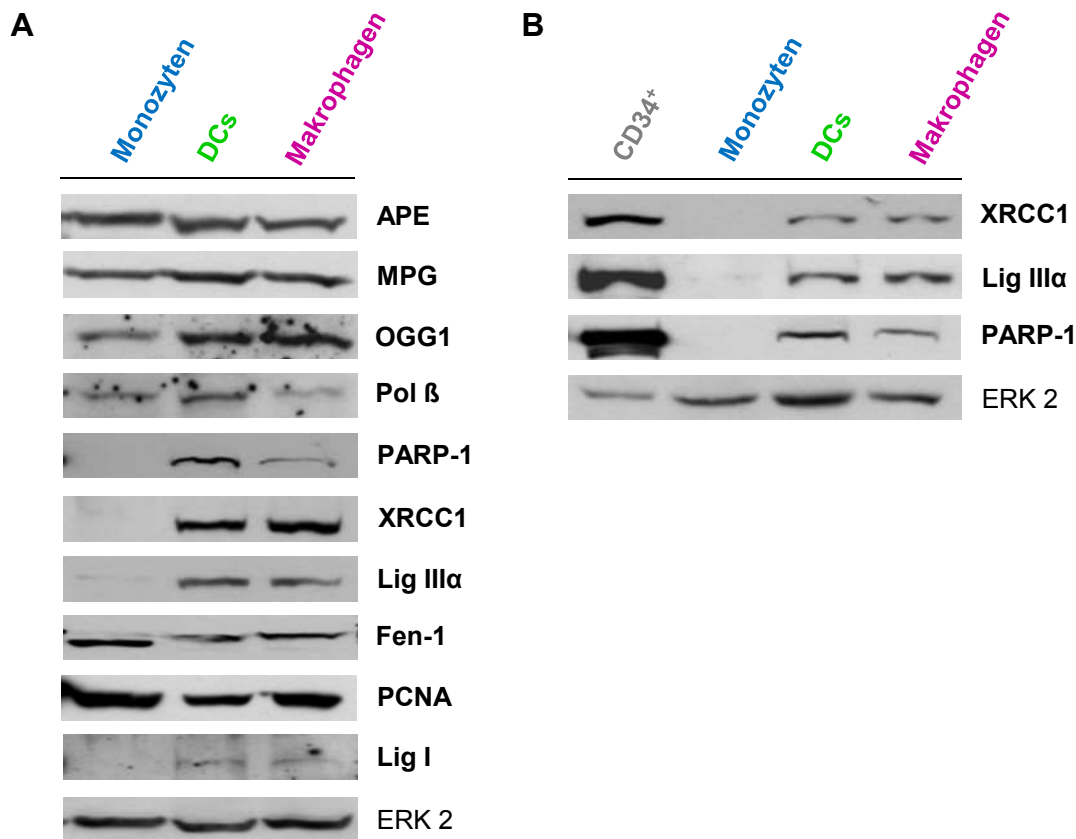


Abb. 3.20: Expression von BER-Proteinen in Monozyten, DCs und Makrophagen. (A) Expression der Proteine APE, MPG, OGG1, Pol β , PARP-1, XRCC1, Lig III α , Fen-1, PCNA und Lig I in Gesamtzellextrakten von Monozyten, DCs und Makrophagen mittels Western Blot. (B) Western Blot-Analyse der Proteine XRCC1, Lig III α und PARP-1 in Gesamtzellextrakten von CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen im Vergleich zu Monozyten, DCs und Makrophagen. ERK2 diente jeweils als Ladekontrolle.

Ein Vergleich von CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen mit Monozyten, DCs und Makrophagen zeigte, dass Stammzellen als Vorläuferzellen der Monozyten die Proteine

XRCC1, Ligase III α und PARP-1 sogar stärker exprimierten als DCs und Makrophagen (Abb. 3.20 B).

Auf Ebene der mRNA hingegen erfolgte lediglich eine Zunahme der *XRCC1* und *PARP-1* mRNA während der Ausreifung von Monozyten zu DCs und Makrophagen (Abb. 3.21). Die Menge der *LIG III α* mRNA war in den drei Zellpopulationen gleich (Abb. 3.21).

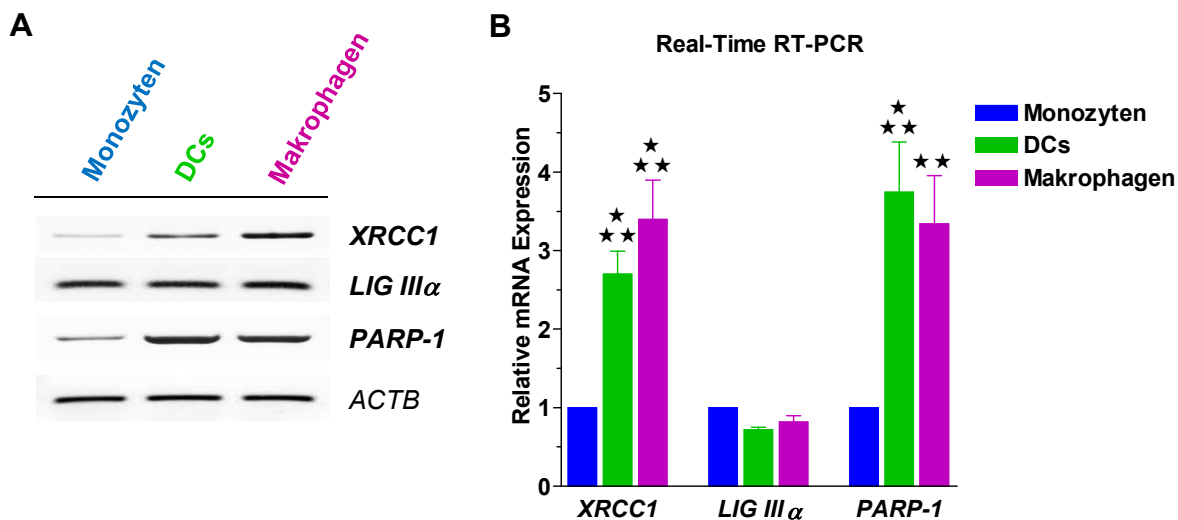


Abb. 3.21: Bestimmung der mRNA Menge der BER-Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 in Monozyten, DCs und Makrophagen. Semiquantitative Endpunkt-RT-PCR (B) und Semiquantitative Real-Time-RT-PCR Analyse (C) der *XRCC1*, *LIG III α* und *PARP-1* mRNA in Monozyten, DCs und Makrophagen. *ACTB*-PCR diente jeweils als Abgleich der eingesetzten RNA-Menge. ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ zum Vergleich von Monozyten zu DC und Makrophagen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test. Dargestellt ist der Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten.

Es wurde gezeigt, dass der Transkriptionsfaktor E2F-1 die Expression von XRCC1 induzieren kann (Chen et al., 2008; Li et al., 2008; Jin et al., 2011). Daher wurde auch die Expression von E2F-1 in Monozyten, DCs und Makrophagen mittels Western Blot-Analysen untersucht. Die E2F-1 Expression war in Monozyten nicht detektierbar und nahm während der Ausreifung von Monozyten in DCs und Makrophagen stark zu (Abb. 3.22). Ein weiterer bekannter XRCC1-induzierender Transkriptionsfaktor ist FoxM1 (Tan et al., 2007). Dieser war jedoch in keiner der drei Zellpopulationen nachweisbar (Abb. 3.22). Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der die BER *in vitro* stimulieren kann, ist p53. Die Western Blot-Analyse zeigte eine starke Zunahme des p53 Proteins während der Ausreifung von Monozyten in DCs und Makrophagen (Abb. 3.22).

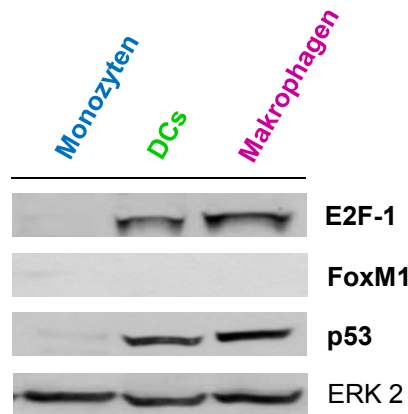


Abb. 3.22: Expression von an der Regulation von BER-Proteinen beteiligten Transkriptionsfaktoren in Monozyten, DCs und Makrophagen. Analyse der Proteinexpression der Transkriptionsfaktoren E2F-1, FoxM1 und p53 in Monozyten, DCs und Makrophagen. ERK2 diente jeweils als Ladekontrolle.

Zusammengefasst zeigten die Untersuchungen, dass die Expression der BER-Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 sowie der Transkriptionsfaktoren E2F-1 und p53 in Monozyten nicht nachweisbar war und im Zuge der Ausreifung von Monozyten zu DCs und Makrophagen induziert wurde.

3.3.3 Bestimmung der 8-oxoG-Spaltungsaktivität in Monozyten, DCs und Makrophagen

OGG1 prozessiert spezifisch die oxidative DNA-Läsion 8-oxoG. Zur Bestimmung der OGG1 Aktivität wurde *in vitro* die Fähigkeit von Monozyten und daraus abgeleiteten DCs und Makrophagen gemessen 8-oxoG, welches auf einem ^{32}P -markiertem Oligonukleotid enthalten ist, spezifisch zu erkennen und an dieser Stelle die DNA zu schneiden. Die 8-oxoG DNA Glykosylase FPG (Formamidopyrimidine [fapy]-DNA Glykosylase) aus *E.coli* wurde dabei als Positiv-Kontrolle verwendet. Die Spaltprodukte wurden nach Denaturierung der dsDNA zu ssDNA mittels 20% PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie visualisiert (Abb. 3.23 A). In Monozyten, wie auch DCs und Makrophagen war ein Spaltprodukt nach 60 min Inkubation nachweisbar. Die Quantifizierung dieses Spaltprodukts zeigte, dass Monozyten eine zu Makrophagen vergleichbare und eine signifikant höhere 8-oxoG Spaltungsaktivität aufweisen als DCs (Abb. 3.23 B).

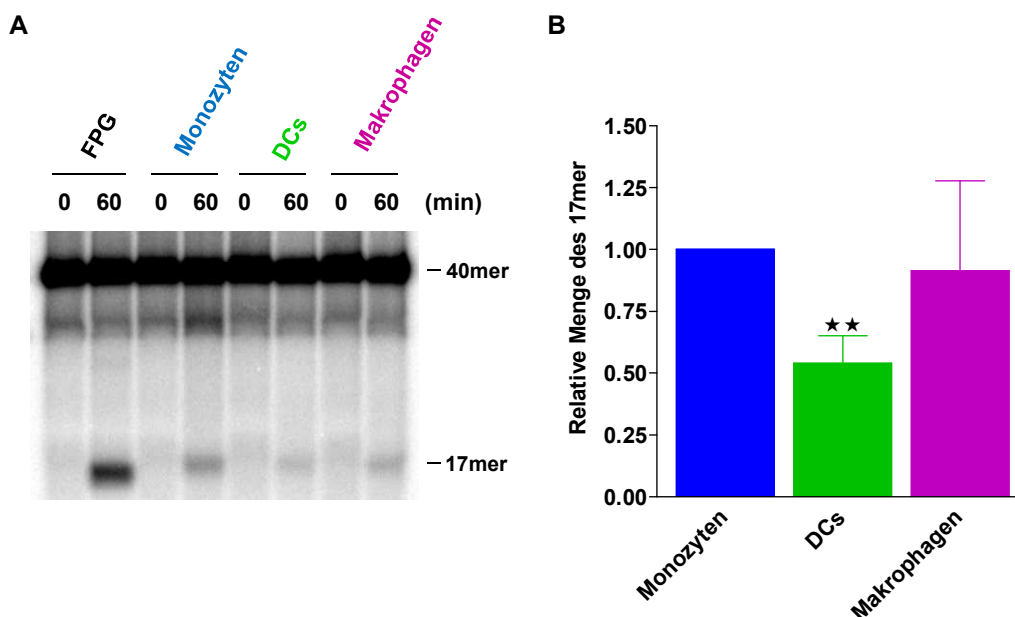


Abb. 3.23: Bestimmung der 8-oxoG-Spaltungsaktivität mittels *in vitro* Assay. (A) 20% PAGE der Reaktionen von FPG Protein (Positiv-Kontrolle), Monozyten, DCs und Makrophagen nach 0 und 60 min Inkubation. (B) Quantifizierung der 17mer Bande nach 60 min Inkubation. Monozyten wurden gleich 1 gesetzt. Dargestellt ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. ** $p < 0.01$ zum Vergleich von Monozyten zu DCs und Makrophagen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test.

3.3.4 Expression von XRCC1, Ligase III α und PARP-1 während der Differenzierung von Monozyten zu DCs und Makrophagen

Die Western Blot-Analysen zeigten bislang eine verstärkte Expression der Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 nach Ausreifung humaner Monozyten in DCs und Makrophagen (siehe 3.3.2). Zu welchem Zeitpunkt der DC- und Makrophagen-Reifung die einzelnen Proteine hochreguliert werden und ob dies in einer bestimmten Reihenfolge erfolgt ist unklar.

DC-Ausreifung: Western Blot-Analysen zeigten, dass während der Ausreifung von Monozyten zu DCs durch die Zytokine IL-4 und GM-CSF die Induktion der Proteinexpression von XRCC1, Ligase III α und PARP-1 zu vergleichbaren Zeitpunkten erfolgte (Abb. 3.24). Nach 3 Tagen war jeweils ein schwaches Signal detektierbar, welches nach 6 und 8 Tagen deutlich verstärkt war. Dies galt auch für p53. Eine Zunahme des Transkriptionsfaktors E2F-1 war hingegen erst nach 6 Tagen zu erkennen.

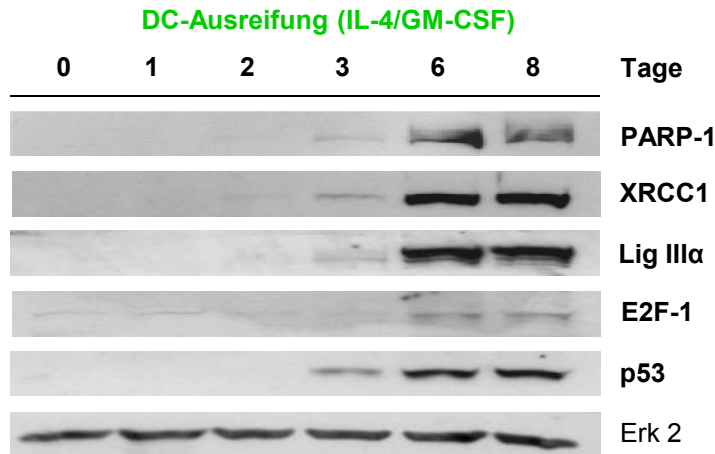


Abb. 3.24: Expression von BER-Proteinen während der Ausreifung von Monozyten zu DCs. Expression der Proteine XRCC1, Lig III α , PARP-1, E2F-1 und p53 in Gesamtzellextrakten von Monozyten nach Stimulation mit IL-4 und GM-CSF nach 0, 1, 2, 3, 6 und 8 Tagen nachgewiesen mittels Western Blot. ERK2 diente jeweils als Ladekontrolle.

Makrophagen-Ausreifung: Die durch GM-CSF induzierte Differenzierung von Monozyten in Makrophagen war bereits nach 6 Tagen abgeschlossen. Somit benötigten Makrophagen 2 Tage weniger zur Ausreifung als DCs, die 8 Tage benötigen. Auch die Hochregulation der Proteinexpression erfolgte während der Differenzierung von Makrophagen im Vergleich zur DC-Ausreifung schneller (Abb. 3.25). Die Induktion der Proteine XRCC1 und Ligase III α erfolgte bereits nach 2 Tagen, von PARP-1 nach 3 Tagen, wobei die jeweilige Intensität während der Ausreifung noch weiter anstieg. p53 wurde, wie auch XRCC1 und Ligase III α , bereits nach 2 Tagen deutlich exprimiert. Die Hochregulation des Transkriptionsfaktors E2F-1 erfolgte auch während der Differenzierung von Makrophagen später. Nach 3 Tagen war eine schwache, nach 6 Tagen dann eine deutliche Zunahme zu erkennen.

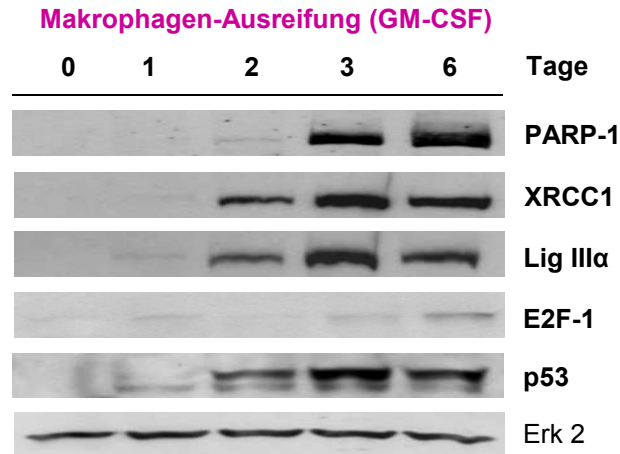


Abb. 3.25: Expression von BER-Proteinen während der Ausreifung von Monozyten zu Makrophagen. Expression der Proteine XRCC1, Lig III α , PARP-1, E2F-1 und p53 in Gesamtzellextrakten von Monozyten nach Stimulation mit GM-CSF nach 0, 1, 2, 3 und 6 Tagen nachgewiesen mittels Western Blot. ERK2 diente jeweils als Ladekontrolle.

3.4 Einfluss des BER-Defekts auf die immunstimulatorische Funktion von Monozyten

Während einer Immunreaktion kommt es zur Ausschüttung von Zytokinen, die entscheidend für die Regulation der Immunantwort sind. Zytokine sind kleine lösliche Proteine, welche das Wachstum und die Differenzierung von Zellen beeinflussen. Monozyten und Makrophagen produzieren sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Zytokine. Um herauszufinden, ob der BER- und ESBR-Defekt in Monozyten diese Fähigkeit beeinflusst, wurden Monozyten und Makrophagen mit LPS, das auf der äußeren Membran gramnegativer Bakterien enthalten ist, stimuliert. Anschließend wurde die Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF α und des anti-inflammatorischen Zytokins TGF- β mittels ELISA bestimmt. In Monozyten reduzierte eine Vorbehandlung mit *tert*-BOOH die Ausschüttung der drei analysierten Zytokine (Abb. 3.26).

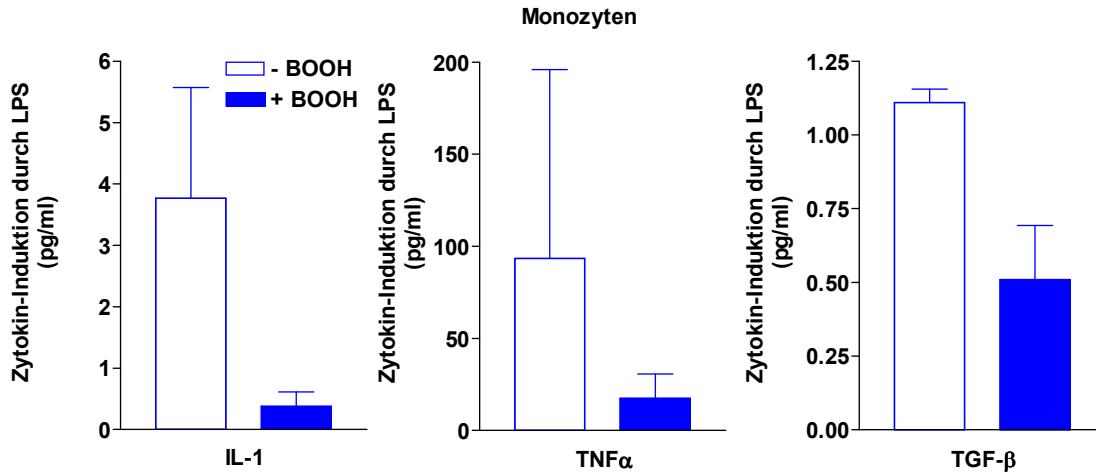


Abb. 3.26 : Einfluss von *tert*-BOOH auf die durch LPS induzierte Produktion der Zytokine IL-1, TNF α und TGF- β in Monozyten. Monozyten wurden mit 400 μ M *tert*-BOOH behandelt und nach 24 h mit 50 ng/ml LPS stimuliert. Nach weiteren 24 h wurde die Menge der ausgeschütteten Zytokine IL-1, TNF α und TGF- β mittels ELISA bestimmt und mit der im WST-Assay bestimmten Zellvitalität verrechnet. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

In Makrophagen war hingegen nach Vorbehandlung mit *tert*-BOOH eine Steigerung der an das Medium abgegebenen Zytokinmenge zu beobachten (Abb. 3.27).

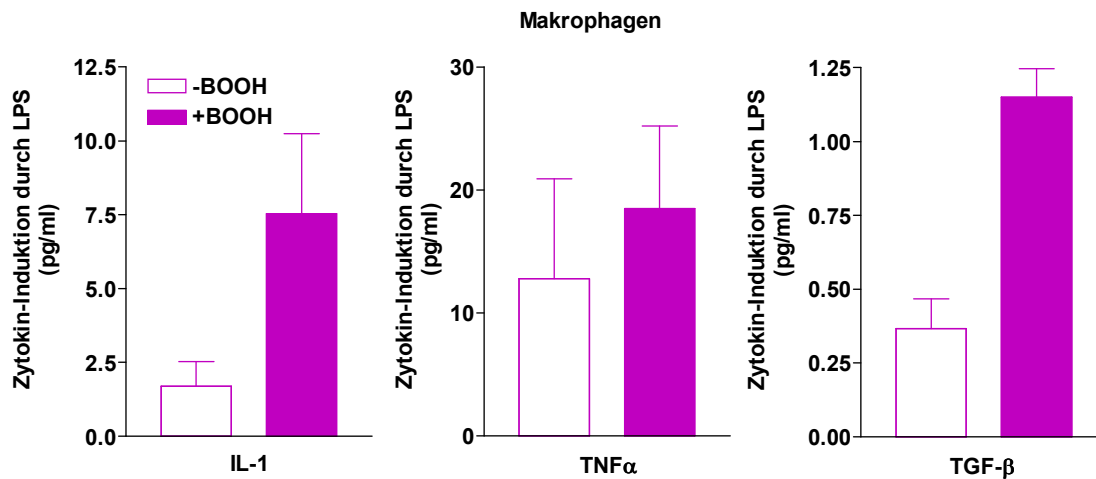


Abb. 3.27: Einfluss von *tert*-BOOH auf die durch LPS induzierte Produktion der Zytokine IL-1, TNF α und TGF- β in Makrophagen. Makrophagen wurden mit 400 μ M *tert*-BOOH behandelt und nach 24 h mit 50 ng/ml LPS stimuliert. Nach weiteren 24 h wurde die Menge der ausgeschütteten Zytokine IL-1, TNF α und TGF- β mittels ELISA bestimmt und mit der im WST-Assay bestimmten Zellvitalität verrechnet. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

Dies zeigt, dass in Monozyten die Ausschüttung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine durch oxidativen Stress beeinträchtigt war. Hingegen zeigten Makrophagen eine Steigerung der Zytokinproduktion nach oxidativem Stress.

3.5 Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber IR

Wie ROS induziert auch IR Basenschäden, ESBs und DSBs in der DNA. Induzierte Basenschäden und ESBs werden über die BER prozessiert und entfernt. Die Reparatur der DSBs kann in Monozyten, DCs und Makrophagen prinzipiell nur über das NHEJ erfolgen, da die Zellen nicht replizieren und NHEJ in der G0/G1-Phase des Zellzyklus dominiert.

3.5.1 Apoptoseinduktion in Monozyten, DCs und Makrophagen nach IR

Zur Untersuchung der Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber IR wurde die durch Bestrahlung induzierte Apoptose durch Messung der SubG1-Fraktion durchflusszytometrisch bestimmt. Dies erfolgte sowohl dosisabhängig 48 h nach Bestrahlung (Abb. 3.28 A) als auch zeitabhängig nach Bestrahlung mit 5 Gy (Abb. 3.28 B).

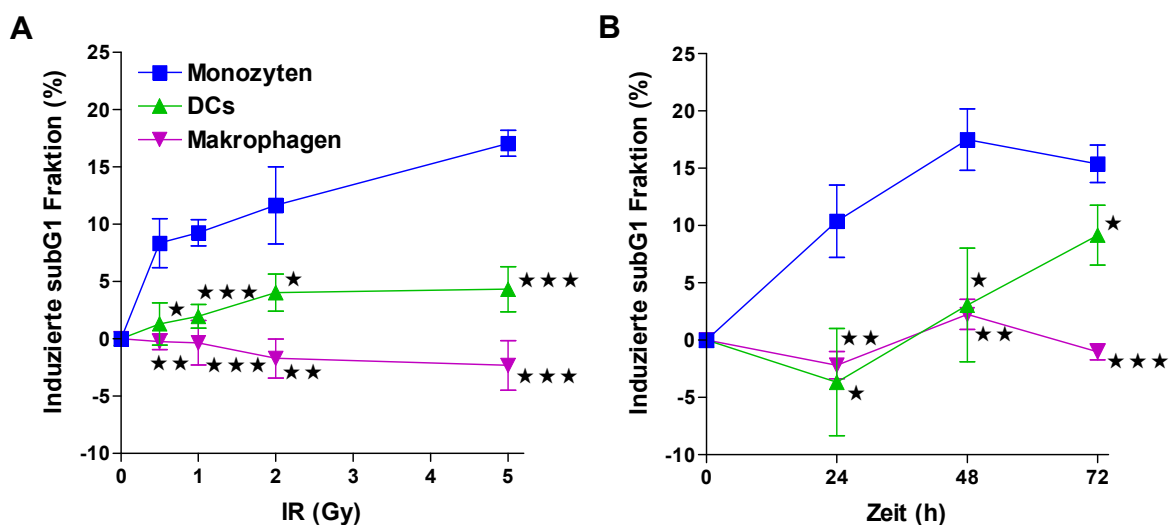


Abb. 3.28: Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber IR. Quantifizierung apoptotischer subG1-Zellen 48 h nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen IR (A), sowie nach unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit 5 Gy (B). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ zum Vergleich von Monozyten zu DCs und Makrophagen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test. Dargestellt ist der Mittelwert von sechs (A) bzw. vier (B) unabhängigen Experimenten.

Beide Messungen zeigten eine Zunahme der SubG1-Fraktion in Monozyten und somit eine dosis- und zeitabhängige Apoptoseinduktion nach IR. Die induzierte Apoptoserate war in Monozyten zu jedem Messpunkt signifikant größer als in DCs und Makrophagen. In

DCs erfolgte nach Bestrahlung nur eine geringe und in Makrophagen keine Zunahme der Apoptose (Abb. 3.28 A und B).

3.5.2 Entstehung von ESBs und DSBs in Monozyten, DCs und Makrophagen nach IR

Um zu überprüfen, ob die erhöhte Sensitivität der Monozyten gegenüber IR auf einen höheren DNA-Schaden und somit auf einen Reparaturdefekt zurückzuführen ist, wurde die Menge der IR-induzierten Basenschäden, ESBs und DSBs sowie deren Reparatur mittels SCGE untersucht. Mittels der alkalischen SCGE erfolgte die Bestimmung der durch IR induzierten ESBs. Dabei werden nicht nur die direkt induzierten ESBs detektiert, sondern auch indirekt gebildete ESBs, die während der Reparatur von Basenschäden durch die BER als Reparaturintermediate generiert werden. Die Menge der durch IR induzierten DSBs wurde durch die neutrale SCGE bestimmt. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt und anschließend sofort der SCGE unterzogen. Sowohl ESBs als auch DSBs nahmen in allen drei Zelltypen mit steigender Strahlendosis zu (Abb. 3.29 A und B). Die induzierte Menge der ESBs in Monozyten war im niedrigen Strahlendosisbereich (1 und 2 Gy) signifikant geringer als in DCs und Makrophagen. Nach Bestrahlung mit höheren Dosen IR (5 und 7 Gy) war hingegen die induzierte Menge der ESBs vergleichbar hoch (Abb. 3.29 A).

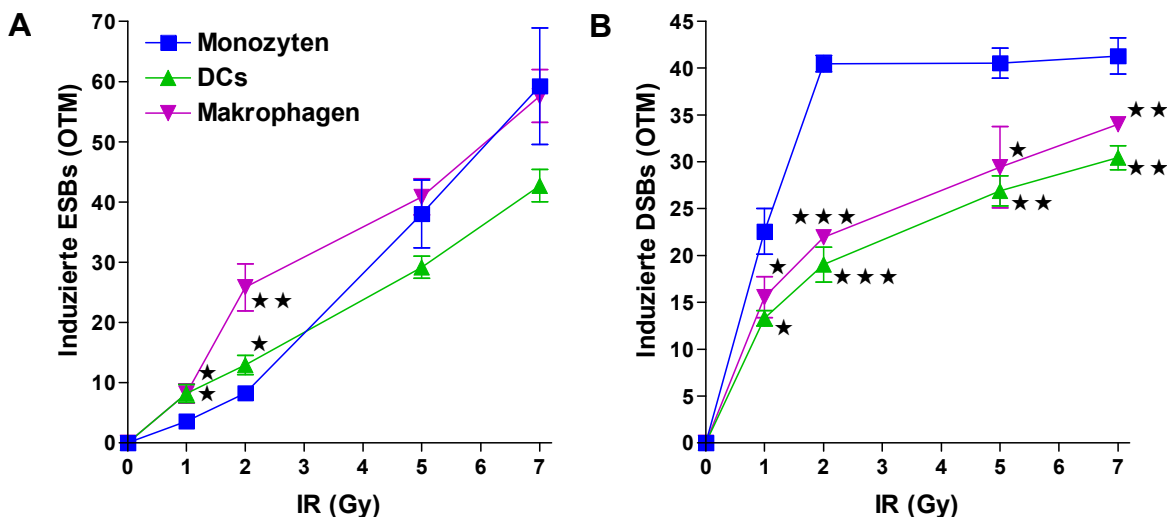


Abb. 3.29: Entstehung von ESBs und DSBs in Monozyten, DCs und Makrophagen nach IR. ESBs wurden mittels alkalischer, DSBs mittels neutraler SCGE bestimmt. Induzierte ESBs (A) und DSBs (C) direkt nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen IR.). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ zum Vergleich von Monozyten zu DCs und Makrophagen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test. Dargestellt ist der Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die Menge der induzierten DSBs war in Monozyten über den gesamten Dosisbereich signifikant höher als in DCs und Makrophagen und bereits bei einer Dosis von 2 Gy in der Sättigung (Abb. 3.29 B).

Zur Ermittlung der Reparatur der ESBs und DSBs wurden die Zellen mit 2 Gy bestrahlt und nach entsprechender Zeit jeweils eine SCGE durchgeführt. Abb. 3.30 zeigt, dass die durch IR induzierten ESBs in Monozyten, DCs und Makrophagen in vergleichbarer Zeit prozessiert und entfernt wurden.

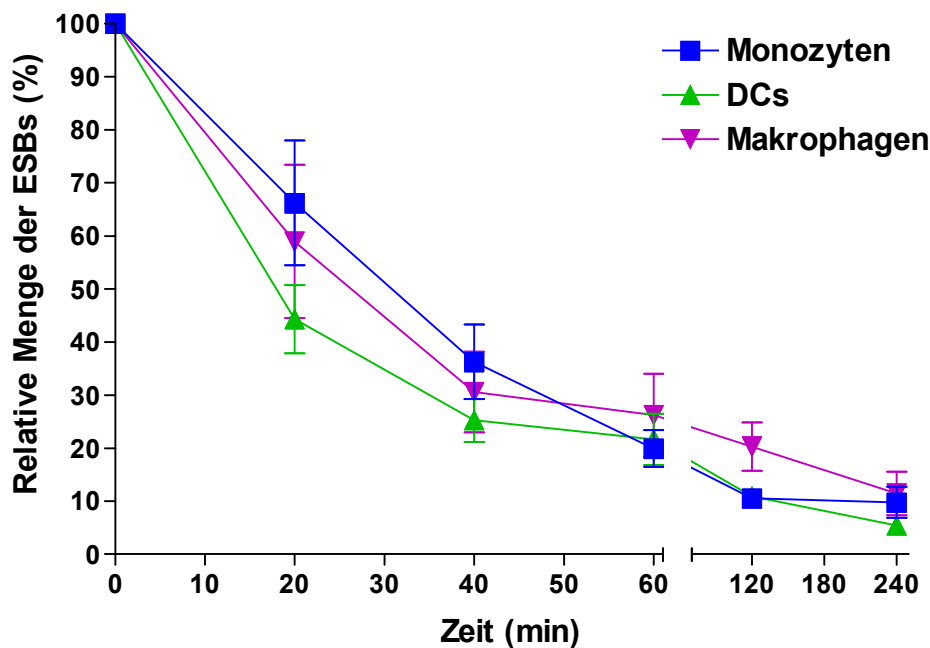


Abb. 3.30: Reparatur von IR-induzierten ESBs in Monozyten, DCs und Makrophagen. Relative Menge der induzierten ESBs, bestimmt mittels alkalischer SCGE, zeitabhängig nach Bestrahlung mit 2 Gy. Dargestellt ist der Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

Die in Abb. 3.31 dargestellte neutrale SCGE zeigt, dass die Reparatur der DSBs in Monozyten im Vergleich zu DCs und Makrophagen langsamer erfolgte. Die relative Menge der DSBs war bis 120 min nach Bestrahlung immer signifikant höher als in DCs und Makrophagen. Nach 20 min konnten in DCs und Makrophagen etwa 50% der DSBs repariert werden. In Monozyten hingegen wurden zu diesem Zeitpunkt lediglich 10% der induzierten DSBs entfernt. Nach 4 h konnten die Monozyten etwa 60%, DCs etwa 70% und Makrophagen etwa 80% der induzierten DSBs prozessieren.

