

Untersuchungen zur Reparatur und Mutagenität
oxidativer DNA-Schäden *in vivo* und deren
Bedeutung für die Kanzerogenese

Dissertation zum Erlangen des Grades

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN

im Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz

vorgelegt von

Christian Trapp

geboren in Speyer

Mainz 2006

Dekan:

Erster Gutachter:

Zweiter Gutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.2006

Danksagung

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IX
1 ZUSAMMENFASSUNG	1
2 EINLEITUNG UND STAND DER FORSCHUNG	4
2.1 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress	6
2.1.1 Endogene Quellen reaktiver Sauerstoffspezies	7
2.1.2 Endogene mitochondriale ROS-Produktion und ihre Konsequenzen	8
2.1.3 ROS durch Peroxisomen und Peroxisomenproliferatoren	11
2.1.3.1 Aufbau und Funktion von Peroxisomen	11
2.1.3.2 Peroxisomenproliferatoren	12
2.1.3.3 Peroxisomenproliferatoren und Leberkrebs	13
2.1.3.4 Der Peroxisomenproliferator WY-14,643	15
2.2 Oxidative DNA-Modifikationen	15
2.3 Biologische Konsequenzen oxidativer DNA-Schäden	17
2.4 DNA-Reparaturmechanismen	18
2.4.1 Direkte Reparatur (Schadensreversion)	19
2.4.2 Basenexcisionsreparatur	20
2.4.2.1 Reparaturenzyme für 8-Hydroxyguanin	24
2.4.3 Nukleotidexcisionsreparatur und transkriptionsgekoppelte Reparatur	27
2.4.4 Postreplikative Reparatur (<i>mismatch</i> -Reparatur)	28
2.4.5 Reparatur mitochondrialer DNA Schäden	29
2.4.6 Die Rolle ausgewählter Hilfsproteine bei der DNA-Reparatur	30
2.4.6.1 Cockayne Syndrom B Protein	31
2.4.6.2 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase	31
3 ZIELSETZUNG	33
4 MATERIAL UND METHODEN	35
4.1 Material	35
4.1.1 Geräte	35
4.1.2 Hilfsmaterialien & Kits	37
4.1.3 Chemikalien	38
4.1.4 Enzyme	40
4.1.5 DNA	41
4.1.6 Oligonukleotide	41
4.1.7 Zelllinien	42
4.1.8 Bakterien	43
4.1.9 Mäuse	44
4.1.10 Verwendete Puffer, Lösungen und Medien	45

4.1.10.1 Zellkultur	45
4.1.10.2 Glutathion-Depletion und Glutathion-Gehalt	46
4.1.10.3 Typisierung von Mäusen	46
4.1.10.4 Isolierung primärer Hepatozyten	47
4.1.10.5 Genexpressionsbestimmung der ACOX1 und PPAR α durch RT-PCR.....	49
4.1.10.6 Alkalische Elution	49
4.1.10.7 Cleavage-Assay	51
4.1.10.8 Big Blue [®] Mutations-Assay.....	52
4.1.10.9 Mitochondrialer DNA-Relaxationsassay.....	53
4.2 Methoden	55
4.2.1 Arbeiten mit Zellen.....	55
4.2.1.1 Zellkultur und Zellpflege	55
4.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	55
4.2.1.3 Depletion der zellulären Glutathion-Spiegel.....	56
4.2.1.4 Enzymatische Quantifizierung des Glutathion-Gehaltes.....	56
4.2.1.5 Behandlung von Zellen mit WY-14,643.....	58
4.2.1.6 Bestimmung der Genexpression von PPAR α mittels RT-PCR.....	58
4.2.2 Arbeiten mit Tieren	58
4.2.2.1 Generierung transgener <i>knockout</i> -Mäuse.....	58
4.2.2.2 Genotypisierung von Mäusen	60
4.2.2.3 Gewinnung primärer Hepatozyten	63
4.2.2.4 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung von Hepatozyten	65
4.2.2.5 Fütterung der Mäuse mit WY-14,643	65
4.2.2.6 Gewichtsmonitoring.....	66
4.2.2.7 Organentnahmen	66
4.2.2.8 Blutentnahme und Plasmagewinnung.....	67
4.2.2.9 Semiquantitative Genexpressionsbestimmung der Acyl-CoA-Oxidase durch RT-PCR.....	67
4.2.2.10 Bestimmung von Mikrokernen.....	71
4.2.3 Alkalische Elution.....	72
4.2.3.1 Prinzip	72
4.2.3.2 Versuchsaufbau	74
4.2.3.3 Durchführung.....	74
4.2.3.4 Auswertung der Alkalischen Elution.....	75
4.2.3.5 Alkalische Schnellelution zur Detektion höherer DNA-Schäden.....	76
4.2.3.6 Bestimmung von Reparaturkinetiken in Säugerzellen	77
4.2.4 Bestimmung der Enzymaktivität von Reparaturenzymen und Zellextrakten mittels <i>Cleavage-Assay</i>	77
4.2.4.1 Herstellung von Zellextrakten.....	78
4.2.4.2 Herstellung der Enzymsubstrate	78
4.2.4.3 Nachweis der 8-oxoG-Glykosylase-Aktivität	79
4.2.4.4 Nachweis der Enzymaktivität von MutY-Protein	79
4.2.4.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	80

4.2.5	Mutations-Assay mit transgenen Big Blue®-Mäusen	81
4.2.5.1	Prinzip	81
4.2.5.2	Isolation genomischer DNA.....	83
4.2.5.3	Verpackung der DNA in □ Phagen	84
4.2.5.4	Überprüfung der Verpackungsreaktion	85
4.2.5.5	Ausplattierung der verpackten DNA Proben	85
4.2.5.6	Mutantenscreening.....	86
4.2.5.7	Amplifizierung und Sequenzierung des <i>lacI</i> -Gens der Mutanten.....	87
4.2.6	Mitochondrialer DNA-Relaxationsassay	88
4.2.6.1	Prinzip des DNA-Relaxationsassay	88
4.2.6.2	Gewinnung von Mitochondrien.....	89
4.2.6.3	Isolation von mitochondrialer DNA.....	90
4.2.6.4	Modifizierung von mtDNA und PM2-DNA (Schadensinduktion)	91
4.2.6.5	Enzyminkubation	92
4.2.6.6	Agarosegel-Elektrophorese.....	92
4.2.6.7	Auswertung	93
4.2.7	Statistische Auswertung	94
5	ERGEBNISSE	95
5.1	Oxidative DNA-Schäden in mitochondrialer DNA.....	95
5.1.1	Einsatz eines DNA-Relaxationsassays zur Bestimmung mitochondrialer DNA-Schäden.....	95
5.1.2	Einfluss eines CSB-, OGG1-, und kombinierten CSB/OGG1-Ausfalls auf die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden in mtDNA	99
5.1.3	Altersabhängigkeit eines kombinierten CSB/OGG1-Ausfalls auf die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen.....	100
5.1.4	Nachweis von MutY-sensitiven Läsionen in mtDNA	101
5.1.5	Schadensprofile in mtDNA in Abwesenheit von OGG1 und CSB	103
5.2	Wirkungen des Peroxisomenproliferators WY-14,643.....	105
5.2.1	Oxidative DNA-Schäden durch WY-14,643 in HEPA1 Zellen.....	105
5.2.2	Einfluss von WY-14,643 auf das Körpergewicht von Wildtyp- und <i>Csb</i> ^{-/-} / <i>Ogg1</i> ^{-/-} -Mäusen	108
5.2.3	Einfluss von WY-14,643 auf das Lebergewicht von Wildtyp und <i>Csb</i> ^{-/-} / <i>Ogg1</i> ^{-/-} -Mäusen	109
5.2.4	Einfluss von WY-14,643 auf die Expression der Acyl-CoA-Oxidase in Mäuselebern.	111
5.2.5	Einfluss von WY-14,643 auf die Hintergrundspiegel Fpg-sensitiver Modifikationen in Wildtyp und <i>Csb</i> ^{-/-} / <i>Ogg1</i> ^{-/-} -Mäusen	112
5.2.6	Einfluss von WY-14,643 auf die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden in mitochondrialer DNA	114
5.2.7	Einfluss von WY-14,643 auf die Mutationsfrequenz in Wildtyp- und <i>Csb</i> ^{-/-} / <i>Ogg1</i> ^{-/-} -Mäusen	115

5.3	Einfluss eines defekten Cockayne Syndrom B Proteins auf Reparatur und Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden in humanen Zellen	116
5.4	Einfluss der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 auf die Reparatur oxidativer DNA-Schäden	119
5.4.1	Auswirkungen des PARP1-Ausfalls sowie eines kombinierten OGG1/PARP1-Ausfalls auf die Hintergrundspiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen und DNA-Einzelstrangbrüche in primären Maushepatozyten	120
5.4.2	Auswirkung eines PARP1 und eines kombinierten PARP1/OGG1-Ausfalls auf die Mikrokernrate in peripheren Mauserythrozyten	123
5.5	Untersuchungen zur Mutagenität von oxidativen DNA-Schäden (8-oxoG) <i>in vivo</i>	125
5.5.1	Generierung transgener reparaturdefizienter Mäuse	125
5.5.2	Spontane Mutationsfrequenzen in Lebern transgener <i>knockout</i> -Mäuse	127
5.5.3	Spontane Mutationsfrequenzen in Lungen transgener <i>knockout</i> -Mäuse	132
5.6	Untersuchungen zum initiierenden Potential von 8-oxoG	134
5.6.1	Einfluss von WY-14,643 auf das Körpergewicht von Wildtyp- und <i>Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}</i> -Mäusen	134
5.6.2	Einfluss von WY-14,643 auf das Lebergewicht von Wildtyp und <i>Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}</i> -Mäusen	136
5.6.3	Einfluss von WY-14,643 auf klinische Parameter in Wildtyp- und <i>Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}</i> -Mäusen	137
5.6.4	Einfluss des Reparaturdefekts in <i>Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}</i> -Mäusen auf die Induktion präneoplastischer Läsionen unter WY-14,643-Behandlung	138
6	DISKUSSION	144
6.1	Sind Mitochondrien endogene Quellen reaktiver Sauerstoffspezies, die zu oxidativen DNA-Schäden führen?	144
6.2	Induziert der Peroxisomenproliferator WY-14,643 oxidative DNA-Schäden <i>in vivo</i> ?	148
6.3	Welche Rolle spielt das CSB-Protein bei der Wahrung der genomischen Integrität?	151
6.4	Welche Rolle spielt die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 bei der Reparatur nukleärer oxidativer DNA Schäden?	153
6.5	Welche Mutagenität besitzt 8-oxoG <i>in vivo</i> ?	156
6.6	Welche Rolle spielen oxidative DNA-Schäden bei der Kanzerogenese?	158
7	LITERATURVERZEICHNIS	161

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

8-oxoG (8-Hydroxyguanin)	7,8-Dihydro-8-oxoguanin
AP-Läsion	Apurinische/apyrimidinische Stelle in der DNA
BER	Basenexcisionsreparatur
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
BSO	Buthioninsulfoximin
CS	Cockayne Syndrom
CSA	Cockayne Syndrom Typ A
CSB	Cockayne Syndrom Typ B
CPD	Cyclobutan-Pyrimidindimer
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Endo	Endonuklease
Exo	Exonuklease
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
Fapy	Formamidopyrimidin
FCS	fötales Kälberserum
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase
GR	Glutathionreduktase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
h	Stunde
k.o.	<i>knockout</i>
MEFs	Mausembryo-Fibroblasten
min	Minute(n)
mRNA	(<i>messenger</i> -) Ribonukleinsäure
MTS	<i>mitochondrial targeting signal</i>
n	Anzahl der Versuche
NER	Nukleotidexcisionsreparatur
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz

Ntg	<i>endonuclease three-like glycosylase</i>
OGG1	8-Hydroxyguanin-DNA-Glykosylase
PARP	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PP	Peroxisomenproliferator
Ro 19-8022	[R]-1-[(10-Chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo[a]chinolizin-1-yl)-carbonyl]-2-pyrrolidin-methanol
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkription bzw. Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPF	spezifisch pathogenfrei
ssb	Einzelstrangbruch (<i>single strand break</i>)
T4 Endo V	T4 Endonuklease V
TCR	Transkriptionsgekoppelte Reparatur
TEAH	Tetraethylammoniumhydroxid
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
VIS	sichtbares Licht (visible light)
wt	Wildtyp
WY-14,643	[4-Chloro-6-(2,3-dimethyl-phenylamino)-pyrimidin-2-ylsulfanyl]-essigsäure
XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i>
XRCC1	<i>X-ray repair cross complementing group 1</i>
ZVTE	Zentrale Versuchstiereinrichtung

SYMBOLE

<i>g</i>	Normalfallbeschleunigung (9,81 m/s ²)
----------	---

Weiterhin werden SI-Abkürzungen und deren Vorsätze zur Bezeichnung von dezimalen Teilen und Vielfachen benutzt.

1 ZUSAMMENFASSUNG

Die hohe Krebsinzidenz in der Bevölkerung kann nur unzureichend mit einer Exposition gegenüber kanzerogenen Noxen erklärt werden. Es ist daher eine interessante Theorie, dass vielmehr auch endogene Faktoren eine entscheidende Rolle bei der Krebsentstehung spielen. Zu diesen endogenen Faktoren gehören u.a. die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen, wie 8-Hydroxyguanin (8-oxoG), die in allen Zellen gefunden werden und höchstwahrscheinlich ein Gleichgewicht zwischen einer permanenten Generierung durch endogen gebildete reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und einer gleichzeitigen Entfernung durch die Mechanismen der DNA-Reparatur darstellen. Nicht reparierte oxidative DNA-Modifikationen tragen zur spontanen Mutationsrate in Zellen bei und spielen so eine entscheidende Rolle bei der Krebsentstehung.

Ein erster Schwerpunkt dieser Arbeit lag in der Untersuchung, ob Mitochondrien und Peroxisomen als Hauptquellen endogen gebildeter ROS zu den Hintergrundspiegeln oxidativer DNA-Modifikationen beitragen. Im Fall der Mitochondrien wurde dazu ein DNA-Relaxationsassay etabliert und mitochondriale DNA-Schäden mit Hilfe verschiedener DNA-Reparaturenukleasen in den Lebern von Mäusen bestimmt. Die Tatsache, dass sich die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden in Wildtyp- und reparaturdefizienten *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen nicht unterscheiden und auch keine altersabhängige Erhöhung der Schäden detektiert wurde, lässt auf alternative mitochondriale Strategien bei der Abwehr oxidativer DNA-Schäden schließen.

Mit Hilfe des Peroxisomenproliferators WY-14,643 wurde die ROS-Produktion in Peroxisomen von Wildtyp- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen durch eine gesteigerte Expression der Acyl-CoA-Oxidase erhöht. Obwohl die behandelten Tiere sehr effektiv auf die Behandlung mit dem Peroxisomenproliferator ansprachen, kam es nicht zu einer Erhöhung der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen. Die DNA-Schäden in genomischer DNA wurden in frisch isolierten Hepatozyten mit Hilfe einer modifizierten Alkalischen Elutionstechnik und der bakteriellen Reparaturenuklease FPG (Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase) bestimmt. In Peroxisomen produzierte ROS tragen somit nicht zu den Hintergrundspiegeln oxidativer DNA-Schäden bei.

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit stellten mechanistische Untersuchungen zur Bedeutung der 8-Hydroxyguanin-Glykosylase (OGG1) und des Cockayne Syndrom B-Proteins (CSB) bei der Basenexcisionsreparatur oxidativer DNA-Modifikationen dar. Experimentell wurden dazu transgene *Csb*^{-/-}, *Ogg1*^{-/-} und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäuse generiert, die das bakterielle *LacI*-Gen (BigBlue®) tragen und somit für *in vivo* Mutationsversuche eingesetzt werden konnten. Die Bestimmung der Mutationsfrequenzen in Lebern der diversen Genotypen zeigte, dass es in *Ogg1*^{-/-}-Mäusen zu einer 2,1-fachen und in *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen zu einer statistisch signifikanten 3,3-fachen Erhöhung der spontanen Mutationsfrequenz im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen kam. Die molekulare Analyse der Mutationen zeigte, dass das vermehrte Auftreten von Mutationen in *Ogg1*^{-/-}- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen vor allem auf eine erhöhte Bildung von G:C zu T:A Transversionen, die typischerweise aus nicht repariertem 8-oxoG entstehen, zurückgeführt werden kann. Dies zeigt, dass CSB in einem *back-up*-Reparaturweg, selbst in nicht transkribierten Genen, einen Ausfall des OGG1-Proteins funktional komplementieren kann. Die Tatsache, dass in *Csb*^{-/-}-Mäusen keine signifikante Erhöhung der Mutationsfrequenz im Vergleich zu Wildtyp-Tieren gefunden wurde, legt nahe, dass OGG1 das primäre Abwehrsystem gegen oxidative DNA-Schäden darstellt. Als weiterer Interaktionspartner in dieser OGG1-unabhängigen, aber CSB-abhängigen *back-up*-Reparatur *in vivo* konnte die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP 1) identifiziert werden. Es zeigte sich, dass *Parp1*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäuse altersabhängig mehr oxidative DNA-Schäden in der Leber akkumulieren als *Ogg1*^{-/-}-Mäuse, wohingegen der alleinige Ausfall des PARP 1-Proteins keinen Einfluss auf die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden hat.

Durch eine Korrelation der gefundenen spontanen Mutationen in der Leber von Wildtyp-, *Csb*^{-/-}-, *Ogg1*^{-/-}- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen mit den Hintergrundspiegeln Fpg-sensitiver Modifikationen konnte eine Abschätzung der Mutagenität von oxidativen DNA-Modifikationen *in vivo* erfolgen. Die Daten zeigen, dass bereits weniger als 0,2 Fpg-sensitive Modifikationen pro 10⁶ bp ausreichen, die spontane Mutationsfrequenz zu verdoppeln.

Um letztendlich eine Aussage über den Beitrag oxidativer DNA-Schäden bei der Kanzerogenese treffen zu können, wurden Wildtyp und reparaturdefiziente

Csb^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäuse mit dem Peroxisomenproliferator WY-14,643 als spezifischem Leberpromotor behandelt, um spontan initiierte Hepatozyten zur Zellteilung anzuregen. Eine in Zusammenarbeit durchgeführte Analyse präneoplastischer Läsionen in Leberschnitten der untersuchten Genotypen zeigte, dass in *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen eine signifikant erhöhte Anzahl an Glucose-6-Phosphatase positiver und negativer Läsionen zu finden war, die als Vorstufen einer malignen Entartung angesehen werden können.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine Erhöhung der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen, z.B. durch eine fehlerhafte Reparatur zu einer Erhöhung der spontanen Mutationsfrequenz führen und somit einen entscheidenden Beitrag bei der Krebsentstehung leisten können.

2 EINLEITUNG UND STAND DER FORSCHUNG

Krebs ist in den westlichen Industrienationen nach den Herz-Kreislauf-erkrankungen die zweithäufigste Todesursache. Daher besteht großes Interesse, die der Erkrankung zugrunde liegenden Mechanismen bei der Entstehung und beim Fortschreiten der Erkrankung (Kanzergenese) aufzuklären.

Es ist bekannt, dass Umweltfaktoren und der individuelle Lebensstil größte Bedeutung für das Krebsrisiko haben. Der Einfluss einer genetischen Prädisposition ist zwar ebenfalls gut belegt, insgesamt aber wohl weniger wichtig (Lichtenstein et al., 2000; Risch, 2001). Obwohl viele der kanzerogenen Noxen, die in der Umwelt vorkommen (wie Aflatoxine, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Sonnenlicht, Asbest) bereits identifiziert sind, kann die Konzentration und das mutagene Potential dieser Stoffe in der Umwelt nur schwer die hohe sporadische Krebsinzidenz in der Bevölkerung erklären (Gold et al., 1992; Ames und Gold, 2000). Es ist daher eine interessante Theorie, dass auch endogene Faktoren eine entscheidende Rolle bei der Krebsentstehung spielen.

Zu diesen endogenen Faktoren gehören unter anderem oxidative DNA-Schäden, die durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) verursacht werden. Nach heutiger Kenntnis unterliegt die DNA einer permanenten Schädigung durch ROS, wie Hydroxylradikale, Superoxid-Radikalanionen und Wasserstoffperoxid, die als ein Nebenprodukt des oxidativen Metabolismus entstehen können (Collins, 1999; Marnett, 2000). Diesem Prozess stehen in gesunden Zellen Abwehrmechanismen gegenüber, vor allem Antioxidantien, die die zellulären Bestandteile vor einer Schädigung durch ROS schützen können. Andererseits existieren verschiedene DNA-Reparaturmechanismen, die durch ihre Funktion einen Beitrag zur Wahrung der genomischen Stabilität der DNA leisten (vgl. 2.4). Aus der Bildungsgeschwindigkeit der DNA-Schäden einerseits und der Reparaturgeschwindigkeit andererseits resultieren in allen Zellen basale Hintergrund- bzw. Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Modifikationen, von denen 8-Hydroxyguanin (8-oxoG) wahrscheinlich die mengenmäßig häufigste ist. Die Anzahl an 8-oxoG in der DNA einer Zelle wird daher auch als Biomarker für zellulären oxidativen Stress herangezogen (Kasai et al., 1993).

Jede Erhöhung dieser Gleichgewichtsspiegel, z.B. durch vermehrte Bildung oder schlechtes Abfangen von ROS, führt zu einem erhöhten Mutationsrisiko (vgl. Abbildung 1). Treten diese Mutationen in Protoonkogenen (wie zum Beispiel ras, c-myc) oder Tumorsuppressorgenen (wie zum Beispiel p53, p16, RB, APC) auf, kann es zur malignen Entartung und damit Krebsentstehung kommen. Aus Abbildung 1 ergibt sich auch die Hypothese, dass Gene, die an der Reparatur oxidativer DNA-Schäden beteiligt sind, indirekt tumor-suppressive Eigenschaften aufweisen könnten (=“caretaker-Gene“). Ein Ausfall könnte die spontane Mutationsrate erhöhen und damit einen Beitrag zu malignen Entartung leisten (Mutatorhypothese) (Loeb, 1998; Loeb, 2001; Loeb et al., 2003).

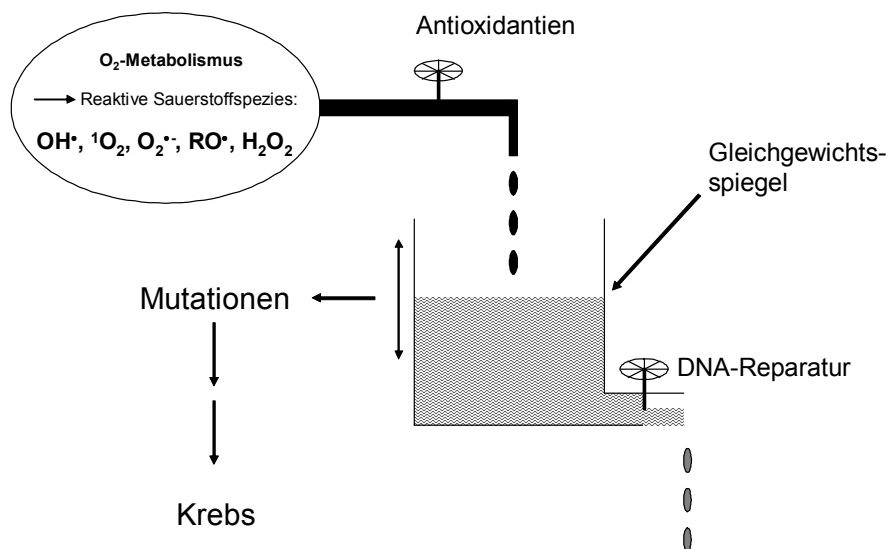


Abbildung 1: Ursprung und Beeinflussbarkeit der basalen Gleichgewichtsspiegel oxidativer DNA-Modifikationen in Zellen und mögliche biologische Konsequenzen (nach Epe, 2002).

Es gibt in den letzten Jahren viele Hinweise dafür, dass oxidative Modifikationen in der DNA tatsächlich wichtige Vorstufen initiiierender Mutationen darstellen (Wiseman und Halliwell, 1996; Beckman und Ames, 1997; Sekiguchi und Tsuzuki, 2002). So wurde gezeigt, dass Kaliumbromat, das oxidative DNA-Schäden generieren kann (Ballmaier und Epe, 1995; Ballmaier und Epe, 2006), in Nagern zu einer Erhöhung der Krebsinzidenz führt (Kurokawa et al., 1990). Aus diesen Expositionsexperimenten kann jedoch nur ungenau das Risiko von endogenen

gebildeten oxidativen DNA-Schäden für die „spontane“ Krebsentstehung abgeschätzt werden.

Einen Hinweis für das Risiko von endogen erzeugten oxidativen DNA-Schäden erhält man, wenn man Genotypen betrachtet, bei denen DNA-Reparaturdefekte für 8-oxoG bestehen. So wurde berichtet, dass menschliche Ösophaguskarzinome (Hagiwara et al., 2005), Magen- (Shinmura et al., 1998), Lungen- und Nierentumoren (Chevallard et al., 1998; Audebert et al., 2000) mit einem Verlust des Genabschnitts der humanen 8-Hydroxyguanin-DNA-Glykosylase (*Ogg1*) (*LOH: loss of heterozygosity*) einhergehen. Ein weiteres wichtiges Indiz für die Wichtigkeit von oxidativen DNA-Schäden, vor allem 8-oxoG, ergibt sich aus der Analyse von Mutationsmustern des Tumorsuppressorgens p53 in diversen Tumorgeweben. Es konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Krebsarten vor allem G:C zu T:A Transversionen zu finden sind (Wiseman und Halliwell, 1996), die typischerweise auf nicht repariertes 8-oxoG zurückzuführen sind.

Die vorliegende Arbeit dient dem Ziel, die Bedeutung oxidativer DNA-Schäden für die Kanzerogenese auch quantitativ besser abschätzen zu können. Grundgedanke dabei ist es, die Folgen eines Ausfalls der spezifischen Reparatur oxidativer DNA-Schäden und damit eines definierten Anstiegs der Gleichgewichtsspiegel der DNA-Modifikationen (vgl. Abbildung 1) *in vivo* zu erfassen. In den folgenden Abschnitten werden darum zumindest die Grundlagen der Bildung und Reparatur oxidativer DNA-Schäden erläutert.

2.1 Reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress

In allen aeroben Organismen wird Sauerstoff in großen Mengen zur Energiegewinnung benötigt. Als Nebenprodukt können dabei reaktive Sauerstoffspezies entstehen (vgl. Tabelle 1), deren vermehrte Bildung zu einer Störung des Verhältnisses aus Prooxidantien und Antioxidantien zugunsten der Prooxidantien führt. Die vermehrte Bildung oder der verminderte Abbau von ROS wird auch als oxidativer Stress bezeichnet (Sies, 1991). Als Folge von oxidativem Stress kann es zur vermehrten Schädigung von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren kommen. Diese Schädigungen sind an Änderungen in der

Signaltransduktion beteiligt (Baeuerle et al., 1996) und haben Einfluss auf Alterungsprozesse, Krebsentstehung und Entzündungsreaktionen.

In Tabelle 1 sind die wichtigsten reaktiven Sauerstoffspezies und ihre geschätzte Lebensdauer aufgeführt.

Tabelle 1: Reaktive Sauerstoffspezies und ihre geschätzte Lebensdauer (Sies, 1993).

Reaktive Sauerstoffspezies	Halbwertszeit [s]
$\text{HO}^\cdot$, Hydroxylradikal	10^{-9}
$^1\text{O}_2$, Singulett-Sauerstoff	10^{-6}
$\text{O}_2^{\cdot -}$, Superoxid-Radikal	Dismutation
H_2O_2 , Wasserstoffperoxid	enzymatischer Abbau
$\text{RO}^\cdot$, Alkoxy-Radikal	10^{-6}
$\text{ROO}^\cdot$, Peroxylradikal	7
$\text{NO}^\cdot$, Stickstoffmonoxid	1 – 10

2.1.1 Endogene Quellen reaktiver Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies können sowohl durch exogene (wie Sonnenstrahlung), als auch endogene Faktoren gebildet werden. Die wahrscheinlich wichtigsten endogenen Quellen reaktiver Sauerstoffspezies sind in Tabelle 2 aufgezeigt.

Tabelle 2: Quantitativ bedeutsame endogene Quellen für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (Klotz, 2003; Waris und Ahsan, 2006).

