

**Einfluss der DNA-Glykosylase OGG1 auf die TGF β -
vermittelte Induktion einer Epithelial-mesenchymalen
Transition**

Dissertation zum Erlangen des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
im Promotionsfach Pharmazie
am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

Tina Maria Sommer, geb. Morbacher
geb. in Saarbrücken

Mainz, 2018

Dekan:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.2018

„Erkenne, wer Du im Kern deines Wesens bist, und dann werde es.“

Pindar

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Einleitung und theoretischer Hintergrund</i>	9
1.1	OGG1: Vom Reparaturenzym zum epigenetischen Regulator	9
1.2	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	10
1.2.1	DNA-Basenmodifikationen durch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	10
1.3	Oxidative DNA-Basenmodifikationen und BER	12
1.3.1	Oxidative DNA Basenmodifikation	12
1.3.2	8-Oxo-guanin - die häufigste oxidativ gebildete DNA-Basenmodifikation	13
1.4	Basenexzisionsreparatur (BER)	15
1.4.1	Allgemeiner Mechanismus	15
1.4.2	Die Reparatur von 8-oxoG	17
1.4.2.1	Schadenserkenkung durch die 7,8-Dihydro-8-oxoguanin-DNA Glykosylase (OGG1)	17
1.4.2.2	hMUYTH	19
1.4.2.3	MTH1/ MTH2	19
1.4.2.4	Folgen einer OGG1-Defizienz in vivo	19
1.5	OGG1 als epigenetischer Regulator	20
1.6	Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)	26
1.6.1	Allgemeines	26
1.6.2	TGF β vermitteltes SMAD-abhängiges Signaling	28
1.6.3	SMAD-unabhängiges Signaling	32
1.6.4	TGF β -vermittelte EMT-typische Endpunkte	35
1.6.4.1	Induktion eines G1-Arrestes	35
1.6.4.2	TGF β induziert die Expression von p21	38
1.6.5	TGF β -induzierte Veränderung der extrazellulären Matrix (ECM)	39
1.6.5.1	Aufbau der ECM	39
1.6.5.2	TGF β vermittelte Induktion von FN1	40
1.7	Zielsetzung	41
2	<i>Material</i>	42
2.1	Geräte	42
2.2	Software	43
2.3	Verbrauchsmaterialien	44

2.4	Chemikalien	45
2.5	Inhibitoren	47
2.6	Enzyme und Marker	47
2.7	Kits	48
2.8	Puffer und Medien für die Zellkultur	48
2.9	Säugerzelllinien	49
2.10	Vektoren und Vektorgerüste	49
2.11	Primer	50
2.12	Primäre Antikörper	50
2.13	Sekundäre Antikörper	50
2.14	Puffer und Arbeitslösungen	51
2.14.1	Für die Zellkultur	51
2.14.2	Für die Arbeit mit Nukleinsäuren	51
2.14.2.1	Für Agarosegele	51
2.14.2.2	Für Alkalische Elution	51
2.14.3	Für die Arbeit mit Proteinen	52
3	Methoden	54
3.1	Arbeit mit Zellen	54
3.1.1	Kultivierung von Zellen.....	54
3.1.2	Generierung einer OGG1-defizienten HaCaT-Zelllinie.....	55
3.1.3	Behandlung der Zellen	56
3.1.3.1	Behandlung mit TGF β	56
3.1.3.2	Behandlung mit Inhibitoren bzw. TGF β	56
3.1.3.3	Behandlung mit Kaliumbromat.....	56
3.1.4	Bestimmung des Proliferationsfaktors	57
3.1.5	HE-Färbung der Zellen zur Dokumentation der Induktion von EMT	57
3.2	Arbeit mit Nukleinsäuren	58
3.2.1	Arbeiten mit RNA.....	58
3.2.1.1	Isolierung von RNA.....	58
3.2.1.2	Überprüfen der RNA-Integrität.....	59
3.2.1.3	Reverse Transkription	59
3.2.1.4	Optimierung der PCR-Bedingungen	59
3.2.1.5	Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR).....	61

3.2.2	Arbeiten mit DNA.....	62
3.2.2.1	Analyse der Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometrie	62
3.2.2.2	Alkalische Elution.....	64
3.2.2.2.1	Versuchsaufbau und Vorbereitung.....	65
3.2.2.2.2	Durchführung.....	65
3.2.2.2.3	Auswertung.....	67
3.2.3	Arbeiten mit Proteinen.....	68
3.2.3.1	Herstellung von Gesamtzellextrakten	68
3.2.3.2	Konzentrationsbestimmung nach Bradford.....	68
3.2.3.3	Diskontinuierliche SDS-Page und Blotten.....	68
3.2.3.4	Antikörper-Inkubation und Detektion.....	69
3.3	Statistik	69
4	Ergebnisse	71
4.1	Verifizierung des OGG1 Knockdown	71
4.1.1	Immunhistochemischer Nachweis des OGG1-Knockdowns	71
4.1.2	Funktioneller Nachweis des OGG1-Knockdowns	72
4.2	TGFβ induziert in HaCaT-Zellen EMT-typische morphologische Veränderungen	73
4.3	Einfluss der Reparaturglykosylase OGG1 auf den TGFβ induzierten G1-Arrest.....	75
4.3.1	Einfluss von TGF β und OGG1 auf die Zellproliferation.....	75
4.3.2	Einfluss von TGF β und OOG1 auf die Zellzyklusverteilung	76
4.3.3	Einfluss von TGF β und OGG1 auf die Expression von <i>p21</i>	77
4.3.3.1	Einfluss der Behandlungsdauer auf die Expression von <i>p21</i>	77
4.3.3.2	Einfluss der TGF β -Konzentration auf die Expression von <i>p21</i>	78
4.3.3.3	Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies auf die Expression von <i>p21</i>	79
4.3.3.3.1	Einfluss von TGF β auf die steady-state level oxidativer Läsionen	79
4.3.3.3.2	Einfluss von N-Acetylcystein (NAC) auf die Expression von <i>p21</i>	81
4.3.3.3.3	Einfluss von Buthioninsulfoximin (BSO) auf die Expression von <i>p21</i>	82
4.3.3.3.4	Einfluss von NOX4 auf die Expression von <i>p21</i>	83
4.3.3.4	Einfluss der Histondemethylase LSD1 auf die Expression von <i>p21</i>	84
4.3.3.5	Einfluss von 8-oxoGua auf die Expression von <i>p21</i>	86
4.3.3.6	Einfluss der MAP-Kinasen auf die Induktion von <i>p21</i>	87
4.3.3.7	Einfluss von NF κ B auf die Expression von <i>p21</i>	90
4.3.4	Einfluss der Reparaturglykosylase OGG1 auf die TGF β induzierte Veränderung der extrazellulären Matrix (ECM)	92
4.3.4.1	Einfluss der Behandlungsdauer auf die Expression von FN1	92
4.3.4.2	Einfluss der TGF β -Konzentration auf die Expression von FN1.....	93

4.3.4.3	Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies auf die Expression von FN1	94
4.3.4.3.1	Einfluss von N-Acetylcystein (NAC) auf die Expression von FN1	94
4.3.4.3.2	Einfluss von Buthioninsulfoximin (BSO) auf die Expression von FN1.....	95
4.3.4.3.3	Einfluss von NOX4 auf die Expression von FN1	96
4.3.4.4	Einfluss der Histondemethylase LSD1 auf die Expression von FN1.....	97
4.3.4.5	Einfluss von 8-oxoGua auf die Expression von FN1.....	99
4.3.4.6	Einfluss der MAP-Kinasen auf die Expression von FN1	100
4.3.4.7	Einfluss von NFκB auf die Expression von FN1	103
5	Diskussion	104
5.1	OGG1 hat einen Einfluss auf die durch TGFβ–induzierten morphologischen Veränderungen	104
5.2	TGFβ und OGG1 beeinflussen den Zellzyklus	105
5.2.1	OGG1 beeinflusst die Expression von <i>p21</i> negativ.....	106
5.2.2	TGFβ induziert ROS und induziert dadurch sequenzspezifisch oxidative DNA-Modifikationen .	106
5.2.3	LSD1 beeinflusst die Expression von <i>p21</i> in Abhängigkeit von OGG1	109
5.2.4	Die freie Base 8-oxoGua und OGG1 beeinflussen die Expression von <i>p21</i> nicht	110
5.2.5	Die MAP-Kinasen p38 und JNK modulieren die TGFβ-vermittelte Expression von <i>p21</i>	111
5.3	Einfluss auf die Veränderung der ECM bzw. des Markergens <i>FN1</i>	112
5.3.1	Die DNA-Glykosylase OGG1 ist ein negativer Regulator der Expression von <i>FN1</i>	112
5.3.2	Eine Beeinflussung von ROS bleibt ohne Folgen auf die Expression von <i>FN1</i>	112
5.3.3	Die Hemmung der Histondemethylase LSD1 hat keine Folgen für die Expression von <i>FN1</i>	113
5.3.4	Die freie Base 8-oxoGua hat keinen Einfluss auf die Expression von <i>FN1</i>	114
5.3.5	Weder MAP-Kinasen noch NFκB modulieren die Expression von <i>FN1</i>	114
5.4	Mechanismen	115
6	Zusammenfassung	120
7	Literaturverzeichnis.....	122
8	Anhang I.....	147
9	Anhang II.....	149
10	Anhang III.....	150
11	Anhang III.....	151
12	Anhang IV.....	155
13	Anhang V.....	159

14 *Abkürzungsverzeichnis*.....**160**

1. Einleitung und theoretischer Hintergrund

1.1 OGG1: Vom Reparaturenzym zum epigenetischen Regulator

Die Integrität der DNA ist wichtig, um eine stabile Vererbung sicherzustellen. Allerdings ist die Stabilität des Erbguts täglich durch exogene und endogene Faktoren bedroht. Die Gruppe der exogenen Noxen ist sehr vielfältig und umfasst neben Industriechemikalien (z.B. Benzo[a]pyren), Naturstoffen (z.B. Aflatoxin B1) und Arzneistoffen (z.B. Temozolomid) auch verschiedenen Formen der Strahlung (z.B. UV- oder Ionisierende Strahlung) (Christmann et al., 2016)(Eaton und Gallagher, 1994)(Roos, 2014)(Murphy, 1975).

Daneben stellen auch endogene Stoffe eine Gefahr für die Integrität des humanen Genoms dar, indem sie zu Oxidation, Hydrolyse oder Methylierung der DNA-Basen oder des DNA-Rückgrats führen (Lindahl, 1993). Eine besondere Rolle kommt dabei reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu. Durch sie verursachte DNA-Basenmodifikationen können in eine Mutation konvertiert werden und letztendlich Krebs auslösen. Aus diesem Grund ist es wichtig, solche DNA-Basenmodifikationen rasch und fehlerfrei zu entfernen. Die häufigste DNA-Basenmodifikation ist 7,8-Dihydro-8-Oxoguanin (8-oxoG), das sehr effizient erkannt und aus der DNA entfernt werden kann. Den wichtigsten Reparaturweg stellt die durch 8-Oxoguaninglycosylase 1 (OGG1) vermittelte Basenexzisionsreparatur (BER) dar.

Bis in die 2000er Jahre wurden die Schadensdetektion und -entfernung als Hauptaufgabe dieses Enzyms angesehen. Dies änderte sich allerdings mit der Publikation von Mabley et al. (2005). Darin wurde beschrieben, dass OGG1-defiziente Mäuse weniger ausgeprägte inflammatorische Reaktionen zeigen als Kontrolltiere. Mit der bis dato publizierten Rolle von OGG1 als BER-Enzym ließen sich diese Befunde jedoch nicht erklären. In der Folgezeit veröffentlichten weitere Forschergruppen unterschiedliche Mechanismen, um die Rolle der Glykosylase an der Transkriptionsinitiation zu erklären. Nach der einen Theorie führt dies im Zuge einer BER mit der Induktion eines Einzelstrangbruchs zum Chromatinremodelling. Nach einer anderen Theorie führt die bei der BER herausgeschnittene freie Base 8-oxoGua als Guanosin-Exchange Factor (GEF) zur Aktivierung von kleinen GTPasen, die dann die Signaltransduktion im Cytoplasma beeinflussen.

In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle von OGG1 bei der TGF β -vermittelten Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) untersucht. Die EMT stellt einen komplexen Differenzierungsprozess dar. Zwei typische Endpunkte, - die Induktion eines G1-Arrestes und die Veränderung der extrazellulären Matrix (ECM) - wurden genauer betrachtet. In den folgenden Abschnitten werden nun die Grundlagen der Arbeitshypothese näher ausgeführt.

1.2 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

1.2.1 DNA-Basenmodifikationen durch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Bei der Induktion von DNA-Basenmodifikationen kommen ROS eine besondere Bedeutung zu (Lindahl, 1993). Unter der Bezeichnung ROS werden stabile Verbindungen (Wasserstoffperoxid), Radikale (z.B. Superoxid-Anion ($O_2^{\cdot-}$) oder Hydroxylradikal (OH^{\cdot})) und Singulett-Sauerstoff zusammengefasst, die aus der sequentiellen Reduktion von Sauerstoff hervorgehen (Halliwell, 2005). Wie in Abb. 1.1 dargestellt, verläuft die Reaktion ausgehend von Sauerstoff über mehrere instabile Zwischenstufen (Superoxid-Anion, Wasserstoffperoxid und Hydroxylradikal) zu Wasser.

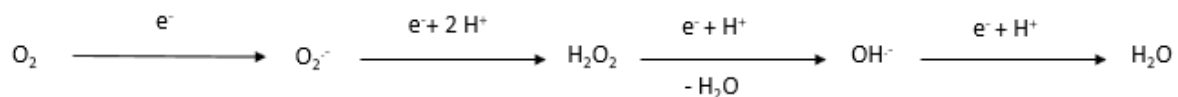


Abb. 1.1 Entstehung von ROS.

ROS entstehen zum einen als Folge von endogenen Prozessen und zum anderen aus exogenen Quellen. Endogen entstehen ROS u.a. als Nebenprodukt der mitochondrialen Atmungskette, bei der Immunabwehr und bei der Lipidperoxidation. Exogen werden ROS durch Umweltgifte (z.B. Pestizide), Zigarettenrauch oder Strahlung generiert (Jablonska-Trypuc et al., 2017).

Das Superoxidanionradikal stellt das erste Zwischenprodukt bei der Reduktion von Sauerstoff zu Wasser dar. In wässriger Lösung und neutralem pH-Wert zerfällt es spontan zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff. Zusätzlich kann diese radikalische Zwischenstufe durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) detoxifiziert werden (Fridovich et al., 1995).

Wasserstoffperoxid, das bei der Reduktion von Sauerstoff ebenfalls gebildet wird, ist zwar reaktionsträge, aber sehr stabil. Zudem kann es Zellmembranen überwinden (Bienert et al.,

2006). Im Zusammenspiel mit Übergangsmetallen kann durch die Fenton-Reaktion bzw. Haber-Weiss-Reaktion, die in Abb. 1.2 dargestellt ist, das sehr reaktive Hydroxylradikal entstehen (Halliwell, 1996).

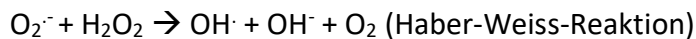
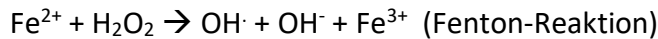
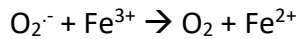


Abb. 1.2 **Metallkatalysierte Entstehung von Hydroxylradikalen.**

Wasserstoffperoxid kann, wie in Abb. 1.3 dargestellt, durch zwei Detoxifizierungssysteme abgebaut werden. Neben dem Abbau, der durch das Enzym Katalase katalysiert wird, existiert mit dem Glutathion-Peroxidase-System ein weiterer Abbauweg (Gaetani et al., 1989).

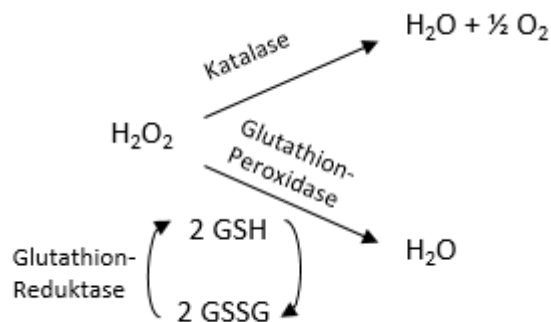


Abb. 1.3 **Enzymatischer Abbau von H₂O₂.**

Das bereits erwähnte Hydroxylradikal stellt zwar mit einer Halbwertszeit von 10⁻⁹s eine sehr kurzlebige Verbindung dar, so dass keine enzymatische Detoxifizierung möglich ist. Aufgrund der hohen Mobilität von Wasserstoffperoxid kann das OH[·]-Radikal aber nahezu überall gebildet werden und mit allen Makromolekülen (Nukleinsäuren, Lipide und Proteine) in seiner unmittelbaren Umgebung reagieren. Durch die Reaktion mit DNA werden Einzel- und Doppelstrangbrüche induziert (Halliwell und Aruoma, 1991).

ROS sind zwar teilweise recht kurzlebig, aber als starke Elektrophile in der Lage, mit biologischen Makromolekülen zu reagieren. Dadurch tragen sie zur Kanzerogenese,

inflammatorischen Prozessen und degenerativen Erkrankungen bei (Helfinger und Schröder et al., 2018)(Hogg, 1998)(Niedzilska et al., 2016).

Daneben sind ROS aber vermutlich auch an der Signaltransduktion beteiligt. So ist unter anderem die Entstehung von ROS im Rahmen der EMT gut bekannt (Herrera et al., 2001)(Kim et al., 2006)(Zhang et al., 2010)(Ishikawa et al., 2014)(Kim et al., 2017). Als ROS-Quelle werden NADPH-Oxidasen (z.B. NOX4) diskutiert (Carmona-Cuenca et al., 2008) Die exakte Rolle von ROS in der Signalübertragung ist allerdings unklar.

Zudem ist bekannt, dass H_2O_2 eine wichtige Rolle bei der Initiation der Transkription zukommt, da ausgehend von oxidativen DNA-Basenmodifikationen eine partielle BER das Chromatin für die Transkriptionsmaschinerie zugänglich macht (Perillo et al., 2008)(Amente et al., 2010).

Aufgrund der ambivalenten Rolle von ROS ist es somit für Organismen wichtig, eine Homöostase zwischen ROS-Bildung und ROS-Abbau aufrechtzuerhalten. Eine Dysbalance zugunsten der Bildung wird als oxidativer Stress bezeichnet (Sies, 1991).

1.3 Oxidative DNA-Basenmodifikationen und BER

1.3.1 Oxidative DNA Basenmodifikation

Oxidative Basenmodifikationen entstehen durch den Angriff von ROS auf das Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA oder die Basen. Dies hat unterschiedliche Basenmodifikationen, AP-Läsionen, Einzel- und Doppelstrangbrüchen oder DNA-Crosslinks zur Folge (Halliwell und Aruoma, 1991). Eine Übersicht einiger DNA-Basenmodifikationen ist in Abb. 1.4 dargestellt. Die Gesamtzahl oxidativer Läsionen wird dabei auf 10^4 pro Tag und Zelle geschätzt (Lindahl, 1993). Aufgrund ihres geringen Redoxpotentials wird besonders häufig die Base Guanin durch Elektrophile verändert (Cadet, 1999).

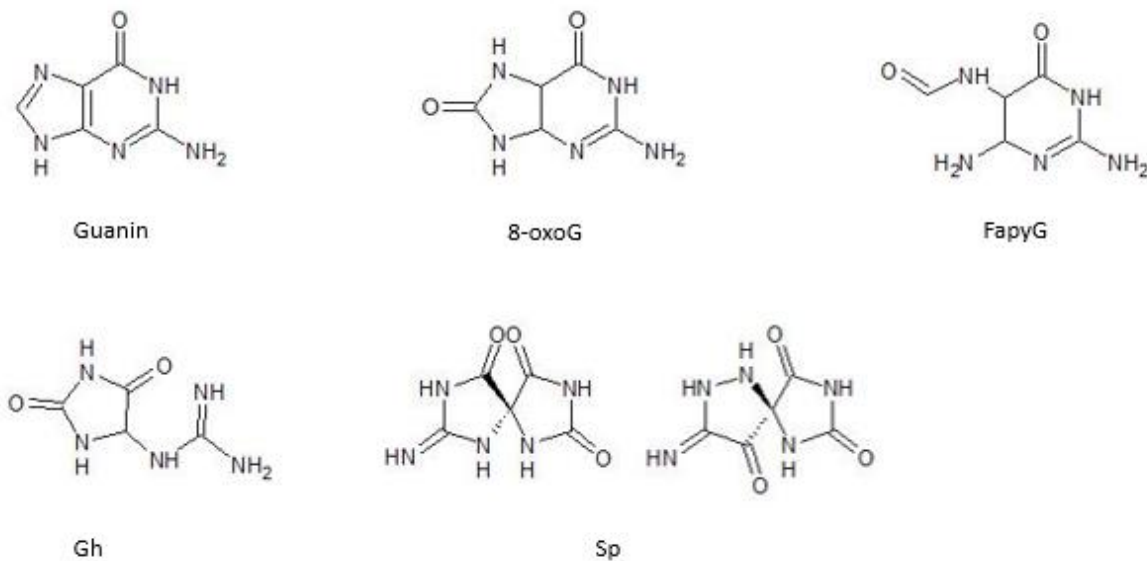


Abb. 1.4. Oxidative Guanin-Modifikationen.

1.3.2 8-Oxo-guanin - die häufigste oxidativ gebildete DNA-Basenmodifikation

Als häufigste oxidative Guaninmodifikation entsteht 8-oxoG. Aber auch 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FapyG) kann durch einen oxidativen Angriff auf Guanin gebildet werden. Neben den bereits genannten existieren aber ca. noch 20 weitere Oxidationsprodukte von Guanin (Neeley und Essigmann, 2006).

8-oxoG entsteht durch die ROS-vermittelte Oxidation von Guanin am Kohlenstoff 8 (Kanvah et al., 2010). Es liegt in mehreren tautomeren Formen vor (McAuley-Hecht et al., 1994).

Obwohl 8-oxoG eine recht stabile DNA Basenmodifikation darstellt, kann es weiter oxidiert werden. Dabei entstehen die Hydantoin-Läsionen Guanidinhydantoin (Gh) und Spiroiminodihydantoin (Sp), die in Abb. 1.4 dargestellt sind.

8-oxoG kann, wie Guanin, eine Basenpaarung mit Cytosin eingehen, darüber hinaus ist es aber auch eine Hoogsten-Basenpaarung mit Adenin möglich, indem es das Basenpaarungspotential von Thymin nachahmt (Shibutani et al., 1991). Um dies zu ermöglichen, wechselt 8-oxoG von der anti- in die syn-Konformation (McCauley et al., 2018).

Die Fehlpaarung mit Adenin verändert die DNA-Helix sterisch nur wenig und entgeht dadurch der Proofreadingfunktion der DNA-Polymerasen. Persistiert die Fehlpaarung, über den nächsten Replikationszyklus hinaus, so verursacht dies eine G:C→T:A-Transversion (Grollman und Moriya, 1993).

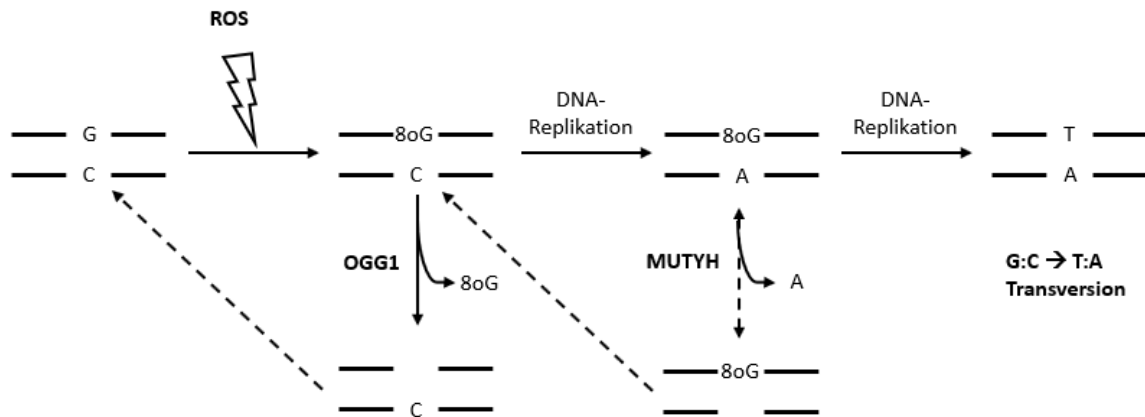


Abb. 1.5 Umwandlung der prämutagenen Basenmodifikation 8-oxoG in eine Mutation und mögliche Reparaturmechanismen. (Beard et al., 2010, verändert)

Dadurch wird die prämutagene DNA-Läsion in eine Mutation konvertiert (vgl. Abb. 1.5) (McAuley-Hecht et al., 1994). Die Spiegel von 8-oxoG können als Biomarker für das Ausmaß von oxidativem Stress verwendet werden und sind darüber hinaus Risikofaktor für diverse Krankheiten (z.B. Krebs) (Valavanidis et al., 2009).

Neben der Schädigung von Guanin in der DNA, kann es durch ROS auch zur Schädigung von dGTPs im zellulären Nukleotidpool kommen. Bei der Replikation kann es vorkommen, dass gegenüber der Base Adenin zufällig ein 8-oxoG eingebaut wird (Batra et al., 2010). Aufgrund der geringen sterischen Veränderung gegenüber der normalen Basenpaarung, kann es in einer weiteren Replikation so zu einer A:T nach C:G-Transversion kommen (vgl. Abb. 1.6).

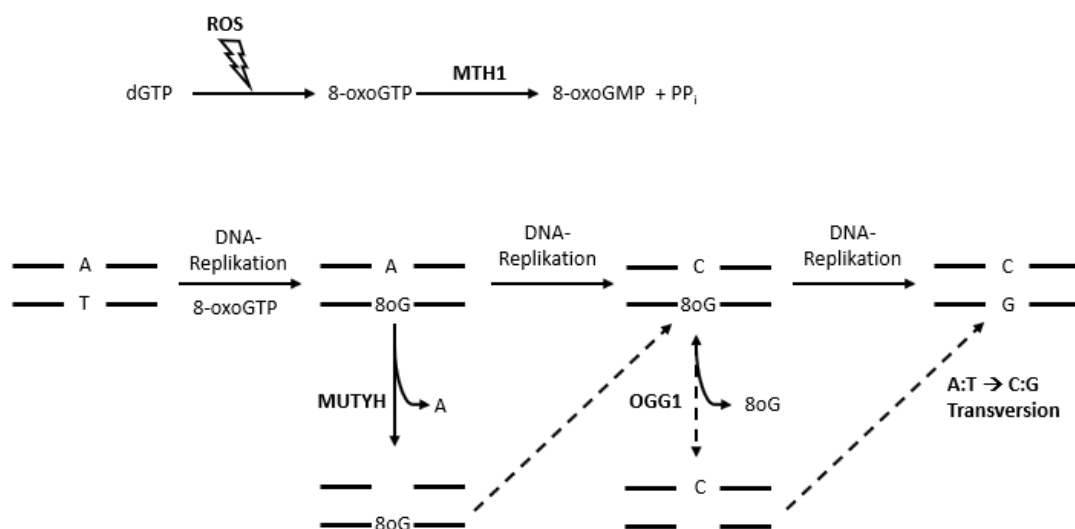


Abb. 1.6 Entstehung einer Mutation ausgehend von 8-oxoG im Nukleotidpool und mögliche Reparaturmechanismen. (Beard et al., 2010, verändert)

1.4 Basenexzisionsreparatur (BER)

1.4.1 Allgemeiner Mechanismus

Die BER stellt den grundlegenden Reparaturmechanismus zur Beseitigung von Basenmodifikationen, die durch Oxidation, Alkylierung und Desaminierung verursacht werden, dar. Der Reparaturweg ist evolutionär hoch konserviert und sowohl in Pro- als auch in Eukaryoten beschrieben (Izumi et al., 2003). Zum ersten Mal wurde die BER 1974 von Tomas Lindahl, in seiner Arbeit über die UNG-Glykosylase in *E. coli* beschrieben.

Für die Schadenserkennung und -reparatur mittels BER werden vier Enzyme benötigt: eine Glykosylase, eine AP-Endonuklease oder eine AP DNA-Lyase, eine DNA-Polymerase und eine DNA-Ligase (Robertson et al., 2009).

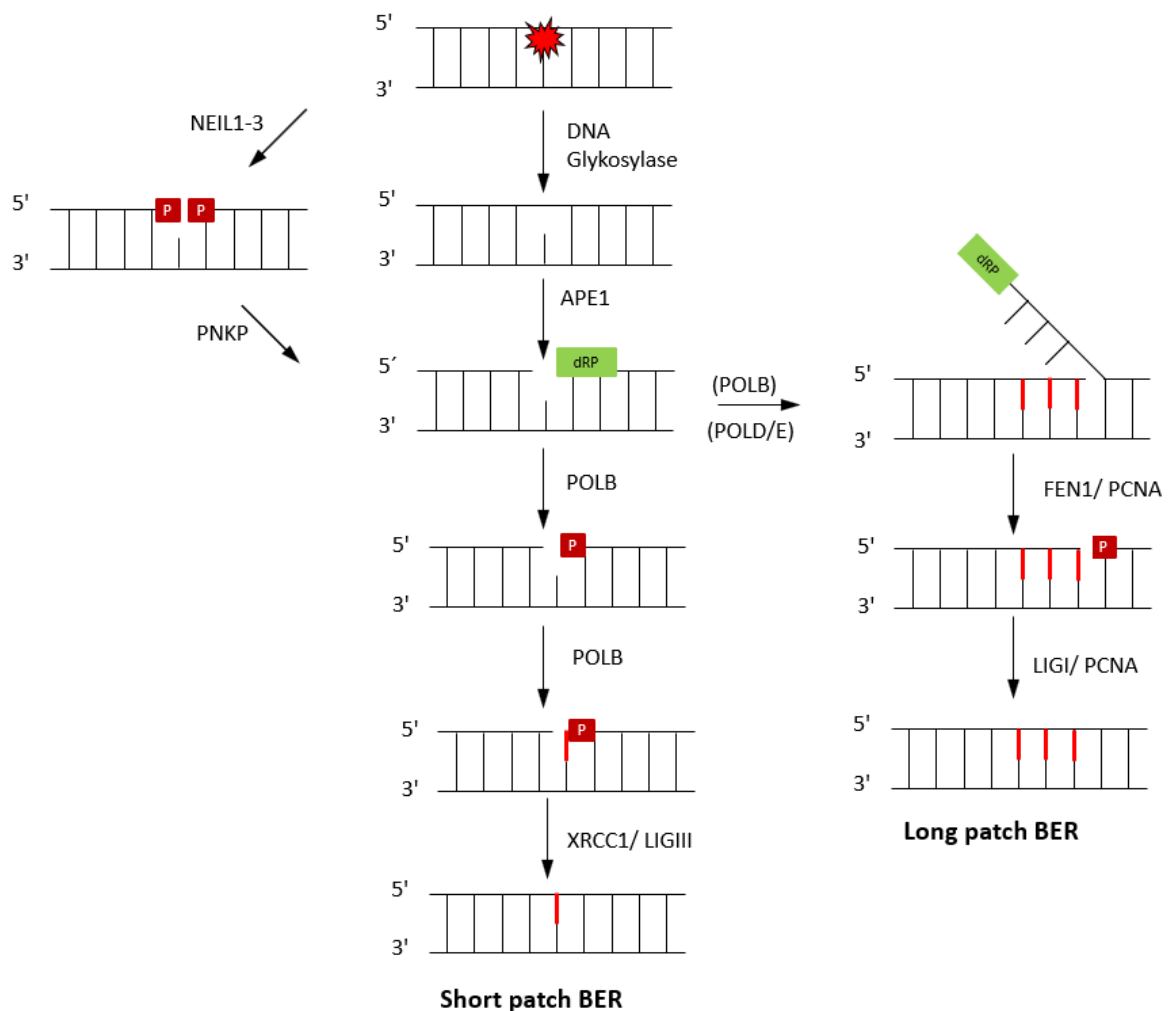


Abb. 1.7 Überblick über den short bzw. long patch-Mechanismus der Basenexzisionsreparatur. Weitere Erläuterungen im Text.

Die Reparatur läuft in fünf aufeinanderfolgenden Schritten ab (Abb. 1.7). Im ersten Schritt wird die schadhafte DNA-Base durch eine schadensspezifische DNA-Glykosylase erkannt. Diese katalysiert die Spaltung der N-glykosidischen Bindung, so dass die beschädigte Base entfernt wird (Scharer und Jiricny, 2001). Als Intermediat entsteht eine apurine/ apyrimidine Stelle (AP-Stelle).

Monofunktionelle Glykosylasen prozessieren die AP-Stelle dahingehend, dass die AP-Endonuclease 1 (APE1) die DNA 5' der AP-Läsion einschneidet (Robertson et al., 2009). Es entsteht ein Einzelstrangbruch mit einem 5'-Desoxyribosephosphat (dRP) und einer 3'-Hydroxylgruppe (Wood et al., 2001). Vor dem Einbau eines neuen Nukleotids entfernt die dRP-Lyaseaktivität der Polymerase β (POLB) die 5'-Zuckerphosphatgruppe und baut anschließend das korrekte Nukleotid ein (Matsumoto und Kim, 1995). Als Vorlage dient der unbeschädigte DNA-Strang (Svilar et al., 2011). Abschließend versiegelt entweder Ligase I (LIGI) oder ein Komplex aus Ligase III (LIGIII) und XRCC1 das DNA-Rückgrat (Nash et al., 1997a).

Bifunktionelle Glykosylasen besitzen neben der Glykosylasefunktion noch eine Lyaseaktivität (Nash et al., 1997b). Dadurch sind sie in der Lage, ebenfalls einen Einzelstrangbruch zu induzieren, der sich allerdings 3' der AP-Läsion befindet (McCullough et al., 1999). Bei der β -Eliminierung entstehen am 3'-Ende ein ungesättigter Hydroxyaldehyd und am 5'-Ende eine Phosphatgruppe (Svilar et al., 2011). Vor dem Nukleotideinbau wird der Zuckerrest am 3'-Ende von der APE1 entfernt (Wallace et al., 1998). Der weitere Mechanismus ist dem der monofunktionellen Glykosylasen analog. Bei einer β, δ -Eliminierung, die einer Schadenserkenkung durch die Neil-Glykosylasen folgt, geschieht der Einschnitt beidseits der AP-Läsion, das ungesättigte Hydroxyaldehyd wird freigesetzt und an beiden Seiten befindet sich eine Phosphatgruppe (Das et al., 2006). Durch die Aktivität der Polynukleotidkinase/-phosphatase (PNKP) wird die benötigte 3' OH-Gruppe generiert. Der weitere Weg erfolgt analog dem bereits beschriebenen.

Von der hier beschriebenen short patch-Variante der BER ist die long patch-Variante zu unterscheiden, bei der mehrere Nukleotide ausgetauscht werden (Matsumoto et al., 1999). Diese Form der BER wird vor allem in proliferierenden Zellen beobachtet und bedient sich einiger Enzyme des DNA-Replikationsprozesses (PCNA, FEN1 und RCF). Analog zum short patch Weg wird auch hier die beschädigte Base schadensspezifisch durch eine DNA-Glykosylase erkannt und entfernt. Anschließend wird die resultierende AP-Stelle durch die

APE1 prozessiert, so dass ein Einzelstrangbruch entsteht. In die resultierende Lücke baut POLB das erste Nukleotid ein (Podlutzky et al., 2001). Durch den Einbau weiterer Nukleotide durch Polymerase δ (POLD) und unter Beteiligung von PCNA und RCF wird der ursprüngliche Strang verdrängt. Der entstehende Überhang (Flap) wird durch FEN1 entfernt und das Rückgrat durch Ligase I (LIGI) versiegelt (Klungland und Lindahl, 1997).

1.4.2 Die Reparatur von 8-oxoG

1.4.2.1 Schadenserkennung durch die 7,8-Dihydro-8-oxoguanin-DNA Glykosylase (OGG1)

Wie aus den bisherigen Ausführungen hervorgeht, nehmen die DNA-Glykosylasen eine Schlüsselfunktion der BER ein, indem sie schadensspezifisch die Modifikation erkennen und entfernen. Bisher sind 11 verschiedene Glykosylasen beschrieben, die schadensabhängig DNA-Basenmodifikationen erkennen und entfernen (vgl. Tab. 1) (Dianov und Hubscher, 2013). Dem Erkennen und Entfernen von 8-oxoG wird eine besondere Bedeutung beigemessen. Die genannte Basenmodifikation bzw. mit ihr verwandte Guaninmodifikationen (FapyG, Gh und Sp) stellen das Substrat mehrerer Glykosylasen dar.

Tab. 1 Humane DNA-Glykosylasen und ihre Substrate. (Krokan und Bjoras, 2013)

Glykosylase	Mono-/ Bifunktionell	Substrat
MBD4	M	U (gepaart mit G), T (gepaart mit G), 5-hmU im CpG-Kontext
MPG	M	3meA, 7meG, 3meG, Hypoxanthin, EthenoA
MUTYH	<i>M</i>	A (gepaart mit 8-oxoG/C/G)
NEIL1	<i>B</i>	Tg, FapyG, FapyA, 8-oxoG, 5-hU, DHU, Sp, Gh
NEIL2	<i>B</i>	Analog NEIL1
NEIL3	<i>B</i>	FapyG, FapyA, Sp, Gh (in ssDNA)
NTHL1	B	Tg, FapyG, 5-hC, 5-hU
OGG1	B	8-oxoG (gepaart mit C), FapyG (gepaart mit C)
SMUG1	M	5-hmU, U (gepaart mit A oder G), 5-fU, ϵ C
TDG	M	U (gepaart mit G), T (gepaart mit G), 5-fC, 5-caC
UNG1/ UNG2	M	U (gepaart mit A oder G), 5-fU

Die Tatsache, dass es sich bei 8-oxoG um eine prämutagene Läsion handelt, die durch eine Replikation in eine Mutation überführt werden kann, macht eine effektive Reparatur notwendig. Um die Integrität des Genoms sicherzustellen, existieren gleich mehrere

Reparaturmechanismen, um 8-oxoG zu erkennen und zu entfernen. Die größte Bedeutung kommt der OGG1-vermittelten BER zu (Larsen et al., 2004).

Neben dem genannten Schaden umfasst das Erkennungsspektrum von OGG1 noch mit Cytosin gepaartes FapyG. Die besondere Bedeutung von OGG1 zeigt sich darin, dass es in fast allen eukaryotischen Organismen vorkommt und evolutionär stark konserviert ist (Aburatani et al., 1997)(Bjoras et al., 1997)(Lu et al., 1997)(Radicella et al., 1997)(Roldan-Arjona et al., 1997)(Rosenquist et al., 1997). Zudem wird die Glykosylase in allen Geweben exprimiert (Radicella et al., 1997). In Prokaryoten findet man mit Fpg ein funktionelles, aber nicht strukturelles Homolog (Boiteux et al., 2017).

In humanen Zellen ist das für OGG1 kodierende Gen auf Chromosom drei lokalisiert und kommt in zwei Splicevarianten vor: α - und β -OGG1 (Radicella et al., 1997). Die beiden Formen unterscheiden sich in ihren unterschiedlichen C-Termini, der N-Terminus hingegen ist weitgehend identisch (Radicella et al., 1997). Der veränderte Carboxyterminus führt dazu, dass man α -OGG1 vor allem im Nukleus und β -OGG1 in Mitochondrien findet (Nishioka et al., 1999). Zudem fehlt der β -Form die Glykosylaseaktivität und ihre Funktion ist unklar (Hashiguchi et al., 2004).

OGG1 gehört zur Gruppe der bifunktionellen Glykosylasen, d.h. es besitzt neben der Glykosylase- auch eine Lyaseaktivität, der aber *in vivo* vermutlich keine Bedeutung zukommt (Allgayer et al., 2016)(Boiteux et al., 2017). Die effektive Reparatur von 8-oxoG stellt für Zellen eine enorme Herausforderung dar. Pro Zelle gibt es recht wenige OGG1-Moleküle (ca. 50.000), um das Genom mit 10^9 bp zu scannen und zumal nur wenige 8-oxoG-Modifikationen beobachtet werden. Dies entspricht etwa 10.000 8-oxoG-Modifikationen pro nukleärem Genom (Epe, 2002)(Ohno et al., 2006). Zudem ist eine Paarung von 8-oxoG mit C sterisch unauffällig und erschwert das Erkennen durch DNA-Glykosylasen.

Trotz dieser Erschwernisse ist die Schadensdetektion durch OGG1 hoch effizient.

Die Schadenserkenung läuft nach einem spezifischen, mehrstufigen Prozess ab (pinch-push-plug-pull) (Stivers et al., 2004). An der Schadensstelle induziert OGG1 das Biegen und Verdrehen der DNA (pinch). Im nächsten Schritt (push) interkaliert ein Aminosäurerest in die DNA-Helix (push) und verdrängt dabei die modifizierte Base. Diesen Prozess bezeichnet man auch als base flipping. Durch diesen Vorgang kann zwischen unmodifiziertem Guanin und 8-oxoG unterschieden werden (Huffman et al., 2005). Durch die Interkalation wird zudem die

veränderte Form der DNA-Helix stabilisiert (plug). Durch das base flipping gelangt die schadhafte Base in das aktive Zentrum von OGG1 (pull), wo sie ggf. entfernt wird (Stivers et al., 2004). Allerdings wird der Suchprozess von OGG1 als eher unpräzise beschrieben. Dieser Mangel wird durch die hohe Geschwindigkeit ausgeglichen. Das Enzym überprüft mehrere Millionen Basenpaare pro Sekunde (Banerjee et al., 2006)(Blainey et al., 2006).

1.4.2.2 *hMUYTH*

Die DNA-Glykosylase hMUYTH ist ebenfalls in der Lage, 8-oxoG zu detektieren und so Replikationsmutationen zu verhindern. Sie erkennt die Fehlpaarung 8-oxoG:A und entfernt mit ihrer Adenin-Glykosylase-Aktivität das fehlerhaft eingebaute Adenin (Michaels und Miller, 1992). Dies steht im Gegensatz zu den übrigen BER-Glykosylasen, die die modifizierte Base, entfernen. Die MUTYH-vermittelte Reparatur findet nach einer Replikation statt und verläuft über den long patch-Weg (Parlanti et al., 2002). Zwar beseitigt dieser Reparaturweg das eigentliche Problem, das zu 8-oxoG oxidierte Guanin, nicht und es entsteht ein 8-oxoG:C-Paar, aber dieses ist ein Substrat für OGG1, das diese Fehlpaarung in einem weiteren Suchprozess erkennt und entfernen kann (vgl. Abb. 1.6) (Lu et al., 2001).

1.4.2.3 *MTH1/MTH2*

Im Nukleotidpool vorhandenes 8-oxoGTP stellt ebenfalls eine Quelle für 8-oxoG in der DNA und somit für Mutationen dar. MTH1, MTH2 und NUDT5 sind in der Lage, durch ihre Nukleosid-Triphosphatase-Aktivität 8-oxoGTP in 8-OxoGMP und Pyrophosphat zu spalten und es somit aus dem Nukleotidpool zu entfernen (Maki und Sekiguchi, 1992)(Sakumi et al., 1993) (vgl. Abb. 1.6). Somit wird sichergestellt, dass keine modifizierten Guanine in die DNA eingebaut werden (Hori et al., 2010). Allerdings kann das entstehende 8-oxoGMP in den Zellen nicht recycelt werden, da es kein Substrat der Guanylatkinase ist (Hayakawa et al., 1999).

1.4.2.4 *Folgen einer OGG1-Defizienz in vivo*

Es ist offensichtlich, dass das Fehlen oder eine Funktionsbeeinträchtigung von OGG1 nicht ohne Folgen bleiben kann. So führt das Fehlen von OGG1 in Hepatozyten von OGG1^{-/-} Mäusen zu einem Anstieg der basalen 8-oxoG-Spiegel (Klungland et al., 1999)(Osterod et al., 2001). Damit einhergehend steigt die Anzahl von G:C nach T:A-Transversionen, davon

unberührt bleibt allerdings die Tumorzinzidenz (Klungland et al., 1999). Eine erhöhte Tumorrage wird erst bei OGG1/ MUTYH-Doppelknockout-Mäusen beobachtet. Darüber hinaus zeigen die Tiere keine pathologischen Unterschiede zu Kontrolltieren (Seifermann und Epe, 2017).

1.5 OGG1 als epigenetischer Regulator

Wie einleitend bereits erwähnt, kommt der DNA-Glykosylase OGG1 eine weitere wichtige Funktion bei der Initiation der Transkription zu. Mit den Erkenntnissen zur BER, die bis zu Beginn der 2000er Jahre publiziert waren, ließen sich die von Mabley et al. (2005) beschriebenen Veränderungen der OGG1-defizienten Tiere nicht erklären. In ihrer Arbeit liefern die Forscher in drei verschiedenen inflammatorischen Modellen Belege, dass OGG1-defiziente Tiere besser vor inflammatorischen Reaktionen geschützt sind, als OGG1-profiziente Kontrolltiere (Mabley et al., 2005).

In einem ersten Modell wurde durch Lipopolysaccharid (LPS) eine systemische Inflammation ausgelöst und die Spiegel der Zytokine MIP1- α und TNF α gemessen. Diese waren in den OGG1^{-/-} Mäusen deutlich niedriger waren, das Ausmaß der Inflammation war also deutlich geringer.

In einem zweiten Modell wurde durch Behandlung mit MLDS (multiple low dose streptomycin) Typ I Diabetes induziert. Bei den Knockout-Tieren wurden deutlich niedriger Blutglukosespiegel gemessen, was auf eine geringere Diabetesinzidenz schließen lässt. Damit einhergehend war der Insulingehalt im Pankreas in den OGG1-defizienten Tieren höher. Zudem waren die TNF α -Spiegel in den OGG1^{-/-} Tieren erniedrigt.

In einem dritten Modell wurde durch die Behandlung mit Oxazolone eine Kontakthypersensitivität ausgelöst. Als Reaktion akkumulierten Granulozyten in der behandelten Hautpartie. Auch die Spiegel der inflammatorischen Zytokine TNF α , IL1 β und MIP1- α waren erhöht. In den OGG1-defizienten Tiere aber weniger stark ausgeprägt als in den Kontrolltieren.

Somit lieferten Mabley et al. Hinweise, dass OGG1 neben seiner Funktion als Reparaturglykosylase eine weitere Aufgabe bei der Regulation der Transkription inflammatorischer Gene hat. Eine mechanistische Erklärung ihrer Befunde lieferte die Forschungsgruppe allerdings nicht.

Inzwischen gibt es mehrere Publikationen, die eine Beteiligung von OGG1 an der Genregulation zeigen. Die postulierten Mechanismen unterscheiden sich allerdings z.T. erheblich voneinander. Gemeinsam ist ihnen allerdings, dass sie von der Induktion von oxidativen DNA-Modifikationen ausgehen, die in einer ersten Annahme durch BER prozessiert werden und letztendlich zum Lockern der Chromatinstruktur führen und somit Raum für die Transkriptionsmaschinerie geschaffen wird. In einer zweiten Annahme bildet die freie Base 8-oxoGua gemeinsam mit der Glykosylase einen Komplex, der als GEF kleine GTPasen aktiviert.

Perillo et al. (2008) postulieren in ihrer Arbeit zur Estrogen vermittelten Transkription von *BCL2* eine neue Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies. ROS und von ihnen induzierte oxidative DNA-Schäden, allen voran 8-oxoG, sind an der Regulation der Transkription beteiligt. Indem eine partielle BER, die von OGG1 eingeleitet wird, einen Einzelstrangbruch induziert und die Aktivität der Topoisomerase 2 β zur Chromatinrelaxierung führt und somit Platz für den Transkriptionsinitiationskomplex schafft. Das Substrat der partiellen BER, die mit dem intermediären Einzelstrangbruch endet, wird durch die Aktivität der Histondemethylase LSD1 bereitgestellt. Diese produziert bei der Demethylierungsreaktion Wasserstoffperoxid, das 8-oxoG in der DNA induziert. Der gesamte Mechanismus ist in Abb. 1.8 dargestellt (Perillo et al., 2008).

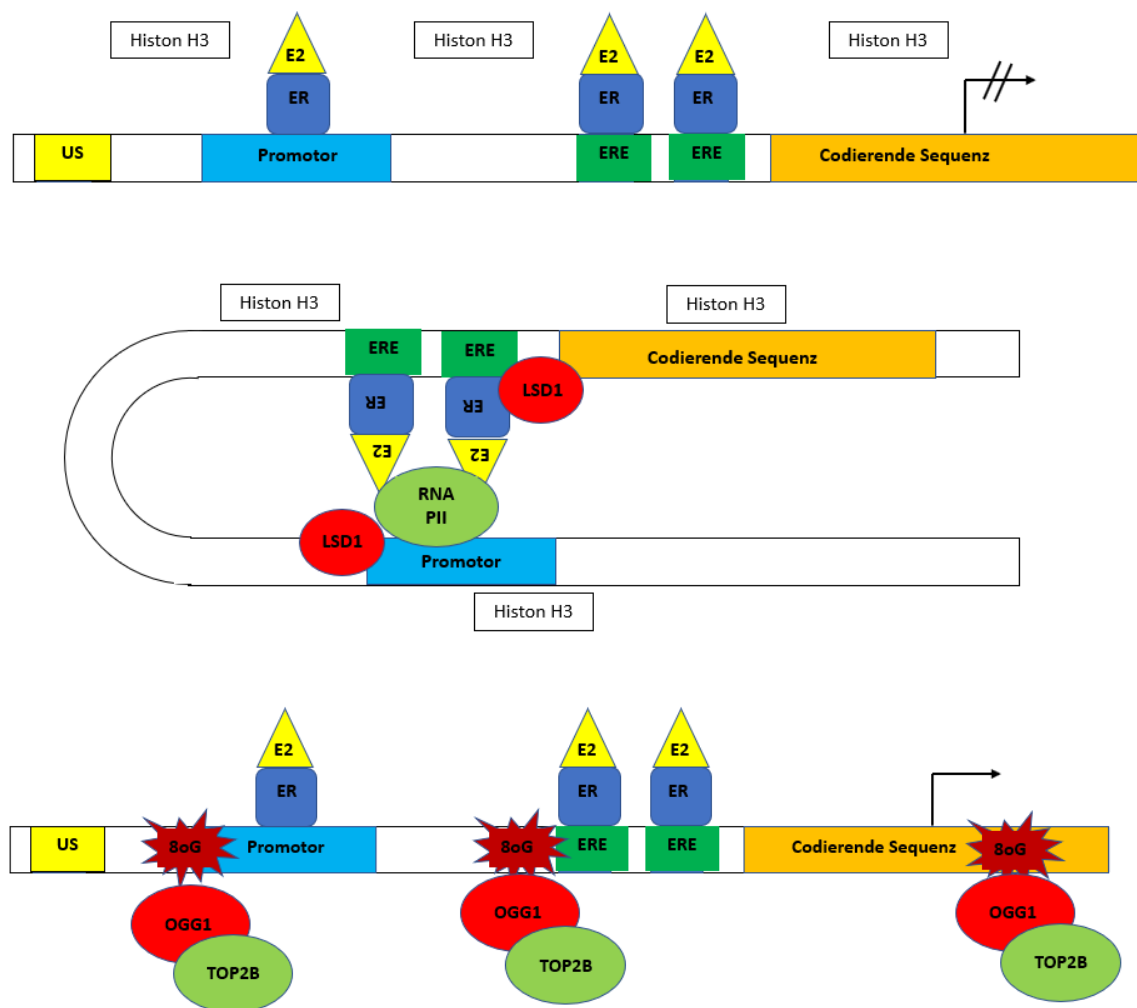


Abb. 1.8 LSD1-vermittelte Induktion von *BCL2* nach Perillo et al. (2008). Weitere Erläuterungen im Text. (Li et al., 2013, verändert)

Amente et al. postulieren einen LSD1-BER-vermittelte Transkription von Myc-aktivierten Genen *NCL* und *CAD*. Der Induktionsmechanismus ist in Abb. 1.9 dargestellt. Hierzu ist die Demethylierung der Histonmarke H3K4me2 an Promotor und E-Box der beiden Gene erforderlich. Der Mechanismus beginnt mit der Tamoxifen induzierten Myc-Aktivierung, die dazu führt, dass der Transkriptionsfaktor v.a. an die E-Boxen der beiden Gene bindet und bis zum Ende der Signalübertragung dort gebunden bleibt. Anschließend wird LSD1 zum upstream element (US), zur Transcription start site (TSS) und zur E-Box innerhalb des codierenden Bereiches rekrutiert. Während der Demethylierung ist 8-oxoG nachweisbar und OGG1 und APE1 sind an den gleichen Stellen aktiv. Nach Abschluss der Demethylierung werden die BER-Proteine von der DNA gelöst (Amente et al., 2010).