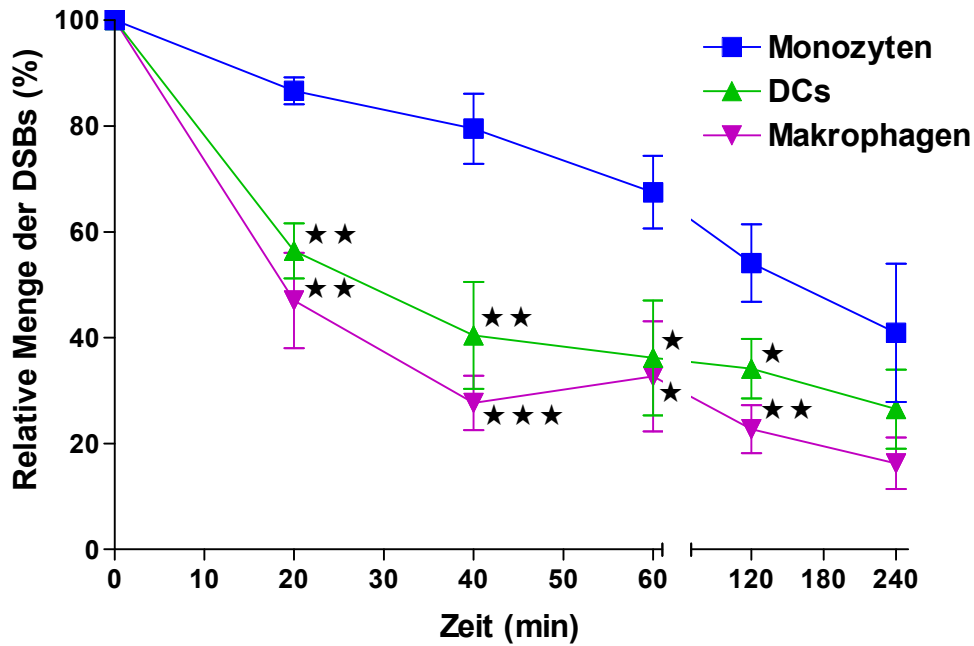


Abb. 3.31: Reparatur von IR-induzierten DSBs in Monozyten, DCs und Makrophagen. Relative Menge der induzierten DSBs, bestimmt mittels neutraler SCGE, zeitabhängig nach Bestrahlung mit 2 Gy. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ zum Vergleich von Monozyten zu DCs und Makrophagen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test. Dargestellt ist der Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

3.5.3 Bestimmung von γ H2AX in Monozyten, DCs und Makrophagen nach IR

Zur Bestätigung des Ergebnisses der neutralen SCGE erfolgte der Nachweis von γ H2AX nach Bestrahlung mit 5 Gy in Monozyten, DCs und Makrophagen mittels Immunfluoreszenz. Die in Abb. 3.32 dargestellten repräsentativen LSM-Aufnahmen zeigen, dass bereits 30 min nach Bestrahlung ein γ H2AX-Signal in Monozyten, DCs und Makrophagen zu erkennen war. Das Signal war in Monozyten intensiver als in DCs und Makrophagen und deutet somit auf eine größere Menge an DSBs in Monozyten hin. In DCs und Makrophagen war nach 120 und 240 min eine deutliche Abnahme des γ H2AX-Signals zu beobachten. Nach 240 min war die Signalintensität auf Ebene der Kontrolle und somit alle induzierten DSBs repariert. In Monozyten hingegen war die Abnahme der Signalintensität schwächer und auch nach 240 min, im Vergleich zur Kontrolle, noch ein stärkeres γ H2AX-Signal vorhanden.

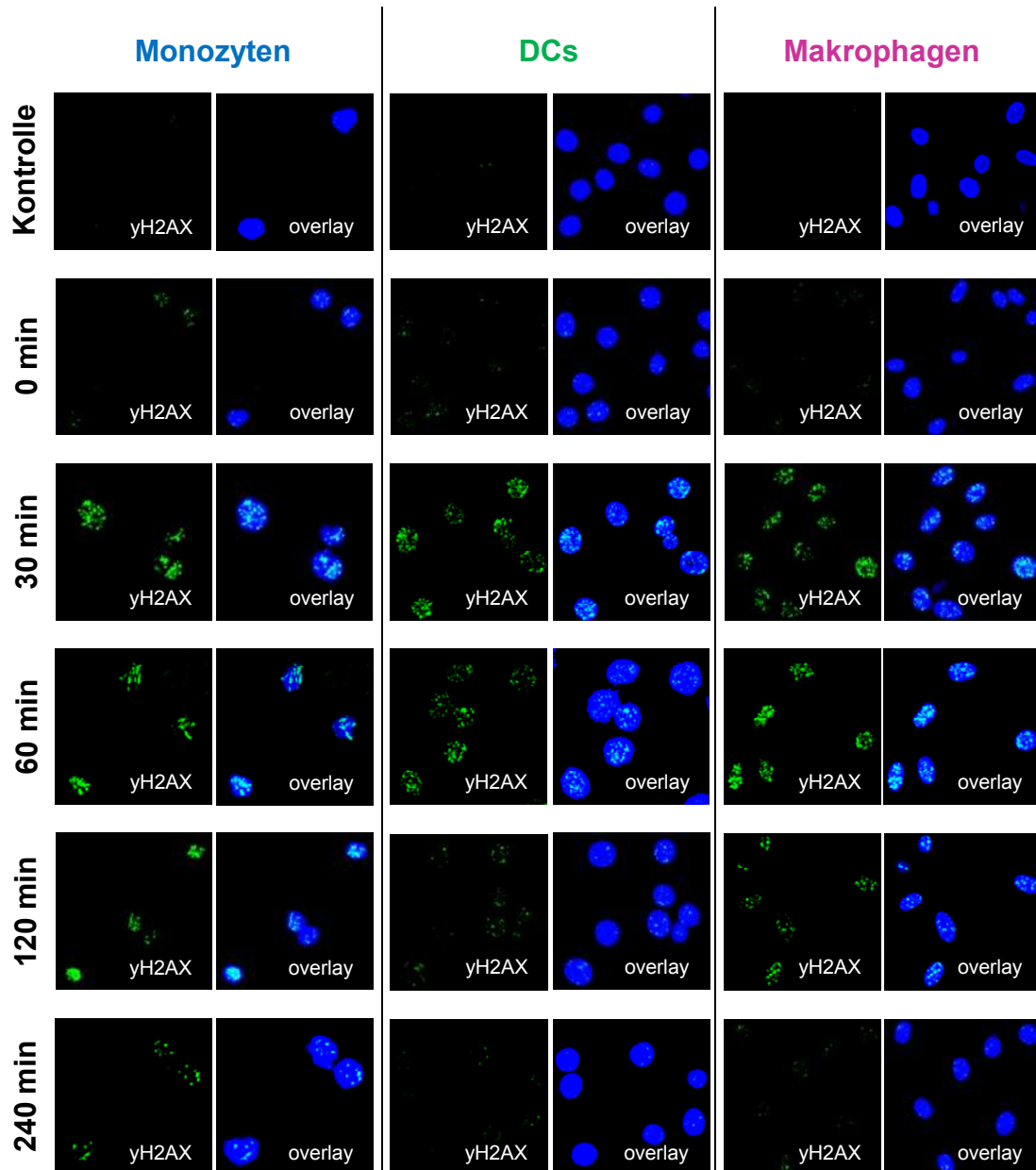


Abb. 3.32: Entstehung von γ H2AX-Foci in Monozyten, DCs und Makrophagen nach IR. Repräsentative LSM-Aufnahmen der γ H2AX-Färbung nach Bestrahlung mit 5 Gy nach unterschiedlichen Zeitpunkten.

Auch die Quantifizierung der Signalintensität von γ H2AX zeigte, dass das γ H2AX-Signal in Monozyten nach 30, 120 und 240 min signifikant höher war als in DCs und Makrophagen (Abb. 3.33). Dies lässt, wie auch die neutrale SCGE (siehe 3.5.2), sowohl eine durch IR höhere induzierte DSB Menge als auch eine eingeschränkte Reparatur der DSBs in Monozyten vermuten.

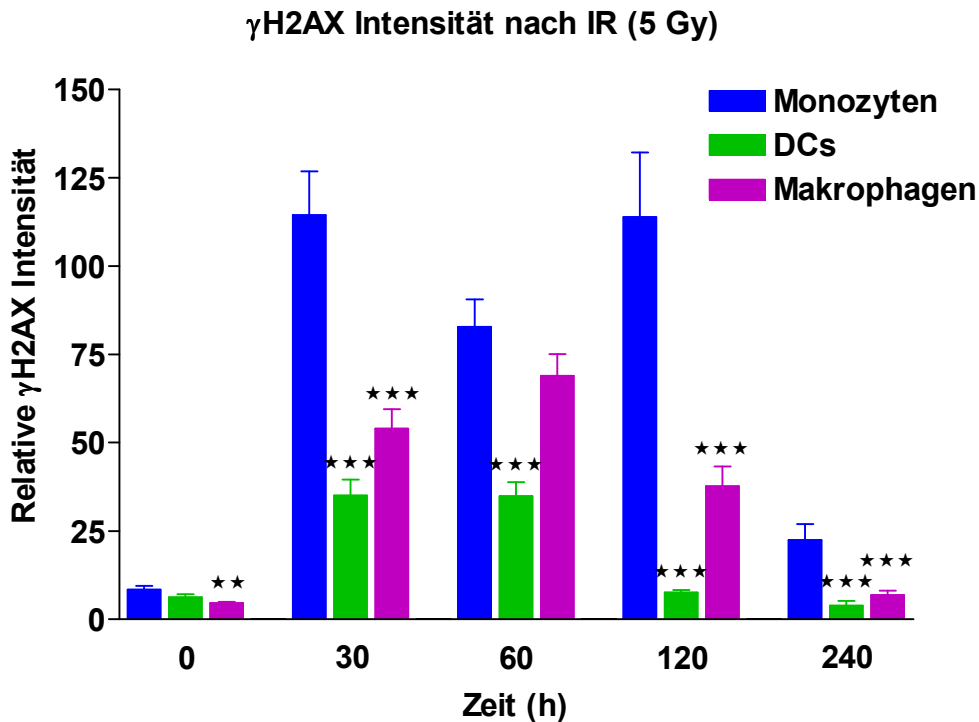


Abb. 3.33: Relative Signalintensität von γ H2AX in Monozyten, DCs und Makrophagen nach IR. Durchschnittliche Fluoreszenzintensität des γ H2AX-Signals, dargestellt in Abb. 3.31. ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ zum Vergleich von Monozyten zu DCs und Makrophagen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test.

3.6 Untersuchung der DSB-Reparaturkapazität

Die in Monozyten nicht exprimierten Proteine PARP-1, XRCC1 und Ligase III α sind nicht nur an der ‚short-patch‘ BER beteiligt (Dianov et al., 2001), sondern bilden zusammen auch den Reparaturapparat des B-NHEJ (Audebert et al., 2004). Dies lässt vermuten, dass in Monozyten ohne die Proteine PARP-1, XRCC1 und Ligase III α die DSB-Reparatur über das B-NHEJ nicht funktionieren kann. Aufgrund des BER-Defekts in Monozyten sollte es jedoch durch nicht reparierte und in überlappenden Bereichen liegenden Reparaturintermediaten vermehrt zur Bildung von DSBs kommen, wie es auch nach Behandlung mit *tert*-BOOH und IR in Monozyten zu beobachten war (siehe 3.3.2 und 3.5.3). Die Reparatur von DSBs in Monozyten, aber auch in DCs und Makrophagen, kann nicht durch die HR erfolgen, da diese lediglich in der S- und G2-Phase des Zellzyklus stattfindet (Takata et al., 1998), die untersuchten Zellen aber nicht proliferieren und in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert sind. In nicht replizierenden Zellen ist das NHEJ für die Reparatur von DSBs verantwortlich. Der überwiegende Teil der DSBs wird über die C-

NHEJ repariert, dessen Reparaturapparat durch die Proteine DNA-PKcs, Ku70, Ku80, XRCC4 und Ligase IV gebildet wird.

3.6.1 Expression von Proteinen des C-NHEJ

Zur Untersuchung der Frage, ob neben den Proteinen der B-NHEJ (PARP-1, XRCC1 und Ligase III α) auch Proteine des C-NHEJ nicht exprimiert werden, wurde mittels Western Blot-Analyse die Expression der Proteine DNA-PKcs, Ku70, Ku80, XRCC4 und Ligase IV in Monozyten, DCs und Makrophagen untersucht. DCs und Makrophagen exprimieren die genannten C-NHEJ Proteine. Monozyten zeigten zwar die Expression der Proteine Ku70, Ku80, XRCC4 und Ligase IV, nicht jedoch die von DNA-PKcs (Abb. 3.34).

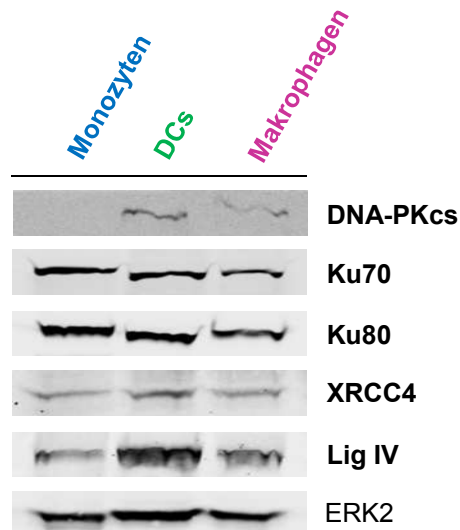


Abb. 3.34: Expression von C-NHEJ-Proteinen in Monozyten, DCs und Makrophagen. Western Blot-Analyse der C-NHEJ Proteine DNA-PKcs, Ku70, Ku80, XRCC4 und Lig IV in Gesamtzell-extrakten von Monozyten, DCs und Makrophagen. ERK2 diente jeweils als Ladekontrolle.

Auch auf Ebene der RNA zeigte sowohl die in Abb. 3.35 A dargestellte semiquantitative Endpunkt-RT-PCR als auch die in Abb. 3.35 B gezeigte semiquantitative Real-Time-RT-PCR, dass Monozyten signifikant weniger *DNA-PKCS* exprimierten als DCs und Makrophagen.

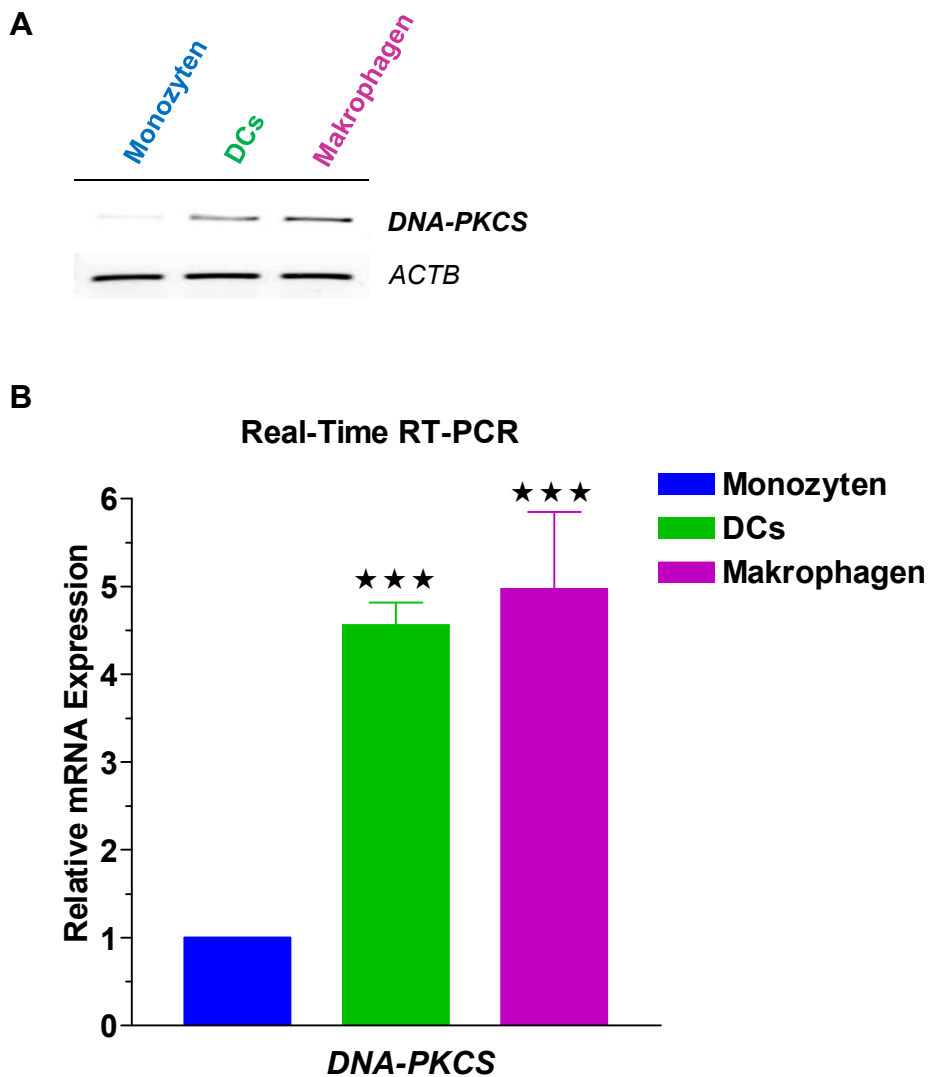


Abb. 3.35: Bestimmung der mRNA Menge von DNA-PKcs in Monozyten, DCs und Makrophagen. Semiquantitative Endpunkt-RT-PCR (A) und semiquantitative Real-Time RT-PCR (B) der *DNA-PKCS* mRNA in Monozyten, DC und Makrophagen. *ACTB*-PCR diente jeweils als Abgleich der eingesetzten RNA-Menge. *** $p < 0.001$ zum Vergleich von Monozyten zu DCs und Makrophagen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test. Dargestellt ist der Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten.

Somit fehlte Monozyten neben der Expression der Proteine PARP-1, XRCC1 und Ligase III α , welche für das B-NHEJ benötigt werden, auch die Expression des für das C-NHEJ benötigten Proteins DNA-PKcs.

3.6.2 Bestimmung der DNA-PK-Aktivität in Monozyten, DCs und Makrophagen

Zur Bestätigung der Expressionsanalysen wurde die enzymatische DNA-PK-Aktivität in Monozyten, DCs und Makrophagen sowohl basal als auch nach Bestrahlung mit 4 Gy IR

bestimmt. Die Bestrahlung diente dabei zur Generierung von DSBs, was zur Aktivierung der DNA-PK (Holoenzym aus DNA-PKcs, Ku70 und Ku80) führte. Monozyten zeigten weder basal noch nach Bestrahlung eine messbare DNA-PK-Aktivität. Hingegen konnte in DCs und Makrophagen bereits basal eine signifikant höhere Aktivität der DNA-PK bestimmt werden, die nach Bestrahlung nochmals signifikant zunahm (Abb. 3.36).

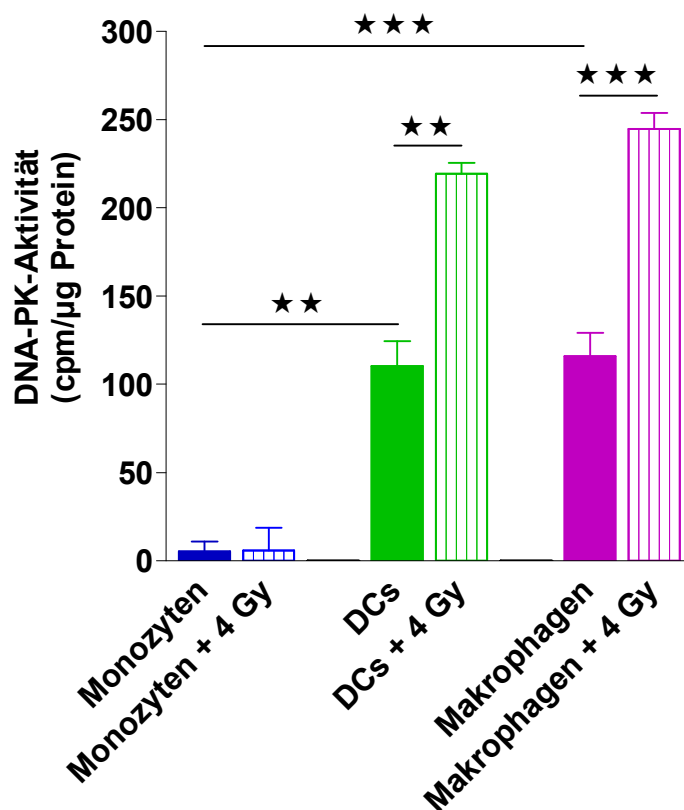


Abb. 3.36: Bestimmung der DNA-PK-Aktivität in Monozyten, DCs und Makrophagen. DNA-PK-Aktivität in Proteinextrakten von Monozyten, DCs und Makrophagen unbehandelt und nach Bestrahlung mit 4 Gy IR. ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ zum Vergleich von Monozyten zu DCs und Makrophagen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

3.7 Expressionsanalyse von weiteren gentoxischen „Stress“-Genen in Monozyten, DCs und Makrophagen

Um herauszufinden, ob bei der Differenzierung von Monozyten zu DCs und Makrophagen die Expression noch weiterer DNA-Reparaturgene reguliert wird, wurde ein PCR-Array durchgeführt. Dieser auf Real-Time RT-PCR basierende PCR-Array enthielt neben zwei Kontrollen 83 Gene der Gruppen „Zellzyklus/Zelltod“, „DNA-Schadensantwort“ und „Stress

Signaling“. Eine Liste der untersuchten Gene befindet sich in Kapitel 6.2. Es wurden Expressionsprofile von Monozyten und daraus abgeleiteten DCs und Makrophagen von zwei verschiedenen Spendern erstellt, welche in Kapitel 6.3 zusammengefasst sind. Dabei wurden nur Gene, deren mRNA-Menge in DCs und Makrophagen um das 2-fache von der mRNA-Menge in Monozyten abweicht, als reguliert angesehen.

Lediglich in Makrophagen wurden die Gene *CD44* (IF = $2,77 \pm 1,21$), *GPX1* (IF = $2,1 \pm 1,01$; Glutathion-Peroxidase 1), *HIF-1A* (IF = $2,96 \pm 1,58$; *Hypoxia-inducible factor-1 α*) und *OGG1* (IF = $2,36 \pm 1,04$) induziert sowie die Gene *FASL* (IF = $0,33 \pm 0,14$; Fas-Ligand), *HMOX1* (IF = $0,41 \pm 0,17$; Hämoxygenase 1), *HSP90* (IF = $0,35 \pm 0,2$; *Heatshock protein 90*), *IL-6* (IF = $0,16 \pm 0,16$; Interleukin-6) und *RHOB* (IF = $0,46 \pm 0,27$, *Ras homolog gene family, member B*) reprimiert.

Nur in DCs erfuhren die Gene *BIRC3* (IF = $3,16 \pm 2,95$; *baculoviral IAP repeat containing 3*), *DDB2* (IF = $2,08 \pm 0,58$; *DNA-damage binding protein 2, XPE*), *FASL* (IF = $2,74 \pm 3,46$), *LIG IV* (IF = $2,22 \pm 0,46$; Ligase IV), *POLE* (IF = $2,67 \pm 1,21$; DNA-Polymerase epsilon), *P53* (IF = $2,11 \pm 0,82$, Tumor Protein 53) und *TIAM1* (IF = $2,69 \pm 1,08$; *T-cell lymphoma invasion and metastasis 1*) eine Induktion sowie die Gene *LIG I* (IF = $0,54 \pm 1,87$; Ligase I) und *REV3L* (IF = $0,49 \pm 0,1$; *REV3-like, catalytic subunit of DNA polymerase zeta*) eine Repression.

Die Expression der Gene, welche sowohl in DCs als auch in Makrophagen beider Spender im Vergleich zu Monozyten gleichermaßen reguliert wurden, also in beiden Fällen induziert oder reprimiert wurden, wurde anschließend mittels semiquantitativer Real-Time RT-PCR verifiziert. In Abbildung 3.37 sind die Ergebnisse der PCR-Analysen für beide Spender zusammengefasst dargestellt.

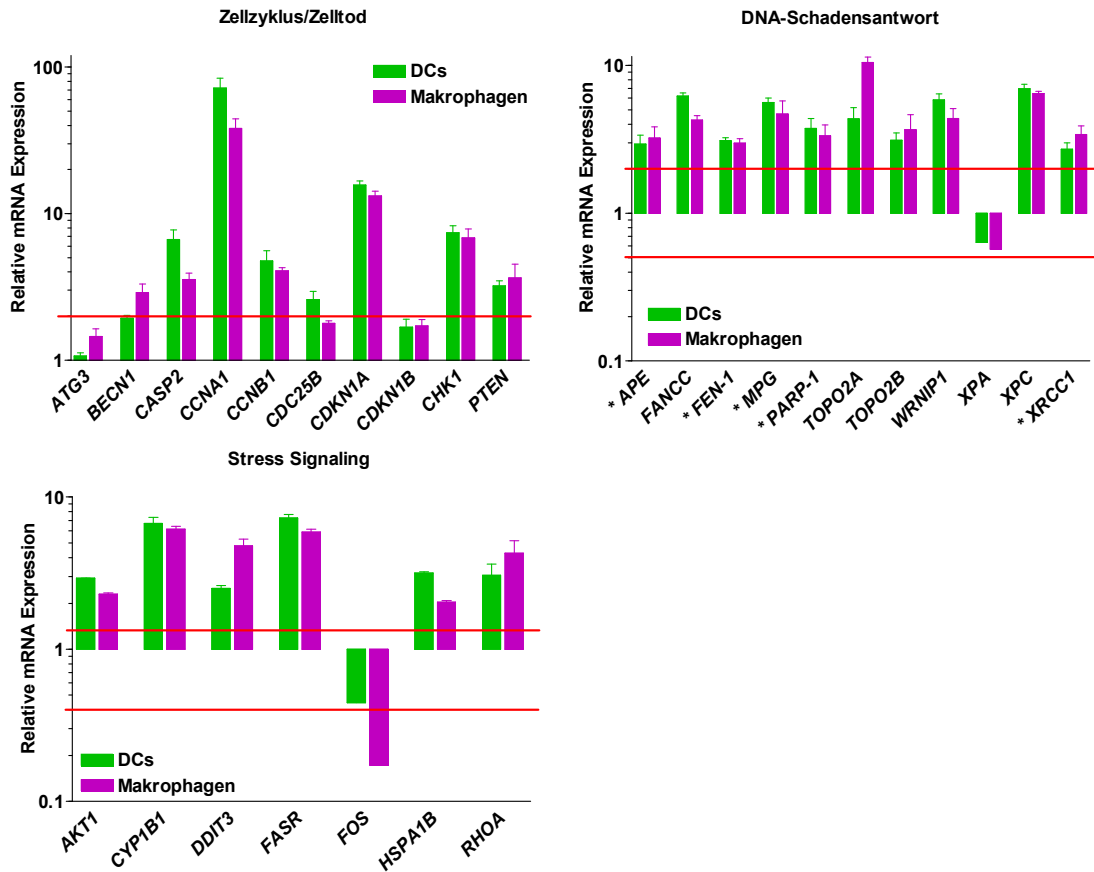


Abb. 3.37: Verifizierung von regulierten Genen des PCR-Arrays von Monozyten im Vergleich zu DCs und Makrophagen. Mittelwerte der Semiquantitative Real-Time-RT-PCR Analysen der mRNA beider Spender aller im PCR-Array regulierter Gene in Monozyten, DCs und Makrophagen. Dargestellt sind die jeweiligen relativen mRNA-Mengen in DCs und Mph im Vergleich zu Monozyten (IF = 1). *ACTB*-PCR diente jeweils als Abgleich der eingesetzten RNA-Menge. Generell werden solche Gene als reguliert betrachtet, deren mRNA-Menge um das 2-fache von der jeweiligen Kontrolle abweicht (gekennzeichnet durch die rote Linie bei 2 bzw. 0,5). *: Gene, die für Proteine der BER kodieren.

Die im PCR-Array beobachtete Regulation der Gene *ATG3* (IF DC = $1,06 \pm 0,14$; IF Mph = $1,45 \pm 0,48$; *Autophagy-related 3*), *CDKN 1B* (IF DC = $1,68 \pm 0,55$; IF Mph = $1,71 \pm 0,44$; *Cyclin dependent kinase inhibitor 1B*, p27) und *XPA* (IF DC = $0,63 \pm 0,09$; IF Mph = $0,57 \pm 0,2$; Xeroderma pigmentosum, Komplementationsgruppe A) konnte mittels der Real-Time PCR-Analyse nicht bestätigt werden.

Das einzige reprimierte Gen in DCs und Makrophagen war das Gen *FOS* (IF DC = $0,42 \pm 0,04$; IF Mph = $0,27 \pm 0,1$; *engl. FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog*). Dieses kodiert für das c-Fos Protein, das mit dem c-Jun Protein zum Transkriptionsfaktor AP-1 dimerisiert, welcher die Expression vieler an Proliferation und Differenzierung beteiligter Gene reguliert.

Insgesamt fällt auf, dass die Expression fast aller regulierten Gene während der Differenzierung von Monozyten zu DCs und Makrophagen zunahm. Zur Gruppe dieser induzierten Gene zählten folgende Gene:

„Zellzyklus/Zelltod“

- *BECN1* (IF DC= 1,93±0,23; IF Mph = 2,89±1,02; Beclin1)
- *CASP2* (IF DC= 6,65±2,69; IF Mph = 3,55±0,91; Caspase 2)
- *CCNA1* (IF DC= 72,06±38,1; IF Mph = 29,08±15,14; Cyclin A1)
- *CCNB1* (IF DC= 4,76±4,07; IF Mph = 2,04±0,55; Cyclin B1)
- *CDC25B* (IF DC= 2,58±0,89; IF Mph = 1,78±0,17; *Cell division cycle 25 homolog B*)
- *CDKN1A* (IF DC= 15,68±2,53; IF Mph = 13,18±2,67; *Cyclin dependent kinase inhibitor 1A, p21*)
- *CHK1* (IF DC= 7,42±2,09; IF Mph = 6,82±2,56; *Cell cycle checkpoint kinase 1*)
- *PTEN* (IF DC= 3,22±0,65; IF Mph = 3,64±2,13; *Phosphatase and tensin homolog*)

„DNA-Schadensantwort“

- *APE* (IF DC= 2,93±1,11; IF Mph = 3,23±1,47; *Apurinic/aprimidinic endonuclease1*)
- *PARP-1* (IF DC= 6,19±0,77; IF Mph = 4,26±0,76)
- *FANCC* (IF DC= 3,09±0,37; IF Mph = 2,98±0,55; Fanconi-Protein, Komplementationsgruppe C)
- *FEN-1* (IF DC= 5,61±1; IF Mph = 4,69±2,58)
- *MPG* (IF DC= 3,47±1,56; IF Mph = 3,34±1,51)
- *TOPO2A* (IF DC= 4,35±2,01; IF Mph = 10,45±2,36; Topoisomerase 2A)
- *TOPO2B* (IF DC= 3,12±0,94; IF Mph = 3,68±2,38; Topoisomerase 2B)
- *WRNIP1* (IF DC= 5,85±1,39; IF Mph = 4,36±1,85; *Werner helicase interacting protein 1*)
- *XPC* (IF DC= 6,96±1,21; IF Mph = 6,45±0,57; Xeroderma pigmentosum, Komplementationsgruppe C)
- *XRCC1* (IF DC= 2,7±0,72; IF Mph = 3,4±1,22)

„Stress Signaling“

- *AKT1* (IF DC= 3,66±0,89; IF Mph = 3,46±1,31; *a-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*)

- *CYP1B1* (IF DC= 6,56±2,21; IF Mph = 6,79±1,25; Cytochrom P450 1B1)
- *DDIT3* (IF DC= 4,64±2,54; IF Mph = 6,57±2,4; *DNA-damage-inducible transcript 3*)
- *FASR* (IF DC= 5,98±1,61; IF Mph = 6,16±0,6; Fas Rezeptor)
- *HSP1B1* (IF DC= 6,73±3,95; IF Mph = 3,8±1,96; *Heatshock protein 1B*)
- *RHOA* (IF DC= 3,06±1,35; IF Mph = 4,27±2,17; *Ras homolog gene family, member A*)

Mit *APE*, *FEN-1*, *MPG*, *PARP-1* und *XRCC1* wurden viele Gene die für Proteine der BER kodieren während der Differenzierung von Monozyten zu DCs und Makrophagen hochreguliert, was den Befund des BER-Defekts in Monozyten bekräftigt (siehe Kapitel 3.3).

Als Cofaktor der BER bei der Reparatur des oxidativen DNA-Schadens 8-oxoG agiert XPC (Xeroderma pigmentosum C), indem es die Aktivität der Glykosylase OGG1 stimuliert (D'Errico et al., 2006). Generell ist das XPC-Protein Teil eines heterodimeren Komplexes, das eine bedeutende Rolle in der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) spielt. Zusammen mit HR23B erkennt XPC UV-induzierte (6-4)Photoprodukte (Christmann et al., 2003). Aufgrund der Bedeutung für die BER, wurde die im PCR-Array gezeigte Hochregulation der *XPC*-mRNA nach Ausreifung von Monozyten zu DCs und Makrophagen auch auf Protein-Ebene mittels Western Blot-Analyse untersucht. In Monozyten war das XPC-Protein nicht nachweisbar. Hingegen exprimierten die aus Monozyten abgeleiteten DCs das Protein deutlich und Makrophagen schwach (Abb. 3.38).

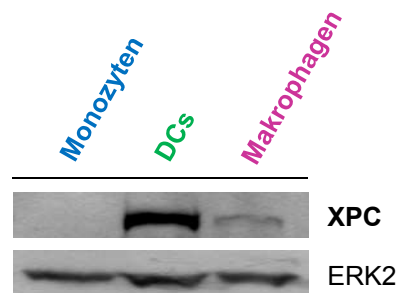


Abb. 3.38: Expression des XPC-Proteins in Monozyten, DCs und Makrophagen. Western-Analyse des XPC-Proteins in Gesamtzellextrakten von Monozyten, DCs und Makrophagen. ERK2 diente als Ladekontrolle.

3.8 Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber Temozolomid

Temozolomid ist ein Zytostatikum, das zur Therapie von Glioblastomen und malignen Melanomen verwendet wird. Es gehört zur Gruppe der monofunktionellen alkylierenden Agenzien und bildet durch spontane Hydrolyse bei physiologischem pH den aktiven Metaboliten 5-(3-methyltriazin-1-yl)imidazole-4-carboxamide (MTIC), welcher mit der DNA reagiert (Newlands et al., 1997). DNA-Methylierungen verursachen verschiedene Läsionen, wobei N7-MeG die häufigste darstellt (Wyatt and Pittman, 2006). N7-MeG und andere N-Methylpurine werden über die BER repariert (Christmann et al., 2003). Aufgrund der fehlenden Expression der BER-Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 in Monozyten stellt sich die Frage, ob dies die Sensitivität der Zellen im Vergleich zu den BER-kompetenten DCs und Makrophagen gegenüber Temozolomid beeinflusst. In vorangegangenen Untersuchungen konnte bereits eine erhöhte Sensitivität von Monozyten im Vergleich zu DCs gegenüber Alkylantien festgestellt werden (Briegert et al., 2007; Briegert and Kaina, 2007).