Endogene Quellen reaktiver Sauerstoffspezies

Mitochondriale Atmungskette

Peroxisomen

Purinabbau (Xanthinoxidase)

Xenobiotika-Metabolismus über das Cytochrom-P-450-System

Granulozyten (NADPH-Oxidase & Myeloperoxidase)

Arachidonsäuremetabolismus

Es wird geschätzt, dass mitochondriale-, peroxisomale-, mikrosomale- und cytosolische Enzyme mit je 15%, 35%, 45% bzw. 5% zur Gesamtproduktion von Wasserstoffperoxid in der Rattenleber beitragen (Boveris et al., 1972). Trotz der hohen Produktion von ROS in diesen Zellkompartimenten ist nur teilweise geklärt, ob überhaupt und wenn ja, welchen absoluten Beitrag diese Quellen zu den Hintergrundspiegeln oxidativer DNA-Modifikationen beisteuern.

Im Folgenden sollen die Mitochondrien (vgl. 2.1.2) und die Peroxisomen (vgl. 2.1.3) als Hauptquellen reaktiver Sauerstoffspezies näher beschrieben werden.

2.1.2 Endogene mitochondriale ROS-Produktion und ihre Konsequenzen

Mitochondrien verbrauchen als Hauptenergielieferanten der Zelle unter physiologischen Bedingungen mehr als 90% des zellulär aufgenommenen Sauerstoffs (Boveris et al., 1972). Davon werden etwa 1–5% zu Superoxidradikalen reduziert (Turrens und Boveris, 1980). Unter pathologischen Bedingungen können die Spiegel an Superoxidradikalen noch erhöht sein (Mecocci et al., 1993; Mecocci et al., 1994). In den Mitochondrien sind die Komplexe I und III die Hauptquellen für die Produktion von Superoxidradikalen. Abbildung 2 zeigt die Produktion von ROS in der mitochondrialen Atmungskette.

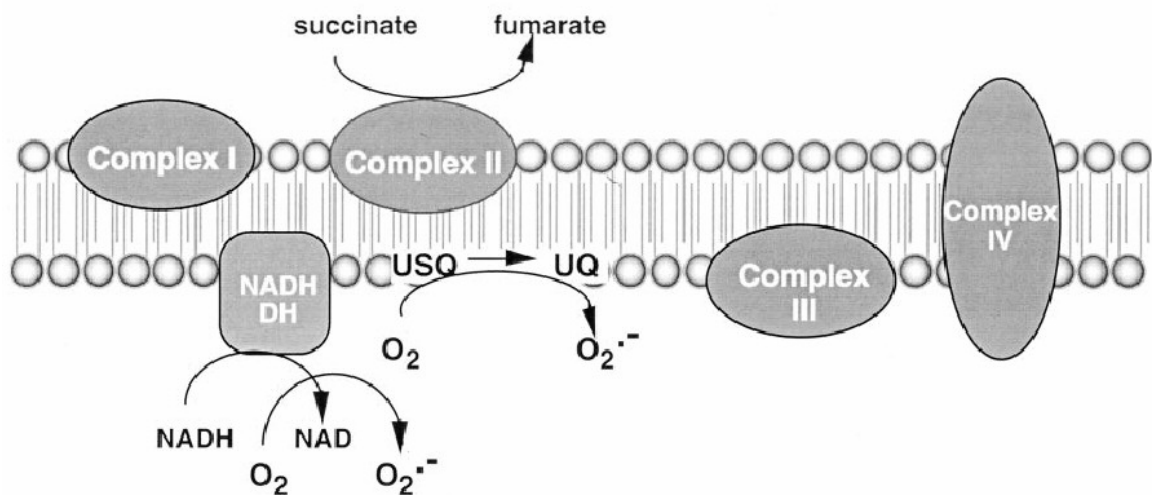


Abbildung 2: ROS-Produktion in der mitochondrialen Atmungskette (Kehrer, 2000).

Superoxidradikale entstehen in Komplex I durch die Übertragung eines Elektrons von der NADH Dehydrogenase auf molekularen Sauerstoff. Des Weiteren können auch Elektronen von Ubichinon (Coenzym Q), welches als Elektronenüberträger zwischen den Komplexen II und III fungiert, auf Sauerstoff übertragen werden (Kehrer, 2000). Superoxidradikale werden durch die Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) umgewandelt. H_2O_2 kann nun durch Katalase oder Glutathionperoxidase (GPx) abgebaut werden. Geschieht dies nicht, kann es zu einer metallkatalysierten *Haber-Weiss-Reaktion* kommen, welche über eine *Fenton-Reaktion* verläuft und letztendlich Hydroxylradikale generiert. Aufgrund ihrer kurzen Halbwertszeit und fehlender enzymatischer Inaktivierungssysteme werden Hydroxylradikale als das ultimativ schädigende Agens angesehen.

Wegen der nahen räumlichen Lage der mitochondrialen DNA (mtDNA) zur Atmungskette und dem Fehlen von Introns wurde spekuliert, dass mtDNA besonders anfällig für eine Schädigung durch ROS ist (Miquel, 1991). Weiterhin können auch Enzyme der Atmungskette geschädigt werden, was langfristig zu einer Abnahme der zellulären Energieproduktion führt. Als Konsequenz der fehlerhaften Atmungskette produzieren die geschädigten Mitochondrien vermehrt Sauerstoffradikale (Perl, 2003). Diese attackieren wiederum mitochondriale

Strukturen, wobei sich der Teufelskreis zwischen ROS-Produktion und Schädigung durch ROS schließt (Abbildung 3).

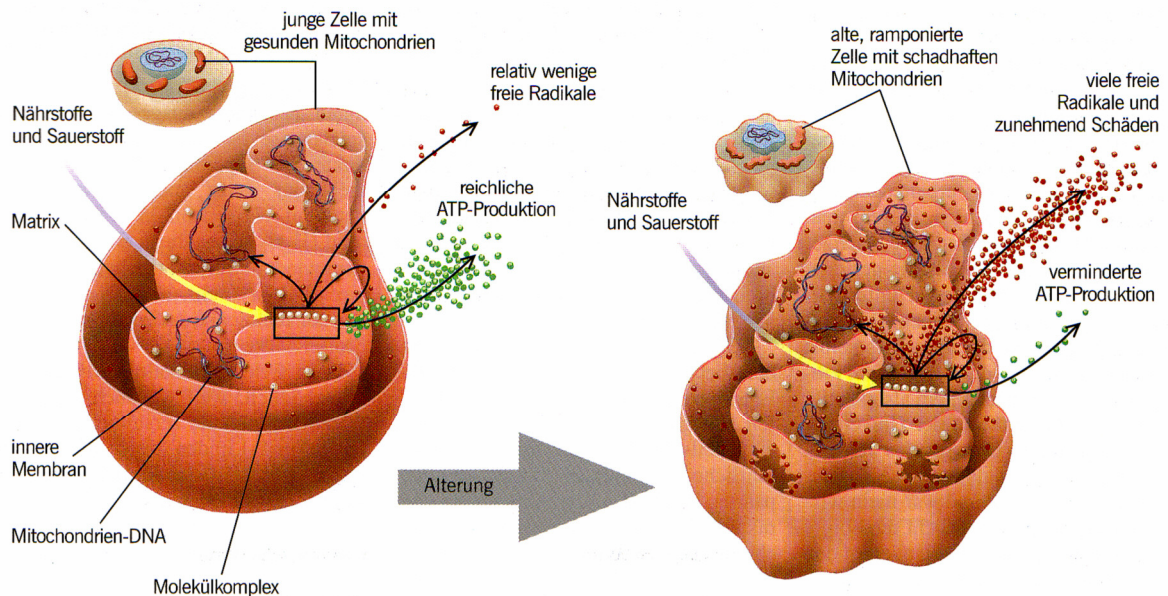


Abbildung 3: Auswirkungen von oxidativem Stress auf mitochondriale Strukturen (Perl, 2003)

Wie in Abbildung 3 gezeigt, können mitochondriale ROS nicht nur mtDNA schädigen, sondern gelangen mit zunehmendem Integritätsverlust der Mitochondrien auch vermehrt ins Cytoplasma, wo sie mit anderen Zellbestandteilen abreagieren können.

Obwohl die absoluten Hintergrundspiegel oxidativer mtDNA-Schäden in Abhängigkeit von der benutzten Messmethode stark schwanken, werden mitochondriale DNA-Schäden kausal mit verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen, Alterungsprozessen und der Entstehung von Krebs in Verbindung gebracht. (Bandy und Davison, 1990; Hayakawa et al., 1992; Mecocci et al., 1993; Schapira, 1999; Berneburg et al., 2006).

2.1.3 ROS durch Peroxisomen und Peroxisomenproliferatoren

2.1.3.1 Aufbau und Funktion von Peroxisomen

Peroxisomen sind kleine, mit einfachen Membranen umhüllte Zellorganellen, die sich im Cytoplasma von eukaryotischen Zellen befinden. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Regulation von Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel, wie der peroxisomalen β -Oxidation (Abbildung 4). Diese dient primär nicht der Energiegewinnung, sondern der Verkürzung von sehr langkettigen Fettsäuren (C_{24} , C_{26}) (Kunau et al., 1995).

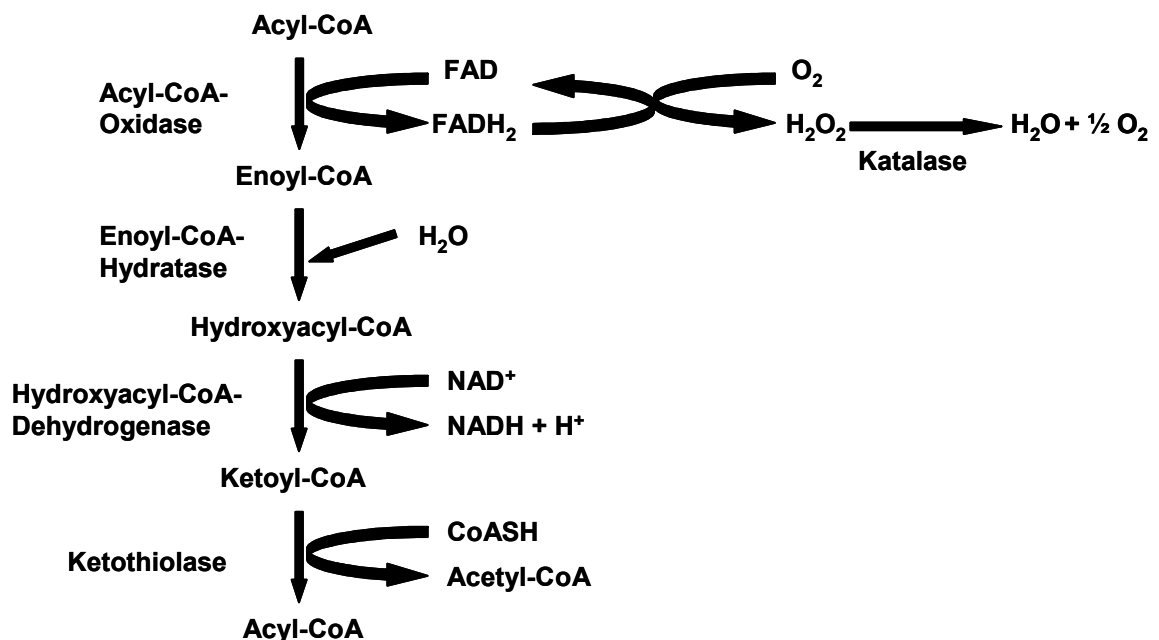


Abbildung 4: Peroxisomale β -Oxidation (nach Karlson et al., 1993).

Im ersten Schritt katalysiert eine peroxisomale Acyl-CoA-Oxidase die Übertragung von FAD-gebundenem Wasserstoff auf Sauerstoff, so dass neben dem entsprechenden Enoyl-CoA auch Wasserstoffperoxid entsteht. Wird H_2O_2 nun nicht durch Katalase entgiftet, kann es, wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben, zur Bildung von Hydroxylradikalen kommen (Schrader und Fahimi, 2004). Entweicht H_2O_2 in das Cytosol und gelangt in den Kern, kann es dort zu den Hintergrundspiegeln oxidativer DNA-Modifikationen beitragen.

2.1.3.2 Peroxisomenproliferatoren

Peroxisomenproliferatoren (PP) gehören aus chemischer Sicht zu einer strukturell sehr heterogenen Klasse von natürlichen und synthetischen Verbindungen. Zu diesen Verbindungen zählen die *Fibrate*, wie Clofibrat und Bezafibrat, verschiedene Weichmacher, wie DEHP, aber auch nichtsteroidale Antirheumatika wie Indometacin (Moody und Reddy, 1978; Willson und Wahli, 1997; Corton et al., 2000; Escher und Wahli, 2000). Als natürliche Verbindungen wurden verschiedene langkettige Fettsäuren identifiziert (Keller et al., 1993). Der Name der Peroxisomenproliferatoren leitet sich von der Fähigkeit dieser Verbindungen ab, Peroxisomen zur Proliferation anzuregen. Unter physiologischen Bedingungen nehmen Peroxisomen 2% des Cytoplasmavolumens ein (Reddy und Lalwai, 1983). Nach einer Behandlung mit PP können Peroxisomen bis zu 25% des Cytoplasmavolumens einnehmen (Reddy et al., 1977). Als molekulare Schaltstelle für die Peroxisomenproliferation konnte ein sogenannter Peroxisomenproliferator aktivierter Rezeptor α (PPAR α) identifiziert werden (Isseman und Green, 1990). PPAR α -*knockout*-Mäuse sprechen nicht auf eine Behandlung mit PP an (Peters et al., 1997; Hays et al., 2005). Die Stimulation der Rezeptorsubtypen PPAR β/δ und PPAR γ führen nicht zu einer Peroxisomenproliferation (Yeldandi et al., 2000). Neben der Peroxisomenproliferation sind die oben genannten Substanzen in der Lage, die Leber zur Proliferation anzuregen, was sich in einer Zunahme des Lebergewichts äußert. Außerdem kommt es zu Genexpressionsveränderungen von Enzymen, die am Fettsäuremetabolismus beteiligt sind (Lock et al., 1989).

Aus toxikologischer Sicht sind Peroxisomenproliferatoren besonders interessant, da eine chronische Verabreichung dieser Substanzen an Mäuse und Ratten zu Leberkrebs führt (Reddy et al., 1980). Peroxisomenproliferatoren besitzen jedoch typischerweise kein direktes mutagenes Potential (Galloway et al., 2000). Vielmehr konnte gezeigt werden, dass Peroxisomenproliferatoren zu einer starken transkriptionellen Aktivierung der peroxisomalen H₂O₂-produzierenden Acyl-CoA-Oxidase führen, wohingegen die Transkription der Katalase kaum beeinflusst wird (Reddy et al., 1986). Das daraus resultierende Missverhältnis aus der Generierung von ROS und deren Abbau, könnte zu oxidativem Stress und daraus resultierend zu oxidativen DNA-Schäden führen (Reddy und Lalwai, 1983; Yeldandi et al.,

2000). Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass es bereits nach zweiwöchiger Behandlung mit Fenofibrat zu einem 89%igen Anstieg der zellulären Wasserstoffperoxid-Konzentration kommt (Arnaiz et al., 1995). Ob der so generierte oxidative Stress auch vermehrt zu oxidativen DNA-Schäden führt und diese Schäden dann ursächlich an der Entstehung von Hepatomen beteiligt sind, ist derzeit noch Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion.

Die Wirkungen von Peroxisomenproliferatoren sind extrem artspezifisch. Während Nager wie Maus und Ratte sehr stark ansprechen, Hamster intermediär, lassen sich in Hunden und Primaten nur schwache bis geringe peroxisomenproliferierende Wirkungen erkennen (Hoivik et al., 2004; Peters et al., 2005).

2.1.3.3 Peroxisomenproliferatoren und Leberkrebs

Die bereits beschriebenen (vgl. 2.1.3.2) und weitere Mechanismen, die zur PP induzierten Leberkanzerogenese beitragen könnten, sind in Abbildung 5 zusammengefasst.

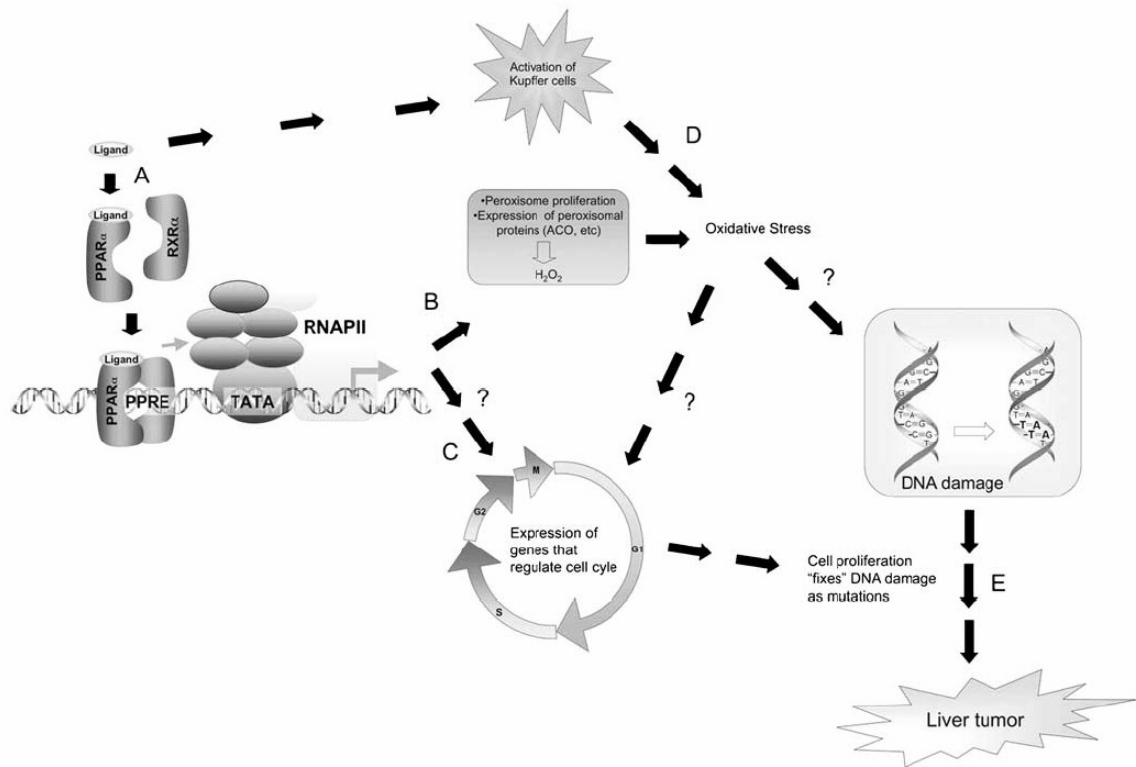


Abbildung 5: Mögliche Mechanismen für die PP induzierte Kanzerogenese (Peters et al., 2005).

Die Bindung von Liganden an PPAR α (A) führt zu einer Aktivierung von Targetgenen, einschließlich der Acyl-CoA-Oxidase (ACO oder ACOX1) (B). Dadurch kommt es auch zur Aktivierung der Zellproliferation (C), wobei noch nicht eindeutig geklärt ist, ob dies über eine direkte Interaktion mit einem noch nicht bekannten Targetgen oder über indirekte Mechanismen abläuft. Liganden für PPAR α können auch unabhängig von PPAR α Kupferzellen aktivieren, die via ROS einen Signalgeber für die Zellteilung benachbarter Hepatozyten darstellen könnten (D). Ob die bei der Behandlung mit PP gebildeten ROS auch zu oxidativen DNA-Schäden und damit zu Mutationen führen oder nur über die Stimulation der Zellteilung das Tumorstadium fördern ist ungewiss. Die gesteigerte Zellproliferation fixiert im letzten Fall spontane, im ersten Fall auch durch ROS induzierte DNA-Schäden zu Mutationen und führt letztendlich zur Entstehung von Leberkrebs (E) (Klaunig et al., 2003; Peters et al., 2005).

Auf die molekularen Mechanismen der gesteigerten Zellproliferation, unter einer Behandlung mit Peroxisomenproliferatoren, soll im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen. Der Focus sollte vielmehr auf die Frage gelenkt werden, ob

(I) der Peroxisomenproliferator WY-14,643 zu oxidativen DNA-Schäden *in vivo* führt oder (II) ob vor allem die PP induzierte Zellproliferation eine Rolle bei der Kanzerogenese spielt.

2.1.3.4 Der Peroxisomenproliferator WY-14,643

WY-14,643 ist ein Peroxisomenproliferator, der von der Firma Wyeth zur Behandlung von Hypertriglyceridämien entwickelt wurde. Trotz der Fähigkeit, die Plasmaspiegel an Triglyceriden in Mäusen effektiv zu senken (Reddy et al., 1977), wurde die Substanz nie in klinischen Phasen getestet. Vielmehr wird die Substanz heute zu Forschungszwecken als potenter PPAR α -Agonist eingesetzt. Die Substanz zeigt alle für PP typischen Eigenschaften (vgl. 2.1.3.2).

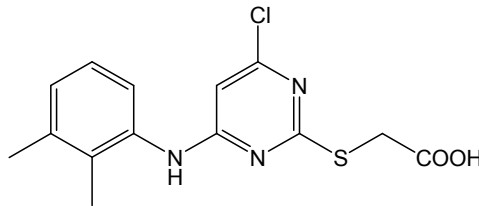


Abbildung 6: Strukturformel von WY-14,643;
[4-Chloro-6-(2,3-dimethyl-phenylamino)-pyrimidin-2-ylsulfanyl]-essigsäure.

2.2 Oxidative DNA-Modifikationen

Die in Tabelle 1 gezeigten ROS können die DNA auf unterschiedliche Art und Weise schädigen. Bis heute konnten mehr als 100 verschiedene DNA-Modifikationen identifiziert werden (Halliwell und Aruoma, 1991; Dizdaroglu, 1992). Dabei kann die DNA-Base oder das Phosphat-Zuckergerüst geschädigt werden. Zu den verschiedenen Modifikationen der DNA zählen Einzel- und Doppelstrangbrüche, modifizierte Basen, AP-Stellen, sowie Protein-DNA-Quervernetzungen. Einige dieser Modifikationen sind in Abbildung 7 dargestellt.

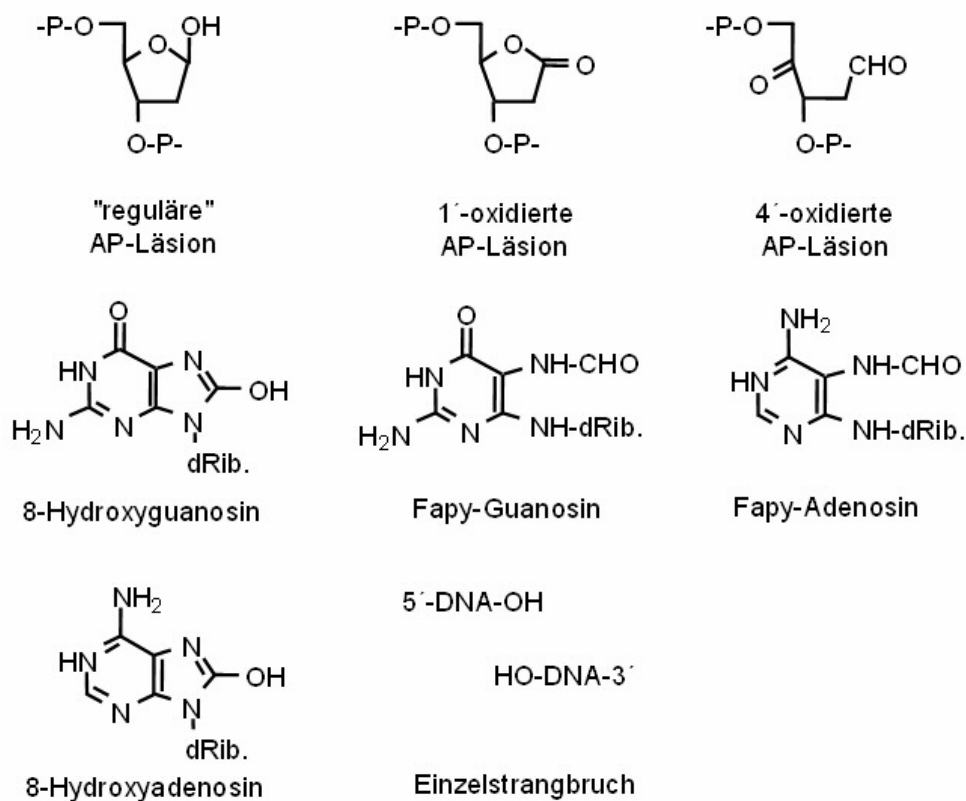


Abbildung 7: Struktur einiger DNA-Modifikationen, die durch ROS induziert werden.

Die mengenmäßig in zellulärer DNA vermutlich am häufigsten vorkommende DNA-Modifikation, das 8-Hydroxyguanin (8-oxoG), kann durch Addition eines OH-Radikals an Position C8 des Guanins gebildet werden (Epe, 1995; Loft und Poulsen, 1996), aber auch durch Einwirkung von Singulett-Sauerstoff (Devasagayam et al., 1991; Halliwell und Aruoma, 1991). Die Häufigkeit dieser Modifikation ergibt sich aus dem besonders niedrigen Oxidationspotential des Guanins im Vergleich zu den anderen Basen (Huttermann, 1982). 8-Hydroxyguanosin liegt in der DNA ganz überwiegend in der tautomeren Ketoform vor, wodurch eine effektive Fehlpaarung mit Adenin ermöglicht wird (s.u.). Alternativ kann aus dem primär gebildeten Radikal durch Öffnung des Imidazolrings 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (Fapy-Guanin) entstehen (Asagoshi et al., 2000; Cadet et al., 2000).

Durch Wasserstoffabstraktion an den Desoxyriboseresten kommt es über Zuckerradikale zur Ausbildung von AP-Läsionen oder zu DNA-Einzel- bzw. DNA-Doppelstrangbrüchen (Teoule, 1987; Von Sonntag, 1987). Oxydierte AP-Läsionen

können durch einen radikalischen Angriff an Position 1, 2, oder 4 des Zuckers entstehen (Epe, 1995). Nicht oxidierte AP-Läsionen entstehen durch spontane Depurinierung (Lindahl, 1993).

2.3 Biologische Konsequenzen oxidativer DNA-Schäden

DNA-Schäden können in Zellen prinzipiell auf drei verschiedene Arten prozessiert werden: (I) Der DNA-Schaden wird durch Reparatursysteme erkannt und vollständig und fehlerfrei behoben. (II) Der DNA-Schaden kann durch Reparatursysteme nicht, oder nur unzureichend behoben werden. Die Zelle leitet daraufhin den programmierten Zelltod (Apoptose) ein oder geht in die Nekrose. (III) Der DNA-Schaden wird nicht oder nur unzureichend repariert und wird in der darauf folgenden Zellteilung als Mutation fixiert. Wie bereits erwähnt, stellt dieser Vorgang dann den ersten Schritt bei der malignen Entartung der Zelle dar.

Im folgenden Abschnitt sollen die Konsequenzen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten DNA-Modifikationen, die durch reaktive Sauerstoffspezies induziert werden, näher beschrieben werden.

Wie bereits erwähnt, ist **8-Hydroxyguanin** (8-oxoG) die mengenmäßig am häufigsten vorkommende oxidative DNA-Basenmodifikation. Aufgrund der möglichen Fehlpaarung mit Adenin während der Replikation besitzt es ein hohes mutagenes Potential (Shibutani et al., 1991; Tchou und Grollman, 1993). Es kann zu so genannten G:C zu T:A Transversionen kommen (Klein et al., 1992). Untersuchungen zur Mutationsfrequenz von 8-oxoG in Säugerzellen konnten zeigen, dass ein einzelnes 8-oxoG Molekül in einem einzelsträngigen Shuttle-Vektor zu einer Mutagenität von 2,5 bis 4,8% führt (Moriya, 1993). Mehr als 78% der gefundenen Mutation waren G:C zu T:A Transversionen. Die relativ niedrige Mutagenität kann mit der Effizienz der vorhandenen Reparatursysteme für 8-oxoG erklärt werden, ist jedoch im Vergleich mit anderen Modifikationen noch relativ hoch.

Formamidopyrimidine (Fapy-Guanin und Fapy-Adenin) besitzen kein mutagenes Potential. Sie führen zur Hemmung der Replikation (O'Connor et al., 1988) und wirken dadurch zytotoxisch (Tudek et al., 1992).

AP-Läsionen können über verschiedene Mechanismen ebenfalls zur Mutagenese beitragen oder zytotoxisch wirken (Epe, 1995): (I) Diese Modifikation stellt eine informationsleere Stelle in der DNA dar, die zum Block der Transkription und Replikation führen kann (Yu et al., 2003). (II) Während der Replikation kann es außerdem zu Basenfehlpaarungen kommen (Lawrence et al., 1990; Klinedinst und Drinkwater, 1992; Neto et al., 1992), die in Bakterien zu G:C zu T:A Transversionen führen. (III) Aus einer AP-Läsion kann auch durch spontane Hydrolyse oder enzymatisch ein DNA-Einzelstrangbruch entstehen (Lindahl, 1993).