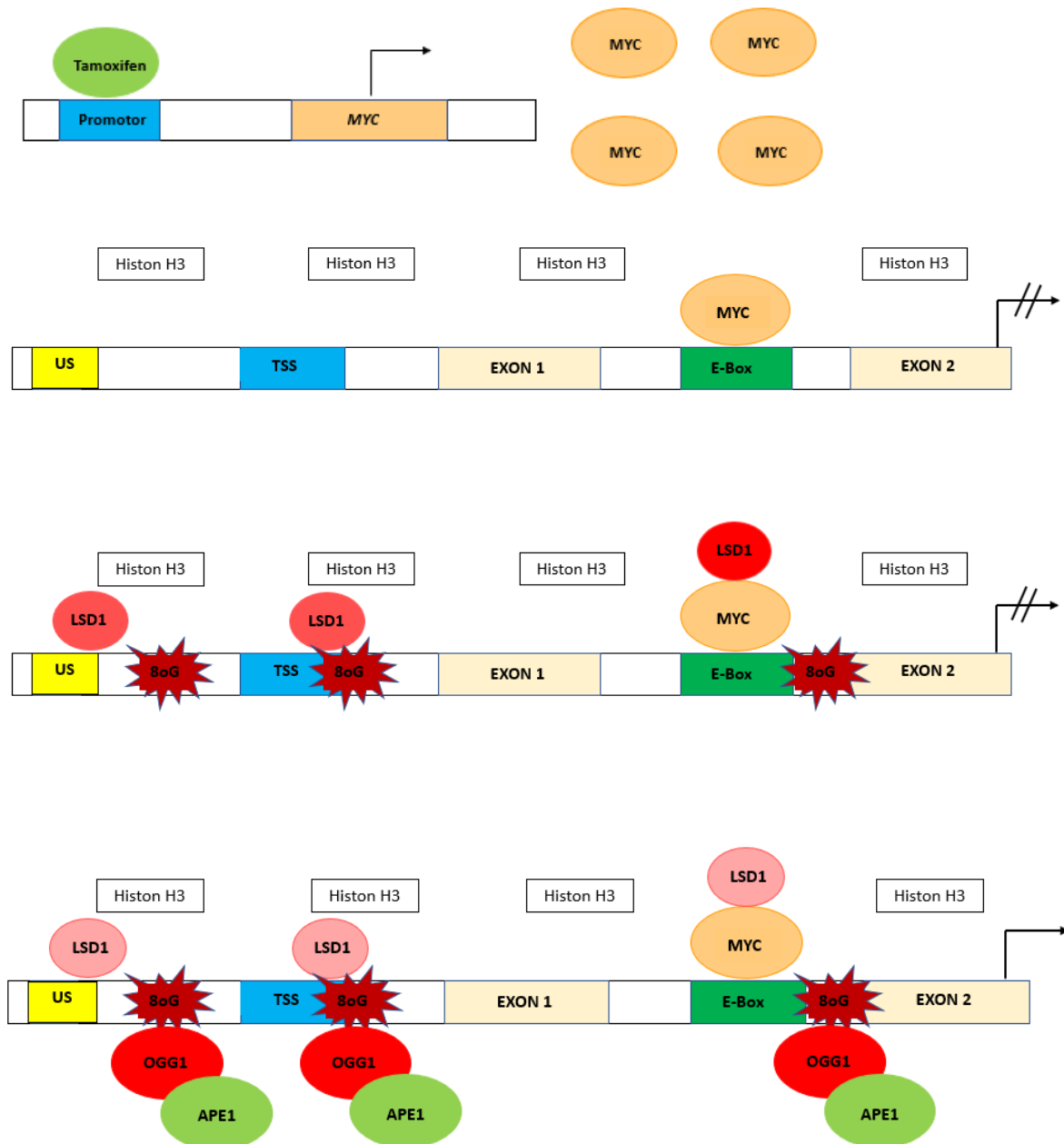


Abb. 1.9 LSD1-vermittelte Induktion von *NCL* bzw. *CAD* nach Amente et al. (2010). Weitere Erläuterungen im Text. (Li et al., 2013, verändert)

Die von Perillo und Amente et al. publizierten Mechanismen postulieren beide eine Beteiligung der Histondemethylase LSD1 bzw. KDM1a. Dieses Enzym wurde im Jahr 2004 von Shi et al. zum ersten Mal beschrieben. Die Forscher schreiben die Histondemethylase eine Funktion als Corepressor der Transkription zu, indem sie in der Lage ist, die aktiven Histonmarken H3K4me1/2 zu entfernen, wodurch ein Silencing induziert wird. Im Zusammenhang mit dem Androgenrezeptor ist allerdings eine Demethylierung von H3K9me1/2 möglich (Metzger et al., 2005).

Mit LSD2 gibt es weitere Demethylase, die die gleiche Substratspezifität wie LSD1 aufweist (Karytinov et al., 2009). Allerdings ist die Sequenzhomologie zu LSD1 eher gering.

LSD1 besteht, wie in Abb. 1.10 zu sehen, aus drei Domänen. Einer katalytisch aktiven Aminoxydasedomäne, die eine Bindestelle für den Cofaktor FAD besitzt (Schmidt, 2007), einer Towerdomäne, die die Interaktion mit weiteren Komplexen (z.B. dem CoREST-Komplex) ermöglicht (Chen et al., 2006)(Yang et al., 2006)(Hwang et al., 2011) und eine SWIRM-Domäne, die die Bindung zur DNA herstellt (Da et al., 2006)(Qian et al., 2005).

Wie Abb. 1.10 zu entnehmen, ist LSD2 LSD1 strukturell recht ähnlich. Allerdings weist sie keine Towerdomäne auf, so dass keine Interaktion mit dem CoREST-Komplex möglich ist. Auch die SWIRM-Domänen unterscheiden sich deutlich voneinander. (Shi et al., 2004).

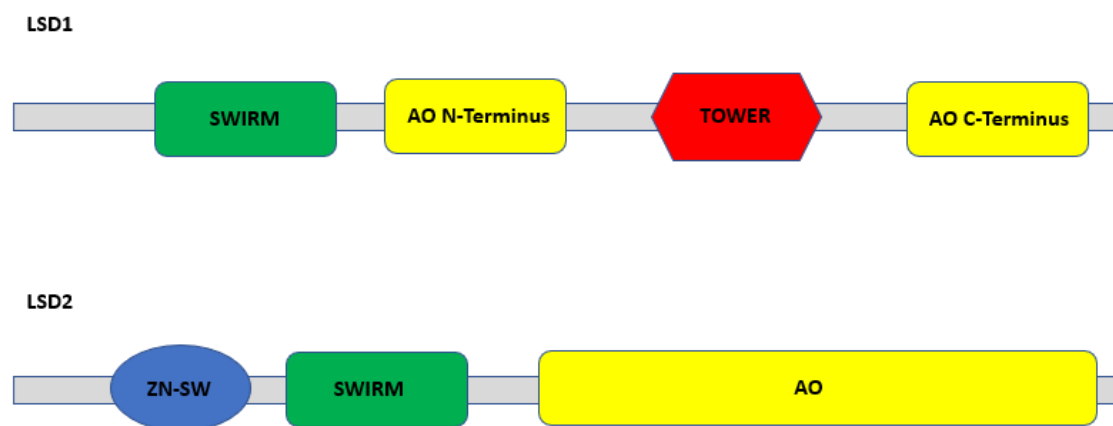


Abb. 1.10 Aufbau der Histondemethylasen LSD1 und LSD2. (Li et al., 2013, verändert)

Darüber hinaus kann LSD1 auch wichtige Nichthistonproteine demethylieren, dazu gehören p53, E2F1, DNMT1 und Stat3 (Burg et al., 2015). Über den Einfluss auf DNMT1, eine DNA-Methylase scheint es zudem möglich zu sein, DNA- und Histonmodifizierung miteinander zu verknüpfen.

LSD1 ist in viele biologische Prozesse involviert und spielt entsprechend auch bei der Entstehung und Progression von Krankheiten (z.B. Krebs) eine wichtige Rolle (Kooistra et al., 2012). Die Bedeutung von LSD1 zeigt sich darin, dass es in vielen Tumoren hochreguliert und eine Hemmung sich positiv auf die Krebsprogression auswirkt (Huang et al., 2012). Eine wichtige Funktion nimmt die Histondemethylase zudem in der embryonalen Entwicklung ein, da ein Knockout embryonal letal ist (Wang et al., 2007).

Beim Prozess der EMT bewirkt LSD1 gemeinsam mit SNAI1 ein Gensilencing (Lin et al., 2010). LSD1 kann aber auch die Induktion von Upstreamgenen z.B. durch TGF β oder Wnt, kontrollieren (McDonald, 2011)(Huang et al., 2012)(Wu et al., 2012). TGF β reduziert die Anzahl reprimierender Histonmarken (z.B. H3K9me2) und vergrößert die Menge an aktivierenden Histonmodifikationen (z.B. H3K4me3 und H3K36me3). An diesen Veränderungen ist LSD1 beteiligt (McDonald, 2011).

Der Demethylierungsprozess verläuft in mehreren Schritten über radikalische Zwischenprodukte (Abb. 1.11). Im ersten Schritt wird die Aminogruppe des Lysinrestes oxidiert und es entsteht ein Iminiumkation als Intermediat. Bei diesem Schritt wird FAD zu FADH₂ reduziert. Beim notwendigen Recyclingprozess des FAD entsteht Wasserstoffperoxid (Forneris et al., 2005)(Shi et al., 2004). Aus dem ersten Zwischenprodukt bildet sich zunächst ein Hemiaminal, der spontan zum demethylierten Lysinrest und Formaldehyd zerfällt. Der Mechanismus über LSD2 ist ähnlich (Karytinov et al., 2009).

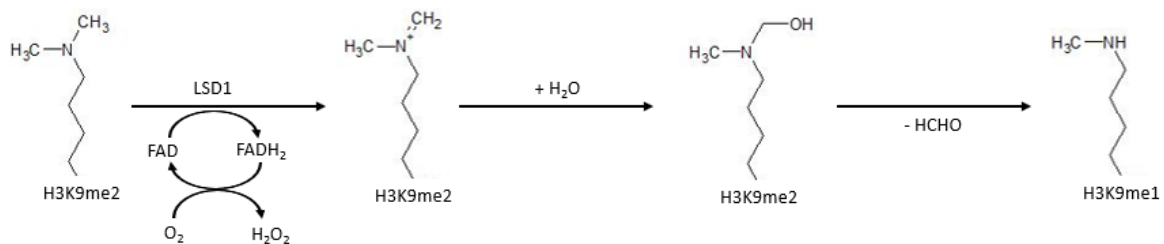


Abb. 1.11 Entstehung von H₂O₂ als Nebenprodukt der Demethylierung von H3K9me2 durch LSD1.

Neben den beiden LSD1-vermittelten Mechanismen gibt es einen weiteren, der 2012 von Boldogh et al. publiziert wurde (vgl. Abb. 1.12). Diese Hypothese geht ebenfalls von der Induktion oxidativer DNA-Modifikationen aus, die mittels OGG1-BER entfernt werden. Im Folgenden bindet allerdings die freie Base 8-oxo-7,8-Dihydroguanin (8-oxoGua) an die Glykosylase OGG1, so dass ein stöchiometrischer Komplex aus beiden entsteht. Dieser Proteinkomplex weist eine hohe Bindungsaffinität zu kleinen GTPasen auf (z.B. Rho). Dabei bewirkt die Bindung als GEF einen Guanosinaustausch und führt dabei zur Aktivierung der GTPase, die ihrerseits Downstreamgene induzieren kann (Boldogh et al., 2012).

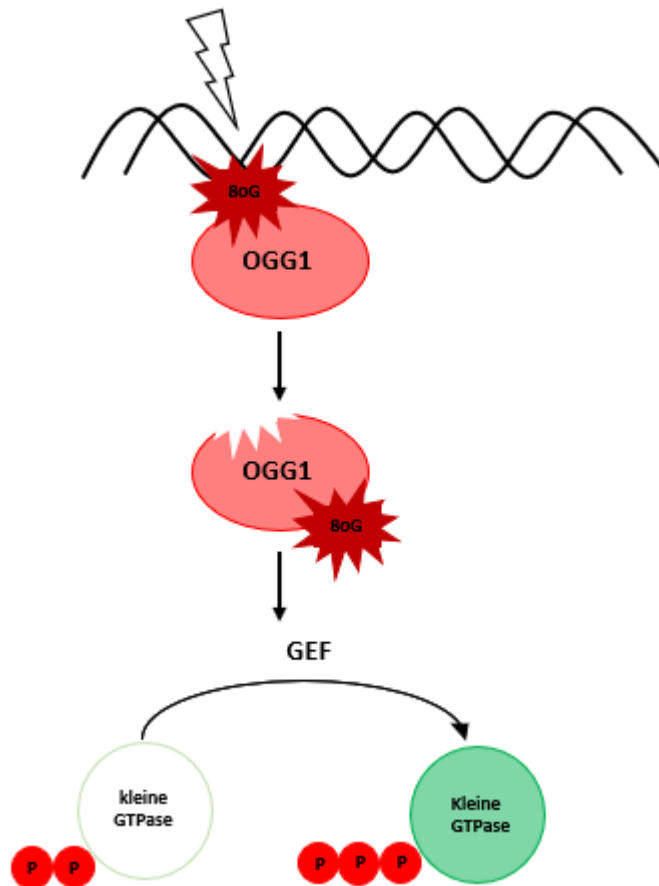


Abb. 1.12 Ein stöchiometrischer Komplex aus OGG1 und der freien Base 8-oxoGua agiert als Guanosin-Exchange Factor (GEF) und aktiviert dabei kleine GTPasen. (Seifermann und Epe, 2017, verändert)

1.6 Epithelial-mesenchymale Transition (EMT)

1.6.1 Allgemeines

Die erste Beschreibung von der Umwandlung von Epithel- in Mesenchymzellen stammt von E. Hay aus den 1980er Jahren (Hay et al., 1995a)(Hay et al., 1995b). Sie hat die charakteristischen morphologischen Veränderungen im sich entwickelnden Primitivstreifen von Hühnerembryonen beschrieben. Die geschilderte Umwandlung der Zellen wurde zunächst als Epithelial-to-Mesenchymal Transition und später lediglich als Epithelial-mesenchymal Transition bezeichnet. Mit der EMT ist die Rückkonvertierung von Mesenchym- in Epithelzellen als sog. Mesenchymal-epithelial-Transition (MET) verbunden.

Eine EMT geht mit charakteristischen Veränderungen einher. Die Epithelzellen, die sonst einer Basalmembran aufsitzen, verlieren ihre Zell-Zell-Kontakte und ihre sonst übliche apikal-basale-Polarität. Darüber hinaus findet eine Reorganisation des Zytoskeletts statt, mit dem Ziel, den Zellen migratorische Fähigkeiten zu verleihen, damit an anderen Orten im

Organismus neue Epithelien entstehen können. Die beschriebenen morphologischen Veränderungen werden durch eine genetische Reprogrammierung ausgelöst. Im Zuge dessen werden epitheliale Gene (z.B. E-Cadherin) stillgelegt und mesenchymale Gene (z.B. Fibronectin oder N-Cadherin) induziert. Aufgrund der Komplexität der Veränderungen sind am genetischen Reprogrammierung zahlreiche Transkriptionsfaktoren beteiligt. Dazu gehören Snai1/2, Twist, ZEB1/2, FOXC2 oder FOXA1 (Lamouille et al., 2014).

Die Vorgänge, die mit einer EMT verbunden sind, sind in Abb. 1.13 zusammenfassend dargestellt.

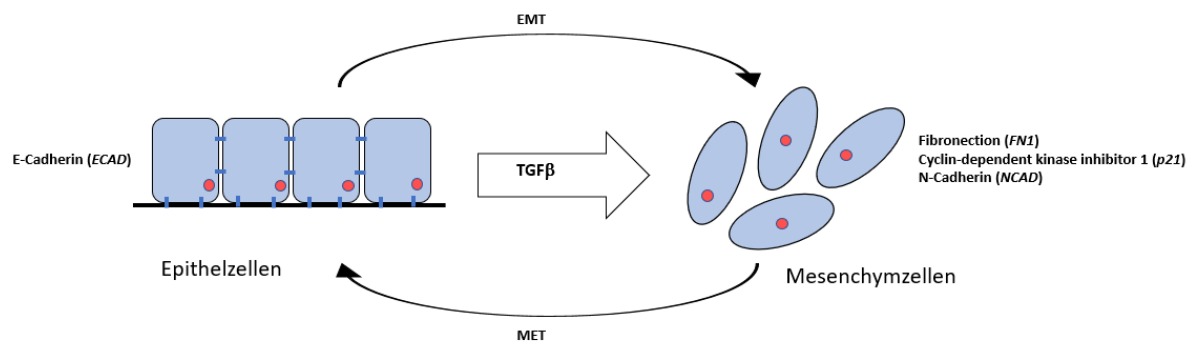


Abb. 1.13 Überblick über EMT und MET.

Oft wird eine EMT durch die Umgestaltung der extrazellulären Matrix begleitet, dies ist wichtig für die Initiierung und Progression einer EMT. Normalerweise findet die Zellkommunikation über Integrine statt, die Informationen der ECM an die Zellen übermitteln. Wenn allerdings eine EMT stattfindet, werden neue Informationen ausgetauscht, so dass das Expressionsmuster der Integrine verändert wird. Es ist bekannt, dass eine EMT u.a. durch das Zytokin TGFβ ausgelöst wird (Miettinen et al., 1994). Dies zeigt sich darin, dass eine Überaktivierung des TGFβ-Signalwegs mit Krankheiten (z.B. Fibrosen oder Krebs) verbunden ist (Yan et al., 2017). In Tumoren kommt dem Zytokin allerdings eine ambivalente Rolle zu. In frühen Stadien wirkt es, wie in Epithelzellen, als Repressor des Zellzykluses, in fortgeschrittenen Stadien wird es allerdings vom Tumorsuppressor zum Onkogen (Valcourt et al., 2005)(Heldin et al., 2009). Dem Zytokin kommt im Rahmen der EMT I eine wichtige Rolle in der Embryogenese zu (Tosh und Slack, 2002)(Gotzmann et al., 2004). Von diesem Typ werden noch zwei weitere EMTs unterschieden, die unter pathologischen Bedingungen stattfinden. Typ II findet bei Wundheilung und Fibrosen statt und Typ III bei der Metastasierung von Krebszellen (Moustakas und Heldin, 2016).

Dieses Zytokin wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, so dass es daher im Fokus der folgenden Ausführungen liegt.

1.6.2 TGF β vermitteltes SMAD-abhängiges Signaling

Eine Übersicht über den SMAD-abhängigen Signalweg ist in Abb. 1.14 dargestellt. In einem ersten Schritt bindet TGF β an Zelloberflächenrezeptoren, die sog. Typ I und Typ II-Rezeptoren. Beide besitzen eine intrinsische Serin-Threonin- und eine schwache Tyrosinkinase-Aktivität (ten Dijken und Hill, 2004). Nach Ligandenbindung bilden je 2 Typ I- und Typ II-Rezeptoren einen tetrameren Komplex und der Typ II transaktiviert den Typ I-Rezeptor durch Phosphorylierung einer konservierten Glycin-Serin-Glycin reichen Sequenz (Souchelnytskyi et al., 1996). Dies führt zur Dissoziation des inhibierenden Proteins PKBP12 von Typ I-Rezeptor und damit zu seiner Aktivierung (Huse et al., 2001). Der aktivierte Typ I-Rezeptor kann seinerseits das Signaling beeinflussen, indem er R-SMADs (SMAD2 und 3) am carboxyterminalen SSXS-Motiv phosphoryliert (Abdollah et al., 1997)(Souchelnytskyi et al., 1997). Genauer findet die Phosphorylierung an zwei Serinen innerhalb des Serin-X-Serin-Motiv statt. Dabei steht das X für Valin oder Methionin (Hill, 2016). Die Phosphorylierungsreaktion induziert die Dissoziation von SARA (SMAD anchor for receptor activation) und SMAD2 (Abdollah et al., 1997).

Nach ihrer Aktivierung bilden SMAD2 und 3 mit dem Co-SMAD SMAD4 einen Komplex, translozieren gemeinsam in den Nucleus, binden entweder direkt oder indirekt über andere Transkriptionsfaktoren an die DNA und beeinflussen so die Genexpression (Massague et al., 2005)(Massague, 2012).

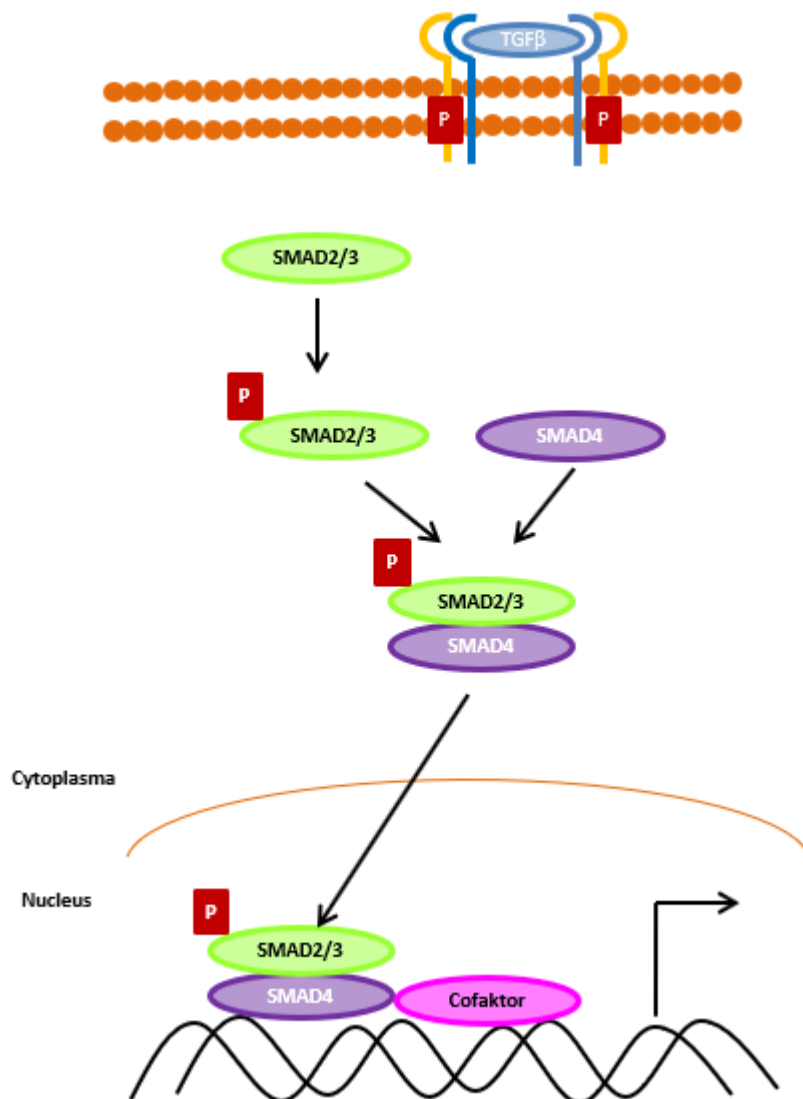


Abb. 1.14 SMAD-abhängige TGFβ-Signalkaskade.

Im inaktivem Zustand pendeln SMADs ständig zwischen Nucleus und Cytoplasma (Xu et al., 2002). Nach Ligandenbindung wird allerdings ein Import- bzw. Exportsignal benötigt (Chen und Xu, 2010)(Hill, 2009)(Dai et al., 2009).

R-SMADs und SMAD4 haben zwei konservierte Domänen, die für ihre Aktivität wichtig sind: die MH1- und die MH2-Domäne. Beide sind durch einen prolinreichen Linker miteinander verbunden. Die MH1-Domäne ist hierbei für die DNA-Bindungen verantwortlich (Shi et al., 1998) und die MH2-Domäne wird für verschiedene Interaktionen (z.B. SMAD-Rezeptor, SMAD-SMAD oder SMAD-Transkriptionsfaktor-Wechselwirkungen) benötigt (Feng und Derynck, 2005). Durch Analysen der Kristallstruktur wurde bestätigt, dass SMAD3 und 4 an die palindromische Sequenz GTCTAGAC binden (Macias et al., 2015). Aus diesem Grund wird

sie auch als SMAD-Bindung-Element (SBE) bezeichnet (Zawel et al., 1998). In Abwesenheit von TGF β sind SMADs inaktiv und ihre MH1- und MH2-Domäne interagieren miteinander, was eine Autoinhibierung zur Folge hat. Die Phosphorylierung führt zu einer Konformationsänderung, die eine Interaktion der MH2-Domäne mit den R-SMADs ermöglicht (Hata et al., 1998)(Zhang et al., 1996).

Trotz ihrer Fähigkeit an DNA zu binden, ist die Affinität von SMADs zur DNA gering (Kd~ 1×10^{-7} M) bzw. für SMAD2 nicht vorhanden (Shi et al., 1998). Deshalb werden weitere Transkriptionsfaktoren benötigt, um eine hochaffine und hochspezifische DNA-Bindung sicherzustellen. Die Bindung von SMADs an ein SBE in endogenen Promotoren ist *in vivo* für ein Signaling nicht ausreichend. Allerdings ist die Bindung von SMADs an mehrere SBEs in räumlicher Nähe zueinander wohl ausreichend (Gomis et al., 2006a).

In einigen Fällen werden Transkriptionsfaktoren benötigt, um SMADs zur DNA zu leiten. In anderen binden sie gemeinsam mit SMADs an Enhancer. SMADs selbst sind aber auch Ziel von anderen Signalwegen oder weiteren Faktoren, wodurch eine zelltypspezifische Reaktion möglich wird. Darüber hinaus sind SMADs an der Aktivierung von EMT-typischen Transkriptionsfaktoren (z.B. SNAI1) beteiligt (Hoot et al., 2008). Es ist sogar vorstellbar, dass über die Zusammenarbeit von SMADs mit bestimmten Cofaktoren in Abhängigkeit vom Chromatinstatus, Entwicklungszustand oder Umweltbedingungen das Signaling entsprechend angepasst werden kann (Gomis et al., 2006a).

In wenigen Fällen binden SMADs und Transkriptionsfaktoren gemeinsam an SBEs und arbeiten bei der Induktion von Genen zusammen. Inzwischen sind viele Transkriptionsfaktoren identifiziert, die mit SMADs zusammenarbeiten. So erfordert die Induktion von *CDKN1A/ p21* in humanen Keratinozyten neben SMAD2, 3 und 4 die Transkriptionsfaktoren FOXO1/3 und/ oder 4 (Seoane et al., 2004)(Gomis et al., 2006a). Darüber hinaus werden die Adapterproteine AP1 und der Transkriptionsfaktor ETS1 benötigt (Gomis et al., 2006b)(Seoane et al., 2004)(Koinuma et al., 2009). Vor einer Induktion von *p21* muss allerdings Myc inaktiviert werden, dies geschieht u.a. durch die Bindung von E2F4 und E2F5 an den Myc-Promotor (Gomis et al., 2006b)(Chen et al., 2002).

Zur Aktivierung von SNAI1 hingegen wird HMG2A benötigt (Thualut et al., 2008). Daneben interagieren auch Sp1 und Mitglieder der AP1-Familie mit SMAD2 und 3 (Feng und Derynck, 2005)(Ross und Hill, 2008). Durch das Zusammenspiel von verschiedenen

Transkriptionsfaktoren ist es möglich, mehrere Signalwege miteinander zu verknüpfen. So kann aktiviertes p53 mit SMAD2 und 3 interagieren und darüber Redoxsignale mit TGF β -Signaling verbinden (Overstreet et al., 2014).

Interessant ist die Induktion von *CDKN1B/ p15* durch TGF β . Hierbei soll das Zytokin eine aktive Demethylierung des Promotors induzieren (Thillainadesan et al., 2012). Die Transkription des Gens wird durch eine Methylierung des Promotors durch den CoREST-Komplex sichergestellt (Laugesen und Helin, 2014). Daneben findet man ZNF217 und DNMT3A am inaktivierten Promotor. TGF β veranlasst nun die aktive DNA-Demethylierung durch Entfernen von ZNF217, CoREST-Komplex und DNMT3A vom Promotor. Zudem werden SMAD2/3, HAT CBP und TDG rekrutiert. Für die Demethylierung wird die Desaminase-Aktivität von TDG und/ oder MBD4 postuliert. Vor dem Entfernen der Promotormethylierung ist allerdings eine Prozessierung von 5-Methylcytosin (5-mC) in ein Substrat, das von einer der beiden DNA-Glykosylasen erkannt werden kann, erforderlich. Grundsätzlich kommen hierfür mehrere Reaktionen in Betracht. Es ist möglich 5mC durch AID oder APOBEC zu Thymin zu desaminieren, was eine G:T-Fehlpaarung zur Folge hätte. Diese kann sowohl von TDG als auch MBD4 erkannt und entfernt werden. Weiterhin ist es möglich 5-mC zu 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC) mittels TET1-3 zu oxidieren. Anschließend kann 5-hmC zu 5-Hydroxyuracil (5-hmU) desaminiert werden, was letztendlich zu einem 5-hmU:G-Fehlpaarung führt. Diese kann von TDG erkannt werden. Darüber hinaus ist die Umwandlung von 5-mC zu 5-Formylcytosin (5-fC) oder 5-Carboxycytosin (5-caC) möglich, die beide ebenfalls von TDG erkannt und entfernt werden können. Thillainadesan et al. zeigen in ihrer Publikation, dass die Umwandlung von 5-mC in 5-hmC vor einer Aktivierung von *p15* stattfindet.

Wie diese Beobachtung zeigt, sind bei einer EMT auch epigenetische Veränderungen zu beobachten. So wird ein Anstieg von aktiven Histonmarken (H3K4me3 und H3K36me3) und ein Rückgang von reprimierenden Histonmarken (z.B. H3K9me2) beobachtet.

Neben der Aktivierung ist es aber auch wichtig, das TGF β -vermittelte Signaling gezielt zu beenden. Hierzu entfernen Phosphatasen die aktivierenden Phosphatgruppen von den R-SMADs. Allerdings ist noch nicht aufgeklärt, um welche Phosphatasen es sich handelt (Bruce und Saptoka, 2012)(Lin, 2006). Parallel zu den R-SMADs werden auch sog. inhibitorische oder I-SMADs aktiviert (v.a. SMAD7), die die Wirkung der R-SMADs antagonisieren, indem

sie mit ihnen um die Bindung am Typ I-Rezeptor konkurrieren (Miyazono et al., 2000). Im Gegensatz zu den R- und Co-SMADs fehlt ihnen die MH1-Domäne (Heldin et al., 1997). Sie werden ebenfalls durch TGF β aktiviert und führen im Komplex mit Smurf1/2 zur Rezeptorubiquitylierung und zur degradativen Endocytose (Kavsak et al., 2000)(Ebisawa et al., 2001). Für die Kontrolle der basalen SMAD-Spiegel ist das Enzym SMURF zuständig (Zhu et al., 1999). I-SMADs sind aber auch am TRAF6-Signaling bzw. der Aktivierung der MAP-Kinase Kaskade beteiligt (Mazars et al., 2001).

1.6.3 SMAD-unabhängiges Signaling

Durch die Bindung von TGF β an die Zelloberflächenrezeptoren werden neben dem SMAD-abhängigen Signalweg auch SMAD-unabhängige Wege induziert. Dazu gehören u.a. ERK1/2, JNK, p38, Pi3-Kinase und Rho GTPasen (Moustakas und Heldin, 2005).

Die Aktivierung von ERK1/2 verläuft, wie in Abb. 1.15 zu sehen, über die Aktivierung von SHC durch den Typ-I-Rezeptor. Anschließend bindet ein Komplex aus GRB2 und SOS1 an SHC und wirkt als GEF für Ras, so dass Erk schließlich über die Ras-Raf-MEK-Kaskade aktiviert wird (Lee et al., 2007). ERK hat verschiedene Funktionen im TGF β -Signaling. Es inaktiviert durch Cleavage den Typ-I-Rezeptor (Liu et al., 2009). Zudem kann es den SMAD-Linker von SMAD3 phosphorylieren und dadurch die durch SMAD3-vermittelte Transkription vermindern (Matsuura et al., 2005). Dies geschieht durch den Rückgang des nukleären Transports (Kretzschmer et al., 1997). Auch die übrigen SMADs können durch ERK beeinflusst werden (Saha et al., 2001)(Uchida et al., 2001). Darüber hinaus beschreiben Zavadil et al. (2001) einen Einfluss von ERK1/2 auf ca. 80 TGF β -induzierte Gene. Zusammenfassend kommt ERK1/2 eine wichtige Rolle beim Lösen von Zellverbindungen und der Zellmigration zu (Hartsough et al., 1995)(Frey et al., 1997)(Papageorgis et al., 2011).

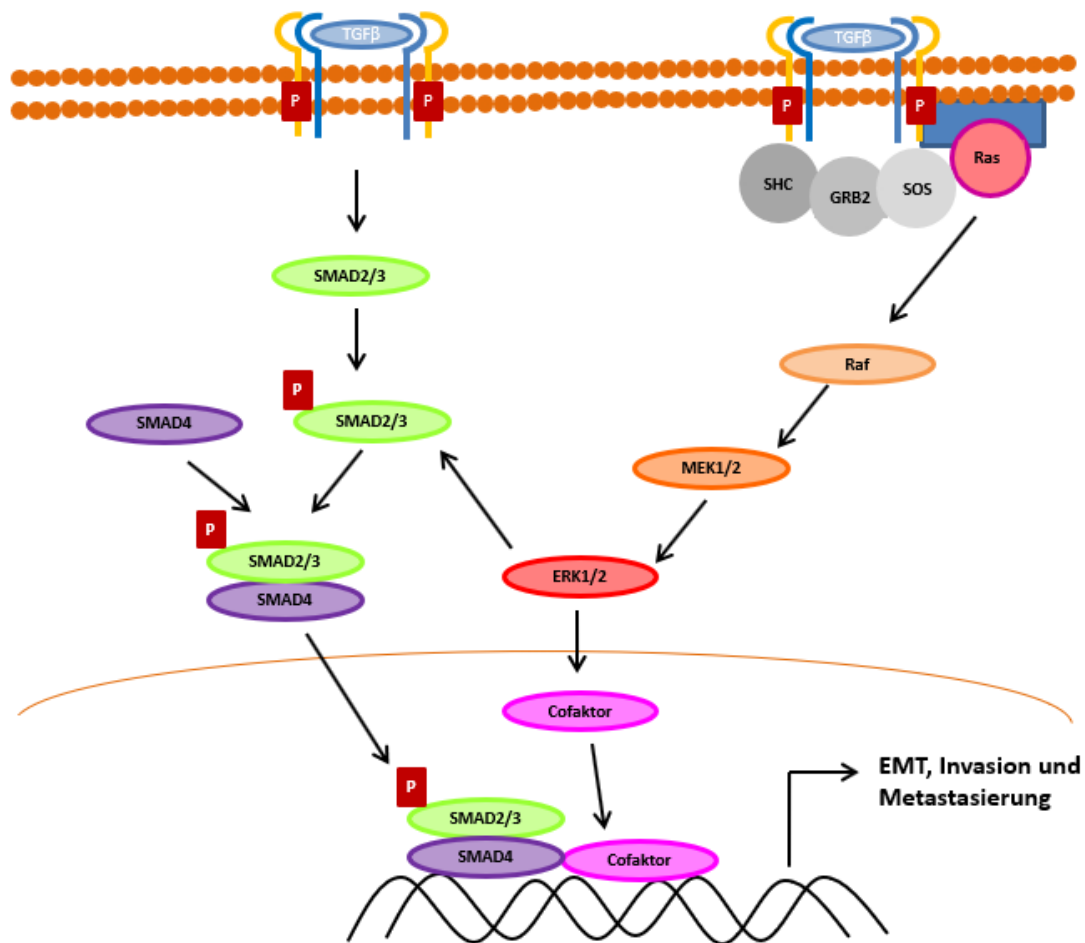


Abb. 1.15 TGFβ-vermittelte Induktion der MAP-Kinase ERK1/2 und deren modulierender Einfluss auf die Genexpression. (Zhang, 2017, verändert)

Die Aktivierung der beiden anderen MAP-Kinasen, JNK und p38, beginnt mit einer Komplexbildung von TRAF6 und den TGFβ-Rezeptoren, wodurch die Kinase TAK1 aktiviert wird (Sorrentino et al., 2008)(Yamaguchi et al., 1995). TAK1 aktiviert als MAPKKK MKK4 um JNK (Hocevar et al., 1999) und MKK3 oder MKK6 um p38 zu aktivieren (Sorrentino et al., 2008). Durch eine Phosphorylierungsreaktion werden die genannten MAP-Kinasen aktiviert (Yamashita et al., 2008)(Sorrentino et al., 2008). In Abb. 1.16 ist eine Darstellung über die Aktivierung der genannten MAP-Kinase zu sehen. Darüber hinaus ist die Aktivierung von p38 und JNK über RhoGTPasen möglich, allerdings ist der Mechanismus unbekannt (Edlund et al., 2002)(Minden et al., 1995). Die phosphorylierte JNK ist in der Lage, mit c-Jun einen Bestandteil des Transkriptionsfaktors AP1 zu aktivieren (Verrecchia et al., 2001)(Santibanez, 2006), der mit den R-SMADs wechselwirken kann (Zhang et al., 1998).

Neben einer MAP-Kinase Aktivierung kann TAK1 auch NF κ B aktivieren, da es IKK α phosphorylieren kann (Wang et al., 2001). Eine Aktivierung von NF κ B kann auch von der GTPase ROCK ausgehen, was ebenfalls TAK1 aktiviert, die ihrerseits IKK β phosphoryliert (Kim et al., 2014). Zudem ist eine Stimulierung des NF κ B-Signalings über den Pi3K-Weg möglich (Yeh et al., 2008). Über den NF κ B-Signalweg ist eine Regulierung von Apoptose, Migration und EMT möglich (Sorrentino et al. 2008)(Adhikari et al., 2007)(Heldin et al., 2009)(Zhang et al., 2013). In Keratinozyten verläuft die Regulierung von Proliferation und Differenzierung über den genannten Signalweg (Descargus et al., 2008).

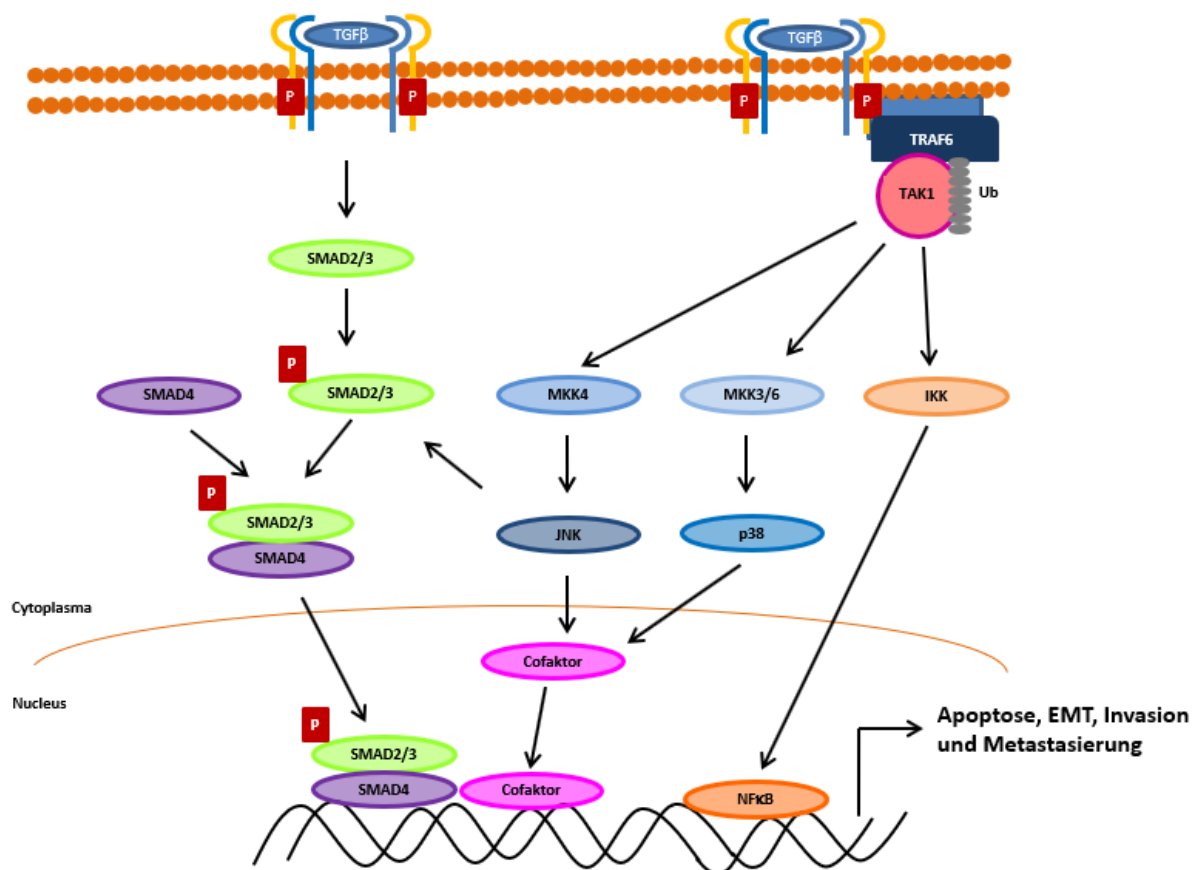


Abb. 1.16 TGF β -vermittelte Induktion der MAP-Kinase p38 und JNK sowie NF κ B und deren modulierender Einfluss auf die Genexpression. (Zhang, 2017, verändert)

Einige TGF β -vermittelte morphologischen Veränderungen (z.B. die Reorganisation des Zytoskeletts, die Zellpolarität und die Zellmigration) werden über die Rho-like Familie der kleinen GTPasen reguliert (Jaffe et al., 2005). Das Zytokin kann sehr schnell ein Signaling über RHOA und CDC42/ RAC1 induzieren, das unabhängig von SMAD2/3 ist und zur

Actinpolymerisierung und der Bildung von Stressfasern führt (Bhomwick et al., 2001)(Edlund et al., 2002).

1.6.4 TGF β -vermittelte EMT-typische Endpunkte

1.6.4.1 Induktion eines G1-Arrestes

In den 1980er Jahren wurde publiziert, dass TGF β in epithelialen Zellen die Zellproliferation unterbinden kann (Tucker et al., 1984)(Silberstein und Daniel, 1987). Das Zytokin kann den Zellzyklus auf unterschiedliche Art und Weise beeinflussen. Zum einen ist eine Verlängerung der G1-Zeit (Massague, 1990) und zum anderen ist eine Arretierung der Zellen in der späten G1-Phase beschrieben (Shiple et al., 1986)(Coffey et al., 1988).

Die molekulare Steuerung des TGF β -vermittelten Zellzyklusarrestes erfolgt durch ein komplexes Netzwerk verschiedener Transkriptionsfaktoren und Zellzyklusproteine (CDKs und Cycline). In Abb. 1.17 ist das Zusammenspiel der unterschiedlichen Faktoren dargestellt.

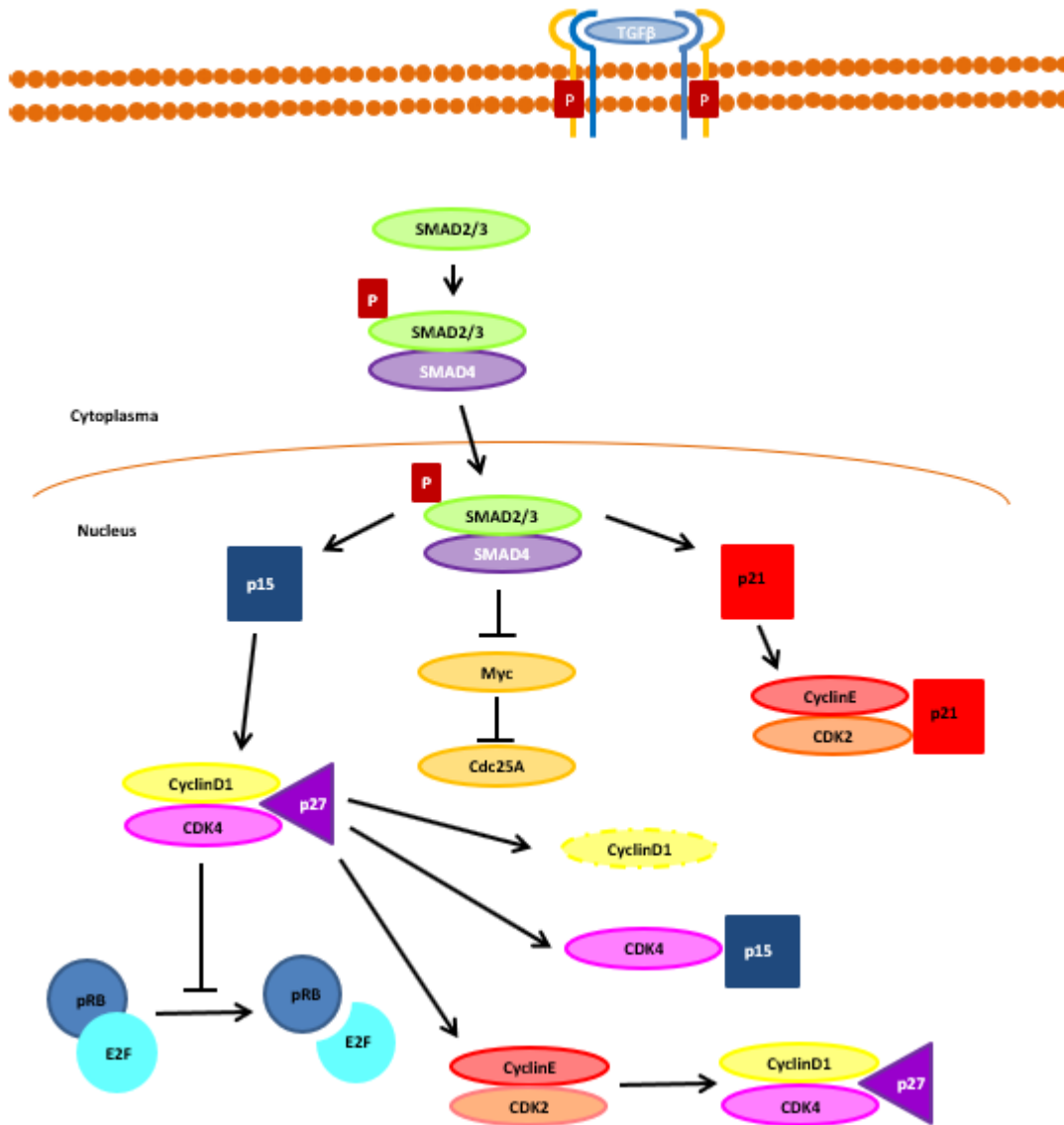


Abb. 1.17 TGFβ induziert einen G1-Arrest. (Donovan und Slingerland, 2000, verändert)

Der Zellzyklus wird durch CDKs gesteuert, die durch Cycline aktiviert und durch CDK-Inhibitoren gehemmt werden (Abb. 1.18). Der Übergang von der G1- zur S-Phase wird durch D-Cycline, E-Cycline und Cyclin-A-assoziierte CDKs bewirkt. E- und D-Cycline-CDKs tragen zur Phosphorylierung des Rb-Proteins bei, das in der späten G1-Phase zur Induktion von Genen der E2F-Familie führt, die zum Übergang in die S-Phase benötigt werden.

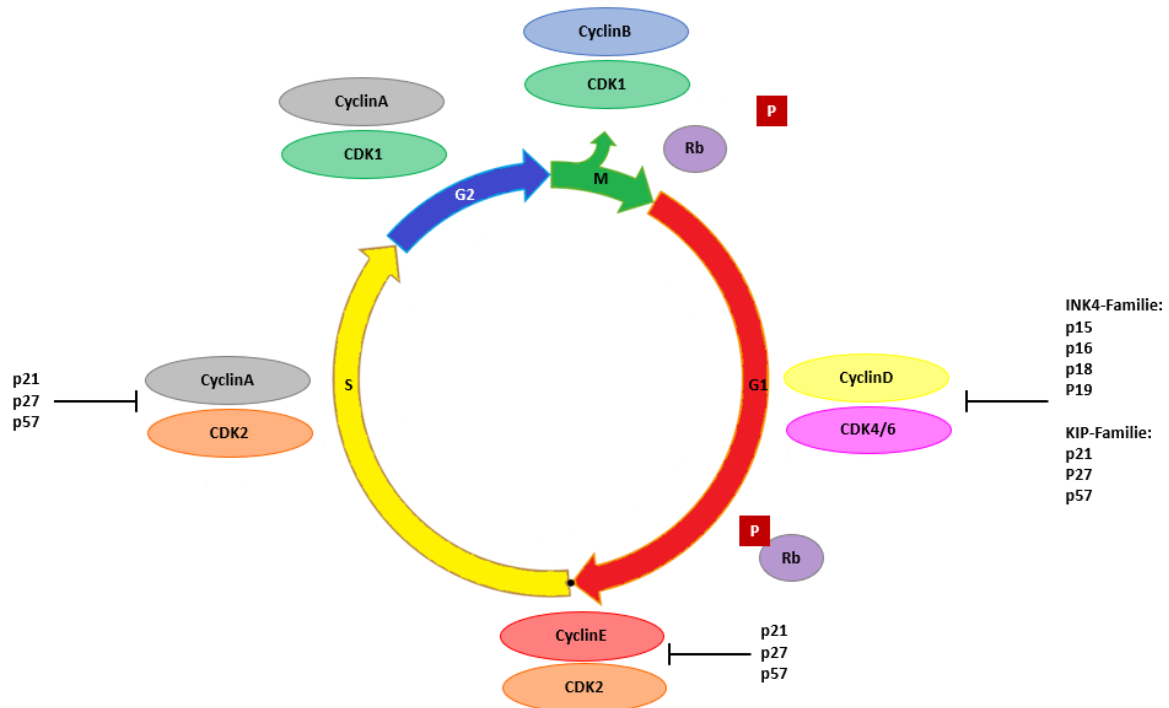


Abb. 1.17 Überblick über die Zellzyklusphasen und der Cyclin-CDK-Komplexe.

CDKs werden durch Cdc25 Phosphatasen reguliert und erst durch die Dephosphorylierung von CDK2 vollständig aktiviert. CDK-Inhibitoren kommt eine wichtige Rolle zu, da sie CDK2 und CDK4 spezifisch hemmen können.

Ein wesentlicher Inhibitor von CDK4 ist z.B. p15. Er gehört der INK4-Familie an. Ein Verlust dieses Proteins trägt mit zum TGF β induzierten Verlust des G1-Arrestes in Krebszellen bei.

Eine weitere wichtige CDK-Inhibitorfamilie (KIP-Familie) umfasst p21, p27 und p57. Ihr Erkennungsspektrum ist wesentlich breiter als das von p15.

In Abhängigkeit ihrer Position im Zellzyklus reagieren Zellen entweder mit einem sofortigen Stopp des Zellzyklus in der G1-Phase oder sie beenden den Zyklus noch und arretieren dann in der genannten Phase.

Die Induktion eines Zellzyklusarrestes verläuft über zwei verschiedene Mechanismen (Abb. 1.17). Über einen Mechanismus induziert TGF β die CDK-Inhibitoren p15, p21 und p27 (Datto et al., 1995)(Polyak et al., 1994)(Sandhu et al., 1997). In Epithelzellen wird beispielsweise p15 verstärkt exprimiert und es kommt zur Ausbildung von p15-CDK4/6 Komplexen, die die Bildung von CyclinD1-CDK4/6 Komplexen verhindern, die eine Progression des Zellzyklus sicherstellen (Sandhu et al., 1997). TGF β verhindert aber auch die Bildung der Komplexe aus

CyclinE-CDK2 und CyclinA-CDK2 durch p21 und p27 (Reynisdottir et al., 1995)(Reynisdottir und Massague, 1997).

Über einen weiteren Mechanismus verhindert das Zytokin die Zellzyklusprogression durch die Hemmung von c-Myc und ID1/2/3 (Inhibitor of DNA binding protein 1/2/3) (Pietenpol et al., 1990)(Norton et al., 2000). In proliferierenden Zellen verhindert c-Myc durch die Bindung von MIZ1 an die Promotoren von p15 und p21 deren Transkription (Seoane et al., 2001)(Staller et al., 2001). Auch die Suppression von ID-Genen trägt zum Zellzyklusstopp bei, da die ID-Proteine mit dem Rb-Protein (Retinoblastom) interagieren und es inhibieren. Dadurch ist ein Übergang in die S-Phase nicht länger möglich (Lasorella et al., 2000).

1.6.4.2 TGF β induziert die Expression von p21

In der vorliegenden Arbeit wird der Fokus auf das Zellzyklusgen *p21* (*CDKN1A*) gelegt. Seit Jahrzehnten ist bekannt, dass *p21* durch den Tumorsuppressor *p53* aktiviert werden kann. An der TGF β -induzierten Aktivierung scheint *p53* allerdings nicht beteiligt zu sein (Datto et al., 1995a). Vielmehr ist beschrieben, dass *p21* recht schnell durch den SMAD-Pathway aktiviert wird (Pardali et al., 2005). Dies belegen Arbeiten mit SMAD4-defizienten Zellen (Gomis et al., 2006a). Darüber hinaus werden die SMAD-Cofaktoren FOXO1, 3 und/ oder 4 benötigt. Wie bereits erwähnt, wird *p21* durch c-Myc in einem inaktiven Zustand gehalten, so dass dessen Repression einer *p21*-Induktion vorgeschaltet ist. Darüber hinaus wird der Transkriptionsfaktor Sp1 für die Aktivierung von *p21* benötigt (Datto et al., 1995b)(Moustakas und Kardassis, 1998)(Pardali et al., 2000)(Seoane et al., 2004). Daneben ist eine Induktion von *p21* über RAS, MEKK1 und ERK beschrieben (Hu et al., 1999)(Kivinen und Laiho, 1999). Es gibt auch Publikationen, die eine Beteiligung von p53 am SMAD-abhängigen TGF β -Signaling zeigen (Overstreet et al., 2014)(Cordenonsi et al., 2003). In Keratinozyten ist zudem ein Weg über PKC α beschrieben (Sakaguchi et al., 2004). Dabei ist diese Kinase für die Rekrutierung von Sp1 zuständig (Pardali et al., 2000).