3.8.1 Apoptoseinduktion in Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit Temozolomid

Monozyten, DCs und Makrophagen wurden mit 0,6 mM Temozolomid behandelt und nach 72 h die Sensitivität gegenüber Temozolomid durchflusszytometrisch mittels SubG1-Assay bestimmt. Die Messungen zeigten eine signifikant höhere SubG1-Fraktion in Monozyten als in DCs und Makrophagen (Abb. 3.39 A und B).

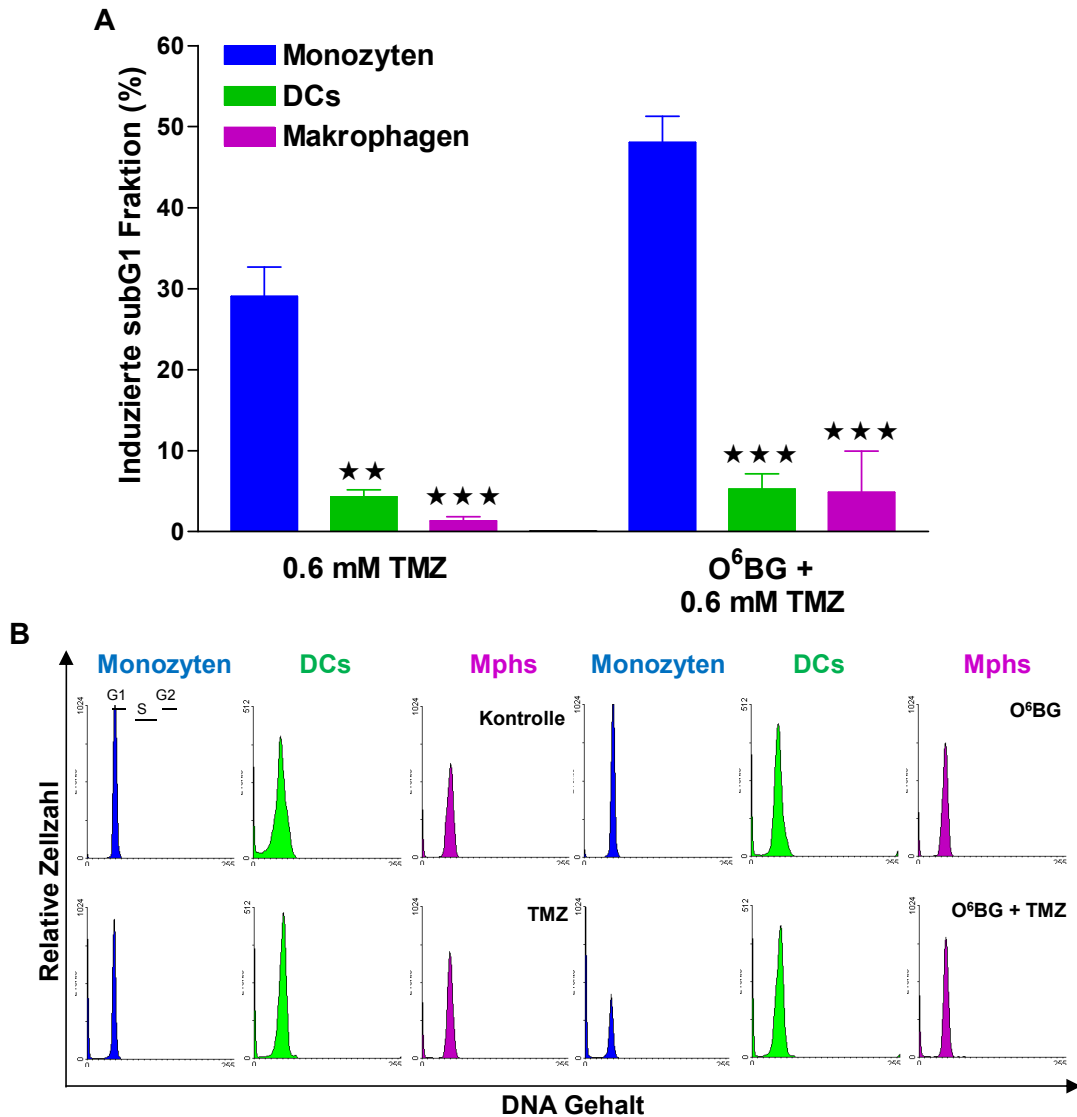


Abb. 3.39: Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber Temozolomid. (A) Quantifizierung apoptotischer SubG1-Zellen 72 h nach Behandlung mit 0,6 mM TMZ. Um MGMT zu inhibieren, wurden die Zellen 1 h vor TMZ-Gabe mit 10 μ M O⁶BG vorbehandelt. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ zum Vergleich von Monozyten zu DC und Makrophagen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten. (B) Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen SubG1-Messung von Monozyten, DCs und Makrophagen 72 h nach Behandlung mit 0,6 mM TMZ und/oder 10 μ M O⁶BG sowie Profil der Zellzyklusverteilung.

Um zu prüfen, ob das durch Temozolomid induzierte O⁶-MeG einen toxischen Schaden für das Monozyten-DC-Makrophagen-System darstellt, wurde die Methyltransferase-Aktivität von MGMT durch Vorbehandlung mit O⁶-Benzylguanin (O⁶BG) inhibiert. Die Sensitivität der Monozyten gegenüber Temozolomid wurde durch Inhibierung von MGMT nochmals gesteigert. Die induzierte SubG1-Population zeigte dabei einen Anstieg von etwa 30 auf fast 50% (Abb. 3.49 A und B).

3.8.2 Proteinexpression und Aktivität von MGMT in Monozyten, DCs und Makrophagen

MGMT ist ein DNA-Reparaturprotein, das die O⁶-Methylgruppe des O⁶-MeG entfernt, welches in proliferierenden und MGMT-defizienten Zellen die wichtigste toxische Läsion induziert durch Temozolomid darstellt (Roos et al., 2004). Da Monozyten, DCs und Makrophagen in unserem verwendetem *in vitro* Zellsystem nicht proliferieren, sollte O⁶-MeG die Sensitivität der Zellen nicht beeinflussen. Um auszuschließen, dass die hohe Sensitivität der Monozyten gegenüber Temozolomid auf eine verminderte Reparatur von O⁶-MeG zurückzuführen ist, wurde sowohl die Expression des MGMT-Proteins, als auch die Methyltransferase-Aktivität in Monozyten, DCs und Makrophagen bestimmt. Die Western Blot-Analyse zeigte, dass sowohl Monozyten als auch DCs und Makrophagen das Protein MGMT exprimieren (Abb. 3.40).

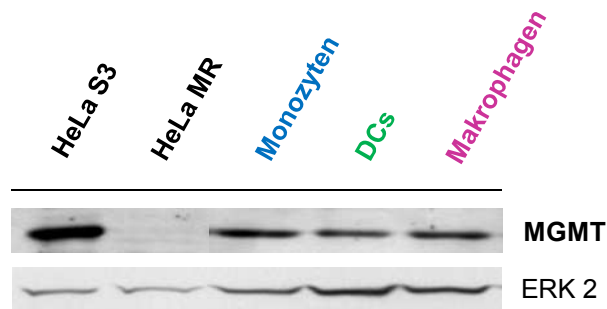


Abb. 3.40: Expression des MGMT-Proteins in Monozyten, DCs und Makrophagen. Expression des MGMT-Proteins in HeLa S3 (Positiv-Kontrolle), HeLa MR (Negativ Kontrolle), Monozyten, DC und Makrophagen mittels Western Blot. ERK2 diente als Ladekontrolle.

In Monozyten konnte sogar eine signifikant höhere MGMT-Enzymaktivität als in DCs und Makrophagen nachgewiesen werden (Abb. 3.41). Die MGMT-Aktivität von DCs und Makrophagen war hingegen vergleichbar. Demnach ist die höhere Sensitivität der Monozyten gegenüber Temozolomid nicht auf eine eingeschränkte Reparatur des O⁶-MeG zurückzuführen.

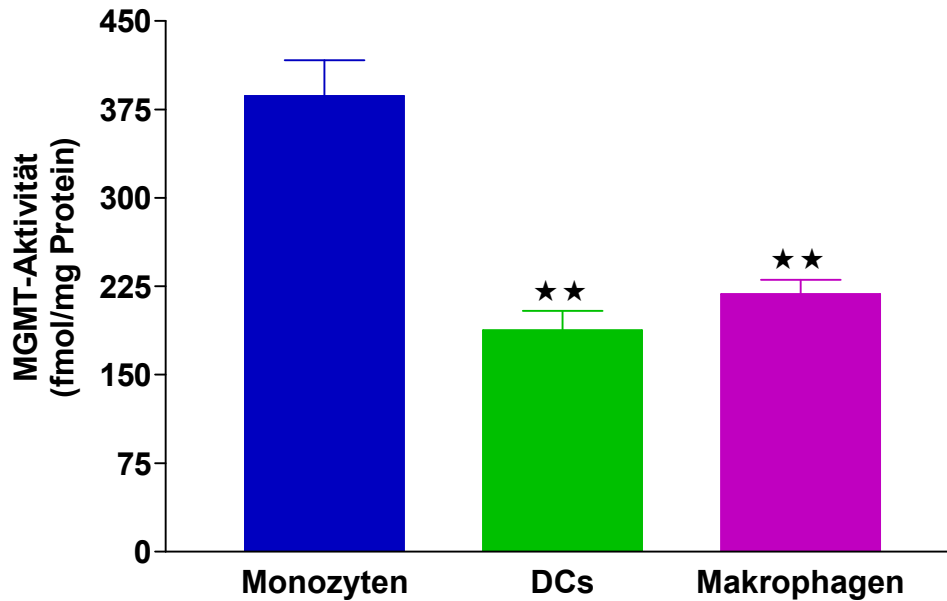


Abb. 3.41: MGMT-Aktivität von Monozyten, DCs und Makrophagen. Messung der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Aktivität mittels MGMT-Aktivitäts-Test in Gesamtzellextrakten von Monozyten, DCs und Makrophagen. **p<0.01 zum Vergleich von Monozyten zu DCs und Makrophagen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

3.8.3 Einfluss von Temozolomid auf die BER-Kapazität von Monozyten, DCs und Makrophagen

In MEFs (*engl.* mouse embryo fibroblasts) wurde gezeigt, dass die Behandlung mit dem Alkylanz MMS zur Hochregulation der Proteinexpression von XRCC1 führt (Chen et al., 2008). Daher sollte untersucht werden, ob auch Temozolomid einen Einfluss auf die Expression der BER-Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 in Monozyten, DCs und Makrophagen hat. Die Western Blot-Analyse in Abb. 3.42 zeigt, dass die Behandlung mit 0,6 mM Temozolomid sowohl in Monozyten als auch in DCs und Makrophagen in einer Abnahme von PARP-1 resultierte. Die Expression von XRCC1 und Ligase III α nahm in Monozyten während der Temozolomid -Behandlung zu. In DCs und Makrophagen, die im Gegensatz zu Monozyten XRCC1 und Ligase III α exprimieren, blieb die Expression nach Behandlung mit Temozolomid unverändert.

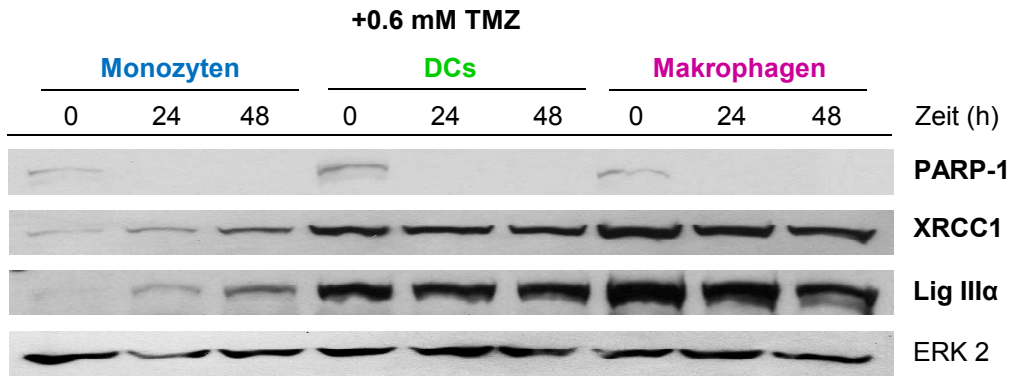


Abb. 3.42: Einfluss der Temozolomid-Behandlung auf die Expression von BER-Proteinen. Expression der Proteine PARP-1, XRCC1 und Lig III α in Gesamtzell-extrakten von Monozyten, DCs und Makrophagen 0, 24 und 48 h nach Behandlung mit 0,6 mM TMZ mittels Western Blot. ERK2 diente als Ladekontrolle.

Mittels eines *in vitro* BER-Aktivitäts-Assays wurde untersucht, ob die Zunahme von XRCC1 und Ligase III α in Monozyten die BER-Kapazität der Zellen beeinflusst (schematische Darstellung des BER-Assays siehe Abb. 3.16). Der *in vitro* BER-Assay zeigte, dass die initiale Inzision durch die APE, die das 19mer Fragment hervorbringt, und auch der anschließende Schritt durch die Pol β (das Anfügen eines Nukleotids zum 20mer Fragment) in Monozyten unbehindert und nach Behandlung mit Temozolomid erfolgte (Abb. 3.43 A). Hingegen konnte die vom XRCC1/Ligase III α -Komplex abhängige Religation (Wiederherstellung des 39mer Fragments) in Monozyten nach Behandlung mit Temozolomid nicht induziert werden (Abb. 3.43 A und B). Dies bedeutet, dass trotz Zunahme der Proteinexpression von XRCC1 und Ligase III α nach der Temozolomid-Behandlung die Religation durch den XRCC1/Ligase III α -Komplex in Monozyten nicht stattfindet und somit die BER-Kapazität der Monozyten nicht beeinflusst.

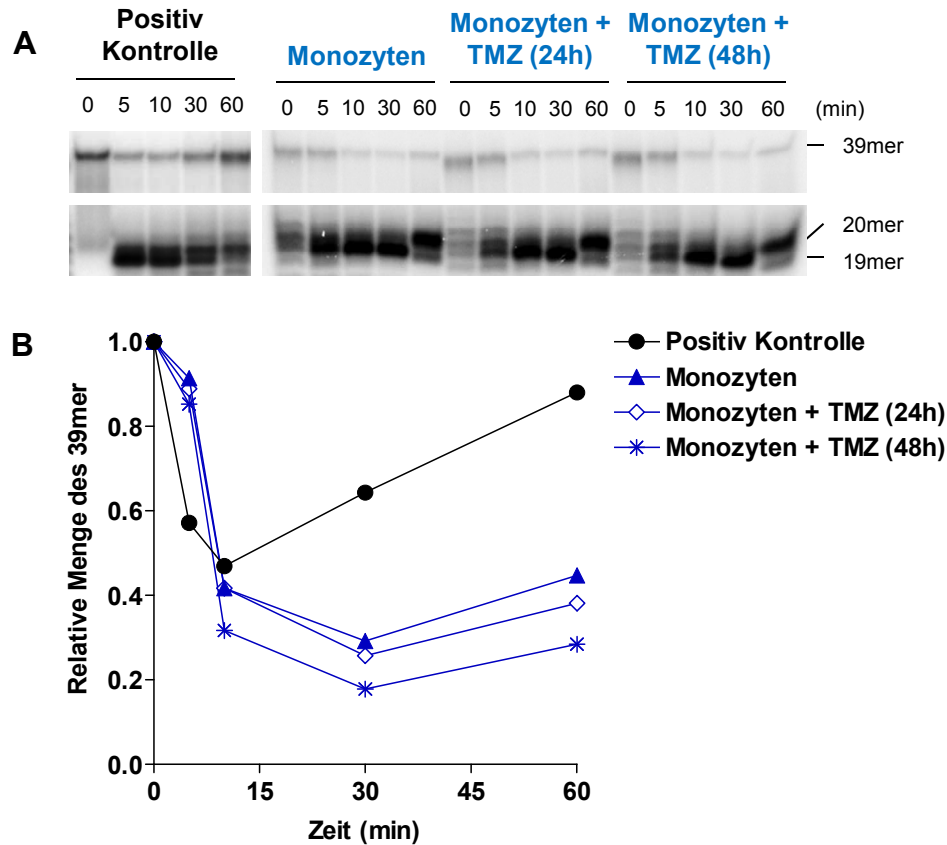


Abb. 3.43: Einfluss der Temozolomid-Behandlung auf die BER-Kapazität von Monozyten. (A) BER-Assay von Proteinextrakten von Monozyten 0, 24 und 48h nach Behandlung mit 0,6 mM TMZ. 20% PAGE der Reaktionen nach 0, 5, 10, 30 und 60 min Inkubation. Als Positiv-Kontrolle wurden DC Gesamtzellextrakte verwendet. Es wurden je 5 µg Gesamtproteinextrakt pro Reaktion eingesetzt. (B) Relative Menge der 39 mer Bande aus (A) nach 0, 5, 10, 30 und 60 min Inkubation. Kontrolle (0 min) wurde jeweils gleich 1 gesetzt.

3.8.4 DNA-Schaden nach Temozolomid-Behandlung in Monozyten, DCs und Makrophagen

Vorangegangenen Untersuchungen (Briegert and Kaina, 2007) und der BER-Assay (siehe 3.8.3) zeigten, dass Temozolomid in Monozyten aufgrund des Defekts in der BER/ESBR zur vermehrten Bildung von ESBs führt. ESBs können in proliferierenden Zellen während der S-Phase zu DSBs umgewandelt werden (Nikolova et al., 2010). Auch in nicht-proliferierenden Zellen kann eine hohe Menge an ESBs zur Bildung von DSBs führen. Dies passiert, wenn zwei ESBs, jeweils auf einem der beiden DNA-Stränge, gegenüber stehen. Zur Untersuchung der Frage, ob die in Monozyten beobachtete Zytotoxizität von Temozolomid auf die Induktion von DSBs zurückzuführen ist, wurde γ H2AX als Marker für DSBs (Kinner et al., 2008) in Monozyten, DCs und Makrophagen nach Temozolomid-Behandlung mittels Immunfärbung nachgewiesen. 3 h nach Temozolomid-Gabe erfolgte eine ähnlich starke Phosphorylierung von H2AX in Monozyten, DCs und Makrophagen,

welche nach 6h zunahm (Abb. 3.44). Während in DCs und Makrophagen die Intensität der γ H2AX-Färbung nach 24 h wieder abnahm, was auf eine Reparatur der DSBs hindeutet, blieb in Monozyten die Intensität der γ H2AX-Färbung unverändert hoch (Abb. 3.44).

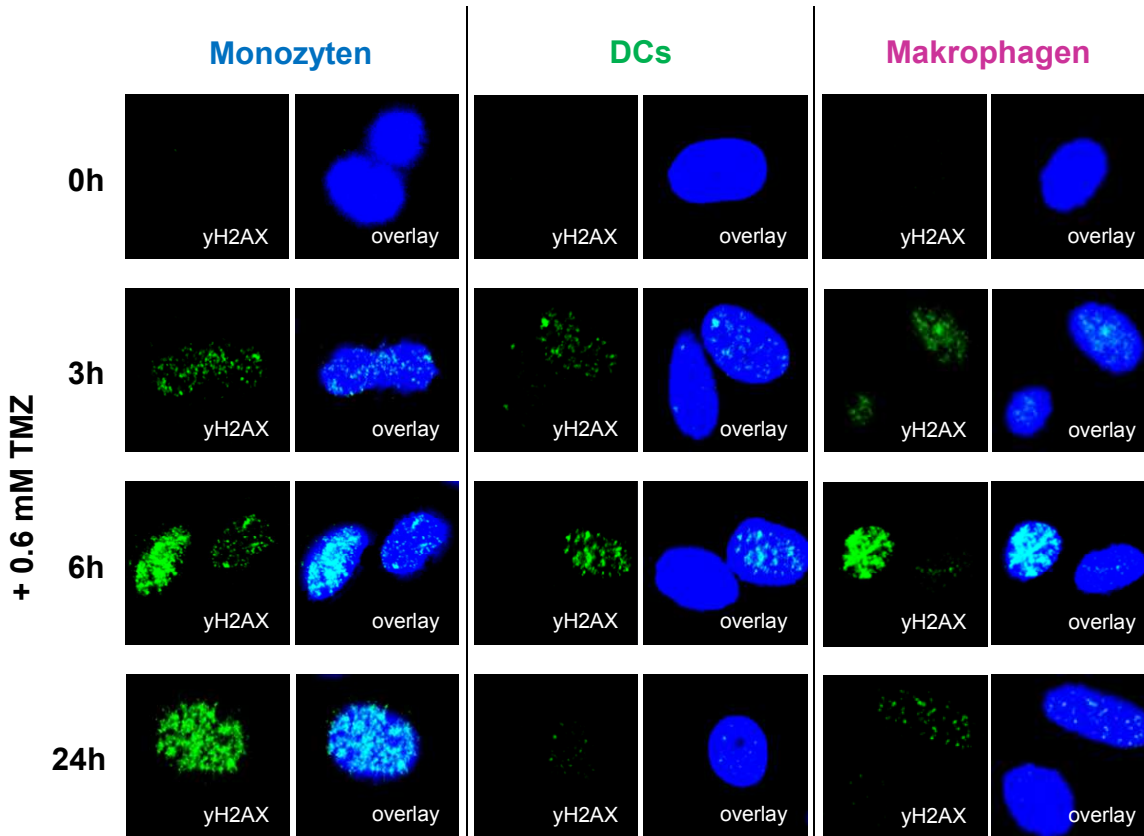


Abb. 3.44: γ H2AX in Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit Temozolomid. Repräsentative LSM-Aufnahmen der γ H2AX-Färbung von Monozyten, DCs und Makrophagen nach Behandlung mit 0,6 mM TMZ.

Dies zeigt, dass Temozolomid in allen drei Zelltypen DSBs induzierte und deren Reparatur in Monozyten langsamer erfolgte als in DCs und Makrophagen. Dies ist durch den bereits erwähnten Defekt der Monozyten in der DSB-Reparatur (siehe Kapitel 3.6) zu erklären.

3.8.5 DNA-Schadensantwort nach Temozolomid-Behandlung in Monozyten

Die Behandlung mit Temozolomid induziert in Monozyten im Vergleich zu DCs und Makrophagen vermehrt Apoptose (siehe 3.8.1), was darauf zurückzuführen ist, dass aufgrund des BER-Defekts eine höhere Menge an ESBs und auch DSBs in Monozyten fortbestehen. Zur Klärung der Frage, über welchen Signalweg Temozolomid Apoptose in

Monozyten induziert, wurde die Phosphorylierung der beiden PI3-Kinasen ATR und ATM, welche an ESBs bzw. DSBs binden und durch Phosphorylierung und Autophosphorylierung am Serin 428 bzw. am Serin 1981 aktiviert werden, untersucht. Die in Abb. 3.45 dargestellte Western Blot-Analyse zeigt, dass nach Behandlung mit 0,6 mM Temozolomid in Monozyten eine Phosphorylierung von ATR und ATM erfolgte (Abb. 3.45).



Abb. 3.45: Phosphorylierung der PI3-Kinasen ATM und ATR in Monozyten, DCs und Makrophagen nach Temozolomid-Behandlung. Expression der Proteine pATR_{Ser428} und pATM_{Ser1981} in Gesamtzellextrakten von Monozyten nach Behandlung mit 0,6 mM TMZ nach 0, 24 und 48 h mittels Western Blot. ERK2 diente als Ladekontrolle.

ATR und ATM aktivieren über Phosphorylierung p53, sowohl direkt als auch über die Aktivierung der Chk1 bzw. Chk2 Kinase (Harper and Elledge, 2007). Weitere Western Blot-Analysen in Monozyten zeigten eine Phosphorylierung der beiden Kinasen Chk1 und Chk2, sowie eine Akkumulation des p53 Proteins (Abb. 3.46).

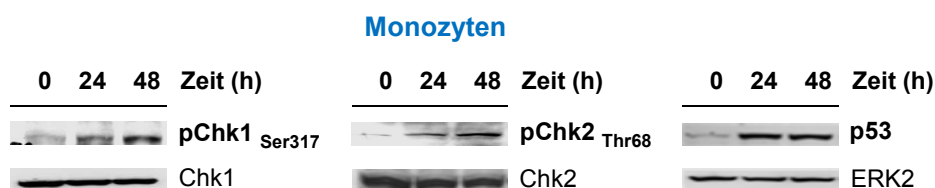


Abb. 3.46: DNA-Schadensantwort von Monozyten gegenüber Temozolomid. Expression der Proteine pChk1_{Ser317}, pChk2_{Thr68} und p53 in Gesamtzellextrakten von Monozyten nach Behandlung mit 0,6 mM TMZ nach 0, 24 und 48 h mittels Western Blot. Für p53 diente ERK2, für pChk1_{Ser317} und pChk2_{Thr68} deren unphosphorylierte Formen Chk1 bzw. Chk2 als Ladekontrolle. (Das dargestellte Experiment wurde unter Berücksichtigung meiner Vorarbeiten von Dr. Michael Goldstein durchgeführt).

Die Ergebnisse zeigen, dass nach Behandlung mit Temozolomid eine DNA-Schadensantwort in Monozyten über Aktivierung von ATR und ATM sowie der Kinasen

Chk1 und Chk2 erfolgte, was letztendlich in der Stabilisierung und Akkumulation von p53 resultierte.

3.8.6 Untersuchung des apoptotischen Signalwegs nach Temozolomid-Behandlung in Monozyten

In weitergehenden Untersuchungen sollte nun geklärt werden, welcher Signalweg in Monozyten nach Temozolomid-Behandlung durch die p53-Akkumulation aktiviert wird und zur Apoptose führt. Der FasR zählt zu den Genen, welche p53-abhängig transkribiert werden. Er gehört zur Gruppe der sogenannten Todesrezeptoren, welche den extrinsisch vermittelten Weg der Apoptose initiieren. Die Behandlung mit 0,6 mM Temozolomid führte in Monozyten zu einer Zunahme der *FASR*-mRNA (Abb. 3.47 A und B).

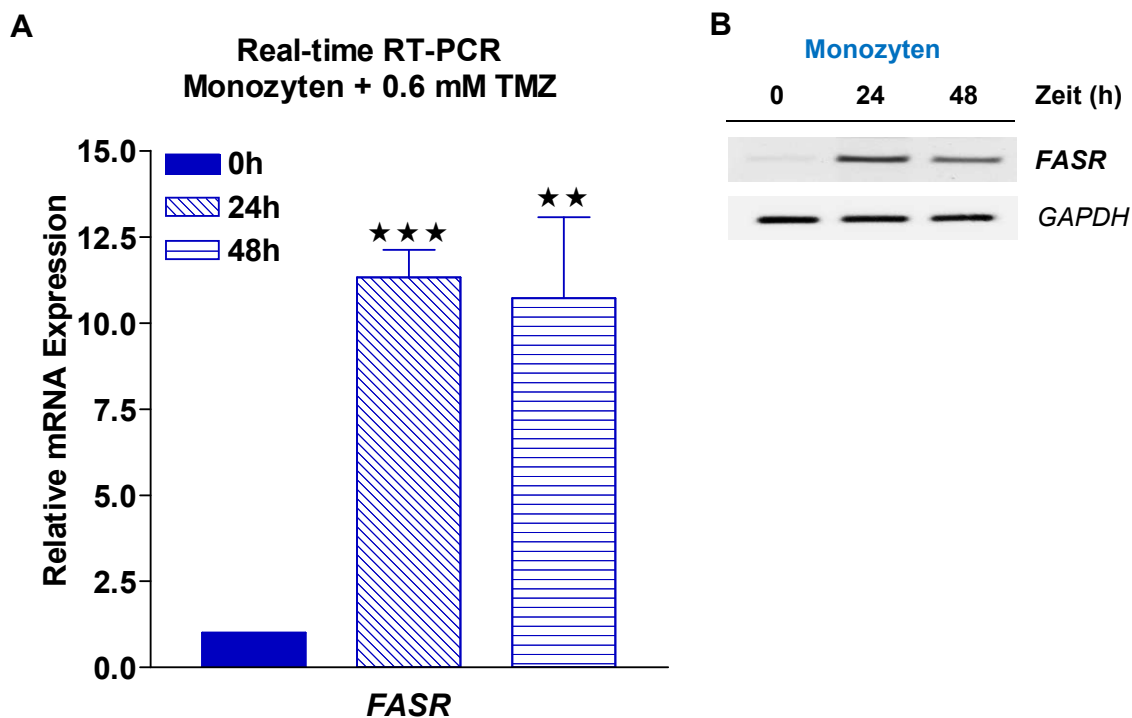


Abb. 3.47: Bestimmung der *FASR*-mRNA Menge in Monozyten nach Behandlung mit Temozolomid. (A) Semiquantitative Real-Time PCR der *FASR*-mRNA in Monozyten nach Behandlung mit 0,6 mM TMZ nach 0, 24 und 48 h. *ACTB*-PCR diene als Abgleich der eingesetzten RNA-Menge. ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$ zum Vergleich von unbehandelten Monozyten zu Monozyten 24 h und 48 h nach Behandlung mit TMZ. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten. (B) Semiquantitative Endpunkt-RT-PCR der *FASR*-mRNA in Monozyten nach Behandlung mit 0,6 mM TMZ nach 0, 24 und 48 h. *GAPDH*-PCR diene als Abgleich der eingesetzten RNA-Menge.

Nicht nur die Expression des Rezeptors, sondern auch die des Fas-Liganden (FasL) wurde verstärkt. Dies betraf sowohl die membranständige (mFasL) als auch die lösliche Form (sFasL) (Abb. 3.48).

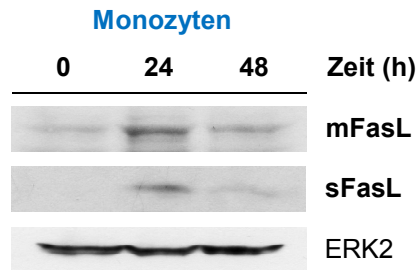


Abb. 3.48: Expression des FasL in Monozyten nach Behandlung mit Temozolomid. Proteinexpression des mFasL und sFasL in Monozyten 0, 24 und 48 h nach Behandlung mit 0,6 mM TMZ mittels Western Blot. ERK2 diente als Ladekontrolle.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Behandlung mit Temozolomid in Monozyten zu einer verstärkten Expression des FasR und FasL führte.

3.9 Vergleich von Monozyten mit Zelllinien myeloiden Ursprungs

Zur weiteren Charakterisierung der Reparaturdefekte in humanen Monozyten wäre es von Vorteil, eine Zelllinie zu finden, die einen vergleichbaren Phänotyp wie humane Monozyten hinsichtlich der DNA-Reparatur aufweist.

Daher wurden die Zelllinien Mono Mac 6 (MM6) und THP-1 (zwei akute myeloische Leukämie (AML) Zelllinien) und U937 (eine histiozytische Lymphomzelllinie) mit humanen Monozyten verglichen. AML ist eine maligne Erkrankung der Myelopoese, dem Teil des blutbildenden Systems, der für die Bildung von Granulozyten, Erythrozyten, Megakaryozyten und Monozyten verantwortlich ist. Histiozyten sind Makrophagen im Bindegewebe und der Tunica adventitia von Gefäßen. Sie gehören dem mononukleären Phagozytensystem (MPS) an und können, aktiviert durch Zytokine, zu Makrophagen differenzieren. Bei allen drei Zelllinien handelt es sich um monozytäre Suspensionszelllinien. Hinsichtlich ihrer Oberflächenmarkerexpression und Eigenschaften werden MM6- und THP-1-Zellen als Monozyten-ähnlich (Tsuchiya et al., 1980; Ziegler-Heitbrock et al., 1988) und U937-Zellen als Makrophagen- und Monozyten-ähnlich (Larrick et al., 1980; Hudig and Bajaj, 1982) beschrieben.

3.9.1 Expression der BER-Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 in MM6-, THP-1- und U937-Zellen

Bezüglich des BER- und ESB-R-Phänotyps humaner Monozyten ist die fehlende Expression der Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 charakteristisch (siehe 3.3.2). Daher sollte die Expression der oben genannten Proteine in MM6-, THP-1- und U937-Zellen mittels Western Blot-Analyse bestimmt und mit Monozyten und daraus abgeleiteten DCs und Makrophagen verglichen werden. Die in Abb. 3.49 dargestellten Western Blot-Analysen zeigen, dass in MM6-Zellen keine Expression der Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 nachweisbar war. THP-1-Zellen zeigten im Vergleich zu MM6-Zellen eine schwache Expression von XRCC1 und Ligase III α und eine zu humanen DCs und Makrophagen vergleichbare Expression von PARP-1. U937-Zellen exprimierten wie humane DCs und Makrophagen alle drei getesteten Reparaturproteine. Somit zeigten nur MM6-Zellen ein mit Monozyten vergleichbares Expressionsprofil der untersuchten BER-Proteine.

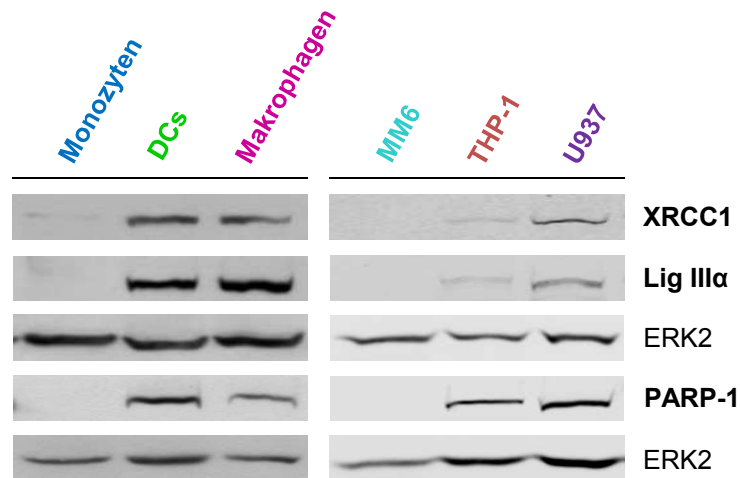


Abb. 3.49: Expression der BER-Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 in humanen monozytären Zelllinien. Expression der Proteine XRCC1, Lig III α und PARP-1 in humanen Monozyten, DCs und Makrophagen sowie den Zelllinien MM6, THP-1 und U937 mittels Western Blot. ERK2 diente jeweils als Ladekontrolle.