Durch Oxidantien induzierte **Einzelstrangbrüche** werden in einem mehrstufigen Prozess sehr schnell repariert (Caldecott, 2001; Caldecott, 2003). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass auch Einzelstrangbrüche ein mutagenes Potential besitzen (Epe, 1995).

2.4 DNA-Reparaturmechanismen

Über die absolute Menge an DNA-Schäden, die täglich in menschlichen Zellen entstehen, gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Die Zahlen variieren von etwa 10 000 (Seeberg et al., 1995) über 20 000 (Lindahl, 1993) endogenen DNA-Schäden pro Tag und Zelle, bis hin zu 150 000 Läsionen (Beckman und Ames, 1997). Dies macht deutlich, dass es ausgefeilte DNA-Reparaturmechanismen geben muss zur Bewahrung der genomischen Integrität. Bis heute wurden mehr als 150 Gene des Menschen beschrieben, die an DNA-Reparaturvorgängen beteiligt sind (Wood et al., 2005). Die Identifizierung dieser Gene erfolgte in vielen Fällen durch Homologiesuche aus einfacher strukturierten Organismen wie Hefen oder *E. coli*. Einige der involvierten Gene wurden auch bei der Erforschung menschlicher Krankheiten entdeckt (Yu et al., 1999). Dennoch werden viele Bereiche der DNA-Reparatur, speziell das Zusammenspiel der verschiedenen Proteine in verschiedenen DNA-Reparaturwegen und die biologischen Konsequenzen bei einem Ausfall der DNA-Reparatur, bisher nur teilweise verstanden.

Nach heutigem Kenntnisstand kann man die DNA-Reparaturmechanismen in mehrere Gruppen einteilen, von denen einige im Folgenden näher erklärt werden sollen.

2.4.1 Direkte Reparatur (Schadensreversion)

Die direkte Schadensreversion scheint bei der Reparatur von oxidativ veränderten Basen nicht beteiligt zu sein. Sie spielt vielmehr eine Rolle bei der Reparatur methylierter Basen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass O⁶-Methylguanin repariert wird, indem eine O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) die Methylgruppe des veränderten Guanins auf einen ihrer Cystein-Bausteine überträgt (Moore et al., 1994). Da das entstehende S-Methylcystein chemisch sehr stabil ist, kann das Reparaturenzym nicht mehr regeneriert werden.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Dioxygenasen hABH2 und hABH3 in der Lage sind, die Methylgruppen von 1-Methyladenin (1meA) und 3-Methylcytosin (3meC), über eine oxidative Demethylierung aus der DNA zu entfernen, wobei Formaldehyd entsteht (Duncan et al., 2002; Aas et al., 2003). In mABH2 und mABH3 *knockout*-Mäusen konnte gezeigt werden, dass mABH2-Mäuse altersabhängig 1meA im Genom akkumulieren und dass die *in vitro* Reparatur von 1meA und 3meC nur vom mABH2-Protein abhängig ist (Ringvoll et al., 2006). Dies deutet auf unterschiedliche Aufgaben von mABH2 und mABH3 bei der Abwehr gegen methylierte DNA-Basen hin.

2.4.2 Basenexcisionsreparatur

Die Basenexcisionsreparatur (BER) ist der Hauptreparaturweg für Basenveränderungen, die die Helix-Struktur der DNA kaum bzw. nicht verändern (Slupphaug et al., 2003). Dazu gehören alkylierte oder deaminierte Basen, sowie durch ROS oder ionisierende Strahlung oxidierte, reduzierte oder fragmentierte Nukleotide (Krokan et al., 2000).

Nach heutigem Kenntnisstand und wie in Abbildung 8 dargestellt, lässt sich die BER in zwei Wege einteilen: Den *short-patch*-Weg (A + B), bei dem ein einzelnes Nukleotid ausgetauscht wird, und der *long-patch*-Weg (C), bei dem 2–8 Nukleotide ausgetauscht werden.

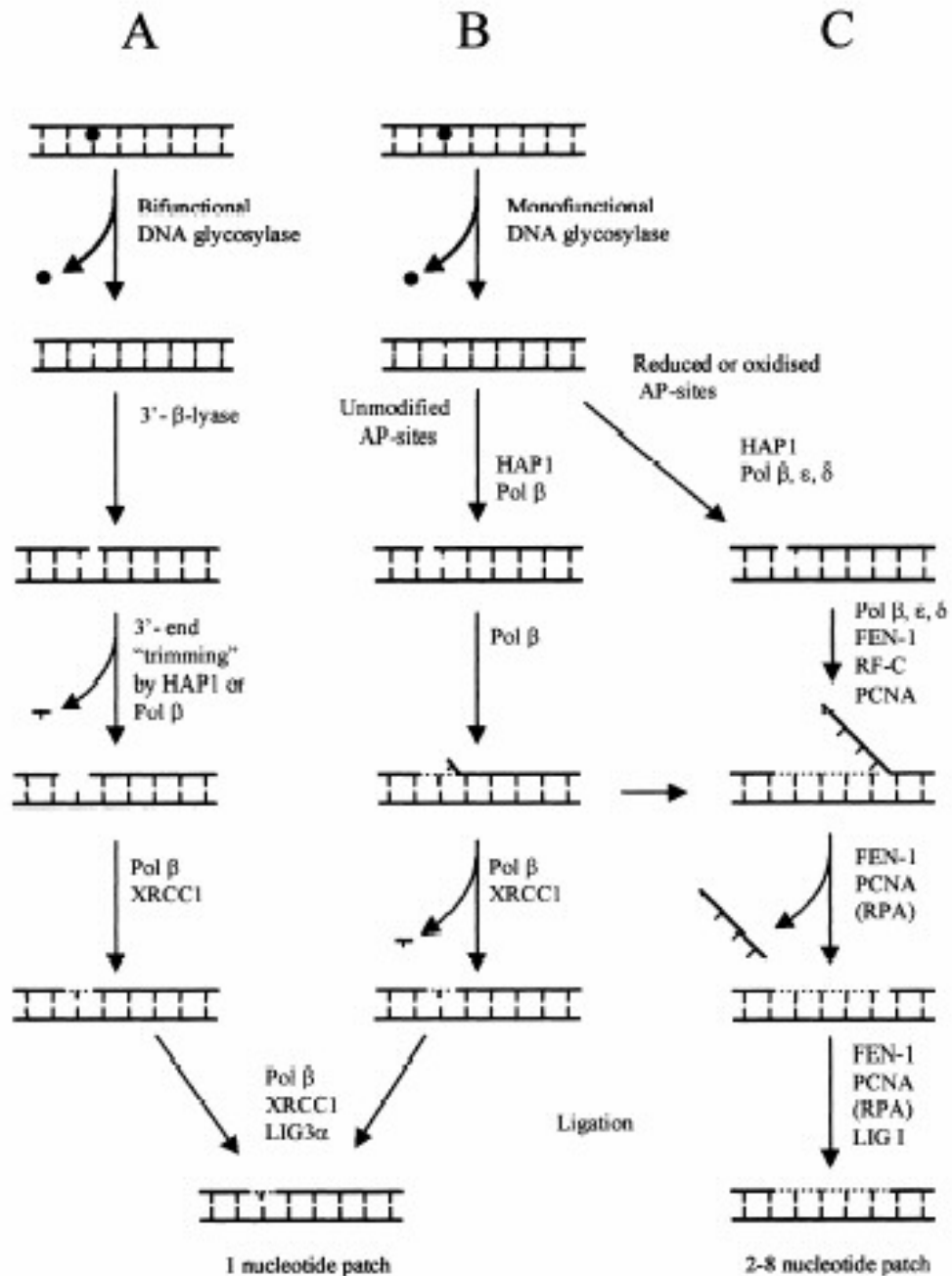


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Mechanismus der Basenexcisionsreparatur beim Menschen (Krokan et al., 2000).

Die Reparatur wird dabei durch spezielle Reparaturglykosylasen eingeleitet. DNA-Reparaturglykosylasen können entweder mono- (A) oder bifunktionell (B) sein. Monofunktionelle Glykosylasen (wie die Uracil-DNA-Glycosylase, UNG) entfernen nur die modifizierte Base und hinterlassen eine intakte AP-Stelle. Diese AP-Läsion wird dann durch eine AP-Endonuklease (APE1, auch HAP1 genannt) erkannt und durch Prozessierung in einen DNA-Einzelstrangbruch überführt. Es

entsteht eine freie 3'-OH-Gruppe, die als Substrat für Polymerase β (Pol β) dient (Bohr und Dianov, 1999; Nilsen und Krokan, 2001). Anschließend wird das DNA-Rückgrat durch eine DNA-Ligase III wieder geschlossen. Dieser Schritt wird durch das *Plattformprotein* XRCC1 koordiniert, das sowohl für Pol β , als auch für DNA-Ligase III Bindestellen aufweist (Lindahl et al., 1997; Krokan et al., 2000).

Bifunktionelle Glykosylasen (wie die 8-Hydroxyguanin-DNA-Glykosylase, OGG1) trennen ebenfalls die *N*-glykosidische Bindung und setzen die modifizierte Base frei. Anschließend lösen sie die Phosphodiesterbindung, die 3' von der gebildeten AP-Läsion liegt, durch β - bzw. β - δ -Elimination (β -Lyase-Aktivität) (Scharer und Jiricny, 2001). Es bleibt ein Einzelstrangbruch mit einem durch einen Zuckerphosphatrest blockierten 3'-Ende und 5'-Phosphatrest zurück. Dieser wird durch APE1 (HAP1) entfernt, damit die Lücke durch Pol β und DNA-Ligase III wieder geschlossen werden kann.

Alternativ zur *short-patch* BER, kann die Reparatur einer modifizierten Base auch über die so genannte *long-patch* BER laufen (vgl. Abbildung 8, C). Welcher Weg bei der BER eingeschlagen wird, ist abhängig von der AP-Stelle erzeugenden Glykosylase (Fortini et al., 1999), dem Typ der vorliegenden AP-Stelle (Slupphaug et al., 2003) und möglicherweise auch vom Zellzyklus (Slupphaug et al., 1991; Levin et al., 1997; Otterlei et al., 1999). Dieser Weg wird durch Pol β , oder wesentlich häufiger durch die DNA-Polymerasen δ und ϵ initiiert, die unter Verdrängung des alten Stranges eine Neusynthese von 2 bis 8 Nukleotiden durchführen. Der überhängende Strang wird durch die *flap*-Endonuklease (FEN1), unter Beteiligung von Replikationsfaktor C (RFC) und PCNA (*proliferation cell nuclear antigen*), abgeschnitten (Klungland und Lindahl, 1997; Gary et al., 1999; Nilsen und Krokan, 2001) und der Reparaturvorgang durch Schließen des verbleibenden Strangbruchs durch die DNA-Ligase I beendet.

Neben oxidativen DNA-Schäden werden von der BER auch DNA-Einzelstrangbrüche, die 3' eine blockierende Gruppe (wie Phosphoglykolaldehyde und Phosphoglykolate) haben, repariert (Von Sonntag, 1987; Demple und DeMott, 2002). Die intrinsische 3'-Phosphodiesteraseaktivität der APE1 ist dabei in der Lage, die 3'-blockierende Gruppe der AP-Stelle zu entfernen.

Die Erkennungsspektren ausgewählter bakterieller und menschlicher DNA-Reparaturenendonukleasen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Erkennungsspektren einer Auswahl bakterieller und menschlicher DNA-Glykosylasen (nach Epe, 1995; Gros et al., 2002; Bjelland und Seeberg, 2003; Dizdaroglu, 2005).

Bakterielles Enzym	Fpg	Endo III	Endo IV	Exo III	T4 Endo V	Endo VIII	MutY ^g
Humanes funkt. Homolog	hOgg1	hNth ^a	--	Ape1	--	NEIL 1-3	hMYH ^g
AP-Läsion							
Regulär	+	+	+	+	+	+	-
1'-oxidiert	-	-	+	+	-	+	-
4'-oxidiert	+	+	+	(+) ^c	+	+	-
Basenmodifikation							
8-Hydroxyguanin	+	-	-	-	-	-	-
Fapy-Guanin	+	(+) ^d	-	-	-	+	-
Fapy-Adenin	(+) ^e	+	-	-	-	+	-
5,6-Dihydro-pyrimidine	-	+	-	-	-	+	-
Pyrimidindimere	-	-	-	-	+	-	-
Adenin:8-oxoG	-	-	-	-	-	-	+ ^g

^a anderer Name für Thymidinglykol-DNA-Glykosylase

^b kein menschliches Homolog

^c Erkennung benötigt sehr hohe Enzymkonzentrationen (200 Units/ml)

^d nicht prozessiert von Endo III

^e nicht prozessiert von hOgg1

^f mit 8-Hydroxyguanin fehlgepaartes Adenin wird entfernt

^g erzeugt keinen Einzelstrangbruch, sondern AP-Stelle

Da verschiedene Glykosylasen, wie in Tabelle 3 gezeigt, verschieden DNA-Schäden erkennen und in Einzelstrangbrüche überführen können (gilt nicht für MutY und hMYH), sind sie wichtige Werkzeuge bei der qualitativen und quantitativen Untersuchung von DNA-Schäden in der Alkalischen Elution (vgl. 4.2.3) und im DNA-Relaxationsassay (vgl. 4.2.6).

Die Funktion der beiden Enzyme OGG1 und MYH soll aufgrund ihrer Wichtigkeit bei der Abwehr oxidativer DNA-Schäden näher in Kapitel 2.4.2.1 besprochen werden.

2.4.2.1 Reparaturenzyme für 8-Hydroxyguanin

Aufgrund des hohen mutagenen Potentials von 8-Hydroxyguanin gibt es verschiedene Mechanismen, durch die die Zellen die Oxidationsprodukte des Guanins entfernen können. Wie bedeutend diese Abwehrmechanismen zur Wahrung der genomischen Integrität sind, spiegelt sich in deren Konservierung während der Evolution vom Prokaryonten bis zum Menschen wieder.

In *E. coli*:

Das Verteidigungssystem von *E. coli* gegen 8-oxoG besteht aus den drei Proteinen MutT, Fpg und MutY (Abbildung 9):

Mut T ist eine Nukleosidtriphosphatase, die im freien Nukleotidpool 8-oxoGTP zu 8-oxoGMP hydrolysiert, so dass 8-oxoG während der Replikation oder Reparatur nicht gegenüber Adenin eingebaut werden kann (Wallace, 2002).

Das Fpg Protein ist eine bifunktionelle Glykosylase, die eine AP-Lyase-Aktivität besitzt (Bailly et al., 1989; O'Connor et al., 1989). Neben 8-oxoG erkennt das Enzym weitere oxidativ modifizierte Purine (Boiteux et al., 1990; Jurado et al., 1998; D'Ham et al., 1999). Für die Bindung an die DNA besitzt das Enzym am carboxyterminalen Ende ein Zinkfingermotiv (Boiteux et al., 1987).

MutY ist eine monofunktionelle DNA-Glykosylase, die Adenin gegenüber 8-oxoG entfernt (Michaels et al., 1990; Michaels et al., 1992). Die Spezifität des Enzyms für 8-oxoG wird durch den carboxyterminalen Teil bestimmt (Chmiel et al., 2001). Ein Ablösen des Enzyms vom Substrat wird durch die Anwesenheit der AP-Endonukleasen Nfo und Xth stark gesteigert (Pope et al., 2002).

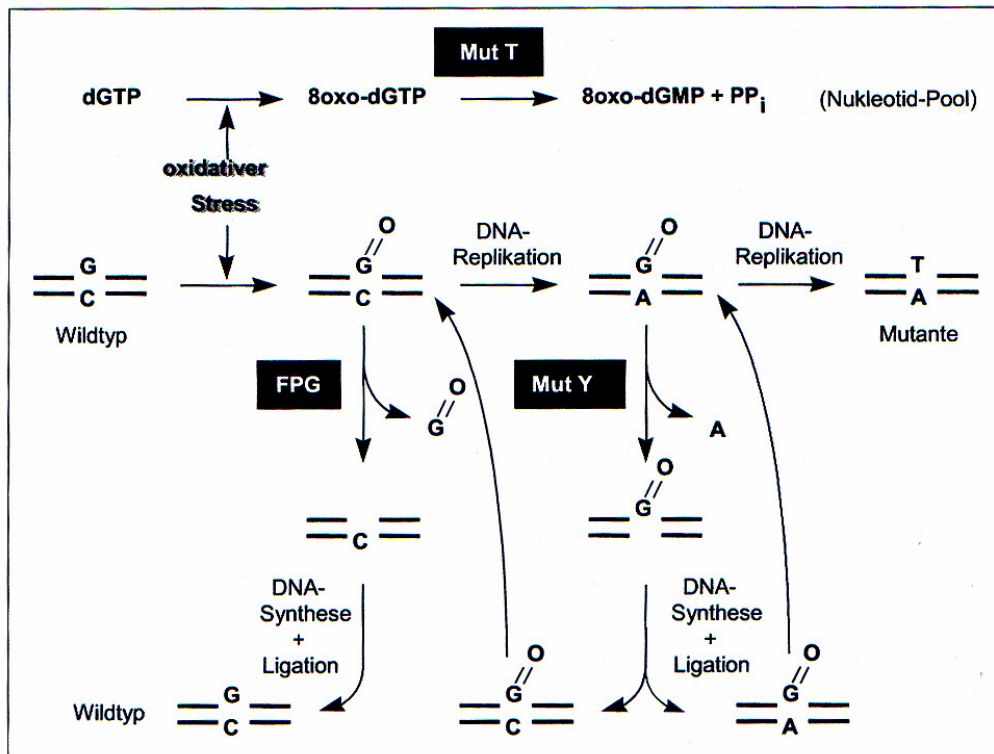


Abbildung 9: Zusammenspiel von Fpg, MutT und MutY zur Entfernung von 8-oxoG aus dem Genom von *Escherichia coli* (nach Grollman und Moriya, 1993).

Die große Bedeutung dieser drei Enzyme, bei der Bewahrung der Integrität der DNA, wird deutlich bei Betrachtung der Phänotypen nach Inaktivierung der entsprechenden Gene. Fpg defiziente *E. coli* zeigen keine Überempfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress, aber eine leichte Erhöhung der Mutationsrate (Cabrera et al., 1988; Michaels et al., 1992; Kuipers et al., 1999). Inaktiviert man in den Bakterien zusätzlich das mutY-Gen, so kommt es zu einer drastisch erhöhten Mutationsrate, wobei das Mutationsspektrum hauptsächlich durch G:C zu T:A Transversionen dominiert wird (Michaels et al., 1992; Kuipers et al., 2000). Dieser Mutationstyp wird typischerweise durch 8-oxoG verursacht. Eine Inaktivierung des mutT-Gens in *E. coli* führt zu einem Stamm mit einem hohen Anteil an A:T zu C:G Transversionen, die auf eine Fehlpaarung von A mit 8-oxoG zurückzuführen sind (Schaaper, 1996).

In Säugerzellen:

Ende der 90er gelang mehreren Arbeitsgruppen gleichzeitig die Klonierung des humanen bzw. murinen Homologs der 8-Hydroxguanin-DNA-Glykosylase (Aburatani et al., 1997; Arai et al., 1997; Bjoras et al., 1997; Lu et al., 1997;

Radicella et al., 1997; Roldan-Arjona et al., 1997; Rosenquist et al., 1997; Tani et al., 1998). Durch alternatives Splicing entstehen zwei verschiedene Proteine, nämlich das α -hOGG1 (345 Aminosäuren) und β -hOGG1 (424 Aminosäuren). Ein Vergleich der Sequenz zeigte, dass die ersten 316 Aminosäuren, die ein *mitochondrial target signal* (MTS) enthalten, identisch sind, die beiden Formen sich jedoch am carboxyterminalen Ende unterscheiden. Die α -Form trägt dort eine *nuclear localisation sequence* (NLS) (Boiteux und Radicella, 1999; Boiteux und Radicella, 2000). Dieser Befund konnte mittels immunohistochemischer Verfahren bestätigt werden: die α -Form wird dank der NLS in den Kern und die β -Form in die Mitochondrien geleitet (Takao et al., 1998; Boiteux und Radicella, 1999). Die Sequenzanalyse zeigte außerdem, dass das *Ogg1*-Gen ein hoch konserviertes *helix-hairpin-helix*-Motiv besitzt. Diese Struktur ist charakteristisch für DNA-Glykosylasen/AP-Lyasen der Klasse III (Nash et al., 1996). Mittels *Northern-Blot*-Analyse konnte eine Expression des *ogg1*-Gens in allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden (Radicella et al., 1997; Rosenquist et al., 1997). Die Analyse der Promotorstruktur des Gens zeigt, dass *hOgg1* ein so genanntes *housekeeping gene* ist (Dhenaut et al., 2000). Dennoch scheint die Expression von OGG1 durch oxidativen Stress induzierbar zu sein (Lee et al., 1996; Rusyn et al., 2000). Isoliertes hOgg1-Protein erkennt verschiedene DNA-Modifikationen: 8-oxoG, Fapy-Guanin und AP-Läsionen, falls diese mit Cytosin gepaart vorliegen (Dherin et al., 1999).

Beim Menschen konnten auch die zu *mutT* und *mutY* homologen Gene *hMth1* und *hMyh* nachgewiesen werden.

hMYH1 ist eine monofunktionelle Glykosylase, die Adenin aus der DNA entfernt, falls diese mit 8-oxoG gepaart vorliegt. Das Enzym ist sowohl im Kern als auch in den Mitochondrien lokalisiert (Ohtsubo et al., 2000; Nakabeppu, 2001).

hMTH1 ist im Kern und in den Mitochondrien lokalisiert (Kang et al., 1995) und hydrolysiert dort oxidierte Purinnukleotidtriphosphate (Nakabeppu, 2001). Dadurch wird der Einbau von oxidierten Purinbasen während Replikation und Reparatur verhindert. Die Bedeutung von MTH1 für die Wahrung der genomischen Integrität wird deutlich in *Mth^{-/-}*-knockout-Mäusen. Diese Tiere zeigen eine erhöhte spontane Tumorzinzidenz (Tsuzuki et al., 2001).

Homozygote *Ogg1*^{-/-}-Mäuse zeigen in der Leber eine leichte Erhöhung der Mutationsfrequenz (Klungland et al., 1999) und eine leichte, altersabhängige Erhöhung der Hintergrundspiegel oxidativer DNA Schäden (Osterod et al., 2001). Es konnte jedoch keine Erhöhung der Krebsinzidenz in diesen Tieren nachgewiesen werden. Dies lässt vermuten, dass für die Reparatur von 8-oxoG bei Abwesenheit von OGG1 ein *back-up*-Reparaturmechanismus besteht, bei dem die Nukleotidexcisionsreparatur und die transkriptionsgekoppelte Reparatur (vgl. 2.4.3) eine Rolle spielen könnten.

2.4.3 Nukleotidexcisionsreparatur und transkriptionsgekoppelte Reparatur

Durch die Nukleotidexcisionsreparatur (NER) werden DNA-Schäden repariert, die zu Helix-Distortionen der DNA führen. Zu diesen Schäden gehören durch Sonnenlicht induzierte Pyrimidin-Dimere und DNA-Addukte (de Laat et al., 1999; Friedberg, 2001; Ura und Hayes, 2002). Durch ihre Fähigkeit, eine große Anzahl an verschiedenen Modifikationen zu erkennen, ist sie das primäre Abwehrsystem gegen exogene Mutagene (Scharer, 2003). An diesem Prozess sind mindestens 25 verschiedenen Proteine beteiligt, darunter sieben *Xeroderma Pigmentosum*-Proteine (XPA bis XPG) und zwei Faktoren, deren Mutation zum *Cockayne Syndrom* führt (CSA und CSB) (Costa et al., 2003). Die Nukleotidexcisionsreparatur kann in zwei verschiedene Wege eingeteilt werden: (I) Die *Global genome* NER (GGR) repariert transkribierte und nicht transkribierte Regionen im Genom und (II) die transkriptionsgekoppelte NER (TCR), die nur in transkribierten Regionen nach Block der RNA Polymerase II (RNA PolII) arbeitet (Costa et al., 2003).

Die NER lässt sich formal in vier Schritte einteilen: (I) Erkennung des Schadens, (II) ein Einschneiden des geschädigten Stranges in 3' und 5' Position zur geschädigten Base, sowie (III) DNA-Synthese und eine sich anschließende (IV) Ligation (Wood, 1997; de Laat et al., 1999). Die Erkennung des Schadens erfolgt initial durch einen XPC-HR23B-Komplex (*human homolog of yeast RAD 23*), was zu einer Konformationsänderung der DNA führt (Janicijevic et al., 2003). Anschließend wird der aus mehreren Proteinen bestehende TFIIH-Komplex

rekrutiert. Die Proteine XPB und XPD entwenden dabei die DNA, so dass die Endonukleasen XPG und ERCC1-XPF, die einzelsträngige DNA 3' bzw. 5' neben dem Schaden einschneiden, so dass ein Oligonukleotid mit einer Länge aus 24 bis 32 Basen entsteht (Winkler et al., 2001). Daraufhin findet komplementär zum Gegenstrang die Reparatursynthese durch die Polymerasen δ und ϵ statt. Danach werden die DNA-Stränge durch die DNA-Ligase I verschlossen (Costa et al., 2003).

Der alternative Weg der transkriptionsgekoppelten Reparatur (TCR) benötigt die gleichen Proteine wie die GGR, jedoch erfolgt die Schadenserkenkung nicht über XPC, sondern über die Blockade der RNA-Polymerase II (Tsutakawa und Cooper, 2000). Für die Entfernung der RNA-Polymerase II vom geschädigten Strang und die Rekrutierung weiterer NER Proteine werden zusätzlich noch die beiden Proteine CSA und CSB benötigt (van den Boom et al., 2002; Costa et al., 2003; Laine und Egly, 2006).

2.4.4 Postreplikative Reparatur (*mismatch-Reparatur*)

Die *mismatch*-Reparatur hat zur Aufgabe, falsch gepaarte Basen und Insertionsschleifen postreplikativ aus dem Genom zu entfernen (Kolodner und Marsischky, 1999; Friedberg, 2001; Marti et al., 2002). Dazu ist es wichtig, zwischen dem alten Elternstrang und dem neu synthetisierten Tochterstrang zu unterscheiden. Dies geschieht in *E. coli* durch Methylierung bestimmter Adenin-Basen, die zeitlich verzögert nach der Replikation erfolgt. Solange kann der Tochterstrang an der fehlenden Methylierung erkannt werden. Die Proteine MutS, MutH und MutL erkennen den *mismatch*, schneiden den neuen Strang ein und ermöglichen somit dessen Reparatur durch weitere Proteine. Die Bedeutung der *mismatch*-Reparatur (MMR) zur Wahrung der genomischen Integrität wird in *E. coli* deutlich. Mutationen in *mutS*, *mutH* und *mutL* führen zu Mutatorphänotypen.

Im Menschen konnten Homologe der Bakterienproteine MutS (MSH) und MutL (MLH) identifiziert werden (Kolodner und Marsischky, 1999). Mutationen in den dazugehörigen Genen führen aufgrund einer fehlerhaften MMR zu einer erhöhten

Prädisposition für die Entwicklung von Tumoren (Narayan und Roy, 2003; Peltomaki, 2003).

2.4.5 Reparatur mitochondrialer DNA Schäden

Von den oben beschriebenen DNA-Reparaturmechanismen scheinen in Mitochondrien nur die Basenexcisionsreparatur und die direkte Schadensreversion bei der Beseitigung von DNA-Schäden eine Rolle zu spielen (Bogenhagen et al., 2001; Dianov et al., 2001; Bohr, 2002; Mandavilli et al., 2002; Larsen et al., 2005). Bereits 1974 konnte gezeigt werden, dass Mitochondrien aus Säugerzellen keine Thymidin-Dimere reparieren können, welche ein Substrat für die NER darstellen (Clayton et al., 1974). Dieser Befund, dass in Säugermitchondrien keine NER abläuft, wurde in späteren Arbeiten bestätigt (LeDoux et al., 1992; Pascucci et al., 1997). Im Gegensatz dazu ist die BER in Mitochondrien relativ gut beschrieben. Die Reparatur wird auch hier durch eine DNA-Glykosylase wie OGG1 initiiert. Wie in Kapitel 2.4.2.1 beschrieben, gibt es für OGG1 zwei verschiedene *Splicing*-Varianten, von denen β -OGG1 in der mitochondrialen Matrix nachgewiesen werden konnte (Nishioka et al., 1999).