Eine veränderte Expression von CDK-Inhibitoren wird in verschiedenen Krebsarten berichtet. So ist ein Verlust von *p21* in fortgeschrittenen Brustkrebsstadien beschrieben und geht mit einer schlechten Patientenprognose einher (Jiang et al., 1997)(Tsihlias et al., 1998).

1.6.5 TGF β -induzierte Veränderung der extrazellulären Matrix (ECM)

1.6.5.1 Aufbau der ECM

Unter dem Begriff ECM wird die Gesamtheit der Makromoleküle, die sich außerhalb der Plasmamembran befinden, zusammengefasst. Die Moleküle werden von den umgebenden Zellen synthetisiert und anschließend sezerniert. Ihre Funktion besteht darin, den umgebenden Zellen sowohl strukturelle als auch biochemische Unterstützung zu geben. Konkret bestehen ihre Aufgaben in der Zelladhäsion, Zell-Zell-Kommunikation und Differenzierung. Grundsätzlich besteht die ECM aus zwei Komponenten: der Grundsubstanz und den Fasern. Der faserige Anteil wird hauptsächlich durch Kollagenfasern gebildet. Ihre Aufgabe ist es, den Zellen strukturelle Unterstützung zu geben. Daneben gibt es noch Elastin, das einem Gewebe Elastizität verleiht. Die Grundsubstanz wird aus Proteoglykanen gebildet. Es handelt sich hierbei um Polysaccharide, die mit Proteinen verbunden sind. Aufgrund ihrer negativen Ladung binden positiv geladene Ionen an sie und Wasser folgt osmotisch. Zudem sind sie in der Lage, Botenstoffe (z.B. Wachstumsfaktoren) in der ECM zu binden und dadurch Einfluss auf das intrazelluläre Signaling zu nehmen. Zudem gibt es auf der Oberfläche fast aller Zellen Rezeptoren, die in Kontakt mit der ECM stehen.

Fibronectin ist ein wichtiges Glykoprotein in der ECM, das als lösliches Dimer im Plasma oder als unlösliches Dimer oder Multimer auf Zelloberflächen und in der ECM vorkommt. Die lösliche Form spielt eine wichtige Rolle bei der Blutgerinnung und Wundheilung. Es wirkt sich positiv auf die Wundheilung aus, da es in Fibringerinnsel eingelagert wird und die Anheftung von Keratinozyten oder Immunzellen erleichtert. Die unlösliche Form wird in die ECM eingelagert und verbindet Kollagenfasern mit anderen Komponenten der ECM bzw. stellt über Integrine den Kontakt zu Zellen her. Darüber hinaus kann es auch als Adhäsionsmolekül fungieren, sogar eine Beteiligung bei der Anheftung von Metastasen wird diskutiert.

Auch bei Wachstums und Differenzierungsprozessen spielt Fibronectin eine große Rolle. Ein Knockout des Proteins ist embryonal letal (George et al., 1993). Es wird in vielen Zellen und Geweben exprimiert. Das Glykoprotein ist ein Dimer aus zwei ca. 250 kDa großen Untereinheiten, die nahe am C-Terminus über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Für Fibronectin sind viele Splicevarianten beschrieben, dies gilt insbesondere für die unlösliche Form (Pankov und Yamada, 2002).

1.6.5.2 TGF β vermittelte Induktion von FN1

Fibronectin kann in *in vitro*-Experimenten durch die Behandlung mit TGF β induziert werden.

Die Aktivierung von FN1 verläuft hierbei direkt über SMADs (Itoh et al., 2003)(Isono et al., 2002)(Kowanetz et al., 2004). Zunächst war man davon ausgegangen, dass die Induktion von FN1 nur SMAD-unabhängig, über JNK verläuft (Hocevar et al., 1999). Dies wurde inzwischen aber eindeutig widerlegt. Zudem ist eine Beteiligung von p38 und ERK1/2 an der Induktion von Genen, die am Remodelling der ECM beteiligt sind, beschrieben. Dies betrifft v.a. das Lösen von Zellverbindungen z.B. Tight junctions (Yu et al., 2002)(Zavadil et al., 2001). Neben dem Transkriptionsfaktor Snai1 sind noch weitere Transkriptionsfaktoren (z.B. TWIST1, FOXC2 und FOXA1) an der Induktion beteiligt (Lamouille et al., 2014). Zudem sollen ROS an der Induktion des Glykoproteins beteiligt sein (Ishikawa et al., 2014). Wie bereits beschrieben, ist auch in diesem Fall der Zelltyp von Bedeutung (Hough et al., 2012).

Daneben existiert eine weitere Hypothese zur Induktion von FN1, wonach die p65-Untereinheit von NF κ B mit PARP1 den Transkriptionsfaktor SNAI1 bei der Induktion von FN1 unterstützen (Stanisavljevic et al., 2011). Darüber hinaus postulieren Jagadeeshan et al. (2015), dass die p21-aktivierte Kinase 1 (PAK1) mit NF κ B gemeinsam an den FN1-Promotor bindet und die Transkription initiiert.

1.17 Zielsetzung

Die TGF β -induzierte EMT stellt einen wichtigen biologischen Prozess dar, der in der Organogenese von großer Bedeutung ist. Allerdings können Signalwege, die eine EMT zur Folge haben, auch im adulten Organismus aktiviert werden z.B. bei der Wundheilung, Fibrose und Metastasierung von Krebszellen. Das Wissen über EMT-auslösende Signalwege liefert wichtige Erkenntnisse um den komplexen Prozess zum einen besser zu verstehen und zum anderen gezielt therapeutisch eingreifen zu können.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der DNA-Glykosylase OGG1 bei der TGF β -vermittelten Induktion der EMT zu untersuchen. Als Modellsystem wurde eine OGG1-defiziente HaCaT-Zelllinie etabliert. Zwei, für EMT charakteristische Endpunkte wurden für die Untersuchungen ausgewählt: die Induktion eines G1-Arrestes und die Veränderung der ECM. Um die Rolle von OGG1 am TGF β -vermittelten Signaling untersuchen zu können, sollte gezielt in die Signalübertragung eingegriffen und die Folgen auf die Expression der genannten Markergene ausgewertet werden.

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav: Technoclav 50 6.0 bzw. 2.0	Fedegari Autoclav SPA, Albuzzo (I)
Destillationsapparatur: Destamat®	Heraeus, Hanau
DNA Fluorometer Modell TKO 100	Hoefer Scientific, San Francisco (USA)
Durchflusszytometer: BD LSRFortessa	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage: AG 245, max. 210 g	Mettler Toledo, Columbus (USA)
Fraktionsammler: Ultrorac 2070 II MM 10, Neolab 4 mit Zeitnehmer SM 999	Pharmacia/ LKB, Uppsala (S) Neolab, Heidelberg
Geldokumentation: Molecular Imager Gel Doc XR+	Bio-Rad, München
Gelelektrophorese-Apparatur	Bio-Rad, München
Glaspipetten (5 und 10 ml)	Hartenstein, Würzburg
Inkubator: Hera Cell 150	Heraeus, Hanau
Kolbenhubpipetten (BioPette A)	Labnet International, Edison (USA)
Lichtmikroskop: Telaval 31	Zeiss, Oberkochen
Mikrowelle: Micromat	AEG, Frankfurt am Main
Neubauer-Zählkammer	Hecht-Assistent, Sondheim
pH-Meter: PHM 62	Radiometer, Kopenhagen (DK)
Pipettierhilfe: Accu-jet pro	Brand, Wertheim
Realtime PCR Cycler: Lightcycler 1.5 Real Time PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
Schüttler: Labnet Orbit LS	Labnet International,
Spannungsquelle: Power Pac 300/ Power Pac BasicTM	Bio-Rad, München

pH-Meter: PHM 62	Radiometer, Kopenhagen (Dänemark)
Scanner für Objektträger: Panoramic Desk 1.15 SP	3D Histech Ltd, Budapest (H)
Spektrophotometer: Biowave S2100	WPA, Cambridge (GB)
Spektrophotometer: Nanodrop 2000	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Sterilarbeitsbank: Lamin Air HB 2448	Heraeus, Hanau
Thermocycler: Biometra T Gradient Thermocycler	Biometra, Göttingen
Tiefkühler (-20°C)	Liebherr, Ochsenhausen
Tiefkühler (-80°C)	Thermo Fischer, Waltham (USA)
Tischzentrifuge: Galaxy Mini	VWR, Darmstadt
Transferkammer: Mini Trans [®] -Blot Cell	Bio-Rad, München
Vortexer: Vortex Genie 2TM	Bender & Hobein, Bruchsal
Waage: PB 3002, Delta Range, max. 3100 g	Mettler Toledo, Columbus (USA)
Wasserbad: Köttermann Typ 3042	Köttermann, Uetze-Hänigsen
Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge: Universal 320R Zentrifuge	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge: Labofuge 400R Zentrifuge	Heraeus, Hanau
Zelltank	Tec-lab, Königstein/Taunus

2.2 Software

Software	Hersteller
BD FACSDIVA Software V8.0.1.	BD Biosciences, Heidelberg
Citavi 6.0	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil (CH)
FlowJo 10.2	FlowJo, LLC, Ashland (USA)
OligoAnalyzer 3.1	Integrated DNA Technologies, Leuven (B)
Image Lab Software Version 6.0	Bio-Rad, München
Lightcycler Software Version 3.5.3	Roche, Mannheim
Panoramic Scanner Control Software	3D Histech Ltd., Budapest (H)

2.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Coulter Counter Döschen	Beckman Coulter, Brea (USA)
Einmalspritzen	BD Biosciences, Heidelberg
FACS-Analyseröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Faltenfilter (Rotilabo, Typ 601P)	Carl Roth, Karlsruhe, Karlsruhe
Filterspitzen ART 10µl	Thermo Scientific, Waltham (USA)
Filterspitzen 20, 200 bzw. 1.000 µl	Biozym, Hessisch Oldendorf
Glasgeräte	Schott Spezialglas,
Kryoröhrchen Nalgene (2 ml)	Nunc, Roskilde (DK)
Lightcycler Kapillaren	Roche Diagnostics, Mannheim
Membranfilter: Isopore membrane filters 2 µm TTTP	Merck Millipore, Darmstadt
Nitrocellulosemembran: Amersham Hybond-C Extra	GE Healthcare, Solingen
Parafilm	Pechiney, Menasha
Photofilm: Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Solingen
Pasteurpipetten	Hartenstein, Würzburg
Pipettenspitzen: 10, 200, und 1.000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen: 5 bzw. 10 ml	Hartenstein, Würzburg
Pipettierhilfe Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte
Reaktionsgefäße: 0,5, 1,5 und 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht
PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml	Greiner Bio-ONE, Frickenhausen
Spritzenfilter: Mlnisart Syringe Filter	Sartorius, Göttingen
Whatmanpapier	GE Healthcare, Little Chalfont (UK)
Zellkulturflaschen (25 und 75 cm ²)	Greiner Bio-ONE, Frickenhausen
Zellkulturplatten (6-well, 24-well)	Nunc, Roskilde (DK)
Zellkulturschalen (6, 10 bzw. 25 cm)	Greiner Bio-ONE, Frickenhausen
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Greiner Bio-ONE, Frickenhausen

2.4 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Aktivkohle	AppliChem, Darmstadt
Baysiolone-Paste	Bayer, Leverkusen
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Hepes)	Sigma-Aldrich, Seelze
Acrylamid-/Bisacrylamid Lsg. (30 %) Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Invitrogen, Darmstadt
Albumin Fraktion V (BSA) (Protease-frei)	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Bacto-Agar	Hartenstein, Würzburg
Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent	Bio-Rad, München
Bisbenzimid (Hoechst No. 33258)	Sigma-Aldrich, Seelze
Brilliant Blue	Sigma-Aldrich, Seelze
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Seelze
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Eisessig	Carl Roth, Karlsruhe
Eosin B	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol absolut	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid 1 mg/ml	Sigma-Aldrich, Seelze
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe
Glycerol	VWR International, Radnor (USA)
Glycin	Biomol, Hamburg
Iford Multigrad Developer	Harman technology Limited, Knutsford (UK)
Iford Rapid Fixer	Harman technology Limited; Knutsford (UK)
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck Millipore, Darmstadt
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Life Technologies, Darmstadt

Methanol	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich, Seelze
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck Millipore, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth, Karlsruhe
Phenylmethyl-Sulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Seelze
PonceauS	Sigma-Aldrich, Seelze
Pufferlösungen (pH 6, 7, 10, 12, 13)	Carl Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Seelze
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Sulfosalicylsäure	Sigma-Aldrich, Seelze
Tetraethylammoniumhydroxid	Merck, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe
TGFβ	Tebu Biotech, Offenbach
Titriplex II	Carl Roth, Karlsruhe
Titriplex III	Carl Roth, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth, Karlsruhe
Triton-X100	Sigma-Aldrich, Seelze
Trizol	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe
Western Lightning®-ECL	Perkin Elmer, Waltham (USA)
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe

2.5 Inhibitoren

Inhibitor	Target	Konzentration Stammlösung	Arbeits- konzentration	Hersteller
Pargylin	LSD1	50 mM in H ₂ O	2,5 mM	Biomol, Hamburg
OGL-002	LSD1	10 mM in DMSO	50 µM	Selleckchem, Houston (USA)
U-0126	ERK	10 mM in DMSO	10 µM	Biomol, Hamburg
SP600125	JNK	30 mM in DMSO	30 µM	Sigma-Aldrich, Seelze
BSO	Glutathion	50 mM in Medium	5 mM	Biomol, Hamburg
PDTC	NFκB	10 mM in Ethanol	10 µM	Sigma-Aldrich, Seelze
N- Acetylcystein	ROS-Fänger	100 mM in H ₂ O	1 mM	Sigma-Aldrich, Seelze
PD169316	p38	10 mM in DMSO	10 µM	Sigma-Aldrich, Seelze
8-oxoGuanin- HCl	8-oxoGuanin- HCl	1 mg/ml in 2 M NaOH	1 µM in PBS	Sigma-Aldrich, Seelze
GKT 137831	NOX4	10 mM in DMSO	10 µM	Selleckchem, Houston (USA)

2.6 Enzyme und Marker

Enzym	Hersteller
cOmplete mini Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim
DNase I (1U/µl)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
DNA-Marker: GeneRuler 100 bp (Plus)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Proteinase K	Carl Roth, Karlsruhe
Protein-Marker: PageRuler Prestained	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
RNA-Ladepuffer (2×)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

Ribonuklease A (RNase A)	Serva Electrophoresis, Heidelberg
<i>Tfi</i> DNA-Polymerase (5 U/μl) mit <i>Tfi</i> PCR Reaktionspuffer (5×) und MgCl ₂ dNTP-Mix	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt

2.7 Kits

Kit	Hersteller
Direct-zol RNA MiniPrep-Kit	Zymo Research, Freiburg
Effectene Transfection Reagent mit EC-Puffer und Enhancer	Qiagen, Hilden
LightCycler FastStart DNA Master ^{PLUS} SYBR Green I Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthese Kit	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
ROTI Kit für Flow Cytometry EdU-Click 488	Carl Roth, Karlsruhe

2.8 Puffer und Medien für die Zellkultur

Material	Hersteller
DMEM High Glucose Medium	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Fötales Rinder Serum (FCS)	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
Geneticin (G418)	Biochrom, Berlin
L-Glutamin 200 mM	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt
0,25 % Trypsin-EDTA in PBS	Biochrom, Berlin

2.9 Säugerzelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Medium	Bezugsquelle
HaCaT	Humane Keratinozyten (Empfängerzellen für KD-Plasmid)	DMEM +10% FCS +2% Glutamin	AG Fusenig (von AG Dietrich, Mainz)
HaCaT pEpS (Klon P2)	Humane Keratinozyten (mit Leervektor stabil transfiziert)	DMEM +10% FCS +2% Glutamin +750 µg/ml G418	Tina M. Sommer, AK Epe (Mainz)
HaCaT pEpS-OGG1 (Klon 14)	Humane Keratinozyten (mit OGG1 shRNA-codierendem Plasmid stabil transfiziert)	DMEM +10% FCS +2% Glutamin +750 µg/ml G418	Tina M. Sommer, AK Epe (Mainz)

2.10 Vektoren und Vektorgerüste

Vektor	Aufgabe	Hersteller
pcDNA3	Vermittelt Geneticin-Resistenz zur Selektion von Klonen nach stabiler Transfektion der shRNA-Expressions-Vektoren	Invitrogen, Karlsruhe
pENTR/pSUPER+ (575-1)	shRNA-Expressions-Vektor	Addgene, Cambridge (USA)
pSH-OGG1-K2	shRNA-Vektor mit OGG1-Knockdown-Sequenz (Allgayer al. 2013)	Julia Allgayer (AK Prof. Epe)

Eine Vektorkarte des shRNA –Expressionsvektor pENTR/pSUPER+ befindet sich im Anhang I ebenso die für die shRNA codierende DNA-Sequenz.

2.11 Primer

Alle eingesetzten Primer wurden mit Hilfe des Tools Primer-Blast konzipiert und mit der Software Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) bzw. OligoAnalyzer 3.1 (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) überprüft. Abschließend wurden die erhaltenen Sequenzen mit dem Basic local alignment searching tool (BLAST) gegen die Nucleotide selection (BLASTn) abgeglichen. Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) bezogen. Die lyophilisierten Primer werden in sterilem TE-Puffer zu einer Stammlösung von 200 µM gelöst. Zur weiteren Verwendung wurde eine Arbeitslösung von 2 µM mit sterilem Wasser hergestellt, die bei -20°C gelagert wurde.

Ziel		Sequenz 5' → 3'	T _{Ann}	T _{Acq}	Zyklenzahl
hCDKN1A	Forward	GCAGACCAGCATGACAGATTT	58	85	28
	Reverse	TGCCCAGCACTCTTAGGAAC			
hFN1	Forward	TGACCAGCAACACCGTGAC	60	84	28
	Reverse	GGAAGATCCAGGTAAGTGTGG			
hSDHA	Forward	AGATCCGAGAAGGAAGAGGC	61	87	32
	Reverse	TGTAGTTGGTGGGAATGCCG			
hTBP	Forward	TCCCTCCCCSTGACTCC	61	84	31
	Reverse	GGACTGTTCTTCACTCTTGCC			

2.12 Primäre Antikörper

Ziel	Verdünnung		Hersteller
ACTB	1:2.000	mAb	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
OGG1	1:10.000	mAb	Abcam plc, Cambridge (GB)

2.13 Sekundäre Antikörper

Ziel	Verdünnung	Hersteller
Goat anti-rabbit IgG-HRP	1:2.000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Goat anti-mouse IgG-HRP	1:2000	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

2.14 Puffer und Arbeitslösungen

2.14.1 Für die Zellkultur

Puffer	Zusammensetzung	
PBS/CMF pH 7,5 (autoklaviert) (CMF: Calcium und Magnesium-Frei)	137 mM 2,7 mM 6,5 mM 1,5 mM	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄
PBS (Lösung I+Lösung II) Lösung I (pH 7,4)	2mM 5,4 mM 274 mM 13 mM	KH ₂ PO ₄ KCl NaCl NaHPO ₄ *2 H ₂ O
Lösung II	1,8 mM 1 mM	CaCl ₂ *2H ₂ O MgCl ₂ *6H ₂ O
TGFβ Stocklösung 2 µg/ml	10 µg	TGFβ in 3 M Citronensäure und BSA

2.14.2 Für die Arbeit mit Nukleinsäuren

2.14.2.1 Für Agarosegele

Puffer	Zusammensetzung	
Ladepuffer für Agarosegele	60% (v/v) 40% (v/v) 0,3 µg/µl	Glycerol TAE (6-fach) Orange G
50x TAE-Stock pH 7,8 (einstellen mit Essigsäure)	242 g 57,1 ml 14,6 g	Tris Eisessig EDTA ad 1l H ₂ O
TE-Puffer pH 8,0	10 mM 1 mM	1 M Tris 0,5 M EDTA

2.14.2.2 Für Alkalische Elution

Puffer	Zusammensetzung	
BE1-Puffer pH 7,5 (einstellen mit HCl), autoklaviert	20 mM 100 mM 1 mM	Tris NaCl 1 mM Titriplex III
Bisbenzimid-Stocklösung	0,15 mM	Bisbenzimid (in H ₂ O)
DNA-Standard	200 µg/ml	Kalbsthymus-DNA, in BE1-Puffer pH 7,5
Elutionspuffer pH 12,1-12,2 (einstellen mit TEAH)	20 mM	Titriplex II
Lysepuffer pH 10 (mit 10 N NaOH einstellen)	2% 100 mM	SDS Glycin

	20 mM	Titriplex III
Lysepuffer mit Proteinase K	40 mg 100 ml	Proteinase K Lysepuffer pH 10
0,1 M Phosphatpuffer pH 6 (autoklaviert)	87,8 mM 12,2 mM	NaH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄
0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2 (autoklaviert)	28 mM 72 mM	NaH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄
0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2 mit Bisbenzimid (autoklaviert)	28 mM 72 mM 1% (v/v)	NaH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ Bisbenzimid-Stocklösung
Waschpuffer pH 10 (einstellen mit 10 N NaOH)	20 mM	Titriplex III

2.14.3 Für die Arbeit mit Proteinen

Puffer	Zusammensetzung	
10% APS	100 mg	APS ad 1 ml H ₂ O
Blockinglösung	2,5 g	BSA ad 50 ml mit TBST
Blottingpuffer	200 ml 400 ml	5x Laemmli-Stocklösung Methanol ad 2l H ₂ O
Elektrophoresepuffer	200 ml 10 ml	5x Laemmli-Stocklösung 10% SDS ad 1 l H ₂ O
5x Laemmli-Stock	0,25 M 1,92 M	Tris Glycin ad 1 l H ₂ O
100 mM PMSF	175 mg 10 ml	PMSF Isopropanol
10x PonceauS	2 g 30 g 30 g	Ponceau S Trichloressigsäure Sulfosalicylsäure ad 1 l H ₂ O
Ripa-Puffer	50 mM 150 mM 1% (v/v) 0,5% (w/v) 0,1% (w/v) 5 mM	Tris-HCl pH 7,4 NaCl TritonX-100 Natriumdeoxycholat 20% SDS EDTA ad 25 ml H ₂ O (im Dunkeln aufbewahren)
20% SDS	10 g	SDS Ad 50 ml H ₂ O
SDS-Sammelgel	8,8 ml 1,5 ml	H ₂ O 0,5 M Tris (pH 6,8)

	1,5 ml 120 µl 120 µl 12 µl	Acrylamid/ Bisacrylamid (37,5:1) 20 % SDS 10 % APS TEMED
SDS-Trenngel (10 %)	11,4 ml 6 ml 6 ml 120 µl 120 µl 12 µl	H ₂ O 1,5 M Tris (pH 8,8) Acrylamid/ Bisacrylamid (37,5:1) 20 % SDS 10 % APS TEMED
10 x TBS	80 g 24,2 g	Tris NaCl ad H ₂ O to 1 l, pH 7,6 mit HCl
1x TBST	100 ml 2 ml	10 x TBS Tween 20 ad 1 l H ₂ O

3 Methoden

3.1 Arbeit mit Zellen

3.1.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der eukaryotischen Zellen erfolgte in entsprechenden Zellkulturgefäßen in entsprechendem Medium in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ in wassergesättigter Atmosphäre.

Das Passagieren der adhärent wachsenden HaCaT-Zellen erfolgte in subkonfluentem Zustand. Hierzu wurde das Medium restlos entfernt und einmal mit PBSCMF gewaschen. Wegen der ausgeprägten adhärennten Eigenschaften wurden die Zellen 12 Minuten mit PBSCMF/ 0,05% EDTA bei 37°C inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde durch die Zugabe von Trypsin (0,25% w/v in PBS) erreicht. Zuletzt wurden die HaCaT-Zellen sorgfältig in Zellkulturmedium resuspendiert und nach der Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer in einer entsprechenden Dichte ausgestreut ($31,19 \times 10^3 / \text{cm}^2$).

Zur Kryokonservierung wurden exponentiell wachsende Zellen verwendet. Sie wurden wie bereits beschrieben abgelöst und in frischem Medium aufgenommen. Anschließend wurden sie in einer Zentrifuge bei 1.200 rpm 5 Minuten sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 1,8 ml Einfriermedium (bestehend aus 1:10 Medium und DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox auf -80°C abgekühlt. Zur langfristigen Aufbewahrung wurden die Kryoröhrchen nach 24 Stunden in flüssigen Stickstoff überführt.

Um kryokonservierte Zellen kultivieren zu können, wurden diese schrittweise mit 5 ml 37°C warmem Medium aufgetaut und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Bei 1.200 rpm wurden die Zellen 5 Minuten sedimentiert, anschließend wurde das Pellet in frischem Medium resuspendiert und in eine 25 cm²-Zellkulturflasche überführt. Nach 24 Stunden wurden die Zellen, sofern eine ausreichende Konfluenz gegeben war, passagiert und mit G418 versetzt.

Alle etablierten Zelllinien wurden mit dem Mykoplasma-Detektions-Kit regelmäßig auf eine Kontamination mit Mykoplasmen entsprechend der Angaben des Herstellers untersucht.

3.1.2 Generierung einer OGG1-defizienten HaCaT-Zelllinie

Zur Generierung einer OGG1-defizienten HaCaT-Zelllinie wurde das von Allgayer et al. (2013) beschriebene Plasmid verwendet. Das Plasmid, das die entsprechende DNA-Sequenz der OGG1-shRNA trägt, basiert auf dem pENTR/pSUPER+ Vektor von Addgene, in den die entsprechende shRNA-Sequenz kloniert wurde (Campeau et al., 2009). Der Vektor basiert auf dem pSuper-Vektor, der unter der Kontrolle des Polymerase-III H1-RNA Promotors steht und ein siRNA-ähnliches Transkript produziert, das in einer RNA-Interferenz-Reaktion die Expression von Gene spezifisch und effizient herunter regulieren (Brummelkamp et al., 2002). Im Falle von OGG1 wurde die shRNA-Sequenz so gewählt, dass sie in allen bekannten OGG1-Splicevarianten enthalten ist (vgl. Anhang I).

24 Stunden vor der Transfektion wurden 600.000 Zellen je Well einer 6-well Platte ausgestreut. Unmittelbar vor der Transfektion wurde das Medium gegen 1,5 ml frisches Medium ausgetauscht. Zur Transfektion wurden 700 ng des Plasmids, das die shRNA-Sequenz trägt mit pcDNA3-Vektor (mit dem G418-Gen) im Verhältnis 1:10 gemischt. Das G418-Gen vermittelt die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Geneticin (G418), das zur Selektion der Klone verwendet wurde. Anschließend wurde der Ansatz mit 92 µl EC-Buffer und 3,2 µl EC-Enhancer versetzt. Danach wurde die Lösung kurz gevortext und für 2-5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dem Ansatz 4,5 µl Effectene Transfektionsreagenz zugegeben. Der Ansatz wurde 10 Sekunden gemischt und für 5-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 600 µl frisches Zellkulturmedium hinzu pipettiert und dann tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach vier Stunden wurde das Medium gewechselt und nach weiteren 20 Stunden wurden die Zellen nach dem Protokoll in Kapitel 3.1.1 passagiert und in eine 143 cm²-Schale überführt. Das Medium wurde zur Selektion der Zellen mit 750 µg/ml mit Geneticin versetzt. Die Zellen wurden unter Selektionsdruck weiterkultiviert, bis einzelne Kolonien zu erkennen waren. Das Medium wurde dabei alle zwei Tage erneuert.

Sobald einzelne Kolonien detektiert werden konnten, wurde das Medium entfernt und zwei Mal mit PBSCMF gewaschen. Um eine Kreuzkontamination der Zellklone zu verhindern, wurde jeweils ein 0,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß, von dem Deckel und Boden entfernt worden waren, und dessen Rand mit Glycerol benetzt worden war, um den Zellklon herum auf den Boden der Zellkulturschale aufgesetzt und festgedrückt. Somit wurde ein separater Raum für das Ablösen des jeweiligen Zellklons geschaffen. Nachdem die Zellen, wie unter

3.1.1 beschrieben, abgelöst worden waren, wurden sie zunächst in ein Well einer 24 well-Platte überführt und unter Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks weiterkultiviert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen schrittweise in eine 25 cm²- und danach in eine 75 cm²-Zellkulturflasche überführt. Nachdem die Klone in den mittleren Zellkulturflaschen nahezu konfluent waren, wurde ein Teil der Zellen in zwei Aliquoten eingefroren. Der Rest wurde, um Gesamtzellextrakte für die immunhistochemische Analyse des Proteingehaltes von OGG1herstellen zu können, in 10 cm-Schalen ausgestreut und nach Erreichen einer fast vollständigen Konfluenz mit RIPA-Puffer geerntet. Das weitere Vorgehen ist in Kapitel 3.2.3 beschrieben.

3.1.3 Behandlung der Zellen

3.1.3.1 Behandlung mit TGF β

Die Behandlung der Zellen mit TGF β erfolgte durch Zugabe der Substanz in das Medium. Hierfür wurde eine Stammlösung (2 μ g/ml TGF β in 3 M Zitronensäure gemäß den Angaben des Herstellers) hergestellt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert wurde. In der Regel wurden die Zellen für 4 h mit 4 ng/ml TGF β behandelt. Ausnahmen bilden jeweils die Zeit- bzw. Konzentrationsreihen.

3.1.3.2 Behandlung mit Inhibitoren bzw. TGF β

Zur Behandlung der Zellen mit Inhibitoren wurde die Substanz in das Zellkulturmedium gegeben. Zuvor wurde eine Stammlösung hergestellt, die in Abhängigkeit von der Substanz bei -20 bzw. -80°C gelagert oder frisch angesetzt wurde.

Die Inkubation der Zellen mit den Inhibitoren erfolgte für 60 Minuten im Wärmeschrank. Zur Glutathion-Depletion wurden die Zellen 24 Stunden mit BSO vorinkubiert. Danach wurde das Medium entfernt und durch ein Gemisch aus Inhibitor und TGF β ersetzt. Anschließend wurden die Zellen für 4 Stunden weiterkultiviert.

3.1.3.3 Behandlung mit Kaliumbromat

Zur Behandlung der Zellen mit Kaliumbromat wurde das Medium der Zellen entfernt und die Zellen zwei Mal mit PBSCMF gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von Kaliumbromat in PBS I+II. Die Schädigung der Zellen erfolgte für 15 Minuten bei 37°C. Nach

Ende der Inkubation wurde die Kaliumbromatlösung entfernt und die Zellen zwei Mal mit PBSCMF gewaschen. Nach Zugabe von Zellkulturmedium, erfolgte die Reparatur der induzierten Schäden bei 37°C. Nach Ablauf der Reparaturzeit wurde das Zellkulturmedium bzw. unmittelbar nach der Behandlung (0 h-Wert) wurden die Zellen wie in Kap. 3.1.1 beschrieben abgelöst, die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und unverzüglich auf die Anlage zur Alkalische Elution aufgebracht.

3.1.4 Bestimmung des Proliferationsfaktors

Um den Einfluss einer Substanz auf das Proliferationsvermögen festzustellen, wurde die Veränderung des Proliferationsfaktors analysiert. Hierzu wurden die Zellen in einer Dichte von $31,19 \times 10^3 / \text{cm}^2$ in 6 cm-Schalen ausgestreut. Nach 24 Stunden erfolgte eine Behandlung mit 4 ng/ml TGF β . Anschließend wurden die Zellen weitere 24 bzw. 48 Stunden mit der Substanz inkubiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium gegen frisches TGF β -haltiges ausgetauscht.

Um Vergleichswerte zu erhalten, wurden parallel unbehandelte Zellen kultiviert. Um einen Ausgangswert (t_0) zu haben, wurden unbehandelte Zellen alle 24 Stunden abgelöst (vgl. 3.1.1) und in der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl/ Milliliter bestimmt. Nach Ablauf der festgelegten Inkubationszeit wurde mit den weiteren Ansätzen analog verfahren. Der Proliferationsfaktor errechnet sich aus dem Quotienten aus der mittleren Zellzahl t_{24} bzw. t_{48} und der mittleren Zellzahl t_0 .

3.1.5 HE-Färbung der Zellen zur Dokumentation der Induktion von EMT

Um zu zeigen, dass HaCaT-Zellen in der Lage sind, EMT zu durchlaufen, wurden die Zellen in 10 cm-Schalen ausgestreut, die einen gereinigten Objektträger enthielten. Nach 24 Stunden wurden die Zellen, wie unter 3.1.3.1 beschrieben, mit TGF β behandelt. Dieses wurde alle 24 Stunden gegen frisches TGF β -haltiges Medium ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBSCMF gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf dem Objektträger zehn Minuten bei 4°C mit reinem Ethanol fixiert. Danach wurde der Objektträger in verschiedenen Bädern inkubiert. Die Reihenfolge bzw. Dauer sind Tab. 2.1 zu entnehmen.

Tab. 2.1 Arbeitsschritte einer HE-Färbung

Nr.	Lösung	Dauer [Minuten]
1	Xylol	5
2	Xylol	5
3	100% Isopropanol	1
4	100% Isopropanol	1
5	96% Isopropanol	0,5
6	70% Isopropanol	0,5
7	VE-Wasser stehend	1
8	Hämalaun (1:10)	6
9	Leitungswasser	1,5
10	0,1% HCl-Ethanol	Kurz eintauchen
11	Fließend wässern	5
12	0,5% Eosin B	3
13	Leistungswasser	1,5
14	96% Ethanol	3
15	100% Ethanol	1
16	100% Ethanol	1
17	Xylol	1
18	Xylol	5

Anschließend wurden die Zellen auf den Objektträgern mit dem Schnelleindeckmittel Entellan unter Deckgläschen eingebettet und die Auswertung erfolgte am Panoramic Desk 1.15 SP1.

3.2 Arbeit mit Nukleinsäuren

3.2.1 Arbeiten mit RNA

3.2.1.1 Isolierung von RNA

Die Isolierung von RNA erfolgte in einem Zwei-Schritt-Verfahren. In einem ersten Schritt wurden die Zellen mit Trizol geerntet. Hierzu wurde das Zellkulturmedium rückstandslos entfernt und 950 µl Trizol auf die adhärennten Zellen gegeben. Durch mehrfaches Überspülen mit dem Reagenz wurden die Zellen vom Zellkulturgefäß gelöst und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C gelagert.

In einem zweiten Schritt erfolgte die Isolierung der RNA. Hierzu wurde das Directzol-RNA Mini prep Kit entsprechend der Angaben des Herstellers verwendet. Allerdings wurden zur Elution nur 30 µl RNase-freies H₂O eingesetzt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

3.2.1.2 Überprüfen der RNA-Integrität

Nach der Isolierung der RNA wurde ihre Konzentration am Nanodrop bestimmt. Zudem wurde die Reinheit der Nukleinsäure anhand der Quotienten 260/ 280 und 260/ 230 beurteilt. Um ihre Integrität zu beurteilen, wurde die isolierte RNA mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Hierzu wurde ein 1%iges Agarosegel hergestellt. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 2x RNA-Ladepuffer gemischt und 5 Minuten bei 65°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte unter Verwendung von TAE-Puffer bei 80 V für eine Stunde. Anschließend wurde das Vorhandensein der 18 bzw. 28 s rRNA-Banden kontrolliert.

3.2.1.3 Reverse Transkription

Um RNA als Ausgangsmaterial für PCR-Reaktionen einsetzen zu können, ist ein Überschreiben in cDNA erforderlich. Hierzu wurde das RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit eingesetzt. Zur Synthese wurden 2 µg RNA und die Random Hexamer Primer eingesetzt.

Das Vorgehen erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Allerdings wurde das Enzym einzeln in jeden Ansatz gegeben. Als Kontrollen wurden für jede cDNA-Synthese zwei weitere Ansätze hergestellt. In einem wurde Wasser anstelle des Enzyms zugegeben (NoRT) und im anderen Ansatz wurde RNA durch Wasser (NTC) ersetzt.

3.2.1.4 Optimierung der PCR-Bedingungen

Vor dem Einsatz in einer Realtime-PCR wurden alle Primer in einer konventionellen Endpunkt-PCR getestet. Ziel war es, zum einen die optimale Annealingtemperatur zu ermitteln und zum anderen die Amplifikatgröße zu überprüfen.

Hierzu wurden mehrere Ansätze hergestellt und die optimale Annealingtemperatur mittels Temperaturgradienten ermittelt.

In einem ersten Schritt wurde der folgende Ansatz (Mix 1) hergestellt (Tab. 2.2):

Tab.2.2 Zusammensetzung Mix 1

Komponente	Volumen/ Ansatz
5-fach Platinum Tfi reaction buffer	5µl
MgCl ₂ (50mM)	0,75 µl
dNTP Mix (10mM each)	0,5 µl
H ₂ O	11,25 µl
Gesamt	17,5 µl

Dieser Mix wurde mit den beiden Primern und der Tfi DNA Polymerase wie folgt zu Mix 2 gemischt (Tab. 2.3):

Tab. 2.3 Zusammensetzung Mix 2

Komponente	Volumen/ Ansatz
Mix 1	17,5 µl
Primer forward (2µM)	2,5 µl
Primer reverse (2µM)	2,5 µl
Tfi DNA Polymerase (5U/µl)	0,5 µl
Gesamt	23 µl

Der Mix 2 wurde mit 2 µl Template cDNA versetzt und einer PCR-Reaktion unterworfen. Das PCR-Programm ist in Tab. 2.4 dargestellt. Für jedes Primerpaar wurden verschiedene Annealingtemperaturen getestet.

Tab. 2.4 PCR-Programm für Endpunkt-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer [Minuten]
1	94°C	2
2	94°C	0,5
3	Temperaturgradient (55, 60 und 65°C)	1
4	70°C	1
5	30x Wiederholung der Schritte 2-4	
6	70°C	10

Aufgrund der erwarteten Fragmentgröße von 150-300 bp wurden die Amplifikate auf ein 1,8%iges Agarosegel aufgetragen und in 1x TAE-Puffer 45 Minuten bei 80 V aufgetrennt. Zur Visualisierung wurde das Agarosegemisch mit Ethidiumbromid versetzt. Die Dokumentation erfolgte mit Hilfe des GelDoc1000 und der Software ImageLab 6.0.

3.2.1.5 Quantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR beruht auf dem herkömmlichen PCR-Dreischnitt aus Denaturierung, Annealing und Elongation. Als Erweiterung zu einer konventionellen Endpunkt-PCR erlaubt sie aber eine Quantifizierung der Amplifikate während des PCR-Zyklus in Echtzeit. Hierzu werden, nach Abschluss jedes PCR-Dreischrittes, Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Die Stärke der Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge des PCR-Amplifikates zu.

Durch die Zugabe eines interkalierenden DNA-Farbstoffes (z.B. SYBRGreen) und der Analyse seiner Emission ist zum einen die Quantifizierung der DNA-Menge in der Reaktion (absolute Quantifizierung) und zum anderen der Einfluss einer Behandlung auf die Genexpression (relative Quantifizierung) möglich.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der relativen Quantifizierung ($\Delta\Delta C_t$) gewählt. Als interkalierender Farbstoff wurde SYBR Green I verwendet. Zur Verwendung der $\Delta\Delta C_t$ -Methode ist eine gleichbleibende PCR-Effizienz wichtig. Diese wurde mit Hilfe einer Standardgerade ermittelt. Hierzu wurde eine Probe ausgewählt (HaCaT pEpS-OGG1 TGF β 4h) und 1:10, 1:100 und 1:200 mit Wasser verdünnt. Alle weiteren Proben wurden 1:25 mit Wasser versetzt.

Die Analyse der Genexpression erfolgte mit Hilfe des Light Cyclers 1.5 und der entsprechenden Gerätesoftware. Zu diesem Zweck wurde folgender Mastermix (Tab. 2.5) hergestellt:

Tab. 2.5 Zusammensetzung Mastermix für qRT-PCR

Komponente	Volumen/ Ansatz
10x SYBR Green ^{PLUS} Mix	1,2 μ l
H ₂ O, nukleasefrei	3,6 μ l
MgCl ₂	0,36 μ l
Primer forward	3 μ l
Primer reverse	3 μ l
Gesamt	11,16 μl

10 μ l des Mastermix wurden in die Light Cyclers Kapillaren vorgelegt und mit 2 μ l cDNA versetzt. Nach Zentrifugation (600 x g, 1 Minute) wurden die Kapillaren in das Gerät eingesetzt und die Reaktion gestartet. Hierzu wurde das folgende PCR-Programm verwendet (Tab. 2.6):

Tab. 2.6 PCR-Programm für qRT-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer [Sekunden]
1	95°C	600
2	95°C	10
3	T _{an}	10
4	72°C	15
5	T _{acq}	5
6	Wiederholung der Schritte 2-5 (Anzahl abhängig von Primer)	
7	65°C → 95°C (0,1°C-Schritten)	600
8	40°C	30

Zur Bestimmung der Akquisitionstemperatur wurde im ersten Lauf mit unbekanntem Primern die Akquisitionstemperatur bei 72°C belassen, was dem Temperaturoptimum der eingesetzten DNA-Polymerase entspricht. Nach Analyse der Schmelzkurven wurde die primerspezifische Messtemperatur festgelegt.

Als interne Kontrolle bzw. zur Normierung wurden das Housekeeping-Gen TATA-Binding Protein (TBP) verwendet. Um eine Beeinflussung durch TGFβ auszuschließen, wurde seine Expression im Verhältnis zur Succinyldehydrogenase A (SDHA) untersucht (vgl. Anhang III). Die Analyse der Genexpression erfolgt als Doppelbestimmung (Ausnahmen: NoRT und NTC).

3.2.2 Arbeiten mit DNA

3.2.2.1 Analyse der Zellzyklusverteilung mittels Durchflusszytometrie

Um den prozentualen Anteil der Zellen in den vier Zellzyklusphasen analysieren zu können, wurde vor der durchflusszytometrischen Analyse eine Alexa Fluor 488/ PI-Färbung durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden die Zellen in einer Dichte von $31,19 \times 10^3 / \text{cm}^2$ in 6 cm-Schalen ausgestreut und mit TGFβ behandelt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium rückstandslos entfernt und frisches Medium mit 10 μM 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 60 Minuten bei 37°C. Während dieser Zeit wird EdU bei der Replikation als Thymidinanalog zufällig in die DNA eingebaut. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen, wie unter 3.1.1 beschrieben, abgelöst. Nachfolgend wurden die HaCaT-Zellen 5 Minuten bei 1.000 rpm sedimentiert. Zur Fixierung und Permeabilisierung wurde das Pellet in 1 ml Methanol/Aceton-Gemisch (7:3)

resuspendiert und zuerst 3 Minuten bei -20°C inkubiert und danach 3 Minuten bei 1.000 rpm 4°C abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 1ml PBSCMF gelöst und 4 Minuten bei 1.000 rpm abzentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 2x wiederholt. Abschließend wurden die Zellen in PBSCMF gelöst und bis zur Färbung bzw. Messung bei 4°C aufbewahrt.

Die Alexa Fluor 488 Färbung wurde gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei der Reaktion wird der Farbstoff Alexa Fluor 488 über eine Click-Reaktion unter Katalyse von Kupfersulfat an EdU gebunden.

Nach der Färbereaktion wurde ein RNase-Verdau durchgeführt, um eine selektive Färbung der DNA mittels PI zu gewährleisten. Hierzu wurde der folgende Ansatz hergestellt (Tab. 2.7):

Tab. 2.7 Lösung für RNase-Verdau

Komponente	Volumen/ Ansatz
PBS	1000 μl
FCS	2 μl
RNase (10 mg/ml)	7,2 μl

Der Verdau erfolgte bei 37°C unter Abschluss von Licht für 15 Minuten im Wasserbad. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten bei 1.000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 300 μl PBSCMF gelöst. Bis zur Messung wurden die Proben auf Eis gelagert. 15 Minuten vor der Messung wurden 5 μl der PI-Färbelösung zugegeben. Anschließend wurden pro Ansatz 10.000 Zellen am Durchflusszytometer LSR Fortessa gemessen.

Zur Bestimmung des Anteils der Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, wurde die Fläche des Spannungspulses (Area) von Alexa Fluor 488 im grünen Fluoreszenzkanal gemessen. Der Farbstoff wurde mit dem blauen Laser (488 nm) angeregt und emittiert bei 525 nm.

Zur Bestimmung der Zellen, die sich in der G1- bzw. G2/M-Phase des Zellzyklus befinden, wurde die Fluoreszenz von Propidiumiodid im gelben Fluoreszenzkanal gemessen, wobei die Anregung des Farbstoffs bei 561 nm erfolgte. Propidiumiodid weist ein Emissionsmaximum bei 617 nm auf. Zur Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität in beiden Kanälen gegeneinander aufgetragen. Die Angabe der Intensität erfolgte in einer einheitslosen, logarithmischen Skalierung.

Zur Kalibrierung des Gerätes wurden jeweils Zellen verwendet, die nur mit Alexa Fluor 488 oder Propidiumiodid gefärbt worden waren. Die Auswertung erfolgte mit der Software FlowJo 10.2. Um die prozentuale Verteilung der Zellen auf die einzelnen Phasen des Zellzyklus bestimmen zu können, wurde ein Spidergate bestehend aus vier variablen Quadranten verwendet. Die Zellpopulationen verteilen sich folgendermaßen auf die Quadranten: Q1 – G1-Zellen, Q2+Q3 – S-Zellen, Q4 – G2-Zellen.

3.2.2.2 Alkalische Elution

Das Verfahren der alkalischen Elution wurde von Kohn et al. (1976) als sehr sensitive Methode zum Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen beschrieben. Der Methode liegt das Prinzip, dass einzelsträngige DNA in Abhängigkeit von ihrer Länge mit unterschiedlicher Geschwindigkeit von einem Polycarbonatfilter eluiert, zugrunde.

Im Jahr 1994 publizierten Epe und Hegler, dass die Nachweismethode durch einen zusätzlichen Schritt, die Inkubation mit DNA-Reparaturenzymen, geeignet ist, um DNA-Basenmodifikationen zu detektieren. Durch die Behandlung mit Reparaturenzymen werden oxidative DNA-Basenläsionen in Strangbrüche überführt. So ist es möglich, durch die Inkubation mit FPG die Läsion 8-oxoG in DNA-Einzelstrangbrüche zu konvertieren und damit quantifizieren zu können. Die Nachweisgrenze liegt bei etwa 0,05 Läsionen/10⁶ bp. Das Prinzip des Versuches ist in Abb. 2.1 dargestellt.

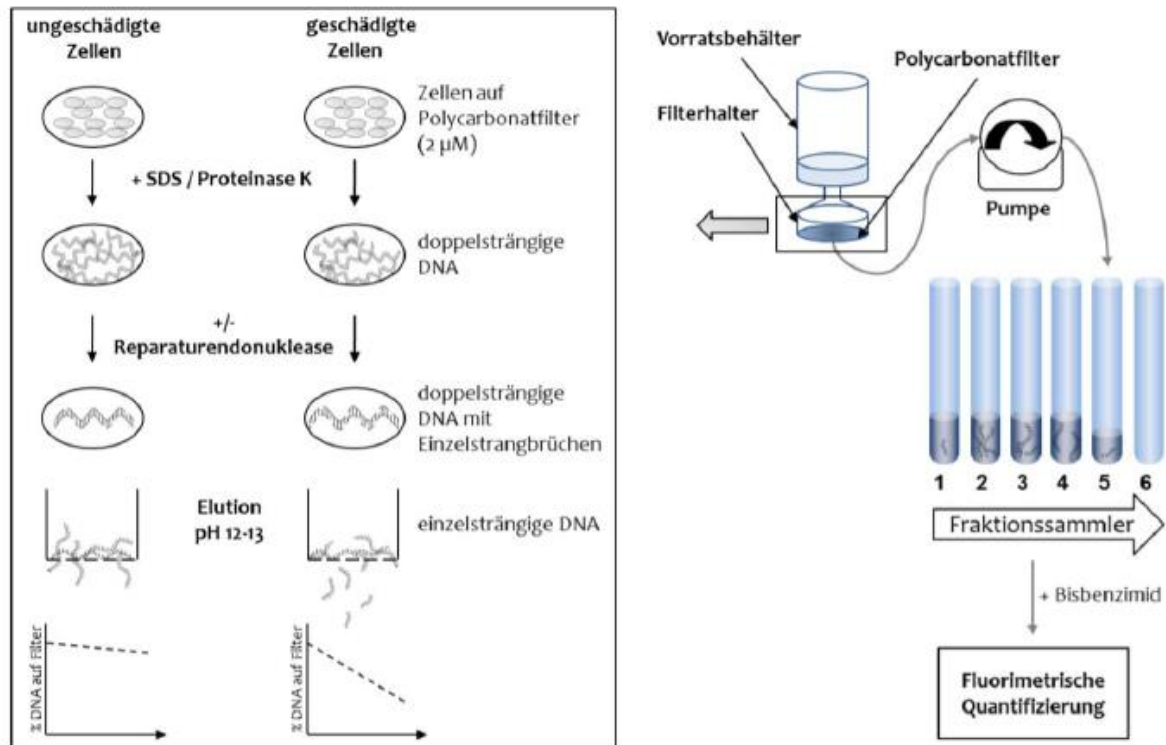


Abb. 2.1 Prinzip der Alkalischen Elution. (Von der Lippen, 2013)

3.2.2.2.1 Versuchsaufbau und Vorbereitung

Die Anlage besteht aus 20 Vorratsbehältern mit einem Fassungsvermögen von 25 ml. Am unteren Ende der Gefäße befindet sich ein Frittenboden, auf den ein Polycarbonatfilter (Porengröße: 2 µm) aufgelegt wird. Die Vorratsgefäße können in ein temperierbares Wasserbad abgesenkt werden.

Die Zellsuspension wurde von oben in die Gefäße gegeben und mittels Mehrkanalpumpe durch die Vorratsgefäße, Filter, Frittenböden und einen Dialyseschlauch in Auffanggefäße gepumpt. Nach Abschluss der Enzyminkubation bzw. den abschließenden Waschschritten, wurden die Auffanggefäße gegen einen, mit Reagenzgläsern bestückten, Fraktionssammler ausgetauscht.

Vor dem Auftragen der Zellen wurde die Anlage zwei Mal mit 2,5 ml kaltem PBSCMF gespült und die Vorratsgefäße in das 4°C kalte Wasserbad abgesenkt.

3.2.2.2.2 Durchführung

Pro Ansatz wurden 3,5 Mio. Zellen ausgestreut und 24 h später mit 4 ng/ml TGFβ oder 4 mM KBrO₃ behandelt. Im Falle von TGFβ wurden die Zellen für 8 h inkubiert. Die Behandlung mit

KBrO₃ erfolgte wie in 3.1.3.3 beschrieben. Anschließend wurden die Zellen gemäß dem Protokoll in Kapitel 3.1.1 dargestellt abgelöst und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Hierbei werden pro Ansatz jeweils eine Million Zellen in drei Spuren aufgetragen: eine Spur dient dem Bestimmen der Einzelstrangbrüche und die anderen beiden Spuren der Bestimmung der Fpg-sensitiven Läsionen als Doppelwert. Nach dem Auftragen wurde die Zellsuspension durch die Anlage gepumpt und die Zellen bleiben auf dem Polycarbonatfilter zurück. Anschließend wurde zwei Mal mit je 3 ml kaltem PBSCMF gespült, um Mediumreste zu entfernen. Während des zweiten Waschschriffs wurde das Wasserbad auf 25°C erwärmt und ab einer Temperatur von 15°C wurde mit der Lyse der Zellen begonnen. Hierzu wurden je 2 ml Lysepuffer mit maximaler Pumpgeschwindigkeit durch die Anlage gepumpt. Danach wurden 5 ml Lysepuffer, der mit 400 mg/l Proteinase K versetzt worden war, innerhalb von 90 Minuten durch die Anlage gepumpt. Nach Abschluss der Zellyse wurde sieben Mal mit je 5 ml BE1-Puffer gewaschen und das Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Für die anschließende Enzyminkubation mit Fpg wurden 2 ml Enzymlösung in die Vorratsgefäße gegeben. Davon wurde 1 ml mit maximaler Geschwindigkeit durch die Anlage gepumpt. Der Rest der Lösung (1 ml) wurde innerhalb von 50 Minuten durchgepumpt. Nachfolgend wurden die verbliebenen Pufferreste entfernt und es wird zwei Mal mit je 5 ml BE1-Puffer und 1 Mal mit Waschpuffer bei maximaler Pumpgeschwindigkeit gespült.

Im nächsten Schritt wurden die Auffanggefäße gegen den mit Reagenzgläsern bestückten Fraktionssammler ausgetauscht. Bevor die 11-stündige Elution gestartet wurde, wurden die Vorratsgefäße bis zum oberen Rand mit Elutionspuffer gefüllt. Aufgrund des zu erwartenden geringen Schadensausmaßes wurde eine langsame Elution durchgeführt. Die Elutionszeit hat Einfluss auf die Anzahl der detektierbaren Läsionen. Mit der genannten „langsamen Elution“ über 11 Stunden können max. 0,9 Läsionen/10⁶ bp detektiert werden. Wird hingegen ein höheres Schadensmaß erwartet, wird eine „schnelle Elution“ durchgeführt, mit der 0,9-3 Läsionen/10⁶ bp detektiert werden können. Bei einer schnellen Elution verkürzt sich die Elutionsdauer auf 54 Minuten. Das bedeutet, dass der Fraktionssammler im Falle einer langsamen Elution alle 120 Minuten vorschiebt.