3.9.2 Sensitivität von MM6-, THP-1- und U937-Zellen gegenüber Alkylantien

3.9.2.1 Apoptoseinduktion in MM6-, THP-1- und U937-Zellen nach Behandlung mit Temozolomid

MM6-, THP-1- und U937-Zellen wurden mit 0,6 mM Temozolomid behandelt. Nach 48 h wurde die Sensitivität gegenüber Temozolomid durchflusszytometrisch mittels des SubG1-Assays bestimmt. Neben N-Alkylierungen zählt auch O⁶-MeG zu den durch Temozolomid induzierten toxischen Läsionen. Diese führt in proliferierenden Zellen zur Apoptoseinduktion nach Temozolomid-Gabe. Daher wurde zusätzlich die Methyltransferase-Aktivität des MGMT-Proteins durch Vorbehandlung mit O⁶BG spezifisch inhibiert. Abb. 3.50 zeigt, dass nach Behandlung mit 0,6 mM Temozolomid wiesen MM6- und THP-1-Zellen die höchste Sensitivität auf. Im Vergleich zu humanen Monozyten war die Sensitivität der MM6- und THP-1-Zellen etwa doppelt so hoch. Auch im Vergleich zu U937-Zellen war die Sensitivität der MM6- und THP-1-Zellen signifikant höher. Durch Inhibition von MGMT konnte die Apoptoseinduktion in allen drei Zelllinien um etwa 2 bis 3% gesteigert werden. Hingegen konnte in humanen Monozyten durch MGMT-Inhibition die Sensitivität der Zellen verdoppelt werden. Insgesamt war auch nach MGMT-Inhibition die induzierte SubG1-Population in MM6- und THP-1-Zellen signifikant größer als in U937-Zellen.

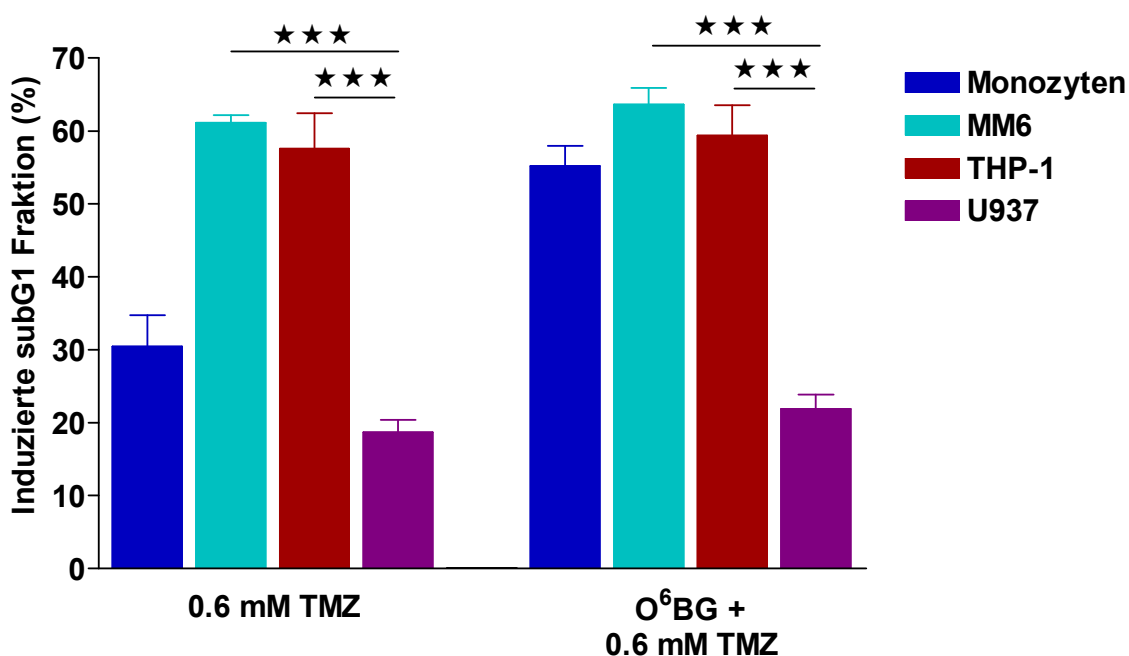


Abb. 3.50: Sensitivität von Monozyten, MM6-, THP-1- und U937-Zellen gegenüber Temozolomid. Quantifizierung apoptotischer SubG1-Zellen 48 h nach Behandlung mit 0,6 mM TMZ. Um MGMT zu inhibieren, wurden die Zellen 1 h vor TMZ-Gabe mit 10 μ M O⁶BG vorbehandelt. *** $p < 0.001$ zum Vergleich von MM6- und THP-1- zu U937-Zellen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

3.9.2.2 Apoptoseinduktion in MM6-, THP-1- und U937-Zellen nach Behandlung mit MMS

Zusätzlich zu Temozolomid sollte auch die Sensitivität der MM6-, THP-1- und U937-Zellen gegenüber MMS bestimmt werden. MMS gehört zu den S_N2 -Alkylantien, welche mehr N-Alkylierungen induzieren als S_N1 -Alkylantien wie Temozolomid. Die Reparatur der N-Alkylierungen erfolgt über die BER. Daher sollten Zellen mit einem Defekt in der BER gegenüber MMS sensitiv sein. Die Zellen wurden mit 0,4 mM MMS für 48 h behandelt. Anschließend wurde die durch MMS induzierte Apoptoserate durchflusszytometrisch durch das SubG1-Assay bestimmt. Wie in Abb. 3.51 dargestellt, zeigten MM6-Zellen die höchste Sensitivität gegenüber MMS. Mit 75% ist die durch MMS induzierte Apoptoserate mit der von primären Monozyten vergleichbar hoch. Die Sensitivität von THP-1-Zellen war mit knapp 65% etwas geringer. Jedoch zeigten sowohl MM6- als auch THP-1-Zellen eine signifikant höhere Apoptoseinduktion als U937-Zellen (etwa 60%) nach Behandlung mit MMS.

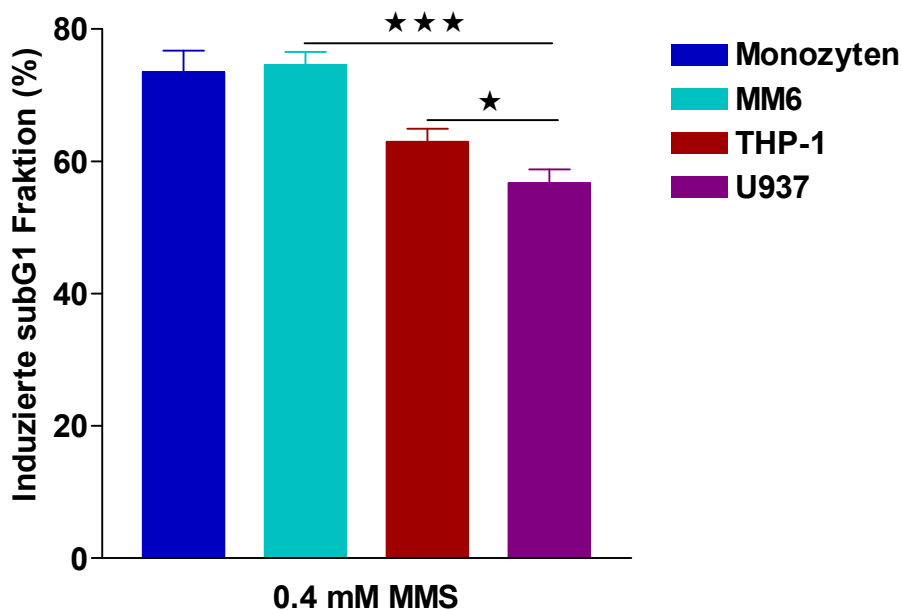


Abb. 3.51: Sensitivität von Monozyten, MM6-, THP-1- und U937-Zellen gegenüber MMS. Quantifizierung apoptotischer SubG1-Zellen 48 h nach Behandlung mit 0,4 mM MMS. * $p < 0.05$ und *** $p < 0.001$ zum Vergleich von MM6- und THP-1- zu U937-Zellen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test. Dargestellt ist der Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten.

3.9.3 Proteinexpression und Aktivität von MGMT in MM6-, THP-1- und U937-Zellen

Um zu überprüfen, ob MM6-, THP-1- und U937-Zellen wie primäre Monozyten MGMT-profizient sind, wurde die Expression des MGMT-Proteins und die Methyltransferase-Aktivität von MGMT der Zelllinien MM6, THP-1- und U937 bestimmt. Die Western Blot-Analyse in Abb 3.52 zeigt, dass MM6-, THP-1- und U937-Zellen das MGMT-Protein in einer zu Monozyten vergleichbaren Menge exprimierten.

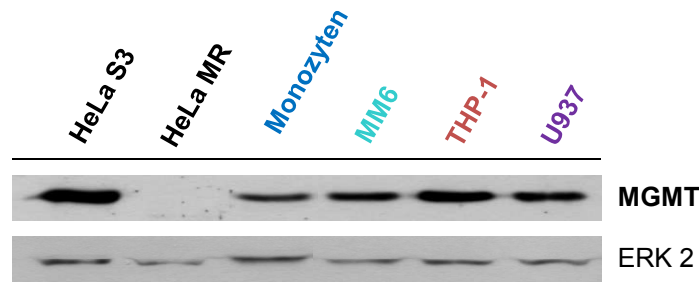


Abb. 3.52: Expression des MGMT-Proteins in MM6-, THP-1- und U937-Zellen. Expression des MGMT-Proteins in Gesamtzellextrakten von HeLa S3- (Positiv-Kontrolle), HeLa MR- (Negativ Kontrolle), Monozyten, MM6-, THP-1- und U937-Zellen mittels Western Blot. ERK2 diente als Ladekontrolle.

Im MGMT-Aktivitätstest betrug die durchschnittliche MGMT-Aktivität der MM6-Zellen 140 fmol/mg und der THP-1-Zellen 200 fmol/mg Protein (Abb. 3.54). U937-Zellen zeigten mit 250 fmol/mg Protein die höchste MGMT-Aktivität.

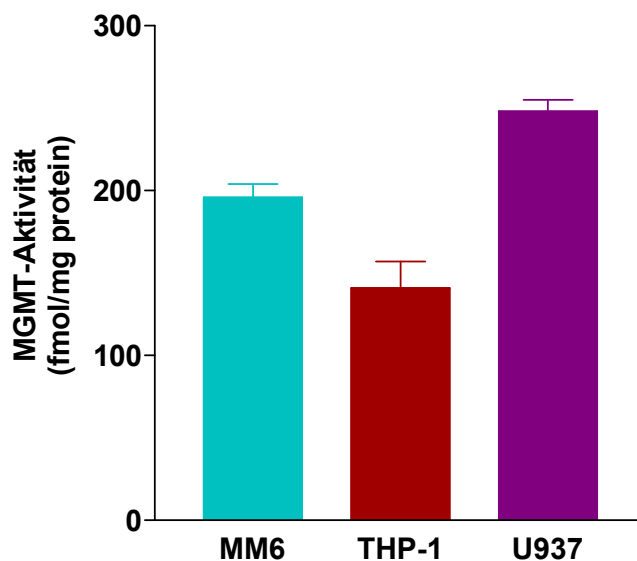


Abb. 3.53: MGMT-Aktivität von MM6-, THP-1- und U937-Zellen. Messung der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase-Aktivität mittels MGMT-Aktivitäts-Test in Gesamtzellextrakten von MM6-, THP-1- und U937-Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Zelllinien MM6, THP-1 und U937 wie humane Monozyten MGMT-profizient sind.

3.9.4 Expression von XRCC1, Ligase III α und PARP-1 in MM6-, THP-1- und U937-Zellen nach Behandlung mit IL-4 und GM-CSF

Während der Ausreifung von Monozyten zu DCs durch die Zytokine IL-4 und GM-CSF und zu Makrophagen durch das Zytokin GM-CSF erfolgte die Induktion der Proteinexpression von XRCC1, Ligase III α und PARP-1 (siehe 3.3.2). In Western Blot-Analysen sollte daher untersucht werden, ob eine Behandlung mit IL-4, GM-CSF oder IL-4 und GM-CSF gemeinsam die Expression dieser Reparaturproteine in MM6-, THP-1- und U937-Zellen beeinflusst.

Die in Abb. 3.54 dargestellte Western Blot-Analyse zeigt, dass in MM6-Zellen eine Induktion der drei genannten Proteine durch Behandlung mit IL-4 und mit IL-4 und GM-CSF gemeinsam erfolgte, wobei die Induktion durch gleichzeitige Behandlung mit beiden Zytokinen am stärksten war. Stimulation von MM6-Zellen mit GM-CSF allein resultierte in einer Zunahme der XRCC1 und PARP-1 Expression, jedoch nicht von Ligase III α (Abb. 3.54 A).

In THP-1-Zellen konnte die Expression der Proteine XRCC1 und Ligase III α sowohl durch IL-4 und GM-CSF allein, als auch durch IL-4 und GM-CSF gemeinsam verstärkt werden. Die Expression von PARP-1 blieb in THP-1-Zellen hingegen unverändert (Abb. 3.54 B).

U937-Zellen zeigten bereits ohne Stimulation eine Expression der untersuchten BER-Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1, vergleichbar zu ausgereiften DCs und Makrophagen. Die Expression wurde durch Stimulation mit IL-4 und GM-CSF nicht weiter beeinflusst und blieb unverändert (Abb. 3.54 C).

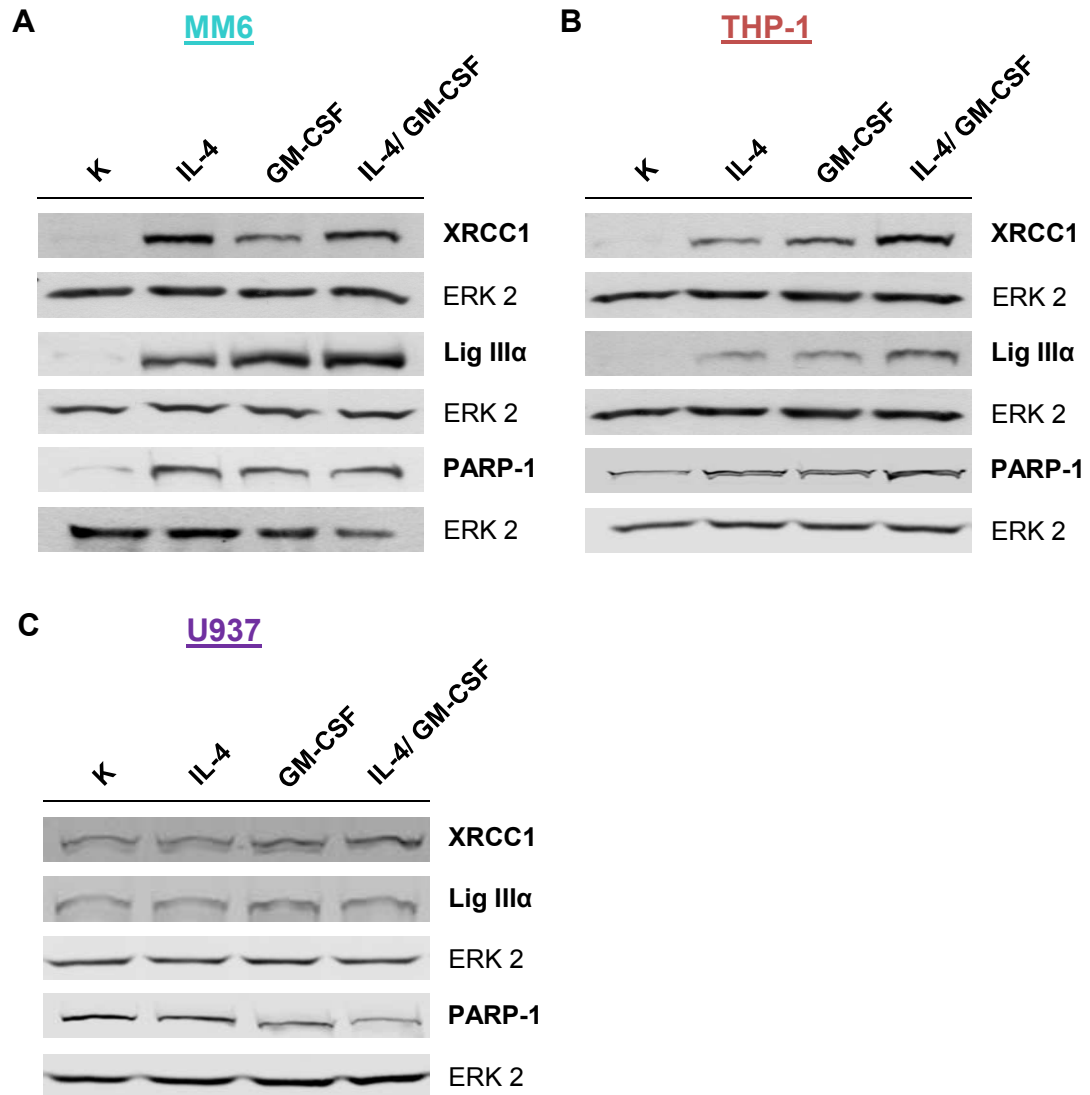


Abb. 3.54: Expression der BER-Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 in MM6-, THP-1- und U937-Zellen nach Behandlung mit IL-4 und GM-CSF. Expression der Proteine XRCC1, Lig III α und PARP-1 in Gesamtzellextrakten von MM6-, THP-1- und U937-Zellen vor und nach 48h Stimulation mit IL-4, GM-CSF sowie IL-4 und GM-CSF mittels Western Blot. Die Zellen wurden jeweils mit 1000 U/ml IL-4 und 800 U/ml GM-CSF für 2 Tage permanent behandelt. ERK2 diente jeweils als Ladekontrolle.

3.9.5 Einfluss von IL-4 und GM-CSF auf die Sensitivität von MM6-Zellen gegenüber Alkylantien

Durch Behandlung von MM6-Zellen mit IL-4 und GM-CSF über 2 Tage konnte die Expression der Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 induziert werden (Abb. 3.54 A). Diese Zunahme war vergleichbar mit der Zytokin-abhängigen Induktion dieser Proteine während der Differenzierung von Monozyten zu DCs oder Makrophagen. Monozyten wiesen im Vergleich zu DCs und Makrophagen eine höhere Sensitivität gegenüber Alkylantien auf (siehe Kapitel 3.8). Daher sollte untersucht werden, ob auch in MM6-

Zellen neben der Induktion der Reparaturproteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 die Sensitivität der Zellen gegenüber Alkylantien beeinflusst wird. Hierfür wurden MM6-Zellen und MM6-Zellen, welche für 2 Tage mit IL-4 und GM-CSF stimuliert wurden, mit 0,6 mM Temozolomid, 0,6 mM Temozolomid + O⁶BG oder 0,4 mM MMS behandelt und die Sensitivität durchflusszytometrisch durch das SubG1-Assay bestimmt (Abb. 3.54). Abb. 3.55 zeigt, dass die Stimulation mit IL-4 und GM-CSF gegenüber Temozolomid und MMS eine signifikante Abnahme der Sensitivität von MM6-Zellen bewirkte. Wurde jedoch MGMT durch Vorbehandlung mit O⁶BG inhibiert, so war eine signifikante Zunahme der Sensitivität nach Stimulation mit IL-4 und GM-CSF gegenüber Temozolomid zu erkennen.

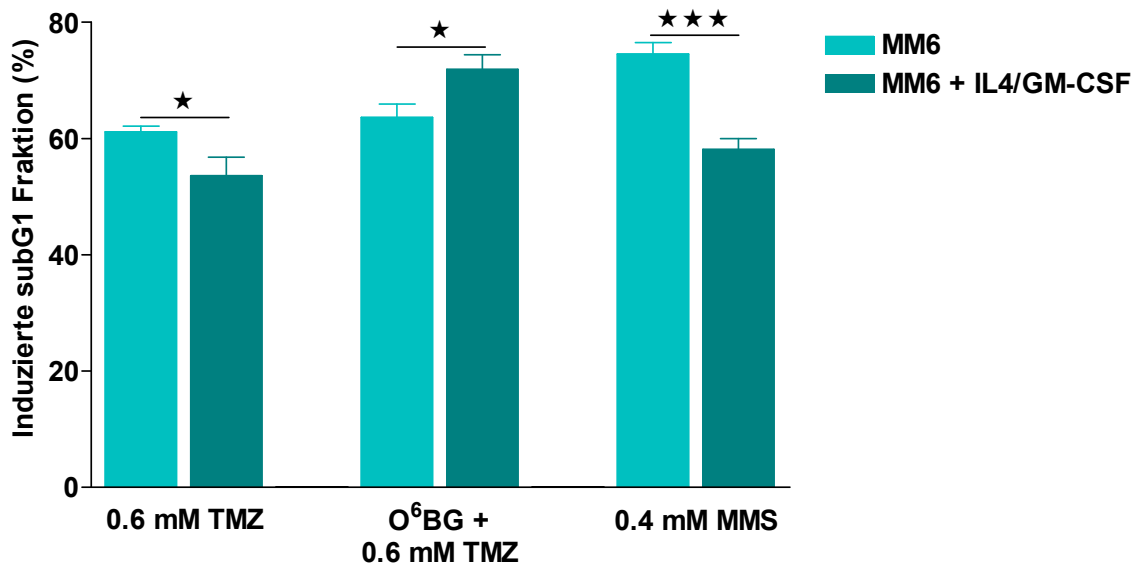


Abb. 3.55: Einfluss von IL-4 und GM-CSF auf die Sensitivität von MM6-Zellen gegenüber Alkylantien. Quantifizierung apoptotischer SubG1-Zellen 48 h nach Behandlung mit 0,6 mM TMZ und 0,4 mM MMS. Um MGMT zu inhibieren, wurden die Zellen 1 h vor TMZ-Gabe mit 10 μ M O⁶BG vorbehandelt. Dargestellt ist der Mittelwert von mindestens drei unabhängigen Experimenten. * $p < 0.05$ und *** $p < 0.001$ zum Vergleich von MM6-Zellen und mit IL-4 und GM-CSF-behandelten MM6-Zellen. Die Bestimmung erfolgte mittels T-Test.

3.9.6 Einfluss der Stimulation mit IL-4 und GM-CSF auf die MGMT-Aktivität von MM6-Zellen

Zusätzlich zur Sensitivität gegenüber Temozolomid und MMS sollte der Einfluss der Zytokinstimulation auf die MGMT-Aktivität der MM6-Zellen bestimmt werden. MGMT ist ein DNA-Reparaturprotein, dass für die Reparatur von O⁶-MeG verantwortlich ist, welches

in proliferierenden Zellen die durch Temozolomid induzierte Läsion mit der größten Toxizität darstellt (Roos et al., 2004).

Die in Abb. 3.56 dargestellte Messung der MGMT-Aktivität zeigt, dass nach Stimulation der MM6-Zellen mit IL-4 und GM-CSF keine signifikante Zunahme der MGMT-Aktivität erfolgte.

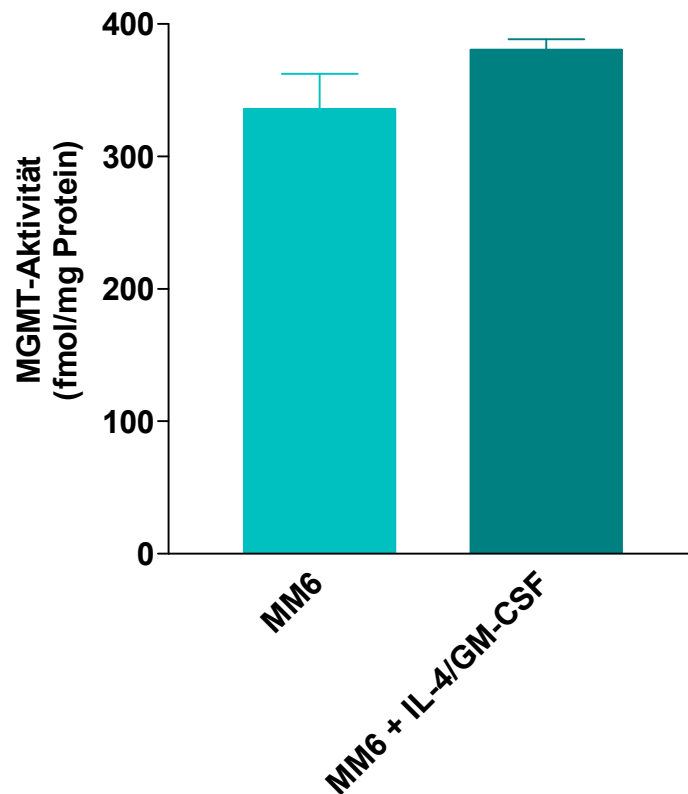


Abb. 3.56: Einfluss von IL-4 und GM-CSF auf die MGMT-Aktivität von MM6-Zellen. Messung der O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase Aktivität mittels MGMT-Aktivitäts-Test in Gesamtzellextrakten von MM6-Zellen vor und nach 48 h Stimulation mit IL-4 und GM-CSF. Dargestellt ist der Mittelwert von mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

3.9.7 Einfluss der Stimulation mit IL-4 und GM-CSF auf die BER-Kapazität von MM6-Zellen

Die Stimulation mit den Zytokinen IL-4 und GM-CSF führte in MM6-Zellen zur Induktion der BER-Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 (Abb. 3.54 A). Um herauszufinden, ob dies einen Einfluss auf die BER Kapazität der MM6-Zellen hat, wurde ein *in vitro* BER-Assay durchgeführt (schematische Darstellung des BER-Assays siehe Abb. 3.16). Das in Abb. 3.57 dargestellte Assay zeigt, dass MM6-Zellen wie auch mit IL-4 und GM-CSF vorbehandelte MM6-Zellen in der Lage waren eine AP-Stelle innerhalb 1 Stunde vollständig zu reparieren.

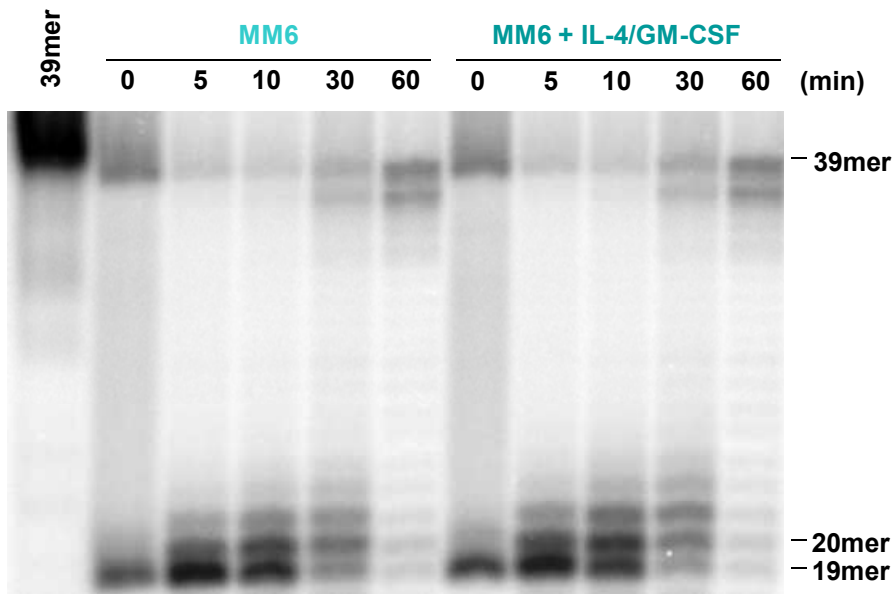


Abb. 3.57: Bestimmung der BER-Kapazität von MM6- und mit IL-4 und GM-CSF- behandelten MM6-Zellen mittels *in vitro* BER-Assay. 20% PAGE der Reaktionen von MM6 und für 2 d mit IL-4 und GM-CSF- vorbehandelten MM6-Zellen nach 0, 5, 10, 30 und 60 min Inkubation. Es wurde je 5 µg Gesamtproteinextrakt pro Reaktion eingesetzt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment.

Die Quantifizierung der 39 mer Bande (Abb. 3.57) verdeutlichte, dass die Spaltung der AP-Stelle und die Religation durch den XRCC1/Ligase III α -Komplex in einer vergleichbaren Geschwindigkeit erfolgte (Abb. 3.58).

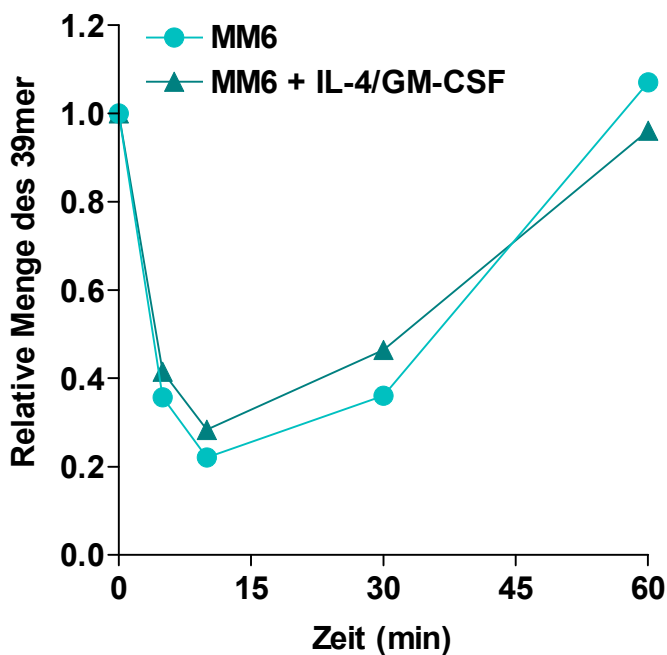


Abb. 3.58: Bestimmung der Spaltung und Religation der AP-Stelle von MM6- und mit IL-4 und GM-CSF-behandelten MM6-Zellen. Relative Menge der 39 mer Bande aus Abb 3.58 nach 0, 5, 10, 30 und 60 min Inkubation. Kontrolle (0 min) wurde jeweils gleich 1 gesetzt.

4 Diskussion

Monozyten sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen unspezifischen Immunsystems. Sie entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark. Nach Ausreifung gehen sie in die Blutbahn über und zirkulieren dort für wenige Tage. Bei Kontakt mit Infektionen wandern sie in das betroffene Gewebe ein und differenzieren zu Makrophagen und myeloiden DCs (Hume, 2006). Die Stimulation der Immunantwort durch DCs erfolgt über Aktivierung von T-Zellen durch Antigenpräsentation (Ueno et al., 2010). Aktivierte T-Zellen können wiederum Makrophagen aktivieren (Enk et al., 1997). Makrophagen phagozytieren Mikroorganismen und andere körperfremde Strukturen und produzieren zur Abtötung dieser Pathogene ROS (Durackova, 2009). ROS werden dabei intrazellulär freigesetzt und auch nach außen an das umgebende Gewebe abgegeben. Im Fall von chronischen Entzündungen oder Infekten kann dies zu einer explosionsartigen Freisetzung freier Radikale führen, was als ‚*Oxidative Burst*‘ bezeichnet wird. Haben Gewebezellen kein ausreichendes antioxidatives Schutzsystem, können die freigesetzten ROS deren DNA und andere Zellbestandteile dermaßen schädigen, dass diese ihre Funktionen nicht mehr erfüllen können oder sogar zu Krebszellen werden. Letztendlich können Gewebe oder Organe degenerieren, woraus schwerwiegende Erkrankungen wie Rheumatoide Arthritis, Psoriasis (Schuppenflechte), chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen (*engl. inflammatory bowel disease*), neurodegenerative Störungen wie Parkinson und Alzheimer sowie Atherosklerose resultieren (Durackova, 2009; Valledor et al., 2010). Dies zeigt, dass die Generierung von ROS durch das myeloide Monozyt/Makrophage/DC-System einer feinabgestimmten Regulation unterliegen muss, um Schädigungen des Organismus durch übermäßige ROS-Produktion zu vermeiden. Wie diese Regulation erfolgt ist bislang unklar.

Immunsuppression gehört zu den unerwünschten Nebenwirkungen einer Chemotherapie, was ein hohes Risiko für Krebspatienten bedeutet, die eine Chemotherapie erhalten. Generell wird die hohe Proliferationsrate der Immunzellen für deren hohe Sensitivität gegenüber Genotoxinen, die in der Chemotherapie verwendet werden, verantwortlich gemacht. Erstaunlicherweise wurde dabei bisher die Toxizität der Chemotherapeutika gegenüber ausdifferenzierten, nicht-proliferierenden Immunzellen nur geringfügig beachtet.

4.1 Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber oxidativem Stress

Kommt es zu einer Überlastung des antioxidativen Schutzsystems einer Zelle oder werden vermehrt ROS gebildet, so entsteht oxidativer Stress. Biologische Konsequenzen des oxidativen Stresses sind neben Lipidperoxidation und Proteinoxidation die Schädigung der DNA. Zu den durch ROS induzierten DNA-Schäden zählen ESBs und DSBs, oxidierte Basen, AP-Stellen, DNA-DNA- und DNA-Protein-Quervernetzungen (Halliwell and Aruoma, 1991; Epe, 1996; Marnett, 2000).

4.1.1 Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber *tert*-BOOH

Um die Konsequenzen von ROS-induzierten DNA-Schäden auf die Sensitivität menschlicher Monozyten und daraus abgeleiteten DCs und Makrophagen zu untersuchen, wurden die Zellen mit *tert*-BOOH behandelt. Dies ist ein Agens, das *in vitro* zur Generierung von ROS führt. Auch wurde H₂O₂ als Agens zur experimentellen Induktion von ROS getestet. Allerdings zeigten die Ergebnisse der Sensitivitätsmessung eine hohe Variabilität, wobei Monozyten die höchste Sensitivität gegenüber H₂O₂ zeigten. In der vorliegenden Arbeit wurde eine starke Zunahme der SubG1-Fraktion bzw. Fragmentierung der DNA, ein charakteristisches Merkmal der Apoptose, nach Behandlung mit *tert*-BOOH in Monozyten beobachtet. Diese war signifikant höher als in DCs und Makrophagen, in denen nach *tert*-BOOH-Behandlung keine Induktion der SubG1-Fraktion nachgewiesen wurde. Die Bestimmung der Apoptose-/Nekrose-Frequenz zeigte zusätzlich, dass in Monozyten die Apoptosefraktion überwiegt. Der Anteil von Nekrose an der Gesamttoxizität von *tert*-BOOH betrug lediglich 20%. Insgesamt war die Apoptose- und auch Nekroserate in Monozyten im Vergleich zu DCs und Makrophagen signifikant größer.