Ein kompletter Ausfall des *Ogg1*-Gens in Mitochondrien ist offenbar weniger gut kompensierbar als im Zellkern (de Souza-Pinto et al., 2001a). *De Souza-Pinto et al.* fanden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) in *Ogg1*^{-/-}-Mäusen einen elffach erhöhten Spiegel an 8-oxoG in mtDNA, im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Kontrolltieren. Demgegenüber war der 8-oxoG Gehalt in der Kern-DNA von *Ogg1*^{-/-}-Tieren im Vergleich zum Wildtyp nur um den Faktor 2 erhöht. Dies könnte auf eine fehlende *backup*-Reparatur in Mitochondrien im Vergleich zum Zellkern hindeuten.

Mit zunehmendem Alter nimmt die 8-oxoG-Reparaturkapazität im Zellkern von Mäusehepatozyten leicht ab, in den entsprechenden Mitochondrien jedoch zu (de Souza-Pinto et al., 2001b). Möglicherweise ist diese altersabhängige Zunahme der Reparaturaktivität eine zelluläre Antwort auf den Anstieg oxidativer mtDNA-Schäden (Bohr und Dianov, 1999).

Spontane oder als Reparaturintermediate auftretende AP-Läsionen werden auch in mitochondrialer DNA durch die AP-Endonuclease (APE) prozessiert. Das Vorkommen von APE in Mitochondrien konnte enzymatisch (Tomkinson et al., 1988) und mittels Immunofluoreszenz (Tell et al., 2001; Tsuchimoto et al., 2001) nachgewiesen werden.

In Mitochondrien werden die Aufgaben der nur im Kern vorkommenden Polymerase β durch Polymerase γ (Pol γ) ersetzt (Larsen et al., 2005). Da Pol γ die einzige in den Mitochondrien vorkommende Polymerase ist, kann ein oxidativer Angriff durch ROS und eine daraus resultierende Inaktivierung zu einem Verlust der genomischen Integrität beitragen (Graziewicz et al., 2002), was letztendlich zu einem Teufelskreis der ROS-Produktion führen kann (Yakes und Van Houten, 1997).

Um die BER in den Mitochondrien zu beenden, schließt die DNA-Ligase III (LIG3) den noch offenen DNA-Strang. Durch Sequenzanalyse des humanen LIG3 Gens konnte gezeigt werden, dass eine *Splicing*-Variante ein *MTS* besitzt (Lakshmipathy und Campbell, 1999).

8-oxoG:A Mispaarungen, die während der Replikation durch einen Fehleinbau von Adenin gegenüber 8-oxoG entstehen, können wie im Kern auch in den Mitochondrien durch das MutY-Homolog (MYH) korrigiert werden. Die Identifizierung von MYH-Protein in den Mitochondrien gelang durch Untersuchung des mitochondrialen Proteoms (Cotter et al., 2004).

2.4.6 Die Rolle ausgewählter Hilfsproteine bei der DNA-Reparatur

Aufgrund der vielfältigen und komplexen Funktionen der DNA-Reparaturproteine Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 und des Cockayne Syndrom B Proteins sollen diese Proteine im Folgenden (vgl. 2.4.6.1 und 2.4.6.2) näher beschrieben werden.

2.4.6.1 Cockayne Syndrom B Protein

Das menschliche Cockayne Syndrom B Protein (CSB) besteht aus 1493 Aminosäuren und besitzt eine Masse von 168 kDa. Das Protein gehört zur Familie der SWI2/SNF2-Proteine, die sieben Helikase-Motive, eine Region, die reich an sauren Aminosäuren ist und zwei nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS) besitzen (Licht et al., 2003). Ein Ausfall des für das CSB-Protein kodierenden Gens führt beim Menschen zu einer als Cockayne Syndrom (CS) bezeichneten Erkrankung, die klinisch folgendermaßen in Erscheinung tritt: Die Patienten leiden unter schweren neurologischen Störungen und einer gestörten physischen Entwicklung, manifestiert in kachektischem Zwergenwuchs, Mikroenzephalie und einer gestörten Skelettentwicklung (Nance und Berry, 1992; Licht et al., 2003). Zusätzlich leiden die Patienten aufgrund eines Ausfalls der transkriptionsgekoppelten Reparatur (vgl. 2.4.3) an einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber UV-Licht (Rapin et al., 2000; Spivak, 2004).

Das CSB-Protein scheint außer an der transkriptionsgekoppelten Reparatur (Le Page et al., 2000; Svejstrup, 2002; Licht et al., 2003) auch an der globalen Reparatur von 8-oxoG beteiligt zu sein. Osterod et al. (2002) konnten zeigen, dass die Reparatur von 8-oxoG in *Csb*^{-/-}-Mausembryofibroblasten verlangsamt abläuft. Das CSB-Protein ist möglicherweise beteiligt an einer *back-up*-Reparatur von 8-oxoG bei einem Ausfall des OGG1-Proteins. Es wurde gezeigt, dass 8-oxoG in Lebern von *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen stärker akkumuliert als in *Ogg1*^{-/-}-Mäusen, wohingegen in *Csb*^{-/-}-Mäusen keine Akkumulation von DNA-Schäden festgestellt werden konnte (Osterod et al., 2002).

Auch hier ist die Datenlage lückenhaft und die genauen Mechanismen dieser *back-up*-Reparatur, sowie die Rolle möglicher Interaktionspartner nicht geklärt.

2.4.6.2 Poly(ADP-Ribose)-Polymerase

Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen gehören zu einer Familie von Proteinen, die den Transfer von ADP-Ribose-Molekülen von NAD⁺ auf Zielproteine katalysieren. Die am besten untersuchte PARP 1 ist ein nukleäres Protein, das an DNA-Einzel- und

DNA-Doppelstrangbrüche binden kann. Durch diese Bindung an die DNA wird PARP 1 aktiviert und heftet folglich Poly(ADP-Ribose)-Reste an Histone (Althaus et al., 1994) und nicht Histon-Proteine (Pleschke et al., 2000), die u.a. an der DNA-Reparatur beteiligt sind und an sich selbst. Durch diese Automodifikation wird die katalytische Aktivität der PARP 1 beendet und diese dissoziiert von der DNA ab (Shall und de Murcia, 2000; Ziegler und Oei, 2001; Burkle et al., 2005). Eine Aktivierung der PARP 1 durch DNA-Einzelstrangbrüche, die, wie in 2.4.2 beschrieben, auch als Reparaturintermediate auftreten können, lässt eine Rolle dieses Enzyms bei der DNA-Reparatur vermuten. Es konnte tatsächlich in Arbeiten, an denen auch unsere Arbeitsgruppe beteiligt war, gezeigt werden, dass PARP 1 die Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen, oxidativen DNA-Modifikationen (BER) und Pyrimidindimeren (GGR) beschleunigt (Dantzer et al., 2000; Flohr et al., 2003). Die Beschleunigung der Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen scheint an ein funktionelles CSB-Protein gekoppelt zu sein (Flohr et al., 2003). Die genaue Rolle der PARP 1 bei der DNA-Reparatur *in vivo* ist jedoch bisher weitgehend ungeklärt.

3 ZIELSETZUNG

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche Rolle reaktive Sauerstoffspezies und dadurch generierte oxidative DNA-Modifikationen bei der Krebsentstehung spielen. Experimentelle Beweise für die Theorie, dass oxidative DNA-Modifikationen einen wichtigen Beitrag bei der Kanzerogenese spielen, sollten durch eine Modulation der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden erhalten werden und ein Beobachten der daraus resultierenden Auswirkungen, insbesondere bezüglich Mutationsfrequenz und Krebsinzidenz.

Da ein Grossteil der reaktiven Sauerstoffspezies endogen im Körper von diversen Zellorganellen produziert werden (vgl. 2.1.1), sollte zuerst untersucht werden, welchen Beitrag Mitochondrien und Peroxisomen zu den Hintergrundspiegeln oxidativer DNA-Modifikationen leisten.

Im Fall der Mitochondrien sollten verschiedene oxidative DNA-Schäden in mitochondrialer DNA altersabhängig in Wildtyp, *Csb*^{-/-}, *Ogg1*^{-/-} und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen mit Hilfe eines DNA-Relaxationsassay bestimmt werden. Durch die Analyse der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen in den verschiedenen Genotypen sollte abgeleitet werden, welche Rolle das OGG1- und das CSB-Protein bei der Reparatur mitochondrialer DNA-Schäden spielt.

Zur Untersuchung der Frage, welchen Beitrag Peroxisomen zu den Hintergrundspiegeln oxidativer DNA-Modifikationen leisten, sollte die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies in Peroxisomen durch den Peroxisomenproliferator WY-14,643 in Wildtyp- und reparaturdefizienten *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen stimuliert und anschließend die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen in frisch isolierten Hepatozyten dieser Tiere untersucht werden. Untersuchungen zur Mutagenität von WY-14,643 in Mäuselebern *in vivo*, sowie die Bestimmung diverser PP-induzierter Parameter *in vivo* sollten eine Aussage über den Mechanismus der Peroxisomenproliferator-induzierten Kanzerogenese in Nagern erlauben.

Neben der Induktion oxidativer DNA-Schäden könnte auch ein Ausfall spezifischer DNA-Reparaturwege und eine daraus resultierende Erhöhung der oxidativen DNA-Modifikationen eine Rolle bei der Krebsentstehung spielen. Daher sollte

anknüpfend an bisherige Erkenntnisse die Rolle des Cockayne Syndrom B Proteins und der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 bei der Basenexcisions-reparatur untersucht werden. Zur experimentellen Untersuchung sollten dazu durch verschiedene Kreuzungsschritte Mausgenotypen generiert werden, die einerseits einen Defekt der Reparaturproteine CSB und / oder OGG1 zeigen und andererseits ein bakterielles *lacI*-Gen (BigBlue[®]-Mäuse) tragen. In diesen transgenen-*knockout*-Mäusen sollten Mutationen in der Leber und im Lungengewebe als Zeichen für eine genomische Instabilität nachgewiesen werden. Aus diesen Befunden sollte auch die Rolle des CSB-Proteins bei der *back-up*-Reparatur von oxidativen DNA-Schäden in *Ogg1*-defizienten Mäusen abgeleitet werden. Die Korrelation der gefundenen Mutationen in den Lebern dieser Tiere mit der Anzahl der oxidativen Basenmodifikationen sollte eine Aussage über das mutagene Potential von 8-oxoG *in vivo* erlauben. Ferner sollten die gefundenen Ergebnisse zur Bedeutung des CSB-Proteins bei der Reparatur oxidativer Basenmodifikationen mit Hilfe einer humanen Zelllinie, die infolge einer Mutation nur ein verkürztes CSB-Protein exprimiert, weiter charakterisiert werden.

Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 bei einer OGG1-unabhängigen *back-up*-Reparatur sollten die Hintergrundspiegel an oxidativen DNA-Modifikationen in primären Hepatozyten von *Parp1*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen und den entsprechenden Kontrolltieren untersucht werden.

Um letztendlich die Frage zu klären, welchen Beitrag endogene oxidative DNA-Schäden bei der Krebsentstehung spielen, wurden *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäuse, die einen erhöhten Hintergrundspiegel an oxidativen DNA-Modifikationen in der Leber tragen und die entsprechenden Wildtyp-Kontrolltiere mit dem leberspezifischen Promoter und Peroxisomenproliferator WY-14,643 behandelt und die Entstehung von enzymveränderten Läsionen, die als Tumorstufen angesehen werden können, in Leberschnitten dieser Mäuse untersucht.

Aus den erhaltenen Daten sollten Abschätzungen ermöglicht werden, in welchem Maße eine gestörte Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen und ein daraus resultierender veränderter Hintergrundspiegel an oxidativen DNA-Modifikationen zu einem erhöhten Krebsrisiko in Säugern beiträgt.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Analysenwaage	AG 245, max. 210g (Mettler Toledo, Schweiz)
Brutschrank (Bakterien)	Kelvitron E, B6200 (Heraeus Instruments, Hanau)
Brutschränke (Zellkultur)	CO ₂ -Inkubator BB16, BB6060 O ₂ und Hera-Cell (Heraeus Instruments, Hanau)
Coulter Counter	Modell N Industry (Coulter Electronics LTD, Beds., England)
Destillations-Apparatur	Destamat® (Heraeus, Hanau)
Fluoreszenz-Mikroskop	(Zeiss, Oberkochen) Filter 46 63 01-9901 und Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim, mit Filtersystem
Fluorimeter	TKO 100, DNA Fluorimeter (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA)
Folienschweißgerät	Typ. 255 (Fa. Schott)
Fraktionssammler	Ultrorac 2070 II (Pharmacia / LKB, Uppsala, Schweden) und MM 10, Neolab 4 mit Zeitnehmer SM 999 (Neolab, Heidelberg)
Gefrierschrank (-20°C)	KG 3666-23 (Liebherr)
Gefrierschrank (-70°C)	Colora UF 85-300S (Colora, Lorch)
Gelapparatur	PerfectBlue™ Gelsystem Mini M (Peqlab, Erlangen)
Gel-Dokumentationssystem	BioRad Gel Doc 1000 + Molecular Analyst® (v 2.1, 1995, BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA)
Gewebehomogenisator	Wheaton Dounce Tissue Grinder, VWR
Halogenlampe (1000 W)	Osram SLG 1000-Studio (Osram, München) mit Flecta Halogen Mini-Brenner (Reflekta)
Heizblock	Thermoblock-Thermostat (Gebr. Liebisch, Bielefeld)
Kühlzentrifuge	Sorvall Superspeed RC2-B (Sorvall, Conn., USA)
Laboratoriumshomogenisator	Potter S (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen)
Lichtmikroskop	Telaval 31 (Zeiss, Oberkochen)
Lichttisch	Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg

Magnetrührer	Ikamag RET-G (Ika-Werk, Janke &Kunkel GmbH & Co KG, Staufen i. Br.)
Mikrowelle	Micromat 175 Z (AEG) und Dimension 4 (Panasonic Service, Wiesbaden)
Multipette	Eppendorf GmbH, Hamburg
Peristaltikpumpe	ISM 759 (20 Kanäle), (Ismatec Laboratoriumstechnik, mit Schläuchen, Schweiz)
pH-Meter	PHM 62 (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark)
Phosphorimager	Storm (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA , USA)
Pipetten	Pipetman P 20, P 100, P 200, P 1000, P 5000 P 10000 (Gilson, Frankreich)
Pipettierhilfe	Pipetus-akku (Hirschmann® Laborgeräte, Eberstadt)
Rotoren für Kühlzentrifuge	SS-34, GS-3 (Sorvall, New.t.on, Conn., USA)
Rotoren für UZ	Ti 60, VTi 50 (Beckman Instruments, Palo Alto, Kalifornien, USA)
Schüttelinkubator (Bakterien)	TH25/SM25 Digi (Edmund Bühler, Bodelshausen)
Spannungsquelle (Protein- /DNA-Gele)	Power PAC- 3000 (BioRad, Hercules, USA)
Spektralphotometer	WPA Biowave, S 2100 (Whatman Biometra, Göttingen)
Sterile Werkbank	Lamin Air® HB 2472 und HB 2448 (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
Thermostat für Haake W19	Haake D8 (Haake, Karlsruhe)
Tischschüttler	GFL 3015 (Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel)
Trockenschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Ultraschallbad	RK 100 (Bandelin electronic, Berlin)
Ultraschall-Homogenisator	SONOPULS; HD 70 mit Sonotrode MS 73 und (Sonifier) HF-Generator GM 70 (70 W, 20 kHz) (Bachofer, Reutlingen)
Ultrazentrifuge (UZ)	Optima LE-80K (Beckman Instruments, Palo Alto, Kalifornien, USA)
Vortexer	Vortex Genie 2, Model G-560E (Scientific Industries, INC, Bohemia, N.Y., USA)
Waage	PB 3002, Delta Range, max. 3100g (Mettler Toledo, Schweiz)
Wasserbad (heizbar bis 100°C)	Köttermann Type 3042 (Köttermann GmbH & Co, Uetze-Hänigsen, Deutschland)
Wasserbad	Haake K, Haake LH mit Kältethermostat Haake F3 (Haake, Karlsruhe)

Zählkammer	Neubauer Kammer (Marienfeld, Deutschland)
Zentrifugen	Hettich Micro Rapid/K und Hettich Universal/K2S (Hettich, Tuttlingen), Biofuge 28RS und Sigma 3K-2 (Heraeus Instruments GmbH, Osterode am Harz, Deutschland)
Zytozentrifuge	Cytospin 3 (Shandon, Astmoor, England)

4.1.2 Hilfsmaterialien & Kits

Dialyseschläuche	Spectra Por (Spectrum Medical Ind., Los Angeles, CA, USA)
DNeasy® MiniKit	QIAGEN, Hilden
Einmalpipetten, steril	Hartenstein, Würzburg
Filter (Alkal. Elution)	Isopore Membranfilter, 2 µm, Ø: 25 mm, (Millipore, Schwalbach)
Filterhalter (Alkal. Elution)	Swinnex SX 2500 (Millipore, Schwalbach)
GFX™ PCR DNA and Gel Purification Kit	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Glaspipetten (Zellkultur)	Hartenstein GmbH, Würzburg
Impfeschlingen	Hartenstein GmbH, Würzburg
Infusionsset mit Flügelkanüle 0,8 × 20 mm	Becton Dickinson, Heidelberg
Kulturröhrchen PP, steril	Hartenstein GmbH, Würzburg
Objektträger	Hartenstein GmbH, Würzburg
Pasteurpipetten	Hartenstein GmbH, Würzburg
Plastikkleinwaren	Eppendorf, Hamburg
Plastikspitzen (Einweg)	Hartenstein GmbH, Würzburg
Prüfdiät (Mäuse) + WY-14,643	Altromin, Lage
QIAshredder®	QIAGEN, Hilden
RecoverEase™ DNA Isolation Kit	Stratagene, Heidelberg
RNeasy® MiniKit	QIAGEN, Hilden
Screeningplatten	Nunc, Wiesbaden
Spritzen (Alkal. Elution)	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter, 0,22 + 0,44 µm	Schleicher & Schüll, Dassel
Transpack® Packaging Extract	Stratagene, Heidelberg
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One GmbH, Essen
Zellsieb, 100µm	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen, Corex	Hartenstein GmbH, Würzburg
Zentrifugenröhrchen, Plastik	Greiner Bio-One GmbH, Essen
Zuchtdiät (Mäuse), Standard	Altromin, Lage

4.1.3 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid	Roth, Karlsruhe (Rotiphorese Gel 30®)
Agarose (Typ I, low EEO)	Sigma Aldrich, Steinheim
Aktivkohle	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid	Merck, Darmstadt
Ammoniumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Ammoniumperoxodisulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma Aldrich, Steinheim
Bacto-Agar	Difco Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Frankreich
Bacto-Trypton (Pepton)	Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Biorad-Farbstoffkonzentrat	BioRad, Hercules, CA, USA
Bisbenzimid (Hoechst Nr. 33258)	Sigma Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Carbogen (95% O ₂ , 5% CO ₂)	Linde, Höllriegelskreuth
Casein-Pepton	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Chloroform	Roth, Karlsruhe
DAPI	Sigma Aldrich, Steinheim
Dextran-Natriumsalz	Pharmacia Upjohn GmbH, Dänemark
D-Glucose x 1 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
di-Kaliumhydrogenphosphat x 3 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
di-Natriumhydrogenphosphat x 2 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Dithioerythritol	Sigma Aldrich, Steinheim
DL-Buthioninsulfoximin	Sigma Aldrich, Steinheim
DMEM Medium high Glucose	PAA, Cölbe
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma Aldrich, Steinheim
DNA-Marker Nr. II + VI	Roche Biosciences, Mannheim
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt
EGTA (Ethylenglycol-bis(β-amino-ethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure)	Sigma Aldrich, Steinheim
Eichlösungen Puffer (pH 5, 7, 8, 10, 11)	Merck, Darmstadt
Eindeckmittel EDL-2	Linaris, Bettingen am Main
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe

Formamid 90%	Sigma Aldrich, Steinheim
Gelatine	Sigma Aldrich, Steinheim
Glutathion (Glu-Cys-Gly)	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycin	Sigma Aldrich, Steinheim
Glycerol	Sigma Aldrich, Steinheim
Harnstoff	Sigma Aldrich, Steinheim
Hefeextrakt	Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
Heparin, 5000 I.E	Ratiopharm, Ulm
HEPES ([N-2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'- [2-ethansulfonsäure])	Sigma Aldrich, Steinheim
Insulin (I-5500)	Sigma Aldrich, Steinheim
Isofluran (Forene [®])	Baxter, München
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma Aldrich, Steinheim
Isoton II-Lösung	Beckman Coulter, Krefeld
Kälberserum, fötales	PAA, Cölbe
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Kaliumhydroxid	Merck, Darmstadt
Kohlendioxid (CO ₂)	Linde, Höllriegelskreuth
L-Alanin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Arginin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Asparagin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Asparaginsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Citrullin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Cystein	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Glutamin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Glutaminsäure	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Histidin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Isoleucin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Leucin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Lysin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Methionin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Ornithin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Phenylalanin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Prolin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Serin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Threonin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Tryptophan	Sigma Aldrich, Steinheim

L-Tyrosin	Sigma Aldrich, Steinheim
L-Valin	Sigma Aldrich, Steinheim
Magnesiumchlorid x 6 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Magnesiumsulfat x 7 H ₂ O	Roth, Karlsruhe
Maltose	Sigma Aldrich, Steinheim
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	BioRad, Hercules, USA
NADPH, Tetranatriumsalz	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat x 1 H ₂ O	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Nutrient broth	Difco Becton Dickinson, Le Pont de Claix, Frankreich
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAA, Cölbe
Phenol	Sigma Aldrich, Steinheim
Ponceau S	Sigma Aldrich, Steinheim
Rinderserumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe
Ro 19-8022	Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz
Salzsäure 25%, 37%	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure 96%	Merck, Darmstadt
Stickstoff, flüssig	Linde, Höllriegelskreuth
Tetraethylammoniumhydroxid (TEAH)	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Sigma Aldrich, Steinheim
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypanblau-Lösung 0,4%	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin /EDTA-Lösung	PAA, Cölbe

4.1.4 Enzyme

Antipain	Sigma Aldrich, Steinheim
Aprotinin	Sigma Aldrich, Steinheim
CollagenaseTyp IA, (C 5138)	Sigma Aldrich, Steinheim
DNase I (D 5025)	Sigma Aldrich, Steinheim

Endonuklease III	zur Verfügung gestellt von S. Boiteux (CEA, Département de Radiobiologie et Radiopathologie, UMR217 CNRS/CEA, F-92265 Fontenay-aux-Roses, Frankreich).
Endonuklease IV	zur Verfügung gestellt von B. Demple (Harvard University Cambridge, USA).
Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (rein)	aus <i>E. coli</i> ; zur Verfügung gestellt von S. Boiteux.
Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Rohextrakt)	aus <i>E. coli</i> ; hergestellt von M. Osterod (Boiteux et al., 1990).
Glutathionreduktase	Boehringer Mannheim, Mannheim
Leupeptin, Trifluoracetat	Sigma Aldrich, Steinheim
MutY-Protein	aus <i>E. coli</i> ; zur Verfügung gestellt von S. Lloyd (Center for Research on Occupational and Environmental Toxicology, Oregon Health & Science University/CROET, USA)
Pfu Turbo DNA Polymerase	Stratagene, Heidelberg
Proteinase K	lyophilisiert, aus <i>Tritirachium album</i> (Roth, Karlsruhe)
Reverse Transkriptase Omniscript®	Qiagen, Hilden
Ribonuclease A (RNase A)	Sigma Aldrich, Steinheim
Taq DNA Polymerase	Peqlab, Erlangen

4.1.5 DNA

mtDNA	Größe: 16295 bp; mitochondriale DNA aus Mäuselebern; eigene Präparation nach (Hegler et al., 1993); vgl. Kapitel 4.2.6.2.
PM2-Plasmid-DNA	Größe: 10000 bp; DNA des Bakteriophagen PM2; Präparation nach Salditt (Salditt et al., 1972) von Ina Schulz, Mainz
Kalbsthymus-DNA	Serva, Heidelberg

4.1.6 Oligonukleotide

Die eingesetzten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG-Biotech (Ebersberg) und Operon Biotechnologies (Köln) bezogen. Vor erstmaliger Verwendung wurde von den PCR-Primern eine Stammlösung mit 25 pmol/µl erstellt, die Lösung aliquotiert und anschließend bei -20 °C gelagert.

β-actin fw

5'-CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT GGA GGG

β-actin rw	5'-TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA
ACOX1 for	5'-TGC CGA GCC AGC GTA TCC
ACOX1 rev	5'-CAC AGC GTT GGG GCG AGT CA
Cleavage_8oxoG	5'-GGC TTC ATC GTT GTC (8oxoG)CA GAC CTG GTG GAT ACC G
Cleavage_A	5'-CGG TAT CCA CCA GGT CTG AGA CAA CGA TGA AGC C
Cleavage_C	5'-CGG TAT CCA CGA GGT CTG CGA CAA CGA TGA AGC C
OGG for MM	5'-ATG AGG ACC AAG CTA GGT GAC
OGG rev WT MM	5'-GCC TCA CAA TCA ACT TAT CCC
OGG rev KO MM	5'-ATC TGC GTG TTC GAA TTC GCC AAT
CSB for WT MM	5'-GCT GCT TAT AAT AAT CCT CAT CTC C
CSB for KO MM	5'-ATC TGC GTG TTC GAA TTC GCC AAT G
CSB rev WT MM	5'-GTC TTC TGA TGA CGT TAG CTA TGA G
GAPDH for	5'-CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA
GAPDH rev	5'-CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT
Lac 1	5'-CGC AGC TAA AAA CAC TAC GA
Lac 2	5'-GCC GCT ACC GCC TCG AC
Lac 3	5'-AGA CCT GCG TAA CCC AG
Lac 4	5'-GAG AGA GTC CCG GTC CG
LACI for	5'-GTA TTA CCG CCA TGC ATA CTA G
LACI Primer #1A	5'-GCG TCG ATT TTT GTG ATG CT
LACI rev	5'-CGT AAT CAT GGT CGT CAT AGC TGT T
PPAR for	5'-CTC CGA GGG CTC TGT CAT C
PPAR rev	5'-ACA TGC ACT GGC AGC AGT GGA

4.1.7 Zelllinien

Alle für diese Arbeit verwendeten Zelllinien wachsen adhärent als Monolayer. Die verwendeten Kulturmedien sind in Abschnitt 4.1.10.1 angegeben.

F11.1

Spontan immortalisierte Mausembryo-Fibroblasten aus Wildtyp-Mäusen. Die Zellen wurden von D. Barnes (Imperial Cancer Research Fund, Clare Hall Laboratories, South Mimms, UK) erhalten. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 21 Stunden.

H4IIE

Hepatomzelllinie der Ratte, erhalten von H.-J. Schmitz (Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, Technische Universität Kaiserslautern). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 27 Stunden.

HEPA 1

Hepatomzelllinie der Maus, erhalten von H.-J. Schmitz (Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, Technische Universität Kaiserslautern). Die Verdopplungszeit beträgt etwa 31 Stunden.

UV^S1KOSV

Humane Zelllinie die eine C:G zu T:A Mutation an Position 308 des CSB-Gens besitzt. Da das entsprechende Basentriplett (TGA) nun als Stopcodon fungiert, wird nur ein verkürztes CSB-Protein mit 76 Aminosäuren gebildet (Horibata et al., 2004). Die Zellen wurden zur Verfügung gestellt von K. Tanaka (Laboratories of Organismal Biosystems, Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, Japan).

HA-CSB/UV^S1KOSV

Humane Zelllinie UV^S1KOSV, die stabil mit humaner wildtyp-CSB-cDNA transfiziert wurde (Horibata et al., 2004). Die Zellen wurden zur Verfügung gestellt von K. Tanaka (Laboratories of Organismal Biosystems, Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, Japan).

4.1.8 Bakterien

Escherichia coli SCS-8

E. Coli Stamm der Firma Stratagene, der so verändert, dass er nur den β -Teil der β -Galaktosidase exprimiert und somit für den BigBlue[®]-Mutations-Assay eingesetzt werden kann.

4.1.9 Mäuse

Sämtliche Tiere wurden in den Tierhaltungen der Universität Mainz unter einem 12 Stunden dauernden Tag- / Nachtrhythmus bei $22,5 \pm 2,5^{\circ}\text{C}$ und einer relativen Luftfeuchtigkeit zwischen 40-70% gehalten. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Tiere mit einer Standardzuchtdiät und Wasser *ad libitum* durch die Tierpfleger der ZVTE versorgt.

BigBlue[®]-Mäuse

Transgene männliche BigBlue[®]-Mäuse wurden im Alter von 2 Monaten über die Firma Taconic (Germantown, USA) bezogen. Diese Mäuse tragen auf Chromosom 4 ein Transgen (vgl. 4.2.5.1) und besitzen ansonsten einen C57BL/6 Hintergrund.

C57BL/6 (Wildtyp)

Die Tiere wurden in regelmäßigen Abständen von Charles-River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und in der Produktionszucht der ZVTE der Universität Mainz unter SPF-Bedingungen gehalten und vermehrt.