Nach Abschluss der Elution wurden die Reste des Elutionspuffer, die sich noch in den Vorratsgefäßen befinden, in die 6. Fraktion gepumpt. Anschließend wurden die Filter und Frittenböden ausgebaut und mit dem Eluat der 6. Fraktion in Coulter Counter-Döschen

gegeben und die DNA auf dem Filter wurde über vier Stunden bei 60°C unter Schütteln gelöst.

Zur Auswertung wurde das Volumen der übrigen Fraktionen bestimmt und nach Ende der 4-stündigen Inkubation wurde das gleiche Volumen aus der 6. Fraktion entnommen und in Reagenzgläser überführt. Die Neutralisierung der Ansätze und damit Hybridisierung der DNA-Doppelstränge erfolgte durch die Zugabe von Phosphatpuffer pH 6 im Verhältnis 1:1. Nach einer 15-minütigen Inkubation wurde Phosphatpuffer pH 7,2 zugegeben, der zuvor mit 1,5 µM Bisbenzimid versetzt worden war. Während der anschließenden 15-minütigen Inkubation interkalierte der Farbstoff in die DNA-Doppelstränge.

3.2.2.2.3 Auswertung

Vor der Messung der Proben wurde das Fluorimeter zunächst mit einer Blindprobe aus (Phosphatpuffer pH 6 und pH 7,2 mit Bisbenzimid im Verhältnis 1:2 geeicht. Anschließend wurde die Fluoreszenz der zellfreien Spur gemessen, um es später von den zugehörigen Fraktionen zu subtrahieren. Danach wurden die Proben gemessen. Hierbei ist die Summe der Fraktionsintensitäten einer Spur proportional der DNA-Menge. Somit ist es möglich, zu bestimmten Zeiten, die durch die jeweiligen Fraktionen repräsentiert werden, den relativen DNA-Anteil auf dem Filter im Verhältnis zur Gesamt-DNA anzugeben.

Die relative DNA-Menge wurde halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Der Anstieg der sich daraus ergebenden Gerade ist proportional zum Anteil der Einzelstrangbrüche. Dies setzt allerdings eine zufällige Verteilung der Einzelstrangbrüche in der DNA voraus.

Die Bestimmung der absoluten Menge der Einzelstrangbrüche bzw. Fpg-sensitiven Läsionen ist nach der folgenden Formel ebenfalls möglich:

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

RE: Fpg-sensitive Läsionen; m: mittlere Steigung der Geraden; 2,24: Faktor für langsame Elutionen

In den Spuren ohne Fpg ist RE=0 und es wird die Anzahl der Einzelstrangbrüche erhalten. Zur Quantifizierung der Fpg-sensitiven Läsionen wurden die Einzelstrangbrüche von den Werten der Fpg-Spuren subtrahiert.

3.2.3 Arbeiten mit Proteinen

3.2.3.1 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Die Zellen wurden in 10 cm-Schalen in einer Dichte von $31,19 \times 10^3 / \text{cm}^2$ ausgestreut und wie unter 3.1.3 beschrieben behandelt und entsprechend der festgelegten Inkubationszeit kultiviert.

Danach wurde das Medium von den Zellen rückstandslos entfernt und einmal mit PBSCMF gewaschen. Danach wurden 200 μl RIPA-Puffer auf die Zellen gegeben und diese 15 Minuten auf einer Schüttelplatte auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturschale abgelöst und die Zellsuspension in Eppendorfgefäße überführt. Diese wurden 20 Minuten auf Eis gelagert und anschließend bei 10.000 rpm (4°C) abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und vom Überstand wurden 22 μl für die Bradford-Messung aliquotiert. Der Rest wurde mit Proteaseinhibitor vermischt, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.2.3.2 Konzentrationsbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung des Proteingehaltes wurde die Methode nach Marion M. Bradford (Bradford, 1976) verwendet. Als Kalibriergerade diente eine BSA-Verdünnungsreihe in Wasser (0,78 –25 ng/ μl). Als Blindwert wurde eine Wasserkontrolle verwendet. Die Proben wurden in den Verhältnissen 1:100 und 1:1.000 mit Wasser verdünnt. Zur Messung wurden die Verdünnungen mit 200 μl Bradford-Reagenz versetzt und 5 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 595 nm gemessen. Die Bestimmung erfolgte in Doppelwerten.

3.2.3.3 Diskontinuierliche SDS-Page und Blotten

Vor der Auftrennung der Proben wurden jeweils 10 μg Protein mit 4x RotiLoad versetzt und mit Wasser auf ein finales Volumen von 30 μl eingestellt. Anschließend wurden die Proben bei 95°C für % Minuten denaturiert und anschließend auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Zur Größenbestimmung der Proteinbanden wurde zusätzlich eine Proteinleiter aufgetragen. In Abhängigkeit vom Molekulargewicht des Zielproteins 10%-ige Gele verwendet. Die Proteine wurden für 45 Minuten bei 60 V (im Sammelgel) bzw. für eine 60 Minuten bei 140 V (im Trenngel) aufgetrennt.

Anschließend wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Hierzu wurden Gel, Membran, Whatmanpapiere und Schwämme 15 Minuten in Transferpuffer im Kühlschrank äquilibriert. Danach wurde ein Sandwich aus den genannten Komponenten hergestellt, in eine Blottingkassette verpackt und eine Blottingkammer eingesetzt. Der Proteintransfer wurde bei 100 V für 60 Minuten durchgeführt. Anschließend wurde das Blotting-Sandwich demontiert und die Membran zur Überprüfung eines erfolgreichen Transfers mit 1x Ponceau-Rot gefärbt. Anschließend wurde sie 5 Minuten mit TBST gewaschen und in 5% BSA/TBST für 90 Minuten bei RT geblockt.

3.2.3.4 Antikörper-Inkubation und Detektion

Die Inkubation der Primärantikörper erfolgte bei 4°C über Nacht auf einem Rollschüttler. Am darauffolgenden Tag wurden die Membran 3 x 10 Minuten mit TBST gewaschen und anschließend 90 Minuten im Sekundärantikörper inkubiert. Danach wurde abermals 3x10 Minuten mit TBST gewaschen.

Die Immundetektion erfolgte mittels Chemilumineszenzreaktion. Hierzu wurde die Membran mit 2 ml ECL-Reagenz für 2 Minuten im Dunkeln inkubiert, sodass das Luminol mit der Horseradish Peroxidase (HRP) reagieren konnte. Anschließend wurde der Blot in eine Röntgenfilmkassette überführt und der Film belichtet. Die Belichtungszeit wurde entsprechend des Antikörpers gewählt und lag zwischen 0,5-5 Minuten. Die Dokumentation und Quantifizierung erfolgte mit dem Gel Doc 1000 und der Software Image Lab™.

3.3 Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit dem Programm Graphpad prism v5.0 durchgeführt. Für den Vergleich von zwei Mittelwerten wurde der Student's t-Test eingesetzt. Hierbei wurde ein ungepaarter, zweiseitiger T-Test mit Welch-Korrektur zur Berücksichtigung der Annahme einer unterschiedlichen Varianz durchgeführt. Zur Angabe der Signifikanz wurde eine Einteilung nach den folgenden Wahrscheinlichkeiten (p-Wert) vorgenommen:

* $0,01 < p < 0,05$ statistisch signifikant

** $0,001 < p < 0,01$ statistisch sehr signifikant

*** $p < 0,001$ statistisch hoch signifikant

Im Falle der Proliferationsanalyse und der Zeitabhängigkeit wurde zusätzlich eine multifaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Post-hoc-Test durchgeführt. Die Einteilung des Signifikanzniveaus erfolgte analog zum Student's t-Test.

4 Ergebnisse

4.1 Verifizierung des OGG1 Knockdown

4.1.1 Immunhistochemischer Nachweis des OGG1-Knockdowns

Um den Einfluss der DNA-Glykosylase OGG1 auf den Prozess der EMT untersuchen zu können, wurde eine stabil transfizierte HaCaT Knockdownzelllinie etabliert. Hierzu wurde das in Allgayer et al. (2013) beschriebene Plasmid verwendet und zusammen mit dem pcDNA3.1 Vektor, der das Geneticinresistenzgen trägt, in HaCaT-Zellen transfiziert (vgl. 3.1.2). Nach mehrwöchiger Selektion mit Geneticin wurden OGG1-defiziente Klone gepickt und die Expression der Glykosylase immunhistochemisch und funktionell mittels Alkalischer Elution analysiert (vgl. Abb. 3.1).

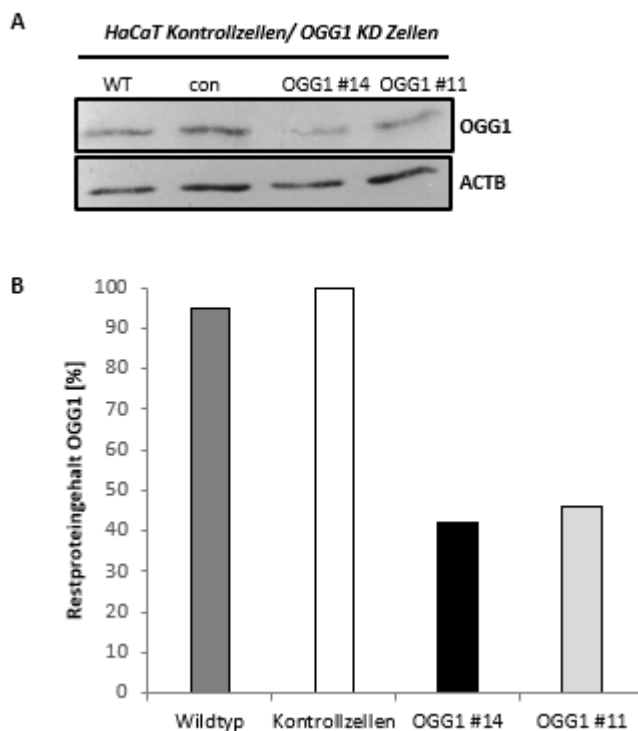


Abb. 3.1 Verifizierung des OGG1-Knockdowns in HaCaT-Zellen mittels Western Blot.

(A) Expression des Proteins OGG1 in Gesamtzellextrakten von HaCaT-Zellen (Wildtyp- (WT), Kontroll- (con) und OGG1 KD-Klonen #14 und #11) mittels Western Blot (vgl. 3.2.3). Als Ladekontrolle diente ACTB. repräsentative Aufnahme. (B) Restproteingehalt von OGG1 in den genannten HaCaT-Zelllinien.

Im Western Blot zeigt sich, dass die Expression von OGG1 in beiden untersuchten Knockdown-Klonen deutlich geringer ist, als in der lediglich mit dem Leervektor transfizierten Kontrollzelllinie (con). Der Vergleich mit untransfizierten HaCaT-Zellen (WT) zeigt, dass sich die Transfektion mit dem pENTR/pSUPER+ Vektor nicht nachteilig auf die

Expression von OGG1 auswirkt. Die Auswertung der Bandenstärke ergab einen Restproteingehalt von ca. 40% in Klon 14 und von ca. 45 % in Klon 11. Aufgrund des geringeren Restproteingehaltes wurde Klon 14 für die weiteren Analysen ausgewählt. Im Folgenden wird dieser Zellklon nur noch als Knockdown-Zelllinie bezeichnet.

4.1.2 Funktioneller Nachweis des OGG1-Knockdowns

Nachdem auf Proteinebene der Knockdown von OGG1 gezeigt wurde, wurde überprüft, ob dieser auch einen funktionellen Knockdown zur Folge hat. Hierzu wurden die beiden Zelllinien mit 4 mM für 15 Minuten in Kaliumbromat geschädigt und ihr Reparaturvermögen mittels Alkalischer Elution nach unterschiedlichen Reparaturzeiten analysiert. Durch diese Behandlung wurden oxidative DNA-Läsionen in der DNA induziert, die durch das Enzym Fpg in Strangbrüche überführt werden.

Die so entstandenen DNA-Fragmente eluieren mit unterschiedlicher Geschwindigkeit vom Membranfilter und werden fraktioniert gesammelt (vgl. 3.2.2.2).

In der Abb. 3.2 sind die Anzahl der verbliebenen Fpg-sensitiven Läsionen pro 10^6 Basenpaare gegen die Reparaturzeit aufgetragen. Als Vergleichsgrundlage dienen Zellen, die unmittelbar nach der Schädigung auf die Alkalische Elution aufgetragen wurden (0 h-Wert). Die Angabe der verbliebenen Läsionen erfolgt in Prozent dieser 0 h-Werte.

Nach vierstündiger Reparaturzeit zeigt sich, dass die Kontrollzellen die induzierten DNA-Läsionen reparieren. Die Zahl der Fpg-sensitiven Läsionen nimmt über die gesamte Beobachtungsdauer kontinuierlich ab. Nach 16 Stunden sind noch etwa 50% der Läsionen vorhanden. In den KD-Zellen hingegen nimmt der Prozentsatz an verbliebenen Schäden in den ersten vier Stunden sogar zu. Sowohl nach vier als auch nach acht Stunden ist die Anzahl der Fpg-sensitiven Läsionen in den KD-Zellen signifikant höher als in den Kontrollzellen. Nach 16 Stunden ist schließlich ein Rückgang der Fpg-sensitiven Läsionen in beiden Zelllinien zu erkennen.

Insgesamt kann festgehalten werden, dass der Anteil an Fpg-sensitiven Läsionen in den Kontrollzellen zu allen untersuchten Zeitpunkten geringer ist als in den Knockdown-Zellen. Aufgrund der Ergebnisse von Western Blot und Alkalischer Elution kann der Knockdown der DNA-Glykosylase OGG1 in den HaCaT-Zellen sowohl auf Proteinebene als funktionell als erfolgreich angesehen werden.

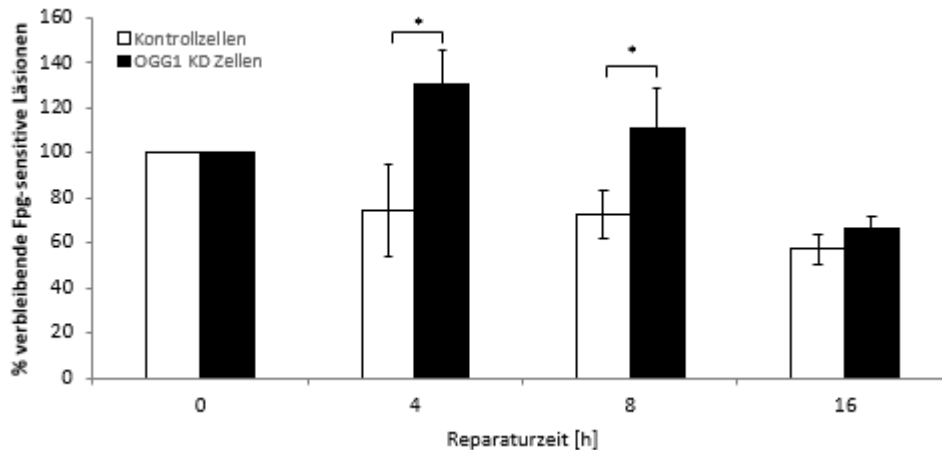


Abb. 3.2 Verifizierung des OGG1-Knockdowns in HaCaT-Zellen mittels Alkalischer Elution.

Reparatur von HaCaT Kontroll- und OGG1-defizienten Zellen nach Schädigung mit 4 mM Kaliumbromat für 15 Minuten bei 37°C in PBS nach den angegebenen Reparaturzeiten mittels Alkalischer Elution (vgl. 3.2.2.2). Die Reparatur erfolgte in Vollmedium. (n=3). MW±SD.

4.2 TGFβ induziert in HaCaT-Zellen EMT-typische morphologische Veränderungen

Eine gut untersuchte und häufig verwendete Methode um EMT zu induzieren, ist die Behandlung mit dem Zytokin TGFβ (Miettinen et al., 1994). Es ist aber auch publiziert, dass einige Zelllinien eine EMT nur teilweise durchlaufen oder die Angaben zum Ansprechen auf die Zytokinbehandlung sind widersprüchlich. Für die Versuche wurden HaCaT-Zellen ausgewählt, da diese sehr gut auf TGFβ ansprechen und den Prozess vollständig durchlaufen können (Nicholas und Hill, 2003). Wie unter Kapitel 1.6 beschrieben, induziert die Behandlung mit dem Zytokin TGFβ eine umfassende Veränderung der Zellarchitektur, um Zellen migratorische Fähigkeiten zu verleihen. Um einen Eindruck von der Rolle der DNA-Glykosylase OGG1 an diesem Prozess zu gewinnen, wurden die Art und Weise und das Ausmaß des zellulären Rearrangements mikroskopisch beurteilt.

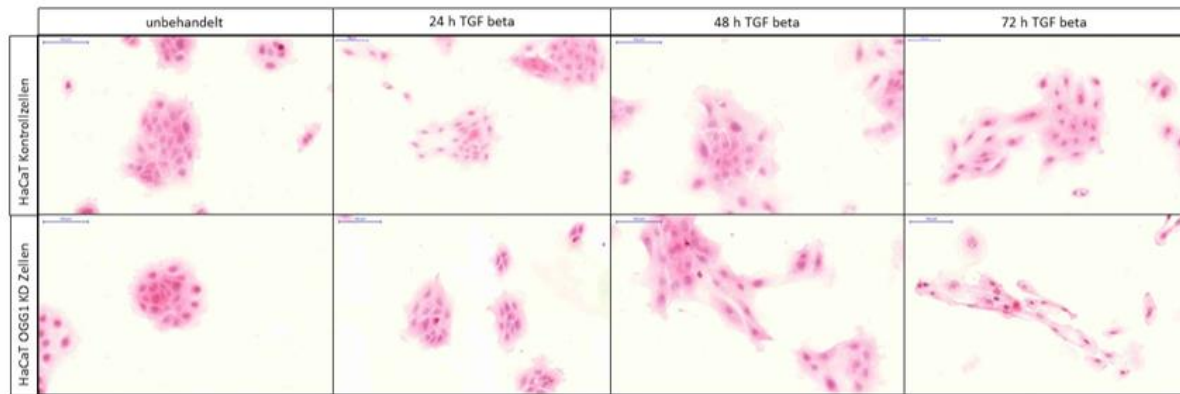


Abb. 3.3 **TGFβ induzierte morphologische Veränderungen in HaCaT-Zellen.**

TGFβ-induzierte morphologische Veränderungen nach Behandlung mit 4 ng/ml TGFβ für 0, 24, 48 und 72 h in HaCaT Kontroll- und OGG1 KD-Zellen (vgl. 3.1.5). Die Aufnahme bzw. Analyse erfolgte mittels Panoramic Desk 1.15 SP1. repräsentative Aufnahmen.

In Abb. 3.3 sind beide Zelllinien sowohl unbehandelt als auch nach Behandlung mit TGFβ dargestellt. In unbehandeltem Zustand weisen beide Zelllinien das für HaCaT-Zellen typische sternförmige Aussehen auf (Boukamp et al., 1988). Zudem wachsen sie in kleineren Aggregationen, was dem Verhalten von Keratinozyten auch entspricht. Nach 24-stündiger Inkubation mit dem Zytokin sind in beiden Zelllinien kaum morphologische Unterschiede auszumachen. Erst nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden beginnt sich die Zellform der HaCaT-Zellen zu verändern. Sie erscheinen nun lang gestreckt und der Zellverband erscheint weniger dicht gepackt. Diese Effekte sind in den OGG1-defizienten Zellen besonders ausgeprägt. Nach 72-stündiger Behandlung mit TGFβ hat sich die Veränderung der Zellmorphologie weiter fortgesetzt. Der Zellverband erscheint noch aufgelockerter und die Zellen sind spindelförmig. Die beschriebenen Veränderungen sind fast ausschließlich in den OGG1 KD Zellen zu beobachten.

Die Ergebnisse zeigen somit, dass beide Zelllinien die EMT-typischen morphologischen Veränderungen durchmachen können. Da die Knockdown-Zellen die zellulären Veränderungen deutlicher zeigen, kann man schließen, dass sich der verminderte Gehalt der Reparaturglykosylase positiv auf den Prozess der EMT auswirkt. Allerdings erlauben diese Resultate lediglich eine erste Abschätzung.

4.3 Einfluss der Reparaturglykosylase OGG1 auf den TGF β induzierten G1-Arrest

Wie einleitend beschrieben, stellt die EMT einen komplexen Prozess dar, der mit einer Vielzahl von genetischen Veränderungen verbunden ist, die sich in einer veränderten Morphologie und Physiologie äußern. Darüber hinaus ist bereits lange bekannt, dass die *in vitro*-Behandlung mit dem Zytokin TGF β einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase bewirkt (Tucker et al., 1984)(Silberstein und Daniel, 1987). Die Charakterisierung des Zellzyklusarrestes erfolgte erstens durch Bestimmen der Zellproliferation, zweitens mittels Durchflusszytometrie und drittens durch die Expressionsanalyse des Gens *p21*.

4.3.1 Einfluss von TGF β und OGG1 auf die Zellproliferation

Zunächst wurde eine Analyse des Proliferationsverhaltens der HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von TGF β durchgeführt. In Abb. 3.4 wurde die Dauer der Zytokinbehandlung gegen den Proliferationsfaktor aufgetragen. Dieser Faktor ergibt sich aus dem Verhältnis der Zellzahlen vor bzw. nach der TGF β -Behandlung.

In unbehandelten HaCaT-Zellen verdoppelt sich die Zellzahl, ungeachtet ihres Genotyps, alle 24 Stunden. Eine TGF β -Behandlung hat in beiden Zelllinien einen antiproliferativen Effekt zur Folge. Eine multifaktorielle Varianzanalyse (2-Way ANOVA) ergab, dass der Einfluss von TGF β auf die Proliferation als hoch signifikant bewertet ($p < 0,0001$). Der Einfluss von OGG1 ist allerdings statistisch nicht signifikant. Eine statistisch signifikante Interaktion der beiden Faktoren ist nicht zu beobachten.

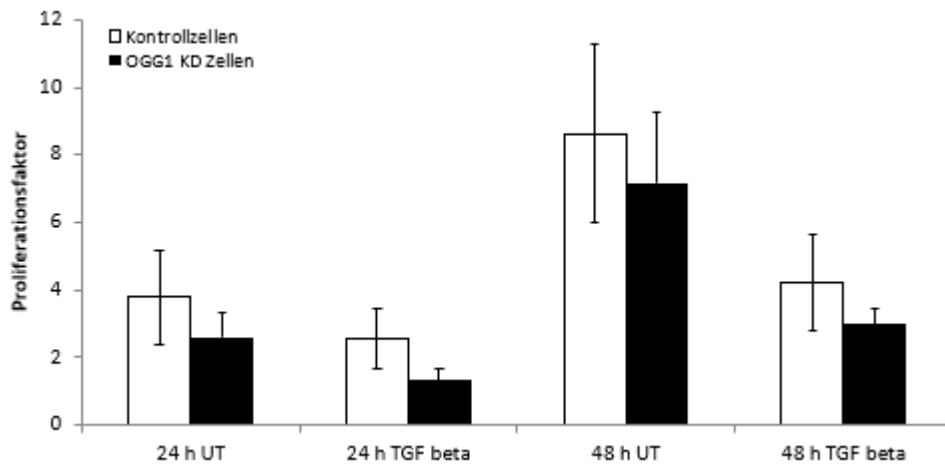


Abb. 3.4 Einfluss von OGG1 Knockdown und Zytokinbehandlung auf die Proliferation in HaCaT-Zellen.

Proliferationsfaktor von HaCaT Kontroll- und OGG1-defizienten Zellen nach 24 bzw. 48 h mit bzw. ohne (UT) TGF β -Behandlung. Der Proliferationsfaktor ergibt aus dem Verhältnis der ausgestreuten und zum Zeitpunkt t gezählten Zellen (vgl. 3.1.4). (n=3). MW \pm SD.

4.3.2 Einfluss von TGF β und OGG1 auf die Zellzyklusverteilung

Wie bereits erwähnt, lassen die Ergebnisse der mikroskopischen Beurteilung eine Beteiligung von OGG1 an der Induktion der EMT durch TGF β vermuten. Auch die Resultate der Proliferationsanalyse stützen diesen Verdacht. Um das veränderte Proliferationsverhalten aber besser charakterisieren zu können, wurde die Veränderung der Zellzyklusphasen mittels Durchflusszytometer untersucht.

Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abb. 3.5 dargestellt. Ohne TGF β -Behandlung befinden sich unabhängig vom Genotyp die meisten Zellen in der S-Phase (Quadrant 2 und 3). Nach acht Stunden Zytokinbehandlung zeigt sich in beiden Zelllinien, dass die Zellen gleichmäßiger auf die Quadranten verteilt sind. Erst nach 24 Stunden zeigt sich ein deutlicher G1-Arrest der Kontroll- und OGG1 KD-Zellen. Die meisten Zellen befinden sich zu diesem Zeitpunkt im ersten Quadranten.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass in HaCaT-Zellen nach 24 Stunden ein deutlicher G1-Arrest beobachtet werden kann. Die Frage nach einer Beteiligung von OGG1 bleibt offen.

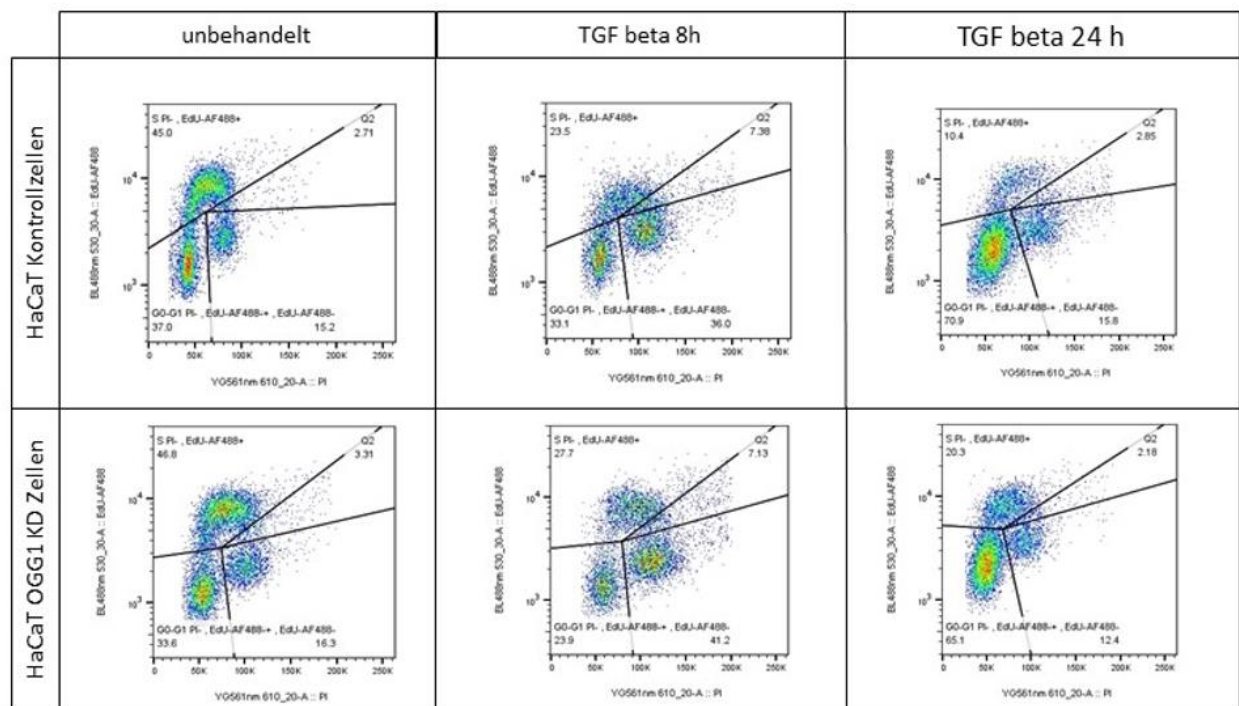


Abb. 3.5 Einfluss von TGF β auf den Zellzyklus in HaCaT-Zellen.

Zellzyklusverteilung in HaCaT Kontroll- und OGG1-defizienten Zellen nach Behandlung mit 4 ng/ml TGF β nach den angegebenen Inkubationszeiten mittels Durchflusszytometer (vgl. 3.2.2.1). Doppelfärbung mit EdU-Alexa488 und Propidiumiodid. (n=2).

4.3.3 Einfluss von TGF β und OGG1 auf die Expression von *p21*

Wie die Ergebnisse der Proliferationsstudie und der durchflusszytometrischen Analyse zeigen, ist eine Beteiligung von der Glykosylase OGG1 an der Induktion eines Zellzyklusarrestes möglich. Eine Antwort auf die Frage nach einer Beteiligung des genannten DNA-Reparaturenzyms auf die Transkriptionsinitiation kann aber nur eine Expressionsanalyse liefern. Hierzu wurde der Einfluss von OGG1 auf die Expression von *p21* unter verschiedenen Bedingungen mittels qRT-PCR analysiert.

4.3.3.1 Einfluss der Behandlungsdauer auf die Expression von *p21*

In einem ersten Versuch wurde der Einfluss von OGG1 bzw. TGF β auf die Expression von *p21* in Abhängigkeit von der Behandlungsdauer untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression von *p21* mit steigender Behandlungsdauer zunimmt. Die Expression erhöht sich in den Kontrollzellen nach achtstündiger TGF β -

Inkubation auf etwa das Vierfache, in den OGG1 Knockdown-Zellen auf das Elffache. Eine 2-Way ANOVA Analyse ergab, dass die beiden Faktoren „TGF β “ und „OGG1“ einen hoch signifikanten Einfluss auf die Expression von *p21* haben (jeweils $p < 0,0001$). Darüber hinaus ist die Interaktion zwischen den beiden genannten Faktoren statistisch signifikant ($p = 0,02$). Das bedeutet, dass sich beide Faktoren gegenseitig beeinflussen und gemeinsam auf die Expression von *p21* wirken.

Interessanterweise ist bereits ohne Zytokin-Behandlung, ein Unterschied der *p21*-Expression zwischen den beiden Zelllinien vorhanden, der sich als statistisch hoch signifikant erweist.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sich die Anwesenheit der DNA-Glykosylase OGG1 negativ auf die Expressionsstärke von *p21* auswirkt und TGF β das genannte Gen zeitabhängig induziert. Der beschriebene Versuch wurde ebenfalls mit dem KD-Klon 11 durchgeführt und die Ergebnisse entsprechen sich (vgl. Anhang V).

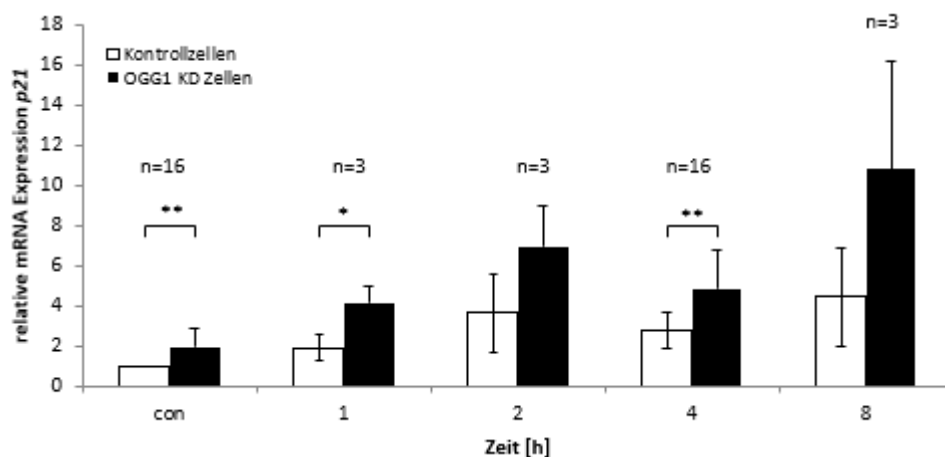


Abb. 3.6 Zeitabhängige Expression von *p21* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *p21* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1 KD-Zellen nach Behandlung mit 4 ng/ml TGF β für die angegebenen Zeiten mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen und der 4 h-Werte wurden über alle durchgeführten Experimente gemittelt. Die Normalisierung erfolgte auf die unbehandelte Kontrollprobe. Die Ergebnisse der direkten Vergleichsbestimmung sind in Anhang III dargestellt. MW \pm SD.

4.3.3.2 Einfluss der TGF β -Konzentration auf die Expression von *p21*

Die Ergebnisse in Abb. 3.7 zeigen, dass die Behandlung der Zellen mit 1 ng/ml TGF β die Expression von *p21* in beiden Zelllinien verdoppelt. Eine weitere Erhöhung der Konzentration führt allerdings nicht zu einer stärkeren Induktion des Zellzyklusgens. Darüber hinaus zeigt

sich, dass der negative Einfluss der DNA-Glykosylase OGG1 unabhängig von der eingesetzten Konzentration ist.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass der beschriebene Effekt von OGG1 bereits bei geringer Konzentration gesättigt und unabhängig von der eingesetzten Konzentration ist.

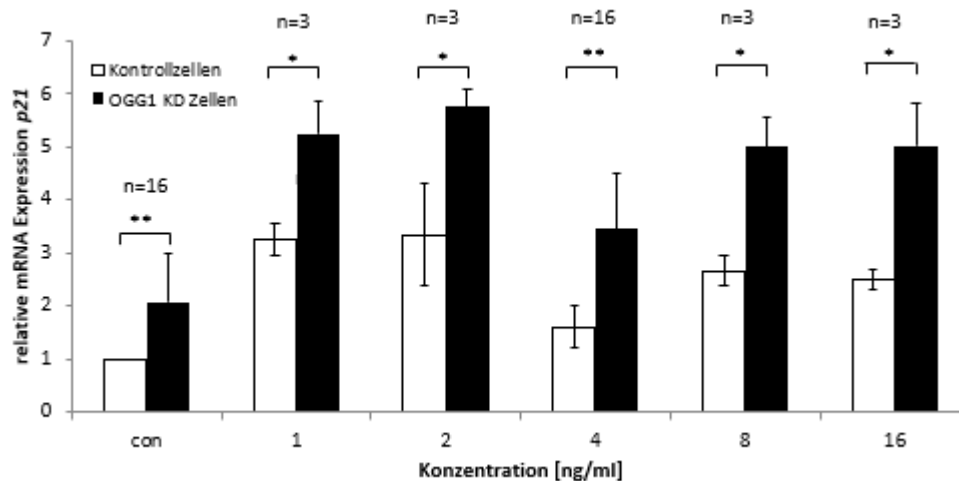


Abb. 3.7 Konzentrationsabhängige Expression von *p21* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *p21* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1 KD-Zellen nach Behandlung mit 0, 1, 2, 4, 8 und 16 ng/ml TGF β für 4 h mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen und der 4 h-Werte wurden über alle durchgeführten Experimente gemittelt. Die Ergebnisse der direkten Vergleichsbestimmung sind in Anhang III dargestellt. Die Normalisierung erfolgte auf die unbehandelte Kontrollprobe. MW \pm SD.

4.3.3.3 Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies auf die Expression von *p21*

4.3.3.3.1 Einfluss von TGF β auf die steady-state level oxidativer Läsionen

In Kapitel 1.5 wurde die von Perillo et al. postulierte Hypothese vorgestellt, wonach die Histondemethylase LSD1 beim Demethylierungsprozess von H3K9 Wasserstoffperoxid als Nebenprodukt erzeugt und dadurch 8-oxoG in den Promotorsequenzen von Genen, die über den Estrogenrezeptor reguliert werden, generiert.

In der Literatur ist zudem beschrieben, dass TGF β ROS induzieren kann. Eine Einflussnahme auf den ROS-Status durch Antioxidantien (z.B. N-Acetylcystein) oder Oxidantien (z.B. H₂O₂) zeigen allerdings abhängig vom Zelltyp unterschiedliche Wirkungen auf die Genexpression (Kim et al., 2006)(Ishikawa et al., 2014)(Gorowiec et al., 2012).

Bevor Expressionsstudien mit ROS-beeinflussenden Agentien durchgeführt wurden, wurde zunächst das Ausmaß der durch TGF β induzierten oxidativen DNA-Modifikationen untersucht.

Hierzu wurden die globalen Spiegel von Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Läsionen in unbehandelten und TGF β -behandelten Zellen mittels Alkalischer Elution gemessen (vgl. 3.2.2.2).

In Abb. 3.8 sind die basalen und durch TGF β induzierten Einzelstrangbrüche bzw. Fpg-sensitiven Läsionen in den Kontroll- bzw. OGG1-defizienten HaCaT-Zellen dargestellt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Behandlung mit TGF β in keiner der beiden Zelllinien eine signifikante Erhöhung der Spiegel von Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Basenmodifikationen wie 8-oxoG in der Gesamt-DNA bewirkt. Eine eventuelle Generierung von ROS durch TGF β führt also bestenfalls ganz lokal zu einer oxidativen DNA-Schädigung. Das „negative“ Ergebnis ist wegen der hohen Empfindlichkeit der eingesetzten Nachweismethode (alkalische Elution) besonders bemerkenswert.

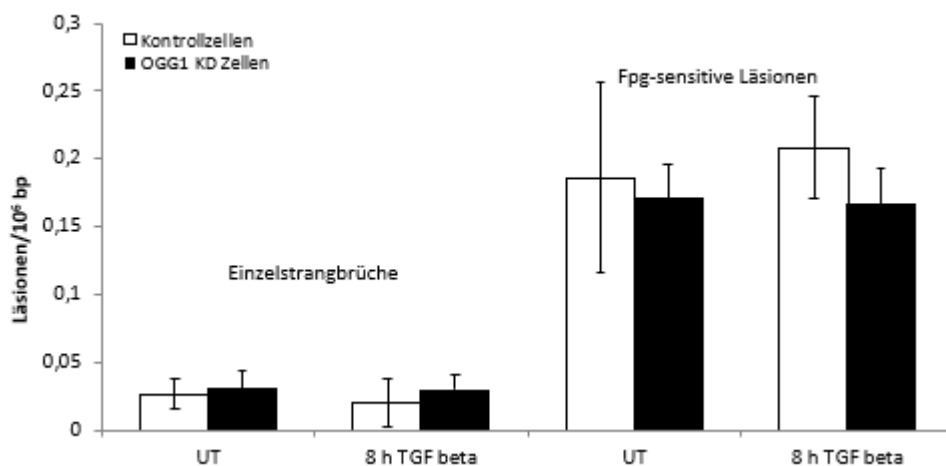


Abb.3.8 DNA-Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Läsionen in HaCaT-Zellen vor bzw. nach der Behandlung mit TGF β .

Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Läsionen in HaCaT Kontroll- und OGG1-defizienten Zellen unbehandelt bzw. nach TGF β -Behandlung (4 ng/ml) für 8 Stunden bei 37°C mittels Alkalischer Elution (vgl. 3.2.2.2). Die Werte im Diagramm sind als Läsion pro 10⁶ Basenpaare dargestellt. (n=4). MW \pm SD.

Um eine mögliche DNA-schädigende Wirkung durch TGF β -Behandlung noch empfindlicher nachweisen zu können, wurde versucht, die Menge an ROS durch die Depletion von

Glutathion zu erhöhen, also das Abfangen der endogen gebildeten ROS durch eines der wichtigsten zellulären Antioxidantien zu verhindern (vgl. Kapitel 1.2).

Wie der Abb. 3.9 zu entnehmen, führt die Vorbehandlung mit BSO weder basal noch in den TGF β -behandelten Zellen zu einer erhöhten Zahl an Einzelstrangbrüchen oder Fpg-sensitiven Läsionen. Abermals besteht kein Unterschied zwischen den Genotypen.

Es kann somit festgehalten werden, dass die Behandlung mit dem Zytokin TGF β in beiden Zelllinien zumindest global höchstens in einem sehr geringen Ausmaß Fpg-sensitive Läsionen (einschließlich 8-oxoG) induziert.

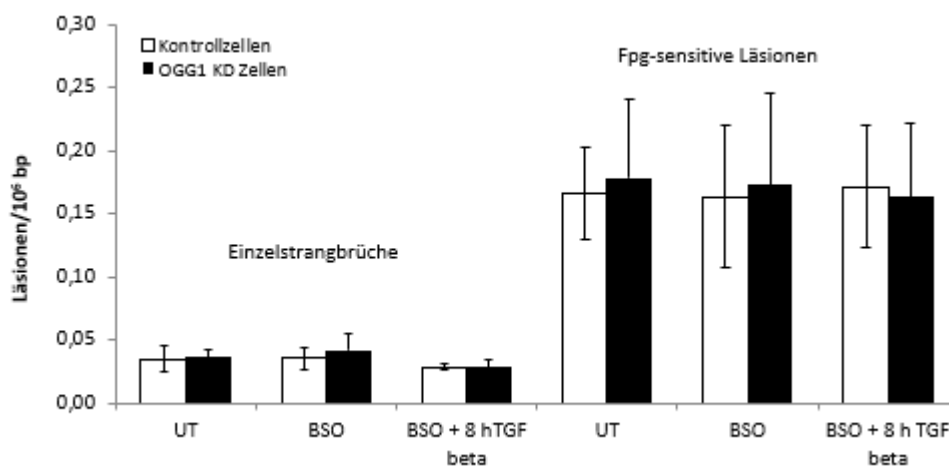


Abb.3.9 Einfluss einer Glutathiondepletion auf DNA-Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Läsionen in HaCaT-Zellen vor bzw. nach TGF β -Behandlung.

Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Läsionen in HaCaT Kontroll- und OGG1 KD-Zellen unbehandelt bzw. nach TGF β Behandlung (4 ng/ml) für 8 Stunden bei 37°C unter Glutathionhemmung mittels Alkalischer Elution (vgl. 3.2.2.2). Die Zellen wurden vor der TGF β -Behandlung mit 5 mM BSO für 24 h vorinkubiert. (n=4). MW \pm SD.

4.3.3.3.2 Einfluss von N-Acetylcystein (NAC) auf die Expression von p21

Mit den nachfolgend beschriebenen Untersuchungen sollte geklärt werden, ob sich ROS auf die Induktion von p21 auswirken. Dazu wurde der Einfluss einer Vorbehandlung der Zellen mit dem Antioxidans (ROS-Fänger) NAC einerseits und dem Glutathion-Synthese-Hemmer BSO andererseits auf die TGF β -induzierte Expression von p21 analysiert.

In einem dritten Versuchsblock wurde der Einfluss von NOX4 als ROS-Quelle auf die Induktion des Zellzyklusgens p21 untersucht. In Publikationen wird diesem Enzym eine Schlüsselfunktion bei der ROS-Generierung durch TGF β zugeschrieben (vgl. Kapitel 1.2).

Die Ergebnisse mit NAC sind in Abb. 3.10 dargestellt. Es zeigt ein Unterschied zwischen den beiden Zelllinien in den unbehandelten Zellen und der Positivkontrolle (vierstündige TGF β -Behandlung). Allerdings zeigt die Vorinkubation mit dem ROS-Fänger weder in den Kontroll- noch in den OGG1-defizienten Zellen einen signifikanten Einfluss auf die, durch TGF β induzierte Expression von *p21*. Entsprechend bleibt der auf der Abwesenheit von OGG1 basierende Unterschied zwischen den Zelllinien erhalten.

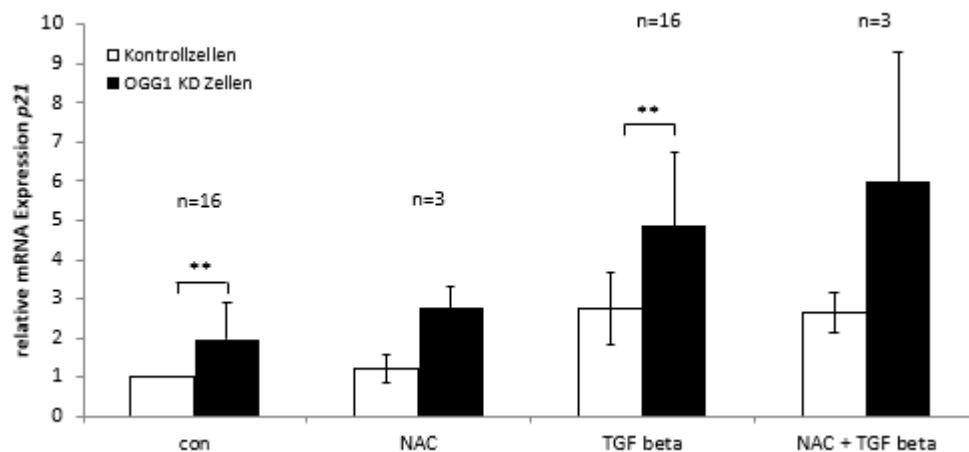


Abb. 3.10 Einfluss von NAC auf die Expression von *p21* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *p21* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1 KD-Zellen nach Inkubation mit 4 ng/ml TGF β für 4 h unter Abfangen von ROS mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Zellen wurden für 4 h mit 1 mM NAC bei 37°C vorinkubiert. Die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen und der 4 h-Werte wurden über alle durchgeführten Experimente gemittelt. Die Ergebnisse der direkten Vergleichsbestimmung sind in Anhang III dargestellt. Die Normalisierung erfolgte auf die unbehandelte Kontrollprobe. MW \pm SD.

4.3.3.3 Einfluss von Buthioninsulfoximin (BSO) auf die Expression von *p21*

Wie bereits ausgeführt, stellt Glutathion ein wichtiges ROS-Detoxifizierungssystem dar (vgl. Kapitel 1.2). Eine Depletion sollte demnach zu einem umgekehrten Effekt wie ein Antioxidans bzw. ROS-Fänger führen.

Wie die Ergebnisse in Abb. 3.11 zeigen, bleibt die Glutathiondepletion sowohl in den Kontrollzellen als auch in den OGG1-defizienten Zellen ohne Einfluss auf die Expression von *p21*. Entsprechend führt die BSO-Behandlung nicht zur Nivellierung des OGG1-abhängigen Unterschieds zwischen den Zelllinien.

Aus den Versuchen kann somit gefolgert werden, dass die intrazellulären Spiegel von Antioxidantien keinen Einfluss auf die Expression bzw. Induktion von *p21* haben.

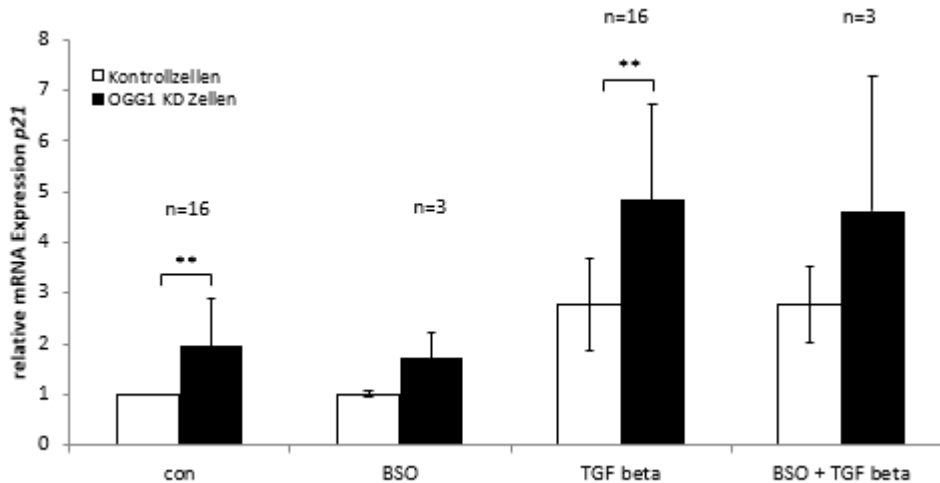


Abb. 3.11 Einfluss von BSO auf die Expression von *p21* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *p21* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1 KD-Zellen nach Behandlung mit 4 ng/ml TGF β für 4 h unter Hemmung der Glutathion-Synthese mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Zellen wurden für 24 h mit 5 mM BSO bei 37°C vorbehandelt. Die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen und der 4 h-Werte wurden über alle durchgeführten Experimente gemittelt. Die Ergebnisse der direkten Vergleichsbestimmung sind in Anhang III dargestellt. Die Normalisierung erfolgte auf die unbehandelte Kontrollprobe. MW \pm SD.

4.3.3.3.4 Einfluss von NOX4 auf die Expression von *p21*

In der Literatur wird NOX4 als Quelle für TGF β -induzierte ROS genannt (Carmona-Cuenca et al., 2008). Zudem wird der Einfluss von ROS auf die Genexpression von *FN1* gezeigt (Boudreau et al., 2012). Um eine Beteiligung des Enzyms NOX4 an der Regulation der Expression von *p21* in HaCaT-Zellen zu überprüfen, wurden in beiden HaCaT-Zelllinien das Enzym mit dem spezifischen Inhibitor GKT 137831 gehemmt.

Die Ergebnisse des Versuchs sind in Abb. 3.12 dargestellt. Danach hat die Behandlung mit dem Inhibitor keinen signifikanten Einfluss auf die TGF β -induzierte Expression von *p21*. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse, dass die Verwendung von DMSO als Lösungsmittel für den Inhibitor die Expressionsstärke zwischen den beiden Zelllinien einander annähert. Ein Vergleich zwischen Proben mit bzw. ohne DMSO als Lösungsmittel zeigt keinen Unterschied (vgl. Anhang II).

Aufgrund dieser Resultate scheint das Enzym NOX4 als ROS-Quelle keine bedeutende Rolle für die hier untersuchte Genregulation zu spielen.

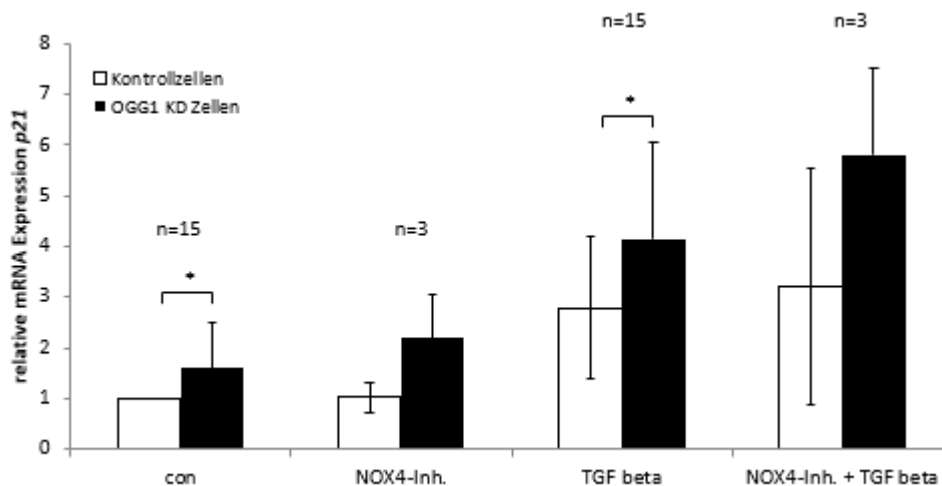


Abb. 3.12 Einfluss von GKT137831 (NOX4-Inhibitor) auf die Expression von *p21* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *p21* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1 KD-Zellen nach Behandlung mit 4 ng/ml TGF β für 4 h unter Inhibierung von NOX4 mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Zellen wurden für 1 h mit 10 μ M GKT137831 bei 37°C vorbehandelt. Die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen und der 4 h-Werte wurden über alle durchgeführten Experimente gemittelt. Die Ergebnisse der direkten Vergleichsbestimmung sind in Anhang III dargestellt. Die Normalisierung erfolgte auf die unbehandelte Kontrollprobe. 0,05 % DMSO unter allen Bedingungen. MW \pm SD.

4.3.3.4 Einfluss der Histondemethylase LSD1 auf die Expression von *p21*

Wie in der Einleitung (Kapitel 1.5) beschrieben, wurde der Einfluss von OGG1 auf die Genexpression in einigen Fällen auf eine gezielte (locus-spezifische) Oxidation der DNA durch die Histondemethylase LSD1 erklärt. Es stellt sich somit die Frage, ob dieser Mechanismus auch für das TGF-vermittelte Reprogramming von Epithelzellen gilt und LSD1 somit einen Einfluss auf die oben beschriebene (zumindest teilweise OGG1-abhängige) *p21*-Induktion hat. Aus diesem Grund wurden zwei verschiedene LSD1-Inhibitoren, Pargylin und OGL-002 verwendet. LSD1 besitzt eine Monoaminoxidasefunktion und kann somit durch Pargylin, das ein unspezifischer MAO-Hemmer ist, inhibiert werden (Burg et al., 2015). OGL-002 ist ein weiterer, deutlich spezifischerer LSD1-Inhibitor (Liang et al., 2013).

Wie die Resultate in Abb. 3.13 zeigen, wird sowohl in den unbehandelten Zellen als auch in den Positivkontrollen (vierstündige TGF β -Behandlung) ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden HaCaT-Zelllinien beobachtet. Darüber hinaus wirkt sich die Behandlung mit Pargylin ganz erheblich auf die Expression von *p21* aus. Durch die Hemmung der Histondemethylase kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der TGF β vermittelten

Induktion von ca. dreifach auf achtfach. In den OGG1-defizienten HaCaT-Zellen hat Pargylin hingegen keinen Einfluss auf die Induktion von *p21* durch TGF β . Der Vergleich der beiden LSD1-gehemmten Zelllinien zeigt, dass die Hemmung des Enzyms LSD1 den Einfluss der OGG1-Defizienz vollkommen aufhebt. Somit hat LSD1 nur bei Anwesenheit von OGG1 einen Einfluss auf die Transkription von *p21*.