Obwohl DCs und Makrophagen keine toxischen Wirkungen nach Behandlung mit *tert*-BOOH zeigten, ist dies nicht auf ein vermindertes antioxidatives Schutzsystem der Monozyten zurückzuführen. Wäre dies der Fall, so würde in Monozyten eine höhere Menge von ROS induziert werden. Eine Quantifizierung der durch *tert*-BOOH induzierten ROS-Menge zeigte jedoch, dass sowohl in Monozyten als auch in DCs und Makrophagen eine signifikante Induktion von ROS erfolgt. Die relative Zunahme von ROS war sogar in DCs und Makrophagen größer als in Monozyten. Auch die Menge der dominierenden oxidativen DNA-Läsion 8-oxoG ist nach *tert*-BOOH-Behandlung in Monozyten, DCs und Makrophagen vergleichbar hoch (Bauer et al., 2011). Dies zeigt, dass die Primärschädigung an der DNA in allen drei Zelltypen vergleichbar ist. Unterschiede waren

jedoch in der Menge der induzierten ESBs zu beobachten. ESBs werden einerseits direkt durch ROS generiert, andererseits können ESBs auch als Reparatur-Intermediate während der BER, die unter anderem oxidative Basenmodifikationen wie 8-oxoG prozessiert, entstehen. Monozyten zeigten einen rapiden Anstieg von ESBs unmittelbar nach *tert*-BOOH-Gabe. Der Anstieg in DCs und Makrophagen war deutlich langsamer. Auch war die induzierte ESB-Menge in DCs und Makrophagen innerhalb der ersten 60 min nach Behandlung signifikant geringer als in Monozyten. Dies sowie die schnellere Abnahme der generierten ESBs spricht für eine deutlich bessere Reparatur der ESBs in DCs und Makrophagen. Monozyten scheinen im Vergleich dazu nicht in der Lage, die durch *tert*-BOOH generierten ESBs reparieren zu können.

Neben ESBs gehören auch DSBs zu den durch ROS induzierten DNA-Läsionen. Diese sind für eukaryotische Zellen besonders toxische DNA-Läsionen, die durch Genotoxine induziert und Replikations-abhängig gebildet werden (Roos and Kaina, 2006). Nicht-repariert führen DSBs zu chromosomalen Aberrationen und Zelltod (O'Driscoll and Jeggo, 2006). Bei Bestimmung der SubG1-Fraktion konnte bereits gezeigt werden, dass Monozyten und daraus abgeleitete DCs und Makrophagen in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert sind und somit nicht proliferieren. *tert*-BOOH induzierte sowohl in Monozyten als auch in DCs und Makrophagen vermehrt DSBs direkt nach Gabe von *tert*-BOOH. Der Anstieg war in Monozyten am stärksten und die DSB-Menge am höchsten, jedoch waren die Unterschiede innerhalb der ersten 60 min im Vergleich zu DCs und Makrophagen nicht signifikant. Signifikante Unterschiede waren in der residualen Menge der induzierten DSBs zu beobachten. Nach 240 min waren signifikant mehr DSBs in Monozyten vorhanden als in DCs und Makrophagen. Dies deutet darauf hin, dass auch die induzierten DSBs von Monozyten nicht prozessiert werden können. Demgegenüber nahm die Menge der induzierten DSBs in DCs und Makrophagen etwa 2 h nach Behandlung wieder deutlich ab, was für eine Reparatur der DSBs spricht. DSBs können nicht nur während der Replikation, sondern auch durch Überlagerung von zwei in nächster Umgebung entstandenen ESBs entstehen. Dies erfolgt bei einer hohen Anzahl von ESBs, wie sie möglicherweise in Monozyten nach *tert*-BOOH-Behandlung induziert werden.

Die Bildung von γ H2AX gehört zu den frühen Ereignissen nach Schädigung der DNA und ist ein häufig verwendeter Marker für DSBs (Ismail and Hendzel, 2008). Dabei repräsentiert ein γ H2AX-Focus einen im Genom gebildeten DSB (Sedelnikova et al., 2002). Die Phosphorylierung des Histons H2AX am Ser139 erfolgt durch die schadensabhängigen Proteinkinasen ATM, ATR und DNA-PK (Ismail and Hendzel, 2008). Die PI3-Kinasen ATM und ATR werden durch Phosphorylierung als auch über

Autophosphorylierung am Serin 428 bzw. am Serin 1981 aktiviert. Durch ATR/ATM werden die abwärts agierenden Stresskinasen Chk1 und Chk2 phosphoryliert. Diese beeinflussen einerseits den Zellzyklus in replizierenden Zellen, andererseits führen sie über Phosphorylierung von p53 und dessen Inhibitors MDM2 zur Akkumulation von p53 in der Zelle, wobei p53 auch direkt durch ATM und ATR phosphoryliert werden kann. In dieser Arbeit konnte mittels Immunfluoreszenz 1 h nach Behandlung mit *tert*-BOOH γ H2AX in Monozyten nachgewiesen werden. Demgegenüber konnte in DCs kein und in Makrophagen ein vergleichsweise schwaches Signal detektiert werden. Zusätzlich konnte in Monozyten gezeigt werden, dass nach Behandlung mit *tert*-BOOH eine DNA-Schadensantwort über ATR-Chk1 und über ATM-Chk2 sowie eine Akkumulation von p53 erfolgt. Hierbei ist zu erwähnen, dass eine Aktivierung von ATM und ATR bereits 1 h nach *tert*-BOOH-Behandlung zu beobachten war, was im Einklang mit der schnellen Entstehung der ESBs und DSBs innerhalb der ersten fünf Minuten nach *tert*-BOOH-Gabe ist. Western Blot-Analysen zeigten, dass zusätzlich zur fehlenden Phosphorylierung des Histons H2AX *tert*-BOOH keine Phosphorylierung der beiden schadensabhängigen Kinasen ATM und ATR in DCs und Makrophagen bewirkte. Auch konnte keine Aktivierung der Stresskinasen Chk1 und Chk2 und keine Akkumulation von p53 in DCs und Makrophagen beobachtet werden. Dies bekräftigt die Schlussfolgerung, dass DCs und Makrophagen in der Lage sind, die induzierten ESBs und DSBs zu prozessieren. Diese Prozessierung erfolgt, bevor es zu einer DNA-Schadensantwort kommt, was die geringe Apoptoserate der Zellen nach Behandlung mit *tert*-BOOH erklärt.

Wie bereits erwähnt, ist der durch *tert*-BOOH induzierte Zelltod in Monozyten hauptsächlich auf Apoptose zurückzuführen. p53, welches durch ATM/ATR aktiviert wird und in Monozyten nach *tert*-BOOH-Behandlung akkumuliert vorliegt, fungiert überwiegend als Transkriptionsfaktor und reguliert die Expression von Genen, die an der Zellzyklusregulation, DNA-Reparatur und Apoptose beteiligt sind (Lavin and Gueven, 2006). Zu den p53-abhängigen Genen zählt unter anderem der FasR (Müller et al., 1998). Die Beteiligung des FasR an der durch *tert*-BOOH induzierten Apoptose in Monozyten konnte in der vorliegenden Arbeit einerseits durch Zunahme der *FASR-mRNA* nach *tert*-BOOH-Behandlung in Monozyten gezeigt werden. Andererseits bestätigen Inhibitorexperimente die Beteiligung des FasR an der *tert*-BOOH-vermittelten Apoptose in Monozyten (Bauer et al., 2011). Bei der rezeptorvermittelten Apoptose erfolgt nach der Expressionssteigerung des FasR und des FasL eine Aktivierung von Caspasen, welche letztendlich CAD (*engl. caspase activated DNase*) aktivieren, dass die DNA fragmentiert und zum Tod der Zelle führt (Srinivasula et al., 1996). Mithilfe eines globalen Caspaseinhibitors wurde gezeigt, dass die *tert*-BOOH-induzierte Apoptose in Monozyten

Caspasen-abhängig verläuft (Bauer et al., 2011). Die Aktivierung von Caspasen stellt somit einen essentiellen Prozess in der Exekution der Apoptose nach Behandlung mit *tert*-BOOH dar. Caspase-8 ist als die Initiatorcaspase des rezeptorvermittelten Wegs der Apoptose beschrieben (Muzio et al., 1996; Muzio et al., 1998). Die aktive Caspase-8 aktiviert ihrerseits die Effektorcaspasen-3 und -7, was die Degradationsphase der Apoptose einleitet (Srinivasula et al., 1996; Muzio et al., 1997). Die aktive Caspase-8 verbindet auch den extrinsischen mit dem intrinsischen Apoptoseweg. Caspase-8 spaltet Bid in die verkürzte Form tBid und aktiviert so Bax (Chou et al., 1999). Aktiviertes Bax führt zur Spaltung von Caspase-9 und letztendlich zur Aktivierung der Effektorcaspasen-3, -6 und -7. In Monozyten konnten sowohl Spaltprodukte der Initiatorcaspasen-8 und -9 sowie der Effektorcaspasen-3 und 7 nachgewiesen werden. Die Spaltung der Initiatorcaspase-9 lässt eine Beteiligung des intrinsischen mitochondrialen Weges vermuten. Jedoch ist unklar ob dies direkt über *tert*-BOOH erfolgt oder über die aktive Caspase-8, tBid und Bax.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Monozyten eine hohe Sensitivität gegenüber oxidativem Stress aufweisen. Dies ist auf eine erhöhte ESB-Rate zurückzuführen. Diese hohe Menge an ESBs führt zur Entstehung von DSBs, welche zur Aktivierung der DNA-Schadensantwort über ATR-Chk1 als auch über ATM-Chk2 sowie zur Akkumulation von p53 führt. p53 bewirkt die Hochregulation des FasR und die Initiation der Apoptose über den extrinsischen rezeptorvermittelten Weg. Im Vergleich zu Monozyten sind daraus abgeleitete DCs und Makrophagen nicht sensitiv gegenüber oxidativem Stress. Dies beruht jedoch nicht auf einem besseren antioxidativem Schutzsystem der Zellen, sondern auf der Fähigkeit, die durch ROS induzierten DNA-Schäden prozessieren zu können.

4.1.2 Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber endogen gebildetem ROS

Ein bedeutender patho-physiologischer Auslöser von ROS stellt die oxidierte Form des LDLs dar (oxLDL), welches laut der ‚*lipoprotein-induced atherosclerosis*‘-Hypothese zur Entstehung von Atherosklerose beiträgt (Goldstein and Brown, 1977a; Goldstein and Brown, 1977b). oxLDL hat eine chemotaktische Wirkung auf im Blut zirkulierende Monozyten. Dabei wird sowohl die Adhärenz am Endothel als auch die anschließende Penetration der Monozyten in den subendothelialen Raum gefördert (Erl et al., 1998; Ang et al., 2011). Dort differenzieren Monozyten zu Makrophagen. Makrophagen erkennen in gleicher Weise wie Monozyten und DCs das oxLDL über einen ‚*Scavenger*‘-Rezeptor

(Zingg et al., 2000). Es kommt zur unkontrollierten Aufnahme von oxLDL und zur Entwicklung von Makrophagen zu mit LDL übersättigten Schaumzellen (Hofnagel et al., 2007). Sterben die Schaumzellen, so wird erneut LDL-Cholesterin freigesetzt und es kommt zur erneuten Rekrutierung von Monozyten bzw. Makrophagen zum Ort der Entzündung. Dies verursacht eine vermehrte Bildung von Schaumzellen, was letztlich zur Entstehung atherosklerotischer Plaques führt. Die Gefäße verhärten und verdicken, begleitet von Elastizitätsverlust und Verengung.

Nach Aufnahme von oxLDL kommt es in der Zelle zur Induktion von ROS (Hsieh et al., 2001). oxLDL führt in Monozyten und Makrophagen zur Induktion der NADPH Oxidase Nox4, welche als primäre Quelle von ROS angesehen wird und in Makrophagen zur Bildung von H₂O₂ führt (Lee et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass oxLDL eine höhere Apoptose in Monozyten im Vergleich zu Makrophagen induziert (Ermak et al., 2008). Im Rahmen dieser Arbeit zeigte die Bestimmung der Apoptoserate, dass oxLDL in Monozyten Apoptose induziert. Diese war signifikant höher als in DCs und Makrophagen. Dies zeigt, dass menschliche Monozyten auch gegenüber einem patho-physiologischem Agens wie oxLDL sensitiv sind. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass aus Monozyten abgeleitete Makrophagen und DCs deutlich resistenter sind als Monozyten. Die in Monozyten signifikant höhere ESB-Rate bestätigte erneut die Beteiligung des Defekts in BER und ESB nach Induktion von ROS an der Apoptoseinduktion in Monozyten. Dies lässt auch vermuten, dass die beobachteten Reparaturdefekte in Monozyten einen Einfluss auf die Regulation der Entstehung von Atherosklerose haben. Die dadurch bedingte hohe Sensitivität der Monozyten gegenüber oxLDL führt zum Absterben der Monozyten im Blut mit hohen oxLDL Konzentrationen, was die Rekrutierung weiterer Makrophagen zu atherosklerotischen Plaques verhindert und somit der Bildung weiterer Schaumzellen entgegenwirkt.

4.2 BER-Kapazität humaner Monozyten und *in vitro* daraus abgeleiteter DCs und Makrophagen

Zytokine spielen in vielen zellulären Prozessen wie der Zellproliferation und –differenzierung, in der Immunantwort, im entzündlichen Geschehen und in der Tumorgenese eine wichtige Rolle. Auch sind Zytokine in der Lage, Einfluss auf den Resistenzstatus von Tumorzellen zu nehmen (Frassanito et al., 2001). Dies lässt auf eine Wirkung von Zytokinen als Modulatoren der DNA-Reparatur und der durch DNA-Schäden

induzierten Apoptose schließen. Es wurde gezeigt, dass Zytokine wie IL-1 α , TNF- α , IL-6 und IL-12 für die DNA-Reparatur und somit das Überleben der Zelle von Bedeutung sind. In humanen Ovarialkarzinomzellen inhibiert IL-1 α die Reparatur von Cisplatin-induzierten DNA-Schäden (Benchekroun et al., 1993; Benchekroun et al., 1995). Dies erfolgt über Inhibierung der Cisplatin vermittelten Induktion von ERCC1, einen bedeutenden Faktor der NER (Li et al., 1998a; Li et al., 1998b). IL-6 moduliert die Bindung von KU-Proteinen an die DNA in Lymphozyten nach Bestrahlung und könnte so zu einer Zunahme der DNA-Reparatur sowie Resistenz der Zellen gegenüber IR beitragen (Frasca et al., 2000). IL-12 spielt eine Rolle in der Vermeidung von Photokarzinogenese, indem es die Reparatur UV-induzierter Läsionen fördert (Katiyar, 2007; Meeran et al., 2008). Desweiteren scheint auch der Differenzierungsstatus der Zelle einen Einfluß auf deren Reparaturkapazität zu haben. Es wird angenommen, dass die DNA-Reparatur in terminal differenzierten Zellen vermindert ist, da diese nicht proliferieren und somit replikationsabhängige Reparaturwege wie die HR nicht nutzen können. Auch die NER ist in ausdifferenzierten Zellen gehemmt, wobei transkribierte Gene weiterhin repariert werden (Nospikel, 2007). Ein Vergleich der BER-Kapazität von proliferierenden Maus-Myoblasten und deren ausdifferenzierten nicht-proliferierenden Pendant, den Myotuben, zeigte, dass während der Differenzierung sowohl die ‚*long-patch*‘ als auch die ‚*short-patch*‘ BER-Kapazität dramatisch abnimmt (Narciso et al., 2007). Dies wird durch die in Myotuben fehlende Expression von Ligase I und die während der Differenzierung abnehmende Expression von XRCC1 und darauffolgender Destabilisation von Ligase III α erklärt. Während der *in vitro* Differenzierung von humanen Monozyten zu iDCs und mDCs konnte eine Abnahme der Sensitivität gegenüber alkylierenden Agenzien beobachtet werden (Briegert and Kaina, 2007). Dies wurde auf die fehlende Expression von XRCC1 und Ligase III α in Monozyten zurückgeführt, deren Expression während der Differenzierung zu iDCs verstärkt wurde.

Durch ROS induzierte oxidative Basenmodifikationen wie 8-oxoG sowie ESBs und AP-Stellen werden über Proteine der BER erkannt und entfernt. Somit lässt die durch oxidativen Stress induzierte hohe ESB-Rate in Monozyten wie auch der Befund der fehlenden Expression der BER-Proteine XRCC1 und Ligase III α in Monozyten (Briegert and Kaina, 2007) einen Defekt in der BER in menschlichen Monozyten vermuten.

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit ein Zellsystem verwendet bei dem Zytokine die Ausreifung von Monozyten zu unreifen myeloiden DCs und Makrophagen induziert. Dies erfolgt durch die Zytokine IL-4 und GM-CSF. In einem *in vitro* BER-Assay wurde die Fähigkeit zur Prozessierung einer AP-Stelle in humanen Monozyten und daraus abgeleiteten DCs und Makrophagen untersucht. Zusätzlich wurde

auch die BER-Kapazität von CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen, den Vorläuferzellen der Monozyten, bestimmt. Dies ist besonders interessant, da CD34⁺ Stammzellen die Vorläuferzellen aller Leukozyten sind. Die im Oligonukleotid enthaltene AP-Stelle wird bevorzugt über die ‚*short-patch*‘ BER repariert, bei der nur ein Nukleotid ausgetauscht wird. Sie stellt die häufigste Form der BER dar. Beispielsweise wird auch die oxidative DNA-Läsion 8-oxoG vorwiegend über die ‚*short-patch*‘ BER repariert (Fortini and Dogliotti, 2007). In Monozyten erfolgte wie auch in DCs, Makrophagen und CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen sowohl der Einschnitt an der AP-Stelle durch die APE als auch das Anfügen eines Nukleotids durch die Pol β . Jedoch waren Monozyten im Gegensatz zu DCs, Makrophagen und CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen nicht fähig den entstandenen ESBs zu religieren, was enzymatisch durch den XRCC1/Ligase III α -Komplex erfolgt. Ein *in vitro* Ligationsassay bestätigte den in Monozyten beobachteten Ligationsdefekt (Bauer et al., 2011).

Expressionsanalysen verschiedener BER-Proteine zeigten, dass Monozyten, DCs und Makrophagen die BER-Proteine APE, MPG, Pol β , Fen-1 und PCNA exprimieren. Diese Proteine spielen bei der Basenentfernung, dem Einschnitt an der apurinen DNA-Stelle, der Verdrängung des dRP-Restes, dem Einbau eines neuen Nukleotides und der ‚*long-patch*‘ BER eine Rolle (Christmann et al., 2003). Die Glykosylase OGG1, die 8-oxoG prozessiert, ist in Monozyten exprimiert, wobei ein vergleichsweise stärkeres Signal in DCs und Makrophagen detektiert wurde. Dies lässt vermuten, dass DCs und Makrophagen den oxidativen DNA-Schaden 8-oxoG besser reparieren können als Monozyten, was jedoch durch den *in vitro* OGG1-Aktivitäts-Assay nicht bestätigt wurde. In diesem *in vitro* Reparaturassay wurde eine vergleichsweise höhere Spaltungsaktivität von 8-oxoG in Monozyten gemessen als in DCs und Makrophagen. Ligase I, die an der ‚*long-patch*‘ BER beteiligt und für die Verknüpfung der Okazaki-Fragmente während der Replikation zuständig ist, konnte in Monozyten nicht und in DCs und Makrophagen nur schwer detektiert werden. Dies ist wohl auf die Arretierung in der G1-Phase des Zellzyklus und die fehlende Proliferation von Monozyten, DCs und Makrophagen zurückzuführen. Eine fehlende Expression konnte für die BER-Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 in Monozyten gezeigt werden. Daraus abgeleitete DCs, Makrophagen wie auch die Vorläufer CD34⁺ hämatopoetische Stammzellen exprimieren diese Proteine. XRCC1 ist für die Koordination der BER/ESBR von großer Bedeutung. Es agiert als Gerüstprotein und beeinflusst über Protein-Protein-Interaktionen die Aktivität weiterer BER-Proteine. So stabilisiert es das Ligase III α Protein über Protein-Protein-Interaktion (Caldecott et al., 1994). Der XRCC1-Ligase III α -Komplex ist, wie bereits erwähnt, für die Ligation des während der ‚*short-patch*‘ BER entstandenen ESBs verantwortlich. Weitere

Interaktionspartner von XRCC1 sind neben APE, Pol β und PCNA, auch PARP-1 (Caldecott et al., 1996). Neben Basenmodifikationen werden auch ESBs über die BER repariert. PARP-1 bindet an ESBs und initiiert deren Reparatur über Rekrutierung des XRCC1-Ligase III α -Komplexes an den ESB (Leppard et al., 2003). In PCR-Analysen konnte gezeigt werden, dass in Monozyten lediglich das *XRCC1* und das *PARP-1* Gen herunterreguliert ist, nicht jedoch *LIGIII α* . Die fehlende Expression von Ligase III α ist somit auf die fehlende Interaktion mit XRCC1 und damit auf die Instabilität des Proteins zurückzuführen. Dies deutet eine spezifische Herabregulation der *XRCC1*- und *PARP-1*-mRNA während der myeloiden Differenzierung in ausgereiften Monozyten an, was die fehlende Ligationsfähigkeit der Monozyten während der BER/ESBR und somit die hohe ESB-Rate in Monozyten nach *tert*-BOOH-Behandlung erklärt.

Die Regulation der Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 erfolgt im vorliegenden Zellsystem über Zytokine und ist unabhängig von der DNA-Replikation, da Monozyten, DCs und Makrophagen nicht proliferieren. Dies unterscheidet die vorliegende Arbeit von der Untersuchung der BER-Kapazität während der Differenzierung von Muskelzellen. Dabei wurden proliferierende Myoblasten mit ausdifferenzierten, nicht-proliferierenden Myotuben verglichen und eine Abnahme der XRCC1- und Ligase III α -Expression während der Ausreifung beobachtet (Narciso et al., 2007). Dies führte zu einer Abnahme der BER-Kapazität im Verlauf der Muskellzell-Differenzierung, was im Widerspruch zur Zunahme der BER-Kapazität während der Ausreifung von Monozyten steht. Demnach kann man nicht von einer generellen Abnahme oder Zunahme der Reparaturkapazität während der Differenzierung von Zellen sprechen. Dies ist spezifisch für das jeweilige Zellsystem.

Die Untersuchung der Frage, wie die Expression von XRCC1 in Monozyten reguliert ist, zeigte, dass während der Differenzierung von Monozyten zu DCs und Makrophagen die Expression des Transkriptionsfaktors FoxM1 in Monozyten, DCs und Makrophagen fehlt. FoxM1 induziert XRCC1 (Tan et al., 2007) und reguliert die Expression von Genen während der Replikation und Mitose. Die fehlende Expression von FoxM1 ist demnach durch die Arretierung der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus zu erklären. Interessanterweise exprimieren Monozyten kein p53. Dessen Expression wird jedoch während der Differenzierung in DCs und Makrophagen induziert. p53 fungiert als Transkriptionsfaktor in der Regulation von Genen, welche an der Zellzyklusregulation, DNA-Reparatur und Apoptose beteiligt sind (Lavin and Gueven, 2006). Desweiteren wurde für p53 gezeigt, dass es die BER stimuliert (Seo et al., 2002; Zhou et al., 2001) (Adimoolam and Ford, 2003). Zellen ohne p53 weisen eine Hypersensitivität gegenüber Alkylantien auf (Lackinger et al., 2001). Somit könnte vermutet werden, dass

p53 in Zusammenhang mit der induzierten BER-Kapazität während der myeloiden Differenzierung steht. Ein weiterer Transkriptionsfaktor, dessen Expression während der Differenzierung von Monozyten in DCs und Makrophagen induziert wird, ist E2F-1. E2F-1 aktiviert S-Phase-abhängige Gene, vermittelt Apoptose und stimuliert DNA-Reparatur. E2F-1 bindet an den XRCC1-Promotor und aktiviert dessen Transkription (Chen et al., 2008; Li et al., 2008; Jin et al., 2011). Auch konnte gezeigt werden, dass PARP-1 induziert wird. PARP-1 bindet E2F-1 und fungiert als Co-Aktivatoren der E2F-1 vermittelte Transkription während des Wiedereintritts ruhender Zellen in die S-Phase (Simbulan-Rosenthal et al., 2003). Die Bindung von GM-CSF, das sowohl für die Differenzierung humaner Monozyten in Makrophagen als auch in DCs eingesetzt wird, aktiviert durch Bindung an seinen Rezeptor (GM-CSF-R) den MAPK- (*engl. mitogen activated protein kinase*), den PI-3K/Akt/p21waf-1- und den JAK2-STAT5-Signalweg (Hercus et al., 2009). MAPK und PI-3K/Akt/p21waf-1 führen unter anderem zur Aktivierung von E2F-1, was einen Einfluss von E2F-1 an der Regulation von XRCC1 während der myeloiden Differenzierung nahelegt. Die Kinetik der Hochregulation von p53 und E2F-1 im Vergleich zu XRCC1 lässt vermuten, dass p53 der entscheidende Faktor ist. p53 war wie XRCC1 während der DC-Ausreifung nach 3 Tagen und während der Makrophagen-Ausreifung nach 2 Tagen detektierbar. Eine Zunahme des E2F-1-Proteins war hingegen während der DC- und Makrophagen-Ausreifung erst nach 6 bzw. 3 Tagen mittels Western Blot-Analyse nachweisbar.

Untersuchungen zur Regulation der Gen-Expression von PARP-1 zeigten, dass diese über eine entgegengesetzte Regulation der beiden Transkriptionsfaktoren Sp1 und NIF erfolgt (Zaniolo et al., 2007). Sp1 aktiviert die Transkription von PARP-1, während NIF als Repressor des PARP-1-Promotors fungiert (Laniel et al., 1997). Sp1 ist gleichzeitig Zielprotein von PARP-1; PARP-1 aktiviert Sp1. Diese synergistische und gleichzeitig antagonistische Regulation sorgt für eine fein abgestimmte Regulation der PARP-1 Expression. Demnach könnte vermutet werden, dass die fehlende Expression von PARP-1 auf eine übermäßige Aktivität des Repressors NIF oder ein Fehlen des Transkriptionsfaktors Sp1 in Monozyten zurückzuführen ist. Diese könnten während der myeloiden Differenzierung herunter- oder hochreguliert werden, was zur Induktion von PARP-1 führen könnte. Diese Vermutung könnte durch Expressionsanalysen von NIF und Sp1 während der Ausreifung von Monozyten zu DCs und Makrophagen überprüft werden.

Insgesamt ist auffallend, dass die Hochregulation der untersuchten Proteine XRCC1, Ligase III α , PARP-1, p53 und E2F-1 während der Makrophagen-Ausreifung durch Stimulation der Monozyten mit GM-CSF deutlich schneller erfolgte als in der DC Ausreifung. Die zusätzliche Stimulation mit IL-4 scheint damit nicht nur die Expression von

CD14 und Makrophagendifferenzierung zu unterdrücken (Jansen et al., 1989), sondern auch die Hochregulation der BER-Proteine in den ersten Tagen der DC Ausreifung. Somit scheint GM-CSF das entscheidende Zytokin zu sein, welches die Hochregulation der BER-Proteine bewirkt.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das Fehlen der BER-Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 in einer defekten BER und ESBR in Monozyten resultiert. Die mittels Western Blot-Analyse gezeigte fehlende Expression des Ligase III α -Proteins ist durch die ausbleibende Interaktion mit XRCC1 zu erklären. Wie die Regulation der Proteine XRCC1 und PARP-1 während der Differenzierung von Monozyten zu DCs und Makrophagen durch die Zytokine IL-4 und GM-CSF erfolgt ist bisher noch unklar. Es gibt lediglich Hinweise, dass p53 oder E2F-1 die Expression der XRCC1-mRNA beeinflussen könnten.

4.3 Einfluss des BER-Defekts auf die immunstimulatorische Funktion von Monozyten

Kommt es zu einer Immunreaktion des Körpers, so werden vermehrt Zytokine ausgeschüttet, die die Immunreaktion entscheidend regulieren. Zytokine sind kleine lösliche Proteine, die sowohl Wachstum als auch die Differenzierung von Zellen beeinflussen. Monozyten, Makrophagen und DCs produzieren pro- und anti-inflammatorische Zytokine, welche die Immunantwort fördern bzw. hemmen.

Monozyten und Makrophagen produzieren beispielsweise die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF α sowie das anti-inflammatorische Zytokin TGF- β . Eine Bestimmung der Ausschüttung dieser Zytokine mittels ELISA nach Stimulation mit LPS zeigte, dass in Gegenwart von ROS in Monozyten die Zytokinausschüttung vermindert war; die Immunantwort wird gehemmt. Im Vergleich dazu wurde in Makrophagen die Zytokinausschüttung durch ROS stimuliert.

Im Fall einer chronischen Inflammation werden so durch Makrophagen vermehrt ROS und Zytokine, welche die Immunantwort fördern, produziert. Die ROS werden an das umgebende Gewebe abgegeben, es kommt zum ‚*Oxidative Burst*‘. So ist nun zu vermuten, dass der Defekt in BER und ESBR in Monozyten und die daraus resultierende hohe Sensitivität gegenüber ROS auch die Menge der aus Monozyten abgeleiteten Makrophagen und DCs reduziert. Makrophagen sind die Hauptproduzenten von ROS und

werden indirekt von DCs über die Aktivierung von T-Zellen stimuliert (Ueno et al., 2010). Hierdurch kommt es möglicherweise zu einer negativen Rückkopplung, welche zur Vermeidung chronischer Inflammation durch ROS beiträgt. Somit hätte der in dieser Arbeit ermittelte Reparaturdefekt in Monozyten einen entscheidenden Einfluss auf die homöostatische Regulation des Immunsystems. Weiterführend könnten Co-Kultivierungsexperimente zeigen, ob unter Bedingungen eines ‚*Oxidative Burst*‘ die von Makrophagen an das umgebene Medium freigesetzte ROS tatsächlich zur Abtötung der co-kultivierten Monozyten führt.

4.4 Sensitivität humaner Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber IR

IR induziert wie ROS Basenschäden, ESBs und DSBs in der DNA. Wird eine Zelle mit 1 Gy bestrahlt, entstehen über 1000 Basenschäden, 1000 ESBs und 20 bis 40 DSBs, wobei den DSBs die größte Toxizität zugesprochen wird (Ward, 1988; Lobrich et al., 1995; Rogakou et al., 1998; Dahm-Daphi et al., 2000; Golden et al., 2012). Ist die hohe Sensitivität der Monozyten gegenüber oxidativem Stress auf eine verminderte Prozessierung der DSBs zurückzuführen, sollten Monozyten auch gegenüber IR sensitiv sein. Die Messung der SubG1-Fraktion zeigte, dass IR in Monozyten Apoptose induziert. Im Vergleich dazu konnte in DCs und Makrophagen nach IR kaum eine Fragmentierung der DNA, welche als Marker für Apoptose dient, beobachtet werden.

Die hohe Induktion von ESBs in Monozyten nach *tert*-BOOH-Behandlung ließ erwarten, dass nach IR ebenso eine hohe Rate an ESBs in Monozyten fortbesteht. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass in Monozyten, DCs und Makrophagen im Bereich von 1 bis 2 Gy signifikant mehr ESBs in DCs und Makrophagen induziert werden als in Monozyten. Nach Bestrahlung mit höheren Dosen IR (5 und 7 Gy) wurde eine vergleichbare Menge an ESBs induziert. Auch die Kinetik der Reparatur der IR-induzierten ESBs war in allen drei Zelltypen vergleichbar. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die durch IR induzierten „glatten“ ESBs direkt durch Ligasen wieder verschlossen werden können und die Basenschäden entweder nicht erkannt oder komplett prozessiert werden. Demnach sind die durch IR induzierten ESBs und Basenschäden nicht für die Sensitivität der Monozyten gegenüber IR verantwortlich.

Unterschiede wurden dagegen in der neutralen SCGE in der Rate der induzierten DSBs festgestellt. Es wurde eine signifikant höhere Bildung von DSBs in Monozyten als in DCs

und Makrophagen beobachtet. Generell wird angenommen, dass dieselbe Dosis IR in unterschiedlichen Zellen dieselbe Anzahl an Basenmodifikationen, ESBs und DSBs induziert, was vollkommen in Widerspruch zu dem in dieser Arbeit gezeigtem Befund steht. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Monozyten eine zu DCs und Makrophagen unterschiedliche Chromatinkondensation aufweisen, was experimentell durch Bestimmung der Chromatinkondensation humaner Monozyten, DCs und Makrophagen geklärt werden könnte. In der Literatur gibt es widersprüchliche Erkenntnisse zum Einfluss der Chromatinkondensation auf die Induktion radiogener DSBs. Einerseits wurde gezeigt, dass zwischen der DSB-Induktion und der Chromatindichte kein Zusammenhang besteht (Brenner and Ward, 1992; Ward, 1994). Andererseits wurde beschrieben, dass die unterschiedlich kondensierten Chromatinkompartimente sich in der Fähigkeit unterscheiden, Radikale einzufangen, und dass dies die zelluläre Strahlenempfindlichkeit beeinflusst (Warters and Lyons, 1992; Oleinick et al., 1994; Newman et al., 2000). Auch gibt es Hinweise, dass in stärker kondensiertem Chromatin weniger DSBs induziert werden als in dekodensiertem Chromatin (Storch et al., 2010).

Zusätzlich zur höheren DSB-Rate zeigten Monozyten auch eine deutlich langsamere Prozessierung der IR-induzierten DSBs als DCs und Makrophagen. In DCs und Makrophagen waren bereits nach 20 min etwa 50% der induzierten DSBs repariert. Zum gleichen Zeitpunkt konnten Monozyten lediglich 10% der induzierten DSBs prozessieren. Dies lässt eine eingeschränkte DSB-Reparatur in Monozyten vermuten.

Die Phosphorylierung des Histons H2AX am Ser139 gehört zu den frühen Ereignissen der DNA-Schadensantwort nach Auftreten eines DSBs und wird als Marker für DSBs verwendet (Ismail and Hendzel, 2008; Kinner et al., 2008). Monozyten zeigten nach 30 min ein intensiveres γ H2AX-Signal als DCs und Makrophagen und auch die Abnahme der Signalintensität über die Zeit war in Monozyten langsamer als in DCs und Makrophagen. Zusätzlich zeigte die Immunfluoreszenz-Analyse auch nach 4 h ein höheres residuales γ H2AX-Signal in Monozyten als in DCs und Makrophagen. Dies bestätigt die Ergebnisse der neutralen SCGE, wonach Monozyten im Vergleich zu DCs und Makrophagen eine verminderte Reparatur der durch IR-induzierten DSBs aufweisen. Desweiteren lässt das signifikant höhere residuale γ H2AX-Signal in Monozyten vermuten, dass dort die DNA-Schadensantwort aktiviert wird, die letztendlich zur Induktion von Apoptose führt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass menschliche Monozyten auch gegenüber IR sensitiver sind als daraus abgeleitete DCs und Makrophagen. Dies ist nicht auf eine erhöhte ESBs-Rate in den Monozyten nach IR zurückzuführen, sondern durch

eine größere Menge an induzierten DSBs im Vergleich zu DCs und Makrophagen sowie eine vergleichsweise langsamere DSB-Reparatur in Monozyten bedingt. Die nicht-reparierten DSBs führen in Monozyten zur Phosphorylierung des Histons H2AX, was auf eine fortbestehende Aktivierung der DNA-Schadensantwort hinweist und die Induktion der Apoptose in Monozyten erklärt.