Csb^{-/-}/Ogg^{-/-}-Mäuse

Die Tiere wurden durch Kreuzung von *Ogg^{-/-}-knockout*- mit *Csb^{-/-}-knockout*-Mäusen von A. Klungland (Department of Molecular Biology, The National Hospital, University of Oslo, Oslo, Norwegen) generiert (Osterod et al., 2002).

Diverse Csb/Ogg/Blue-Mäuse

Zu Mutationsanalysen wurden durch Kreuzung von BigBlue[®]-Mäusen mit *Csb^{-/-}Ogg1^{-/-}*-Mäusen diverse *Csb/Ogg/Blue*-Mausgenotypen generiert (vgl. Kapitel 4.2.2.1). Tiere aus diesen Kreuzungsschritten, die das *lacI*-Gen nicht trugen, wurden teilweise zur Analyse von mitochondrialen DNA-Schäden eingesetzt.

Parp1^{-/-}-Mäuse

Parp1^{-/-}-knockout-Tiere wurden von Gilbert de Murcia (Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, Illkirch, Frankreich) generiert (de Murcia et al., 1997).

***Parp1*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäuse**

Die Tiere wurden durch Kreuzung von *Ogg1*^{-/-} mit *Parp1*^{-/-}-Mäusen von A. Klungland (Department of Molecular Biology, The National Hospital, University of Oslo, Oslo, Norwegen) generiert.

4.1.10 Verwendete Puffer, Lösungen und Medien**4.1.10.1 Zellkultur**

PBSCMF (pH 7,5)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,3 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
Kulturmedium für F11.1	DMEM (4,5 g/l Glucose) 15% FCS 1% Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg/ml)
Kulturmedium für H4IIE	MEM 2mM L-Glutamin 1% Penicillin/Streptomycin-Lsg. 10% FCS
Kulturmedium für HEPA1	DMEM 4mM L-Glutamin 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin-Lsg.
Kulturmedium für humane UV ^S Fibroblasten	DMEM (4,5 g/l Glucose) 10% FCS 1% Penicillin/Streptomycin-Lsg. (100 U/ml, 100 µg/ml)

4.1.10.2 Glutathion-Depletion und Glutathion-Gehalt

tert.-Buthioninsulfoximin-Stammlösung (10 mM, frisch angesetzt)	33,5 mg in 15 ml Vollmedium gelöst
tert.-Buthioninsulfoximin-Vorverdünnung (1 mM, frisch angesetzt, sterilfiltriert)	1:10-Verdünnung der Stammlösung (10mM) in Vollmedium
TCA-Puffer	5 ml 20%ige Trichloressigsäure 40 µl EDTA (0,5 M) 2 ml HCl (1 N) Ad 60 ml mit H ₂ O dest
Phosphat/EDTA-Puffer (pH 7,5) (autoklaviert)	7,98 g Na ₂ HPO ₄ 0,86 g NaH ₂ PO ₄ 1,18 g Na ₂ EDTA Ad 500 ml mit H ₂ O dest
Phosphat/NADPH-Lösung	0,3 mM Na ₄ NADPH
DTNB-Reagenz	6 mM DNTB in Phosphat/EDTA-Puffer
Glutathion-Standardlösung (frisch angesetzt)	20 mM Glutathion (reduziert) in Phosphat/EDTA-Puffer

4.1.10.3 Typisierung von Mäusen

LyseLösung:	10 ml Tris HCl (pH 8) 40 ml EDTA DiNa-Dihydrat (0.5 M) 4 ml NaCl (5 M) 10 ml SDS 20% 136 ml H ₂ O dest.
-------------	--

Die LyseLösung wird aus den autoklavierten Stammlösungen hergestellt.

4.1.10.4 Isolierung primärer Hepatozyten

Folgende Stamm-Lösungen werden zur Isolierung der Primärzellen benötigt:

Glucose-Lösung :	D (+) Glucose x H ₂ O	50 mM
Krebs-Henseleit-Puffer :	NaCl	1000 mM
	KCl	24 mM
	KH ₂ PO ₄	12 mM
	pH:	7,6 (NaOH)
HEPES-Puffer :	HEPES (freie Säure)	250 mM
	pH:	8,5
Aminosäure-Lösung :	L-Alanin	3,0 mM
	L-Asparaginsäure	1,0 mM
	L-Asparagin	3,0 mM
	L-Citrullin	1,5 mM
	L-Cystein	0,8 mM
	L-Histidin	6,4 mM
	L-Glutaminsäure	6,8 mM
	Glycin	13,3 mM
	L-Isoleucin	3,0 mM
	L-Leucin	6,1 mM
	L-Lysin	7,1 mM
	L-Methionin	3,7 mM
	L-Ornithin	3,8 mM
	L-Phenylalanin	3,3 mM
	L-Prolin	4,8 mM
	L-Serin	6,2 mM
	L-Threonin	11,3 mM
	L-Tryptophan	3,2 mM
	L-Tyrosin	3,0 mM
	L-Valin	6,8 mM

Die Aminosäuren werden in H₂O dest. aufgenommen. Nach 20 min Rühren wird mit 10 M NaOH ein pH-Wert von 11 eingestellt und weitere 10 min gerührt. Durch Zugabe von 37%iger HCl wird der pH-Wert auf 7,6 eingestellt und die Lösung mit H₂O dest. auf das endgültige Volumen aufgefüllt. Die Lösung wird sterilfiltriert und im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die Haltbarkeit beträgt 2-3 Monate.

Glutamin-Lösung (pH 7,6):	L-Glutamin	48 mM
---------------------------	------------	-------

Die Lösung wird sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Insulin-Lösung:	Insulin (I-5500)	2 g/l
-----------------	------------------	-------

Insulin wird in H_2O dest. durch Zugabe von einem Tropfen 1 M NaOH gelöst. Die Lösung wird mit 1 M HCl auf pH 7,4–7,6 eingestellt, ohne dass Insulin in der Lösung ausfällt, sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

EGTA-Lösung:	EGTA	125 mM
--------------	------	--------

EGTA wird in H_2O dest. aufgenommen und durch Zugabe von 1-2 Tropfen 1 M NaOH gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird auf 7,6 eingestellt, die Lösung sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

CaCl_2 -Lösung:	$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	129 mM
--------------------------	--	--------

MgSO_4 -Lösung	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	100 mM
-------------------------	--	--------

Soweit nicht anders angegeben, werden alle Lösungen autoklaviert.

Aus den oben genannten Stammlösungen werden unter sterilen Bedingungen folgende Puffer hergestellt:

EGTA-Puffer :	62 ml Glucose-Lösung
	10 ml Krebs-Henseleit-Puffer
	10 ml HEPES-Puffer
	15 ml Aminosäure-Lösung
	1 ml Glutamin-Lösung
	0,5 ml Insulin-Lösung
	0,4 ml EGTA-Lösung

Kollagenase-Puffer :	77,5 ml Glucose-Lösung
	12,5 ml Krebs-Henseleit-Puffer
	12,5 ml HEPES-Puffer
	19 ml Aminosäure-Lösung
	5 ml CaCl_2 -Lösung
	1,25 ml Glutamin-Lösung
	0,6 ml Insulin-Lösung
	62,5 mg Kollagenase

Die CaCl_2 -Lösung wird erst unmittelbar vor Benutzung des Kollagenase-Puffers zugesetzt. Ebenso wird unmittelbar vor Benutzung des Puffers die Kollagenase abgewogen und die entsprechende Menge unter leichtem Schütteln im Kollagenasepuffer gelöst.

Suspensions-Puffer :	310 ml Glucose-Lösung
	50 ml Krebs-Henseleit-Puffer
	50 ml HEPES-Puffer
	75 ml Aminosäure-Lösung
	5 ml Glutamin-Lösung
	2,5 ml Insulin-Lösung
	4 ml CaCl ₂ -Lösung
	2 ml MgSO ₄ -Lösung
	1 g BSA

1 g BSA wird auf 40 ml Suspensionspuffer aufgestreut und dieser bei 4 °C für mindestens 2 h aufbewahrt. Das BSA löst sich im Puffer. Nach Sterilfiltration wird das gelöste BSA in den verbliebenen Suspensions-Puffer gegeben.

4.1.10.5 Genexpressionsbestimmung der ACOX1 und PPAR α durch RT-PCR

Mastermix:	GAPDH	ACOX1	PPAR α
10x PCR-Puffer Y	5 μ l	5 μ l	5 μ l
	-	-	10 μ l
dNTP-Mix (10 mM)	5 μ l	1 μ l	1 μ l
Upstream Primer (25pmol/ μ l)	2 μ l	1 μ l	1 μ l
Downstream Primer (25pmol/ μ l)	2 μ l	1 μ l	1 μ l
MgCl ₂	4 μ l	-	-
cDNA-Template	1 μ l	1 μ l	1 μ l
H ₂ O	30 μ l	40,5 μ l	30,5 μ l
Taq-Polymerase	1 μ l	0,5 μ l	0,5 μ l

4.1.10.6 Alkalische Elution

PBSCMF (autoklav.)	pH 7,5	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,3 mM NaH ₂ PO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄
BE ₁ -Puffer (autoklav.)	pH 7,5	100 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 1 mM Na ₂ EDTA

BE ₁ /BSA-Puffer (autoklav.)	pH 7,5	100 mM NaCl 20 mM Tris/HCl 1 mM Na ₂ EDTA 0,50 g/l BSA
Lysepuffer (mit Proteinase K)	pH 10,0	100 mM Glycin 20 mM Na ₂ EDTA 2 % SDS pH-Wert mit 2 N NaOH eingestellt (400 mg/l Proteinase K)
Waschpuffer (autoklav.)	pH 10,0	20 mM Na ₂ EDTA pH-Wert mit 2 N NaOH eingestellt
Elutionspuffer	pH 12,15	20 mM EDTA pH-Wert mit TEAH eingestellt
DNA-Standard		200 µg/ml Kalbsthymus-DNA in BE ₁ -Puffer
Bisbenzimid-Stammlösung (Hoechst No. 33258) Die Lösung wird aliquotiert bei -20°C gelagert.		0,15 mM in H ₂ O dest.
Phosphatpuffer pH 6,0 (autoklav.)		68,1 mM NaH ₂ PO ₄ 15,8 mM Na ₂ HPO ₄
Phosphatpuffer pH 7,2 (autoklav.)		21,7 mM NaH ₂ PO ₄ 93,0 mM Na ₂ HPO ₄ mit Bisbenzimid (1 % (v/v) Bisbenzimid-Stamm- lösung)

Die Bisbenzimid-Stammlösung wird dem autoklavierten Phosphatpuffer erst unmittelbar vor Gebrauch zugesetzt.

4.1.10.7 Cleavage-Assay

Tris-HCl, 1 M, pH 7,6	121,1 g Tris-Base pH mit HCl auf 7,6 einstellen ad 1 l mit H ₂ O dest.
PNK-Puffer (10x)	0,5 ml Tris-HCl, 1 M (pH 7,6) 0,1 ml MgCl ₂ , 1 M 2 µl EDTA, 0,5 M ad 1 ml mit H ₂ O dest.
Chloroform/Ethanol (1:1)	10 ml Ethanol 10 ml Chloroform 20 ml TE-Puffer (pH 8,0) hinzufügen, gut schütteln, nach dem Trennen der Phasen die untere verwenden
TE-Puffer, pH 8,0	10 mM Tris-Base pH mit HCl auf 8,0 einstellen 1 mM EDTA (pH 8,0)
NaCl, 5 M	29,22 g NaCl Ad 100 ml mit H ₂ O dest.
SDS, 10%	10 g Sodiumdodecylsulfat in 100 ml H ₂ O dest. Lösen
Lysepuffer	20 mM Tris-Base einwiegen, PH mit HCl auf 8,0 einstellen 1 mM EDTA
Stopp-Puffer	210 µl TBE (10x) 50 µl Bromphenolblau 50 µl Xylencyanol 1% 800 µl deionisiertes Formamid 90%
Ammoniumpersulfat (APS)-Lösung 10%	10 g APS in 100 ml H ₂ O dest.

TBE-Puffer (10x)	108,0 g Tris-Base 55,0 g Borsäure 40,0 ml EDTA, 0,5 M, pH 8,0
Polyacrylamid-Gelmix (20%)	10 ml TBE (10x) 42,0 g Harnstoff 50 ml Acrylamid-Lösung (40%) ad 100 ml H ₂ O dest.

4.1.10.8 Big Blue[®] Mutations-Assay

Lysepuffer I	8,20 g NaCl 0,22 g KCl 120 g Sucrose 0,30 g EDTA 10 ml Triton [®] X-100 1,58 g Tris-HCl (pH 8,3)
--------------	--

Die Substanzen werden in 800 ml H₂O dest. gelöst, der pH-Wert auf 8,3 eingestellt, das Volumen auf 1000 ml ergänzt und sterilfiltriert.

Lysepuffer II	1,75 g Na ₂ HPO ₄ 8,0 g NaCl 0,2 g KCl 0,2 g KH ₂ PO ₄ 20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
---------------	--

Die Substanzen werden in 800 ml H₂O dest. gelöst, der pH-Wert mit 1 N NaOH auf pH 8,0 eingestellt, das Volumen auf 1000 ml ergänzt und die Lösung autoklaviert.

Kurz vor der Anwendung wird der Lösung pro Milliliter 20 µl eines RNase-IT[™] Ribonuklease-Cocktails zugesetzt.

Maltose 20% (w/v) / MgSO ₄ (1 M)	20,0 g Maltose
Lösung	24,6 g MgSO ₄ x 7H ₂ O H ₂ O dest. ad 100 ml

Die Lösung wird sterilfiltriert und kann bei 4°C bis zu 6 Monaten gelagert werden.

MgSO ₄ Lösung (10 mM)	2,46 g MgSO ₄ x 7H ₂ O H ₂ O dest. ad 1000 ml
----------------------------------	---

Die Lösung wird 30 min autoklaviert und kann dann bis zu einem Jahr bei Raumtemperatur aufbewahrt werden.

NZY Broth Medium	5,0 g NaCl
	2,0 g MgSO ₄ x 7H ₂ O
	5,0 g Hefeextrakt
	10,0 g Casein-Pepton

Die Substanzen werden in 800 ml H₂O dest. gelöst, der pH-Wert mit 10 N NaOH auf pH 7,0 eingestellt, das Volumen mit H₂O auf 1 Liter ergänzt und anschließend für 30 min autoklaviert.

Proteinase K-Lösung (2mg/ml)	100 mg Proteinase K
	30 ml steriles H ₂ O
	10 ml SDS-Lösung 10% (w/v)
	10 ml 0,5 M EDTA (pH 7,5)

SM Puffer	5,8 g NaCl
	2,0 g MgSO ₄ x 7H ₂ O
	50,0 ml Tris-HCl (1 M) pH 7,5
	5,0 ml Gelatinelösung 2% (w/v)
	H ₂ O dest. ad 1000 ml

Der pH-Wert der Lösung wird auf pH 7,5 eingestellt, die Lösung für 30 min autoklaviert und kann bis zu einem Jahr bei Raumtemperatur gelagert werden.

4.1.10.9 Mitochondrialer DNA-Relaxationsassay

BE ₁ -Puffer pH 7,5	100 mM NaCl
	20 mM Tris/HCl
	1,0 mM Na ₂ EDTA
BE ₁ /BSA-Puffer pH 7,5	0,1 g/l BSA in BE ₁ -Puffer pH 7,5
Fällungslösung	125 mM Na-Acetat
	In EtOH abs.
Homogenisationspuffer	85,58 g Sucrose
	0,38 g EGTA
	2,42 g Tris

Die Substanzen werden in 1000 ml H₂O dest. gelöst, der pH-Wert der Lösung auf pH 7,4 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

Homogenisationspuffer / BSA	Homogenisationspuffer mit 0,1% BSA
-----------------------------	------------------------------------

Lösung I	50 mM Glucose
	25 mM Tris HCl pH 8.0
	10 mM EDTA

Vor der Verwendung wird RNase A (10 mg/ml) zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben.

Lösung II	0,2 N NaOH
	1% SDS

Die Lösung II wird vor jeder Verwendung frisch hergestellt.

Lösung IIIa	60,0 ml Kaliumacetat (5 M)
	11,5 ml Eisessig
	28,5 ml H ₂ O

Lösung IIIb	60,0 ml Kaliumacetat (5 M)
	40,0 ml H ₂ O

Lösung IV	Lösung IIIb, die durch Zugabe von Lösung IIIa auf pH 6,6 eingestellt wird.
-----------	--

Phosphatpuffer pH 7,4	5 mM KH ₂ PO ₄
	50 mM NaCl

Stopppuffer pH 7,8	40 mM Tris/HCl
	5 mM Na-Acetat
	21 mM EDTA
	0,05% Bromphenolblau
	70% Glycerin
	4% SDS

TAE-Puffer pH 7,8 (10x)	400 mM Tris-HCl
	50 mM Na-Acetat
	10 mM EDTA

Der pH-Wert wird mit 2 N H₂SO₄ eingestellt.

4.2 Methoden

4.2.1 Arbeiten mit Zellen

4.2.1.1 Zellkultur und Zellpflege

Alle Zellkulturarbeiten werden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die in dieser Arbeit beschriebenen Zelllinien werden bei 37 °C, 5% CO₂ und 99% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen werden in Abhängigkeit von ihrer Verdopplungszeit - spätestens jedoch nach 4 Tagen – passagiert. Zum Passagieren der adhärenenten Zellen wird das Medium mit einer sterilen Pipette abgenommen und die Zellen einmal mit 10 ml PBSCMF gespült. Anschließend werden die Zellen mit 1-2 ml Trypsin/EDTA-Lösung für 2-3 Minuten bei 37 °C inkubiert, um die Zellen abzulösen. Die Zellen werden danach in ihrem entsprechenden Medium resuspendiert und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Ein definiertes Volumen der Zellsuspension wird in ISOTON II-Lösung überführt und die Zellzahl mit Hilfe eines Coulter Counter™ Gerätes bestimmt. Die Zellen können nun verdünnt in eine neue Zellkulturflasche ausgesät werden.

Falls nicht anders angegeben, werden für alle Experimente Zellen verwendet, die sich in einer exponentiellen Wachstumsphase befinden.

4.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Um Zelllinien über einen längeren Zeitraum aufbewahren zu können, werden sie kryokonserviert. Hierzu werden die Zellen nach dem Ablösen in frischem Medium aufgenommen und 5 min bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und die Zellen in eisgekühltem Einfriermedium (Medium mit 10% DMSO) resuspendiert (ca. 2 Millionen Zellen/ml). Nach 2 h Lagerung bei -20 °C werden die Kryoröhrchen über Nacht bei -70 °C gelagert und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung werden die Zellen bei 37 °C aufgetaut und die Zellsuspension direkt in 10 ml Kulturmedium überführt. Zur Entfernung des zelltoxischen DMSO wird die Zellsuspension für 5 min bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen werden nun in eine Zellkulturflasche überführt und stehen bei entsprechendem Wachstum nach frühestens 2 Passagen für Experimente zur Verfügung.

4.2.1.3 Depletion der zellulären Glutathion-Spiegel

Zur Depletion von Glutathion in Zellen werden die Zellen mit Buthioninsulfoximin (BSO) inkubiert. Buthioninsulfoximin ist ein selektiver, irreversibler Inhibitor der γ -Glutamylcystein-Synthetase, einem Enzym, das den ersten Schritt der Glutathion-Synthese katalysiert (Griffith und Meister, 1979).

Für den Versuch wird zunächst die BSO-Stammlösung mit Kulturmedium zur Endkonzentration 1 mM verdünnt. Diese Verdünnung wird dann zu den Zellen in die Kulturflasche gegeben, nachdem das alte Kulturmedium entfernt wurde. Die Inkubation wird im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂, 99% Luftfeuchtigkeit für 24 h durchgeführt. Anschließend werden die Zellen zweimal mit PBSCMF gewaschen, um BSO vollständig zu entfernen.

4.2.1.4 Enzymatische Quantifizierung des Glutathion-Gehaltes

Prinzip

Zur Ermittlung des Gesamt-Glutathion-Gehaltes von Zellen wird die Methode nach *Griffith* benutzt (Griffith, 1985). Als Detektionsreagenz wird dabei 5,5'-Dithio-(2-nitrobenzoesäure) (DTNB, Ellman's Reagenz) verwendet, welches mit Thiolgruppen unter Bildung von 5'-Thio-(2-nitrobenzoesäure) (TNB) reagiert, wie in Gleichung 1 dargestellt. Dabei entsteht oxidiertes Glutathion (GSSG), das durch das Enzym Glutathionreduktase unter NADPH/H⁺-Verbrauch reduziert wird. Reduziertes Glutathion (GSH) kann nun erneut mit DTNB reagieren.



Gleichung 1: Reaktionsgleichungen zur Bestimmung von Glutathion mit DTNB-Reagenz (Griffith, 1985).

Bei der enzymatischen Glutathion-Bestimmung sind die Konzentrationen von DTNB, NADPH und GR so gewählt, dass die Geschwindigkeit der gesamten Reaktion c) proportional zur Konzentration des gesamten Glutathiongehaltes verläuft. Die Bildung von TNB lässt sich spektralphotometrisch als Absorption bei 412 nm verfolgen.

Durchführung

10 Mio. Zellen werden abgelöst und in 10 ml Medium resuspendiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 1200 x g und 4°C wird der Überstand verworfen und das Pellet in 5 ml PBSCMF aufgenommen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt werden die Zellen in genau 5 ml PBSCMF resuspendiert. Anschließend wird die Zellzahl bestimmt und ein letztes Mal zentrifugiert. Das Pellet wird in eisgekühltem TCA-Puffer aufgenommen, so dass sich eine Zelldichte von 10 Mio. Zellen/ml ergibt, und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen werden nun mit einem Ultraschall-Homogenisator (35 W, 3 x 20 Impulse, 10kHz) lysiert und die festen Zellbestandteile durch einen Zentrifugationsschritt (10 min, 10000 x g, 4 °C) abgetrennt. Je nach erwarteter Glutathion-Konzentration werden 10-40 µl des Überstandes photometrisch vermessen. Dazu pipettiert man 700 µl Phosphat/NADPH-Lösung, 100 µl DTNB-Reagenz und 10-40 µl des Überstandes in eine Einmalküvette und füllt das Volumen mit H₂O dest. auf 1000 µl auf. Die Probe wird nun gemischt und anschließend 2 µl Glutathionreduktase-Lösung hinzupipettiert. Nun wird für 2 min, alle 30 s die Absorption bei 412 nm bestimmt. Zur Quantifizierung des Glutathions wird mit 5-40 µl einer 0,1 mM GSH-Lösung eine Kalibriergerade erstellt.

4.2.1.5 Behandlung von Zellen mit WY-14,643

Zur Behandlung von Zellen mit WY-14,643 wird das Medium einer Zellkulturflasche (75 cm²) abgenommen und anschließend durch genau 10 ml neues Medium ersetzt. Anschließend pipettiert man je nach gewünschter Endkonzentration (250 – 1000 µM) eine entsprechende Menge WY-14,643-Stammlösung (in DMSO) in die Flasche und mischt unter leichtem Schwenken. Die Behandlung erfolgt über 24 h. Die Zellen werden mindestens 24 h vor der Behandlung mit WY-14,643 ausgestreut.

4.2.1.6 Bestimmung der Genexpression von PPAR α mittels RT-PCR

Mit Hilfe der Reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) kann qualitativ die Genexpression von spezifischen Genen nachgewiesen werden. Zur Untersuchung der Expression des Peroxisomenproliferator aktivierten Rezeptors α (PPAR α) wird RNA mit Hilfe eines RNeasy[®]-Kits nach den Anweisungen des Herstellers aus 10 Mio. HEPA1-Zellen isoliert. Daraus wird mit Hilfe der Reversen-Transkriptase Omniscript[®] und einem Oligo-dT-Primer cDNA synthetisiert (vgl. Kapitel 4.2.2.9). Die Amplifikation eines für PPAR α spezifischen PCR-Produkts (654 bp) erfolgt mit dem in Kapitel 4.1.10.5 angegebenen Mastermix und folgendem Temperaturprogramm (3 min bei 94 °C; 35 Zyklen: 1 min bei 92 °C, 1 min bei 65 °C und 1 min bei 72 °C; 10 min bei 72 °C) im Thermocycler.

4.2.2 Arbeiten mit Tieren

4.2.2.1 Generierung transgener *knockout*-Mäuse

Prinzip

Durch Verpaarung von Mäusen, in deren Genom ein Transgen integriert wurde, mit Mäusen, bei denen ein oder mehrere Gene gentechnisch ausgeschaltet

wurden („*knockout*“), ist es möglich, transgene *knockout*-Mäuse zu erhalten. Um alle Merkmale in einem Tier vereinigen zu können, müssen die Genveränderungen auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sein (vgl. Tabelle 4).

Tabelle 4: Chromosomale Lokalisation von *Csb*-, *Ogg1*- und transgenem *lacI*-Gen in BigBlue®-Mäusen.

Bezeichnung	Lokalisation	Pubmed GeneID / Literatur
<i>Csb</i>	Chromosom 14	319955
<i>Ogg1</i>	Chromosom 6	18214
<i>lacI</i> (BigBlue®)	Chromosom 4	(Dycaico et al., 1994)

Durch die Generierung von transgenen BigBlue®- *knockout*- und *double-knockout*-Tieren können sowohl spontane Mutationsfrequenzen, als auch durch Fremdstoffe induzierte Mutationen organspezifisch in diesen Tieren untersucht werden. Als Targetgen für die Mutationsexperimente in den BigBlue®-Mäusen dient das bakterielle *lacI*-Gen (vgl. 4.2.5).

Durchführung

Zur Generierung transgener *Csb*^{-/-}*Ogg1*^{-/-}-*double-knockout*-Tiere werden in einem 1. Zuchtschritt jeweils ein BigBlue^{+/+}-Männchen polygam mit zwei *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Weibchen angepaart. Der daraus resultierende Nachwuchs braucht nicht genotypisiert werden, da dieser ausnahmslos den Genotyp *Csb*^{+/-}/*Ogg1*^{+/-}/BigBlue^{+/-} besitzt. Im darauf folgenden 2. Zuchtschritt werden *Csb*^{+/-}/*Ogg1*^{+/-}BigBlue^{+/-}-Mäuse beiderlei Geschlechts aus dem 1. Zuchtschritt mit homozygoten *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen angepaart. Aus dieser Paarung können insgesamt 8 unterscheidbare Genotypen hervorgehen. Deshalb müssen alle Tiere genotypisiert werden. In einem 3. Zuchtschritt werden *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}/BigBlue⁺-Mäuse mit *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}/BigBlue⁺-Mäusen verpaart, um diesen Stamm zu erhalten. Zur besseren Übersicht ist das Kreuzungsschema in der folgenden Übersicht dargestellt:

1. Zuchtschritt

$Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}$ x $BigBlue^{+/+}$ → $Csb^{+/-}/Ogg1^{+/-}/BigBlue^{+/-}$

2. Zuchtschritt

$Csb^{+/-}/Ogg1^{+/-}/BigBlue^{+/-}$ x $Csb^{+/-}/Ogg1^{+/-}/BigBlue^{+/-}$ →

$Csb^{+/-}/Ogg1^{+/-}/BigBlue^{-/-}$
 $Csb^{-/-}/Ogg1^{+/-}/BigBlue^{-/-}$
 $Csb^{+/-}/Ogg1^{-/-}/BigBlue^{-/-}$
 $Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}/BigBlue^{-/-}$
 $Csb^{+/-}/Ogg1^{+/-}/BigBlue^{+/-}$
 $Csb^{-/-}/Ogg1^{+/-}/BigBlue^{+/-}$
 $Csb^{+/-}/Ogg1^{-/-}/BigBlue^{+/-}$
 $Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}/BigBlue^{+/-}$

3. Zuchtschritt

$Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}/BigBlue^{+/-}$ x $Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}/BigBlue^{+/-}$ →

$Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}/BigBlue^{+/-}$
 $Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}/BigBlue^{+/-}$
 $Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}/BigBlue^{-/-}$

4.2.2.2 Genotypisierung von Mäusen

Zur Untersuchung des Genotyps von Mäusen kann aus Schwanzspitzen der Tiere DNA isoliert werden und dann mittels einer Polymerase-Kettenreaktion und allelspezifischen Primern ein spezifisches DNA-Stück mit definierter Länge amplifiziert werden. Praktisch wird dabei folgendermaßen vorgegangen:

Markierung der Tiere:

Um die Tiere nach einer Typisierung unterscheiden zu können, werden sie mit Hilfe einer Ohrmarkenzange und speziellen Nagerohrmarken gekennzeichnet. Die Nummern der Mäuse werden auf den entsprechenden Käfigen notiert.