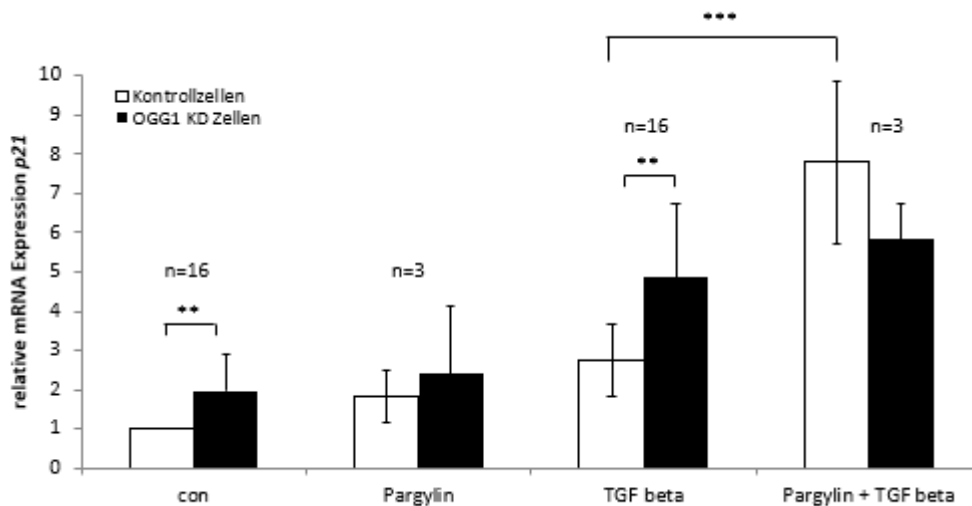


Abb. 3.13 Einfluss des LSD1-Inhibitors Pargylin auf die Expression von *p21* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *p21* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1 KD-Zellen nach der Behandlung 4 ng/ml TGF β unter Hemmung von LSD1 mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Zellen wurden für 1 h mit 2,5 mM Pargylin bei 37°C vorbehandelt. Die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen und der 4 h-Werte wurden über alle durchgeführten Experimente gemittelt. Die Ergebnisse der direkten Vergleichsbestimmung sind in Anhang III dargestellt. Die Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontrollprobe. MW \pm SD.

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde mit OGL-002 ein weiterer LSD1-Inhibitor eingesetzt. Die Resultate sind in Abb. 3.14 dargestellt. Bei Verwendung dieses Hemmstoffs erhöht sich die TGF β -vermittelte Induktion von *p21* in den Kontrollzellen signifikant von dreifach auf sechsfach. Der auf der Abwesenheit von OGG1 beruhende Expressionsunterschied zwischen den beiden Zelllinien wird wiederum nivelliert.

Somit verifizieren diese Ergebnisse die mit Pargylin erhaltenen und eine Beteiligung der Histondemethylase LSD1 kann als gesichert angesehen werden. Zusammenfassend hat LSD1 in Anwesenheit von OGG1 eine hemmende Wirkung auf die Expression von *p21*. LSD1 und OGG1 sind offensichtlich epistatisch in einen gemeinsamen Prozess der Genregulation involviert.

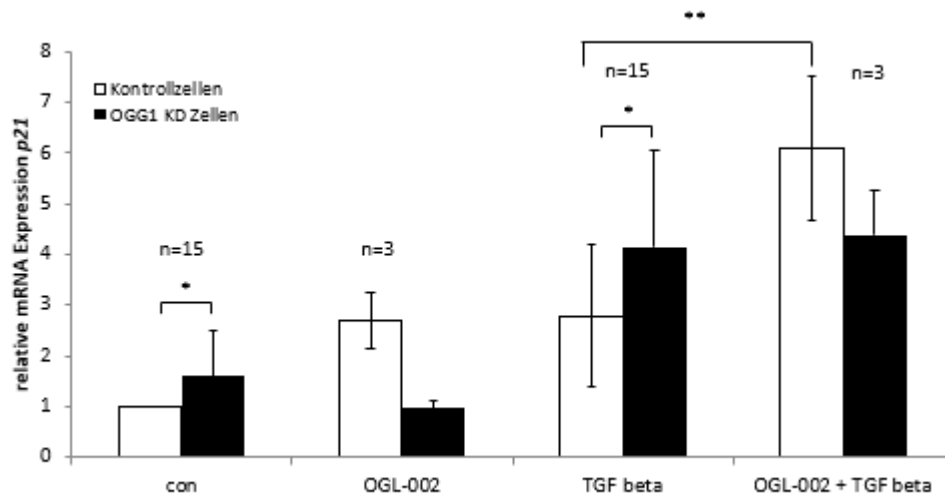


Abb. 3.14 Einfluss des LSD1-Inhibitors OGL-002 auf die Expression von *p21* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *p21* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1-defizienten Zellen nach der Behandlung mit 4 ng/ml TGF β unter Hemmung von LSD1 mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Zellen wurden für 1 h mit 50 μ M OGL-002 vorinkubiert. Die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen und der 4 h-Werte wurden über alle durchgeführten Experimente gemittelt. Die Ergebnisse der direkten Vergleichsbestimmung sind in Anhang III dargestellt. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontrollprobe. 0,05 % DMSO unter allen Bedingungen. MW \pm SD.

4.3.3.5 Einfluss von 8-oxoGua auf die Expression von *p21*

Wie einleitend in Kapitel 1.5 beschreiben, gibt es neben den Hypothesen von Perillo und Amente et al. eine weitere, LSD1-unabhängige Theorie. Boldogh et al. postulieren, dass die freie Base 8-oxoGua, nachdem sie mittels BER aus der DNA entfernt wurde, an OGG1 bindet und als Guanosin-Exchange Factor (GEF) agiert und dadurch Ras/Raf-Signalwege aktiviert. Da diesen MAP-Kinase-Wegen auch im Prozess der EMT eine Rolle als SMAD-Modulator zukommt (Moustakas und Heldin, 2005).

Es ist wichtig zu überprüfen, ob der beschriebene Mechanismus bei der Transkriptionsregulation von *p21* ebenfalls eine Rolle spielt. Deshalb wurden beide Ziellinien mit der freien Base 8-oxoGua vorbehandelt. Nach der Theorie von Boldogh et al. sollte exogen zugesetztes 8-oxoGua ebenso wie endogen generiertes den Ras/Raf-Signalweg induzieren (Boldogh et al., 2008).

Die Ergebnisse in Abb. 3.15 zeigen, dass der basale und in den Positivkontrollen beschriebene Unterschied zwischen den beiden Ziellinien zu beobachten ist. Aber die

Vorbehandlung mit 8-oxoGua hat keinerlei Einfluss auf die Expression von *p21*. Diese Beobachtung ist unabhängig vom Genotyp der Zellen.

Es kann somit ein Einfluss von 8-oxoGua auf die Induktion des Zellzyklusgens *p21* ausgeschlossen werden.

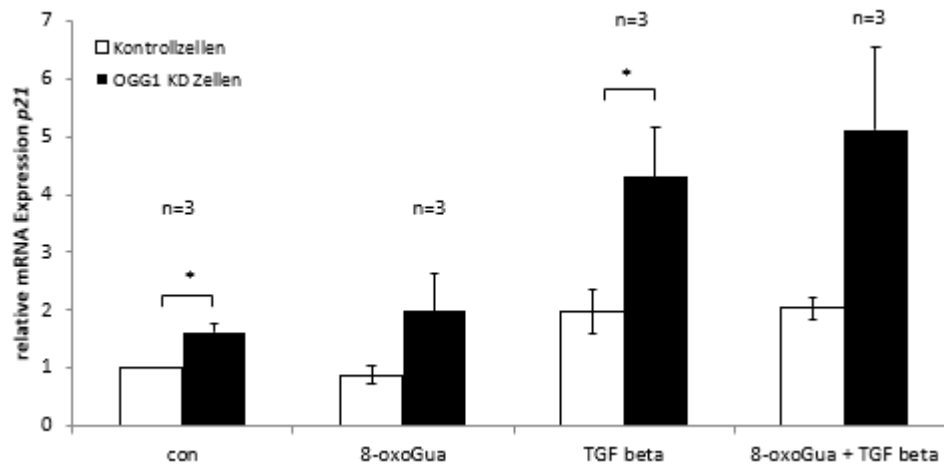


Abb. 3.15 Einfluss von 8-oxoGua auf die Expression von *p21* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *p21* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1-defizienten Zellen nach der Behandlung mit TGF β (4 ng/ml) unter Zugabe von 8-oxoGua (1 μ M, 1 h) mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Zellen wurden für 1 h mit 1 μ M 8-oxoGua bei 37°C vorbehandelt. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontrollprobe. MW \pm SD. (n=3).

4.3.3.6 Einfluss der MAP-Kinasen auf die Induktion von *p21*

Für die Induktion von *p21* ist ein SMAD-abhängiger Signalweg publiziert (Datto et al., 1995b). Allerdings benötigen SMAD-Transkriptionsfaktoren akzessorische Faktoren, da ihre Bindungsaffinität zur DNA gering ist. Als mögliche Cofaktoren bei der Induktion von *p21* werden FOXO1/3 und/ oder 4 genannt (Gomis et al., 2006a). Eine Beteiligung weiterer Faktoren wird aber diskutiert. In Betracht kommen beispielsweise durch MAP-Kinasen aktivierte Transkriptionsfaktoren wie AP1, denen ohnehin eine modulierende Funktion im SMAD-Signaling zugeschrieben wird (vgl. Abb. 1.14 und 1.15).

Um eine mögliche Beteiligung der MAP-Kinasen an der TGF β -vermittelten Induktion von *p21* in HaCaT-Zellen zu überprüfen, wurde jede MAP-Kinase einzeln mit einem spezifischen Inhibitor gehemmt.

Für die MAP-Kinasen wird unabhängig vom eingesetzten Inhibitor bereits ein Unterschied in den unbehandelten Zellen und den Positivkontrollen beobachtet. Für die MAP-Kinase p38

zeigt sich ein schwacher positiver Effekt der genannten MAP-Kinase auf die Expression von *p21*, der allerdings unabhängig vom Genotyp und somit OGG1 ist (vgl. Abb. 3.16).

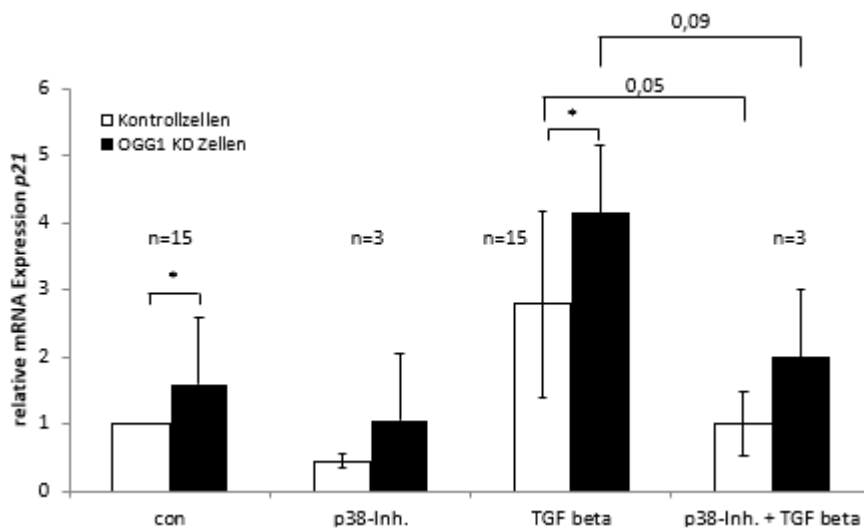


Abb. 3.16 Einfluss von PD169316 (p38-Inhibitor) auf die Expression von *p21* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *p21* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1 KD-Zellen nach der Behandlung mit 4 ng/ml TGF β unter Hemmung von p38 mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Zellen wurden für 1 h mit 10 μ M PD169316 vorinkubiert. Die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen und der 4 h-Werte wurden über alle durchgeführten Experimente gemittelt. Die Ergebnisse der direkten Vergleichsbestimmung sind in Anhang III dargestellt. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontrollprobe. 0,05 % DMSO unter allen Bedingungen. MW \pm SD.

Nach Vorinkubation mit einem Inhibitor der JNK wird in der OGG1-Knockdown-Zelllinie, nicht jedoch in den Kontrollzellen, eine Erhöhung der TGF β -vermittelten *p21* Expression beobachtet (vgl. Abb. 3.17). Dies würde bedeuten, dass die JNK-Hemmung einen Einfluss auf die OGG1-unabhängige Induktion von *p21* (in den OGG1-defizienten Zellen) hat. Die OGG1-abhängige (in den Kontrollzellen) bleibt unbeeinflusst. Neben LSD1 wäre somit auch die JNK an der OGG1-abhängigen Regulation der *p21*-Expression beteiligt. Eine eindeutige Aussage über eine Beteiligung der JNK ist allerdings nicht möglich, da der beobachtete Unterschied statistisch knapp unterhalb des Signifikanzniveaus von 0,05 bleibt.

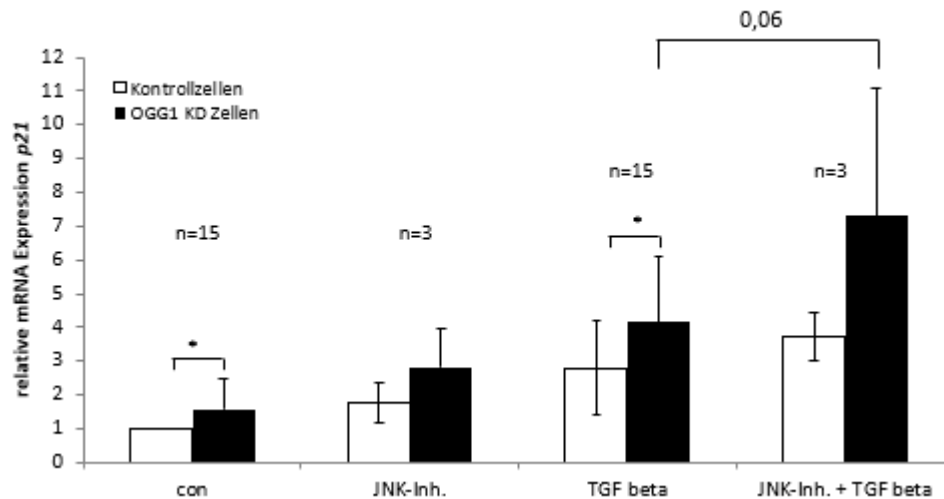


Abb. 3.17 Einfluss von SP600125 (JNK-Inhibitor) auf die Expression von *p21* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *p21* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1 KD-Zellen nach Inkubation mit 4 ng/ml TGF β für 4 h unter Hemmung der JNK mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Zellen wurden für 1 h mit 30 μ M SP600125 bei 37°C vorbehandelt. Die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen und der 4 h-Werte wurden über alle durchgeführten Experimente gemittelt. Die Ergebnisse der direkten Vergleichsbestimmung sind in Anhang III dargestellt. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontrollprobe. 0,05 % DMSO unter allen Bedingungen. MW \pm SD.

Für die dritte MAP-Kinase, ERK1/2, sind die Ergebnisse eindeutig. Die Enzymhemmung bleibt in beiden Zelllinien ohne Einfluss auf die Expression des Zellzyklusgens (vgl. Abb. 3.18).

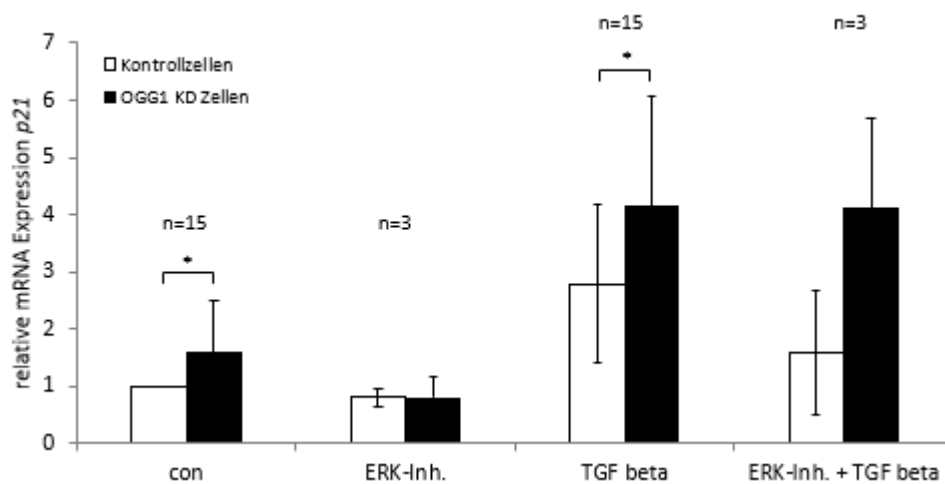


Abb. 3.18 Einfluss von U-0126 (ERK-Inhibitor) auf die Expression von *p21* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *p21* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1-defizienten Zellen nach der Behandlung mit 4 ng/ml TGF β unter Hemmung von ERK1/2 mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Zellen wurden für 1 h mit 10 μ M U-0126 bei 37°C vorbehandelt. Die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen und der 4 h-Werte wurden über alle durchgeführten Experimente gemittelt. Die Ergebnisse der direkten Vergleichsbestimmung sind in Anhang III dargestellt. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontrollprobe. 0,05 % DMSO unter allen Bedingungen. MW \pm SD.

Zusammenfassend kann aus den Ergebnissen gefolgert werden, dass p38 einen positiven, aber OGG1- unabhängigen Einfluss auf *p21* ausübt. Für die beiden anderen MAP-Kinase ist der Einfluss gering oder nicht vorhanden.

4.3.3.7 Einfluss von NF κ B auf die Expression von *p21*

Neben dem Transkriptionsfaktor AP1 ist auch NF κ B in der Lage, den SMADs als Hilfs-Transkriptionsfaktor zu dienen. Zudem ist beschrieben, dass NF κ B als Non SMAD-Signalweg Einfluss auf die EMT nehmen kann (Kapitel 1.6.3).

Zur Analyse des Einflusses von NF κ B auf die Induktion von *p21* wurde der Transkriptionsfaktor in seiner Aktivität durch den Inhibitor Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC) gehemmt.

Wie Abb. 3.19 zu entnehmen, scheint die Verwendung von Ethanol als Lösungsmittel zur Folge zu haben, dass die zuvor beobachteten Unterschiede in den unbehandelten Zellen und den Positivkontrollen aufgehoben werden. Darüber hinaus hat die Hemmung von NF κ B

aber weder in den Kontroll- noch in den OGG1-defizienten Zellen einen signifikanten Einfluss auf die Induktion des Zellzyklus durch TGF β .

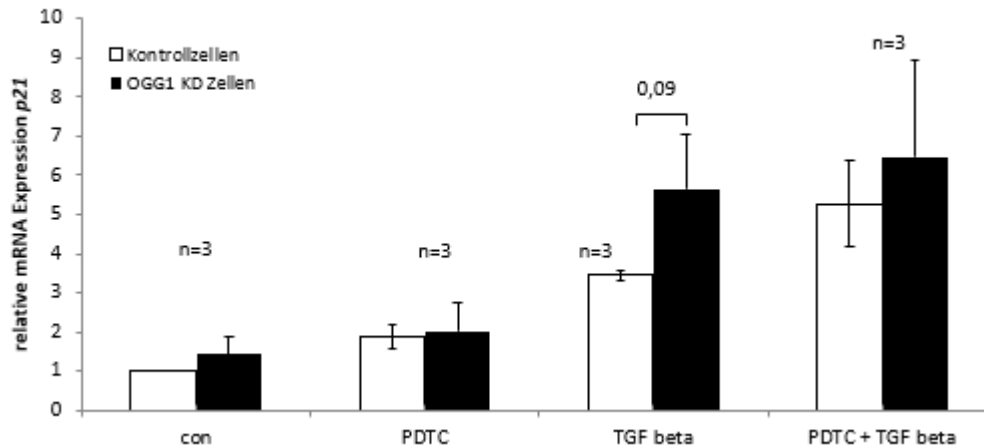


Abb. 3.19 Einfluss von Ammonium Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC) (NF κ B-Inhibitor) auf die Expression von *p21* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *p21* über der Expression von TBP in HaCaT-Zellen nach der Behandlung mit 4 ng/ml TGF β für 4 h unter Hemmung von NF κ B mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Zellen wurden für 1 h mit 10 μ M PDTC bei 37°C vorbehandelt. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontrollprobe. 0,05 % Ethanol unter allen Bedingungen. MW \pm SD. (n=3).

4.3.4 Einfluss der Reparaturglykosylase OGG1 auf die TGF β induzierte Veränderung der extrazellulären Matrix (ECM)

Neben der Expressionsanalyse für *p21* wurde mit der Induktion von Fibronectin (*FN1*) ein zweiter EMT-typischer Endpunkt gewählt, um den Einfluss von OGG1 auf die Transkription zu untersuchen und die Frage nach einer Endpunkt- bzw. Genspezifität der beobachteten Effekte beantworten zu können. Darüber hinaus wurden alle Einflussfaktoren, die für *p21* analysiert worden sind, auch für das zweite Gen untersucht.

4.3.4.1 Einfluss der Behandlungsdauer auf die Expression von FN1

Auch für den zweiten EMT-spezifischen Endpunkt wurden in einem ersten Versuch der Einfluss der Reparaturglykosylase OGG1 und der Dauer der TGF β -Inkubation untersucht.

Es zeigte sich, dass das Zytokin *FN1*, ebenso wie *p21*, sowohl in den Kontroll- als auch in den OGG1 KD-Zellen zeitabhängig induziert wird (vgl. Abb. 3.20).

Eine 2-Way ANOVA-Analyse ergab, dass die beiden Faktoren „TGF β “ und „OGG1“ einen hoch signifikanten Einfluss auf die Expression von *FN1* haben (jeweils $p < 0,0001$). Darüber hinaus ist die Interaktion zwischen den beiden genannten Faktoren statistisch hoch signifikant ($p = 0,02$). Das bedeutet, dass beide Faktoren zusammen die Expression von *FN1* beeinflussen. Interessanterweise ist bereits ohne Zytokin-Behandlung, ein Unterschied der *FN1*-Expression zwischen den beiden Zelllinien vorhanden, der sich als statistisch hoch signifikant erweist.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass *FN1*, ebenso wie *p21*, durch die Zytokinbehandlung in beiden Zelllinien zeitabhängig induziert wird. Zudem zeigt sich abermals ein negativer Einfluss des Reparaturenzyms OGG1. Der beschriebene Versuch wurde ebenfalls mit dem KD-Klon 11 durchgeführt und die Ergebnisse entsprechen sich (vgl. Anhang V).

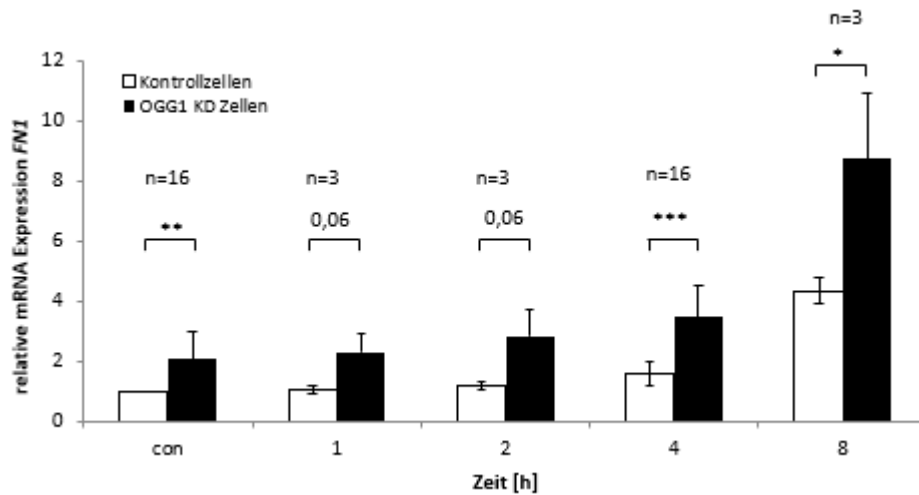


Abb. 3.20 **Zeitabhängige Expression von FN1 in HaCaT-Zellen nach der Behandlung mit TGFβ.**

Relative mRNA Expression von *FN1* über der Expression von TBP in HaCaT-Zellen nach Behandlung mit 4 ng/ ml TGFβ für die angegebenen Inkubationszeiten mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen und der 4 h-Werte wurden über alle durchgeführten Experimente gemittelt. Die Normalisierung erfolgte auf die unbehandelte Kontrollprobe. Die Ergebnisse der direkten Vergleichsbestimmung sind in Anhang IV dargestellt. MW±SD.

4.3.4.2 Einfluss der TGFβ-Konzentration auf die Expression von FN1

Die Ergebnisse in Abb. 3.21 zeigen, dass das Zytokin *FN1* in beiden Zelllinien konzentrationsunabhängig induziert. Wie für *p21* beschrieben, zeigt sich, dass der negative Einfluss von OGG1 auf die Expression von *FN1* bereits bei geringer Konzentration gesättigt und unabhängig von der eingesetzten Konzentration ist.

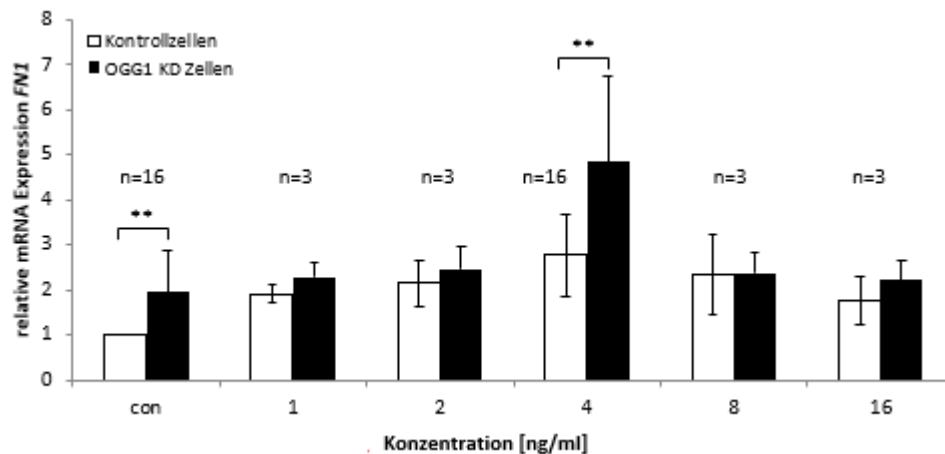


Abb. 3.21 **Konzentrationsabhängige Expression von FN1 in HaCaT-Zellen nach der Behandlung mit TGFβ.**

Relative mRNA Expression von FN1 über der Expression von TBP in HaCaT-Zellen nach Behandlung mit 0, 1, 2, 4, 8 und 16 ng/ml TGFβ für 4 h mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen und der 4 h-Werte wurden über alle durchgeführten Experimente gemittelt. Die Normalisierung erfolgte auf die unbehandelte Kontrollprobe. MW±SD.

4.3.4.3 Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies auf die Expression von FN1

In den vorgestellten Hypothesen kommt ROS bzw. durch sie generierten oxidativen DNA-Modifikationen eine große Bedeutung zu. Wie für das Gen *p21* bereits beschrieben, wurde deshalb in mehreren Versuchen die Auswirkung eines veränderten ROS-Gleichgewichtes untersucht. In einem weiteren Assay wurde wiederum der Einfluss von NOX4 als intrazellulär ROS-generierendem Enzym bestimmt.

4.3.4.3.1 Einfluss von N-Acetylcystein (NAC) auf die Expression von FN1

Eine Behandlung mit NAC verfolgt das Ziel, ROS zu reduzieren und dadurch in die Induktion von oxidativen DNA-Läsionen, die den Ausgangspunkt für die Transkriptionsinitiation darstellen, einzugreifen.

Die Ergebnisse in Abb. 3.22 zeigen einen signifikanten Unterschied in den unbehandelten Zelllinien und in den Positivkontrollen. Allerdings bleibt die Vorbehandlung mit NAC sowohl in den Kontroll- als auch in den Knockdown-Zellen ohne Einfluss auf die Expression von FN1 bleibt.

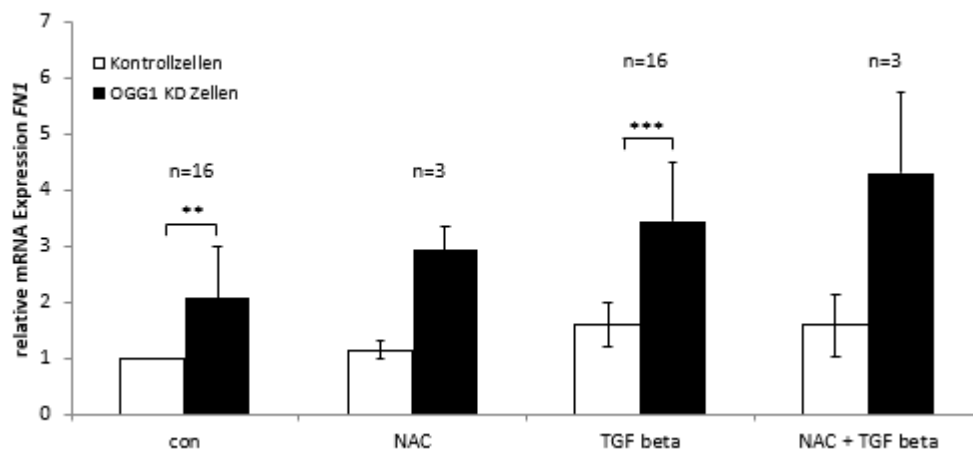


Abb. 3.22 Einfluss von NAC auf die Expression von *FN1* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *FN1* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1-defizienten Zellen nach der Behandlung mit TGF β (4 ng/ml) für 4 h unter Abfangen von ROS mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Zellen wurden für 4 h mit 1 mM NAC bei 37°C vorbehandelt. Die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen und der 4 h-Werte wurden über alle durchgeführten Experimente gemittelt. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontrollprobe. Die Ergebnisse der direkten Vergleichsbestimmung sind in Anhang IV dargestellt. MW \pm SD.

4.3.4.3.2 Einfluss von Buthioninsulfoximin (BSO) auf die Expression von *FN1*

Um den Einfluss einer Verminderung der antioxidativen Abwehr zu untersuchen, wurden die Zellen mit BSO zur Hemmung der Glutathionsynthese vorinkubiert. Durch die Depletion von Glutathion kann die Wirkung der ROS verstärkt werden, da den Zellen ein wichtiger Detoxifizierungsweg genommen wird.

Wie die Ergebnisse in Abb. 3.23 zeigen, hat die BSO-vermittelte Depletion von Glutathion in den Kontrollzellen keinen Einfluss auf die Expression von *FN1*. Die gleiche Beobachtung kann auch in den OGG1-defizienten Zellen gemacht werden. Somit bestätigen diese Ergebnisse die mit NAC gemachten. Es kann somit unter den gewählten Bedingungen ein wesentlicher Einfluss von Glutathion auf die Induktion von *FN1* ausgeschlossen werden.

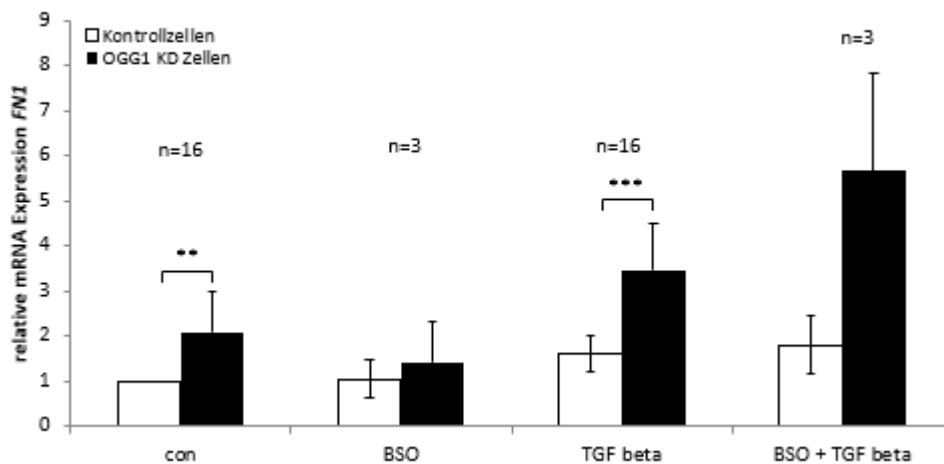


Abb. 3.23 Einfluss von BSO auf die Expression von *FN1* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *FN1* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1 KD-Zellen nach der Behandlung mit TGF β (4 ng/ml) für 4 h unter Hemmung der Glutathionsynthese mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Zellen wurden für 24 h mit 5 mM BSO bei 37°C vorbehandelt. Die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen und der 4 h-Werte wurden über alle durchgeführten Experimente gemittelt. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontrollprobe. Die Ergebnisse der direkten Vergleichsbestimmung sind in Anhang IV dargestellt. MW \pm SD.

4.3.4.3.3 Einfluss von NOX4 auf die Expression von *FN1*

In einem weiteren Versuch wurde die Beteiligung von NOX4 an der Induktion von *FN1* untersucht. In der Literatur wird ein Einfluss dieses Enzyms am Prozess der EMT diskutiert (Boudreau et al., 2012).

Die Ergebnisse in Abb. 3.24 zeigen, dass sich die Hemmung von NOX4 durch GKT137831 weder in den Kontroll- noch in den Knockdown-Zellen signifikant auf die Expression von *FN1* auswirkt. Zudem scheint die DMSO, das als Lösungsmittel für den Inhibitor verwendet wurde, die Expression in den unbehandelten Zellen bzw. den Positivkontrollen einander anzunähern, so dass die zuvor beschriebenen signifikanten Unterschiede nicht länger gegeben sind. Ein Vergleich zwischen Proben mit bzw. ohne DMSO als Lösungsmittel zeigt keinen Unterschied (vgl. Anhang II).

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass sich Eingriffe in den ROS-Haushalt nicht auszuwirken. Zudem scheint NOX4 nicht als ROS-Quelle an der Induktion von *FN1* beteiligt zu sein.

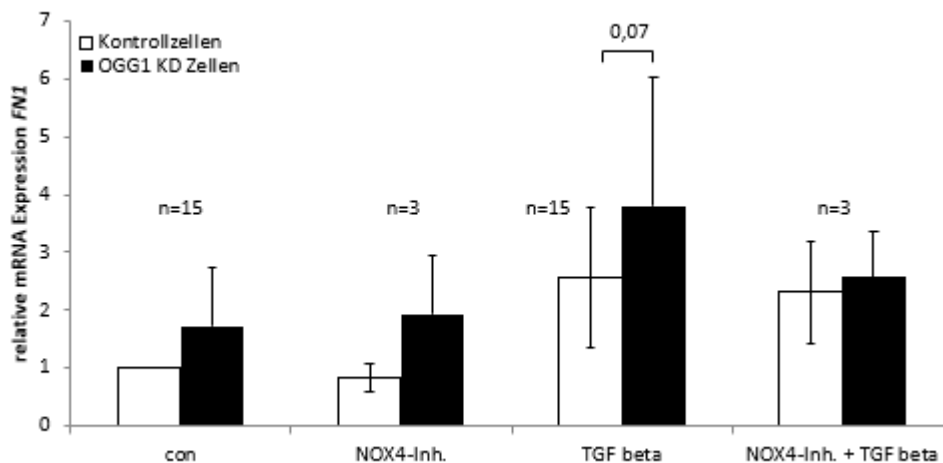


Abb. 3.24 Einfluss von GKT137831 (NOX4-Inhibitor) auf die Expression von *FN1* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *FN1* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1-defizienten Zellen nach der Behandlung mit 4 ng/ml TGF β für 4 h unter Inhibierung von NOX4 mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Zellen wurden für 1 h mit 10 μ M GKT137831 bei 37°C vorbehandelt. Die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen und der 4 h-Werte wurden über alle durchgeführten Experimente gemittelt. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontrollprobe. 0,05 % DMSO unter allen Bedingungen. Die Ergebnisse der direkten Vergleichsbestimmung sind in Anhang IV dargestellt. MW \pm SD.

4.3.4.4 Einfluss der Histondemethylase LSD1 auf die Expression von *FN1*

Für die Induktion von *p21* konnte in den vorangegangenen Versuchen ein signifikanter Einfluss der Histondemethylase LSD1 festgestellt werden, der vollständig von der Anwesenheit von OGG1 abhängig ist.

Um eine Beteiligung von LSD1 an der Induktion von *FN1* zu prüfen, wurden beide Zelllinien mit den LSD1-Inhibitoren Pargylin und OGL-002 behandelt.

Die in Abb. 3.25 dargestellten Ergebnisse zeigen einen Unterschied in den unbehandelten Zellen und Positivkontrollen. Es ist aber weder in den Kontrollzellen noch in den OGG1-defizienten Zellen ein signifikanter Einfluss der LSD1-Hemmung zu erkennen.

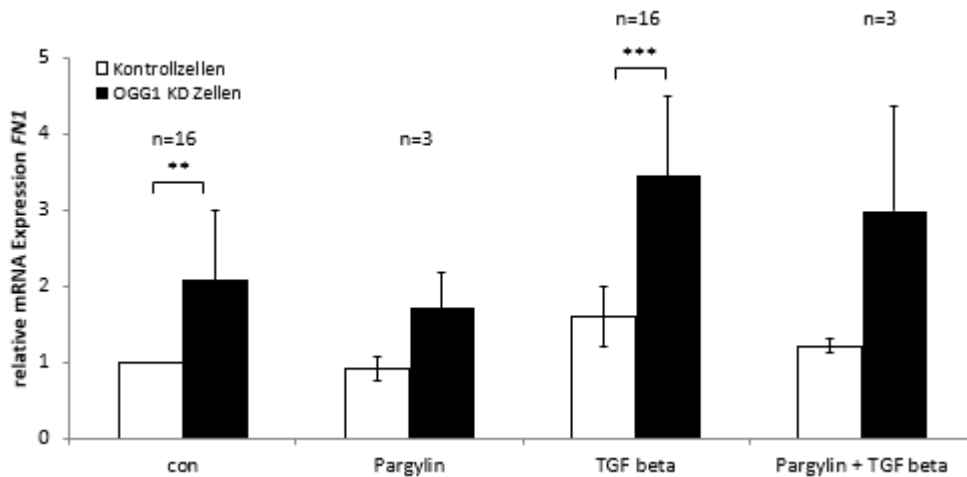


Abb. 3.25 Einfluss des LSD1-Inhibitors Pargylin auf die Expression von *FN1* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *FN1* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1 KD-Zellen nach Behandlung mit 4 ng/ml TGF β für 4 h unter Inhibierung von LSD1 mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Zellen wurden für 1 h mit 2,5 mM Pargylin bei 37°C vorbehandelt. Die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen und der 4 h-Werte wurden über alle durchgeführten Experimente gemittelt. Die Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontrollprobe. Die Ergebnisse der direkten Vergleichsbestimmung sind in Anhang IV dargestellt. MW \pm SD.

Jedoch handelt es sich bei Pargylin um einen unspezifischen LSD1-Inhibitor. Um die Beobachtungen, die nach der Vorinkubation mit diesem Inhibitor gemacht wurde, zu verifizieren, wurde mit OGL-002 zusätzlich ein selektiver LSD1-Inhibitor eingesetzt.

Wie Abb. 3.26 zu entnehmen, wirkt sich auch dieser Inhibitor nicht auf die Expression von *FN1* aus.

Somit unterscheiden sich die Ergebnisse für *FN1* deutlich von denen für *p21*. Es muss sich demnach um einen genspezifischen Einfluss von LSD1 handeln.

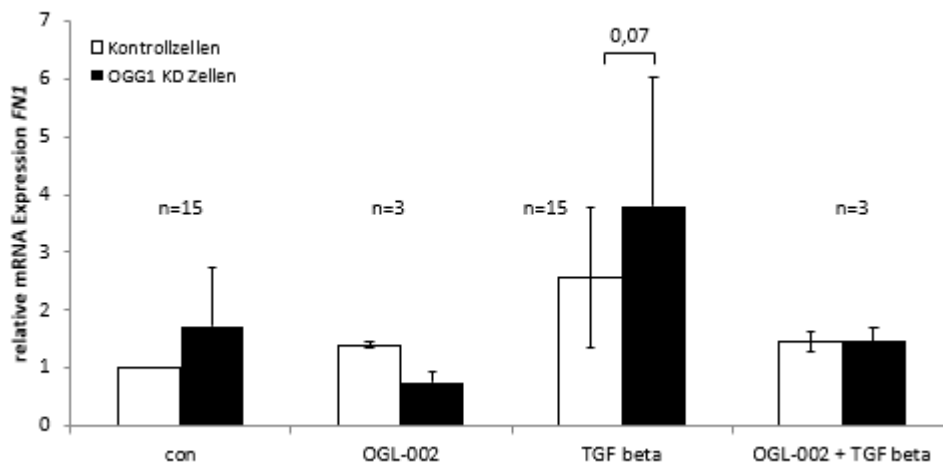


Abb. 3.26 Einfluss des LSD1-Inhibitors OGL-002 auf die Expression von *FN1* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *FN1* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1 KD-Zellen nach Behandlung mit 4 ng/ml TGF β für 4 h unter Hemmung von LSD1 mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Zellen wurden für 1 h mit 50 μ M OGL-002 bei 37°C vorbehandelt. Die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen und der 4 h-Werte wurden über alle durchgeführten Experimente gemittelt. Die Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontrollprobe. 0,05 % DMSO unter allen Bedingungen. Die Ergebnisse der direkten Vergleichsbestimmung sind in Anhang IV dargestellt. MW \pm SD.

4.3.4.5 Einfluss von 8-oxoGua auf die Expression von *FN1*

Nachdem für *p21* gezeigt werden konnte, dass die Induktion des Gens durch die Zugabe von 8-oxoGua ins Zellkulturmedium unverändert geblieben ist, wurde der Einfluss dieser freien oxidierten Base auch für *FN1* untersucht.

Die Ergebnisse sind in Abb. 3.27 dargestellt und zeigen, dass der basale und in den Positivkontrollen beobachtete Unterschied ausgeglichen wird. Darüber hinaus bleibt diese Behandlung auch für dieses Gen ohne Folgen. Die Expression von *FN1* bleibt unabhängig von Genotyp unverändert. Somit kann der von Boldogh et al. postulierte Mechanismus auch für die TGF β -vermittelte Induktion von *FN1* ausgeschlossen werden.

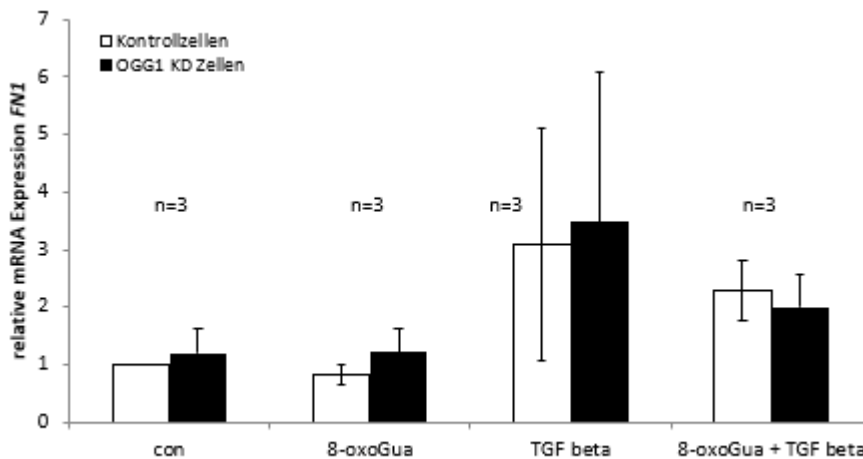


Abb. 3.27 Einfluss von 8-oxoGua auf die Expression von *FN1* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *FN1* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1 KD-Zellen nach der Behandlung mit TGF β (4 ng/ml, 4 h) unter Zugabe mit 8-oxoGua mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Zellen wurden für 1 h mit 1 μ M 8-oxoGua bei 37°C vorbehandelt. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontrollprobe. MW \pm SD.

4.3.4.6 Einfluss der MAP-Kinasen auf die Expression von *FN1*

Die Ergebnisse bezüglich einer Beteiligung der MAP-Kinasen an der TGF β -vermittelten Induktion von *p21* zeigten einen Einfluss von p38 und einen möglichen Effekt von JNK speziell auf die OGG1 (und LSD1-) vermittelte Supprimierung (vgl. 4.3.3.6).

Da sich der molekulare Mechanismus zum Umbau der zellulären Architektur aber von dem zur Induktion des G1-Arrestes deutlich unterscheidet, stellt sich auch für *FN1* die Frage nach einer möglichen Beteiligung der MAP-Kinasen an der OGG1-abhängigen oder -unabhängigen Genregulation.

Um den Einfluss der MAP-Kinasen auf die TGF β -vermittelte Induktion von *FN1* untersuchen zu können, wurden beide Zelllinien zunächst mit dem jeweiligen MAP-Kinase Inhibitor vorinkubiert.

Wie in Abb. 3.28 dargestellt, führt die Anwesenheit eines p38-Inhibitors in beiden Zelllinien zu einer – statistisch allerdings nicht signifikanten – Hemmung der TGF β -vermittelten *FN1* Induktion.

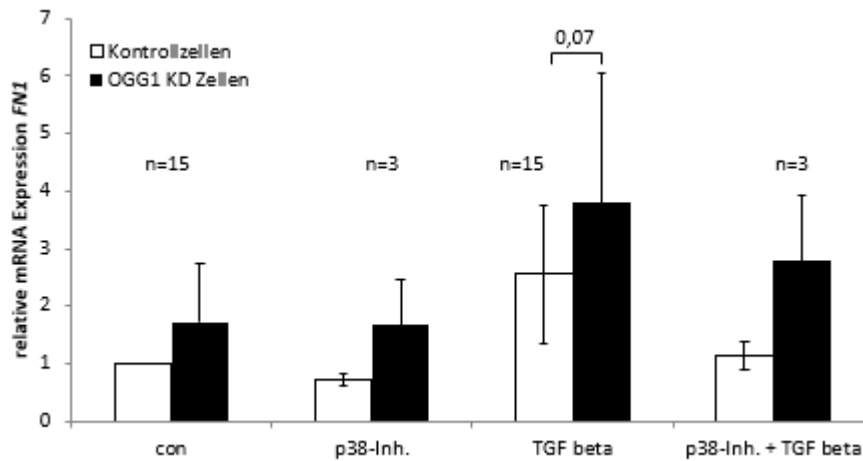


Abb. 3.28 Einfluss von PD169316 (p38-Inhibitor) auf die Expression von *FN1* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *FN1* über der Expression von TBP in HaCaT-Zellen nach der Behandlung mit TGF β (4 ng/ml) für 4 h unter Hemmung von p38 mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Zellen wurden für 1 h mit 10 μ M PD169316 bei 37°C vorbehandelt. Die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen und der 4 h-Werte wurden über alle durchgeführten Experimente gemittelt. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontrollprobe. 0,05 % DMSO unter allen Bedingungen. Die Ergebnisse der direkten Vergleichsbestimmung sind in Anhang IV dargestellt. MW \pm SD.

Die Ergebnisse mit dem JNK-Inhibitor zeigen dagegen einen OGG1-abhängigen hemmenden Einfluss auf die Expression von *FN1* (vgl. Abb. 3.29). In den OGG1-defizienten Zellen ist kein signifikanter Einfluss der JNK-Inhibierung zu beobachten.

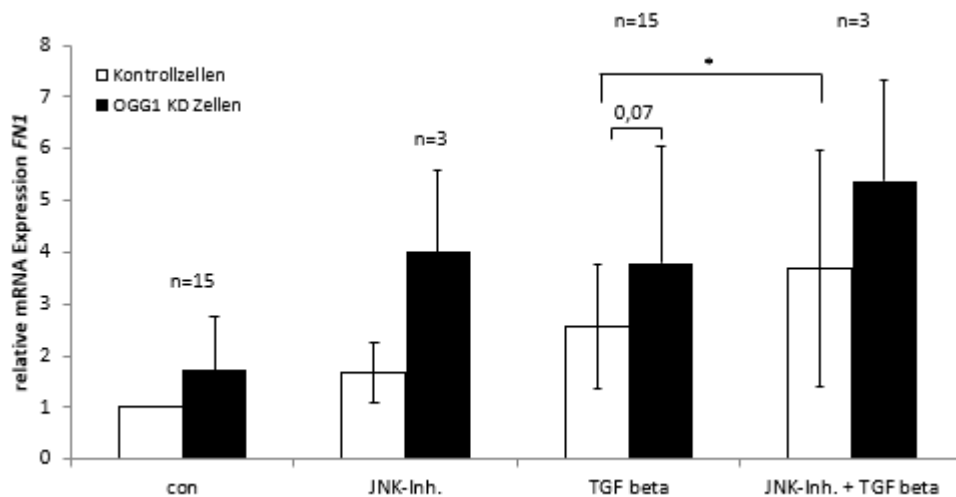


Abb. 3.29 Einfluss der SP600125 (JNK-Inhibitor) auf die Expression von *FN1* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *FN1* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1-defizienten Zellen nach Behandlung mit 4 ng/ml TGF β für 4 h unter Inhibierung der JNK mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Zellen wurden für 1 h mit 30 μ M SP600125 bei 37°C vorinkubiert. Die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen und der 4 h-Werte wurden über alle durchgeführten Experimente gemittelt. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontrollprobe. 0,05 % DMSO unter allen Bedingungen. Die Ergebnisse der direkten Vergleichsbestimmung sind in Anhang IV dargestellt. MW \pm SD.

Die in Abb. 3.30 dargestellten Resultate mit dem ERK-Inhibitor lassen keinen signifikanten Einfluss auf die Induktion von *FN1* erkennen.

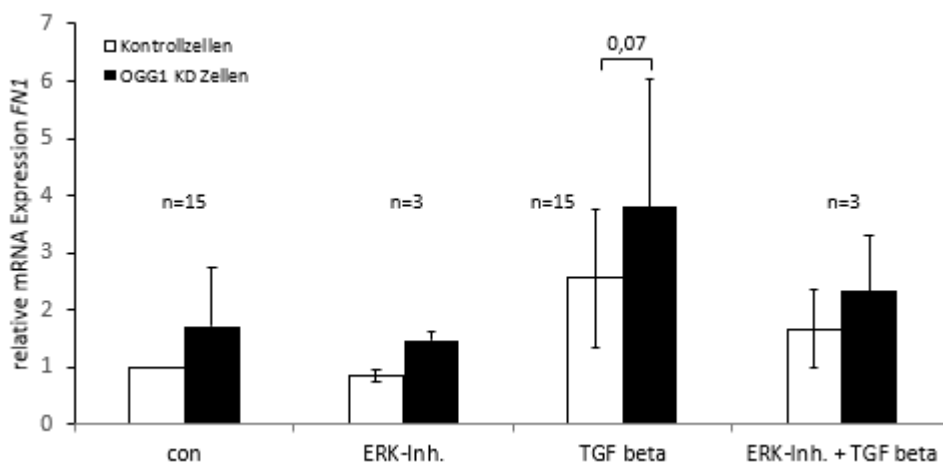


Abb. 3.30 Einfluss von U-0126 (ERK-Inhibitor) auf die Expression von *FN1* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *FN1* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1 KD-Zellen nach der Behandlung mit TGF β unter Hemmung von ERK1/2 mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Zellen wurden für 1 h mit 10 μ M U-0126 bei 37°C vorbehandelt. Die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollen und der 4 h-Werte wurden über alle durchgeführten Experimente gemittelt. Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontrollprobe. 0,05 % DMSO unter allen Bedingungen. Die Ergebnisse der direkten Vergleichsbestimmung sind in Anhang IV dargestellt. MW \pm SD.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass p38, wie für *p21* bereits beobachtet, einen aktivierenden, aber OGG1-unabhängigen Einfluss auf die Induktion von *FN1* hat. Es handelt sich also um einen genunabhängigen Einfluss der genannten MAP-Kinase. Eine Beteiligung der JNK an der Induktion von *FN1* ist nicht genau zu beurteilen. ERK1/2 ist an der TGF β -vermittelten Induktion von *FN1* nicht beteiligt.

4.3.4.7 Einfluss von NF κ B auf die Expression von *FN1*

Um den Einfluss des genannten Transkriptionsfaktors auf die Expression von *FN1* zu testen, wurden beide Zelllinien mit 10 μ M PDTC vorinkubiert.

Die Resultate in Abb. 3.31 zeigen weder in den unbehandelten Zellen noch in den mit TGF β induzierten Zellen einen signifikanten Einfluss des Inhibitors. Dies gilt sowohl für die Kontroll- als auch für die OGG1 KD-Zellen. Zudem scheint die Verwendung von Ethanol als Lösungsmittel für den Inhibitor eine Angleichung der Expressionsunterschiede in den unbehandelten Zellen und in den Positivkontrollen zu verursachen.

Somit ist eine Beteiligung von NF κ B an der Induktion von *FN1* unter den gewählten Bedingungen nicht nachweisbar.