4.5 DSB-Reparatur in Monozyten, DCs und Makrophagen

Die Reparatur von DSBs findet generell über zwei Reparaturmechanismen statt: HR und NHEJ (Jackson, 2002). Die HR hat zwar eine geringere Fehleranfälligkeit, benötigt aber eine homologe Sequenz aus der Schadensregion, weshalb sie lediglich in der S-Phase und späten G2-Phase des Zellzyklus stattfinden kann (Takata et al., 1998; Johnson and Jasin, 2000). Das NHEJ dominiert in der G1- und G0-Phase des Zellzyklus (Shrivastav et al., 2008) und ist demnach *a priori* in den in dieser Arbeit untersuchten Monozyten, DCs und Makrophagen für die Reparatur von DSBs verantwortlich, da diese nicht proliferieren. Das NHEJ wird in C-NHEJ und B-NHEJ unterteilt, wobei im C-NHEJ größere Modifikationen der DSB-Enden stattfinden und das B-NHEJ fehleranfälliger ist. Die in Monozyten fehlenden Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 sind nicht nur an der BER beteiligt, sondern bilden auch den Reparaturapparat des B-NHEJ (Audebert et al., 2004). Aufgrund der fehlenden Expression der B-NHEJ Proteine müsste in Monozyten die DSB-Reparatur über das C-NHEJ erfolgen. Die nach *tert*-BOOH-Behandlung persistierenden DSBs sowie die im Vergleich zu DCs und Makrophagen langsamere Reparatur von DSBs nach IR lassen einen Defekt in der DSB-Reparatur in Monozyten vermuten. Expressionsanalysen zeigten, dass Monozyten die Proteine Ku70, Ku80, XRCC4 und Ligase IV wie DCs und Makrophagen exprimieren. XRCC4 und Ligase IV sind für die Ligation des DSBs zuständig und Ku70 und Ku80 binden an den DSB und assoziieren mit der katalytischen Untereinheit der DNA-PK (DNA-PKcs), welche zusammen das DNA-PK-Holoenzym (DNA-PK) bilden, das für die Reparatur eines DSBs über die C-NHEJ entscheidend ist. Sowohl das Protein DNA-PKcs als auch dessen mRNA ist in Monozyten im Vergleich zu DCs und Makrophagen nicht exprimiert. Auch war eine enzymatische Aktivität der DNA-PK in Monozyten basal als auch nach Induktion durch IR kaum nachweisbar. In DCs und Makrophagen hingegen konnte durch IR die DNA-PK-Aktivität klar induziert werden. Dies weist neben dem in Monozyten beobachteten BER und ESR-Defekt auch auf einen Defekt in der DSB-Reparatur hin.

Somit ist die hohe Sensitivität der Monozyten gegenüber oxidativem Stress mit einer defekten BER/ESBR und einem Defekt in beiden Wegen des NHEJ zu erklären.

Durch die fehlende Expression der Reparaturproteine XRCC1, Ligase III α , PARP-1 und DNA-PKcs wird die Toxizität von oxidativen DNA-Läsionen in Monozyten dramatisch verstärkt, so dass diese letztlich zum Tod der Zellen führen. Dies könnte als „Selbstmord-Strategie“ der Monozyten gegenüber genotoxischem Stress betrachtet werden, der von reparatur-kompetenten Zellen toleriert wird.

4.6 Expressionsanalysen von weiteren genotoxischen „Stress“-Genen in Monozyten, DCs und Makrophagen

Der bereits gezeigte Defekt in BER/ESBR und DSB-Reparatur in Monozyten sowie die Hochregulation der fehlenden Proteine in DCs und Makrophagen lassen vermuten, dass noch weitere Reparaturproteine in Monozyten nicht exprimiert werden. Ein PCR-Array zeigte, dass die Expression fast aller während der Differenzierung von Monozyten zu DCs und Makrophagen regulierter Gene zunahm. Durch Behandlung mit IL-4 und/oder GM-CSF werden viele differenzierungsabhängige Gene aktiviert, was diese Zunahme erklären könnte. Eine Abnahme von MGMT während der Differenzierung von Monozyten zu DCs (Briegert et al., 2007) und auch zu Makrophagen widerspricht allerdings einer generellen Zunahme der Genexpression. Auch das *C-FOS* Gen war in Monozyten signifikant höher exprimiert als in DCs und Makrophagen. Das c-Fos Protein, welches mit c-Jun zum Transkriptionsfaktor AP-1 dimerisiert, reguliert die Expression vieler an Proliferation und Differenzierung beteiligter Gene. MicroRNA Experimente konnten zeigen, dass ein ‚*Silencing*‘ von c-Fos für die DC-Ausreifung aus Monozyten und für die Funktion von DCs notwendig ist (Dunand-Sauthier et al., 2011).

XPC gehört zu einem heterodimeren Komplex, der für die NER von großer Bedeutung ist. Zusammen mit HR23B erkennt XPC spezifisch UV-induzierte 6-4-Photoprodukte (Christmann et al., 2003). Es spielt aber auch eine Rolle in der BER. Als Kofaktor der Glykosylase OGG1 stimuliert es deren Aktivität, was die Prozessierung der oxidativen DNA-Läsion 8-oxoG fördert (D'Errico et al., 2006). Sowohl der PCR-Array als auch eine Western Blot-Analyse zeigte, dass Monozyten XPC nicht exprimieren und dessen Expression in DCs und Makrophagen induziert ist. Aufgrund der höheren 8-oxoG-Spaltungsaktivität in Monozyten ist jedoch ein negativer Einfluss des Fehlens von XPC auf OGG1 auszuschließen. Desweiteren stellt sich die Frage, ob die XPC-Induktion von

einer Induktion des DDB2-Proteins während der Ausreifung von Monozyten zu DCs und Makrophagen begleitet wird. XPC als auch DDB2 werden transkriptionell durch p53 reguliert (Adimoolam and Ford, 2003). Wie in Kapitel 4.2 diskutiert, erfolgt während der Differenzierung von Monozyten zu DCs und Makrophagen eine Induktion des p53-Proteins. Eine Zunahme der *DDB2* mRNA wurde im durchgeführten PCR-Array für DCs ($\Delta\text{IF } 2,08 \pm 0,58$) gezeigt. In Makrophagen erfolgte nur in einem Spender eine Induktion der mRNA ($\Delta\text{IF } 1,82 \pm 0,8$). Da im PCR-Array nur Gene, deren mRNA Menge in DCs und Makrophagen beider Spender um das 2-fache von der mRNA-Menge in Monozyten abweicht als reguliert angesehen werden, wurde folglich *DDB2* in Makrophagen als nicht-reguliert bewertet. Aufgrund der großen Bedeutung von XPC und DDB2 für die NER-Kapazität der Zelle, stellt sich die Frage ob es Unterschiede in der NER-Kapazität zwischen Monozyten, DCs und Makrophagen gibt.

Neben XPC beeinflusst auch der c-Fos-Status einer Zelle deren Sensitivität gegenüber UV-Strahlung. c-Fos-defiziente Zellen weisen eine erhöhte Sensitivität gegenüber UV-C auf (Christmann et al., 2006). Ein Einfluss der unterschiedlichen Expression von XPC und c-Fos auf die Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber UV-Licht ist bisher nicht untersucht worden. Die Sensitivität gegenüber UV-C könnte durch Messung der Viabilität mittels Trypan-Blau-Färbung und Apoptose mittels SubG1 Assay oder AnnexinV/PI-Messung überprüft werden.

Gemäß den Ergebnissen des PCR-Arrays wie auch dessen Verifizierung mittels Real-Time RT-PCR waren nicht nur die Gene der BER-Proteine XRCC1 und PARP-1, sondern auch APE, Fen-1 und MPG in Monozyten herunterreguliert. Entscheidend ist jedoch die Proteinexpression. Die durchgeführten Western Blot-Analysen konnten die Ergebnisse der PCR-Analysen nicht bestätigen: Die Proteine APE, Fen-1 und MPG waren in Monozyten, DCs und Makrophagen vergleichbar exprimiert.

4.7 Sensitivität von Monozyten, DCs und Makrophagen gegenüber Temozolomid

Wichtig für eine erfolgreiche Chemotherapie ist die Unversehrtheit des Immunsystems. Allerdings gehört Immunsuppression häufig zu den unerwünschten Nebenwirkungen einer Chemotherapie. Die Toxizität der eingesetzten Genotoxine wird generell durch die hohe Proliferationsrate der Immunzellen erklärt. Dabei werden ausdifferenzierte, nicht-proliferierende Immunzellen wie Monozyten, Makrophagen und DCs oft vernachlässigt.

Temozolomid gehört zur Gruppe der monofunktionellen methylierenden Agenzien und wird zur Therapie von Glioblastomen und malignen Melanomen eingesetzt (Stupp et al., 2005b; Bei et al., 2010). Alkylanzien haben nicht nur gegenüber Tumorzellen eine zytotoxische Wirkung, sondern induzieren auch in Immunzellen Zelltod, was zur Entstehung von Leukozytopenie, Lymphozytopenie und Thrombozytopenie führt (Batts et al., 2007; Schwarzberg et al., 2007). Die Zytotoxizität von Temozolomid ist auf die Induktion einer Vielzahl von N- und O-Alkylierungen in den Basen der DNA zurückzuführen, wobei N7-MeG die häufigste Alkylierungsläsion darstellt (Wyatt and Pittman, 2006). O⁶-MeG ist eine vergleichsweise selten induzierte Läsion. Diese wird durch MGMT repariert (Christmann et al., 2003). Nicht-repariert kann O⁶-MeG zur Bildung toxischer DSBs während der Replikation führen (Ochs and Kaina, 2000; Roos et al., 2004). Für die Reparatur von N-Alkylierungen wie N7-MeG oder N3-MeA ist die BER verantwortlich (Christmann et al., 2003; Wyatt and Pittman, 2006). In vorangegangenen Arbeiten wurde die Wirkung von Alkylantien auf Monozyten und aus Monozyten abgeleiteten dendritischen Zellen untersucht. Es wurde gezeigt, dass Monozyten eine höhere Sensitivität gegenüber Alkylantien aufweisen als die von ihnen abgeleiteten DCs (Briegert et al., 2007; Briegert and Kaina, 2007). Dies wurde mit der fehlenden Expression der BER-Proteine XRCC1 und Ligase III α erklärt, deren Expression während der Ausreifung von Monozyten zu DCs hochreguliert wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Monozyten eine signifikant höhere Sensitivität gegenüber Temozolomid aufweisen als daraus abgeleitete DCs und Makrophagen. In proliferierenden Zellen stellt O⁶-MeG die zytotoxische Hauptläsion von Temozolomid dar (Roos et al., 2004). Bei Bestimmung der SubG1-Fraktion konnte gezeigt werden, dass Monozyten und daraus abgeleitete DCs und Makrophagen in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert sind und somit nicht proliferieren. Daher ist die Apoptoseinduktion in diesem Modellsystem proliferationsunabhängig und die zytotoxische DNA-Läsion O⁶-MeG sollte hierbei keine Rolle spielen. Allerdings war nach Inhibierung von MGMT durch dessen spezifischen Inhibitor O⁶-Benzylguanin eine Steigerung der Sensitivität in DCs, Makrophagen und vor allem in Monozyten zu beobachten. Dies war nicht zu erwarten und widerspricht vorherigen Untersuchungen, die zeigten, dass die Inhibition von MGMT keinen Effekt auf die Zytotoxizität des Alkylanz MNNG in Monozyten und DCs hat (Briegert and Kaina, 2007). Die MGMT-Aktivität nahm während der Differenzierung von Monozyten zu DCs und Makrophagen signifikant ab. Daher ist die höhere Sensitivität der Monozyten (im Vergleich zu DCs und Makrophagen) nicht auf eine verminderte Reparatur des O⁶-MeG zurückzuführen. Dies bestätigte die bereits für die DC-Differenzierung gezeigte Abnahme der MGMT-Aktivität (Briegert et al., 2007). Daher sollte die Toxizität

von Temozolomid in Monozyten aus den induzierten N-Alkylierungen resultieren, die über die BER repariert werden. Der in dieser Arbeit gezeigte Defekt in der BER und ESBR durch die fehlende Expression von XRCC1, Ligase III α und PARP-1 unterstützt diese Hypothese.

Interessanterweise wurde in der vorliegenden Arbeit eine Hochregulation der beiden BER-Proteine XRCC1 und Ligase III α in Monozyten nach Behandlung mit Temozolomid beobachtet. Auch in MEFs (*engl.* mouse embryo fibroblasts) konnte eine Induktion von XRCC1 nach Behandlung mit dem S_N2-Alkylanz MMS gezeigt werden (Chen et al., 2008). Allerdings zeigte ein *in vitro* BER-Aktivitäts-Assay, das eine Steigerung der XRCC1 und Ligase III α Expression in Monozyten die Re-Ligationskapazität der Zellen während der BER nicht erhöht. Dies lässt vermuten, dass das Fehlen von PARP-1, welches nicht nach Temozolomid-Behandlung in Monozyten induziert wurde, für die BER notwendig ist und dessen Fehlen für die erhöhte Sensitivität der Monozyten gegenüber Temozolomid mitverantwortlich ist.

Frühere Untersuchungen des DNA-Schadens nach Behandlung mit Alkylanzien zeigten eine hohe, persistierende ESB-Rate in Monozyten (Briegert and Kaina, 2007). Zusammen mit der Beobachtung, dass Genotoxin-induzierte ESBs in Monozyten durch den BER/ESBR-Defekt nicht repariert werden können, ist zu vermuten, dass auch nach Temozolomid-Behandlung eine Akkumulation des DNA-Schadens erfolgt. So ist zu erwarten, dass die induzierten ESBs nicht prozessiert werden können, akkumulieren und toxische DSBs entstehen. In nicht-proliferierenden Zellen ist das NHEJ (unterteilt in die Wege B-NHEJ und C-NHEJ) für die Reparatur von DSBs zuständig (Shrivastav et al., 2008). Aufgrund der fehlenden Expression der Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 sowie der DNA-PKcs ist sowohl die B-NHEJ als auch die C-NHEJ in Monozyten beeinträchtigt. Dies sollte zu einem Defekt in der Reparatur von DSBs führen. Die Kinetik der γ H2AX-Foci-Bildung nach Behandlung mit Temozolomid bestätigte diese Vermutung. Die Bildung von γ H2AX gehört zu den frühen Ereignissen nach Schädigung der DNA. Während in DCs und Makrophagen die Intensität der γ H2AX-Foci nach 24 h abnahm, was auf Reparatur der DSBs zurückzuführen ist, war in Monozyten eine solche Abnahme nicht zu beobachten: das γ H2AX-Signal blieb auch 24 h nach Temozolomid-Behandlung bestehen.

In der vorliegenden Arbeit wurde in Monozyten nach Behandlung mit Temozolomid eine Phosphorylierung der beiden Stresskinasen ATM und ATR gezeigt, welche durch DSBs und ESBs aktiviert werden und ihrerseits zur Aktivierung von Chk1, Chk2 und p53 führen. Eine Aktivierung des AMT/ATR-Chk1/Chk2-p53-Signalwegs wurde durch

Phosphorylierung der beiden Kinasen Chk1 und Chk2 sowie durch p53-Akkumulation nachgewiesen. Dies konnte durch zusätzliche Experimente mit Inhibitoren der Kinasen ATM/ATR, Chk1, Chk2 und p53 bestätigt werden (Bauer et al., 2012).

Die durch Temozolomid induzierte Zunahme der SubG1-Population, das heißt eine Induktion der DNA-Fragmentierung, in Monozyten, lässt vermuten, dass der Zelltod auf Induktion von Apoptose zurückzuführen ist. p53 akkumuliert in Monozyten nach Behandlung mit Temozolomid. Zu den p53-abhängigen Genen gehört unter anderem der FasR (Müller et al., 1998). Die Beteiligung des FasR an der Temozolomid-induzierten Apoptose in Monozyten konnte in der vorliegenden Arbeit a) durch Zunahme der *FASR*-mRNA, b) durch Zunahme der membranständigen, wie auch löslichen Form des FasL und c) durch Spaltung der Initiatorcaspase des rezeptorvermittelten Wegs der Apoptose, der Caspase-8, gezeigt werden. Desweiteren bestätigte die Abnahme der Apoptoserate in Monozyten nach Inhibition des FasR dessen Beteiligung (Bauer et al., 2012). Wird die Apoptose über den rezeptorvermittelten extrinsischen Weg induziert, so werden Caspasen aktiviert, welche letztendlich CAD (*engl. caspase activated DNase*) aktivieren, welches die DNA fragmentiert und letztendlich zum Tod der Zelle führt (Srinivasula et al., 1996). Die Verwendung eines globalen Caspaseinhibitors zeigte, dass die durch Temozolomid induzierte Apoptose in Monozyten Caspasen-abhängig verläuft (Bauer et al., 2012). Aber auch eine Beteiligung des mitochondrialen-vermittelten intrinsischen Signalwegs an der Temozolomid-induzierten Apoptose in Monozyten konnte gezeigt werden (Bauer et al., 2012).

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse vermuten, dass die durch Temozolomid induzierten N-Alkylierungen durch die BER-Glykosylase MPG erkannt und entfernt werden, es entstehen AP-Stellen. An diesen AP-Stellen schneidet die APE, es entstehen ESBs. DCs und Makrophagen reparieren diese über die BER, während Monozyten aufgrund des Fehlens von XRCC1, Ligase III α und PARP-1 nicht fähig sind diese zu ligieren. Es entstehen durch Überlagerungen von ESBs proliferations-unabhängig DSBs, welche von Monozyten ebenfalls nicht prozessiert werden können, da ihnen nicht nur Proteine für ein funktionierendes B-NHEJ, sondern auch mit DNA-PKcs ein entscheidender Faktor für einen korrekten Ablauf der C-NHEJ fehlt. Dies führt zur Akkumulation von ESBs und DSBs, welche die DNA-Schadensantwort über den ATM/ATR-Chk1/Chk2-p53-Signalweg aktivieren. p53 führt unter Beteiligung des extrinsischen und intrinsischen Signalwegs zur Caspasen-abhängigen Induktion der Apoptose.

Insgesamt sind diese Erkenntnisse von großer Bedeutung für die Chemotherapie. Monozyten sind nicht nur sensitiv gegenüber Temozolomid, sondern auch gegenüber IR. In der Therapie von Gliomen kommt es zur Kombination von IR und Temozolomid (Stupp et al., 2005a). Somit kann die Sensitivität der Monozyten gegenüber Temozolomid und IR eine Erklärung der begleitenden Immunsuppression einer solchen Therapie sein. Diese führt nicht nur zu einer Depletion von Monozyten, sondern auch daraus differenzierten myeloiden DCs und Makrophagen, welche eine bedeutende Rolle in der sogenannten ‚*tumor host defense*‘ spielen (Voss et al., 2004; Melief, 2008; Nardin and Abastado, 2008). Dies könnte durch Patientendaten zur Monozytenzahl während einer Chemotherapie mit Temozolomid und/oder IR oder durch Verwendung eines geeigneten Mausmodells näher analysiert werden. Gleichzeitig zeigen die Daten, dass DCs und Makrophagen über eine vollständige DNA-Reparatur-Apparat verfügen und somit gegenüber Temozolomid und IR induzierten DNA-Läsionen geschützt sind. Dies ist auch für die Immunvakzinierung von Patienten mit Tumorantigen-beladenen *in vitro* aus Monozyten-abgeleiteten DCs von Bedeutung (De Vleeschouwer et al., 2008). Der Befund der Aktivierung des AMT/ATR-Chk1/Chk2-p53-Signalwegs könnte ebenfalls von großer Bedeutung sein. Die gezeigte Abnahme der Sensitivität von Monozyten nach Inhibition von Chk1 und Chk2 (Bauer et al., 2012), könnte ein Mittel darstellen, Monozyten während der Chemotherapie mit Temozolomid zu protektieren und letztlich die Nebenwirkung der Immunsuppression zu mindern. Die verwendeten Inhibitoren sind bereits in Kombination mit einer Chemotherapie klinisch getestet worden (Ashwell and Zabludoff, 2008).

4.8 Vergleich humaner Monozyten mit Zelllinien myeloiden Ursprungs

Zur Charakterisierung menschlicher Monozyten werden experimentell häufig humane myeloide Zelllinien wie MM6, THP-1 und U937 verwendet. Dies ist im Vergleich zu primären Monozyten, die vor jedem Experiment frisch *ex vivo* aus ‚*Buffy Coats*‘ isoliert werden ein klarer technischer Vorteil. Limitationen hinsichtlich der Zellzahl, Spendervariationen und auch die Kultivierungsdauer werden bei Verwendung von Zelllinien umgangen. MM6 und THP-1 sind akute myeloische Leukämiezelllinien, die hinsichtlich ihrer Oberflächenmarkereexpression und Eigenschaften als Monozyten-ähnlich beschrieben wurden (Tsuchiya et al., 1980; Ziegler-Heitbrock et al., 1988). U937 ist eine histiozytische Lymphomazelllinie, die sowohl Monozyten- als auch Makrophagen-ähnliche Eigenschaften aufweist (Larrick et al., 1980; Hudig and Bajaj, 1982).

Ein Vergleich der Zelllinien MM6, THP-1 und U937 mit primären Monozyten zeigte, dass hinsichtlich der Expression der BER-Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 lediglich MM6-Zellen alle drei Proteine nicht exprimieren. THP-1-Zellen fehlt zwar die Expression von XRCC1 und Ligase III α , sie exprimieren aber PARP-1. U937-Zellen exprimieren wie primäre Makrophagen alle drei BER-Proteine. MM6- und THP-1-Zellen zeigten wie primäre Monozyten eine hohe Sensitivität gegenüber den Alkylanzien Temozolomid und MMS. Die Sensitivität war in beiden Fällen signifikant höher als in U937-Zellen. In allen drei Zelllinien wurde durch Inhibition von MGMT die Sensitivität gegenüber Temozolomid nicht gesteigert. Dies zeigt, dass auch in den proliferierenden Zelllinien die Toxizität von Temozolomid lediglich über die Induktion von N-Alkylierungen vermittelt wird. MM6-, THP-1- und U937-Zellen sind wie primäre Monozyten MGMT-profizient. Insgesamt war die MGMT-Aktivität der drei Zelllinien jedoch geringer als in primären Monozyten, was aber die Sensitivität gegenüber Alkylanzien offenbar nicht beeinflusst.

Die Zytokine IL-4 und GM-CSF induzieren während der Ausreifung primärer Monozyten zu DCs und Makrophagen die Expression der BER-Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1. Eine solche Hochregulation wurde lediglich in MM6-Zellen durch gleichzeitige Stimulation mit IL-4 und GM-CSF erreicht. Gleichzeitig wurden auch die in THP-1-Zellen fehlenden Proteine XRCC1 und Ligase III α durch IL-4, GM-CSF allein und durch deren Kombination induziert. In U937-Zellen waren die Proteine bereits basal exprimiert, so dass die Zytokin-Stimulation keine Veränderung der Proteinexpression bewirkte.

Demnach zeigen lediglich MM6-Zellen, unbehandelt und nach Stimulation mit IL-4 und GM-CSF, den gleichen Phänotyp wie primäre Monozyten. Auch in MM6-Zellen nahm die Sensitivität der Zellen nach IL4/GM-CSF-Behandlung gegenüber Temozolomid und MMS ab. Dies könnte auf die Induktion der BER-Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 zurückzuführen sein. Interessanterweise führte die Stimulation mit IL-4 und GM-CSF in MM6-Zellen zu einer geringen Zunahme der MGMT-Aktivität sowie zur Sensibilisierung der Zellen gegenüber Temozolomid wenn gleichzeitig MGMT inhibiert wird. Wie dieses Phänomen zu erklären ist, ist bislang noch unklar. Eine durch Induktion der BER-Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 vermutete Steigerung der BER-Kapazität konnte mittels eines *in vitro* BER-Aktivitätassay nicht bestätigt werden. Der Assay zeigte zusätzlich, dass MM6-Zellen auch ohne die Anwesenheit von XRCC1, Ligase III α und PARP-1 fähig sind die AP-Stelle vollständig zu prozessieren. Dies könnte durch eine funktionelle ‚*long-patch*‘ BER erklärt werden, die den Defekt der ‚*short-patch*‘ BER kompensiert. Mit Fen-1, Ligase I, Pol δ , Pol ϵ und PCNA teilen sich ‚*long-patch*‘ BER und DNA-Replikation eine Vielzahl von Proteinen. Untersuchungen zeigten auch, dass ‚*long-patch*‘ BER vermehrt in

replizierenden Zellen, aber nicht in nicht-proliferierenden Zellen stattfindet (Akbari et al., 2009). Zusätzlich sollte das Ergebnis des durchgeführten *in vitro* BER-Assays durch einen *in vitro* Ligationsassay (Bauer et al., 2011) verifiziert werden.

Zusammenfassend zeigte der Vergleich primärer Monozyten mit den myeloiden Zelllinien MM6, THP-1 und U937, dass es hinsichtlich der Proteinexpression und Sensitivität gegenüber Alkylanzien Übereinstimmungen zwischen primären Monozyten und MM6-, sowie THP-1-Zellen gibt. Es gibt jedoch gravierende Unterschiede hinsichtlich der Reparaturkapazität. Die Zelllinie U937 ähnelt in ihrem Verhalten eher primären Makrophagen. Auch ist zu bedenken, dass an dieser Stelle nicht-proliferierende Primärzellen mit proliferierenden Zelllinien verglichen werden und Proliferation den Reparaturstatus einer Zelle stark beeinflussen kann. Dennoch scheint die myeloide Zelllinie MM6 geeignet um die GM-CSF- und GM-CSF/IL-4-vermittelte Induktion der Gene *XRCC1* und *PARP-1* näher zu analysieren. Dies könnte beispielsweise durch Transfektionsexperimente mit p53-siRNA oder E2F1-siRNA erfolgen.

5 Zusammenfassung

Monozyten wie auch DCs und Makrophagen sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen unspezifischen Immunsystems. Ein Kennzeichen dieser Zellen ist die Produktion von ROS zur Abtötung von Pathogenen. Im Fall von chronischen Entzündungen oder Infekten kann es zu einer explosionsartigen Freisetzung freier Radikale kommen (*Oxidative Burst*). Aus vorangegangenen Untersuchungen war bekannt, dass die Expression der beiden BER-Proteine XRCC1 und Ligase III α während der Ausreifung humaner Monozyten zu iDCs und mDCs induziert wird (Briegert and Kaina, 2007). Dies lässt vermuten, dass Monozyten aufgrund einer defekten BER eine hohe Sensitivität gegenüber ROS aufweisen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Wirkung von ROS auf humane Monozyten und daraus abgeleiteten DCs und Makrophagen untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Monozyten eine hohe Sensitivität gegenüber oxidativem Stress aufweisen, was auf eine höhere ESB-Rate zurückzuführen war. Ursache hierfür ist das Fehlen der BER-Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1. Die fehlende Expression dieser Proteine resultierte letztendlich in Monozyten in einem Defekt der BER und DNA-Einzelstrangbruchreparatur.

Die Proteine XRCC1, Ligase III α und PARP-1 sind auch Bestandteil des B-NHEJ-Apparats, was auf eine Beeinträchtigung der Monozyten hinsichtlich der Prozessierung von DSBs schließen lässt. Zur Untersuchung dieser Vermutung, wurde die Wirkung von IR auf Monozyten, DCs und Makrophagen bestimmt. Monozyten zeigten eine signifikant höhere Sensitivität gegenüber IR als DCs und Makrophagen, was auf eine erhöhte DSB-Rate in den Monozyten nach IR zurückzuführen war. Expressionsanalysen und ein DNA-PK-Aktivitäts-Assay zeigten zusätzlich, dass Monozyten keine DNA-PKcs, ein bedeutender Faktor des C-NHEJ, exprimieren. Somit haben Monozyten sowohl einen Defekt im B-NHEJ als auch im C-NHEJ und sind demnach nicht in der Lage, DSBs zu reparieren.

Auch gegenüber dem Alkylanz und Chemotherapeutikum Temozolomid bewirken die Reparaturdefekte eine hohe Sensitivität der Monozyten. Zur Therapie von Hirntumoren werden neben der Operation, die Bestrahlung und Chemotherapie mit Temozolomid angewendet. Die hohe Sensitivität von Monozyten gegenüber IR und Temozolomid könnte eine Erklärung für die starke Immunsuppression bei einer derartigen Therapie sein.

6 Anhang

6.1 CD-Antigene

Tabelle 6.1: CD-Antigene humaner Monozyten, DCs und Makrophagen.

Monozyten	DCs	Makrophagen
CD4	CD1a, b, c, d	CD4
CD9	CD11b, c (myeloid)	CD11a, b, c
CD11a, b, c	CD15u (myeloid)	CD15u
CDw12	CD21 (follikulär)	CD16
CD13	CD23 (follikulär)	CD23 (aktiviert)
CD14	CD35 (follikulär)	CD26
CD15	CD37 (myeloid)	CD37
CD15u	CD39	CD39
CDw17	CD40	CD40
CD25	CD80	CD45RO, RB
CD30	CD83	CD61
CD31	CD85	CD63
CD32	CD86	CD64
CD33	CD101	CD68
CD35	CD111 (myeloid)	CD69 (aktiviert)
CD36	CD112 (myeloid)	CD70
CD37	CD148	CD74
CD45RO, RA, RB	CD157 (follikulär)	CD87
CD49a, b, d, e, f	CD177 (myeloid)	CD88
CD50	CD203c (myeloid)	CD89
CD52	CD204 (myeloid)	CD203c
CD57	CD205	CD105 (aktiviert)
CD62L	CD206 (Subpopulationen)	CD111
CD63	CD207 (Langerhans Zellen)	CD112
CD64	CD208 (Intergiditative DCs in lymphoiden Organen)	CD115
CD65	CD209	CD119
CD68	CD252	CDw121b
CD74	CD256 (myeloid)	CD153 (aktiviert)
CDw84	CD257 (myeloid)	CD155
CD86	CD258 (unreif)	CD163
CD87	CD271 (follikulär)	CD169 (Subpopulationen)
CD89	CD273	CD177
CD91	CD274	CD204
CD92	CD275	CD206
CD93	CD276 (Subpopulationen)	CDw210
CD97	CD277	CD256
CD101	CD289 (Subpopulationen)	CD257
CD102	CD300a, c, e	CD280 (Subpopulationen)
CD105 (aktiviert)	CD301 (unreif)	
CD111	CD302	
CD112	CD303 (Subpopulationen)	
CD114	CD304 (Subpopulationen)	
CD115	CD312 (Subpopulationen)	
CD116		

Anhang

CD119	CD319 (Subpopulationen)	
CDw121b	CD320 (follikulär)	
CDw123		
CD127		
CDw136		
CD142		
CD148		
CD155		
CD156a		
CD157		
CD162		
CD163		
CD168		
CD171		
CD172a		
CD177		
CD203c		
CD204		
CDw210		
CD213a1, 2		
CD226		
CD256		
CD257		
CD273 (aktiviert)		
CD274 (aktiviert)		
CD276 (aktiviert)		
CD277		
CD281		
CD282		
CD284 (schwach)		
CD300a, c, e		
CD302		
CD305		
CD312		
CD315 (aktiviert)		
CD322		
CDw328		
CDw329		

6.2 Primer des PCR-Arrays

Tabelle 6.2: Liste der auf dem PCR-Array untersuchten Gene mit jeweiligem Primerpaar.