Gewinnung der Schwanzbiopsien:

Zur Gewinnung von Schwanzbiopsien wird den Tieren mit einer Pinzette und mittels einer mit EtOH 70% und Wasser gespülten Schere ca. 0,5 cm ihres Schwanzes abgetrennt und dieser sofort in 750 µl Lysepuffer gegeben.

Aus Tierschutzgründen sollten Schwanzbiopsien nur bis zur 4. Woche nach Geburt entnommen werden.

DNA-Isolation:

Zur Isolation der DNA werden zu 750 µl Lysepuffer, in denen sich ein Teil des Mäuseschwanzes befindet, 37,5 µl Proteinase K-Lösung (10mg/ml) gegeben und die Proben über Nacht bei 55°C geschüttelt. Am nächsten Morgen werden die Proben 10 min gerüttelt, anschließend 250 µl 5 M NaCl zugegeben und erneut für 10 min auf einem Vortex-Gerät gerüttelt. In einem sich anschließenden 10-minütigen Zentrifugationsschritt werden bei 14000U/min nicht lysierte Zelltrümmer abgetrennt. 750 µl des Überstandes werden in ein neues Cap überführt. Um die DNA zu präzipitieren werden 500 µl Isopropanol zugesetzt und der Ansatz zwei Minuten gemischt. Anschließend wird die DNA für 5 min bei 14 000U/min abzentrifugiert und das DNA Pellet noch zwei Mal mit EtOH (70%) gewaschen. Um die DNA zu lösen, wird sie mit 50 µl DNase-freiem Wasser versetzt und 30 Minuten bei 55 °C leicht geschüttelt. Die gelöste DNA wird danach über Nacht bei -20 °C gelagert. Am nächsten Morgen werden die Proben aufgetaut und 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt. Sie können nun für die PCR eingesetzt werden.

Polymerase-Kettenreaktion:

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren, mit dessen Hilfe ein beliebiger DNA-Abschnitt amplifiziert werden kann (Mullis und Faloona, 1987). Die Position und Länge des Amplikons wird dabei durch die Wahl der Primer bestimmt. Durch die Kombination von drei verschiedenen Primern, von denen ein 3'-Primer komplementär zu einer *knockout*-Sequenz und ein 3'-Primer komplementär zu einer Wildtyp-Sequenz ist, können sowohl Wildtyp- und *knockout*-, als auch heterozygote Tiere identifiziert werden.

Ausgehend von der Zahl der zu bearbeitenden Proben wird nach Tabelle 5 eine entsprechende Menge Mastermix vorbereitet und dann auf Reaktionsgefäße verteilt. Zu jedem Ansatz wird jeweils 1µl der *Template*-DNA pipettiert.

Tabelle 5: Übersicht der zur Genotypisierung von Mäusen verwendeten Mastermixe.

	<i>Csb</i>	<i>Ogg1</i>	<i>lacI</i>
Reaktionspuffer Y	5 µl	5 µl	5 µl
Enhancer Lösung P	10 µl	10 µl	-
dNTP-Mix (10mM)	1 µl	1 µl	1,5 µl
Upstream Primer (25 pmol/µl)	2 µl	2 µl	1 µl
Downstream Primer KO (25 pmol/µl)	2 µl	2 µl	1 µl
Downstream Primer WT (25 pmol/µl)	2 µl	2 µl	-
Taq Polymerase	0,25 µl	0,25 µl	0,25 µl
DNA Template	1 µl	1 µl	1 µl
H ₂ O steril	26,75 µl	26,75 µl	40,25 µl
Summe	50 µl	50 µl	50 µl

Die Proben werden kurz gemischt und die PCR mit den in Tabelle 6 aufgeführten Bedingungen gestartet.

Tabelle 6: Temperaturprogramme zur Amplifizierung des *Csb*-, *Ogg1*- und *lacI*-Gens.

<i>Csb</i> und <i>Ogg1</i>	<i>lacI</i>
1 Zyklus: 94 °C, 3 min	1 Zyklus: 95 °C, 5 min
35 Zyklen: 94 °C, 45 s	35 Zyklen: 95 °C, 30 s
59 °C, 1 min	53 °C, 45 s
72 °C, 2 min	72 °C, 60 s
1 Zyklus: 72 °C, 10 min	1 Zyklus: 72 °C, 10 min

Die amplifizierten DNA-Stücke können nun mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Kapitel 4.2.6.6) aufgetrennt und die Länge der Banden mit Hilfe eines DNA-Markers zugeordnet werden. Jeder Genotyp ist durch das in Abbildung 10 gezeigte, charakteristische Bandenmuster zu erkennen:

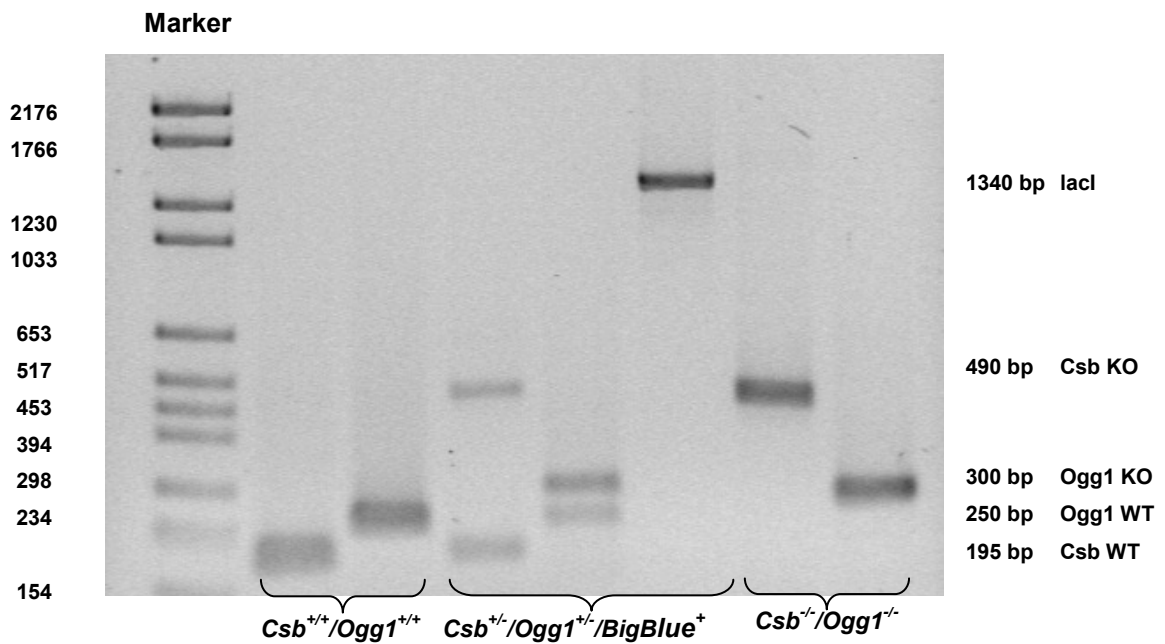


Abbildung 11: PCR-Produkte verschiedener Genotypen in einem 2%igen Agarosegel. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid gefärbt. Marker = Roche DNA-Marker VI.

4.2.2.3 Gewinnung primärer Hepatozyten

Die Hepatozyten der Maus werden mit Hilfe einer modifizierten EGTA/Kollagenase Perfusions-Technik (Seglen, 1976; Hengstler et al., 2000) isoliert, wie in Abbildung 12 schematisch dargestellt.

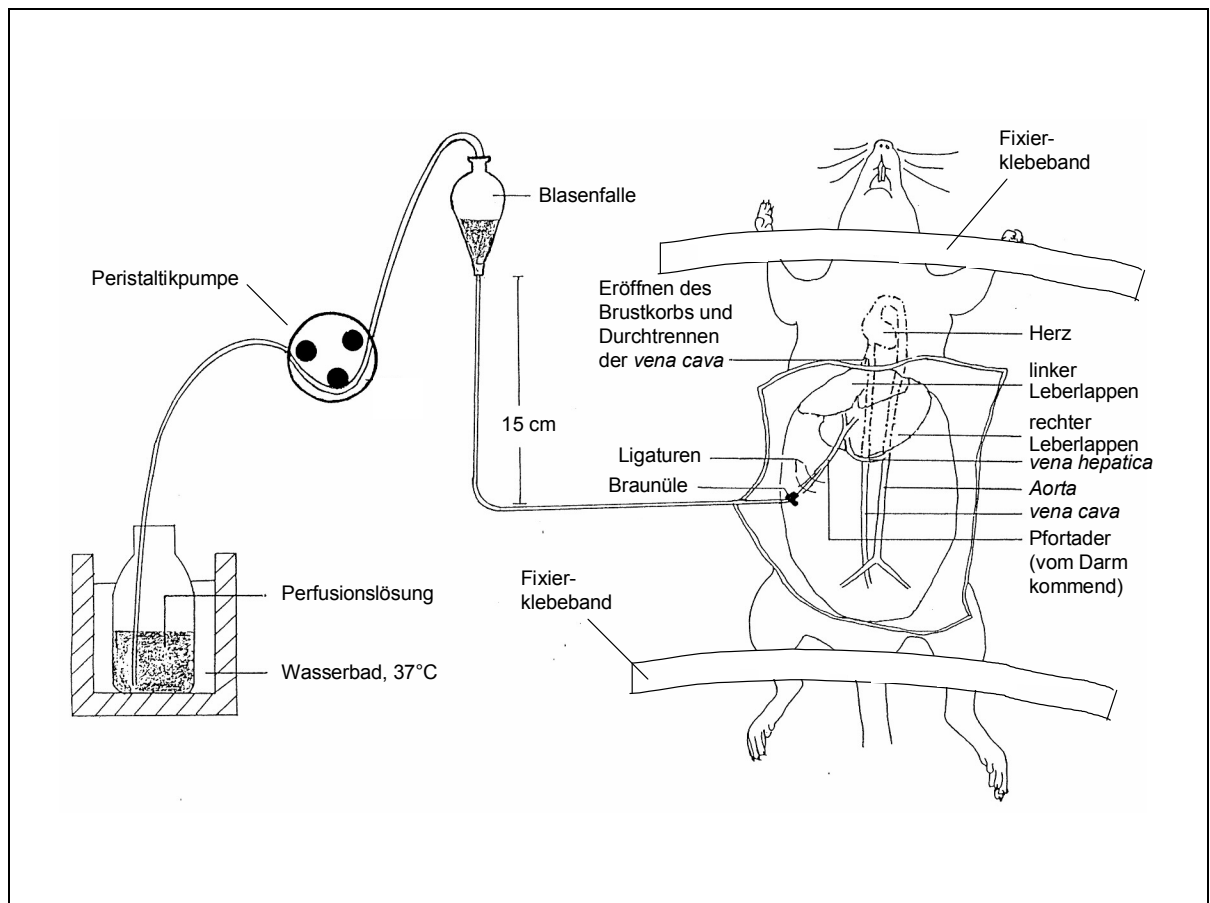


Abbildung 12: Schematische Abbildung der Leberperfusion *in vivo*.

Die Tiere werden nach der Tötung in einer mit Isofluran gesättigten Kammer auf einer Halterung fixiert und die Bauchdecke geöffnet. Anschließend wird die Pfortader (Vena portae) freigelegt. Mit einer chirurgischen Schere wird die Pfortader zur Hälfte durchtrennt, so dass eine Flügelkanüle, die mit einem Pumpenschlauch verbunden ist, in das eröffnete Gefäß eingeführt werden kann. Eine zuvor um die eingeführte Flügelkanüle und die Pfortader gelegte Schlinge dient zur Fixierung der Kanüle im Gefäß. Die Halsschlagader wird nun durchtrennt und die Leber luftblasenfrei für 15 min (Pumpgeschwindigkeit max. 1 ml/min) perfundiert. Anschließend wird der Puffer gewechselt und für maximal 30 min mit Kollagenase-Puffer perfundiert (max. 1 ml/min). EGTA- und Kollagenase-Puffer werden sowohl 15 min vor, als auch während der gesamten Perfusion im Wasserbad auf 37 °C temperiert und mit Carbogen* begast, welches durch Glasfritten in die Pufferflaschen eingeleitet wird. Nach erfolgter Perfusion wird die komplette Leber in 10 ml eisgekühlten Suspensionspuffer überführt und vorsichtig

die Gallenblase entfernt. Mit Hilfe einer Pinzette kann nun die Leberkapsel geöffnet werden und durch vorsichtiges Schütteln und Zerpfen können die Hepatozyten aus dem Gewebeverband freigesetzt werden. Die so erhaltene Zellsuspension wird durch ein 100 µm Zellsieb in ein Greinerröhrchen gegossen, um größere Gewebestückchen abzutrennen. Die Hepatozyten werden nun für 10 min bei 15 x g und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand der Zellsuspension vorsichtig abgenommen. Nach Zugabe von 30 ml kaltem Suspensionspuffer werden die Zellen durch vorsichtiges Schwenken vereinzelt und der Waschschrift noch insgesamt zweimal wiederholt. Die Zellen werden vor der Weiterverarbeitung auf Eis gelagert.

* Carbogen enthält 5% (v/v) CO₂. Bei der Begasung der o.g. Puffer kommt es zu einem Absinken des pH-Wertes. Deshalb wird für die Herstellung von EGTA- und Kollagenase-Puffer HEPES-Puffer pH 8,5 verwendet. Während der Begasung mit Carbogen wird in den verwendeten Lösungen dann ein pH-Wert von 7,8 erreicht.

4.2.2.4 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung von Hepatozyten

Die Vitalität der primären Hepatozyten wird mittels Trypanblau-Ausschluß bestimmt. Dazu werden 200 µl der Zellsuspension mit 200 µl Trypanblau-Lösung (4 mg/ml in PBS) gemischt. Um die Hepatozyten nicht zu beschädigen, werden Pipettenspitzen verwendet, deren Spitzen 5 mm abgeschnitten wurden. In einer Neubauer-Kammer werden im Lichtmikroskop die nicht gefärbten lebenden Zellen und blau gefärbten toten Zellen gezählt. Hieraus lässt sich die Gesamtzellzahl und die Vitalität berechnen (prozentualer Anteil der lebenden Zellen).

4.2.2.5 Fütterung der Mäuse mit WY-14,643

Zur Behandlung der Mäuse mit WY-14,643 werden jeweils für die Kurzzeit- und Langzeitbehandlung verschiedene Applikationsarten gewählt.

Für die einmalige und viermalige Behandlung wird WY-14,643 in Sesamöl suspendiert (10mg/ml) und per Schlundsonde 100 mg/kg Körpergewicht durch einen tierversuchserfahrenen Mediziner oder Veterinärmediziner appliziert.

Für alle längeren Fütterungszeitpunkte wird WY-14,643 in einer Konzentration von 0,025% *ad libitum* über das Haltungsfutter verabreicht. Die Herstellung der Prüfdiät erfolgt durch die Firma Altromin. Zur Prävention einer Oxyureninfektion wird sowohl in die Prüfdiät, als auch in das Haltungsfutter Fenbendazol in einer Konzentration von 1% eingearbeitet.

Vor Beginn der Fütterungsexperimente werden die Tiere randomisiert und der Verum- oder Kontrollgruppe zugeordnet.

4.2.2.6 Gewichtsmonitoring

Um mögliche Gewichtsveränderungen an den Mäusen durch eine Gabe von WY-14,643 untersuchen zu können, werden die Tiere einmal wöchentlich gewogen und dabei individuell mit einem wasserfesten Farbstift am Schwanz markiert.

4.2.2.7 Organentnahmen

Zur Analyse der präneoplastischen Läsionen, zur Bestimmung der Expression der Acyl-CoA-Oxidase und zur Gewinnung von mitochondrialer DNA müssen Lebern aus Tieren entnommen werden. Dazu werden die Tiere nach Betäubung mit Isofluran mittels einer Nagerguillotine dekapitiert und falls benötigt, das dabei austretende Blut in einem Reaktionsgefäß aufgesammelt. Danach wird der Bauchraum geöffnet und die Leber entnommen. Wird das Material nicht direkt verwendet, so wird es in Stickstoff schockgefrostet und bei -70°C gelagert.

Zur Mutationsanalyse können weitere Organe wie Nieren, Milz, Hoden, Lungen und Gehirn entnommen werden. Auch diese Organe werden direkt in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -70°C gelagert.

Lebern, die zur Analyse von präneoplastischen Läsionen bestimmt sind, werden nach dem Entbluten flach auf einem Metallblock eingefroren und anschließend bei -70°C gelagert.

4.2.2.8 Blutentnahme und Plasmagewinnung

Zur Plasmagewinnung aus Mäuseblut wird 30 µl Heparin 5000 I.E in ein Reaktionsgefäß vorgelegt. Anschließend wird eine betäubte Maus mit einer Nagerguillotine dekapitiert und das austretende Blut in dem Reaktionsgefäß gesammelt. Das Röhrchen wird leicht geschwenkt, direkt bei 2500U/min für 10 min zentrifugiert und der klare Überstand in ein Versandröhrchen überführt. Das Plasma wird nun zur Bestimmung diverser Laborparameter der Firma Biocontrol (Ingelheim) übersendet.

4.2.2.9 Semiquantitative Genexpressionsbestimmung der Acyl-CoA-Oxidase durch RT-PCR

Prinzip

Die semiquantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) erlaubt es, die Genexpression einzelner Gene im Vergleich zu einem Kontrollgen („*housekeeping gene*“) zu bestimmen, dessen Expression sich weder unter endogenem noch exogenem Einfluss verändert. Dabei nutzt man aus, dass es einen linearen Zusammenhang zwischen eingesetzter mRNA und daraus mittels RT-PCR amplifizierter DNA gibt, bevor die Reaktion eine Plateauphase erreicht. Quantifiziert man die erhaltene DNA, so kann man daraus eine Veränderung der Genexpression berechnen. Mit dieser Methode soll untersucht werden, ob es unter einer Behandlung mit WY-14,643 zu einer Veränderung der peroxisomalen Acyl-CoA-Oxidase (ACOX1)-Expression kommt. Als Kontrollgen wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) eingesetzt.

RNA Isolierung

Aus tiefgefrorenen Lebern (vgl. Kapitel 4.2.2.7) von WY-14,643 behandelten und unbehandelten Mäusen (vgl. Kapitel 4.2.2.5) wird die Gesamt-RNA mit einem RNeasy® MiniKit der Firma Qiagen isoliert. Dazu werden ca. 30 mg mit Mörser, Pistill und Stickstoff pulverisierte Leber mit 600 µl RLT Lysepuffer aufgenommen und resuspendiert. Die Suspension wird nun mittels einer QIAshredder-Säule homogenisiert und mit 600 µl EtOH 70% durch Pipettieren vermischt. Die Probe wird dann in zwei Aliquots auf eine RNeasy-mini-spin-Säule gegeben und für 15 s bei 9000 x g zentrifugiert. Das Eluat wird verworfen und die Gesamt-RNA, die sich auf der Säule befindet, mit 700 µl RW1-Puffer und anschließend mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen (jeweils 15 s bei 9000 x g). Der Waschschrift mit RPE-Puffer wird wiederholt. Zum Trocknen der Säule wird anschließend für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Nun kann die RNA mit 80 µl RNase-freiem Wasser eluiert werden (1 min; 9000 x g).

Die Qualität der Aufarbeitung und der Gehalt der RNA werden photometrisch bestimmt. Zusätzlich kann ein Agarosegel zur Überprüfung der Qualität angefertigt werden.

Reverse Transkription

Die Synthese des ersten cDNA-Stranges erfolgt mit Hilfe der rekombinaten RNase H-Reversen-Transkriptase Omniscript® der Firma Qiagen (Phillips und Eberwine, 1996). Der Startpunkt der Reaktion wird durch einen Oligo-dT-Primer der Kettenlänge 12–18 bestimmt. Die Reaktion wird nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Zu 2 µg Gesamt-RNA werden 2,5 µl dNTP-Mix (je 0,5 mM), 2,5 µl Oligo-dT-Primer (10 µM) und RNase-freies Wasser ad 19 µl pipettiert. Anschließend wird 1 µl Reverse Transkriptase Omniscript® zupipettiert, kurz durch Vortexen gemischt und 1 h bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Die erhaltene cDNA dient als Matritze für die sich anschließende PCR.

Polymerase-Kettenreaktion

Zunächst wird untersucht, bei welcher Zyklenzahl die Amplifikation der PCR-Produkte in einer logarithmischen Phase verläuft. Dazu werden jeweils Amplifikate

für das Gen GAPDH und ACOX1 erstellt (vgl. 4.1.10.5). Die entstehenden PCR-Produkte werden nach verschiedenen Amplifikationszyklen dem Thermocycler entnommen, auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen (vgl. 4.2.6.6) und nach Färbung mit Ethidiumbromid, die Fluoreszenzintensitäten der Banden bestimmt (Abbildung 13).

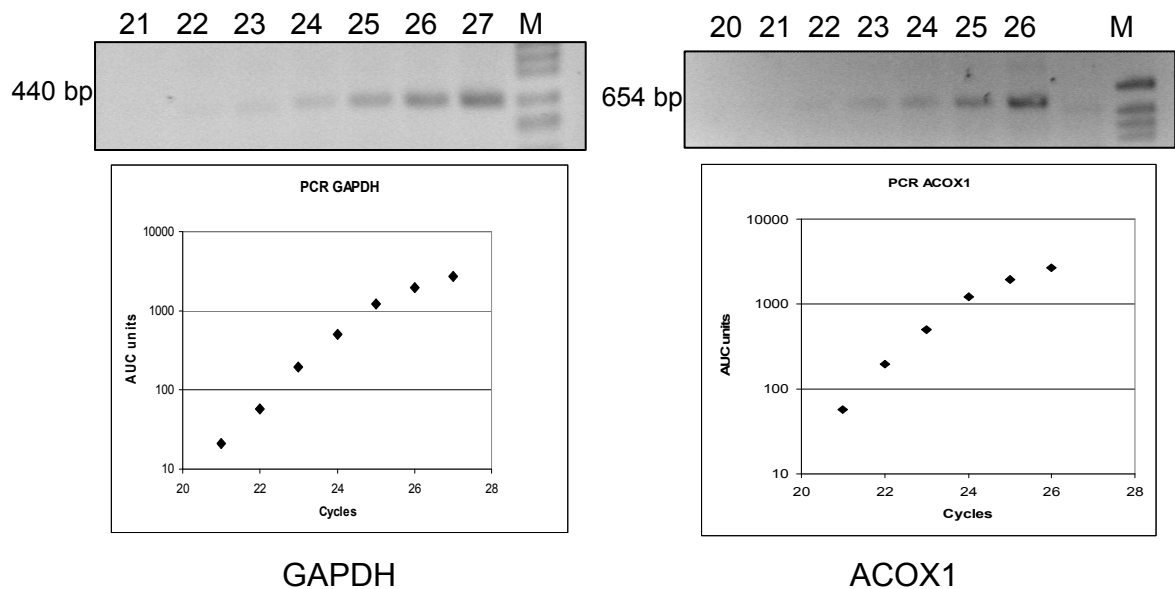


Abbildung 13: PCR-Produkte für GAPDH und ACOX1 nach unterschiedlich vielen Amplifikationszyklen (20–27). Die Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und quantitativ vermessen. M = DNA-Marker Roche VI; AUC units = Flächeninhalt der Fluoreszenzintensität (Willkürliche Einheiten).

Um sicherzustellen, dass in allen verwendeten Proben die gleiche Menge an cDNA für die PCR eingesetzt wurde, wird eine so genannte „Normalisierung der cDNA“ (Ringhoffer et al., 2001) durchgeführt. Dazu amplifiziert man das *housekeeping* Gen GAPDH sowohl in der cDNA von unbehandelten als auch von behandelten Tieren unter vergleichbaren Bedingungen für 25 Zyklen. Die erhaltenen Produkte werden im Agarosegel aufgetrennt, visualisiert und aus den unterschiedlichen Bandenintensitäten nach Gleichung 2 ein Korrekturfaktor (F_{corr}) berechnet.

$$F_{\text{corr}} = V_{\text{st}}/V_i$$

Gleichung 2: Formel zur Berechnung eines Korrekturfaktors für die Normalisierung der effektiven cDNA. F_{corr} = Korrekturfaktor; V_{st} = Integrationswert des Standards (hier: GAPDH-Bande; unbehandelt); V_i = Integrationsfaktor einer beliebigen Probe (hier: GAPDH-Bande; 1 + 4 Tage WY-14,643).

Der errechnete Korrekturfaktor (vgl. Abbildung 14) dient zur Korrektur der eingesetzten cDNA Menge für die sich anschließende Amplifizierungsreaktion. Zur Generierung des GAPDH-Amplifikats werden 25 und zur Amplifizierung von ACOX1 23 Zyklen im Thermocycler inkubiert.

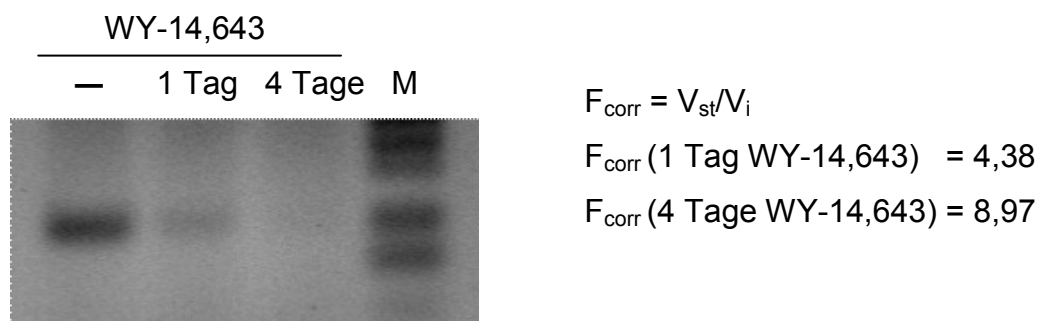


Abbildung 14: PCR-Produkte für GAPDH nach 25 Zyklen aus unbehandelten und WY-14,643 behandelten Mäusen. Die Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und quantitativ vermessen. Nach Gleichung 2 wurde ein Korrekturfaktor für die jeweiligen Proben berechnet. M = DNA-Marker Roche VI.

Die korrespondierenden PCR-Produkte werden zusammen auf eine Gelspur aufgetragen, mittels Agarosegelelektrophorese (vgl. Kapitel 4.2.6.6) aufgetrennt (vgl. Abbildung 15) und die Banden quantitativ vermessen.

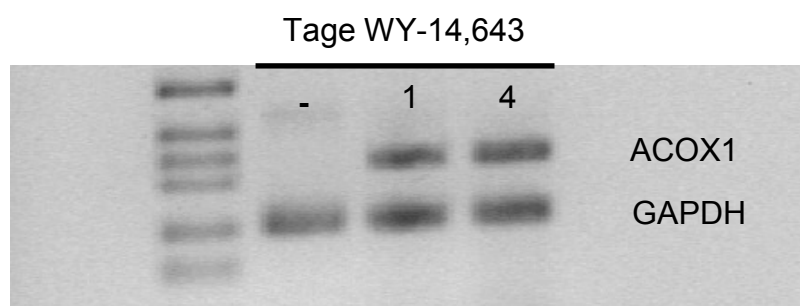


Abbildung 15: PCR Produkte für GAPDH (25 Zyklen) und ACOX1 (23 Zyklen) aus unbehandelten und WY-14,643 behandelten Mäusen. Die Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und quantitativ vermessen.

4.2.2.10 Bestimmung von Mikrokernen

Prinzip

Mikrokerne sind definiert als Abspaltungen vom Zellkern, die entweder ganze Chromosomen oder Chromosomenfragmente enthalten. Substanzen, die zur Abspaltung von ganzen Chromosomen führen, bezeichnet man als „aneugen“, während Substanzen, die chromosomenbrechende Wirkung zeigen, als „klastogen“ bezeichnet werden. Mikrokerne können sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* nachgewiesen werden. Mikrokerntests *in vivo* können sowohl mit Mausknochenmark (Heddle, 1973; von Ledebur und Schmid, 1973), als auch mit Erythrozyten durchgeführt werden (MacGregor et al., 1980). Mikrokerne, die in Erythrozyten nachgewiesen werden können, entstehen bereits in deren Vorläuferzellen, den Erythroblasten. Wenige Stunden nach der letzten mitotischen Zellteilung eines Erythroblasten wird der Zellkern ausgestoßen, ein Mikrokern bleibt jedoch zurück und kann letztendlich nach Anfärbung auch in ausdifferenzierten Erythrozyten gefunden werden. Zur quantitativen Analyse wird die Anzahl an Mikrokernen in Erythrozyten ausgezählt und auf die Anzahl der nicht mikrokernhaltigen Erythrozyten bezogen.