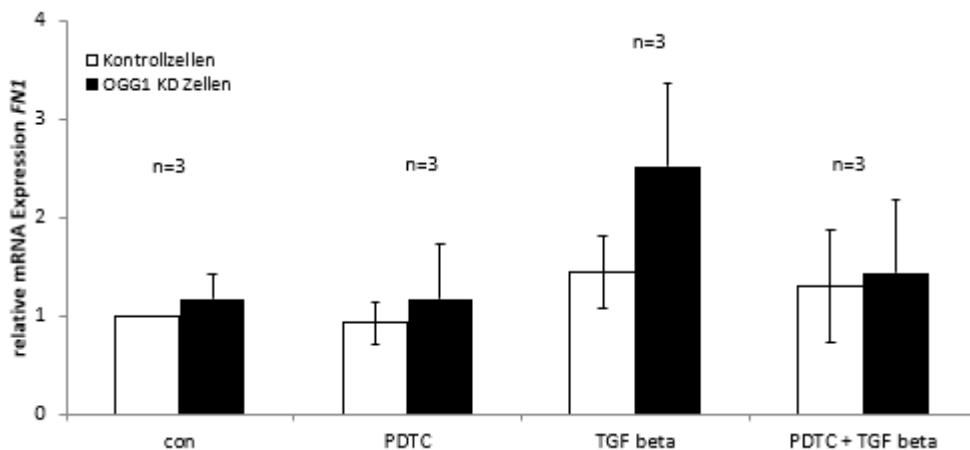


Abb. 3.31 Einfluss von Ammonium Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC) (NF κ B-Inhibitor) auf die Expression von *FN1* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *FN1* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1-defizienten Zellen nach der Behandlung mit 4 ng/ml TGF β für 4 h unter Hemmung von NF κ B mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). Die Zellen wurden für 1 h mit 10 μ M PDTC bei 37°C vorbehandelt. Die Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontrollprobe. MW \pm SD. (n=3).

5 Diskussion

Bis vor wenigen Jahren wurde der DNA-Glykosylase OGG1 lediglich eine Funktion im Erkennen und Entfernen von modifizierten DNA-Basen zugeschrieben. Inzwischen gibt es mehrere Publikationen, die eine Beteiligung der Reparaturglykosylase an der Transkriptionsinitiation zeigen (Perillo et al., 2008)(Amente et al., 2010)(Boldogh et al., 2012).

Um die Beteiligung der Glykosylase OGG1 auf die mit dem Prozess der EMT verbundene Transkription untersuchen zu können, wurden eine HaCaT-Zelllinie mit einem stabilen OGG1-Knockdown als Modellsystem etabliert. Die Stärke des Knockdowns wurde sowohl immunhistochemisch, als auch funktional bestätigt (vgl. Abb. 3.1 und 3.2). In diesem Zellsystem wurde der Prozess der EMT durch die Behandlung mit dem Zytokin TGF β induziert.

Um den Erfolg der TGF β -Behandlung bzw. den Einfluss von Inhibitoren analysieren zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei unabhängige Endpunkte gewählt. Zum einen wurde der TGF β -vermittelte Zellzyklusarrest untersucht. Für letzteren Endpunkt wurde die Expressionsänderung des Gens *p21* und die TGF β -induzierte Änderung der Proliferation bzw. der Zellzyklusverteilung analysiert. Zum anderen wurde der Umbau der ECM betrachtet, dies geschah durch die Induktionsanalyse des Markergens *FN1*.

5.1 OGG1 hat einen Einfluss auf die durch TGF β -induzierten morphologischen Veränderungen

Wie in Kapitel 1.6 dargestellt, handelt es sich bei der EMT um einen komplexen biologischen Prozess, der mit einer umfassenden Veränderung der zellulären Architektur verbunden ist, um den Zellen migratorische Eigenschaften zu verleihen. In einem ersten Versuch wurde der durch TGF β ausgelöste Umbau der zellulären Architektur mikroskopisch beurteilt. Der Vergleich zwischen Kontroll- und OGG1-defizienten Zellen erlaubte eine Abschätzung des Einflusses von OGG1.

Die Ergebnisse zeigen, dass HaCaT-Zellen den charakteristischen durch TGF β induzierten morphologischen Umbauprozess durchlaufen können (vgl. Abb. 3.3). Zudem zeigt ein Vergleich der beiden Zelllinien miteinander, dass OGG1 einen positiven Einfluss auf den Prozess der EMT zu haben scheint. Das bedeutet, dass sie in der Lage ist, die Veränderung

der zellulären Architektur zu verstärken. Allerdings geben die Resultate nur einen qualitativen Hinweis auf einen Effekt von OGG1. Zumindest was die Fähigkeit von HaCaT-Zellen zum Durchlaufen der EMT betrifft, decken sich die Beobachtungen mit denen von Nicholas und Hill (2003). Allerdings existieren bisher keine Publikationen, die den Einfluss von OGG1 auf EMT thematisieren.

5.2 TGF β und OGG1 beeinflussen den Zellzyklus

Die Resultate der morphologischen Analyse lassen eine Beteiligung der Reparaturglykosylase OGG1 am Prozess der EMT vermuten (vgl. 4.2).

Zu den Schlüsselprozessen der EMT gehören zum einen die Induktion eines Zellzyklusarrestes in der G1-Phase und zum anderen die Umgestaltung der ECM als Voraussetzung zum Erlangen von migratorischen Eigenschaften.

Um den Einfluss der Reparaturglykosylase OGG1 auf den Zellzyklusarrest charakterisieren zu können, wurden mehrere Assays durchgeführt. In einem ersten Experiment wurde der Einfluss von TGF β und OGG1 auf die Zellproliferation untersucht. Die Resultate des Proliferationsassays (vgl. Abb. 3.4) zeigen, dass OGG1 und TGF β die Proliferation negativ beeinflussen. Zumindest was den Einfluss des Zytokins anbelangt, decken sich die Ergebnisse sehr gut mit denen von Nicolas und Hill (2003) bzw. Kim et al. (2017), die die Induktion eines Zellzyklusarrestes in HaCaT-Zellen durch TGF β zeigen.

Um den negativen Einfluss der Zytokinbehandlung genauer zu analysieren, wurde die Veränderung der Zellzyklusverteilung in Abhängigkeit von TGF β bestimmt (vgl. Abb. 3.5). Die durchflusszytometrische Auswertung zeigt, dass der von Nicolas und Hill beschriebene G1-Arrest nach etwa 24 Stunden TGF β -Behandlung auftritt (Nicolas und Hill, 2003). Zu diesem Zeitpunkt befinden sich mehr als 70% der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus. Diese Beobachtung ist allerdings unabhängig vom Genotyp der Zellen.

Diese Ergebnisse werden, was den Zeitpunkt und die prozentuale Verteilung auf die Zellzyklusphasen betrifft, durch die Publikationen von Kim et al. (2017) und von Nicolas und Hill (2003) gestützt, die ebenfalls mit HaCaT-Zellen gearbeitet haben. Erstaunlich ist allerdings, dass der Einfluss des Genotyps nicht so offensichtlich ist wie aufgrund der mikroskopischen Aufnahmen zu erwarten war.

5.2.1 OGG1 beeinflusst die Expression von *p21* negativ

Wichtigstes Ziel der vorliegenden Arbeit war es aber, den Einfluss der Reparaturglykosylase OGG1 auf die Transkription zu untersuchen. Als Markergen für den TGF β -induzierten Zellzyklusarrest wurde *p21* ausgewählt. Als Markergen für den TFG β -induzierten Zellzyklusarrest wurde *p21* beschrieben (Moustakas et al., 2002). Daher wurde im nächsten Schritt der Einfluss von OGG1 auf die Expression dieses Gens untersucht. Die Ergebnisse (vgl. Abb. 3.6) zeigen einerseits eine zeitabhängige Induktion von *p21* und andererseits einen negativen Einfluss von OGG1. Somit bestätigen dieses Resultat die mikroskopischen Beobachtungen. Diese Beobachtung ist überraschend, da zum ersten Mal ein negativer Einfluss der Reparaturglykosylase OGG1 auf die Transkription gezeigt wurde. In allen bisher publizierten Mechanismen zur Rolle von OGG1 an der Transkription kommt OGG1 eine aktivierende Rolle zu.

Die Ergebnisse zur Konzentrationsabhängigkeit (vgl. Abb. 3.7) zeigen, dass der negative Einfluss der Reparaturglykosylase OGG1 unabhängig von der eingesetzten TGF β -Konzentration ist. Somit ist es möglich, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ungeachtet der verwendeten Konzentration mit den Resultaten anderer Forschungsgruppen zu vergleichen.

5.2.2 TGF β induziert ROS und induziert dadurch sequenzspezifisch oxidative DNA-Modifikationen

Die bisherigen Ergebnisse zeigen eine Beteiligung von OGG1 an der TGF β -induzierten Genexpression. Es stellte sich aber die Frage nach dem zugrundeliegenden Mechanismus. In der Literatur gibt es mehrere postulierte Mechanismen zur Rolle der Reparaturglykosylase an der Transkriptionsinitiation. Gemeinsam ist allen, dass sie oxidative DNA-Modifikationen als Ausgangspunkt für mechanistische Erklärungsversuche nutzen.

Als Ursache für oxidative DNA-Modifikationen gelten in erster Linie ROS. In der Literatur finden sich Belege, dass TGF β in der Lage ist, ROS in Zellen zu generieren (Kim et al., 2006)(Kim et al., 2017)(Ishikawa et al., 2014). Es wurde deshalb mittels alkalischer Elution untersucht, ob die Behandlung mit TGF β zu einer Entstehung von Einzelstrangbrüchen bzw. oxidativer DNA-Basenmodifikationen führt.

Die Resultate (vgl. Abb. 3.8) zeigen, dass eine Behandlung mit 4 ng/ml TGF β in den HaCaT-Zellen innerhalb der Messgenauigkeit keine Strangbrüche und Fpg-sensitive Läsionen induziert.

Dieses Ergebnis erscheint wegen des berichteten Anstiegs der ROS-Level nach TGF β -Behandlung überraschend (Kim et al., 2006)(Kim et al., 2017). Allerdings ist in den genannten Publikationen ein ROS-Maximum eine Stunde nach der Behandlung beschrieben. In den Versuchen zeigt sich, dass sich die Spiegel Fpg-sensitiver Läsionen nach 8-stündiger TGF β -Inkubation kaum von den basalen Spiegeln unterscheiden. Das Ergebnis deckt sich zudem mit Beobachtungen zum Einfluss von TNF α auf die Induktion von oxidativen DNA-Modifikationen in HeLa-Zellen. Im Falle des Inflammationsmodells konnten unter Verwendung des gleichen Assays keine nennenswerten oxidativen DNA-Läsionen in der Gesamt-DNA nachweisen gewiesen. Es gibt aber Hinweise auf eine Induktion von oxidativen Basenmodifikationen in der Promotorregion von *IL-6* (Seifermann, 2017). Es ist vorstellbar, dass eventuell transient induzierte DNA-Schäden zum Beobachtungszeitpunkt (nach 8 h) bereits wieder repariert sind. Da mit einer Alkalischen Elution die durchschnittliche Anzahl von Fpg-sensitiven Läsionen in der Gesamt-DNA gemessen wird, kann eine sequenzspezifische Induktion von 8-oxoG nicht ausgeschlossen werden. Eine Analyse der exakten Induktionsstellen könnte mit einer 8-oxoG-Seq erfolgen (Clark et al., 2011). Deren Ergebnisse in einem nächsten Schritt mit dem Humangenom abgeglichen werden können, um positionsgenau die Lage der Induktionsstellen (z.B. Promotor- oder regulatorische Sequenzen) zu bestimmen.

Um eine mögliche DNA-schädigende Wirkung durch TGF β zu erhöhen, wurde in den Zellen Glutathion depletiert. Glutathion zusammen mit Glutathionperoxidase stellt neben Katalase das wichtigste Detoxifizierungssystem für H₂O₂ in Zellen dar (Gaetani et al., 1989). Eine Glutathiondepletion sollte sich also positiv auf die intrazellulären ROS-Level auswirken und dementsprechend die Anzahl von DNA-Strangbrüchen und oxidativ gebildeter DNA-Basenmodifikationen (Fpg-sensitive Läsionen), die durch TGF β induziert werden, erhöhen. Die Ergebnisse spiegeln dies allerdings nicht wider. Trotz der Glutathiondepletion bleibt die Anzahl von Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen und Strangbrüchen jedoch nahezu unverändert (vgl. Abb. 3.9). Dies spricht dafür, dass oxidative DNA-Modifikationen nur in geringem Ausmaß induziert werden, um ein Signaling zu initiieren und/oder die DNA des Zellkerns nicht in nachweisbarem Maße erreichen. Bemerkenswerterweise zeigen Zhang et

al. (2010), dass sogar die Behandlung mit H_2O_2 und TGF β keinen Einfluss auf eine EMT hat. Zur Wirkung von BSO auf eine EMT konnten Herrera et al. (2001) zeigen, dass sich eine Behandlung mit BSO positiv auf die Induktion von Apoptose in fetalen Hepatozyten auswirkt. Im Gegensatz dazu, zeigen Ishikawa et al. (2014), dass eine Behandlung mit dem ROS-Fänger NAC ohne Einfluss auf die Genexpression bleibt. Allerdings konnte die Gruppe zeigen, dass sich die enzymatische Hemmung der SOD auf die Genexpression auswirkt. Dies lässt einen Einfluss des ROS-Typs vermuten.

Die weiteren Ergebnisse (vgl. Abb. 3.10) zeigen, dass die Behandlung mit dem ROS-Fänger NAC ohne Einfluss auf die Induktion von *p21* bleibt. Dies erscheint vor dem Hintergrund des in der Literatur beschriebenen Einflusses von ROS als unerwartet (Zhang et al., 2010), deckt sich aber mit den Daten von Kim et al. (2006), die für NAC kaum einen Einfluss auf die Expression von *p21* fanden.

Für eine BSO-Behandlung im TGF β -vermittelte Signaling von *p21* gibt es bisher keine publizierten Daten. Aber vor dem Hintergrund, dass sich eine Verminderung von ROS nicht auswirkt, erscheint eine ausbleibende Wirkung einer ROS-Erhöhung nicht überraschend (vgl. Abb. 3.11). Zumal von Zhang et al. (2005) gezeigt wurde, dass eine Co-Behandlung von Zellen mit TGF β und H_2O_2 ohne Einfluss auf die Expression von Markergenen bleibt. Zudem bleibt Katalase in den Zellen von der Glutathiondepletion unbeeinflusst und könnte somit das Fehlen des anderen ROS-Detoxifizierungssystems ausgleichen. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse von Ishikawa et al. (2014), dass ein Abfangen von ROS keine Wirkung hat, aber die enzymatische Inhibierung der SOD einen deutlichen Einfluss auf die Genexpression hat.

Chiu et al. (2001) zeigen, dass die Behandlung mit dem als NF- κ B-Inhibitor wirkenden Antioxidans PDTC eine Phosphorylierung von p38 verhindert, die Aktivierung von SMAD2 aber unbeeinflusst stattfindet. Daraus kann geschlossen werden, dass ROS am SMAD-Signaling nicht beteiligt sind, aber Einfluss auf die modulierenden, SMAD-unabhängigen Wege nehmen.

In einem weiteren Versuch wurde der Frage nachgegangen, ob die ROS-Quellen NOX4, wie in der Literatur diskutiert, an der Induktion von *p21* Expression nach TGF β beteiligt ist (Carmona-Cuenca et al., 2008). Nach der Enzymhemmung mit einem neuartigen Hemmstoff, GKT137831, zeigt sich allerdings kein Einfluss (vgl. Abb. 3.12). Insgesamt zeigt sich die Datenlage bezüglich einer Beteiligung von NOX4 an der TGF β -vermittelten

Signaltransduktion uneinheitlich. Zum einen wurde gezeigt, dass sich die Hemmung von NOX4 negativ auf die TGF β -induzierte Apoptose auswirkt (Sancho und Fabregat, 2011). Zum anderen ist ein positiver Einfluss von NOX4 auf die Expression von *FN1* publiziert (Boudreau et al., 2012).

Die Ergebnisse in Abb. 3.12 zeigen aber weiterhin, dass sich das Lösungsmittel DMSO, obwohl es nur in geringer Konzentration in den Proben vorhanden war, sich auf die Expression von *p21* auswirkt. Der zuvor beschriebene hoch signifikante Unterschied zwischen den beiden Zelllinien im unbehandelten Zustand bzw. nach vierstündiger TGF β -Behandlung wird angeglichen. Im Falle von *p21* ist dieser Effekt tolerabel, da der Unterschied weiterhin signifikant vorhanden ist. Unerwartet ist der Effekt von DMSO allerdings nicht, da ein Einfluss des Lösungsmittels auf die Genexpression publiziert ist (Pal et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit war die Verwendung von DMSO als Lösungsmittel unumgänglich, da einige Inhibitoren nur in DMSO zu lösen und keine alternativen Hemmstoffe vorhanden sind.

5.2.3 LSD1 beeinflusst die Expression von *p21* in Abhängigkeit von OGG1

Wie in Kapitel 1.5 dargestellt, ist eine Rolle von OGG1 an der Transkription im Zusammenhang mit der Histondemethylierung durch LSD1 beschrieben. Zudem ist bekannt, dass LSD1 als Bestandteil des CoREST-Komplexes die Expression von E-Cadherin (ECAD) nach TGF β -Behandlung negativ beeinflusst. Darüber hinaus beschreiben Thillainadesan et al. (2012), dass die Histondemethylase an der Inhibierung von *p15* beteiligt ist. Um die Rolle von LSD1 untersuchen zu können, wurde das Enzym gehemmt und die Auswirkungen auf die Expression von *p21* untersucht.

Die Ergebnisse mit zwei unterschiedlichen Inhibitoren zeigen, dass der Expressionslevel in den Kontrollzellen nach Enzymhemmung steigt, wohingegen er in den OGG1 KD-Zellen unverändert bleibt (vgl. Abb. 3.13 und 3.14). Das bedeutet, dass die Hemmung des Enzyms dieselbe Wirkung wie eine OGG1-Defizienz hat und sich in Abwesenheit von OGG1 nicht weiter auswirkt. Daraus wird gefolgert, dass OGG1 und LSD1 in einem gemeinsamen Signalweg wirksam sind und diesen einen negativen Einfluss auf die Expression von *p21* hat. Damit zeigt sich deutlich, dass ein die Genexpression stimulierender LSD1-abhängiger Mechanismus, wie von Perillo und Amente et al. postuliert, hier gerade nicht beobachtet wird, sondern ein gegenteiliger Effekt.

Die Beobachtungen können bedeuten, dass LSD1 als Bestandteil des CoRest-Komplexes zusammen mit OGG1 an einer Transkriptionshemmung beteiligt ist. Thillainadesan et al. postulieren, dass ohne TGF β -Stimulierung das Gen *p15* durch einen Komplex aus CoRest, DNMT3A und ZNF217 in einem inaktiven Zustand gehalten wird. Nach Ligandenbindung und SMAD-Signaling werden die genannten Komplexe vom Promotor gelöst und dieser durch TDG demethyliert, um die Transkription zu ermöglichen.

Ein ähnlicher Mechanismus könnte auch für *p21* angenommen werden, zumal es sich bei beiden Genen um Zellzyklusgene handelt, die durch c-Myc und TGF β reguliert werden. Darüber hinaus weist der Promotor von *p21* GC-reiche Sequenzen, beispielsweise in der SMAD4-Binderegion, auf (Koinuma et al., 2011).

In den Kontrollzellen wirkt sich die LSD1-Hemmung positiv auf die Expression von *p21* aus, da die beschriebene Hemmung durch den CoREST-Komplex entfällt. Eine verlockende Erklärung wäre, dass die Transkription des Gens durch oxidative DNA-Läsionen behindert wird, die lokal induziert anschließend durch BER-Proteine wie OGG1 erkannt werden. Die z.T. sperrigen BER-Komplexe versperren der RNA-Polymerase den Weg und hemmen so die Transkription.

In den OGG1-defizienten Zellen wirkt sich die LSD1-Hemmung nicht aus, da die sperrigen BER-Komplexe nicht rekrutiert werden können.

5.2.4 Die freie Base 8-oxoGua und OGG1 beeinflussen die Expression von *p21* nicht

Nachdem der expressionssteigernde Mechanismus von Perillo und Amente et al. durch die Ergebnisse mit den LSD1-Inhibitoren widerlegt ist, stellt sich die Frage, ob ein Mechanismus über die Beeinflussung kleiner GTPasen durch cytosolisches 8-oxoGua wie von Boldogh et al. (2012) beschrieben, die Ergebnisse für *p21* erklären kann.

Die Ergebnisse (vgl. Abb. 3.15) zeigen allerdings, dass die Zugabe von 8-oxoGua in das Medium keinen Einfluss auf die Expression von *p21* hat. Somit erscheint ein Mechanismus, wie von Boldogh et al. publiziert, als unwahrscheinlich. Zudem müsste eine Stimulation der kleinen GTPasen durch 8-oxoGua im Falle von *p21* inhibitorisch wirken, also umgekehrt wie von Boldogh et al. für proinflammatorische Zytokine beobachtet. Darüber hinaus erscheint eine Beteiligung von kleinen GTPasen für die Induktion von *p21* als unwahrscheinlich, da

ihnen eher eine Beteiligung am Remodelling des Zytoskeletts zugeschrieben wird (Zavadil et al., 2005).

Der durchgeführte Versuch weist allerdings den Schwachpunkt auf, dass die Aufnahme des zugesetzten 8-oxoGua durch die HaCaT-Zellen nicht verifiziert werden konnte. Somit kann nicht zweifelsfrei von einer Aufnahme der Base 8-oxoGua ausgegangen werden.

5.2.5 Die MAP-Kinasen p38 und JNK modulieren die TGF β -vermittelte Expression von p21

Für die Induktion von *p21* spielen die SMAD-Transkriptionsfaktoren eine zentrale Rolle. Allerdings benötigen diese zusätzliche akzessorische Transkriptionsfaktoren, da ihre Affinität und Bindungsstärke an die DNA gering ist (Shi et al., 1998). In Publikationen wird FOXO1/3/4 eine solche Rolle zugesprochen. Eine wichtige Rolle bei der Modulation der TGF β vermittelten Transkription kommt auch den MAP-Kinasen zu (Moustakas und Heldin, 2005). Zudem sind sie in der Lage, mit AP1 einen weiteren wichtigen Transkriptionsfaktor zu aktivieren, der eine Rolle im Signaling einnehmen könnte.

Um die Frage nach einer Beteiligung der MAP-Kinasen an der Induktion von *p21* zu beantworten, wurde die Aktivität der drei MAP-Kinasen durch Hemmstoffe unterbunden.

Die Resultate für die MAP-Kinase p38 zeigen, dass sie die TGF β vermittelte Induktion von *p21* unabhängig von der Anwesenheit von OGG1 positiv beeinflussen kann (vgl. Abb. 3.16).

Die Ergebnisse für die JNK zeigen hingegen einen inhibierenden Effekt der genannten MAP-Kinase auf die Expression von *p21* in den OGG1-defizienten Zellen (vgl. Abb. 3.17). Beide Ergebnisse decken sich zwar nicht mit denen von Kim et al. (2006), die für eine Hemmung von p38 keinen Einfluss auf die Expression von *p21* gezeigt haben. Allerdings wurden die Expression erst nach 24 h TGF β analysiert. Es ist also möglich, dass der beobachtete Effekt für die MAP-Kinase p38 der kürzeren Behandlungsdauer geschuldet ist.

Eine enzymatische Hemmung von ERK1/2 bleibt in der vorliegenden Arbeit ohne Einfluss auf die Expression von *p21*. Dies ist im Einklang mit dem Ergebnis von Zavadil et al. 2001. Die Autoren zeigten ebenfalls, dass eine ERK-Inhibierung mit U-0126 ohne Folgen auf den Zellzyklus in proliferierenden HaCaT-Zellen ist.

Die Ergebnisse von Kim et al. (2006) für die MAP-Kinase ERK1/2 widersprechen allerdings denen von Zavadil et al. Darüber hinaus lassen Kim et al. (2006) die Ergebnisse von Zavadil

unkommentiert. Überraschenderweise haben beide Forscher ihre Versuche in HaCaT-Zellen durchgeführt und den gleichen Inhibitor verwendet.

Ein wichtiger Transkriptionsfaktor, dessen Bindung durch den Redoxstatus von Zellen beeinflusst werden kann, ist NFκB. Für proinflammatorische Gene ist eine Beteiligung dieses Transkriptionsfaktors mehrfach beschrieben (Bekhat et al., 2017). Für das TGFβ-vermittelte Signaling ist eine Beteiligung von NFκB ebenfalls publiziert (Sorrentino et al. 2008)(Adhikari et al., 2007)(Heldin et al., 2009)(Zhang et al., 2013).

Um die Frage nach einer Beteiligung von NFκB an der Induktion von *p21* beantworten zu können, wurde der Transkriptionsfaktor enzymatisch mit PDTC gehemmt.

Die Ergebnisse (vgl. Abb. 3.19) zeigen allerdings keinen signifikanten Einfluss auf die Expression des Zielgens. In der Literatur gibt es bisher keine Information zu einer Beteiligung von NFκB an der Induktion von *p21*.

5.3 Einfluss auf die Veränderung der ECM bzw. des Markergens *FN1*

5.3.1 Die DNA-Glykosylase OGG1 ist ein negativer Regulator der Expression von *FN1*

Die in Kapitel 4.3.4 dargestellten Ergebnisse (vgl. Abb. 3.20 und 3.21) zeigen, dass *FN1* als klassisches Markergen der ECM zeitabhängig, aber konzentrationsunabhängig in den HaCaT-Zellen induziert wird, im Einklang mit früheren Befunden (Ignatz und Massague, 1986). Der Vergleich der Wildtyp- und OGG1 KD-Zellen zeigt wie bei *p21* erstmalig, dass die Reparaturglykosylase auch hier als negativer Regulator an der Expression des Glykoproteins beteiligt ist. Somit könnte OGG1 ein genereller negativer Einflussfaktor bei TGFβ-induzierten Transkription sein.

5.3.2 Eine Beeinflussung von ROS bleibt ohne Folgen auf die Expression von *FN1*

Aufgrund der Bedeutung die ROS in den vorgestellten Hypothesen zukommt, wurde abermals mit NAC und BSO Einfluss auf den ROS-Status der Zellen genommen.

Die Ergebnisse mit NAC (vgl. Abb. 3.20) zeigen, dass die Behandlung ohne Einfluss auf die Expression von *FN1* bleibt. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten von Ishikawa et al. (2014), in denen NAC in NMuMG-Zellen ebenfalls ohne Einfluss auf die Expression von *FN1* bleibt. Allerdings gibt es auch Publikationen, die in MvLu-Zellen einen Einfluss von NAC auf die Expression von *FN1* zeigen (Zhang et al., 2010). Die

unterschiedlichen Befunde könnten dadurch erklärt werden, dass der Zelltyp einen ganz erheblichen Einfluss auf die Expression von Genen bei der EMT hat, wie bereits von Hough et al. (2012) vermutet.

Die Versuche mit einer BSO-Vorbehandlung zur Erhöhung der intrazellulären ROS-Level zeigen, dass die Depletion von Glutathion in den HaCaT-Zellen ebenfalls ohne Einfluss auf die Expression von *FN1* bleibt (vgl. Abb. 3.23). In der Literatur sind bisher keine Untersuchungen zum Einfluss von BSO auf die Expression von *FN1* beschrieben.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss der endogenen ROS-Quelle NOX4 analysiert. Boudreau et al. (2012) beschreiben eine Beteiligung von NOX4 an der Induktion von *FN1*. Die Ergebnisse mit GKT137831 als selektivem NOX4-Inhibitor, zeigen allerdings, dass die Behandlung ohne Einfluss auf die Expression des Glykoproteins bleibt (vgl. Abb. 3.24).

Da Boudreau et al. ihre Untersuchungen in Brustkrebszellen gemacht haben, könnte wiederum der Zelltyp für das unterschiedliche Ergebnis verantwortlich sein. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass TGF β in normalen Zellen als Tumorsuppressor, aber in Krebszellen als Onkogen wirkt (vgl. 1.6.1). Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse in Abb. 3.24 aber auch, dass DMSO als Lösungsmittel einen deutlichen Einfluss auf die Expression von *FN1* in den unbehandelten Zellen und den Positivkontrollen hat. Der vormals beschriebene Unterschied zwischen den beiden Zelllinien wird fast gänzlich ausgeglichen. Dies hat erhebliche Auswirkungen auf die Interpretation der Daten, da eine Auswertung auf einer solchen Grundlage kaum möglich ist. Die Gründe für den Einfluss von DMSO wurde bereits für *p21* diskutiert (vgl. 5.2.2).

5.3.3 Die Hemmung der Histondemethylase LSD1 hat keine Folgen für die Expression von *FN1*

Für *p21* konnte eine OGG1-abhängige Rolle der Histondemethylase LSD1 auf die Expression gezeigt werden. Es stellt sich die Frage, ob es sich bei dem für *p21* beobachteten Einfluss von LSD1 um eine genspezifische Beobachtung handelt. Die Ergebnisse mit zwei LSD1-Inhibitoren zeigen, im Gegensatz zu den Resultaten für *p21*, dass die Hemmung der Histondemethylase ohne Einfluss auf die Expression von *FN1* bleibt (vgl. Abb. 3.25 und 3.26).

Aufgrund der Resultate kann ein Mechanismus, wie für *p21* vermutet, ausgeschlossen werden. Auch die Hypothesen von Perillo und Amente kommen für *FN1* nicht in Betracht.

5.3.4 Die freie Base 8-oxoGua hat keinen Einfluss auf die Expression von *FN1*

Wie bereits mehrfach erwähnt, ist ein LSD1-unabhängiger Weg für eine Beteiligung von OGG1 an der Genexpression beschrieben (Boldogh et al., 2012). Nachdem für *p21* ein Einfluss von 8-oxoGua ausgeschlossen werden konnte, wurde dessen Einfluss auch für *FN1* überprüft. Die Ergebnisse (vgl. Abb. 3.27) zeigten, dass auch für *FN1* eine Beeinflussung der Induktion durch 8-oxoGua ausgeschlossen werden kann, also ein Mechanismus, wie von Boldogh et al. postuliert, nicht in Frage kommt.

Allerdings bleibt die für *p21* bereits dargestellte Unsicherheit bezüglich der Aufnahme von 8-oxoGua in die Zellen bestehen.

5.3.5 Weder MAP-Kinasen noch NF κ B modulieren die Expression von *FN1*

Wie für *p21* bereits beschrieben, kommt den MAP-Kinasen eine wichtige Rolle als SMAD-Modulator zu. Zudem können sie den Transkriptionsfaktor AP1 aktivieren, der als SMAD-Cofaktor dienen könnte.

Für *FN1* wurde zunächst eine alleinige Induktion über JNK angenommen (Hocevar et al., 1999), aber inzwischen gilt ein Signaling über SMADs als gesichert (Itoh et al., 2003).

Die Ergebnisse für p38 und ERK (vgl. 3.28 und 3.30) zeigen keinen Einfluss. Bei Verwendung des JNK-Inhibitors konnte nachgewiesen werden, dass diese MAP-Kinase einen hemmenden Einfluss auf die Expression in den Kontrollzellen hat (vgl. 3.29). Allerdings stellt sich die Frage nach der Aussagekraft dieser Beobachtung, da DMSO den Unterschied zwischen den beiden Zelllinien nivelliert hat.

Ein Vergleich mit Daten von Rhyu et al. (2012) zeigt, dass die Hemmung von p38 in NRK-52E Zellen mit einer Verringerung der Expression von *FN1* verbunden ist. Allerdings ist der verwendete p38-Inhibitor nicht näher bezeichnet, so dass ein Vergleich mit den Daten aus der genannten Arbeit schwerfällt.

Für JNK ist publiziert, dass sich eine Hemmung negativ auf die Expression von *FN1* auswirken soll (Santibanez, 2006). Auch Hocevar et al. (1999) publizierten ein ähnliches Ergebnis.

Für ERK1/2 konnte kein Einfluss der enzymatischen Hemmung auf die Expression von *FN1* beobachtet werden. Dies erscheint überraschend, da Rhyu et al. (2012) für diese MAP-Kinase einen Einfluss eines anderen MEK-Inhibitors auf die Expression von *FN1* zeigen konnten. Aufgrund der Tatsache, dass dem Zelltyp eine große Bedeutung zukommt und Rhyu et al. andere Zellen und Inhibitoren verwendet haben, können die Daten nur sehr eingeschränkt miteinander verglichen werden.

Eine Behandlung mit dem NFκB-Inhibitor PDTC hat weder in den Kontroll- noch in den OGG1-defizienten Zellen einen Einfluss auf die Expression von *FN1* (vgl. Abb. 3.31).

Für dieses Gen kommt diese Beobachtung unerwartet, da Ishikawa et al. (2014) einen Einfluss von PDTC in murinen Zellen beschrieben haben. Auch Jagadeeshan et al. (2015) beschrieben eine TGFβ-unabhängige Induktion von *FN1* über PAK1. Es stellt sich aber die Frage nach der direkten Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die humane Situation, da, wie bereits mehrfach erwähnt, der Zelltyp eine große Rolle spielt (Hough et al., 2012).

Es stellt sich weiterhin die Frage nach der Wirksamkeit der Inhibierung. Der verwendete Inhibitor PDTC wird bereits seit vielen Jahren als hoch selektiver NFκB-Hemmstoff in *in vivo*-Studien eingesetzt und hat sich als bestens geeignet erwiesen. Auch bei *in vitro*-Studien kommt er erfolgreich zum Einsatz (Ishikawa et al., 2014). Aufgrund dessen wird davon ausgegangen, dass die Hemmung des Transkriptionsfaktors erfolgreich war und er bei der Induktion der beiden Markergene in humanen Keratinozyten keine Rolle spielt.

5.4 Mechanismen

Zusammenfassend kann für das Zellzyklusgen *p21* festgehalten werden, dass ein negativer Einfluss sowohl von OGG1 als auch LSD1 auf die Expression vorliegt. Die beiden Wirkungen sind voneinander abhängig, gehören also zu einem gemeinsamen Regulationsweg. Darüber hinaus zeigt sich ein positiver, aber OGG1-unabhängiger Einfluss der MAP-Kinase p38 und ein schwach hemmender Effekt der JNK in den OGG1 KD-Zellen.

Für *FN1* wurde lediglich ein negativer Einfluss von OGG1 auf die TGFβ-vermittelte Induktion beobachtet.

Aufgrund dieser Ergebnisse ergeben sich zwei mögliche mechanistische Erklärungsansätze für die Rolle von OGG1. Der erste Mechanismus geht davon aus, dass der CoREST-Komplex gemeinsam mit DNMT3A und ZNF217 die Transkription von *p21* in Abwesenheit von TGFβ

durch eine Promotormethylierung stilllegt. Durch die Zugabe von TGF β oder die enzymatische Hemmung von LSD1, einem wichtigen Bestandteil des CoREST-Komplexes, wird die Inhibierung unterbunden und eine Transkription ermöglicht. OGG1 ist also Cofaktor an der LSD1-vermittelten Inhibierung beteiligt. Möglicherweise wird 8-oxoG durch die Behandlung mit dem Zytokin TGF β sequenzspezifisch im Promotor bzw. regulatorischen Regionen induziert. Dadurch wird OGG1 rekrutiert und eine BER initiiert. Die teilweise sperrigen BER-Komplexe könnten das Zusammenlagern des Transkriptionskomplexes erschweren oder das Fortschreiten der RNA-Polymerase unterbinden. Eine Blockade der Transkriptionsinitiation durch Intermediate der BER wurde bereits 2011 von Kitsera et al. beschrieben.

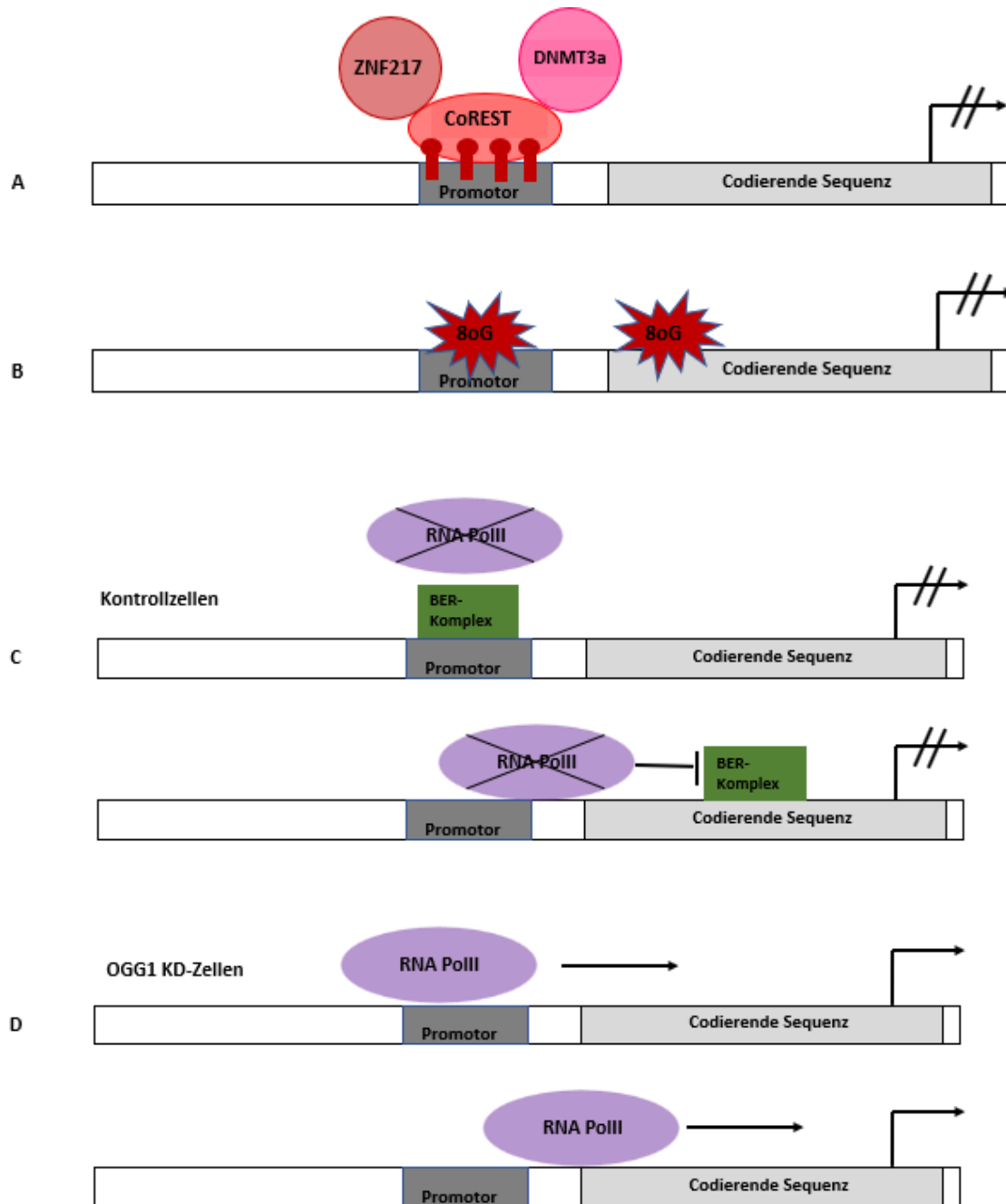


Abb. 5.1 **LSD1 und OGG1 behindern die Initiation bzw. Elongation der Transkription.**

A In Abwesenheit von TGFβ Hemmung des Promotors durch Methylierung von CpG Islands durch einen Komplex aus CoREST, ZNF217 und DNMT3A.

B Nach Zugabe von TGFβ Zerfall des inhibierenden Komplexes und Demethylierung des Promotors durch TDG und/oder MBD4

C Zeitgleich Induktion von oxidativen DNA-Basenmodifikationen. In den Kontrollzellen initiiert OGG1 deren Reparatur. Hemmung der Transkriptionsinitiation bzw. -Elongation durch BER-Intermediate

D In den KD-Zellen findet keine BER statt und die RNA Polymerase II kann ungehindert transkribieren.

In einem alternativen Szenario könnte OGG1 die DNA-Basenmodifikation zwar erkennen und daran binden, aber aufgrund spezieller Gegebenheiten keine sofortige Reparatur einleiten. Die Bindung der DNA-Glykosylase induziert eine Beugung der DNA-Helix um ca. 70°, wodurch diese Stelle markiert wird und Corepressoren an diese Stelle rekrutiert oder Coaktivatoren von einer Bindung an diesen DNA-Abschnitt ferngehalten werden (Bravard et al., 2006)(Bravard et al., 2010)(Wang et al., 2017). Beides würde die Transkription negativ beeinflussen. In den KD-Zellen würde dieser Einfluss entsprechend entfallen. Erst später würde OGG1 wieder in die Lage versetzt, die geschädigte Base zu entfernen und eine BER einzuleiten.

Beide Hypothesen bedürfen der Überprüfung, beispielsweise durch Messung der sequenzspezifischen und zeitabhängigen Induktion von 8-oxoG, eventuell durch eine 8-oxoG Seq (Ding et al., 2017). CHIP-Experimente erscheinen geeignet, um zu ermitteln, welche Cofaktoren an die DNA gebunden haben. Schließlich muss die Rolle der APE1 weiter geprüft werden, ob die enzymatische Aktivität von OGG1 und APE1 während der Transkriptionsregulation durch posttranslationale Modifikationen (z.B. Cystein-Oxidation) verändert ist.

Der Mechanismus der postulierten sequenzspezifischen Bildung von 8-oxoG erscheint weiterhin rätselhaft. Allgemeiner, durch TGFβ-Behandlung induzierter oxidativer Stress scheidet als Ursache weitgehend aus, insbesondere da kein Anstieg des globalen 8-oxoG zu beobachten ist, selbst nach Glutathion-Depletion (vgl. Abb. 3.9). Es ist aber auch schwer vorstellbar, dass die von Perillo et al. (2008) angenommene stöchiometrische Generierung von H₂O₂ durch LSD1 eine ausreichende und gezielte 8-oxoG-Bildung zur Folge haben kann, da H₂O₂ nicht direkt mit der DNA reagiert, sondern nur über eine Fenton-Reaktion zu einer sehr unspezifischen DNA-Schädigung führt. Auch wenn bekannt ist, dass guaninreiche Sequenzen bevorzugt oxidiert werden und eine Oxidationsstelle durch Elektron-Transfer in der DNA verschoben werden kann (Giese, 2002). Andererseits fehlen bisher Belege für eine denkbare direkt Oxidation von Guaninresten durch LSD1 bzw. seinen Cofaktor FAD. Biochemische Modelluntersuchungen, eventuell in zellfreien Systemen, könnten hier vielleicht weitere Hinweise liefern.

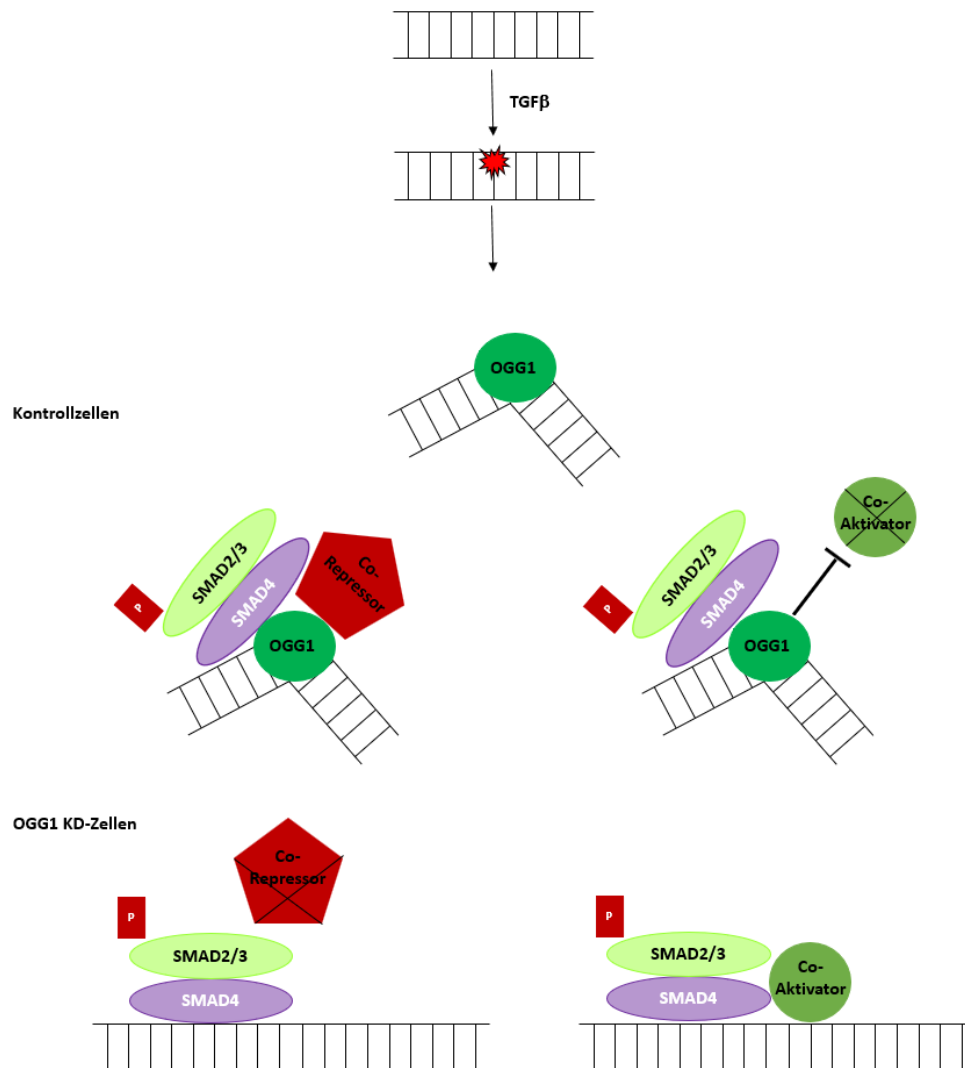


Abb. 5.2 **OGG1 lockt gezielt Co-Repressoren an oder blockt Co-Aktivatoren ab.**

TGFβ induziert oxidative DNA-Läsionen in der DNA. In den Kontrollzellen erkennt die DNA-Glykosylase OGG1 die Läsion kann aber keine sofortige Reparatur einleiten. Durch die Bindung wird die DNA-Helix um ca. 70° gebeugt und dadurch markiert, so dass Corepressoren angelockt bzw. Coaktivatoren abgeblockt werden.

Beides senkt die Transkriptionsrate in den Kontrollzellen.

In den KD-Zellen entfällt aufgrund der Abwesenheit von OGG1 das Anlocken von Corepressoren und Coaktivatoren können ungehindert binden.

6 Zusammenfassung

Eine Epithelial-mesenchymale Transition (EMT) ist ein biologischer Prozess, der *in vitro* durch das Zytokin TGF β ausgelöst werden kann, der den morphologischen und funktionellen Übergang von Epithel- in Mesenchymzellen beschreibt (Transdifferenzierung). Auf molekularer Ebene wird dieser Prozess durch eine umfassende Änderung des genetischen Expressionsprofils begleitet.

In den letzten Jahren mehrten sich Hinweise, die die DNA-Glykosylase OGG1 nicht nur für die Verhinderung von Mutationen, die aus oxidativen DNA-Modifikationen wie 8-oxoG resultieren können, sondern auch an der Transkription bestimmter Gene beteiligt ist. Dabei könnte auch die Histondemethylase LSD1 mitwirken, und zwar als Generator von 8-oxoG in der Promotorregion der betroffenen Gene. Für die EMT ist bisher eine Rolle von LSD1, nicht aber von OGG1 beschrieben.

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss der Reparaturglykosylase OGG1 an der TGF β -induzierten Genexpressionsänderung zu untersuchen. Hierzu wurde der Einfluss des Zytokins auf die Expression von zwei EMT-typischen Markergenen (*p21* und *FN1*) in OGG1-defizienten HaCaT-Zellen bzw. den entsprechenden Kontrollzellen vergleichend untersucht.

Es zeigte sich, dass die DNA-Glykosylase OGG1 einen hemmenden Einfluss auf die Expression beider Markergene ausübt. Ein solcher inhibierender Einfluss der DNA-Glykosylase auf die Transkription wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig beobachtet. Zudem wurde gezeigt, dass die Histondemethylase LSD1 in den Kontrollzellen ebenfalls einen hemmenden Einfluss auf die Transkription von *p21* hat, nicht jedoch in den OGG1-defizienten Zellen.

Mechanistisch bedeutet dies, dass sowohl OGG1 als auch LSD1 einen hemmenden Einfluss auf die Expression von *p21* haben. Grundsätzlich erscheinen zwei Szenarien möglich. LSD1 hemmt als Bestandteil des inhibierenden CoREST-Komplexes in Abwesenheit von TGF β die Transkription. Nach Zugabe von TGF β wird der inhibitorische Komplex von regulatorischen Elementen (z.B. Promotor oder Enhancern) gelöst und die Transkription kann stattfinden. Die DNA-Glykosylase könnte dadurch einen hemmenden Einfluss auf die Transkription ausüben, dass sie (über LSD1 generierte) oxidative DNA-Modifikationen in regulatorischen Regionen erkennt und deren Reparatur induziert. Dabei könnten Intermediate der Basenexzisionsreparatur (AP-Läsionen oder DNA-Strangbrüche) die Initiation oder die Elongation der Transkription negativ beeinflussen. In einem weiteren Szenario ist es möglich,

dass OGG1 die durch TGF β induzierten oxidativen DNA-Läsionen erkennt, eine sofortige weitere Prozessierung unter Verdrängung von OGG1 jedoch ausbleibt. Durch die Bindung der DNA-Glykosylase in der Promotorregion könnten Corepressoren rekrutiert werden, die die Transkription negativ beeinflussen.

An der TGF β -vermittelten Signalübertragung sind bekanntermaßen eine Vielzahl von weiteren Signalwegen, beispielsweise über die MAP-Kinasen, beteiligt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die MAP-Kinase p38 einen aktivierenden Einfluss auf die Induktion von *p21* hat, während die MAP-Kinase JNK hemmend wirkt. Beide Effekte erwiesen sich aber als unabhängig von der Anwesenheit von OGG1, sind also entweder „upstream“ von der vom Zusammenwirken von LSD1 und OGG1 abhängigen Regulation der Transkription oder verlaufen gänzlich unabhängig voneinander.

Die OGG1-abhängige Regulation der Transkription ist nicht mit einer signifikanten Erhöhung der Spiegel an 8-oxoG in der Gesamt-DNA der Zellen verbunden, wie Untersuchungen mit Hilfe der empfindlichen alkalischen Elutionstechnik zeigten. Eine für die Rekrutierung von OGG1 verantwortliche Bildung von 8-oxoG muss also lokal sehr begrenzt und positioniert erfolgen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern somit wichtige Erkenntnisse über die Regulation einer EMT und beschreiben erstmalig die Rolle der DNA-Glykosylase OGG1 in diesem Prozess. Da die EMT auch bei zahlreichen pathophysiologischen Prozessen (z.B. Fibrosen oder Metastasierung von Krebszellen) eine zentrale Rolle spielt, kann das Wissen um die molekulare Steuerung des Prozesses verwendet werden, um therapeutisch gezielter eingreifen zu können.

7 Literaturverzeichnis

Abdollah, S.; Macias-Silva, M.; Tsukazaki, T.; Hayashi, H.; Attisano, L.; Wrana, J. L. (1997): TbetarI phosphorylation of Smad2 on Ser465 and Ser467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (44), S. 27678–27685.

Aburatani, H.; Hippo, Y.; Ishida, T.; Takashima, R.; Matsuba, C.; Kodama, T. et al. (1997): Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue. In: *Cancer research* 57 (11), S. 2151–2156.

Adhikari, A.; Xu, M.; Chen, Z. J. (2007): Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. In: *Oncogene* 26 (22), S. 3214–3226. DOI: 10.1038/sj.onc.1210413.

Allgayer, J.; Kitsera, N.; Lippen, C. von der; Epe, B.; Khobta, A. (2013): Modulation of base excision repair of 8-oxoguanine by the nucleotide sequence. In: *Nucleic acids research* 41 (18), S. 8559–8571. DOI: 10.1093/nar/gkt620.

Allgayer, J.; Kitsera, N.; Bartelt, S.; Epe, B.; Khobta, A. (2016): Widespread transcriptional gene inactivation initiated by a repair intermediate of 8-oxoguanine. In: *Nucleic acids research* 44 (15), S. 7267–7280. DOI: 10.1093/nar/gkw473.

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

Ba, X.; Boldogh, I. (2018): 8-Oxoguanine DNA glycosylase 1: Beyond repair of the oxidatively modified base lesions. In: *Redox biology* 14, S. 669–678. DOI: 10.1016/j.redox.2017.11.008.

Banerjee, A.; Santos, WL.; Verdine, GL. (2006): Structure of a DNA glycosylase searching for lesions. In: *Science (New York, N.Y.)* 311 (5764), S. 1153–1157. DOI: 10.1126/science.1120288.

Batra, VK.; Beard, WA.; Hou, EW.; Pedersen, LC.; Prasad, R.; Wilson, SH. (2010): Mutagenic conformation of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-dGTP in the confines of a DNA polymerase active site. In: *Nature structural & molecular biology* 17 (7), S. 889–890. DOI: 10.1038/nsmb.1852.

Beard, W.A.; Batra, V.K.; Wilson, S.H. (2010): DNA polymerase structure-based insight on the mutagenic properties of 8-oxoguanine. In: *Mutation research* 703 (1), S. 18–23. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2010.07.013.

Bekhbat, Mandakh; Rowson, Sydney A.; Neigh, Gretchen N. (2017): Checks and balances: The glucocorticoid receptor and NFkB in good times and bad. In: *Frontiers in neuroendocrinology* 46, S. 15–31. DOI: 10.1016/j.yfrne.2017.05.001.

Bhowmick, N. A.; Ghiassi, M.; Bakin, A.; Aakre, M.; Lundquist, C. A.; Engel, M. E. et al. (2001): Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. In: *Molecular biology of the cell* 12 (1), S. 27–36.

Bienert, GP.; Schjoerring, JK.; Jahn, TP. (2006): Membrane transport of hydrogen peroxide. In: *Biochimica et biophysica acta* 1758 (8), S. 994–1003. DOI: 10.1016/j.bbamem.2006.02.015.