Gen	up	low
<i>ACTB</i>	TGGCATCCACGAACTACC	GTGTTGGCGTACAGGTCTT
<i>AKT1</i>	ATTGTGAAGGAGGGTTGG	TGAAGGTGCCATCATTCT
<i>APE</i>	AGGATTAGATTGGGTAAAGGA	GCTGGTAGTTTGTCTCTG
<i>ARHGDI1</i>	TCGTTTGTGCTGAAGGAG	TCATGCCGGACACTATCT
<i>ATG3</i>	AGGACAATATAAGGCTTCAA	TTCCAACAATCCACTCTC
<i>ATG7</i>	GAACCTCAGTGAATGTATG	AACCTTGTCCAAGTCTAA
<i>ATM</i>	CAAGATGTTTCATAGAGTT	TGAGGAAGATAGTAAGAG
<i>BAX</i>	ATCAGATGTGGTCTATAATG	CAGAAGGCACTAATCAAG
<i>BCL-2</i>	CGACTCCTGATTCATTGG	TCTACTTCCTCTGTGATGT
<i>BECN1</i>	GGATGGAAGGGTCTAAGA	CTGTGGTAAGTAATGGAG
<i>BID</i>	GAAGACAGGCTGGAAGATA	GTGTGGATGATATGAAGGC
<i>BIRC3</i>	TGGTAATGAGATGTGATG	GTAAGAGGTTCTGAGTC
<i>BRCA1</i>	AAGACTTCTACAGAGTGAA	CAGTTCCAAGTTAGAGA
<i>BRCA2</i>	AACAACAATTACGAACCAA	AACATTCCTTCCTAAGTCTA
<i>CASP2</i>	GAGAGAAAGAACTGGAATT	TCTGGTCACATAGAACAT
<i>CCNA1</i>	ATTTCAACACAGTTTCCC	CAGCATATTCAGTCACATT
<i>CCNB1</i>	CCTTCGGAGAGCATCTAA	CATAGTTAGTTCCATCAGGTATT
<i>CCNE1</i>	GCAAATAGAGAGGAAGTC	ATTAACCAATCCAGAAGAAT
<i>CD44</i>	GGACCAATTACCATAACTATT	AGGATTCGTTCTGTATTCT
<i>CDC25A</i>	GTGAAGAACAACAGTAATC	TGAGGTAGGGAATGTATT
<i>CDC25B</i>	CGTGACCTTGATTGAGTT	TCCCGGAAGTTTGCTAAA
<i>CDKN1A</i>	TACATCTTCTGCCTTAGT	TCTTAGGAACCTCTCATT
<i>CDKN1B</i>	ACAGCTCGAATTAAGAATA	CTTATACAGGATGTCCATT
<i>CHK1</i>	CCACCTCTTCATAACAACAA	TAAATCACAATCGCCACTC

<i>CHK2</i>	GCACTGTCACTAAGCAGAAAT	AGGCACCACTTCCAAGAG
<i>C-JUN</i>	ATGGAAACGACCTTCTATG	TCTTGGGGTACTGTAGC
<i>CXCR4</i>	GCCTTACTACATTGGGAT	ACAGTGTCTCAAACCTCA
<i>CYP1A1</i>	CTGCTTAGCCTAGTCAAC	GGTAGGTAGCGAAGAATAG
<i>CYP1B1</i>	TCCGTCCCCATCCCAATC	CCTCACTGGAAGCTTTAACT
<i>DDB2</i>	TTTAACCCTCTCAATACCA	CTACTAGCAGACACATCC
<i>DDIT3</i>	ACTGAGCGTATCATGTAA	CAGGTGTGGTGATGTATG
<i>ERCC1</i>	AGGAAGAAATTTGTGATAC	TGTGTAGATCGGAATAAG
<i>FANCC</i>	AGATGTATGAAGCCTTGAA	AGACAACATAAGCACCAT
<i>FASL</i>	CAATCTTACCAGTGCTGAT	AATCCCAAAGTGCTTCTC
<i>FASR</i>	TTATCTGATGTTGACTTGAGTAA	GGCTTCATTGACACCATT
<i>FEN-1</i>	CGGGAGAATGACATCAAG	AACAGCAATCAGGAACTG
<i>FOS</i>	TCAGTGGAACCTGTCAAGA	TGGATGATGCTGGGAACA
<i>GADD45A</i>	ATCCACATTCATCTCAAT	GTA ACTACAAAGGTATTTCA
<i>GAPDH</i>	CATGAGAAGTATGACAACAG	ATGAGTCCTTCCACGATA
<i>GPX1</i>	GCCAAGAACGAAGAGATT	TCGAAGAGCATGAAGTTG
<i>GSTM1</i>	ACTATCCTTCGTGAACATC	AGACACAACCACTAACAG
<i>HIF1A</i>	TATTTGCGTGTGAGGAAA	CATCTGTGAGAACCATAAC
<i>HMOX1</i>	CAACAAAGTGCAAGATTC	AGAAAGCTGAGTGTAAGG
<i>HSP90AA1</i>	AGTTATCCTACACCTGAA	CATCATCGCTTACTTCTT
<i>HSP1B</i>	GGACTTTGACAACAGGCT	GCTTGTTCTGGCTGATGT
<i>HUS1</i>	TGTTATCTATGTCAAGCAGTA	CGGTTCTTGTAAGTCCTT
<i>ICAM1</i>	AAGAAGATAGCCAACCAATGT	TACACGGTGAGGAAGGTT
<i>IL6</i>	CCAATCTGGATTCAATGA	GTTCCCTCACTACTCTCAA
<i>ITGB1</i>	GAGGATTACTTCGGACTTCA	GCTGGTGTTGTGCTAATG
<i>LAMP1</i>	GCTCCAAAGAAATCAAGACTGT	GGTGCCACTAACACATCTG
<i>LIG I</i>	GAAGTGGAACAGAGAAG	CTTTGGAGGTCTTTAGGG

<i>LIG III</i>	GCTATATGTCTTTGGCTTTC	GGAATAGGCACAGTTCTT
<i>LIG IV</i>	TGAGCACATTGAGAAGGA	CAGTAGGAGAAGCACCAA
<i>MDM2</i>	ATCTTGATGCTGGTGTA	AGGCTATAATCTTCTGAGTC
<i>MGMT</i>	CTCTTCACCATCCCGTTT	AATCACTTCTCCGAATTTTAC
<i>MMP3</i>	GAAGTTACTAGCAAGGACCTC	TCCAGCTCGTACCTCATT
<i>MMP 7</i>	TTGATAAGCACTGTTCCCT	GCAAGTATAGATGAATAAGACA
<i>MMP 13</i>	GGCTCTTAATGGTTATGAC	GCACTTATCTTCTTAACTTCT
<i>MPG</i>	CAACCGAGGCATGTTTCAT	TGGAGATGTTTCATGCAGAAG
<i>MRE11</i>	GCCTGTCCAGTTTGAAT	GGTTGCCATCTTGATAGTT
<i>MSH2</i>	CTTCTTCTGGTTCGTCAGTATAGA	ATCATTCTCCTTGGATGCCTTAT
<i>NOS2</i>	AATCCAGATAAGTGACATAAG	CTCCACATTGTTGTTGAT
<i>NOS3</i>	CAAGGAGACGAAGAGAAC	TGGAGTCTTGTGTAGGATA
<i>NOX1</i>	CTCTCCAGCCTATCTCAT	AATGTCACATACTCCACTG
<i>OGG1</i>	AAGAGGTGGCTCAGAAAT	GATGTTGTTGTTGGAGGAA
<i>PARP-1</i>	GAACGACCTGATCTGGAA	CACTTGCTGCTTGTGAA
<i>PCNA</i>	TTACCATAGAGATGAATGAACCA	AGTGTCACCGTTGAAGAG
<i>POLD1</i>	TCTGGGATGATGATGATGC	GTGTTCTGCCTCCATCTC
<i>POLE</i>	TTTGGCATTGACATTGAG	AATCATCATAATCTGGTCTGT
<i>PTEN</i>	ATCATCAAAGAGATCGTTA	ACCTTACTACATCATCAATA
<i>RAC1</i>	ATCAGTTACACAACCAAT	CGTAATCTGTCATAATCTTC
<i>RAD51</i>	AATTAGTTCCAATGGGTTT	TGAAGTAGTTTGTCAAGC
<i>REV1</i>	AACACATATTATTGCCACAA	GAATGTAGGAGAGGAGTC
<i>REV3L</i>	AGTGTCATTAGTATCAGGAA	TGTAGGAGGTAGGGAATA
<i>RHOA</i>	CCGATGTTATACTGATGTG	ACAGAAATGCTTGACTTC
<i>RHOB</i>	TGATCGTGTTTCAGTAAGGAC	CAATGTCGGCCACATAGTT
<i>SELE</i>	GCTATGACTTATGATGAG	ATTCCAATCCAGTAATAAC
<i>SOD1</i>	TCTGTTTCAATGACCTGTATT	GCCTCATAATAAGTGCCATA

<i>TIAM1</i>	TAATGCTCTGAATCCTAGTC	GAAACAGAAGAGGCTTTG
<i>TIMP2</i>	AAGGAAGTGGACTCTGGAA	CTTTGAACATCTTTATCTGCTTGA
<i>TOPO2A</i>	ACGGTGTGGATATTCTAAG	AAGCGAGCCTGATTATTC
<i>TOPO2B</i>	ATAACATTCCAACCAGAT	GGCAATTTCTTTCCATTA
<i>TREX1</i>	TCATGTGAAGAGGGAGAC	GAAGTTGGAGAGGGTGAG
<i>TXNRD1</i>	CGAAATTATGGATGGAAAGTC	GAGCCAATGTGATTCTGTA
<i>TP53</i>	AGCACTAAGCGAGCACTG	ACGGATCTGAAGGGTGAAA
<i>TP63</i>	ATTGTTCTCCGTTTCGTTGATA	GTAAGGGTCAGGGCAGTA
<i>TP73</i>	CACTTTGAGGTCACCTTC	ATCTGGCAGTAGAGTTTC
<i>VCAM1</i>	TGTCATTGAGGATATTGGAA	ATAACTGTATTCTTGGGTGAT
<i>WEE1</i>	TTCCAGAGATTAAGACAA	ATATTCACTTGAGGAGTC
<i>WRN</i>	AAGATGTGCTGTAGAAGAA	TCGTAACTATACACAATGGA
<i>WRNIP1</i>	CTGGAGACCAACGAAATC	TAATGTCACAAACCTTATGC
<i>XPA</i>	AAGGAAGTCCGACAGGAA	ACACGCTGCTTCTTACTG
<i>XPC</i>	ACACCTACTACCTCTCAA	TAAATAGCAAATCTCCTTTCC
<i>XRCC1</i>	GAGGAAGTTGGATTTGAA	ATTTAGGTCTCTTGGGAA
<i>XRCC3</i>	CATTGTTCTGTCTTTCT	CTCCTTTACCGATTCAG
<i>XRCC4</i>	GTGTGAGTGCTAAGGAAG	CTCATCATAGACTGGATCTC

6.3 Ergebnis des PCR-Arrays

Tabelle 6.3: Ergebnis des PCR-Arrays von Monozyten, DCs und Makrophagen. Induktionsfaktoren der Genexpression in DCs und Makrophagen zweier verschiedener Spender im Vergleich zu Monozyten. Expression der Monozyten wurde gleich 1 gesetzt. *ACTB*-PCR diente jeweils als Abgleich der eingesetzten RNA-Menge. *: die Expressionsanalyse der Gene *CYP1A1*, *POLD1*, *VCAM1*, *SELE*, *WEE1*, *P63*, *TREX1*, *MMP13*, *NOS3*, *NOX1*, *CDC25A*, *P73* und *MMP3* wurden wegen mangelnder Qualität aus der Auswertung ausgeschlossen.

Gen	<u>Spender I</u>		<u>Spender II</u>	
	IF DC	IF Mph	IF DC	IF Mph
<u>„DDR“</u>				
<i>APE</i>	4,10	5,12	2,16	1,99
<i>ATM</i>	1,67	1,91	0,94	0,73
<i>BRCA1</i>	2,03	2,04	0,99	0,71
<i>BRCA2</i>	2,13	1,69	1,29	0,81
<i>DDB2</i>	2,05	2,55	2,11	1,31
<i>ERCC1</i>	0,84	2,57	0,49	1,02
<i>FANCC</i>	2,90	3,28	1,69	1,87
<i>FEN-1</i>	4,41	4,24	5,56	4,11
<i>GADD45a</i>	1,48	2,43	2,02	1,57
<i>HUS1</i>	1,00	1,73	1,27	0,90
<i>LIG I</i>	2,39	2,98	1,75	1,17
<i>LIG III</i>	0,71	0,85	0,57	0,43
<i>LIG IV</i>	2,66	2,78	1,84	0,88
<i>MGMT</i>	1,56	1,89	1,15	1,13
<i>MPG</i>	4,75	3,91	2,53	2,16
<i>MRE11a</i>	1,52	2,38	1,44	1,25
<i>MSH2</i>	1,73	1,52	1,12	0,49
<i>OGG1</i>	2,58	3,90	1,07	1,42
<i>PARP-1</i>	4,44	3,85	3,67	1,77
<i>PCNA</i>	1,67	2,04	1,27	1,09
<i>POLD1</i>	*	*	*	*

Anhang

<i>POLE</i>	3,65	1,56	1,95	1,01
<i>RAD51</i>	1,49	1,00	1,42	1,33
<i>REV1</i>	1,13	1,44	0,84	0,50
<i>REV3L</i>	0,45	0,84	0,54	0,37
<i>TOPO2B</i>	3,11	5,64	2,03	1,56
<i>TOPOIIA</i>	3,89	10,00	2,49	7,68
<i>TREX1</i>	*	*	*	*
<i>WRN</i>	1,45	2,43	1,67	1,21
<i>WRNIP1</i>	4,64	4,85	3,13	2,26
<i>XPA</i>	0,61	0,66	0,49	0,31
<i>XPC</i>	8,32	8,57	5,98	6,44
<i>XRCC1</i>	2,44	3,55	1,76	2,51
<i>XRCC3</i>	1,88	1,50	1,70	1,16
<i>XRCC4</i>	1,26	1,93	0,95	1,16
<u>„Stress Signaling“</u>				
<i>AKT1</i>	3,18	4,37	3,10	2,41
<i>ARHGDI1A</i>	0,96	2,05	1,04	0,98
<i>BIRC3</i>	1,44	0,85	6,93	0,99
<i>C-JUN</i>	1,43	0,62	0,93	0,56
<i>CYP1A1</i>	*	*	*	*
<i>CYP1B1</i>	6,87	6,93	5,09	5,43
<i>DDIT3</i>	8,32	9,60	2,13	4,48
<i>FASL</i>	5,01	0,28	1,52	0,39
<i>FASR</i>	6,84	7,46	5,59	3,75
<i>FOS</i>	0,39	0,36	0,38	0,14
<i>GPX1</i>	2,29	3,27	1,17	1,35
<i>GSTM1</i>	1,75	1,32	1,70	1,73
<i>HIF1A</i>	0,85	4,32	0,93	2,02
<i>HMOX1</i>	0,78	0,67	0,59	0,25
<i>HSPA1B</i>	8,59	6,02	2,72	1,95
<i>IL6</i>	1,39	0,25	0,86	0,11

Anhang

<i>MDM2</i>	1,23	2,24	1,18	1,31
<i>NOS2</i>	2,07	2,25	1,39	1,09
<i>NOS3</i>	*	*	*	*
<i>NOX1</i>	*	*	*	*
<i>RAC1</i>	1,18	1,54	0,63	0,77
<i>RHOA</i>	2,78	4,73	2,45	2,38
<i>RHOB</i>	1,11	0,87	0,65	0,24
<i>SOD1</i>	1,65	2,06	1,19	1,23
<i>TIAM1</i>	2,10	1,90	3,43	1,58
<i>TP53</i>	2,32	3,26	1,91	0,88
<i>TP63</i>	*	*	*	*
<i>TP73</i>	*	*	*	*
<i>TXNRD1</i>	1,92	2,53	0,76	1,25
<i>WEE1</i>	*	*	*	*
<u>„Tumor assoziiert“</u>				
<i>CD44</i>	1,74	4,12	1,60	1,87
<i>CXCR4</i>	0,84	1,23	1,33	0,72
<i>ICAM1</i>	3,43	4,27	1,72	1,05
<i>ITGB1</i>	4,85	10,07	5,47	4,81
<i>LAMP1</i>	2,10	2,52	1,85	1,25
<i>MMP13</i>	*	*	*	*
<i>MMP3</i>	*	*	*	*
<i>MMP7</i>	0,01	0,02	0,00	0,06
<i>SELE</i>	*	*	*	*
<i>TIMP2</i>	2,86	3,28	2,07	1,48
<i>VCAM1</i>	*	*	*	*
<u>„Zellzyklus/Zelltod“</u>				
<i>ATG3</i>	4,24	5,37	0,97	1,06
<i>ATG7</i>	1,65	2,69	1,28	1,36
<i>BAX</i>	1,55	1,41	1,37	0,71

Anhang

<i>BCL2</i>	1,34	1,22	0,58	0,60
<i>BECN1</i>	3,59	5,23	1,40	1,54
<i>BID</i>	0,92	1,47	0,67	0,66
<i>CASP2</i>	6,77	5,42	7,07	2,12
<i>CCNA1</i>	93,28	48,00	109,35	47,20
<i>CCNB1</i>	3,95	4,74	4,74	4,93
<i>CCNE1</i>	3,95	1,95	3,49	1,62
<i>CDC25A</i>	*	*	*	*
<i>CDC25B</i>	2,39	2,87	2,95	1,85
<i>CDKN1A</i>	29,56	19,95	12,89	6,48
<i>CDKN1B</i>	1,84	2,66	2,41	1,80
<i>CHK1</i>	6,75	6,97	7,63	4,81
<i>CHK2</i>	1,74	1,37	1,18	0,44
<i>GAPDH</i>	1,02	2,33	0,95	2,00
<i>HSP90AA1</i>	0,92	0,71	0,60	0,18
<i>PTEN</i>	3,11	4,55	2,15	1,37

7 Literatur

- Acehan, D., X. Jiang, et al. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: Implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*, **9**(2): 423-32.
- Adams, J. M. (2003). Ways of dying: Multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev*, **17**(20): 2481-95.
- Adimoolam, S. and J. M. Ford (2003). P53 and regulation of DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)*, **2**(9): 947-54.
- Ahel, I., U. Rass, et al. (2006). The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature*, **443**(7112): 713-6.
- Ahn, J. Y., X. Li, et al. (2002). Phosphorylation of threonine 68 promotes oligomerization and autophosphorylation of the chk2 protein kinase via the forkhead-associated domain. *J Biol Chem*, **277**(22): 19389-95.
- Akbari, M., J. Pena-Diaz, et al. (2009). Extracts of proliferating and non-proliferating human cells display different base excision pathways and repair fidelity. *DNA Repair (Amst)*, **8**(7): 834-43.
- Allen, R. T., M. W. Cluck, et al. (1998). Mechanisms controlling cellular suicide: Role of bcl-2 and caspases. *Cell Mol Life Sci*, **54**(5): 427-45.
- Ang, K. P., H. K. Tan, et al. (2011). Cryptotanshinone attenuates in vitro oxLDL-induced pre-lesional atherosclerotic events. *Planta Med*, **77**(16): 1782-7.
- Aruoma, O. I., B. Halliwell, et al. (1989). Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *J Biol Chem*, **264**(34): 20509-12.
- Ashwell, S. and S. Zabludoff (2008). DNA damage detection and repair pathways--recent advances with inhibitors of checkpoint kinases in cancer therapy. *Clin Cancer Res*, **14**(13): 4032-7.
- Audebert, M., B. Salles, et al. (2004). Involvement of poly(adp-ribose) polymerase-1 and xrcc1/DNA ligase iii in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J Biol Chem*, **279**(53): 55117-26.
- Audebert, M., B. Salles, et al. (2006). Involvement of polynucleotide kinase in a poly(adp-ribose) polymerase-1-dependent DNA double-strand breaks rejoining pathway. *J Mol Biol*, **356**(2): 257-65.

- Babior, B. M. (1999). NADPH oxidase: An update. *Blood*, **93**(5): 1464-76.
- Bakkenist, C. J. and M. B. Kastan (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, **421**(6922): 499-506.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, **392**(6673): 245-52.
- Banin, S., L. Moyal, et al. (1998). Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. *Science*, **281**(5383): 1674-7.
- Bartsch, H. and J. Nair (2000). New DNA-based biomarkers for oxidative stress and cancer chemoprevention studies. *Eur J Cancer*, **36**(10): 1229-34.
- Batts, E. D., C. Maisel, et al. (2007). O6-benzylguanine and BCNU in multiple myeloma: A phase II trial. *Cancer Chemother Pharmacol*, **60**(3): 415-21.
- Bauer, M., M. Goldstein, et al. (2011). Human monocytes are severely impaired in base and DNA double-strand break repair that renders them vulnerable to oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**(52): 21105-21110.
- Bauer, M., M. Goldstein, et al. (2012). Human monocytes undergo excessive apoptosis following temozolomide activating the ATM/ATR pathway while dendritic cells and macrophages are resistant. *PLoS One*, **7**(6): e39956.
- Beger, R. D. and P. H. Bolton (1998). Structures of apurinic and apyrimidinic sites in duplex DNAs. *J Biol Chem*, **273**(25): 15565-73.
- Bei, R., L. Marzocchella, et al. (2010). The use of temozolomide for the treatment of malignant tumors: Clinical evidence and molecular mechanisms of action. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, **5**(3): 172-87.
- Bender, A. T., C. L. Ostenson, et al. (2005). Selective up-regulation of pde1b2 upon monocyte-to-macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(2): 497-502.
- Bennardo, N., A. Cheng, et al. (2008). Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet*, **4**(6): e1000110.
- Bennett, S. E., J. S. Sung, et al. (2001). Fidelity of uracil-initiated base excision DNA repair in DNA polymerase beta-proficient and -deficient mouse embryonic fibroblast cell extracts. *J Biol Chem*, **276**(45): 42588-600.
- Beranek, D. T. (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res*, **231**(1): 11-30.

- Boldin, M. P., T. M. Goncharov, et al. (1996). Involvement of mach, a novel mort1/fadd-interacting protease, in fas/apo-1- and tnf receptor-induced cell death. *Cell*, **85**(6): 803-15.
- Boldin, M. P., E. E. Varfolomeev, et al. (1995). A novel protein that interacts with the death domain of fas/apo1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem*, **270**(14): 7795-8.
- Bolzan, A. D. and M. S. Bianchi (2002). Genotoxicity of streptozotocin. *Mutat Res*, **512**(2-3): 121-34.
- 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**: 248-54.
- Brenner, D. J. and J. F. Ward (1992). Constraints on energy deposition and target size of multiply damaged sites associated with DNA double-strand breaks. *Int J Radiat Biol*, **61**(6): 737-48.
- Breslin, C. and K. W. Caldecott (2009). DNA 3'-phosphatase activity is critical for rapid global rates of single-strand break repair following oxidative stress. *Mol Cell Biol*, **29**(17): 4653-62.
- Briegert, M., A. H. Enk, et al. (2007). Change in expression of mgmt during maturation of human monocytes into dendritic cells. *DNA Repair (Amst)*, **6**(9): 1255-63.
- Briegert, M. and B. Kaina (2007). Human monocytes, but not dendritic cells derived from them, are defective in base excision repair and hypersensitive to methylating agents. *Cancer Res*, **67**(1): 26-31.
- Brown, M. L., D. Franco, et al. (2002). Role of poly(adp-ribosyl)ation in DNA-pkcs-independent v(d)j recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**(7): 4532-7.
- Burma, S., B. P. Chen, et al. (2001). Atm phosphorylates histone h2ax in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*, **276**(45): 42462-7.
- Caldecott, K. W. (2003). Protein-protein interactions during mammalian DNA single-strand break repair. *Biochem Soc Trans*, **31**(Pt 1): 247-51.
- Caldecott, K. W., S. Aoufouchi, et al. (1996). Xrcc1 polypeptide interacts with DNA polymerase beta and possibly poly (adp-ribose) polymerase, and DNA ligase iii is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro. *Nucleic Acids Res*, **24**(22): 4387-94.

- Caldecott, K. W., C. K. McKeown, et al. (1994). An interaction between the mammalian DNA repair protein xrc1 and DNA ligase iii. *Mol Cell Biol*, **14**(1): 68-76.
- Carson, C. T., R. A. Schwartz, et al. (2003). The mre11 complex is required for atm activation and the g2/m checkpoint. *Embo J*, **22**(24): 6610-20.
- Chai, J., C. Du, et al. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by smac/diablo. *Nature*, **406**(6798): 855-62.
- Chappell, C., L. A. Hanakahi, et al. (2002). Involvement of human polynucleotide kinase in double-strand break repair by non-homologous end joining. *Embo J*, **21**(11): 2827-32.
- Chehab, N. H., A. Malikzay, et al. (2000). Chk2/hcds1 functions as a DNA damage checkpoint in g(1) by stabilizing p53. *Genes Dev*, **14**(3): 278-88.
- Chen, D., Z. Yu, et al. (2008). E2f1 regulates the base excision repair gene xrc1 and promotes DNA repair. *J Biol Chem*, **283**(22): 15381-9.
- Chen, L., S. N. Willis, et al. (2005). Differential targeting of prosurvival bcl-2 proteins by their bh3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell*, **17**(3): 393-403.
- Cheng, Q., N. Barboule, et al. (2011). Ku counteracts mobilization of parp1 and mrn in chromatin damaged with DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res*, **39**(22): 9605-19.
- Chinnaiyan, A. M. and V. M. Dixit (1996). The cell-death machine. *Curr Biol*, **6**(5): 555-62.
- Chou, J. J., H. Li, et al. (1999). Solution structure of bid, an intracellular amplifier of apoptotic signaling. *Cell*, **96**(5): 615-24.
- Christmann, M., M. Pick, et al. (2001). Acquired resistance of melanoma cells to the antineoplastic agent fotemustine is caused by reactivation of the DNA repair gene mgmt. *Int J Cancer*, **92**(1): 123-9.
- Christmann, M., M. T. Tomicic, et al. (2006). C-fos is required for excision repair of uv-light induced DNA lesions by triggering the re-synthesis of xpf. *Nucleic Acids Res*, **34**(22): 6530-9.
- Christmann, M., M. T. Tomicic, et al. (2003). Mechanisms of human DNA repair: An update. *Toxicology*, **193**(1-2): 3-34.
- Coleman, D. L. (1986). Regulation of macrophage phagocytosis. *Eur J Clin Microbiol*, **5**(1): 1-5.

- Cotter, T. G. (2009). Apoptosis and cancer: The genesis of a research field. *Nat Rev Cancer*, **9**(7): 501-7.
- Cregan, S. P., V. L. Dawson, et al. (2004). Role of aif in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene*, **23**(16): 2785-96.
- Critchlow, S. E. and S. P. Jackson (1998). DNA end-joining: From yeast to man. *Trends Biochem Sci*, **23**(10): 394-8.
- D'Errico, M., E. Parlanti, et al. (2006). New functions of xpc in the protection of human skin cells from oxidative damage. *Embo J*, **25**(18): 4305-15.
- Dahm-Daphi, J., C. Sass, et al. (2000). Comparison of biological effects of DNA damage induced by ionizing radiation and hydrogen peroxide in cho cells. *Int J Radiat Biol*, **76**(1): 67-75.
- Dahm, K. (2008). Role and regulation of human xrcc4-like factor/cernunnos. *J Cell Biochem*, **104**(5): 1534-40.
- Dart, D. A., K. E. Adams, et al. (2004). Recruitment of the cell cycle checkpoint kinase atr to chromatin during s-phase. *J Biol Chem*, **279**(16): 16433-40.
- Date, H., S. Igarashi, et al. (2004). The fha domain of aprataxin interacts with the c-terminal region of xrcc1. *Biochem Biophys Res Commun*, **325**(4): 1279-85.
- de Murcia, G. and J. Menissier de Murcia (1994). Poly(adp-ribose) polymerase: A molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci*, **19**(4): 172-6.
- De Vleeschouwer, S., S. Fieuws, et al. (2008). Postoperative adjuvant dendritic cell-based immunotherapy in patients with relapsed glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*, **14**(10): 3098-104.
- Desai-Mehta, A., K. M. Cerosaletti, et al. (2001). Distinct functional domains of nibrin mediate mre11 binding, focus formation, and nuclear localization. *Mol Cell Biol*, **21**(6): 2184-91.
- Dianov, G. L., N. Souza-Pinto, et al. (2001). Base excision repair in nuclear and mitochondrial DNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **68**: 285-97.
- Dianova, II, V. A. Bohr, et al. (2001). Interaction of human ap endonuclease 1 with flap endonuclease 1 and proliferating cell nuclear antigen involved in long-patch base excision repair. *Biochemistry*, **40**(42): 12639-44.
- Dianova, II, K. M. Sleeth, et al. (2004). Xrcc1-DNA polymerase beta interaction is required for efficient base excision repair. *Nucleic Acids Res*, **32**(8): 2550-5.

- DiJulio, J. (1991). Hematopoiesis: An overview. *Oncol Nurs Forum*, **18**(2 Suppl): 3-6.
- Dimmeler, S., K. Breitschopf, et al. (1999). Dephosphorylation targets bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: A link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J Exp Med*, **189**(11): 1815-22.
- Ding, Q., Y. V. Reddy, et al. (2003). Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol*, **23**(16): 5836-48.
- Du, C., M. Fang, et al. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating iap inhibition. *Cell*, **102**(1): 33-42.
- Duchstein, H. J., S. Riederer, et al. (1999). [active nitrogen species. A new research area for pharmaceutical chemistry]. *Pharm Unserer Zeit*, **28**(4): 197-207.
- Dunand-Sauthier, I., M. L. Santiago-Raber, et al. (2011). Silencing of c-fos expression by microrna-155 is critical for dendritic cell maturation and function. *Blood*, **117**(17): 4490-500.
- Durackova, Z. (2009). Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res*.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, et al. (1993). Waf1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, **75**(4): 817-25.
- Enari, M., H. Sakahira, et al. (1998). A caspase-activated dnase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor icad. *Nature*, **391**(6662): 43-50.
- Enk, A. H., H. Jonuleit, et al. (1997). Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. *Int J Cancer*, **73**(3): 309-16.
- Epe, B. (1991). Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem Biol Interact*, **80**(3): 239-60.
- Epe, B. (1996). DNA damage profiles induced by oxidizing agents. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, **127**: 223-49.
- Erl, W., P. C. Weber, et al. (1998). Monocytic cell adhesion to endothelial cells stimulated by oxidized low density lipoprotein is mediated by distinct endothelial ligands. *Atherosclerosis*, **136**(2): 297-303.
- Ermak, N., B. Lacour, et al. (2008). Role of reactive oxygen species and bax in oxidized low density lipoprotein-induced apoptosis of human monocytes. *Atherosclerosis*, **200**(2): 247-56.

- Fahrbach, K. M., S. M. Barry, et al. (2007). Activated cd34-derived langerhans cells mediate transinfection with human immunodeficiency virus. *J Virol*, **81**(13): 6858-68.
- Fan, J., M. Otterlei, et al. (2004). Xrcc1 co-localizes and physically interacts with pcna. *Nucleic Acids Res*, **32**(7): 2193-201.
- Fang, F. C. and A. Vazquez-Torres (2002). Nitric oxide production by human macrophages: There's no doubt about it. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **282**(5): L941-3.
- Faris, M., K. M. Latinis, et al. (1998). Stress-induced fas ligand expression in t cells is mediated through a mek kinase 1-regulated response element in the fas ligand promoter. *Mol Cell Biol*, **18**(9): 5414-24.
- Forman, H. J. and M. Torres (2001). Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med*, **22**(4-5): 189-216.
- Fortini, P. and E. Dogliotti (2007). Base damage and single-strand break repair: Mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair (Amst)*, **6**(4): 398-409.
- Frankenberg-Schwager, M. and D. Frankenberg (1990). DNA double-strand breaks: Their repair and relationship to cell killing in yeast. *Int J Radiat Biol*, **58**(4): 569-75.
- Frasca, D., P. Barattini, et al. (2000). Modulation of x-ray-induced damage recognition and repair in ageing human peripheral blood mononuclear cells by an interleukin-6-type cytokine. *Mech Ageing Dev*, **121**(1-3): 5-19.
- Frassanito, M. A., A. Cusmai, et al. (2001). Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: Relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood*, **97**(2): 483-9.
- Friedland, W., P. Jacob, et al. (1999). Simulation of DNA fragment distributions after irradiation with photons. *Radiat Environ Biophys*, **38**(1): 39-47.
- Fritz, G., K. Tano, et al. (1991). Inducibility of the DNA repair gene encoding o6-methylguanine-DNA methyltransferase in mammalian cells by DNA-damaging treatments. *Mol Cell Biol*, **11**(9): 4660-8.
- Fuentes-Prior, P. and G. S. Salvesen (2004). The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J*, **384**(Pt 2): 201-32.
- Fulda, S. and K. M. Debatin (2006). Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*, **25**(34): 4798-811.

- Gatei, M., K. Sloper, et al. (2003). Ataxia-telangiectasia-mutated (atm) and nbs1-dependent phosphorylation of chk1 on ser-317 in response to ionizing radiation. *J Biol Chem*, **278**(17): 14806-11.
- Gillissen, B., F. Essmann, et al. (2003). Induction of cell death by the bh3-only bcl-2 homolog nbk/bik is mediated by an entirely bax-dependent mitochondrial pathway. *Embo J*, **22**(14): 3580-90.
- Giovannetti, A., M. Pierdominici, et al. (2008). Apoptosis in the homeostasis of the immune system and in human immune mediated diseases. *Curr Pharm Des*, **14**(3): 253-68.
- Golden, E. B., I. Pellicciotta, et al. (2012). The convergence of radiation and immunogenic cell death signaling pathways. *Front Oncol*, **2**: 88.
- Goldstein, J. L. and M. S. Brown (1977a). Atherosclerosis: The low-density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism*, **26**(11): 1257-75.
- Goldstein, J. L. and M. S. Brown (1977b). The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem*, **46**: 897-930.
- Gong, J., V. Apostolopoulos, et al. (2000). Selection and characterization of muc1-specific cd8+ t cells from muc1 transgenic mice immunized with dendritic-carcinoma fusion cells. *Immunology*, **101**(3): 316-24.
- Goria-Gatti, L., A. Iannone, et al. (1992). In vitro and in vivo evidence for the formation of methyl radical from procarbazine: A spin-trapping study. *Carcinogenesis*, **13**(5): 799-805.
- Gottlieb, T. M. and S. P. Jackson (1993). The DNA-dependent protein kinase: Requirement for DNA ends and association with ku antigen. *Cell*, **72**(1): 131-42.
- Grombacher, T., U. Eichhorn, et al. (1998). P53 is involved in regulation of the DNA repair gene o6-methylguanine-DNA methyltransferase (mgmt) by DNA damaging agents. *Oncogene*, **17**(7): 845-51.
- Gross, A., J. Jockel, et al. (1998). Enforced dimerization of bax results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Embo J*, **17**(14): 3878-85.
- Gueven, N., O. J. Becherel, et al. (2004). Aprataxin, a novel protein that protects against genotoxic stress. *Hum Mol Genet*, **13**(10): 1081-93.
- Guidarelli, A., F. Cattabeni, et al. (1997a). Alternative mechanisms for hydroperoxide-induced DNA single strand breakage. *Free Radic Res*, **26**(6): 537-47.

- Guidarelli, A., E. Clementi, et al. (1997b). Calcium-dependent mitochondrial formation of species mediating DNA single strand breakage in u937 cells exposed to sublethal concentrations of tert-butylhydroperoxide. *J Pharmacol Exp Ther*, **283**(1): 66-74.
- Guirouilh-Barbat, J., S. Huck, et al. (2004). Impact of the ku80 pathway on nhej-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol Cell*, **14**(5): 611-23.
- Guirouilh-Barbat, J., E. Rass, et al. (2007). Defects in xrcc4 and ku80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(52): 20902-7.
- Gwinn, M. R. and V. Vallyathan (2006). Respiratory burst: Role in signal transduction in alveolar macrophages. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, **9**(1): 27-39.
- Hacker, G. and A. Weber (2007). Bh3-only proteins trigger cytochrome c release, but how? *Arch Biochem Biophys*, **462**(2): 150-5.
- Haince, J. F., S. Kozlov, et al. (2007). Ataxia telangiectasia mutated (atm) signaling network is modulated by a novel poly(adp-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem*, **282**(22): 16441-53.
- Haince, J. F., D. McDonald, et al. (2008). Parp1-dependent kinetics of recruitment of mre11 and nbs1 proteins to multiple DNA damage sites. *J Biol Chem*, **283**(2): 1197-208.
- Halliwell, B. and O. I. Aruoma (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett*, **281**(1-2): 9-19.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1984). Role of iron in oxygen radical reactions. *Methods Enzymol*, **105**: 47-56.
- Halliwell, B. and J. M. Gutteridge (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol*, **186**: 1-85.
- Harper, J. W. and S. J. Elledge (2007). The DNA damage response: Ten years after. *Mol Cell*, **28**(5): 739-45.
- Harris, L. C., J. S. Remack, et al. (1996). Wild-type p53 suppresses transcription of the human o6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res*, **56**(9): 2029-32.