Durchführung

Einige Tropfen Blut, die entweder aus der Schwanzvene von Mäusen oder wie in Kapitel 4.2.2.8 beschrieben gewonnen wurden, werden auf einen Objektträger gegeben und mit einem zweiten Objektträger so ausgezogen, dass der Ausstrich am Ende des Objektträgers zu einer dünnen Fahne ausläuft. Die Präparate werden nun mindestens 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend im Tauchverfahren gefärbt. Dazu werden die Objektträger für 5 min in May-Grünwald-Lösung eingetaucht, anschließend für 3 min in H₂O dest. gespült und schließlich für 20 min in Giemsa-Lösung gefärbt. Danach werden die Präparate 2 x mit H₂O dest. gewaschen (je 5 min) und die Unterseite der Ausstriche mit Ethanol gesäubert. Bei korrekter Färbung sollten unter dem Mikroskop die folgenden Strukturen in den angegebenen Farben zu erkennen sein: Erythrozyten (rosa bis rot), Zellkerne (blau-violett), Lymphozyten (hellblau bis blau), Thrombozyten (rot-violett). Die Proben werden nun von einer am Versuch nicht beteiligten Person verblindet und typischerweise die Mikrokerne in 2000

Erythrozyten pro Objektträger ausgezählt. Pro untersuchtem Tier werden mindestens 3 Objektträger ausgezählt.

4.2.3 Alkalische Elution

4.2.3.1 Prinzip

Die Alkalischen Elution ist eine hochempfindliche *in-vitro*-Methode zur Quantifizierung intrazellulärer DNA-Schäden. Das von Kohn (Kohn et al., 1976) eingeführte Verfahren ermöglicht es, Einzelstrangbrüche, DNA-DNA- und DNA-Protein-Quervernetzungen nachzuweisen. Mit Hilfe einer modifizierten Variante der Alkalischen Elution gelingt es, durch eine ergänzende Inkubation mit Reparaturenzymen neben DNA-Einzelstrangbrüchen auch DNA-Basen-Modifikationen nachzuweisen und zu quantifizieren. Dazu wird isolierte DNA vor der Elution mit spezifischen Reparaturenukleasen inkubiert, welche entsprechende Basenmodifikationen erkennen und die DNA dort einschneiden. Dieser Einschnitt wird als Einzelstrangbruch detektiert, sodass ursprüngliche Basenmodifikationen sichtbar werden.

Mit der alkalischen Elution lassen sich DNA-Schäden bis zu einer Nachweisgrenze von etwa 0.5 Läsionen pro 10^7 Basenpaaren erkennen. Damit ist die alkalische Elutionstechnik etwa 200mal empfindlicher als der Relaxationsassay mit PM2-DNA. Auch die Detektion mittels HPLC/ECD ist, in Abhängigkeit von der eingesetzten DNA-Menge, etwa um den Faktor 10 unempfindlicher (Pflaum et al., 1997).

Das Prinzip der Alkalischen Elution ist in Abbildung 16 dargestellt.

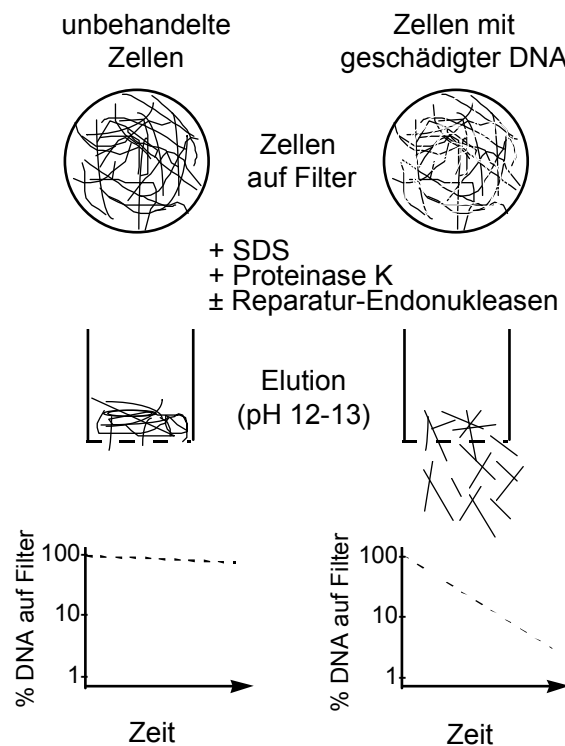


Abbildung 16: Prinzip der Alkalischen Elution (Pflaum, 1996).

Bei der Durchführung der Alkalischen Elution werden die zu untersuchenden Zellen auf einen Polycarbonatfilter aufgetragen und durch Spülen mit einem alkalischen Lysepuffer, der SDS und Proteinase K enthält, lysiert. Dadurch werden Zellbestandteile, zelluläre Proteine sowie RNA vom Filter gewaschen. Die DNA bleibt in doppelsträngiger Form auf dem Filter zurück. Nach dem Waschen der DNA - zum Entfernen des eingesetzten Lysepuffers - kann eine Inkubation mit Reparatarendonukleasen erfolgen. Anschließend überführt man die doppelsträngige DNA mit Elutionspuffer (pH 12.15) in ihre Einzelstränge und startet die Elution. In Abhängigkeit von der Molekülgröße passieren dabei DNA-Fragmente einen Polycarbonat-Filter. Kurze DNA-Bruchstücke eluieren dabei schneller als größere, weniger geschädigte Fragmente. Nach der fraktionierten Elution werden die Eluate neutralisiert, mit Bisbenzimid versetzt und der DNA-Gehalt der einzelnen Fraktionen sowie die Menge der auf dem Filter verbleibenden DNA fluorimetrisch bestimmt. Daraus lässt sich die Elutionsrate der DNA berechnen, welche direkt proportional zur Anzahl der Einzelstrangbrüche und alkalilabilen Läsionen ist. Die Kalibrierung der Methode erfolgt durch Vermessung einer mit γ -Strahlung geschädigten Probe: 6 Gy γ -Strahlung erzeugen einen Einzelstrangbruch pro 10^6 Basenpaare (Kohn et al., 1976).

4.2.3.2 Versuchsaufbau

Für jeden Ansatz wird an eine 25 ml Einwegspritze ein Filterhalter angebracht, der einen luftblasenfrei eingelegten Polycarbonatfilter trägt. Die Zellsuspension und alle verwendeten Lösungen werden von oben in die Einwegspritze pipettiert. Mit Hilfe einer Mehrkanalpumpe wird die Flüssigkeit durch Spritze, Filterhalter und Filter durch einen Dialyseschlauch in ein Abfallgefäß gepumpt. Im letzten Schritt, bei der Elution der DNA, wird das Abfallgefäß gegen einen Fraktionssammler ausgetauscht.

4.2.3.3 Durchführung

Die Filterhalter mit den Polycarbonatfiltern werden mit H₂O dest. blasenfrei gefüllt und zweimal mit je 2,5 ml PBSCMF gespült. Nun werden die Filtersysteme in ein temperiertes Wasserbad eingetaucht und auf 4°C gekühlt, um eine Reparatur der DNA-Schäden während des Auftrags zu verhindern. 1 Mio. Zellen bzw. 0,5 Mio. Hepatozyten werden über den Vorratsbehälter aufgetragen und mit der Pumpe auf die Filter aufgebracht. Zum Entfernen von Medienresten wird mit zweimal 5 ml kaltem PBSCMF gewaschen und gegen Ende des zweiten Spülvorgangs die Temperatur des Wasserbades auf 25 °C erhöht. Zur Zellyse werden 2 ml Lysepuffer aufgebracht und bei einer Temperatur, die nicht unter 15 °C liegt, mit maximaler Geschwindigkeit durch den Filter gespült. Weitere 5 ml Lysepuffer, dem 0,4 mg/ml Proteinase K zugesetzt wurden, werden daraufhin bei 25°C innerhalb von 90 min durch das System gepumpt. Nach der Lyse wird die Temperatur des Wasserbades auf 37 °C erhöht und sieben Mal mit BE₁-Puffer gespült, um die Wände des Vorratsbehälters zu reinigen und ein geeignetes Reaktionsmilieu für die Enzyminkubation herzustellen. Zur Inkubation mit Fpg-Enzym, werden jeweils 2 ml der frisch hergestellten Enzymverdünnung in BE₁/BSA-Puffer (1 µg/ml Endkonzentration) aufgetragen. Die Filterhalter, in denen die Einzelstrangbrüche ohne Enzymzugabe quantifiziert werden sollen, werden mit 2 ml BE₁-Puffer befüllt. Der erste Milliliter der Lösung wird bei maximaler Geschwindigkeit durchgepumpt, der zweite innerhalb einer Stunde. Um danach die Reste der Enzyme zu entfernen, werden alle Filterhalter zweimal mit 5 ml BE₁-Puffer gespült, danach mit

4 ml Waschpuffer. Dabei wird die Temperatur des Wasserbades auf 25 °C eingestellt. Anschließend füllt man die Einwegspritzen mit 25 ml Elutionspuffer und eluiert mit einer Pumpgeschwindigkeit von 1,9 ml/h über 12 h. Durch den Fraktionswechsel, der alle 2 Stunden durchgeführt wird, erhält man 6 Fraktionen mit ca. 3,8 ml Eluat pro Reagenzglas. Der Überstand an Elutionspuffer, der sich nach der Elution noch in den Einwegspritzen befindet, wird in die sechste Fraktion gepumpt. Zur Auswertung werden zunächst die Filterhalter auseinander gebaut. Anschließend vereinigt man Filter und Fritte mit der sechsten Fraktion der jeweiligen Spur in einem Coulter Counter™-Zähldöschen und inkubiert unter Schütteln für 2 Stunden bei 60 °C im Wasserbad. Dadurch bringt man die auf den Filtern verbleibende DNA in Lösung. Nach der Inkubation wird eine den Volumina der anderen Fraktionen entsprechende Flüssigkeitsmenge (3,6 ml) entnommen und wie diese aufgearbeitet.

4.2.3.4 Auswertung der Alkalischen Elution

Jedes Reagenzglas mit DNA-Lösung wird mit einer dem Fraktionsvolumen entsprechenden Menge (3,8 ml) an Phosphatpuffer pH 6,0 versetzt (15 min). Anschließend wird das gleiche Volumen an Phosphatpuffer pH 7,2/Bisbenzimid (1,5 µM) zugesetzt und erneut 15 Minuten unter Ausschluss von Licht inkubiert. Daraufhin wird die Emissionsintensität des Bisbenzimid-DNA-Komplexes der einzelnen Proben bei 450 nm nach Anregung bei 360 nm im Fluorimeter bestimmt. Als Blindwert wird eine Mischung aus gleichen Volumina (je 3,8 ml) Elutionspuffer, Phosphatpuffer pH 6,0 und Phosphatpuffer pH 7,2/Bisbenzimid eingesetzt. Der Berechnung der Einzelstrangbrüche in den jeweiligen Spuren liegt zugrunde, dass sich die Summe der Fluoreszenzeinheiten aller Fraktionen einer Spur proportional zur Gesamtmenge an DNA dieses Ansatzes verhält. Wird die DNA-Menge der einzelnen Fraktionen halblogarithmisch gegen den Zeitverlauf aufgetragen, ergibt sich daraus eine Gerade, deren Steigung proportional zur Anzahl der Einzelstrangbrüche ist. Dabei wird eine vollkommen zufällige Verteilung der Modifikationen in der DNA vorausgesetzt.

Die absolute Zahl an Einzelstrangbrüchen (SSB) und Endonuklease-sensitiven Modifikationen (ESS) errechnet sich aus Gleichung 3 (Epe et al., 1993):

$$\text{SSB} + \text{ESS} = m \times -2,24 \times 10^{-6}$$

Gleichung 3: Formel zur Berechnung von Einzelstrangbrüchen (SSB) und Endonuklease-sensitiven Modifikationen (ESS) in der Alkalischen Elution. m = Geradensteigung.

Dabei beschreibt m die Steigung der Geraden und -2,24 den für unsere Bedingungen experimentell ermittelten Faktor (Pflaum, 1996).

4.2.3.5 Alkalische Schnellelution zur Detektion höherer DNA-Schäden

Da sich mit der oben beschriebenen Elutionstechnik nur Schäden bis zu maximal etwa 0,6 Strangbrüchen pro 10^6 bp nachweisen lassen, kann die oben beschriebene Technik zur Messung höherer Schäden einfach abgewandelt werden, indem man die eigentliche Elution bei einer Pumpgeschwindigkeit von 30,7 ml/h durchführt. Dadurch wird die Empfindlichkeit der Methode herabgesetzt und die Gesamtelutionszeit verringert sich von 10 h auf 54 min. Das Fraktionsvolumen und die Anzahl der Fraktionen bleiben gleich, so dass die Fraktionen alle 9 min gewechselt werden.

Zur Auswertung dient wiederum die Kalibrierung durch Schädigung mit γ -Strahlung. Nach den von D. Ballmaier (Ballmaier, 1997) durchgeführten γ -Bestrahlungsexperimenten ergibt sich für die Umrechnung der Geradensteigungen aus der Alkalischen Schnellelution in die Anzahl von Einzelstrangbrüchen pro 10^6 Basenpaare der Faktor $F = -8,6$.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Alkalische Schnellelution eingesetzt zur Bestimmung der Fpg-sensitiven Modifikationen in *Parp1*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen, die älter als 8 Monate waren.

4.2.3.6 Bestimmung von Reparaturkinetiken in Säugerzellen

Zur Bestimmung von Reparaturkinetiken in Säugerzellen werden diese eine bestimmte Zeit vor der Aufarbeitung geschädigt (z.B. drei Stunden für einen 3 h-Reparaturwert).

Zur Bestimmung der Reparatur von oxidativen DNA-Schäden wird durch den Photosensibilisator Ro 19-8022 vor allem 8-oxoG induziert (Will et al., 1999). Dazu werden adhärenzte Zellen in einer 75 cm² Flasche zunächst zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen und anschließend mit 10 ml einer 50 nM Ro 19-8022-Lösung in PBSCMF versetzt. Die Zellen werden für 10 min mit sichtbarem Licht (Halogenlampe 1000 W) bestrahlt. Der Abstand zwischen Lampe und Zellen beträgt dabei 38 cm. Unter diesen Bedingungen entspricht die Bestrahlung einer Energiedosis von 166 kJ/m² im Bereich von 400-800 nm. Um noch vorhandene Ro 19-8022-Substanz zu entfernen, werden die Zellen noch zweimal mit PBSCMF gewaschen. Danach werden sie in Vollmedium im Brutschrank aufbewahrt (37 °C, 5% CO₂). Zusätzlich zu diesen Ansätzen und der Kontrolle mit den ungeschädigten Zellen wird eine weitere Flasche mit Zellen vorbereitet. Diese wird direkt vor der Aufarbeitung (zum Zeitpunkt t=0), nach obiger Anleitung geschädigt. Nach Durchführung der alkalischen Elution wird die Anzahl der induzierten DNA-Modifikationen im geschädigten Ansatz ohne Reparatur (t=0) mit 100% Schaden gleichgesetzt. Die Restschäden mit den Ansätzen, bei denen Reparatur stattgefunden hat, werden prozentual dazu berechnet.

4.2.4 Bestimmung der Enzymaktivität von Reparaturenzymen und Zellextrakten mittels *Cleavage-Assay*

Mit Hilfe des *Cleavage-Assay* kann die *in-vitro*-Reparaturenzymaktivität von Zellextrakten und reinen Enzymen bestimmt werden. Dazu werden Oligonukleotide verwendet, die an einer definierten Position eine Modifikation tragen, die ein Substrat für ein bestimmtes Reparaturenzym ist. Inkubiert man das Substrat mit einem Zellextrakt bzw. Enzym das diese Läsion erkennt und prozessiert, erhält man ein kürzeres Oligonukleotid. Im vertikalen, 20%igen

Acrylamid-Gel lassen sich die beiden Oligonukleotidformen (geschnitten und ungeschnitten) durch unterschiedliches Wanderungsverhalten im elektrischen Feld voneinander trennen. Zur Detektion und Quantifizierung wird das Oligonukleotid 5' mit radioaktivem ^{32}P Phosphor markiert.

4.2.4.1 Herstellung von Zellextrakten

Zur Herstellung von Zellextrakten werden ca. 10 Millionen Zellen verwendet. Die Zellen werden unter Zusatz von 2 ml PBSCMF mit einem Zellschaber von den Flaschen abgelöst und zentrifugiert (5 min bei 1000 x g und 4 °C). Anschließend werden die Zellen noch zweimal mit kaltem PBSCMF gewaschen (5 min bei 1000 x g und 4 °C) und direkt weiterverarbeitet oder bei -70 °C eingefroren.

Die Zellpellets werden mit 200 µl Lysepuffer versetzt und die Zellwände durch eine Ultraschallbehandlung (35 W, 3 x 20 Impulse, 10kHz) aufgebrochen. Die Zellsuspension wird dann für 45 min bei 85000 x g und 4 °C zentrifugiert, um Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wird abgenommen und darin der Proteingehalt nach Bradford bestimmt.

4.2.4.2 Herstellung der Enzymsubstrate

Zur Herstellung der Enzymsubstrate für OGG1-, Fpg- und MutY-Protein werden 10 µl des zu markierenden Oligonukleotids (2 pmol/µl) mit 1 µl T4-Polynukleotidkinase (PNK; 9 u/µl), 2 µl PNK-Puffer (10x), 2 µl H₂O dest. und 5 µl ^{32}P -ATP versetzt und nach Mischen 1 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Direkt im Anschluss wird das markierte Oligonukleotid aufgereinigt, um überschüssiges ^{32}P -ATP zu entfernen. Dazu fügt man 180 µl TE-Puffer, 55 µl NaCl (5 M), 20 µl SDS (10%) und 300 µl Chloroform/Ethanol (1:1) hinzu und durchmischt die Lösung eine Minute mit einem Vortex-Gerät. Anschließend stellt man die Probe für 2 min auf Eis. Danach zentrifugiert man das Reaktionsgefäß für 2 min bei 12000 U/min und 4 °C. Der wässrige Überstand wird abgenommen, mit 5 µl Acrylamid (0,25%) und 1 ml Ethanol versetzt, kurz gevortext und für 30 min

bei 12000 x *g* und 4 °C zentrifugiert, um die gefällte DNA abzutrennen. Nun wird der Überstand entfernt und das Oligonukleotid bei geöffnetem Deckel 1 Stunde getrocknet. Das getrocknete Pellet wird anschließend in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und gelöst. Zur anschließenden Hybridisierung mit einem komplementären Oligonukleotid werden 20 µl des markierten Oligonukleotids mit 20 µl komplementären Oligonukleotid versetzt und für 5 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Nach dem langsamen Erkalten des Heizblocks auf unter 30 °C kann die Lösung bei -20 °C gelagert werden.

4.2.4.3 Nachweis der 8-oxoG-Glykosylase-Aktivität

Zur Messung der 8-oxoG-Glykosylase-Aktivität wird ein ³²P-markiertes Oligonukleotid mit folgender Sequenz verwendet: 5'-GGC TTC ATC GTT GTC (8oxoG)CA GAC CTG GTG GAT ACC G-3'. Dieser Strang wird mit einem komplementären Strang hybridisiert, der an Position 19 ein Cytosin enthält, so dass ein 8-oxoG:C Basenpaar entsteht. Zur Messung der 8-oxoG-Glykosylase-Aktivität von Zellextrakten werden bis zu 4 µl der Extrakte (Proteingehalt: 1-6 µg) mit 0,2 µl radioaktiv markiertem Oligonukleotid (25 fmol) versetzt und mit Lysepuffer auf 16 µl aufgefüllt. Als Negativkontrolle wird der oben genannte Ansatz ohne Enzym verwendet. Als Positivkontrolle dienen 1 µg Proteinextrakt einer OGG1 überexprimierenden HeLa-Zelllinie. Die Ansätze werden für 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird 1,6 µl NaOH (1 M) zugesetzt und weitere 15 min bei 37 °C inkubiert. Dann werden 4 µl Stopp-Puffer zugesetzt, kurz gevortext und die Proben für 5 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert, um die DNA zu denaturieren. Die Proben können nun auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen werden (vgl. 4.2.4.5).

4.2.4.4 Nachweis der Enzymaktivität von MutY-Protein

Da MutY-Protein fehlgepaartes Adenin gegenüber 8-oxoG erkennt, dieses aus dem Strang entfernt und dadurch an dieser Position eine AP-Stelle erzeugt, wird

zum Nachweis der MutY-Enzymaktivität, der dem 8-oxoG komplementäre Strang radioaktiv markiert.

Zur Messung der Enzymaktivität werden 11,8 µl MutY-Reaktionspuffer vorgelgt, mit 0,2 µl radioaktiv markiertem Substrat versetzt und anschließend 4 µl MutY-Protein in abnehmender Konzentration (30–0,09 µg/ml in Reaktionspuffer) dazu pipettiert und der Reaktionsansatz bei 37 °C für drei Stunden im Wasserbad inkubiert. Nach der Enzyminkubation werden die Proben wie in Punkt 4.2.4.3 beschrieben weiter prozessiert und anschließend auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen (vgl. 4.2.4.5).

4.2.4.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Analyse der Produkte zum Nachweis der Enzymaktivität aus 4.2.4.3 und 4.2.4.4 erfolgt in 20%igen Polyacrylamid-Gelen, die Harnstoff (7 M) enthalten. Zum Erstellen des Gels pipettiert man zu 6 ml des Polyacrylamid-Mixes 60 µl APS (10%) und 6 µl TEMED in ein Greiner-Röhrchen. Nach kurzem Schwenken wird die Lösung in die vorbereitete Gelkammer gegossen und der Kamm eingebracht. Nach dem Aushärten des Gels (ca. 20 min), werden die Proben auf das Gel geladen. Die Elektrophorese wird für 40 min bei 400 V mit TBE als Laufpuffer durchgeführt. Die fertigen Gele werden der Kammer entnommen, in Plastikfolie eingeschweißt, über Nacht ein Radio-Detektionsfilm aufgelegt und dieser anschließend mit einem Storm[®] Phosphorimager analysiert (Abbildung 17). Aus dem Verhältnis der Intensitäten zwischen eingeschnittenen und nicht eingeschnittenen Oligonukleotiden lässt sich die Aktivität der Enzyme berechnen.

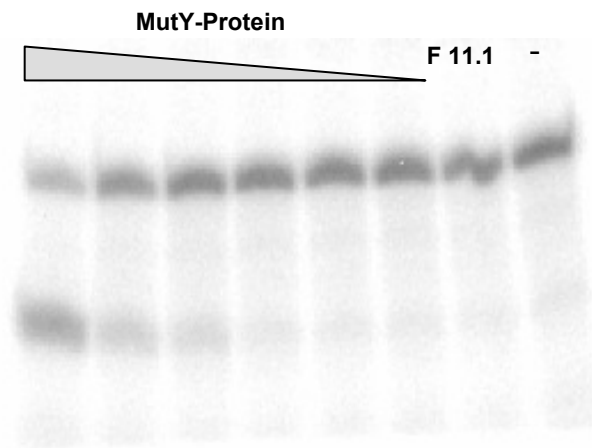


Abbildung 17: Denaturierendes Polyacrylamid-Gel von ^{32}P -markierten 34-mer Oligonukleotiden nach Inkubation mit abnehmender Konzentration an MutY-Protein (30–0,09 $\mu\text{g/ml}$) und einem Zellextrakt aus F11.1 Mausembryofibroblasten (6 μg), visualisiert durch Aufnahme mit Storm[®] Phosphorimager.

4.2.5 Mutations-Assay mit transgenen Big Blue[®]-Mäusen

4.2.5.1 Prinzip

Der Big Blue[®] Mutations-Assay der Firma Stratagene ist eine *in vivo* Testmethode, die zur organspezifischen Testung von spontanen und induzierten Mutationen in so genannten Big Blue[®] Mäusen (Kohler et al., 1990) und Big Blue[®] Ratten benutzt werden kann.

Die Basis für diese Testmethode bildet ein 45.5 kb langer λLIZ shuttle vector, der als Transgen in das Genom von Mäusen und Ratten integriert wurde. Homozygote Mäuse tragen ungefähr 40 Kopien dieses Vektors an einer einzigen Integrationsstelle auf Chromosom Nummer 4 (Dycaico et al., 1994). Dieser λLIZ trägt wie in Abbildung 18 dargestellt, die genetische Information für das bakterielle *lacI^q* Gen (im Folgenden als *lacI* bezeichnet) und den α -Teil des bakteriellen *lacZ* Gens (αlacZ).

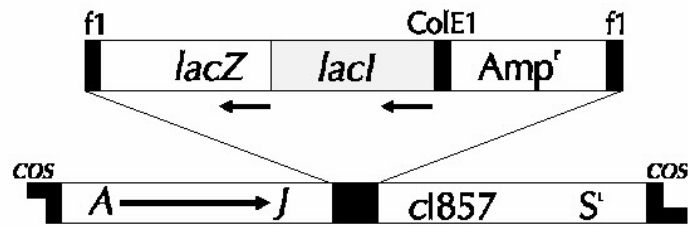


Abbildung 18: BigBlue® λLIZ shuttle vector.

Das *lacI* Gen, welches für das bakterielle Lac Repressor-Protein codiert, stellt hierbei das Targetgen für die Mutagenese dar. Als Reportergen fungiert das bakterielle α *lacZ* Gen, welches für den α -Teil der β -Galaktosidase codiert. Liegt das Lac-Repressor-Protein funktionsfähig vor, verhindert es in Bakterien die Transkription des α *lacZ* Gens. Mutationen im *lacI* Gen jedoch, die zu einer Inaktivierung des Lac-Repressor-Proteins führen, erlauben die Transkription des α *lacZ* Gens und es kommt zur Bildung des Reporterproteins, dem α -Teil der β -Galaktosidase. Fusionieren die α - und die β -Form der β -Galaktosidase in bestimmten Bakterienstämmen, so können Mutationen auf einem X-Gal haltigen Agar sichtbar gemacht werden. Eine funktionelle β -Galaktosidase wandelt das Substrat zu einem blauen Indigofarbstoff um.

Die praktische Versuchsdurchführung, wie in Abbildung 19 dargestellt, gliedert sich in diverse Einzelschritte, die im Folgenden näher beschrieben werden sollen.

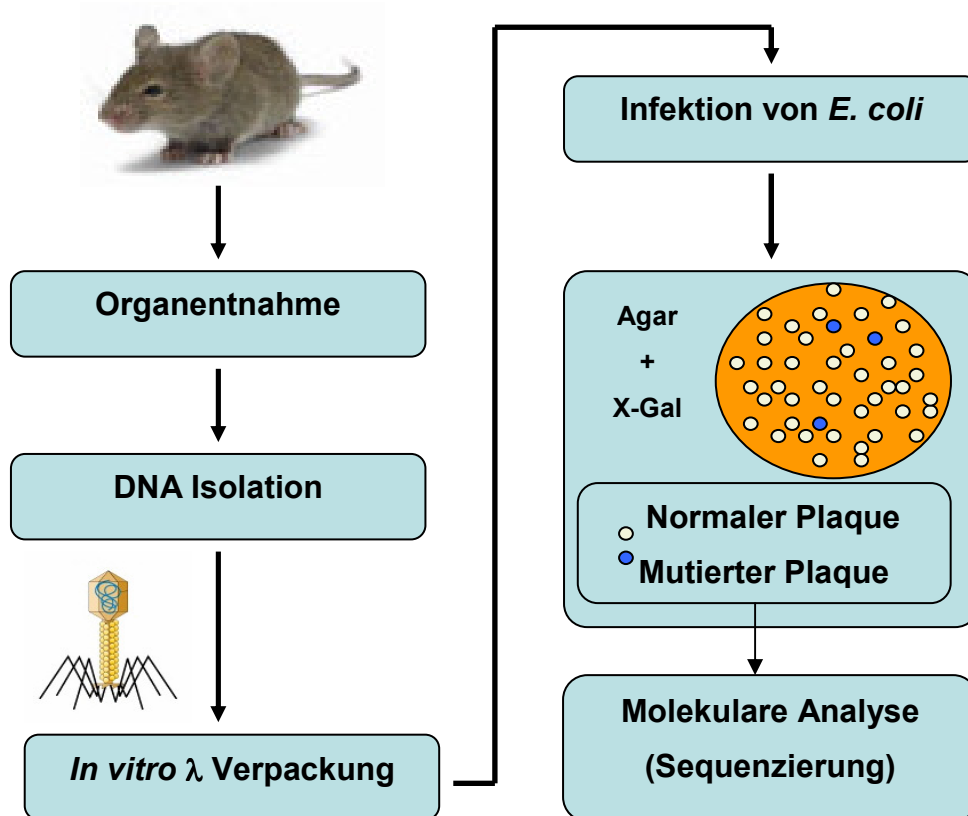


Abbildung 19: Schematischer Ablauf des Big Blue® Mutations-Assay.

4.2.5.2 Isolation genomischer DNA

Zur DNA-Isolation aus verschiedenen Mäuseorganen wird ein RecoverEase™-DNA-Isolations Kit der Firma Stratagene verwendet.