Bjoras, M.; Luna, L.; Johnsen, B.; Hoff, E.; Haug, T.; Rognes, T.; Seeberg, E. (1997): Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites. In: *The EMBO journal* 16 (20), S. 6314–6322. DOI: 10.1093/emboj/16.20.6314.

Blainey, PC.; van Oijen, AM.; Banerjee, A.; Verdine, GL.; Xie, XS. (2006): A base-excision DNA-repair protein finds intrahelical lesion bases by fast sliding in contact with DNA. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (15), S. 5752–5757. DOI: 10.1073/pnas.0509723103.

Boiteux, S.; Coste, F.; Castaing, B. (2017): Repair of 8-oxo-7,8-dihydroguanine in prokaryotic and eukaryotic cells: Properties and biological roles of the Fpg and OGG1 DNA N-glycosylases. In: *Free radical biology & medicine* 107, S. 179–201. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.042.

Boldogh, I.; Hajas, G.; Aguilera-Aguirre, L.; Hegde, ML.; Radak, Z.; Bacsi, A. et al. (2012): Activation of ras signaling pathway by 8-oxoguanine DNA glycosylase bound to its excision product, 8-oxoguanine. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (25), S. 20769–20773. DOI: 10.1074/jbc.C112.364620.

Boudreau, HE.; Casterline, BW.; Rada, B.; Korzeniowska, A.; Leto, TL. (2012): Nox4 involvement in TGF-beta and SMAD3-driven induction of the epithelial-to-mesenchymal

transition and migration of breast epithelial cells. In: *Free radical biology & medicine* 53 (7), S. 1489–1499. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.016.

Boukamp, P.; Petrussevska, R. T.; Breitkreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A.; Fusenig, N. E. (1988): Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. In: *The Journal of cell biology* 106 (3), S. 761–771.

Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical biochemistry* 72, S. 248–254.

Bravard, A.; Campalans, A.; Vacher, M.; Gouget, B.; Levalois, C.; Chevillard, S.; Radicella, J.P. (2010): Inactivation by oxidation and recruitment into stress granules of hOGG1 but not APE1 in human cells exposed to sub-lethal concentrations of cadmium. In: *Mutation research* 685 (1-2), S. 61–69. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2009.09.013.

Bravard, A.; Vacher, M.; Gouget, B.; Coutant, A.; Boisferon, F.H. de; Marsin, S. et al. (2006): Redox regulation of human OGG1 activity in response to cellular oxidative stress. In: *Molecular and cellular biology* 26 (20), S. 7430–7436. DOI: 10.1128/MCB.00624-06.

Bruce, DL.; Sapkota, GP. (2012): Phosphatases in SMAD regulation. In: *FEBS letters* 586 (14), S. 1897–1905. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.02.001.

Burg, J.M.; Link, J.E.; Morgan, B.S.; Heller, F.J.; Hargrove, A.E.; McCafferty, D.G. (2015): KDM1 class flavin-dependent protein lysine demethylases. In: *Biopolymers* 104 (4), S. 213–246. DOI: 10.1002/bip.22643.

Cadet, J.; Delatour, T.; Douki, T.; Gasparutto, D.; Pouget, J. P.; Ravanat, J. L.; Sauvaigo, S. (1999): Hydroxyl radicals and DNA base damage. In: *Mutation research* 424 (1-2), S. 9–21.

Carmona-Cuenca, I.; Roncero, C.; Sancho, P.; Caja, L.; Fausto, N.; Fernandez, M.; Fabregat, I. (2008): Upregulation of the NADPH oxidase NOX4 by TGF-beta in hepatocytes is required for its pro-apoptotic activity. In: *Journal of hepatology* 49 (6), S. 965–976. DOI: 10.1016/j.jhep.2008.07.021.

Chen, CR; Kang, Y.; Siegel, P.M.; Massague, J. (2002): E2F4/5 and p107 as Smad cofactors linking the TGFbeta receptor to c-myc repression. In: *Cell* 110 (1), S. 19–32.

Chen, X.; Xu, L. (2010): Specific nucleoporin requirement for Smad nuclear translocation. In: *Molecular and cellular biology* 30 (16), S. 4022–4034. DOI: 10.1128/MCB.00124-10.

Chen, Y.; Yang, Y.; Wang, F.; Wan, K.; Yamane, K.; Zhang, Y.; Lei, M. (2006): Crystal structure of human histone lysine-specific demethylase 1 (LSD1). In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (38), S. 13956–13961. DOI: 10.1073/pnas.0606381103.

Chiu, C.; Maddock, D. A.; Zhang, Q.; Souza, K. P.; Townsend, A. R.; Wan, Y. (2001): TGF-beta-induced p38 activation is mediated by Rac1-regulated generation of reactive oxygen species in cultured human keratinocytes. In: *International journal of molecular medicine* 8 (3), S. 251–255.

Christmann, M.; Boisseau, C.; Kitzinger, R.; Berac, C.; Allmann, S.; Sommer, T. et al. (2016): Adaptive upregulation of DNA repair genes following benzo(a)pyrene diol epoxide protects against cell death at the expense of mutations. In: *Nucleic acids research* 44 (22), S. 10727–10743. DOI: 10.1093/nar/gkw873.

Clark, T.A.; Spittle, K.E.; Turner, S.W.; Korch, J. (2011): Direct Detection and Sequencing of Damaged DNA Bases. In: *Genome Integrity* 2, S. 10. DOI: 10.1186/2041-9414-2-10.

Coffey, R. J., JR; Bascom, C. C.; Sipes, N. J.; Graves-Deal, R.; Weissman, B. E.; Moses, H. L. (1988): Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factor beta. In: *Molecular and cellular biology* 8 (8), S. 3088–3093.

Cordenonsi, Michelangelo; Dupont, Sirio; Maretto, Silvia; Insinga, Alessandra; Imbriano, Carol; Piccolo, Stefano (2003): Links between tumor suppressors: p53 is required for TGF-beta gene responses by cooperating with Smads. In: *Cell* 113 (3), S. 301–314.

Da, G.; Lenkart, J.; Zhao, K.; Shiekhattar, R.; Cairns, BR.; Marmorstein, R. (2006): Structure and function of the SWIRM domain, a conserved protein module found in chromatin regulatory complexes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (7), S. 2057–2062. DOI: 10.1073/pnas.0510949103.

Dai, F.; Lin, X.; Chang, C.; Feng, XH. (2009): Nuclear export of Smad2 and Smad3 by RanBP3 facilitates termination of TGF-beta signaling. In: *Developmental cell* 16 (3), S. 345–357. DOI: 10.1016/j.devcel.2009.01.022.

Das, A.; Wiederhold, L.; Leppard, JB.; Kedar, P.; Prasad, R.; Wang, H. et al. (2006): NEIL2-initiated, APE-independent repair of oxidized bases in DNA: Evidence for a repair complex in human cells. In: *DNA repair* 5 (12), S. 1439–1448. DOI: 10.1016/j.dnarep.2006.07.003.

- Datto, M. B.; Li, Y.; Panus, J. F.; Howe, D. J.; Xiong, Y.; Wang, X. F. (1995a): Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (12), S. 5545–5549.
- Datto, M. B.; Yu, Y.; Wang, X. F. (1995b): Functional analysis of the transforming growth factor beta responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (48), S. 28623–28628.
- Descargues, P.; Sil, A.K.; Sano, Y.; Korchynskiy, O.; Han, G.; Owens, P. et al. (2008): IKKalpha is a critical coregulator of a Smad4-independent TGFbeta-Smad2/3 signaling pathway that controls keratinocyte differentiation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (7), S. 2487–2492. DOI: 10.1073/pnas.0712044105.
- Dianov, G.L.; Hubscher, U. (2013): Mammalian base excision repair: the forgotten archangel. In: *Nucleic acids research* 41 (6), S. 3483–3490. DOI: 10.1093/nar/gkt076.
- Dijke, P. ten; Hill, C.S. (2004): New insights into TGF-beta-Smad signalling. In: *Trends in biochemical sciences* 29 (5), S. 265–273. DOI: 10.1016/j.tibs.2004.03.008.
- Ding, Y.; Fleming, A.M.; Burrows, C.J. (2017): Sequencing the Mouse Genome for the Oxidatively Modified Base 8-Oxo-7,8-dihydroguanine by OG-Seq. In: *Journal of the American Chemical Society* 139 (7), S. 2569–2572. DOI: 10.1021/jacs.6b12604.
- Donovan, J.; Slingerland, J. (2000): Transforming growth factor-beta and breast cancer: Cell cycle arrest by transforming growth factor-beta and its disruption in cancer. In: *Breast cancer research : BCR* 2 (2), S. 116–124.
- Eaton, D. L.; Gallagher, E. P. (1994): Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. In: *Annual review of pharmacology and toxicology* 34, S. 135–172. DOI: 10.1146/annurev.pa.34.040194.001031.
- Ebisawa, T.; Fukuchi, M.; Murakami, G.; Chiba, T.; Tanaka, K.; Imamura, T.; Miyazono, K. (2001): Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (16), S. 12477–12480. DOI: 10.1074/jbc.C100008200.
- Edlund, Sofia; Landstrom, Marene; Heldin, Carl-Henrik; Aspenstrom, Pontus (2002): Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires

signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. In: *Molecular biology of the cell* 13 (3), S. 902–914. DOI: 10.1091/mbc.01-08-0398.

Epe, B.; Hegler, J. (1994): Oxidative DNA damage: endonuclease fingerprinting. In: *Methods in enzymology* 234, S. 122–131.

Epe, B. (2002): Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice? In: *Biological chemistry* 383 (3-4), S. 467–475. DOI: 10.1515/BC.2002.049.

Feng, XH.; Derynck, R. (2005): Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. In: *Annual review of cell and developmental biology* 21, S. 659–693. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.21.022404.142018.

Fornieris, F.; Binda, C.; Vanoni, MA.; Mattevi, A.; Battaglioli, E. (2005): Histone demethylation catalysed by LSD1 is a flavin-dependent oxidative process. In: *FEBS letters* 579 (10), S. 2203–2207. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.03.015.

Frey, R. S.; Mulder, K. M. (1997): Involvement of extracellular signal-regulated kinase 2 and stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase activation by transforming growth factor beta in the negative growth control of breast cancer cells. In: *Cancer research* 57 (4), S. 628–633.

Fridovich, I. (1995): Superoxide radical and superoxide dismutases. In: *Annual review of biochemistry* 64, S. 97–112. DOI: 10.1146/annurev.bi.64.070195.000525.

Gaetani, G. F.; Galiano, S.; Canepa, L.; Ferraris, A. M.; Kirkman, H. N. (1989): Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. In: *Blood* 73 (1), S. 334–339.

George, E. L.; Georges-Labouesse, E. N.; Patel-King, R. S.; Rayburn, H.; Hynes, R. O. (1993): Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. In: *Development (Cambridge, England)* 119 (4), S. 1079–1091.

Giese, B. (2002): Electron transfer in DNA. In: *Current opinion in chemical biology* 6 (5), S. 612–618.

Gomis, RR.; Alarcon, C.; He, W.; Wang, Q.; Seoane, J.; Lash, A.; Massague, J. (2006a): A FoxO-Smad synexpression group in human keratinocytes. In: *Proceedings of the National Academy*

of Sciences of the United States of America 103 (34), S. 12747–12752. DOI: 10.1073/pnas.0605333103.

Gomis, Roger R.; Alarcon, Claudio; Nadal, Cristina; van Poznak, Catherine; Massague, Joan (2006b): C/EBPbeta at the core of the TGFbeta cytostatic response and its evasion in metastatic breast cancer cells. In: *Cancer cell* 10 (3), S. 203–214. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.07.019.

Gorowiec, Marta R.; Borthwick, Lee A.; Parker, Sean M.; Kirby, John A.; Saretzki, Gabriele C.; Fisher, Andrew J. (2012): Free radical generation induces epithelial-to-mesenchymal transition in lung epithelium via a TGF-beta1-dependent mechanism. In: *Free radical biology & medicine* 52 (6), S. 1024–1032. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.12.020.

Gotzmann, J.; Mikula, M.; Eger, A.; Schulte-Hermann, R.; Foisner, R.; Beug, H.; Mikulits, W. (2004): Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. In: *Mutation research* 566 (1), S. 9–20.

Grollman, A. P.; Moriya, M. (1993): Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. In: *Trends in genetics : TIG* 9 (7), S. 246–249.

Halliwell, B. (1996): Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. In: *Biochemical Society transactions* 24 (4), S. 1023–1027.

Halliwell, B.; Aruoma, O. I. (1991): DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. In: *FEBS letters* 281 (1-2), S. 9–19.

Halliwell B: Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. In: *Encyclopedia of Life Science* 2005, S. 1–7.

Hartsough, M. T.; Mulder, K. M. (1995): Transforming growth factor beta activation of p44mapk in proliferating cultures of epithelial cells. In: *The Journal of biological chemistry* 270 (13), S. 7117–7124.

Hashiguchi, K.; Stuart, J. A.; Souza-Pinto, N. C. de; Bohr, V. A. (2004): The C-terminal alphaO helix of human Ogg1 is essential for 8-oxoguanine DNA glycosylase activity: the mitochondrial beta-Ogg1 lacks this domain and does not have glycosylase activity. In: *Nucleic acids research* 32 (18), S. 5596–5608. DOI: 10.1093/nar/gkh863.

Hay, E. D. (1995a): An overview of epithelio-mesenchymal transformation. In: *Acta anatomica* 154 (1), S. 8–20.

Hay, E. D.; Zuk, A. (1995b): Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. In: *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 26 (4), S. 678–690.

Hayakawa, H.; Hofer, A.; Thelander, L.; Kitajima, S.; Cai, Y.; Oshiro, S. et al. (1999): Metabolic fate of oxidized guanine ribonucleotides in mammalian cells. In: *Biochemistry* 38 (12), S. 3610–3614. DOI: 10.1021/bi982361l.

Heldin, C. H.; Miyazono, K.; Dijke, P. ten (1997): TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. In: *Nature* 390 (6659), S. 465–471. DOI: 10.1038/37284.

Heldin, CH.; Landstrom, M.; Moustakas, A. (2009): Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. In: *Current opinion in cell biology* 21 (2), S. 166–176. DOI: 10.1016/j.ceb.2009.01.021.

Helfinger, V.; Schroder, K. (2018): Redox control in cancer development and progression. In: *Molecular aspects of medicine*. DOI: 10.1016/j.mam.2018.02.003.

Herrera, B.; Alvarez, A. M.; Sanchez, A.; Fernandez, M.; Roncero, C.; Benito, M.; Fabregat, I. (2001): Reactive oxygen species (ROS) mediates the mitochondrial-dependent apoptosis induced by transforming growth factor (beta) in fetal hepatocytes. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15 (3), S. 741–751. DOI: 10.1096/fj.00-0267com.

Hill, Caroline S. (2009): Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins. In: *Cell research* 19 (1), S. 36–46. DOI: 10.1038/cr.2008.325.

Hill, Caroline S. (2016): Transcriptional Control by the SMADs. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 8 (10). DOI: 10.1101/cshperspect.a022079.

Hocevar, B. A.; Brown, T. L.; Howe, P. H. (1999): TGF-beta induces fibronectin synthesis through a c-Jun N-terminal kinase-dependent, Smad4-independent pathway. In: *The EMBO journal* 18 (5), S. 1345–1356. DOI: 10.1093/emboj/18.5.1345.

Hogg, N. (1998): Free radicals in disease. In: *Seminars in reproductive endocrinology* 16 (4), S. 241–248. DOI: 10.1055/s-2007-1016284.

Hoot, KE.; Lighthall, J.; Han, G.; Lu, SL.; Li, A.; Ju, W. et al. (2008): Keratinocyte-specific Smad2 ablation results in increased epithelial-mesenchymal transition during skin cancer formation

and progression. In: *The Journal of clinical investigation* 118 (8), S. 2722–2732. DOI: 10.1172/JCI33713.

Hori, M.; Satou, Ka.; Harashima, H.; Kamiya, H. (2010): Suppression of mutagenesis by 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate (7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate) by human MTH1, MTH2, and NUDT5. In: *Free radical biology & medicine* 48 (9), S. 1197–1201. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.02.002.

Hough, C.; Radu, M.; Dore, J.J. E. (2012): Tgf-beta induced Erk phosphorylation of smad linker region regulates smad signaling. In: *PloS one* 7 (8), e42513. DOI: 10.1371/journal.pone.0042513.

Hu, P. P.; Shen, X.; Huang, D.; Liu, Y.; Counter, C.; Wang, X. F. (1999): The MEK pathway is required for stimulation of p21(WAF1/CIP1) by transforming growth factor-beta. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (50), S. 35381–35387.

Huang, Y.; Vasilatos, SN.; Boric, L.; Shaw, PG.; Davidson, NE. (2012): Inhibitors of histone demethylation and histone deacetylation cooperate in regulating gene expression and inhibiting growth in human breast cancer cells. In: *Breast cancer research and treatment* 131 (3), S. 777–789. DOI: 10.1007/s10549-011-1480-8.

Huffman, J.L.; Sundheim, O.; Tainer, J.A. (2005): DNA base damage recognition and removal: new twists and grooves. In: *Mutation research* 577 (1-2), S. 55–76. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2005.03.012.

Hwang, S.; Schmitt, A.A.; Luteran, A.E.; Toone, E.J.; McCafferty, D.G. (2011): Thermodynamic characterization of the binding interaction between the histone demethylase LSD1/KDM1 and CoREST. In: *Biochemistry* 50 (4), S. 546–557. DOI: 10.1021/bi101776t.

Ignotz, R. A.; Massague, J. (1986): Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. In: *The Journal of biological chemistry* 261 (9), S. 4337–4345.

Ishikawa, F.; Kaneko, E.; Sugimoto, T.; Ishijima, T.; Wakamatsu, M.; Yuasa, A. et al. (2014): A mitochondrial thioredoxin-sensitive mechanism regulates TGF-beta-mediated gene expression associated with epithelial-mesenchymal transition. In: *Biochemical and biophysical research communications* 443 (3), S. 821–827. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.12.050.

Isono, M.; Chen, S.; Hong, SW.; Iglesias-de la Cruz, MC.; Ziyadeh, FN. (2002): Smad pathway is activated in the diabetic mouse kidney and Smad3 mediates TGF-beta-induced fibronectin in mesangial cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 296 (5), S. 1356–1365.

Itoh, S.; Thorikay, M.; Kowanetz, M.; Moustakas, A.; Itoh, F.; Heldin, CH; Dijke, P (2003): Elucidation of Smad requirement in transforming growth factor-beta type I receptor-induced responses. In: *The Journal of biological chemistry* 278 (6), S. 3751–3761. DOI: 10.1074/jbc.M208258200.

Izumi, T.; Wiederhold, LR.; Roy, G.; Roy, R.; Jaiswal, A.; Bhakat, KK. et al. (2003): Mammalian DNA base excision repair proteins: their interactions and role in repair of oxidative DNA damage. In: *Toxicology* 193 (1-2), S. 43–65.

Jablonska-Trypuc, A.; Wolejko, E.; Wydro, U.; Butarewicz, A. (2017): The impact of pesticides on oxidative stress level in human organism and their activity as an endocrine disruptor. In: *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes* 52 (7), S. 483–494. DOI: 10.1080/03601234.2017.1303322.

Jaffe, Aron B.; Hall, Alan (2005): Rho GTPases: biochemistry and biology. In: *Annual review of cell and developmental biology* 21, S. 247–269. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.21.020604.150721.

Jagadeeshan, S.; Krishnamoorthy, Y. R.; Singhal, M.; Subramanian, A.; Mavuluri, J.; Lakshmi, A. et al. (2015): Transcriptional regulation of fibronectin by p21-activated kinase-1 modulates pancreatic tumorigenesis. In: *Oncogene* 34 (4), S. 455–464. DOI: 10.1038/onc.2013.576.

Jiang, M.; Shao, Z. M.; Wu, J.; Lu, J. S.; Yu, L. M.; Yuan, J. D. et al. (1997): p21/waf1/cip1 and mdm-2 expression in breast carcinoma patients as related to prognosis. In: *International journal of cancer* 74 (5), S. 529–534.

Johansson, C.; Jamal Fattah, T.; Yu, H.; Nygren, J.; Mossberg, AK.; Schwartz, S. (2015): Acetylation of intragenic histones on HPV16 correlates with enhanced HPV16 gene expression. In: *Virology* 482, S. 244–259. DOI: 10.1016/j.virol.2015.02.053.

Kanvah, S.; Joseph, J; Schuster, GB.; Barnett, RN.; Cleveland, CL.; Landman, U (2010): Oxidation of DNA: damage to nucleobases. In: *Accounts of chemical research* 43 (2), S. 280–287. DOI: 10.1021/ar900175a.

Karytinis, A.; Forneris, F.; Profumo, A.; Ciossani, G.; Battaglioli, E.; Binda, C.; Mattevi, A. (2009): A novel mammalian flavin-dependent histone demethylase. In: *The Journal of biological chemistry* 284 (26), S. 17775–17782. DOI: 10.1074/jbc.M109.003087.

Kavsak, P.; Rasmussen, R. K.; Causing, C. G.; Bonni, S.; Zhu, H.; Thomsen, G. H.; Wrana, J. L. (2000): Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. In: *Molecular cell* 6 (6), S. 1365–1375.

Kim, HJ.; Kim, JG.; Moon, MY.; Park, SH.; Park, JB. (2014): I kappa B kinase gamma/nuclear factor-kappa B-essential modulator (IKKgamma/NEMO) facilitates RhoA GTPase activation, which, in turn, activates Rho-associated KINASE (ROCK) to phosphorylate IKKbeta in response to transforming growth factor (TGF)-beta1. In: *The Journal of biological chemistry* 289 (3), S. 1429–1440. DOI: 10.1074/jbc.M113.520130.

Kim, SC.; Kang, JI.; Hyun, JW.; Kang, JH.; Koh, YS.; Kim, YH. et al. (2017): 4-O-Methylhonokiol Protects HaCaT Cells from TGF-beta1-Induced Cell Cycle Arrest by Regulating Canonical and Non-Canonical Pathways of TGF-beta Signaling. In: *Biomolecules & therapeutics* 25 (4), S. 417–426. DOI: 10.4062/biomolther.2016.003.

Kim, YK.; Bae, GU.; Kang, JK.; Park, JW.; Lee, EK.; Lee, HY. et al. (2006): Cooperation of H₂O₂-mediated ERK activation with Smad pathway in TGF-beta1 induction of p21^{WAF1/Cip1}. In: *Cellular signalling* 18 (2), S. 236–243. DOI: 10.1016/j.cellsig.2005.04.008.

Kitsera, N.; Stathis, D.; Lühnsdorf, B.; Müller, H.; Carell, T.; Epe, B.; Khobta, A. (2011): 8-Oxo-7,8-dihydroguanine in DNA does not constitute a barrier to transcription, but is converted into transcription-blocking damage by OGG1. In: *Nucleic acids research* 39 (14), S. 5926–5934. DOI: 10.1093/nar/gkr163.

Kivinen, L.; Laiho, M. (1999): Ras- and mitogen-activated protein kinase kinase-dependent and -independent pathways in p21^{Cip1/Waf1} induction by fibroblast growth factor-2, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor-beta1. In: *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 10 (9), S. 621–628.

Klungland, A.; Lindahl, T. (1997): Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). In: *The EMBO journal* 16 (11), S. 3341–3348. DOI: 10.1093/emboj/16.11.3341.

Klungland, A.; Rosewell, I.; Hollenbach, S.; Larsen, E.; Daly, G.; Epe, B. et al. (1999): Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (23), S. 13300–13305.

Kohn, K. W.; Erickson, L. C.; Ewig, R. A.; Friedman, C. A. (1976): Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. In: *Biochemistry* 15 (21), S. 4629–4637.

Koinuma, D.; Tsutsumi, S.; Kamimura, N.; Taniguchi, H.; Miyazawa, K.; Sunamura, M. et al. (2009): Chromatin immunoprecipitation on microarray analysis of Smad2/3 binding sites reveals roles of ETS1 and TFAP2A in transforming growth factor beta signaling. In: *Molecular and cellular biology* 29 (1), S. 172–186. DOI: 10.1128/MCB.01038-08.

Koinuma, D.; Tsutsumi, S.; Kamimura, N.; Imamura, T.; Aburatani, H.; Miyazono, K. (2009): Promoter-wide analysis of Smad4 binding sites in human epithelial cells. In: *Cancer science* 100 (11), S. 2133–2142. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2009.01299.x.

Kooistra, SM.; Helin, K. (2012): Molecular mechanisms and potential functions of histone demethylases. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 13 (5), S. 297–311. DOI: 10.1038/nrm3327.

Kowanetz, M.; Valcourt, U.; Bergstrom, R.; Heldin, CH.; Moustakas, A. (2004): Id2 and Id3 define the potency of cell proliferation and differentiation responses to transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein. In: *Molecular and cellular biology* 24 (10), S. 4241–4254.

Kretzschmar, M.; Doody, J.; Massague, J. (1997): Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. In: *Nature* 389 (6651), S. 618–622. DOI: 10.1038/39348.

Krokan, H.E.; Bjoras, M. (2013): Base excision repair. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 5 (4), a012583. DOI: 10.1101/cshperspect.a012583.

Lamouille, S.; Xu, J.; Derynck, R. (2014): Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 15 (3), S. 178–196. DOI: 10.1038/nrm3758.

Larsen, E.; Kwon, K.; Coin, F.; Egly, JM; Klungland, A. (2004): Transcription activities at 8-oxoG lesions in DNA. In: *DNA repair* 3 (11), S. 1457–1468. DOI: 10.1016/j.dnarep.2004.06.008.

Lasorella, A.; Nosedà, M.; Beyna, M.; Yokota, Y.; Iavarone, A. (2000): Id2 is a retinoblastoma protein target and mediates signalling by Myc oncoproteins. In: *Nature* 407 (6804), S. 592–598. DOI: 10.1038/35036504.

Laugesen, A.; Helin, K. (2014): Chromatin repressive complexes in stem cells, development, and cancer. In: *Cell stem cell* 14 (6), S. 735–751. DOI: 10.1016/j.stem.2014.05.006.

Lee, MK.; Pardoux, C.; Hall, MC.; Lee, PS.; Warburton, D.; Qing, J. et al. (2007): TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. In: *The EMBO journal* 26 (17), S. 3957–3967. DOI: 10.1038/sj.emboj.7601818.

Li, J. M.; Datto, M. B.; Shen, X.; Hu, P. P.; Yu, Y.; Wang, X. F. (1998): Sp1, but not Sp3, functions to mediate promoter activation by TGF-beta through canonical Sp1 binding sites. In: *Nucleic acids research* 26 (10), S. 2449–2456.

Li, J.; Braganza, A.; Sobol, R.W. (2013): Base excision repair facilitates a functional relationship between Guanine oxidation and histone demethylation. In: *Antioxidants & redox signaling* 18 (18), S. 2429–2443. DOI: 10.1089/ars.2012.5107.

Liang, Y.; Quenelle, D.; Vogel, J.L.; Mascaro, C.; Ortega, A.; Kristie, T.M. (2013): A novel selective LSD1/KDM1A inhibitor epigenetically blocks herpes simplex virus lytic replication and reactivation from latency. In: *mBio* 4 (1), e00558-12. DOI: 10.1128/mBio.00558-12.

Lin, T.; Ponn, A.; Hu, X.; Law, B. K.; Lu, J. (2010): Requirement of the histone demethylase LSD1 in Snai1-mediated transcriptional repression during epithelial-mesenchymal transition. In: *Oncogene* 29 (35), S. 4896–4904. DOI: 10.1038/onc.2010.234.

Lin, X.; Duan, X.; Liang, YY; Su, Y.; Wrighton, K.H.; Long, J. et al. (2006): PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling. In: *Cell* 125 (5), S. 915–928. DOI: 10.1016/j.cell.2006.03.044.

Lindahl, T. (1974): An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (9), S. 3649–3653.

Lindahl, T. (1993): Instability and decay of the primary structure of DNA. In: *Nature* 362 (6422), S. 709–715. DOI: 10.1038/362709a0.

Lippen, C. von der (2013): Untersuchungen der DNA-Reparatur in humanen Lymphozyten. Disserationsschrift. Mainz.

Liu, C.; Xu, P.; Lamouille, S.; Xu, J.; Derynck, R. (2009): TACE-mediated ectodomain shedding of the type I TGF-beta receptor downregulates TGF-beta signaling. In: *Molecular cell* 35 (1), S. 26–36. DOI: 10.1016/j.molcel.2009.06.018.

Lu, A. L.; Li, X.; Gu, Y.; Wright, P. M.; Chang, D. Y. (2001): Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions. In: *Cell biochemistry and biophysics* 35 (2), S. 141–170. DOI: 10.1385/CBB:35:2:141.

Lu, R.; Nash, H. M.; Verdine, G. L. (1997): A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer. In: *Current biology : CB* 7 (6), S. 397–407.

Luo, K. (2017): Signaling Cross Talk between TGF-beta/Smad and Other Signaling Pathways. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 9 (1). DOI: 10.1101/cshperspect.a022137.

Mabley, JG.; Pacher, P.; Deb, A.; Wallace, R.; Elder, RH.; Szabo, C. (2005): Potential role for 8-oxoguanine DNA glycosylase in regulating inflammation. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19 (2), S. 290–292. DOI: 10.1096/fj.04-2278fje.

Macias, MJ.; Martin-Malpartida, P.; Massague, J. (2015): Structural determinants of Smad function in TGF-beta signaling. In: *Trends in biochemical sciences* 40 (6), S. 296–308. DOI: 10.1016/j.tibs.2015.03.012.

Maki, H.; Sekiguchi, M. (1992): MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. In: *Nature* 355 (6357), S. 273–275. DOI: 10.1038/355273a0.

Massague, J. (1990): The transforming growth factor-beta family. In: *Annual review of cell biology* 6, S. 597–641. DOI: 10.1146/annurev.cb.06.110190.003121.

- Massague, J. (2012): TGFbeta signalling in context. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 13 (10), S. 616–630. DOI: 10.1038/nrm3434.
- Massague, J.; Seoane, J.; Wotton, D. (2005): Smad transcription factors. In: *Genes & development* 19 (23), S. 2783–2810. DOI: 10.1101/gad.1350705.
- Matsumoto, Y.; Kim, K. (1995): Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. In: *Science (New York, N.Y.)* 269 (5224), S. 699–702.
- Matsumoto, Y.; Kim, K.; Hurwitz, J.; Gary, R.; Levin, D. S.; Tomkinson, A. E.; Park, M. S. (1999): Reconstitution of proliferating cell nuclear antigen-dependent repair of apurinic/aprimidinic sites with purified human proteins. In: *The Journal of biological chemistry* 274 (47), S. 33703–33708.
- Matsuura, I.; Wang, G.; He, D.; Liu, F. (2005): Identification and characterization of ERK MAP kinase phosphorylation sites in Smad3. In: *Biochemistry* 44 (37), S. 12546–12553. DOI: 10.1021/bi050560g.
- Mazars, A.; Lallemand, F.; Prunier, C.; Marais, J.; Ferrand, N.; Pessah, M. et al. (2001): Evidence for a role of the JNK cascade in Smad7-mediated apoptosis. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (39), S. 36797–36803. DOI: 10.1074/jbc.M101672200.
- McAuley-Hecht, K. E.; Leonard, G. A.; Gibson, N. J.; Thomson, J. B.; Watson, W. P.; Hunter, W. N.; Brown, T. (1994): Crystal structure of a DNA duplex containing 8-hydroxydeoxyguanine-adenine base pairs. In: *Biochemistry* 33 (34), S. 10266–10270.
- McCauley, Micah J.; Furman, Leah; Dietrich, Catherine A.; Rouzina, Ioulia; Nunez, Megan E.; Williams, Mark C. (2018): Quantifying the stability of oxidatively damaged DNA by single-molecule DNA stretching. In: *Nucleic acids research*. DOI: 10.1093/nar/gky148.
- McCullough, A. K.; Dodson, M. L.; Lloyd, R. S. (1999): Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures. In: *Annual review of biochemistry* 68, S. 255–285. DOI: 10.1146/annurev.biochem.68.1.255.
- McDonald, OG.; Wu, H.; Timp, W.; Doi, A.; Feinberg, AP. (2011): Genome-scale epigenetic reprogramming during epithelial-to-mesenchymal transition. In: *Nature structural & molecular biology* 18 (8), S. 867–874. DOI: 10.1038/nsmb.2084.

- Metzger, E.; Wissmann, M.; Yin, N.; Muller, JM.; Schneider, R.; Peters, A. H F M et al. (2005): LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. In: *Nature* 437 (7057), S. 436–439. DOI: 10.1038/nature04020.
- Michaels, M. L.; Miller, J. H. (1992): The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). In: *Journal of bacteriology* 174 (20), S. 6321–6325.
- Miettinen, P. J.; Ebner, R.; Lopez, A. R.; Derynck, R. (1994): TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. In: *The Journal of cell biology* 127 (6 Pt 2), S. 2021–2036.
- Minden, A.; Lin, A.; Claret, F. X.; Abo, A.; Karin, M. (1995): Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. In: *Cell* 81 (7), S. 1147–1157.
- Miyazono, K. (2000): Positive and negative regulation of TGF-beta signaling. In: *Journal of cell science* 113 (Pt 7), S. 1101–1109.
- Moustakas, A.; Kardassis, D. (1998): Regulation of the human p21/WAF1/Cip1 promoter in hepatic cells by functional interactions between Sp1 and Smad family members. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (12), S. 6733–6738.
- Moustakas, A.; Heldin, CH. (2005): Non-Smad TGF-beta signals. In: *Journal of cell science* 118 (Pt 16), S. 3573–3584. DOI: 10.1242/jcs.02554.
- Moustakas, A.; Heldin, CH. (2016): Mechanisms of TGFbeta-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. In: *Journal of clinical medicine* 5 (7). DOI: 10.3390/jcm5070063.
- Murphy, T. M. (1975): Nucleic acids: interaction with solar UV radiation. In: *Current topics in radiation research quarterly* 10 (3), S. 199–228.
- Nash, R. A.; Caldecott, K. W.; Barnes, D. E.; Lindahl, T. (1997a): XRCC1 protein interacts with one of two distinct forms of DNA ligase III. In: *Biochemistry* 36 (17), S. 5207–5211. DOI: 10.1021/bi962281m.
- Nash, H. M.; Lu, R.; Lane, W. S.; Verdine, G. L. (1997b): The critical active-site amine of the human 8-oxoguanine DNA glycosylase, hOgg1: direct identification, ablation and chemical reconstitution. In: *Chemistry & biology* 4 (9), S. 693–702.

- Neeley, WL.; Essigmann, JM. (2006): Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. In: *Chemical research in toxicology* 19 (4), S. 491–505. DOI: 10.1021/tx0600043.
- Nicolas, FJ.; Hill, CS. (2003): Attenuation of the TGF-beta-Smad signaling pathway in pancreatic tumor cells confers resistance to TGF-beta-induced growth arrest. In: *Oncogene* 22 (24), S. 3698–3711. DOI: 10.1038/sj.onc.1206420.
- Niedzielska, E.; Smaga, I.; Gawlik, M.; Moniczewski, A.; Stankowicz, P.; Pera, J.; Filip, M. (2016): Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. In: *Molecular neurobiology* 53 (6), S. 4094–4125. DOI: 10.1007/s12035-015-9337-5.
- Nishioka, K.; Ohtsubo, T.; Oda, H.; Fujiwara, T.; Kang, D.; Sugimachi, K.; Nakabeppu, Y. (1999): Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. In: *Molecular biology of the cell* 10 (5), S. 1637–1652.
- Norton, J. D. (2000): ID helix-loop-helix proteins in cell growth, differentiation and tumorigenesis. In: *Journal of cell science* 113 (Pt 22), S. 3897–3905.
- Ohno, M.; Miura, T.; Furuichi, M.; Tominaga, Y.; Tsuchimoto, D.; Sakumi, K.; Nakabeppu, Y. (2006): A genome-wide distribution of 8-oxoguanine correlates with the preferred regions for recombination and single nucleotide polymorphism in the human genome. In: *Genome research* 16 (5), S. 567–575. DOI: 10.1101/gr.4769606.
- Osterod, M.; Hollenbach, S.; Hengstler, J. G.; Barnes, D. E.; Lindahl, T.; Epe, B. (2001): Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1) deficient mice. In: *Carcinogenesis* 22 (9), S. 1459–1463.
- Overstreet, JM.; Samarakoon, R.; Meldrum, KK.; Higgins, PJ. (2014): Redox control of p53 in the transcriptional regulation of TGF-beta1 target genes through SMAD cooperativity. In: *Cellular signalling* 26 (7), S. 1427–1436. DOI: 10.1016/j.cellsig.2014.02.017.
- Pal, R.; Mamidi, M.K.; Das, A.K.; Bhonde, R. (2012): Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells. In: *Archives of toxicology* 86 (4), S. 651–661. DOI: 10.1007/s00204-011-0782-2.
- Pankov, R.; Yamada, KM. (2002): Fibronectin at a glance. In: *Journal of cell science* 115 (Pt 20), S. 3861–3863.

- Papageorgis, P.; Cheng, K.; Ozturk, S.; Gong, Y.; Lambert, A.W.; Abdolmaleky, Hamid M. et al. (2011): Smad4 inactivation promotes malignancy and drug resistance of colon cancer. In: *Cancer research* 71 (3), S. 998–1008. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-3269.
- Pardali, K.; Kurisaki, A.; Moren, A.; Dijke, P. ten; Kardassis, D.; Moustakas, A. (2000): Role of Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21(Waf1/Cip1) regulation by transforming growth factor-beta. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (38), S. 29244–29256. DOI: 10.1074/jbc.M909467199.
- Pardali, K.; Kowanetz, M.; Heldin, CH.; Moustakas, A. (2005): Smad pathway-specific transcriptional regulation of the cell cycle inhibitor p21(WAF1/Cip1). In: *Journal of cellular physiology* 204 (1), S. 260–272. DOI: 10.1002/jcp.20304.
- Parlanti, E.; Fortini, P.; Macpherson, P.; Laval, J.; Dogliotti, E. (2002): Base excision repair of adenine/8-oxoguanine mispairs by an aphidicolin-sensitive DNA polymerase in human cell extracts. In: *Oncogene* 21 (34), S. 5204–5212. DOI: 10.1038/sj.onc.1205561.
- Perillo, B.; Ombra, MN.; Bertoni, A.; Cuzzo, C.; Sacchetti, S.; Sasso, A. et al. (2008): DNA oxidation as triggered by H3K9me2 demethylation drives estrogen-induced gene expression. In: *Science (New York, N.Y.)* 319 (5860), S. 202–206. DOI: 10.1126/science.1147674.
- Pietenpol, J. A.; Holt, J. T.; Stein, R. W.; Moses, H. L. (1990): Transforming growth factor beta 1 suppression of c-myc gene transcription: role in inhibition of keratinocyte proliferation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87 (10), S. 3758–3762.
- Podlutzky, A. J.; Dianova, I. I.; Podust, V. N.; Bohr, V. A.; Dianov, G. L. (2001): Human DNA polymerase beta initiates DNA synthesis during long-patch repair of reduced AP sites in DNA. In: *The EMBO journal* 20 (6), S. 1477–1482. DOI: 10.1093/emboj/20.6.1477.
- Polyak, K.; Kato, J. Y.; Solomon, M. J.; Sherr, C. J.; Massague, J.; Roberts, J. M.; Koff, A. (1994): p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. In: *Genes & development* 8 (1), S. 9–22.
- Qian, C.; Zhang, Q.; Li, S.D.; Zeng, L.; Walsh, M.J.; Zhou, MM. (2005): Structure and chromosomal DNA binding of the SWIRM domain. In: *Nature structural & molecular biology* 12 (12), S. 1078–1085. DOI: 10.1038/nsmb1022.

Radicella, J.P.; Dherin, C.; Desmaze, C.; Fox, M. S.; Boiteux, S. (1997): Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (15), S. 8010–8015.

Reynisdottir, I.; Polyak, K.; Iavarone, A.; Massague, J. (1995): Kip/Cip and Ink4 Cdk inhibitors cooperate to induce cell cycle arrest in response to TGF-beta. In: *Genes & development* 9 (15), S. 1831–1845.

Reynisdottir, I.; Massague, J. (1997): The subcellular locations of p15(Ink4b) and p27(Kip1) coordinate their inhibitory interactions with cdk4 and cdk2. In: *Genes & development* 11 (4), S. 492–503.

Rhyu, D. Y.; Park, J.; Sharma, B. R.; Ha, H. (2012): Role of reactive oxygen species in transforming growth factor-beta1-induced extracellular matrix accumulation in renal tubular epithelial cells. In: *Transplantation proceedings* 44 (3), S. 625–628. DOI: 10.1016/j.transproceed.2011.12.054.

Robertson, A. B.; Klungland, A.; Rognes, T.; Leiros, I. (2009): DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 66 (6), S. 981–993. DOI: 10.1007/s00018-009-8736-z.

Roldan-Arjona, T.; Wei, Y. F.; Carter, K. C.; Klungland, A.; Anselmino, C.; Wang, R. P. et al. (1997): Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (15), S. 8016–8020.

Roos, W.P.; Quiros, S.; Krumm, A.; Merz, S.; Switzeny, O.J.; Christmann, M. et al. (2014): B-Raf inhibitor vemurafenib in combination with temozolomide and fotemustine in the killing response of malignant melanoma cells. In: *Oncotarget* 5 (24), S. 12607–12620. DOI: 10.18632/oncotarget.2610.

Rosenquist, T. A.; Zharkov, D. O.; Grollman, A. P. (1997): Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (14), S. 7429–7434.

Ross, S.; Hill, C.S. (2008): How the Smads regulate transcription. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 40 (3), S. 383–408. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.09.006.

- Sakaguchi, M.; Miyazaki, M.; Sonogawa, H.; Kashiwagi, M.; Ohba, M.; Kuroki, T. et al. (2004): PKC α mediates TGF β -induced growth inhibition of human keratinocytes via phosphorylation of S100C/A11. In: *The Journal of cell biology* 164 (7), S. 979–984. DOI: 10.1083/jcb.200312041.
- Sakumi, K.; Furuichi, M.; Tsuzuki, T.; Kakuma, T.; Kawabata, S.; Maki, H.; Sekiguchi, M. (1993): Cloning and expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxo-dGTP, a mutagenic substrate for DNA synthesis. In: *The Journal of biological chemistry* 268 (31), S. 23524–23530.
- Saha, D.; Datta, P. K.; Beauchamp, R. D. (2001): Oncogenic ras represses transforming growth factor- β /Smad signaling by degrading tumor suppressor Smad4. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (31), S. 29531–29537. DOI: 10.1074/jbc.M100069200.
- Sancho, P.; Fabregat, I. (2011): The NADPH oxidase inhibitor VAS2870 impairs cell growth and enhances TGF- β -induced apoptosis of liver tumor cells. In: *Biochemical pharmacology* 81 (7), S. 917–924. DOI: 10.1016/j.bcp.2011.01.007.
- Sandhu, C.; Garbe, J.; Bhattacharya, N.; Daksis, J.; Pan, C. H.; Yaswen, P. et al. (1997): Transforming growth factor β stabilizes p15INK4B protein, increases p15INK4B-cdk4 complexes, and inhibits cyclin D1-cdk4 association in human mammary epithelial cells. In: *Molecular and cellular biology* 17 (5), S. 2458–2467.
- Santibanez, JF. (2006): JNK mediates TGF- β 1-induced epithelial mesenchymal transdifferentiation of mouse transformed keratinocytes. In: *FEBS letters* 580 (22), S. 5385–5391. DOI: 10.1016/j.febslet.2006.09.003.
- Scharer, O. D.; Jiricny, J. (2001): Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 23 (3), S. 270–281. DOI: 10.1002/1521-1878(200103)23:3<270::AID-BIES1037>3.0.CO;2-J.
- Schmidt, D. M. Z.; McCafferty, DG. (2007): trans-2-Phenylcyclopropylamine is a mechanism-based inactivator of the histone demethylase LSD1. In: *Biochemistry* 46 (14), S. 4408–4416. DOI: 10.1021/bi0618621.

Seifermann, M. (2017): Die Regulation der Transkription proinflammatorischer Zytokine durch oxidative Basenmodifikationen und die DNA-Reparaturglykosylase OGG1. Dissertationsschrift. Mainz.

Seifermann, M.; Epe, B. (2017): Oxidatively generated base modifications in DNA: Not only carcinogenic risk factor but also regulatory mark? In: *Free radical biology & medicine* 107, S. 258–265. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.018.

Seifermann, M.; Ulges, A.; Bopp, T.; Melcea, S.; Schafer, A.; Oka, S. et al. (2017): Role of the DNA repair glycosylase OGG1 in the activation of murine splenocytes. In: *DNA repair* 58, S. 13–20. DOI: 10.1016/j.dnarep.2017.08.005.

Seoane, J.; Pouponnot, C.; Staller, P.; Schader, M.; Eilers, M.; Massague, J. (2001): TGFbeta influences Myc, Miz-1 and Smad to control the CDK inhibitor p15INK4b. In: *Nature cell biology* 3 (4), S. 400–408. DOI: 10.1038/35070086.

Seoane, J.; Le, HV.; Shen, L.; Anderson, SA.; Massague, J. (2004): Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. In: *Cell* 117 (2), S. 211–223.

Shi, Y.; Wang, Y. F.; Jayaraman, L.; Yang, H.; Massague, J.; Pavletich, N. P. (1998): Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF-beta signaling. In: *Cell* 94 (5), S. 585–594.

Shi, Y.; Lan, F.; Matson, C.; Mulligan, P.; Whetstine, JR.; Cole, PA. et al. (2004): Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. In: *Cell* 119 (7), S. 941–953. DOI: 10.1016/j.cell.2004.12.012.

Shibutani, S.; Takeshita, M.; Grollman, A. P. (1991): Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. In: *Nature* 349 (6308), S. 431–434. DOI: 10.1038/349431a0.

Shiple, G. D.; Pittelkow, M. R.; Wille, J. J., JR; Scott, R. E.; Moses, H. L. (1986): Reversible inhibition of normal human prokeratinocyte proliferation by type beta transforming growth factor-growth inhibitor in serum-free medium. In: *Cancer research* 46 (4 Pt 2), S. 2068–2071.

Sies, H. (1991): Role of reactive oxygen species in biological processes. In: *Klinische Wochenschrift* 69 (21-23), S. 965–968.

Silberstein, G. B.; Daniel, C. W. (1987): Reversible inhibition of mammary gland growth by transforming growth factor-beta. In: *Science (New York, N.Y.)* 237 (4812), S. 291–293.

Sorrentino, A.; Thakur, N.; Grimsby, S.; Marcusson, A.; Bulow, V. von; Schuster, N. et al. (2008): The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. In: *Nature cell biology* 10 (10), S. 1199–1207. DOI: 10.1038/ncb1780.

Souchelnytskyi, S.; Dijke, P. ten; Miyazono, K.; Heldin, C. H. (1996): Phosphorylation of Ser165 in TGF-beta type I receptor modulates TGF-beta1-induced cellular responses. In: *The EMBO journal* 15 (22), S. 6231–6240.

Souchelnytskyi, S.; Tamaki, K.; Engstrom, U.; Wernstedt, C.; Dijke, P. ten; Heldin, C. H. (1997): Phosphorylation of Ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor-beta signaling. In: *The Journal of biological chemistry* 272 (44), S. 28107–28115.

Stanisavljevic, J.; Porta-de-la-Riva, M.; Batlle, R.; Herreros, A. Garcia de; Baulida, J. (2011): The p65 subunit of NF-kappaB and PARP1 assist Snail1 in activating fibronectin transcription. In: *Journal of cell science* 124 (Pt 24), S. 4161–4171. DOI: 10.1242/jcs.078824.

Staller, P.; Peukert, K.; Kiermaier, A.; Seoane, J.; Lukas, J.; Karsunky, H. et al. (2001): Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1. In: *Nature cell biology* 3 (4), S. 392–399. DOI: 10.1038/35070076.

Stivers, JT. (2004): Site-specific DNA damage recognition by enzyme-induced base flipping. In: *Progress in nucleic acid research and molecular biology* 77, S. 37–65. DOI: 10.1016/S0079-6603(04)77002-6.

Svilar, D.; Goellner, EM.; Almeida, KH.; Sobol, RW. (2011): Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. In: *Antioxidants & redox signaling* 14 (12), S. 2491–2507. DOI: 10.1089/ars.2010.3466.

Thillainadesan, G.; Chitilian, JM.; Isovich, M.; Ablack, JNG.; Mymryk, JS.; Tini, M.; Torchia, J. (2012): TGF-beta-dependent active demethylation and expression of the p15ink4b tumor suppressor are impaired by the ZNF217/CoREST complex. In: *Molecular cell* 46 (5), S. 636–649. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.03.027.

Thuault, S.; Tan, EJ.; Peinado, H.; Cano, A.; Heldin, CH.; Moustakas, A. (2008): HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal

transition. In: *The Journal of biological chemistry* 283 (48), S. 33437–33446. DOI: 10.1074/jbc.M802016200.

Tosh, D.; Slack, J. M. W. (2002): How cells change their phenotype. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 3 (3), S. 187–194. DOI: 10.1038/nrm761.

Tsihlias, J.; Kapusta, L. R.; DeBoer, G.; Morava-Protzner, I.; Zbieranowski, I.; Bhattacharya, N. et al. (1998): Loss of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 is a novel prognostic factor in localized human prostate adenocarcinoma. In: *Cancer research* 58 (3), S. 542–548.

Tucker, R. F.; Shipley, G. D.; Moses, H. L.; Holley, R. W. (1984): Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to platelet type beta transforming growth factor. In: *Science (New York, N.Y.)* 226 (4675), S. 705–707.

Uchida, K.; Suzuki, H.; Ohashi, T.; Nitta, K.; Yumura, W.; Nihei, H. (2001): Involvement of MAP kinase cascades in Smad7 transcriptional regulation. In: *Biochemical and biophysical research communications* 289 (2), S. 376–381. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5984.

Valavanidis, A.; Vlachogianni, T.; Fiotakis, C. (2009): 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. In: *Journal of environmental science and health. Part C, Environmental carcinogenesis & ecotoxicology reviews* 27 (2), S. 120–139. DOI: 10.1080/10590500902885684.

Valcourt, U.; Kowanetz, M.; Niimi, H.; Heldin, CH.; Moustakas, A. (2005): TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. In: *Molecular biology of the cell* 16 (4), S. 1987–2002. DOI: 10.1091/mbc.E04-08-0658.

Verrecchia, F.; Tacheau, C.; Schorpp-Kistner, M.; Angel, P.; Mauviel, A. (2001): Induction of the AP-1 members c-Jun and JunB by TGF-beta/Smad suppresses early Smad-driven gene activation. In: *Oncogene* 20 (18), S. 2205–2211. DOI: 10.1038/sj.onc.1204347.

Wallace, S. S. (1998): Enzymatic processing of radiation-induced free radical damage in DNA. In: *Radiation research* 150 (5 Suppl), S60-79.

Wang, C.; Deng, L.; Hong, M.; Akkaraju, G. R.; Inoue, J.; Chen, Z. J. (2001): TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. In: *Nature* 412 (6844), S. 346–351. DOI: 10.1038/35085597.

- Wang, J.; Scully, K.; Zhu, X.; Cai, L.; Zhang, J.; Prefontaine, GG. et al. (2007): Opposing LSD1 complexes function in developmental gene activation and repression programmes. In: *Nature* 446 (7138), S. 882–887. DOI: 10.1038/nature05671.
- Wang, T.; Li, J.; Ding, K.; Zhang, L.; Che, Q.; Sun, X. et al. (2017): The CpG Dinucleotide Adjacent to a kappaB Site Affects NF-kappaB Function through Its Methylation. In: *International journal of molecular sciences* 18 (3). DOI: 10.3390/ijms18030528.
- Wood, R. D.; Mitchell, M.; Sgouros, J.; Lindahl, T. (2001): Human DNA repair genes. In: *Science (New York, N.Y.)* 291 (5507), S. 1284–1289. DOI: 10.1126/science.1056154.
- Wu, ZQ.; Li, XY.; Hu, C.Y.; Ford, M.; Kleer, C.G.; Weiss, S.J. (2012): Canonical Wnt signaling regulates Slug activity and links epithelial-mesenchymal transition with epigenetic Breast Cancer 1, Early Onset (BRCA1) repression. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (41), S. 16654–16659. DOI: 10.1073/pnas.1205822109.
- Xu, J.; Lamouille, S.; Derynck, R. (2009): TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. In: *Cell research* 19 (2), S. 156–172. DOI: 10.1038/cr.2009.5.
- Xu, L.; Kang, Y.; Col, S.; Massague, J. (2002): Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGFbeta signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. In: *Molecular cell* 10 (2), S. 271–282.
- Yamaguchi, K.; Shirakabe, K.; Shibuya, H.; Irie, K.; Oishi, I.; Ueno, N. et al. (1995): Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. In: *Science (New York, N.Y.)* 270 (5244), S. 2008–2011.
- Yan, C.; Yang, Q.; Shen, HM.; Spitsbergen, J.M.; Gong, Z. (2017): Chronically high level of tgfb1a induction causes both hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma via a dominant Erk pathway in zebrafish. In: *Oncotarget* 8 (44), S. 77096–77109. DOI: 10.18632/oncotarget.20357.
- Yang, M.; Gocke, CB.; Luo, X.; Borek, D.; Tomchick, DR.; Machius, M. et al. (2006): Structural basis for CoREST-dependent demethylation of nucleosomes by the human LSD1 histone demethylase. In: *Molecular cell* 23 (3), S. 377–387. DOI: 10.1016/j.molcel.2006.07.012.
- Yeh, YY.; Chiao, CC.; Kuo, WY.; Hsiao, YC.; Chen, YJ.; Wei, YY. et al. (2008): TGF-beta1 increases motility and alphavbeta3 integrin up-regulation via PI3K, Akt and NF-kappaB-

dependent pathway in human chondrosarcoma cells. In: *Biochemical pharmacology* 75 (6), S. 1292–1301. DOI: 10.1016/j.bcp.2007.11.017.