- Hart, D. N. and J. W. Fabre (1981). Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med*, **154**(2): 347-61.
- Hengstler, J. G., B. Tanner, et al. (1999). Activity of o(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in relation to p53 status and therapeutic response in ovarian cancer. *Int J Cancer*, **84**(4): 388-95.
- Hercus, T. R., D. Thomas, et al. (2009). The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: Linking its structure to cell signaling and its role in disease. *Blood*, **114**(7): 1289-98.
- Hofnagel, O., B. Luechtenborg, et al. (2007). Statins and foam cell formation: Impact on ldl oxidation and uptake of oxidized lipoproteins via scavenger receptors. *Biochim Biophys Acta*, **1771**(9): 1117-24.
- Holti, L., R. Ramoner, et al. (2005). Allogeneic dendritic cell vaccination against metastatic renal cell carcinoma with or without cyclophosphamide. *Cancer Immunol Immunother*, **54**(7): 663-70.
- Hou, W. S. and L. Van Parijs (2004). A bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nat Immunol*, **5**(6): 583-9.
- Hsieh, C. C., M. H. Yen, et al. (2001). Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*, **49**(1): 135-45.
- Hudig, D. and S. P. Bajaj (1982). Tissue factor-like activity of the human monocytic tumor cell line u937. *Thromb Res*, **27**(3): 321-32.
- Hume, D. A. (2006). The mononuclear phagocyte system. *Curr Opin Immunol*, **18**(1): 49-53.
- Huttermann, J. (1982). Solid-state radiation chemistry of DNA and its constituents. *Ultramicroscopy*, **10**(1-2): 25-40.
- Iliakis, G., H. Wang, et al. (2004). Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res*, **104**(1-4): 14-20.
- Ismail, I. H. and M. J. Hendzel (2008). The gamma-h2a.X: Is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more? *Environ Mol Mutagen*, **49**(1): 73-82.

- Ismail, I. H., S. Nystrom, et al. (2005). Activation of ataxia telangiectasia mutated by DNA strand break-inducing agents correlates closely with the number of DNA double strand breaks. *J Biol Chem*, **280**(6): 4649-55.
- Jackson, S. P. (2002). Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*, **23**(5): 687-96.
- Jacobson, M. D., M. Weil, et al. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell*, **88**(3): 347-54.
- Jeggo, P. A., M. Hafezparast, et al. (1992). Localization of a DNA repair gene (xrcc5) involved in double-strand-break rejoining to human chromosome 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**(14): 6423-7.
- Jilani, A., D. Ramotar, et al. (1999). Molecular cloning of the human gene, pnkp, encoding a polynucleotide kinase 3'-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage. *J Biol Chem*, **274**(34): 24176-86.
- Jin, R., Y. Sun, et al. (2011). E2f1 is involved in DNA single-strand break repair through cell-cycle-dependent upregulation of xrcc1 expression. *DNA Repair (Amst)*, **10**(9): 926-33.
- Johnson, R. D. and M. Jasin (2000). Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Embo J*, **19**(13): 3398-407.
- Joza, N., G. Kroemer, et al. (2002). Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends Genet*, **18**(3): 142-9.
- Kaina, B. (2003). DNA damage-triggered apoptosis: Critical role of DNA repair, double-strand breaks, cell proliferation and signaling. *Biochem Pharmacol*, **66**(8): 1547-54.
- Karimi-Busheri, F., G. Daly, et al. (1999). Molecular characterization of a human DNA kinase. *J Biol Chem*, **274**(34): 24187-94.
- Kashimura, S., M. Terashima, et al. (2004). [experimental study for a combination chemo-immunotherapy using dendritic cells]. *Gan To Kagaku Ryoho*, **31**(11): 1631-3.
- Katiyar, S. K. (2007). Interleukin-12 and photocarcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*, **224**(3): 220-7.
- Kepp, O., K. Rajalingam, et al. (2007). Bak and bax are non-redundant during infection- and DNA damage-induced apoptosis. *Embo J*, **26**(3): 825-34.

- Khanna, K. K. and S. P. Jackson (2001). DNA double-strand breaks: Signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet*, **27**(3): 247-54.
- Kinner, A., W. Wu, et al. (2008). Gamma-h2ax in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res*, **36**(17): 5678-94.
- Klungland, A. and T. Lindahl (1997). Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: Reconstitution with purified proteins and requirement for dnase iv (fen1). *Embo J*, **16**(11): 3341-8.
- Kobayashi, J., H. Tauchi, et al. (2002). Nbs1 localizes to gamma-h2ax foci through interaction with the fha/brct domain. *Curr Biol*, **12**(21): 1846-51.
- Krokan, H. E., H. Nilsen, et al. (2000). Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett*, **476**(1-2): 73-7.
- Kubota, Y., R. A. Nash, et al. (1996). Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: Interaction between DNA polymerase beta and the xrcc1 protein. *Embo J*, **15**(23): 6662-70.
- Kuhfittig-Kulle, S., E. Feldmann, et al. (2007). The mutagenic potential of non-homologous end joining in the absence of the nhej core factors ku70/80, DNA-pkcs and xrcc4-ligiv. *Mutagenesis*, **22**(3): 217-33.
- Kysela, B., M. Chovanec, et al. (2005). Phosphorylation of linker histones by DNA-dependent protein kinase is required for DNA ligase iv-dependent ligation in the presence of histone h1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**(6): 1877-82.
- Lackinger, D., U. Eichhorn, et al. (2001). Effect of ultraviolet light, methyl methanesulfonate and ionizing radiation on the genotoxic response and apoptosis of mouse fibroblasts lacking c-fos, p53 or both. *Mutagenesis*, **16**(3): 233-41.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, **227**(5259): 680-5.
- Lamarche, B. J., N. I. Orazio, et al. (2010). The mrn complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Lett*, **584**(17): 3682-95.
- Laniel, M. A., M. J. Bergeron, et al. (1997). A nuclear factor other than sp1 binds the gc-rich promoter of the gene encoding rat poly(adp-ribose) polymerase in vitro. *Biochem Cell Biol*, **75**(4): 427-34.
- Larrick, J. W., D. G. Fischer, et al. (1980). Characterization of a human macrophage-like cell line stimulated in vitro: A model of macrophage functions. *J Immunol*, **125**(1): 6-12.

- Latour, I., J. B. Demoulin, et al. (1995). Oxidative DNA damage by t-butyl hydroperoxide causes DNA single strand breaks which is not linked to cell lysis. A mechanistic study in freshly isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett*, **373**(3): 299-302.
- Lavin, M. F., G. Birrell, et al. (2005). Atm signaling and genomic stability in response to DNA damage. *Mutat Res*, **569**(1-2): 123-32.
- Lavin, M. F. and N. Gueven (2006). The complexity of p53 stabilization and activation. *Cell Death Differ*, **13**(6): 941-50.
- Lee, C. F., M. Qiao, et al. (2010). Nox4 is a novel inducible source of reactive oxygen species in monocytes and macrophages and mediates oxidized low density lipoprotein-induced macrophage death. *Circ Res*, **106**(9): 1489-97.
- Lee, J. H. and T. T. Paull (2005). Atm activation by DNA double-strand breaks through the mre11-rad50-nbs1 complex. *Science*, **308**(5721): 551-4.
- Lee, J. W., S. M. Yannone, et al. (2003). Requirement for xrcc4 and DNA ligase iv in alignment-based gap filling for nonhomologous DNA end joining in vitro. *Cancer Res*, **63**(1): 22-4.
- Leppard, J. B., Z. Dong, et al. (2003). Physical and functional interaction between DNA ligase iii α and poly(adp-ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol*, **23**(16): 5919-27.
- Li, J., Y. Shi, et al. (2008). [e2f1 upregulates endogenous xrcc1 expression]. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi*, **22**(3): 186-8.
- Li, P., D. Nijhawan, et al. (1997). Cytochrome c and datp-dependent formation of apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**(4): 479-89.
- Li, Q., F. Bostick-Bruton, et al. (1998a). Effect of interleukin-1 alpha and tumour necrosis factor-alpha on cisplatin-induced ercc-1 mrna expression in a human ovarian carcinoma cell line. *Anticancer Res*, **18**(4A): 2283-7.
- Li, Q., K. Gardner, et al. (1998b). Cisplatin induction of ercc-1 mrna expression in a2780/cp70 human ovarian cancer cells. *J Biol Chem*, **273**(36): 23419-25.
- Lin, W. C., F. T. Lin, et al. (2001). Selective induction of e2f1 in response to DNA damage, mediated by atm-dependent phosphorylation. *Genes Dev*, **15**(14): 1833-44.
- Lindahl, T. (2000). Suppression of spontaneous mutagenesis in human cells by DNA base excision-repair. *Mutat Res*, **462**(2-3): 129-35.

- Lips, J. and B. Kaina (2001). DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts. *Carcinogenesis*, **22**(4): 579-85.
- Liu, M. L., Y. P. Lee, et al. (2005). Type I interferons protect mice against enterovirus 71 infection. *J Gen Virol*, **86**(Pt 12): 3263-9.
- Liu, X., H. Zou, et al. (1997). Dff, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*, **89**(2): 175-84.
- Lobrich, M., B. Rydberg, et al. (1995). Repair of x-ray-induced DNA double-strand breaks in specific not I restriction fragments in human fibroblasts: Joining of correct and incorrect ends. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**(26): 12050-4.
- Ma, Y., K. Schwarz, et al. (2005). The artemis:DNA-pkcs endonuclease cleaves DNA loops, flaps, and gaps. *DNA Repair (Amst)*, **4**(7): 845-51.
- Mansour, W. Y., T. Rhein, et al. (2010). The alternative end-joining pathway for repair of DNA double-strand breaks requires parp1 but is not dependent upon microhomologies. *Nucleic Acids Res*, **38**(18): 6065-77.
- Margison, G. P., A. C. Povey, et al. (2003). Variability and regulation of O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis*, **24**(4): 625-35.
- Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, **21**(3): 361-70.
- Marnett, L. J. and J. P. Plataras (2001). Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet*, **17**(4): 214-21.
- Maser, R. S., K. J. Monsen, et al. (1997). Hmre11 and hrad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks. *Mol Cell Biol*, **17**(10): 6087-96.
- Matsumoto, Y. (2001). Molecular mechanism of pcna-dependent base excision repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **68**: 129-38.
- Matsumoto, Y., K. Kim, et al. (1994). Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in xenopus laevis oocytes: An alternative pathway of base excision DNA repair. *Mol Cell Biol*, **14**(9): 6187-97.
- Matsuoka, S., M. Huang, et al. (1998). Linkage of atm to cell cycle regulation by the chk2 protein kinase. *Science*, **282**(5395): 1893-7.
- Medema, J. P., C. Scaffidi, et al. (1997). Flice is activated by association with the cd95 death-inducing signaling complex (disc). *Embo J*, **16**(10): 2794-804.

- Meek, K., S. Gupta, et al. (2004). The DNA-dependent protein kinase: The director at the end. *Immunol Rev*, **200**: 132-41.
- Meeran, S. M., T. Punathil, et al. (2008). Il-12 deficiency exacerbates inflammatory responses in uv-irradiated skin and skin tumors. *J Invest Dermatol*, **128**(11): 2716-27.
- Melief, C. J. (2008). Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity*, **29**(3): 372-83.
- Mihara, M., S. Erster, et al. (2003). P53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell*, **11**(3): 577-90.
- Morisaki, T., K. Matsumoto, et al. (2003). Dendritic cell-based combined immunotherapy with autologous tumor-pulsed dendritic cell vaccine and activated t cells for cancer patients: Rationale, current progress, and perspectives. *Hum Cell*, **16**(4): 175-82.
- Moser, M. (2004). Balancing life and death. *Nat Immunol*, **5**(6): 559-60.
- Moshous, D., I. Callebaut, et al. (2001). Artemis, a novel DNA double-strand break repair/v(d)j recombination protein, is mutated in human severe combined immune deficiency. *Cell*, **105**(2): 177-86.
- Müller, M., S. Wilder, et al. (1998). P53 activates the cd95 (apo-1/fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med*, **188**(11): 2033-45.
- Munro, T. R. (1970). The relative radiosensitivity of the nucleus and cytoplasm of chinese hamster fibroblasts. *Radiat Res*, **42**(3): 451-70.
- Muzio, M., A. M. Chinnaiyan, et al. (1996). Flice, a novel fadd-homologous ice/ced-3-like protease, is recruited to the cd95 (fas/apo-1) death--inducing signaling complex. *Cell*, **85**(6): 817-27.
- Muzio, M., G. S. Salvesen, et al. (1997). Flice induced apoptosis in a cell-free system. Cleavage of caspase zymogens. *J Biol Chem*, **272**(5): 2952-6.
- Muzio, M., B. R. Stockwell, et al. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem*, **273**(5): 2926-30.
- Narciso, L., P. Fortini, et al. (2007). Terminally differentiated muscle cells are defective in base excision DNA repair and hypersensitive to oxygen injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**(43): 17010-5.
- Nardin, A. and J. P. Abastado (2008). Macrophages and cancer. *Front Biosci*, **13**: 3494-505.

- Naumann, S. C., W. P. Roos, et al. (2009). Temozolomide- and fotemustine-induced apoptosis in human malignant melanoma cells: Response related to mgmt, mmr, dsbs, and p53. *Br J Cancer*, **100**(2): 322-33.
- Nelms, B. E., R. S. Maser, et al. (1998). In situ visualization of DNA double-strand break repair in human fibroblasts. *Science*, **280**(5363): 590-2.
- Newlands, E. S., M. F. Stevens, et al. (1997). Temozolomide: A review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer Treat Rev*, **23**(1): 35-61.
- Newman, H. C., K. M. Prise, et al. (2000). The role of higher-order chromatin structure in the yield and distribution of DNA double-strand breaks in cells irradiated with x-rays or alpha-particles. *Int J Radiat Biol*, **76**(8): 1085-93.
- Nikolova, T., M. Ensminger, et al. (2010). Homologous recombination protects mammalian cells from replication-associated DNA double-strand breaks arising in response to methyl methanesulfonate. *DNA Repair (Amst)*, **9**(10): 1050-63.
- Nomura, M., S. Shimizu, et al. (1999). Apoptotic cytosol facilitates bax translocation to mitochondria that involves cytosolic factor regulated by bcl-2. *Cancer Res*, **59**(21): 5542-8.
- Nospikel, T. (2007). DNA repair in differentiated cells: Some new answers to old questions. *Neuroscience*, **145**(4): 1213-21.
- Nussenzweig, A. and M. C. Nussenzweig (2007). A backup DNA repair pathway moves to the forefront. *Cell*, **131**(2): 223-5.
- O'Connor, T. R. and J. Laval (1991). Human cDNA expressing a functional DNA glycosylase excising 3-methyladenine and 7-methylguanine. *Biochem Biophys Res Commun*, **176**(3): 1170-7.
- O'Driscoll, M. and P. A. Jeggo (2006). The role of double-strand break repair - insights from human genetics. *Nat Rev Genet*, **7**(1): 45-54.
- O'Keeffe, M., H. Hochrein, et al. (2002). Mouse plasmacytoid cells: Long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into cd8(+) dendritic cells only after microbial stimulus. *J Exp Med*, **196**(10): 1307-19.
- Ochs, K. and B. Kaina (2000). Apoptosis induced by DNA damage o6-methylguanine is bcl-2 and caspase-9/3 regulated and fas/caspase-8 independent. *Cancer Res*, **60**(20): 5815-24.

- Oleinick, N. L., U. Balasubramaniam, et al. (1994). Nuclear structure and the microdistribution of radiation damage in DNA. *Int J Radiat Biol*, **66**(5): 523-9.
- Oltvai, Z. N., C. L. Milliman, et al. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, **74**(4): 609-19.
- Parsons, J. L., Dianova, II, et al. (2005). Poly(adp-ribose) polymerase-1 protects excessive DNA strand breaks from deterioration during repair in human cell extracts. *Febs J*, **272**(8): 2012-21.
- Pegg, A. E., M. Boosalis, et al. (1993). Mechanism of inactivation of human o6-alkylguanine-DNA alkyltransferase by o6-benzylguanine. *Biochemistry*, **32**(45): 11998-2006.
- Pegg, A. E., M. E. Dolan, et al. (1995). Structure, function, and inhibition of o6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **51**: 167-223.
- Perrault, R., H. Wang, et al. (2004). Backup pathways of nhej are suppressed by DNA-pk. *J Cell Biochem*, **92**(4): 781-94.
- Petermann, E., C. Keil, et al. (2006). Roles of DNA ligase iii and xrcc1 in regulating the switch between short patch and long patch ber. *DNA Repair (Amst)*, **5**(5): 544-55.
- Pieper, R. O., J. F. Costello, et al. (1991). Direct correlation between methylation status and expression of the human o-6-methylguanine DNA methyltransferase gene. *Cancer Commun*, **3**(8): 241-53.
- Pop, C., J. Timmer, et al. (2006). The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol Cell*, **22**(2): 269-75.
- Qian, X. C. and T. P. Brent (1997). Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the o6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. *Cancer Res*, **57**(17): 3672-7.
- Rafferty, J. A., A. R. Clarke, et al. (1996). Induction of murine o6-alkylguanine-DNA-alkyltransferase in response to ionising radiation is p53 gene dose dependent. *Oncogene*, **12**(3): 693-7.
- Ramanathapuram, L. V., T. Hahn, et al. (2005). Chemo-immunotherapy of breast cancer using vesiculated alpha-tocopheryl succinate in combination with dendritic cell vaccination. *Nutr Cancer*, **53**(2): 177-93.

- Rass, E., A. Grabarz, et al. (2009). Role of mre11 in chromosomal nonhomologous end joining in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol*, **16**(8): 819-24.
- Reeves, W. H. and Z. M. Stoeber (1989). Molecular cloning of cDNA encoding the p70 (ku) lupus autoantigen. *J Biol Chem*, **264**(9): 5047-52.
- Reid, J. M., M. J. Kuffel, et al. (1999). Metabolic activation of dacarbazine by human cytochromes p450: The role of cyp1a1, cyp1a2, and cyp2e1. *Clin Cancer Res*, **5**(8): 2192-7.
- Renart, J., J. Reiser, et al. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzylmethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **76**(7): 3116-20.
- Robles, A. I., N. A. Bemmels, et al. (2001). Apaf-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res*, **61**(18): 6660-4.
- Robson, C. N. and I. D. Hickson (1991). Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/apyrimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in *E. coli* xth (exonuclease iii) mutants. *Nucleic Acids Res*, **19**(20): 5519-23.
- Rogakou, E. P., D. R. Pilch, et al. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, **273**(10): 5858-68.
- Roos, W., M. Baumgartner, et al. (2004). Apoptosis triggered by DNA damage O⁶-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and fas/cd95/apo-1. *Oncogene*, **23**(2): 359-67.
- Roos, W. P. and B. Kaina (2006). DNA damage-induced cell death by apoptosis. *Trends Mol Med*, **12**(9): 440-50.
- Roos, W. P., T. Nikolova, et al. (2009). Brca2/xrcc2 dependent HR, but not NHEJ, is required for protection against O⁶-methylguanine triggered apoptosis, dsbs and chromosomal aberrations by a process leading to SCES. *DNA Repair (Amst)*, **8**(1): 72-86.
- Rosenquist, T. A., D. O. Zharkov, et al. (1997). Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**(14): 7429-34.
- Rosidi, B., M. Wang, et al. (2008). Histone H1 functions as a stimulatory factor in backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res*, **36**(5): 1610-23.

- Ross, R., J. Glomset, et al. (1977). Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol*, **86**(3): 675-84.
- Saito, S., A. A. Goodarzi, et al. (2002). Atm mediates phosphorylation at multiple p53 sites, including ser(46), in response to ionizing radiation. *J Biol Chem*, **277**(15): 12491-4.
- Saunders, J. W., Jr. (1966). Death in embryonic systems. *Science*, **154**(749): 604-12.
- Schulte-Uentrop, L., R. A. El-Awady, et al. (2008). Distinct roles of xrcc4 and ku80 in non-homologous end-joining of endonuclease- and ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Res*, **36**(8): 2561-9.
- Schwarzberg, A. B., E. H. Stover, et al. (2007). Selective lymphopenia and opportunistic infections in neuroendocrine tumor patients receiving temozolomide. *Cancer Invest*, **25**(4): 249-55.
- Sedelnikova, O. A., E. P. Rogakou, et al. (2002). Quantitative detection of (125)iodo-induced DNA double-strand breaks with gamma-h2ax antibody. *Radiat Res*, **158**(4): 486-92.
- Shin, J. Y., S. K. Lee, et al. (2003). Antitumor effect of intratumoral administration of dendritic cell combination with vincristine chemotherapy in a murine fibrosarcoma model. *Histol Histopathol*, **18**(2): 435-47.
- Shortman, K. and S. H. Naik (2007). Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol*, **7**(1): 19-30.
- Shrivastav, M., L. P. De Haro, et al. (2008). Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res*, **18**(1): 134-47.
- Siegel, R. M. and M. J. Lenardo (2002). Apoptosis signaling pathways. *Curr Protoc Immunol*, **Chapter 11**: Unit 11 9C.
- Simbulan-Rosenthal, C. M., D. S. Rosenthal, et al. (2003). Parp-1 binds e2f-1 independently of its DNA binding and catalytic domains, and acts as a novel coactivator of e2f-1-mediated transcription during re-entry of quiescent cells into s phase. *Oncogene*, **22**(52): 8460-71.
- Smith, G. C. and S. P. Jackson (1999). The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev*, **13**(8): 916-34.
- Sobol, R. W., J. K. Horton, et al. (1996). Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature*, **379**(6561): 183-6.

- Sobol, R. W., R. Prasad, et al. (2000). The lyase activity of the DNA repair protein beta-polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity. *Nature*, **405**(6788): 807-10.
- Srinivasula, S. M., M. Ahmad, et al. (1998). Autoactivation of procaspase-9 by apaf-1-mediated oligomerization. *Mol Cell*, **1**(7): 949-57.
- Srinivasula, S. M., M. Ahmad, et al. (1996). Molecular ordering of the fas-apoptotic pathway: The fas/apo-1 protease mch5 is a crma-inhibitable protease that activates multiple ced-3/ice-like cysteine proteases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(25): 14486-91.
- Steinman, R. M. and Z. A. Cohn (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*, **137**(5): 1142-62.
- Steinman, R. M. and M. D. Witmer (1978). Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**(10): 5132-6.
- Storch, K., I. Eke, et al. (2010). Three-dimensional cell growth confers radioresistance by chromatin density modification. *Cancer Res*, **70**(10): 3925-34.
- Stucki, M., B. Pascucci, et al. (1998). Mammalian base excision repair by DNA polymerases delta and epsilon. *Oncogene*, **17**(7): 835-43.
- Stupp, R., W. P. Mason, et al. (2005a). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*, **352**(10): 987-96.
- Stupp, R., M. J. van den Bent, et al. (2005b). Optimal role of temozolomide in the treatment of malignant gliomas. *Curr Neurol Neurosci Rep*, **5**(3): 198-206.
- Sung, J. S., M. S. DeMott, et al. (2005). Long-patch base excision DNA repair of 2-deoxyribonolactone prevents the formation of DNA-protein cross-links with DNA polymerase beta. *J Biol Chem*, **280**(47): 39095-103.
- Susin, S. A., H. K. Lorenzo, et al. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*, **397**(6718): 441-6.
- Szabo, C., H. Ischiropoulos, et al. (2007). Peroxynitrite: Biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, **6**(8): 662-80.
- Takata, M., M. S. Sasaki, et al. (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): 5497-508.
- Tan, Y., P. Raychaudhuri, et al. (2007). Chk2 mediates stabilization of the foxm1 transcription factor to stimulate expression of DNA repair genes. *Mol Cell Biol*, **27**(3): 1007-16.
- Tanaka, F., H. Yamaguchi, et al. (2002). Intratumoral injection of dendritic cells after treatment of anticancer drugs induces tumor-specific antitumor effect in vivo. *Int J Cancer*, **101**(3): 265-9.
- Tchou, J. and A. P. Grollman (1993). Repair of DNA containing the oxidatively-damaged base, 8-oxoguanine. *Mutat Res*, **299**(3-4): 277-87.
- Thompson, C. B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**(5203): 1456-62.
- Thompson, L. H., K. W. Brookman, et al. (1990). Molecular cloning of the human xrcc1 gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol Cell Biol*, **10**(12): 6160-71.
- Tibbetts, R. S., K. M. Brumbaugh, et al. (1999). A role for atr in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev*, **13**(2): 152-7.
- Tomicic, M. T. and B. Kaina (2001). Hamster bcl-2 protein is cleaved in vitro and in cells by caspase-9 and caspase-3. *Biochem Biophys Res Commun*, **281**(2): 404-8.
- Tomimatsu, N., C. G. Tahimic, et al. (2007). Ku70/80 modulates atm and atr signaling pathways in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem*, **282**(14): 10138-45.
- Tomkinson, A. E., L. Chen, et al. (2001). Completion of base excision repair by mammalian DNA ligases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **68**: 151-64.
- Toorchon, D. and M. D. Topal (1983). Mechanisms of chemical mutagenesis and carcinogenesis: Effects on DNA replication of methylation at the o6-guanine position of dgtp. *Carcinogenesis*, **4**(12): 1591-7.
- Truman, J. W. (1984). Cell death in invertebrate nervous systems. *Annu Rev Neurosci*, **7**: 171-88.
- Tsuchiya, S., M. Yamabe, et al. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (thp-1). *Int J Cancer*, **26**(2): 171-6.

- Ueno, H., N. Schmitt, et al. (2010). Dendritic cells and humoral immunity in humans. *Immunol Cell Biol*, **88**(4): 376-80.
- Unger, T., T. Juven-Gershon, et al. (1999). Critical role for ser20 of human p53 in the negative regulation of p53 by mdm2. *Embo J*, **18**(7): 1805-14.
- Uziel, T., Y. Lerenthal, et al. (2003). Requirement of the mrn complex for atm activation by DNA damage. *Embo J*, **22**(20): 5612-21.
- Valledor, A. F., M. Comalada, et al. (2010). Macrophage proinflammatory activation and deactivation: A question of balance. *Adv Immunol*, **108**: 1-20.
- Vaux, D. L. and A. Strasser (1996). The molecular biology of apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(6): 2239-44.
- Vermes, I., C. Haanen, et al. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin v. *Journal of Immunological Methods*, **184**(1): 39-51.
- Vidal, A. E., S. Boiteux, et al. (2001). Xrcc1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *Embo J*, **20**(22): 6530-9.
- Voss, C. Y., M. R. Albertini, et al. (2004). Dendritic cell-based immunotherapy for cancer and relevant challenges for transfusion medicine. *Transfus Med Rev*, **18**(3): 189-202.
- Wang, H., B. Rosidi, et al. (2005). DNA ligase iii as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining. *Cancer Res*, **65**(10): 4020-30.
- Wang, M., W. Wu, et al. (2006). Parp-1 and ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct nhej pathways. *Nucleic Acids Res*, **34**(21): 6170-82.
- Ward, I. M. and J. Chen (2001). Histone h2ax is phosphorylated in an atr-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem*, **276**(51): 47759-62.
- Ward, J. F. (1985). Biochemistry of DNA lesions. *Radiat Res Suppl*, **8**: S103-11.
- Ward, J. F. (1988). DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: Identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **35**: 95-125.

- Ward, J. F. (1994). The complexity of DNA damage: Relevance to biological consequences. *Int J Radiat Biol*, **66**(5): 427-32.
- Ward, J. F., J. W. Evans, et al. (1987). Radiation and hydrogen peroxide induced free radical damage to DNA. *Br J Cancer Suppl*, **8**: 105-12.
- Warters, R. L. and B. W. Lyons (1992). Variation in radiation-induced formation of DNA double-strand breaks as a function of chromatin structure. *Radiat Res*, **130**(3): 309-18.
- Watts, G. S., R. O. Pieper, et al. (1997). Methylation of discrete regions of the o6-methylguanine DNA methyltransferase (mgtm) cpg island is associated with heterochromatinization of the mgtm transcription start site and silencing of the gene. *Mol Cell Biol*, **17**(9): 5612-9.
- Whitehouse, C. J., R. M. Taylor, et al. (2001). Xrcc1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell*, **104**(1): 107-17.
- Willis, S. N., L. Chen, et al. (2005). Proapoptotic bak is sequestered by mcl-1 and bcl-xl, but not bcl-2, until displaced by bh3-only proteins. *Genes Dev*, **19**(11): 1294-305.
- Wilson, D. M., 3rd and D. Barsky (2001). The major human abasic endonuclease: Formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutat Res*, **485**(4): 283-307.
- Wu, X. and Y. Deng (2002). Bax and bh3-domain-only proteins in p53-mediated apoptosis. *Front Biosci*, **7**: d151-6.
- Wu, Y., J. W. Mehew, et al. (2001). Negative regulation of bcl-2 expression by p53 in hematopoietic cells. *Oncogene*, **20**(2): 240-51.
- Wyatt, M. D. and D. L. Pittman (2006). Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chem Res Toxicol*, **19**(12): 1580-94.
- Wyllie, A. H. (1980). Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, **284**(5756): 555-6.
- Xiang, S. D., A. Scholzen, et al. (2006). Pathogen recognition and development of particulate vaccines: Does size matter? *Methods*, **40**(1): 1-9.
- Xie, A., A. Kwok, et al. (2009). Role of mammalian mre11 in classical and alternative nonhomologous end joining. *Nat Struct Mol Biol*, **16**(8): 814-8.

- Xu-Welliver, M. and A. E. Pegg (2002). Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, o(6)-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis*, **23**(5): 823-30.
- Yan, C. T., C. Boboila, et al. (2007). Igh class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway. *Nature*, **449**(7161): 478-82.
- Yannone, S. M., I. S. Khan, et al. (2008). Coordinate 5' and 3' endonucleolytic trimming of terminally blocked blunt DNA double-strand break ends by artemis nuclease and DNA-dependent protein kinase. *Nucleic Acids Res*, **36**(10): 3354-65.
- Yu, Z., J. Chen, et al. (1999). Human DNA repair systems: An overview. *Environ Mol Mutagen*, **33**(1): 3-20.
- Zaniolo, K., S. Desnoyers, et al. (2007). Regulation of poly(adp-ribose) polymerase-1 (parp-1) gene expression through the post-translational modification of sp1: A nuclear target protein of parp-1. *BMC Mol Biol*, **8**: 96.
- Zha, S., C. Boboila, et al. (2009). Mre11: Roles in DNA repair beyond homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol*, **16**(8): 798-800.
- Zhang, Y., J. Zhou, et al. (2007). Partial deficiency of DNA-pkcs increases ionizing radiation-induced mutagenesis and telomere instability in human cells. *Cancer Lett*, **250**(1): 63-73.
- Ziegler-Heitbrock, H. W., E. Thiel, et al. (1988). Establishment of a human cell line (mono mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer*, **41**(3): 456-61.
- Zingg, J. M., R. Ricciarelli, et al. (2000). Scavenger receptors and modified lipoproteins: Fatal attractions? *IUBMB Life*, **49**(5): 397-403.

Veröffentlichungen

a) Begutachtete Originalarbeiten:

Bauer, M., M. Goldstein, M. Christmann, H. Becker, D. Heylmann and B. Kaina (2011). Human monocytes are severely impaired in base and DNA double-strand break repair that renders them vulnerable to oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **108**(52): 21105-21110.

Bauer, M., M. Goldstein, D. Heylmann and B. Kaina (2012). Human monocytes undergo excessive apoptosis following temozolomide activating the ATM/ATR pathway while dendritic cells and macrophages are resistant. *PLoS One*, **7**(6): e39956.

b) Begutachtete Abstracts:

Briegert M., **M. Bauer** and B. Kaina. (2008). Humane Monozyten sind hypersensitiv gegenüber Genotoxinen aufgrund eines Defekts in der DNA-Reparatur. *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology*, Berlin, Heidelberg: Springer.

Bauer M., H. Becker and B. Kaina (2009). Die Aufhebung eines Defekts in der DNA Reparatur während der Ausreifung humaner Monozyten führt zu Resistenz gegenüber methylierenden und oxidierenden Agenzien. *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology*, Berlin, Heidelberg: Springer.

Bauer M., H. Becker and B. Kaina (2010). Regulation von Proteinen der Basenexzisions-Reparatur durch die Zytokine IL-4 und GM-CSF während der Ausreifung humaner Monozyten. *Naunyn-Schmiedberg's Archives of Pharmacology*, Berlin, Heidelberg: Springer.

Kongressteilnahmen

a) Kongressteilnahmen mit Posterpräsentationen

38th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS), September 2008, Cavtat, Croatia.

Titel: **M. Bauer**, H. Becker, M. Briegert and B. Kaina. Decreasing sensitivity to alkylating genotoxins during maturation of human monocytes.

51. Frühjahrstagung der DGPT, März 2010, Mainz, Deutschland

Titel: **M. Bauer**, H. Becker and B. Kaina. Induction of base excision repair proteins by IL-4 and GM-CSF during monocytic maturation.

11. Tagung der DGDR, September 2010, Jena, Deutschland

Titel: **M. Bauer**, H. Becker, N. Bacher, K. Steinbrink and B. Kaina. Restricted repair of low-dose cyclophosphamide induced interstrand crosslinks in T_{REGs} inhibits their suppressive function, leading to enhanced immune response.

13. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (GBS), September 2010, Hamburg, Deutschland

Titel: **M. Bauer**, H. Becker, T. Nikolova and B. Kaina. Differential expression of base excision repair proteins during monocytic maturation might impact sensitivity to ionising radiation.

13. Tagung der DGDR, 15. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung (GBS), September 2012, München, Deutschland

Titel: **M. Bauer**, M. Goldstein, H. Becker, D. Heylmann and B. Kaina. Human monocytes undergo apoptosis following treatment with temozolomide activating the ATM/ATR pathway while dendritic cells and macrophages are resistant

b) Kongressteilnahmen mit Vorträgen

49. Frühjahrstagung der DGPT, März 2008, Mainz, Deutschland

Titel: Briegert M., **Bauer M.** and Kaina B. Humane Monozyten sind hypersensitiv gegenüber Genotoxinen aufgrund eines Defekts in der DNA-Reparatur.

10. Tagung der DGDR, September 2008, Berlin, Deutschland

Titel: **M. Bauer**, H. Becker, M. Briegert and B. Kaina. Human monocytes are hypersensitive to alkylating genotoxins due to a DNA repair defect.

50. Frühjahrstagung der DGPT, März 2009, Mainz, Deutschland

Titel: **M. Bauer**, H. Becker and B. Kaina. Die Aufhebung eines Defekts in der DNA Reparatur während der Ausreifung humaner Monozyten führt zu Resistenz gegenüber methylierenden und oxidierenden Agenzien.

2. Deutsch-Französisches DNA-Reparatur-Treffen – DNA-Schädigung und –Reparatur in Alterung und degenerative Krankheiten, September 2009, Konstanz, Deutschland

Titel: **M. Bauer**, M. Goldstein, H. Becker and B. Kaina. Human monocytes are more sensitive to oxidative DNA damage than DCs and macrophages derived from them due to down-regulated DNA repair.

Symposium der DFG-Forschergruppe 527 "Suszeptibilitätsfaktoren der Tumorgenese", Mai 2010, Mainz, Deutschland

Titel: **M. Bauer**, H. Becker, M. Goldstein, S. Ernst and B. Kaina. A base excision repair defect in human monocytes renders them sensitive to oxidative stress