Yu, L.; Hebert, M.C.; Zhang, Y.E. (2002): TGF-beta receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF-beta responses. In: *The EMBO journal* 21 (14), S. 3749–3759. DOI: 10.1093/emboj/cdf366.

Zavadil, J.; Bitzer, M.; Liang, D.; Yang, Y. C.; Massimi, A.; Kneitz, S. et al. (2001): Genetic programs of epithelial cell plasticity directed by transforming growth factor-beta. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (12), S. 6686–6691. DOI: 10.1073/pnas.111614398.

Zavadil, Jiri; Bottinger, Erwin P. (2005): TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. In: *Oncogene* 24 (37), S. 5764–5774. DOI: 10.1038/sj.onc.1208927.

Zawel, L.; Dai, J. L.; Buckhaults, P.; Zhou, S.; Kinzler, K. W.; Vogelstein, B.; Kern, S. E. (1998): Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. In: *Molecular cell* 1 (4), S. 611–617.

Zhang, L.; Lei, W.; Wang, X.; Tang, Y.; Song, J. (2010): Glucocorticoid induces mesenchymal-to-epithelial transition and inhibits TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and cell migration. In: *FEBS letters* 584 (22), S. 4646–4654. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.10.038.

Zhang, L.; Zhou, F.; García de Vinuesa, A.; Kruijff, E.M. de; Mesker, W.E.; Hui, L. et al. (2013): TRAF4 promotes TGF- β receptor signaling and drives breast cancer metastasis. In: *Molecular cell* 51 (5), S. 559–572. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.07.014.

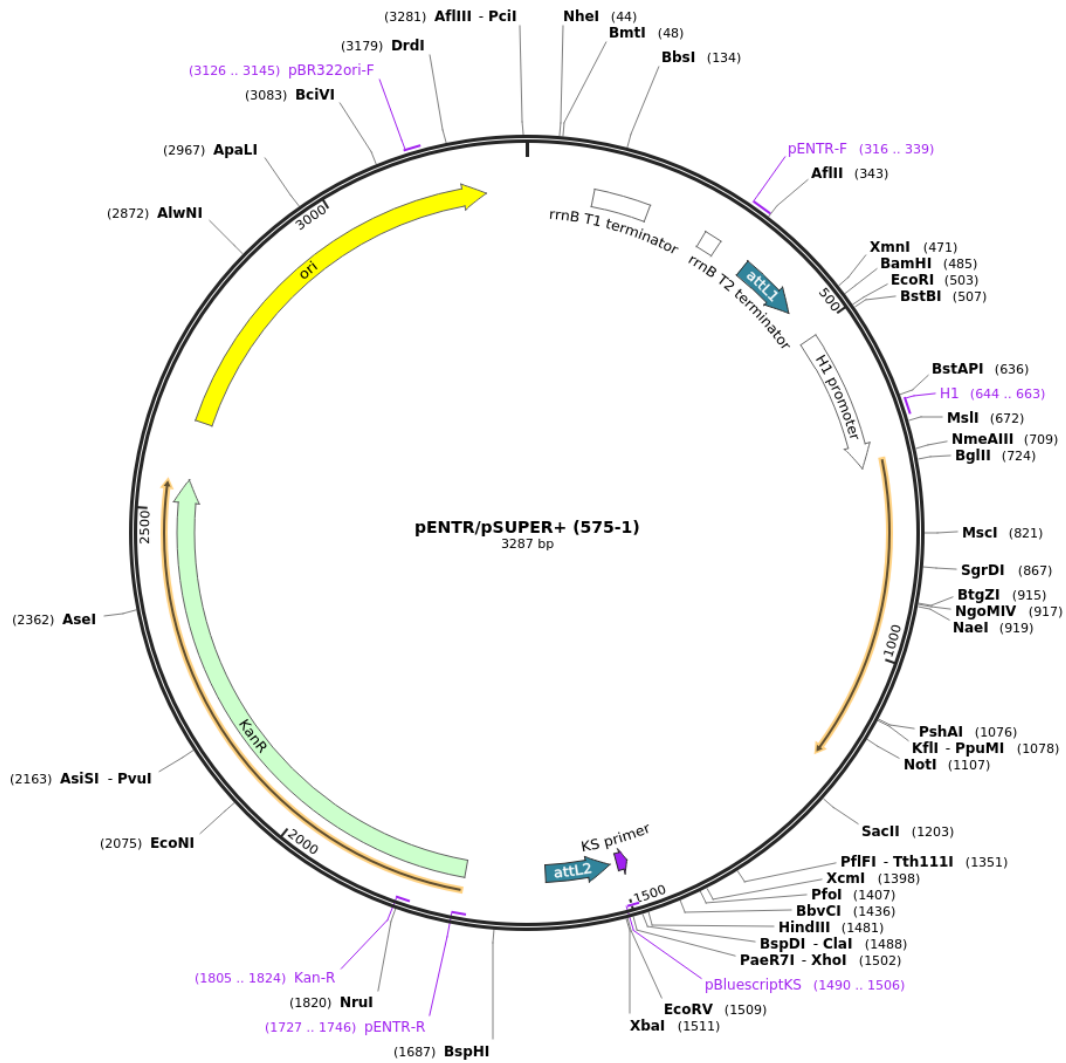
Zhang, YE. (2017): Non-Smad Signaling Pathways of the TGF-beta Family. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 9 (2). DOI: 10.1101/cshperspect.a022129.

Zhu, H.; Kavsak, P.; Abdollah, S.; Wrana, J. L.; Thomsen, G. H. (1999): A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. In: *Nature* 400 (6745), S. 687–693. DOI: 10.1038/23293.

8 Anhang I

Vektorkarte pENTR/pSUPER+

Created with SnapGene®



pENTR/pSUPER+ mit shRNA-Insert

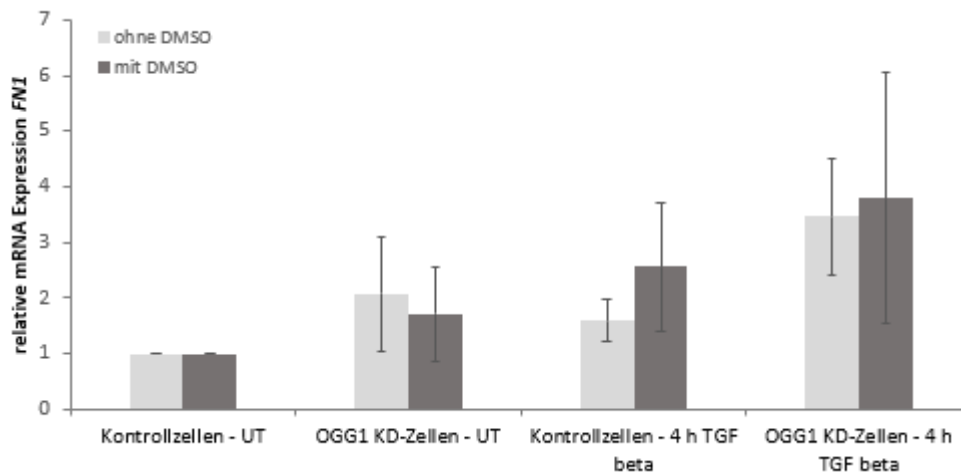
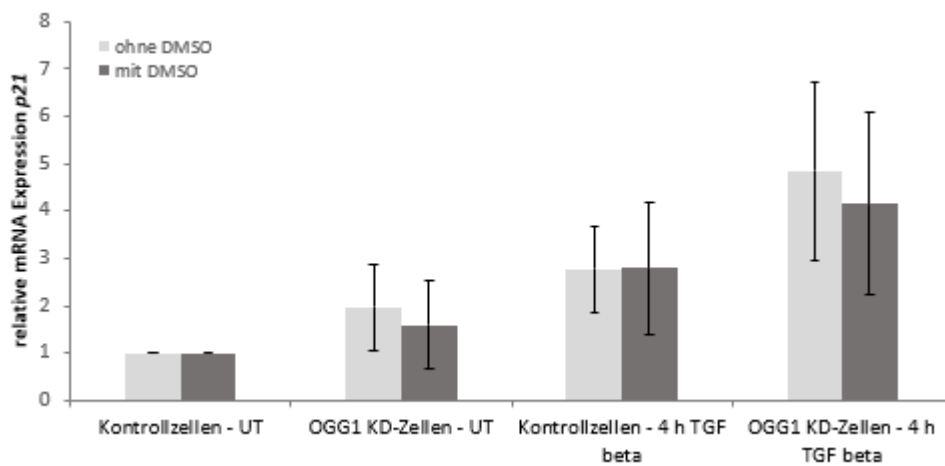
Die Sequenz, die für die shRNA codiert, ist grün markiert.

```
CTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCTAGCATGGATCTCGGGGACGTCTAACTACTAAGCGAGAGTAGGGAAGTGC
CCAGGCATCAAATAAAAACGAAAGGCTCAGTCGGAAGACTGGGCCCTTTCGTTTTATCTGTGTTTGTTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAA
TCCGCCGGGAGCGGATTTGAACGTTGTGAAGCAACGGCCCGGAGGGTGGCGGGCAGGACGCCGCCATAAAGTGCAGGCATCAAACCTAAGCAG
AAGGCCATCCTGACGGATGGCCCTTTTTGCGTTTCTACAAACTCTCCTGTTAGTTAGTTACTTAAGCTCGGGCCCCAAATAATGATTTTTATTTT
GACTGATAGTGACCTGTTGTTGCAACAAATTGATAAGCAATGCTTTTTTATAATGCCAACTTTGTACAAAAAGCAGGCTCCACCATGGGAAC
CAATTCAGTCGACTGGATCCCCCGGGCTGCAGGAATTCGAACGCTGACGTCATCAACCCGCTCCAAGGAATCGCGGGCCAGTGTCACTAGGCG
GGAACACCCAGCGCGCTGCGCCCTGGCAGGAAGATGGCTGTGAGGGACAGGGGAGTGGCGCCCTGCAATATTTGCATGTGCGTATGTGTCTG
GGAAATCACCATAAACGTGAAATGTCTTTGGATTTGGGAATCTTATAAGTTCTGTATGAGACCACA GATCCCC CGATCAAGTATGGACTGTT
CAAGAGA CAGTGTCCATACTTGATCC TTTTTA AGCTTATCGATACCGTCGACCTCGAGATATCTAGACCAGCTTTCTGTACAAAGTTGGCAT
TATAAGAAAGCATTGCTTATCAATTTGTGCAACGAACAGGCTACTATCAGTCAAATAAAATCATTATTTGCCATCCAGCTGCAGCTCTGGCC
CGTGTCTCAAAATCTCTGATGTTACATTGCACAAAGATAAAAATATATCATCATGAACAATAAAACTGTCTGCTTACATAAACAGTAATACAAGG
GGTGTATGAGCCATATTCACCGGGAACGTCGAGGCCCGGATTAATTCACACATGGATGCTGATTTATATGGGTATAAATGGGCTCGCGATA
ATGTCGGGCAATCAGGTGCGACAATCTATCGCTTGATGGAAGCCCGATGCGCCAGAGTTGTTTCTGAAACATGGCAAAGGTAGCGTTGCCAA
TGATGTTACAGATGAGATGGTCAGACTAACTGGCTGACGGAATTTATGCCTCTTCCGACCATCAAGCATTTTATCCGTACTCCTGATGATGCA
TGGTTACTCACCCTGCGATCCCCGAAAAACAGCATTCCAGGTATTAGAAGAATATCCTGATTCAGGTGAAAATATTGTTGATGCGCTGGCAG
TGTCCTGCGCCGGTTGCATTTCGATTTGTAATTGTCTTTTAAACAGCGATCGCGTATTTTCGCTCGCTCAGGCGCAATCAGGAATGAA
TAACGGTTTGGTTGATGCGAGTGATTTTGTGACGAGCGTAATGGCTGGCCTGTTGAACAAGTCTGGAAGAAATGCATAAACTTTTGCCATTC
TACCAGGATTCAGTCGCTCACTCATGGTGATTTCTCACTTGATAACCTTATTTTACGAGGGGAAATTAATAGGTTGATTTGATGTTGGACGAG
TCGGAATCGCAGACCGATACCAGGATCTTGCCATCCTATGGAAGTGCCTCGGTGAGTTTTCTCCTTACATTACAGAAACGGCTTTTCAAAAATA
TGGTATTGATAATCCTGATATGAATAAATGTCAGTTTCATTTGATGCTCGATGAGTTTTTCTAATCAGAATTGGTTAATTGGTTGTAACATTAT
TCAGATTGGGCCCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCT
TGCAAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGGTTTGGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACGGCTTCAGCAGAGC
GCAGATAACAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCCTACATACTCGCTCTGCTAATC
CTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCT
GAACGGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCT
TCCCGAAGGGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCTGGTAT
CTTTATAGTCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCA
ACGCGGCCCTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTT//
```

9 Anhang II

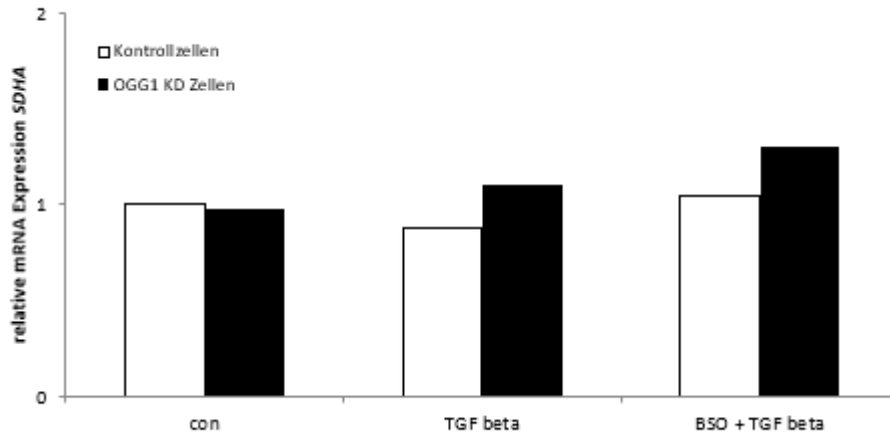
Einfluss von DMSO auf die Expression von *p21* bzw. *FN1*

Die in 2.5 aufgelisteten Inhibitoren wurden z.T. in DMSO gelöst. Aus diesem Grund wurde der Einfluss des Lösemittels auf die Expression der beiden Markergene untersucht. In den folgenden Abbildungen sind die Expression von *p21* bzw. *FN1* in unbehandelten und für 4 h mit TGF β behandelten Kontroll- und OGG1 KD-Zellen dargestellt.



10 Anhang III

Expressionsvergleich SDHA-TBP

**Expressionsvergleich der beiden Housekeeping-Gen TBP und SDHA in HaCaT-Zellen.**

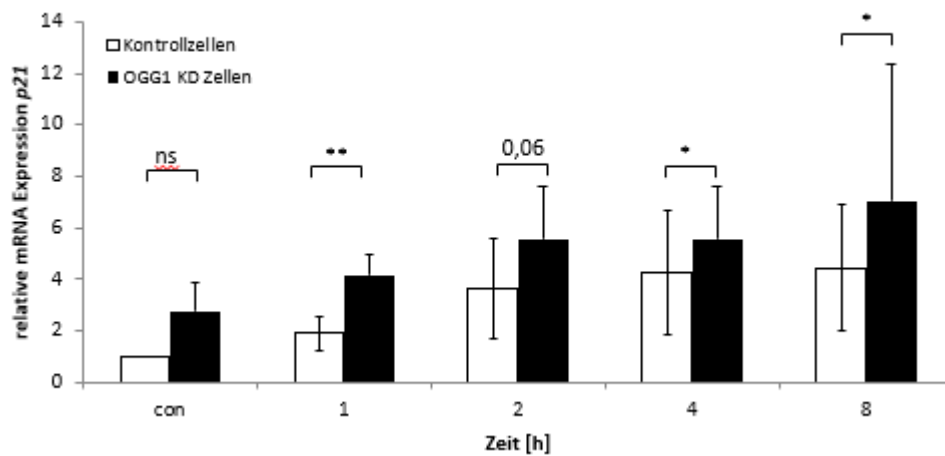
Relative mRNA Expression von *SDHA* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1-defizienten Zellen nach der Behandlung mit 4 ng/ml TGF β (vgl. 3.2.1.5). Normalisierung erfolgt auf die unbehandelte Kontrollprobe. (n=1). MW \pm SD.

11 Anhang III

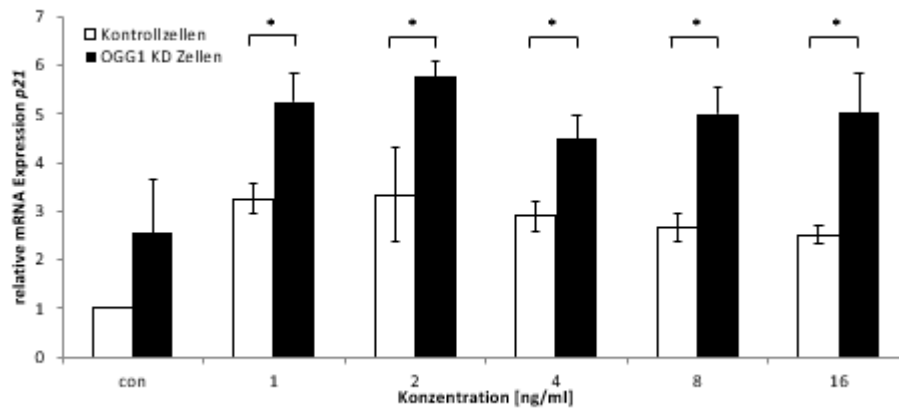
Ungepoolte Ergebnisse der qRT-PCR- Analyse für *p21*

Im Folgenden sind die Ergebnisse der direkten Expressionsvergleiche aufgeführt. Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Experimenten dargestellt.

Einfluss der Behandlungsdauer (vgl. Abb. 3.6)

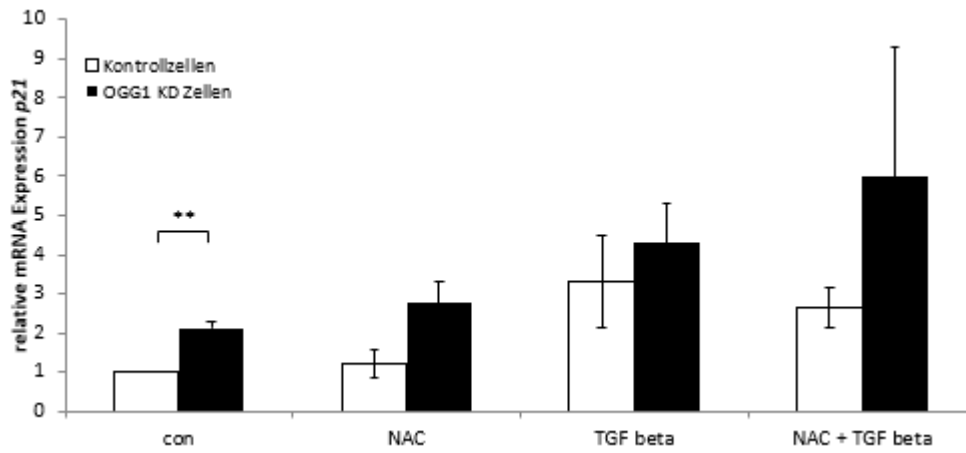


Einfluss der Konzentration (vgl. Abb. 3.7)

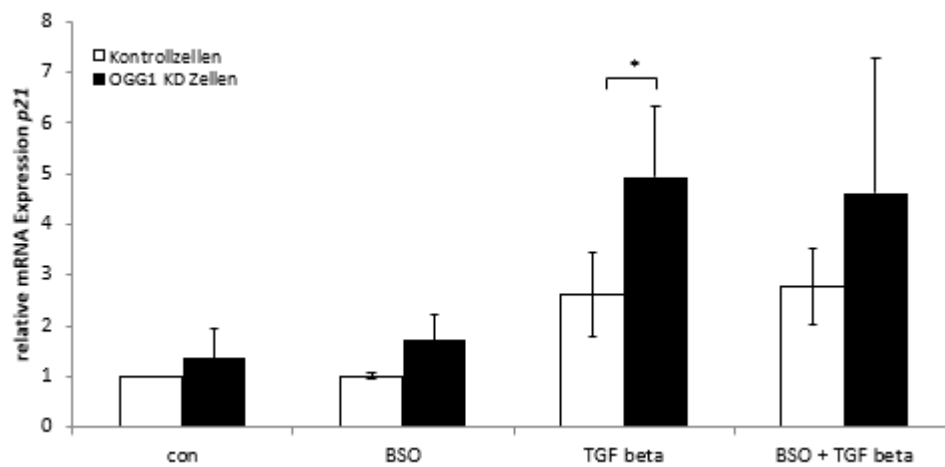


Einfluss von ROS

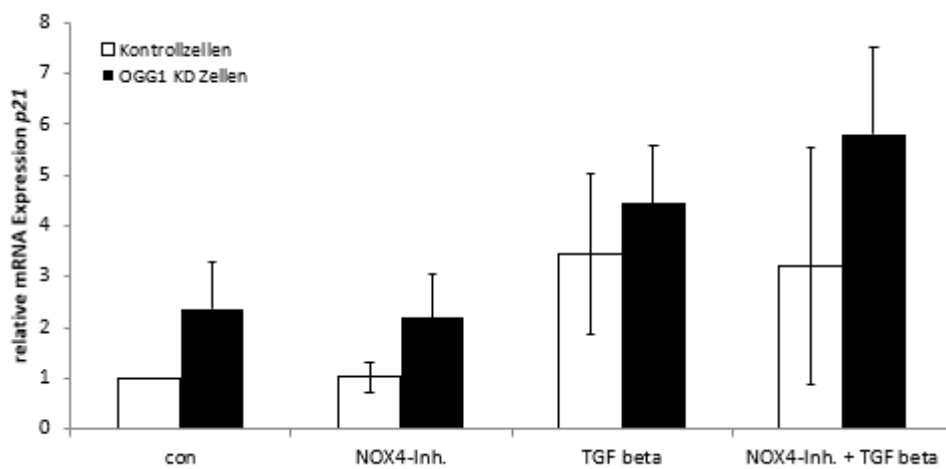
Einfluss von N-Acetylcystein (vgl. Abb. 3.10)



Einfluss von Buthioninsulfoximin (vgl. Abb. 3.11)

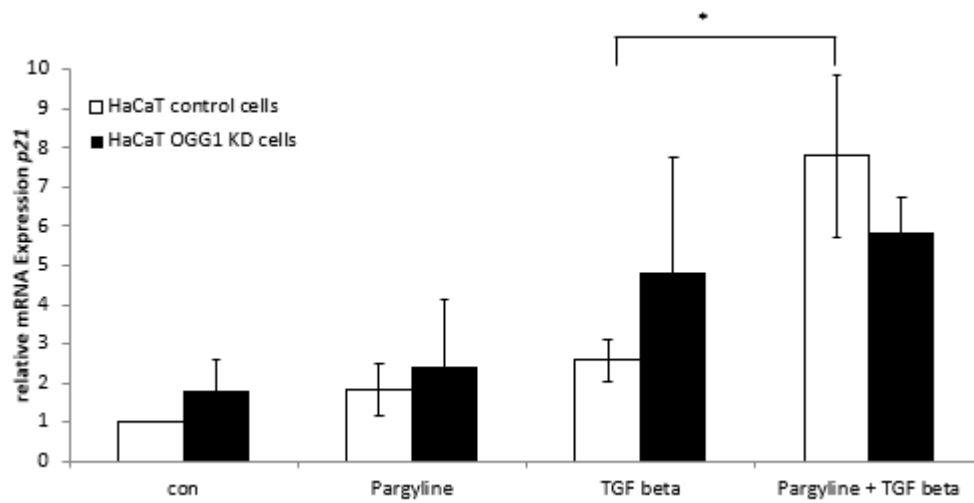


Einfluss von NOX4 (vgl. Abb. 3.12)

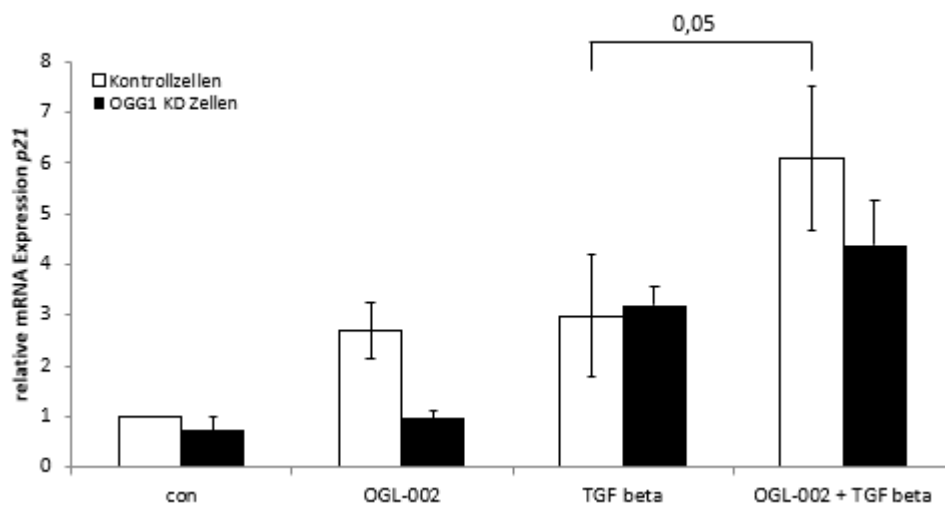


Einfluss der Histondemethylase LSD1

Einfluss von Pargylin (vgl. Abb. 3.13)

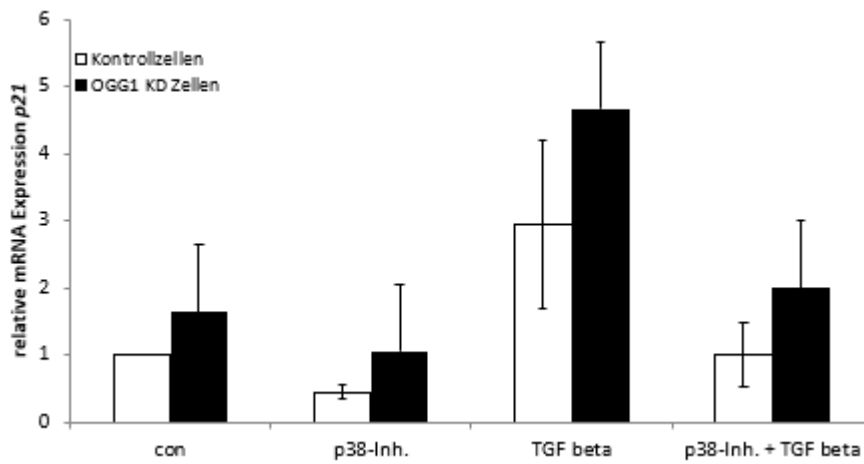


Einfluss von OGL-002 (vgl. Abb. 3.14)

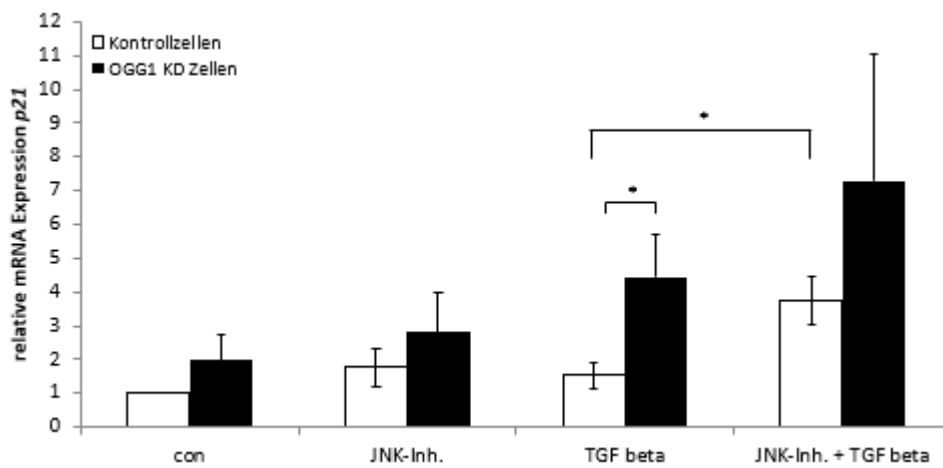


Einfluss der MAP-Kinasen

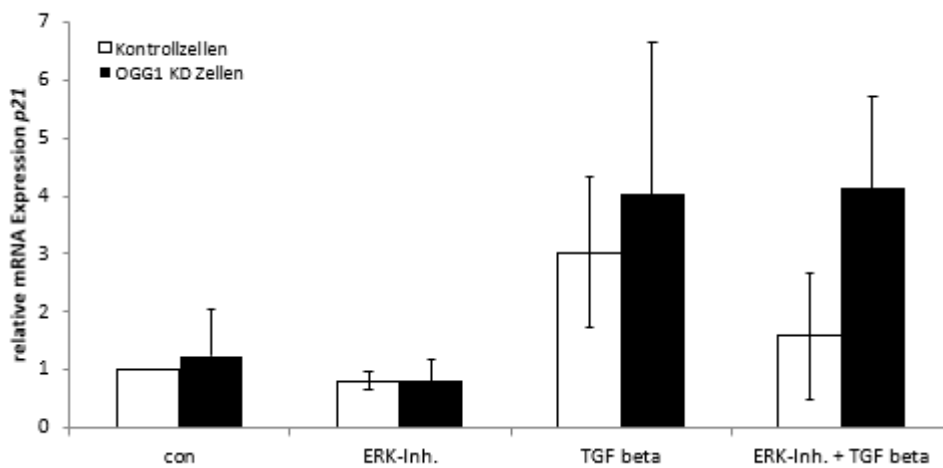
p38 (vgl. Abb. 3.16)



JNK (vgl. Abb. 3.17)



ERK1/2 (vgl. Abb. 3.18)

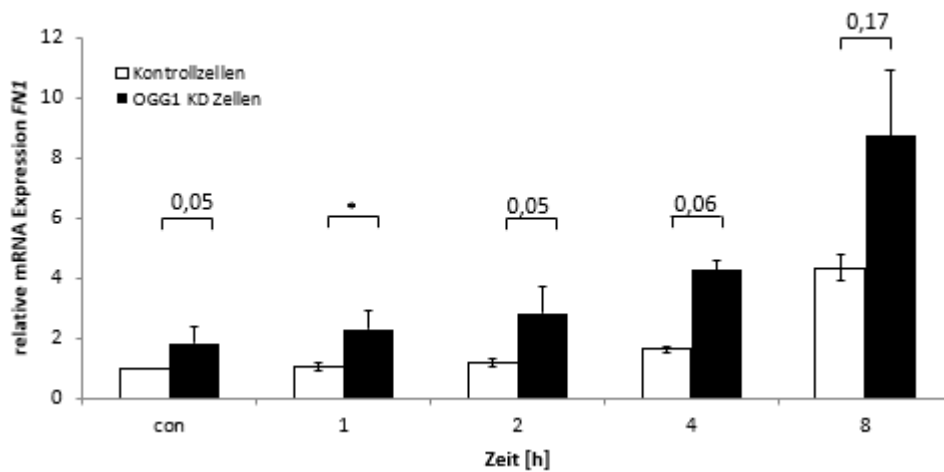


12 Anhang IV

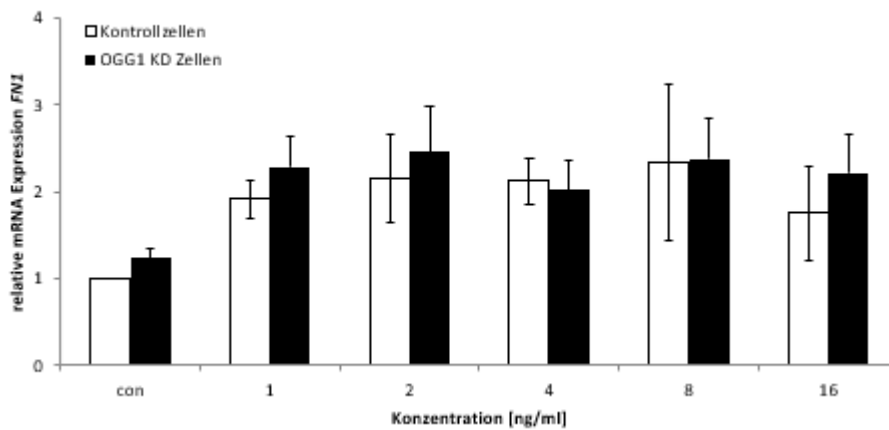
Ungepoolte Ergebnisse der qRT-PCR- Analyse für *FN1*

Im Folgenden sind die Ergebnisse der direkten Expressionsvergleiche aufgeführt. Es sind jeweils die Mittelwerte aus drei Experimenten dargestellt.

Einfluss der Behandlungsdauer (vgl. Abb. 3.20)

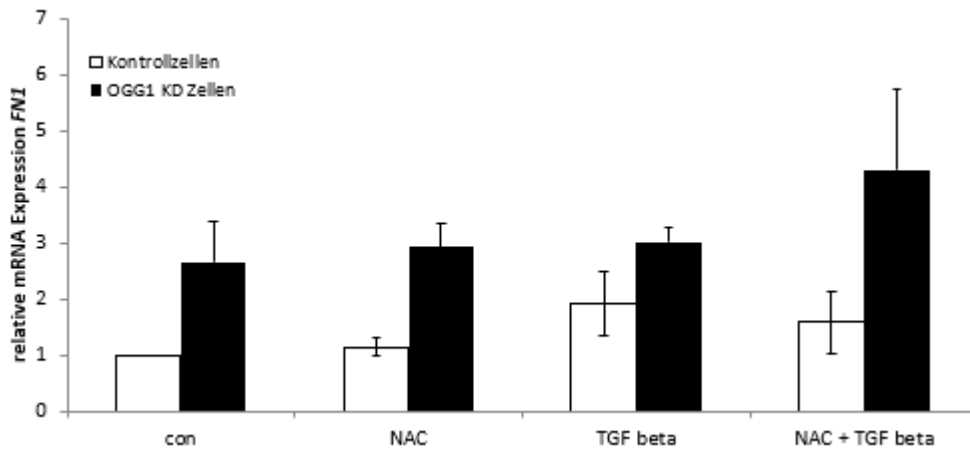


Einfluss der Konzentration (vgl. Abb. 3.21)

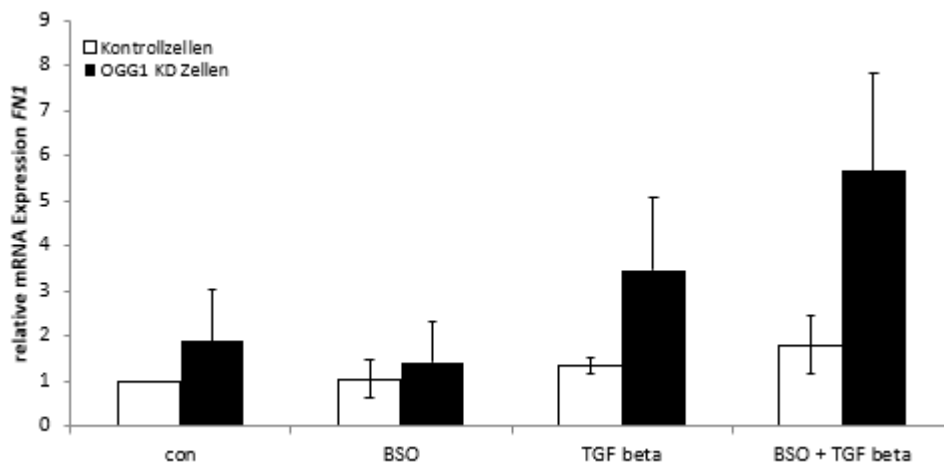


Einfluss von ROS

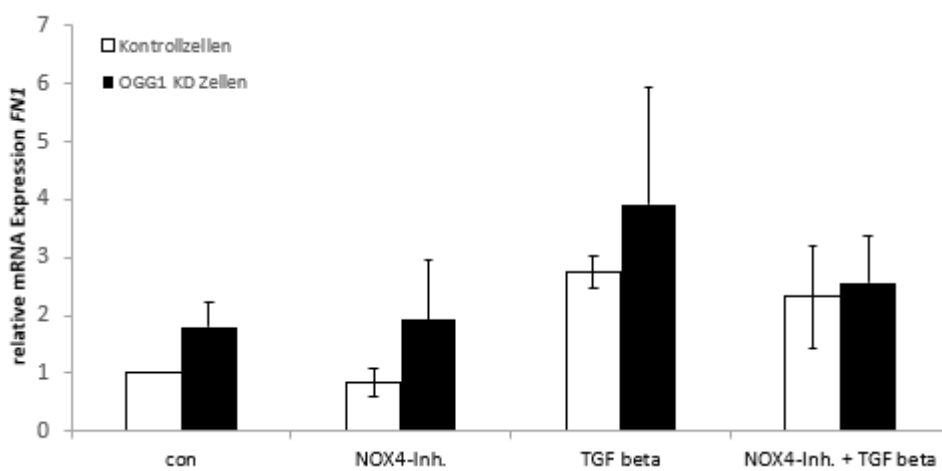
Einfluss von N-Acetylcystein (vgl. Abb. 3.22)



Einfluss von Buthioninsulfoximin (vgl. Abb. 3.23)

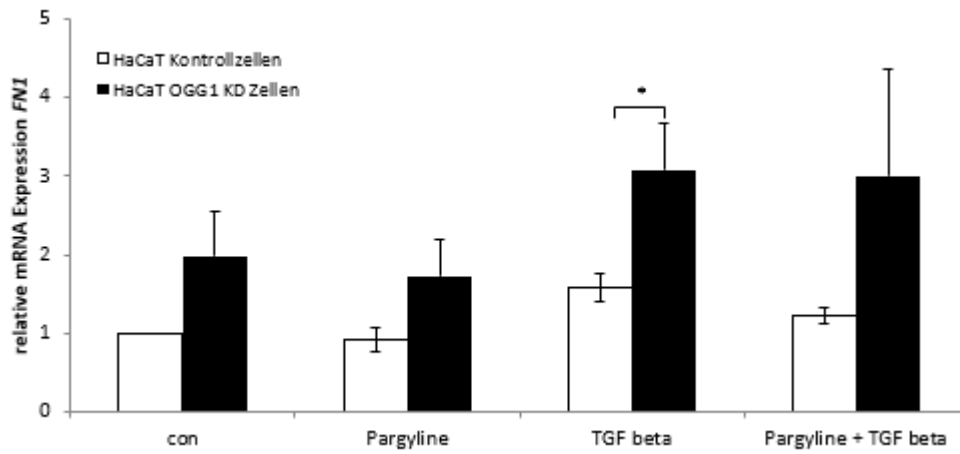


Einfluss von NOX4 (vgl. Abb. 3.24)

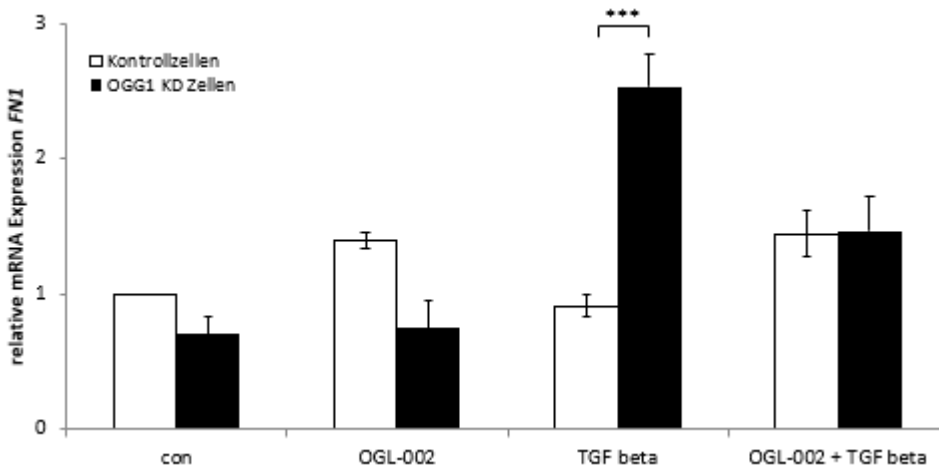


Einfluss der Histondemethylase LSD1

Einfluss von Pargylin (vgl. Abb. 3.25)

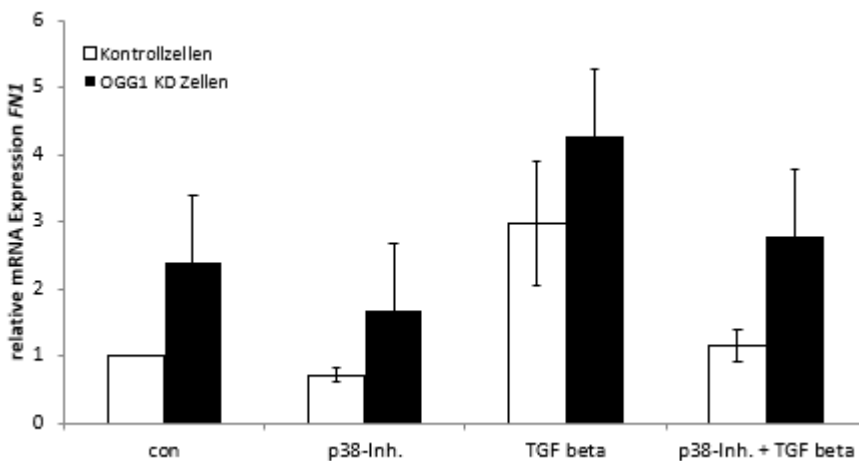


Einfluss von OGL-002 (vgl. Abb. 3.26)

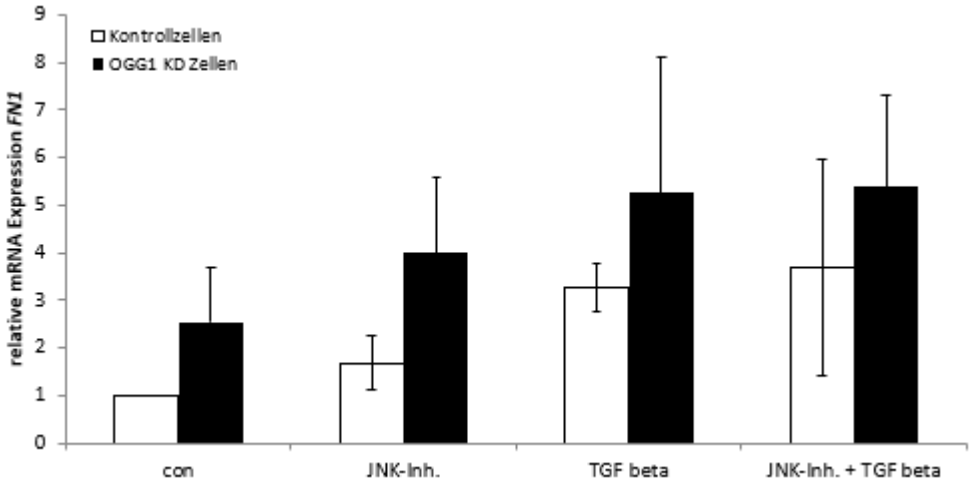


Einfluss der MAP-Kinasen

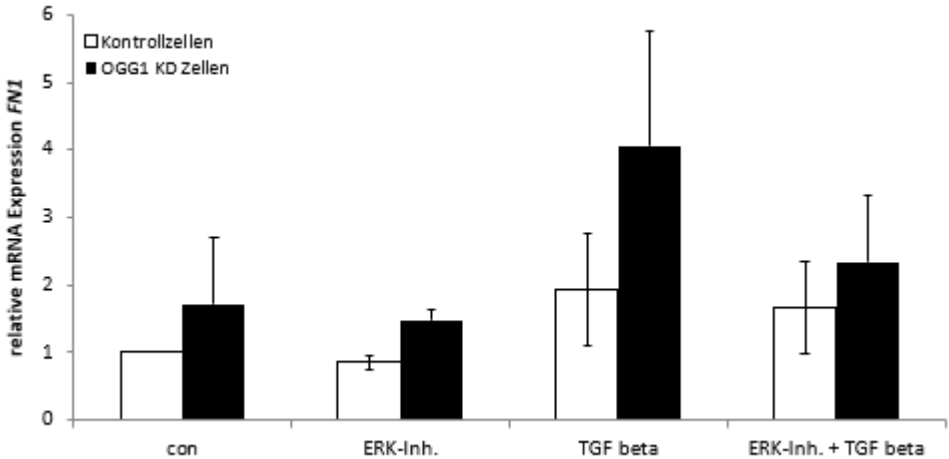
p38 (vgl. Abb. 3.28)



JNK (vgl. Abb. 3.29)



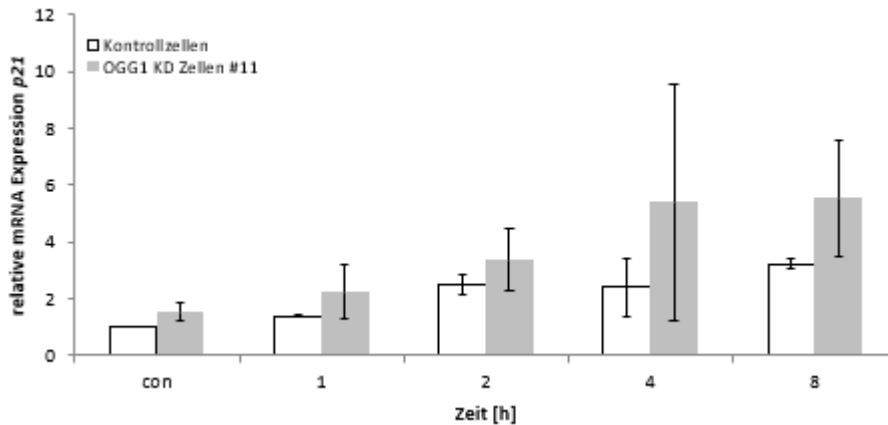
ERK1/2 (vgl. Abb. 3.30)



13 Anhang V

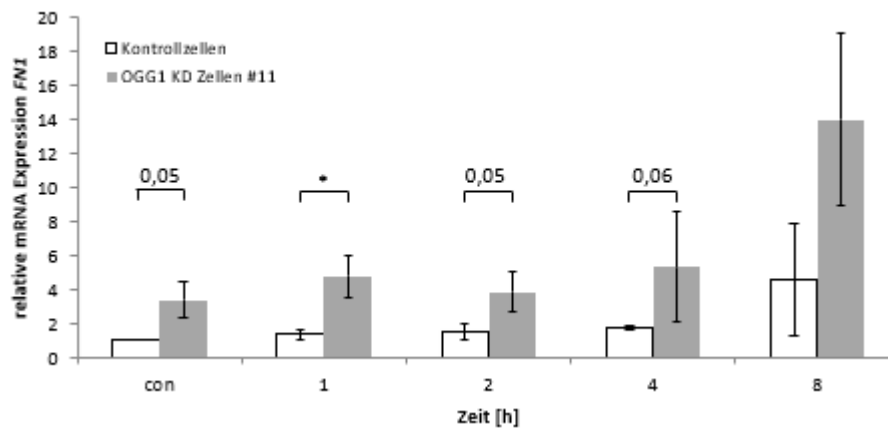
Ergebnisse mit dem OGG1 KD-Klon #11

Im Folgenden sind die Ergebnisse für den zweiten OGG1-defizienten Zellklon dargestellt. Es handelt sich um den in Abb. 3.1 als #11 bezeichneten Klon.



Zeitabhängige Expression von *p21* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *p21* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1 KD-Zellen (KD-Klon #11) nach Behandlung mit 4 ng/ml TGF β für die angegebenen Zeiten mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). (n=3). MW \pm SD.



Zeitabhängige Expression von *FN1* in HaCaT-Zellen.

Relative mRNA Expression von *FN1* über der Expression von TBP in HaCaT Kontroll- und OGG1 KD-Zellen (KD-Klon #11) nach Behandlung mit 4 ng/ml TGF β für die angegebenen Zeiten mittels qRT-PCR (vgl. 3.2.1.5). (n=3). MW \pm SD.

14 Abkürzungsverzeichnis

5-caC	5-Carboxycytosin
5-fC	5-Formylcytosin
5-hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5-hmU	5-Hydroxymethyluracil
5-mC	5-Methylcytosin
8-oxoG	7,8-Dihydro-8-oxoguanin
8-oxoGua	Freie Base von 7,8-Dihydro-8-oxoguanin
ACTB	β -Actin
AID	Activation-induced cytidine deaminase
AP-1	Activator protein 1
APE1	apurinic/apyrimidinic (AP) endonuclease
AP-Läsion/ Stelle	Apurinische/apyrimidinische Läsion
APOBEC	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like
BCL2	B-cell lymphoma 2
BER	Basenexzisionreparatur
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin
BSO	Butioninsulfoximin
CAD	carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase, and dihydroorotase
CDK1/2/4/6	Cylin-dependent kinase1/2/4/6
CoREST	Corepressor of RE1-silencing transcription factor
Ct	Cycle of threshold
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT1/3	DNA methyltransferase1/3
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dRP	Desoxyribosephosphat
DSB	Doppelstrangbruch (DNA)

E2	Estradiol
ECAD	E-Cadherin
ECM	Extrazelluläre Matrix
EdU	5-Ethynyl-2'-desoxyuridin
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
ER	Estrogen receptor
ERE	Estrogen response element
ERK1/2	Extracellular-signal Regulated Kinase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FapyG	2,6-Diamino-4-oxo-5-formamidopyrimidin
FCS	Fetales Kälberserum
FEN1	Flap-Endonuclease1
FOXO1/3/4	Forkhead-Box-Protein1/3/4
Fpg	Formamidopyrimidine-DNA-Glycosylase
G418	Geneticin
GEF	Guanosin-Exchange Factor
Gh	Guanidinohydatoin
GRB2	Growth factor receptor-bound protein 2
GTP	Guanosintriphosphat
HDAC	Histondeacetylase
HRP	Horseradish peroxidase
IKK	I κ B kinase
IL1 β /6	Interleukin1 β /6
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KD	Knockdown
KMT1a/1b	Lysinmethyltransferase1a/1b
KO	Knockout
LIG1/3	Ligase1/3
LSD	Lysin-specific demethylase
MAO	Monoaminoxidase
MAP-Kinase	Mitogen activated protein kinase
MAPKKK	Mitogen activated protein kinase kinase kinase kinase

MBD4	Methyl-CpG binding domain4
MEK	Mitogen activated protein kinase kinase kinase
MET	Mesenchymale-epitheliale Transition
MH-Domäne	Mad-Homologie-Domäne
MIP1- α	Macrophage Inflammatory Protein
MIZ1 (ZBTB17)	Zinc finger and BTB domain containing 17
MKK3/4/6	Mitogen-activated protein kinase kinase3/4/6
MLDS	Multiple low dose of streptozotocin
MPG	Methylpurine glycosylase
mRNA	messenger RNA
MTH1	MutT Homolog1
MUTYH	MutY-Homolog
NAC	N-Acetylcystein
NCAD	N-Cadherin
NCL	Nucleolin
NEIL1/2/3	Nei Like DNA Glycosylase1/2/3
NF κ B	Nuclear factor kappa B
NoRT	No Reverse Transcriptase
NOX4	NADPH oxidase4
NRF2	Nuclear factor (erythroid-derived)-like 2
NTC	Non-template control
NTH1	Endonuclease III-like protein1
OGG1	8-Oxoguanine glycosylase
PARP1	Poly(ADP-ribose)-Polymerase1
PBS	phosphate buffered saline
PBSCMF	phosphate buffered saline (calcium magnesium free)
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PDTC	Pyrrolidindithiocarbamat
PI	Propidiumiodid
Pi3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKC	Proteinkinase C

POL	DNA Polymerase
PNKP	Polynucleotide phosphatase/-kinase
qRT-PCR	quantitative Realtime PCR
RCF	Replication factor C
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-associated protein kinase
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SBE	SMAD-Bindungs-Element
SDHA	Succinyldehydrogenase A
SDS	sodium dodecyl sulfate
SHC	SHC adapter protein
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	Short interfering RNA
SMAD	Mothers against decapentaplegic homolog
SMUG1	Single strand selective monofunctional uracil DNA-Glycosylase1
SOD	Superoxiddismutase
SOS1	SOS Ras/Rac guanine nucleotide exchange factor 1
Sp	Spiroiminodihydantoin
Sp1	Specificity protein 1
SSB	Einzelstrangbruch (DNA)
SNAI1	Snail family transcriptional repressor 1
STAT3	Signal transducer and activator of transcription1
TAK1	Transforming growth factor β activated kinase
TBP	Tata Binding Protein
TET1/2/3	Ten eleven translocation Methylcytosin-Deoxygenase1/2/3
TGF β	Transforming growth factor beta
TNF α	Tumor necrosis factor α
TDG	Thymine-DNA glycosylase
TRAF6	TNF receptor associated factor6
UNG	uracil-DNA glycosylase
Wnt	Wingless
ZEB1/2	Zinc finger E-box binding homeobox 1/2

XRCC1	X-ray repair cross-complementing protein 1
ZNF217	Zinc finger protein217