Dazu wird zuerst 5 ml eisgekühlter Lysepuffer I in einen sterilen *Wheaton Dounce* Gewebekomogenisator gegeben und eine definierte Menge des zu untersuchenden Gewebes zugesetzt (Leber: 50–80 mg; Lunge: ca. 175 mg). Durch zehnmaliges Auf- und Abbewegen mit Pistill B, wird das Gewebe homogenisiert. Zur Freisetzung der Zellkerne aus dem Homogenisat wird der Arbeitsschritt noch achtmal mit Pistill A wiederholt. Die so erhaltene Suspension wird nun durch ein steriles Zellsieb in ein 50 ml Greiner-Röhrchen filtriert, um nicht zerkleinerte Gewebekomponenten abzutrennen. Gewebekomogenisator und Zellsieb werden anschließend mit 3 ml Lysepuffer gespült. Um die Zellkerne zu erhalten, werden diese für 12 min bei 1100 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die überschüssige Flüssigkeit mit einem sterilen

Tupfer entfernt. Um die Zellkerne zu lysieren, werden pro Ansatz 70 µl einer Lyselösung II zugesetzt und durch leichtes Schwenken das Pellet von der Bodenwandung abgelöst. Anschließend wird die Probe in ein auf 50 °C temperiertes Wasserbad gegeben und 70 µl Proteinase K-Lösung zugesetzt. Das geschlossene Röhrchen wird unter leichtem Schwenken für 45 Minuten bei 50 °C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wird die hoch viskose DNA mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze auf eine Dialysemembran überführt, die auf einem Liter sterilen TE-Puffer schwimmt. Nach 24-stündigem leichte Rühren wird der TE-Puffer erneuert und die Probe für weitere 16 Stunden inkubiert. Die vollständig hydratisierte DNA wird nun in ein Eppendorfgefäß überführt und kann für bis zu vier Wochen bei 4 °C gelagert werden.

4.2.5.3 Verpackung der DNA in λ Phagen

Die Gewinnung des λ LIZ shuttle vectors aus der genomischen DNA und die anschließende Verpackung in Phagen wird mit dem Transpack® Packaging Extract der Firma Stratagene durchgeführt.

Bevor die Gewinnung und Verpackung des λ LIZ shuttle vectors durchgeführt werden kann, muss eine *E. coli* SCS-8 Flüssigkultur angesetzt werden, die im weiteren Versuchsverlauf benötigt wird. Dazu überführt man wenige Kolonien einer SCS-8 Übernachtskultur (auf LB-Tetracyclin-Agarplatte) mit einer sterilen Impföse in ein steriles 50 ml Inkubationsgefäß, das 20 ml NZY broth Flüssigmedium und 250 µl Maltose/MgSO₄-Lösung enthält. Diese SCS-8 Flüssigkultur wird nun für 4 bis 6 h unter Schütteln (250 – 300 U/min) bei 37 °C inkubiert. Danach werden die Bakterien bei 1000 x g für 10 min pelletiert und in 10 ml MgSO₄ (10 mM) resuspendiert. Nach Vermessen der optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀), werden die Bakterien auf eine OD₆₀₀ von 0,5 mit sterilem MgSO₄ (10 mM) verdünnt. Diese so genannte Ausplattierungskultur wird auf Eis gelagert und sollte innerhalb von 2 h für den Versuch eingesetzt werden.

Für die eigentliche Verpackungsreaktion wird ein Röhrchen „Verpackungsmix I“ des Herstellers vorsichtig aufgetaut und mit 12 µl der zu verpackenden DNA aus Kapitel 4.2.5.2 versetzt. Mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze werden die

Lösungen durch dreimaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und anschließend für 90 min bei 30 °C im Wasserbad inkubiert. Dann wird zu jeder Probe 12 µl „Verpackungsmix II“ gegeben, durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und die Probe für weitere 90 min bei 30 °C inkubiert. Danach werden die Proben mit 966 µl sterilem SM-Puffer versetzt, für 10 s bei höchster Stufe mittels eines Vortex-Gerätes gemischt und anschließend auf Eis gelagert. Die genomische DNA aus den Mäusen wurde in λ Phagen verpackt („gepackte Phagen“) und kann nun zur Transfektion von Bakterien eingesetzt werden.

4.2.5.4 Überprüfung der Verpackungsreaktion

Bevor die in Phagen verpackte DNA mit *E. coli* Bakterien für den endgültigen Versuch ausplattiert werden kann, muss die Effizienz der Verpackungsreaktion überprüft werden. Dazu werden 200 µl der Ausplattierungskultur aus Punkt 4.2.5.3 in ein steriles Greinerröhrchen gegeben und mit 1 µl der *gepackten Phagen* versetzt. Damit die Phagen an die Bakterien adsorbieren können, wird die Mischung für 15 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden 3–4 ml geschmolzene BigBlue®-Topagarose zugegeben und die Mischung auf einer BigBlue®-Bottom-Agar-Platte ausplattiert. Die Platten werden anschließend über Nacht bei 37 °C inkubiert und am nächsten Morgen die Anzahl der Plaque bildenden Einheiten (*pfu* = *plaque forming units*) bestimmt. Daraus lässt sich die Anzahl der *pfu* errechnen, die pro Verpackungsreaktion erhalten wurden. Idealerweise werden pro Reaktion bis zu 100000 *pfu* erhalten.

4.2.5.5 Ausplattierung der verpackten DNA Proben

Typischerweise werden für einen Ausplattievorgang 14 Screeningplatten (500 cm²) mit je 250 ml BigBlue®-Bottom-Agar benötigt. Die Platten werden vor der Verwendung auf 25 °C temperiert und werden wie folgt verwendet: 2 Verdünnungsplatten (V1 + V2), 4 Platten mit Farbkontrollen (CM 0, CM 1, CM 2 und CM 3) und 8 Platten zur Ausplattierung (A1–A8). Zur Zeit- und

Kosteneinsparung können ohne Sensitivitätsverluste bis zu 30000 *pfu* pro Screeningplatte (Heinmoller et al., 2000) ausplattiert werden. Dazu wird aus parallelen Verpackungsreaktionen (vgl. Punkt 4.2.5.3) das Volumen entnommen, das theoretisch 320000 *pfu* beinhaltet, mit 2 ml SCS-8 Flüssigkultur aus Punkt 4.2.5.3 versetzt und für 15 min im Wasserbad bei 37°C inkubiert, damit sich die Phagen an die Bakterien anheften können. Als interne Kontrolle werden bei jedem Experiment nach Vorschrift des Herstellers Phagen, die *lacI* Abschnitte mit definierten Mutationen beinhalten (Farbkontrollen CM 0, CM 1, CM 2 und CM 3), ausplattiert. Dazu werden 50 µl der entsprechenden Farbkontrolle mit 2 ml SCS-8 Flüssigkultur versetzt und 15 min bei 37 °C inkubiert (Röhrchen CM 0–3). In der Zwischenzeit werden für die Ansätze V1 + V2 und A1 – A8 jeweils 2 ml SCS-8 Flüssigkultur in ein steriles 50 ml Röhrchen gegeben. Ist die Inkubationszeit beendet, werden die Röhrchen aus dem Wasserbad entnommen und der Phagen/Bakterienmix auf die Röhrchen A1–A8 aufgeteilt. Zur Ausplattierung wird jedes Röhrchen mit 35 ml X-Gal haltigem (1,5 mg/ml) BigBlue®-Topagar versetzt und jede Probe zügig auf eine Screeningplatte gegeben. Damit der Topagar aushärten kann, werden die Deckel im 45° Winkel aufgelegt und die Platten für 2 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend können die Screeningplatten verschlossen und für 16 – 20 Stunden bei 37 °C inkubiert werden.

4.2.5.6 Mutantenscreening

Für das Screening der Mutanten werden zuerst die Farbkontrollen CM 0–CM 4 auf einer Lichtbank ausgewertet. Die Mutanten sind als blaue *pfu* in verschiedenen Farbintensitäten zu erkennen. Werden bei der Auszählung pro Farbkontrollplatte 15–25 *pfu* gefunden, hat der Versuch funktioniert und es können die restlichen Platten ausgewertet werden. Auf den Platten V1 + V2 werden alle *pfu* ausgezählt. Daraus lässt sich die Anzahl der total ausplattierten *pfu* berechnen. Auf den Platten A1–A8 werden sorgfältig alle blauen, d.h. „mutierten“ *pfu* identifiziert, mit einer Pipettenspitze aus dem Agar herausgelöst und in 500 µl SM-Puffer überführt. Um Bakterienwachstum in diesen Ansätzen zu verhindern, wird in jedes

Reaktionsgefäß 50 µl Chloroform gegeben und kurz mit einem Vortex-Gerät gemischt. Die Proben werden über Nacht bei 4 °C gelagert, damit die Phagen aus dem Agar herausdiffundieren können.

Zur Berechnung der Mutationsfrequenz wird der Quotient aus der Anzahl der „mutierten“ *pfu* und der Anzahl der total ausplattierten *pfu* gebildet.

4.2.5.7 Amplifizierung und Sequenzierung des *lacI*-Gens der Mutanten

Bevor die mutierten DNA-Abschnitte amplifiziert und sequenziert werden können, müssen die sie enthaltenden Phagen erneut verdünnt ausplattiert werden, um Kontaminationen durch nicht mutierte *pfu* zu verhindern. Dies erfolgt mit leichten Modifikationen, wie in Kapitel 4.2.5.5 beschrieben.

Zur Amplifikation der mutierten DNA-Sequenz mittels PCR werden die Phagen zuerst lysiert. Dazu werden 11 µl H₂O mit 11 µl PCR Puffer (10x), 10 µl Phagen-Lösung und 1,5 µl Proteinase K-Lösung versetzt. Dieser Mix wird für 60 min bei 52 °C im Thermocycler und anschließend für 10 min bei 96 °C inkubiert, um die Proteinase K zu inaktivieren. 8 µl dieser lysierten Phagenlösung werden mit 8,5 µl H₂O, 1,7 µl PCR-Puffer (10x), 2 µl dNTP-Mix (2,5 mM), 2 µl Primer *LacI* #1A, 2 µl Primer *LacI* rev und 0,5 µl Pfu Turbo Polymerase versetzt. Mit diesem Reaktionsansatz und dem entsprechenden Temperaturprogramm (5 min bei 95 °C; 30 Zyklen: 30 s bei 95 °C, 45 s bei 53 °C und 60 s bei 72 °C; 10 min bei 72 °C) wird ein DNA-Fragment des kompletten bakteriellen *lacI* Gens amplifiziert. Die erfolgreiche Amplifikation wird durch das Auftragen eines Teils des Reaktionsansatzes auf ein Agarosegel überprüft.

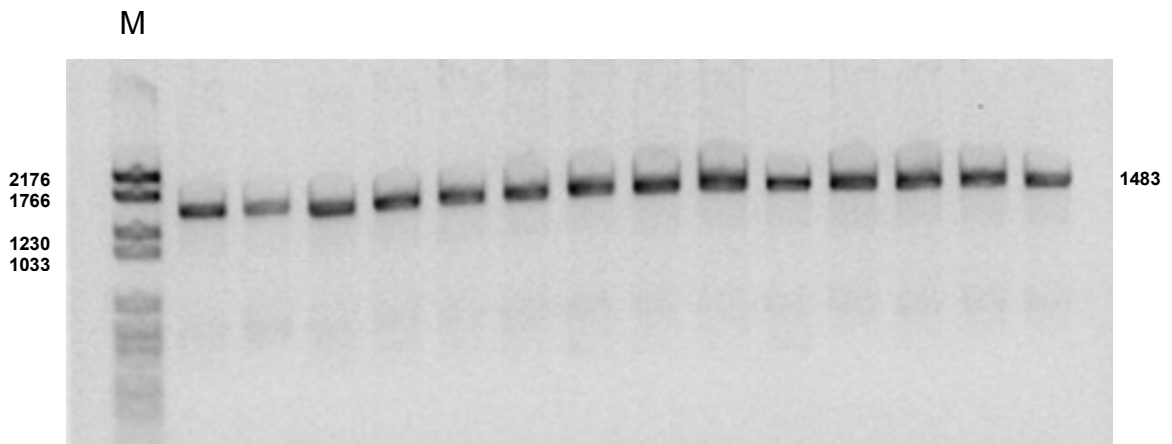


Abbildung 20: PCR-Produkte verschiedener Mutanten. Es wurde das komplette bakterielle *lacI*-Gen mittels PCR amplifiziert (1483 bp) und in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Nach Anfärbung mit Ethidiumbromid wurden die Banden quantifiziert. M = DNA-Marker Roche VI.

Die nicht aufgetragenen PCR-Produkte werden anschließend mit einem GFX™ PCR DNA and Gel Purification Kit (Amersham Pharmacia) nach Anleitung des Herstellers aufgereinigt, um überflüssige Primer und Nukleotide zu entfernen. Nach erneuter Auftrennung im Agarosegel und Konzentrationsbestimmung werden die Proben zur Sequenzierung abgegeben.

Zur Identifizierung von Mutationen wurden die erhaltenen Sequenzen mit dem Programm *Chromas Pro* mit der Wildtyp-Sequenz verglichen.

4.2.6 Mitochondrialer DNA-Relaxationsassay

4.2.6.1 Prinzip des DNA-Relaxationsassay

Das Prinzip des DNA-Relaxationsassays (vgl. Abbildung 21) beruht darauf, dass PM2-DNA natürlicherweise in einer superspiralisierten Form vorliegt und durch einen einzigen Einzelstrangbruch in eine weniger kompakte relaxierte Form überführt werden kann. Die beiden Formen können aufgrund ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese getrennt und der Anteil der beiden Formen fluorimetrisch bestimmt werden. Durch den Einsatz bifunktioneller Reparatarendonukleasen, die spezifisch DNA-Schäden erkennen, mit ihrer Glykosylase-Funktion die modifizierte Base

entfernen und mit ihrer AP-Endonuklease-Funktion einen Einzelstrangbruch in die DNA einführen, lassen sich verschiedene DNA-Schäden empfindlich detektieren (Epe et al., 1988). Da auch mitochondriale DNA natürlicherweise in einer superspiralisierten Form vorliegt, kann auch diese für den Assay eingesetzt werden (Hegler et al., 1993). Dies ermöglicht den Nachweis von Hintergrundspiegeln oxidativer DNA-Schäden in mitochondrialer DNA verschiedener Mausgenotypen.

DNA-Relaxations-Assay

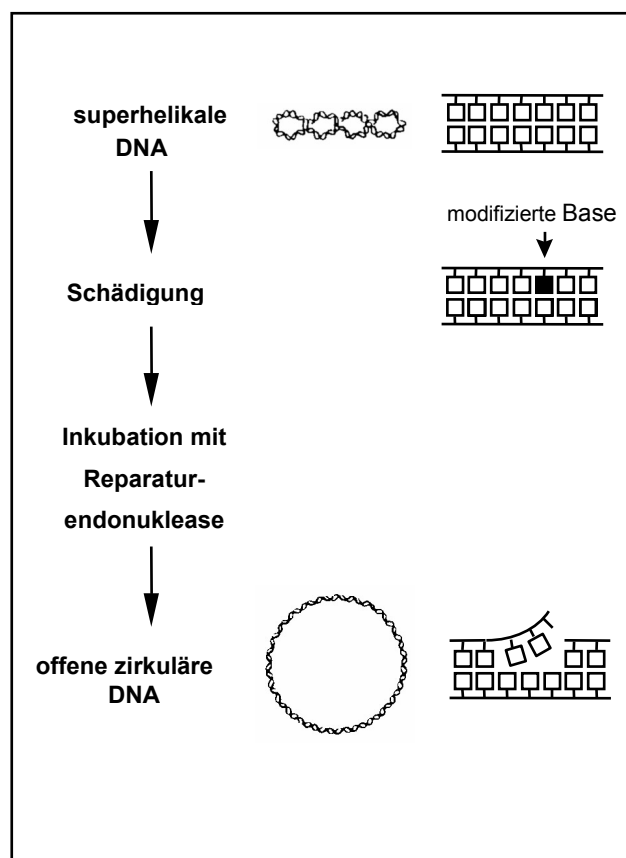


Abbildung 21: Prinzip des DNA-Relaxationsassays (nach Pflaum, 1996).

4.2.6.2 Gewinnung von Mitochondrien

Zur Gewinnung von mitochondrialer DNA (mtDNA) werden zuerst Mitochondrien aus Mäuselebern isoliert (Johnson und Lardy, 1967). Um später eine ausreichende Menge an DNA gewinnen zu können, werden die Lebern von zwei

WY-14,643 behandelten Tieren (vgl. 4.2.1.5) oder mindestens 3 unbehandelten Tieren (ca. 4–5,5 g Leber), die sich in Alter, Geschlecht und Genotyp nicht unterscheiden, gepoolt. Das Gewicht der Lebern wird bestimmt und die Organe zusammen mit BSA-haltigem Homogenisationspuffer in einen Glaspotter gegeben. Dabei werden pro Gramm Leber 3 ml eisgekühlter Puffer eingesetzt. Mit einem elektrisch betriebenen Teflonkolben (600 U/min) werden die Lebern durch sechsmaliges Auf- und Abbewegen homogenisiert. Zum Abtrennen von Zelltrümmern und nicht homogenisierten Organbestandteilen wird die Probe für 10 min, bei 2000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, das Sediment erneut mit Homogenisationspuffer versetzt und anschließend noch einmal zentrifugiert. Zur Gewinnung der Mitochondrien werden nun die beiden Überstände vereinigt und die Mitochondrien 10 min bei 15000 x g und 4 °C abzentrifugiert. Das hellgefärbte Mitochondrienpellet wird nun vorsichtig mit einer sterilen Impföse von der Wandung abgelöst, in 3 ml Homogenisationspuffer resuspendiert und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Dieser Waschschrift wird jetzt noch einmal wiederholt und die Mitochondrien zur Bestimmung des Proteingehalts in 3 ml Homogenisationspuffer ohne BSA aufgenommen. Der Proteingehalt der Mitochondriensuspension wird mit Biorad-Farbreagenz bestimmt und die Proteinkonzentration mit Hilfe einer Kalibriergeraden berechnet. Die Suspension wird nun so verdünnt, dass sich 16 mg Protein in 1,5 ml Homogenisationspuffer befinden. Zum Verdau der nukleären DNA werden die Proben nun mit je 7,5 µl DNase (2 mg/ml) versetzt und 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Zum entfernen der DNase werden die Proben sofort 5 min bei 4900 x g kalt abzentrifugiert und anschließend noch ein Mal mit Homogenisationspuffer gewaschen. Die Mitochondrien können nun zur Gewinnung von mitochondrialer DNA lysiert werden (vgl. Kapitel 4.2.6.3).

4.2.6.3 Isolation von mitochondrialer DNA

Zur Gewinnung von mitochondrialer DNA werden die isolierten Mitochondrien aus Kapitel 4.2.6.2 in 400 µl eiskalter Lösung I resuspendiert. Zur Lyse wird 400 µl

frisch hergestellte, alkalische SDS-haltige Lösung II zugesetzt und mit einer Pipette gemischt. Nach einer einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur wird der Reaktionsansatz mit 600 µl Lösung IV neutralisiert und 18 min auf Eis inkubiert. Dabei fallen Proteinbestandteile als Niederschlag aus und werden durch Zentrifugation (10 min, 4 °C, 12 000 U/min (Hettich Micro Rapid K; Rotor Nr. 1395)) abgetrennt. Der Überstand wird nun zweimal einer Phenol-/Chloroform Extraktion unterzogen (je 400 µl), um Proteine zu entfernen. Schließlich wird die mitochondriale DNA durch Zusatz von 840 µl Isopropanol bei Raumtemperatur gefällt (30 min) und bei 16000 x g abzentrifugiert. Die mtDNA wird nun noch zweimal mit EtOH 70% gewaschen, anschließend in 50 µl BE₁-Puffer gelöst (15 min bei 37 °C) und bei -20 °C gelagert.

4.2.6.4 Modifizierung von mtDNA und PM2-DNA (Schadensinduktion)

Als interner Standard beim DNA-Relaxationsassay und zur Enzymtestung können zusätzliche oxidative DNA-Schäden in mtDNA und PM2-DNA mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022 und sichtbarem Licht induziert werden. Zur Schädigung von PM2-DNA werden 155 µl PM2-DNA (64,5 µg/ml) mit 1645 µl Phosphatpuffer pH 7,4 und 200 µl Ro 19-8022 Stammlösung (1 mM; Endkonzentration 100 µM) versetzt, gemischt und 10 min auf einer eisgekühlten Tüpfelplatte mit einer Halogenlampe (1000 Watt, 47 cm) bestrahlt. Danach wird das Gemisch in 5 ml eisgekühlter Fällungslösung aufgenommen und 30 min auf Eis gefällt. Die Probe wird 30 min lang zentrifugiert (12000 U/min (Hettich Micro Rapid K; Rotor 1395)) und der Überstand verworfen. Die geschädigte DNA wird nun mit 1000 µl EtOH 70% gewaschen und anschließend in 200 µl BE₁-Puffer aufgenommen.

Die Schädigung von mtDNA wird analog zur Schädigung von PM2-DNA, jedoch mit weniger DNA und den dadurch entsprechend korrigierten Volumina durchgeführt. Um die Suszeptibilität von PM2- und mtDNA bezüglich der Induktion oxidativer DNA-Schäden zu untersuchen, werden PM2- und mtDNA gemischt und in einem Ansatz gemeinsam geschädigt.

4.2.6.5 Enzyminkubation

Eine entsprechende Menge DNA (mtDNA: 0,05 µg; PM2-DNA: 0,1 µg) in BE₁-Puffer wird mit Phosphatpuffer pH 7,4 auf 10 µl aufgefüllt und 10 µl BSA-haltiger BE₁-Puffer (0,1 mg/ml) hinzugefügt. Zu den Proben, die einer Enzymbehandlung unterzogen werden sollen, werden 10 µl einer Fpg-Protein-Mischung (3 µg/ml) in BE₁/BSA-Puffer gegeben. Proben, in denen nur die Einzelstrangbrüche analysiert werden, wird 10 µl BE₁/BSA-Puffer zugesetzt und alle Proben für 30 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion werden 10 µl Stopppuffer zugesetzt und die Proben kurz gevortext. Danach können die Proben auf ein Agarosegel aufgetragen werden (vgl. Kapitel 4.2.6.6). An Stelle des Fpg-Proteins können weitere Reparatarendonukleasen verwendet werden. Die Anwendungskonzentrationen sowie die Reaktionspuffer dieser Enzyme sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Wird MutY-Protein als Reparatarendonuklease verwendet, so beträgt die Inkubationszeit 3 h.

Enzym	Puffer	Anwendungskonzentration
Endonuklease III	BE ₁ / 0,1 mg BSA	30 ng/ml
Endonuklease IV	BE ₁ / 0,1 mg BSA	30 ng/ml
Fpg	BE ₁ 0,1 mg/ml BSA	1 µg/ml
MutY	MutY-Puffer / 0,1 mg/ml BSA	30 µg/ml

Tabelle 7: Reaktionspuffer und Anwendungskonzentrationen, der im DNA-Relaxationsassay verwendeten Reparatarendonukleasen.

4.2.6.6 Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung der superhelikalen und offen zirkulären DNA-Formen erfolgt mittels horizontaler Agarosegel-Elektrophorese in einem 0,8%igen Agarosegel. Hierzu werden 800 mg Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer gegeben und in einem Erlenmeyerkolben bis zum völligen Auflösen erhitzt. Verdampftes Wasser wird ergänzt und das Gel nach Abkühlen auf 60 °C in eine Gelkammer gegossen. Nach dem Aushärten (ca. 30 min bei Raumtemperatur) wird 1x TAE-Puffer zugesetzt. In

jede Tasche des Gels wird ein Reaktionsansatz (40 µl) aus 4.2.6.5 eingefüllt und bei 80 V innerhalb von 120 min aufgetrennt. Anschließend wird das Gel zur Färbung in ein Ethidiumbromidbad (0,5 mg/ml H₂O) überführt und 1 h auf dem Tischschüttler gefärbt. Alternativ kann die Färbung auch über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank durchgeführt werden.

4.2.6.7 Auswertung

Zur Auswertung wird das Gel auf einen UV-Leuchttisch (312 nm) gelegt, mit einer digitalen Kamera aufgenommen und gespeichert. Um die jeweiligen Anteile der einzelnen DNA-Formen an der gesamten DNA-Menge pro Spur zu bestimmen, wird über die gemessenen Fluoreszenzintensitäten integriert.

Mit Hilfe von Gleichung 4 werden daraus die Zahl der Einzelstrangbrüche und die Endonuklease-sensitiven DNA-Modifikationen pro Molekül berechnet. Die logarithmische Formel berücksichtigt, dass nur der erste Strangbruch zu einer Relaxation des Moleküls führt und setzt eine statistisch zufällige Verteilung (Poisson-Verteilung) der Strangbrüche voraus. Der geringeren Interkalation des Ethidiumbromids in die superhelikale DNA und die damit verbundene geringere Fluoreszenz wird durch den Korrekturfaktor 1,42 Rechnung getragen (Lloyd et al., 1978).

$$ESS + SSB = -\ln(1,42 \times S) / (1,42 \times S + R)$$

Gleichung 4: Gleichung zur Berechnung der Einzelstrangbrüche (SSB) und Endonuklease-sensitiven Modifikationen (ESS) im DNA-Relaxationsassay; S = Fluoreszenzintensität der superhelikalen Form der DNA; R = Fluoreszenzintensität der relaxierten Form der DNA.

Um nur die Endonuklease-sensitiven Modifikationen zu erhalten, muss der Anteil der direkten Einzelstrangbrüche in Ansätzen ohne Reparatureenonuklease bestimmt werden und kann dann subtrahiert werden.

4.2.7 Statistische Auswertung

Statistische Vergleiche zwischen zwei Datenreihen werden mit dem Student'schen T-Test durchgeführt. Die Berechnungen werden mit Microsoft Excel durchgeführt. Alle T-Tests werden als zweiseitige Tests durchgeführt, dabei werden jeweils zwei Stichproben mit ungleicher Varianz verglichen (heteroskedastischer Typ). Eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wird als statistisch signifikant betrachtet.

Die statistischen Auswertungen der Mutationsfrequenzen werden mit Hilfe eines Vierfeldertests durchgeführt, wobei eine binominale Verteilung zwischen den verglichenen Genotypen angenommen wird. Sämtliche möglichen Genotypkombinationen werden mit dem Programm SPSS 12.0 verglichen und die Signifikanz mit Hilfe des exakten Tests nach Fisher berechnet. Eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wird als statistisch signifikant betrachtet.

5 ERGEBNISSE

5.1 Oxidative DNA-Schäden in mitochondrialer DNA

Wie in Kapitel 2.1.1 beschrieben, sind Mitochondrien einer der Hauptproduktionsorte für ROS in aeroben Zellen. Selbst unter physiologischen Bedingungen werden bis zu 2% des durch die mitochondriale Atmungskette aufgenommenen Sauerstoffs zu Superoxidradikalen reduziert (Boveris et al., 1972). Aufgrund der nahen räumlichen Lage der Atmungskette zur mitochondrialen DNA wird spekuliert, dass diese sehr anfällig für ROS sein könnte (Miquel, 1991). Deshalb sollte untersucht werden, in welchem Ausmaß oxidative Basenmodifikationen in mitochondrialer DNA (mtDNA) zu finden sind. Da bisher noch nicht ausreichend geklärt ist, welche Rolle das CSB- und das OGG1-Protein bei der Reparatur mitochondrialer DNA-Schäden spielen, sollten neben Wildtyp auch *Csb*^{-/-}, *Ogg1*^{-/-} und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäuse in die Analyse mit einbezogen werden.

Dazu sollte ein DNA-Relaxationsassay etabliert werden, der es ermöglicht, mit Hilfe spezifischer Reparaturenukleasen verschiedene mitochondriale DNA-Schäden in Mäusen zu quantifizieren.

5.1.1 Einsatz eines DNA-Relaxationsassays zur Bestimmung mitochondrialer DNA-Schäden

Mitochondriale DNA liegt natürlicherweise in einer superspiralisierten Form vor. Diese Eigenschaft der DNA kann man zur Bestimmung von DNA-Schäden in mtDNA nutzen. Durch spezifische Reparaturenukleasen, die DNA-Modifikationen erkennen, diese prozessieren und einen Einzelstrangbruch in die DNA einführen, wird die superspiralisierte in eine relaxierte „offen zirkuläre“ Form überführt. Diese beiden Formen können nun im Agarosegel aufgetrennt werden.

Um eine ausreichende Menge an mtDNA gewinnen zu können, wurden für jede mtDNA-Isolation die Lebern von mindestens 2 Mäusen vereinigt. Um den Einfluss

interindividueller Schwankungen gering zu halten, wurden nur Lebern von Tieren mit gleichem Geschlecht, Genotyp und Alter zusammengefasst.

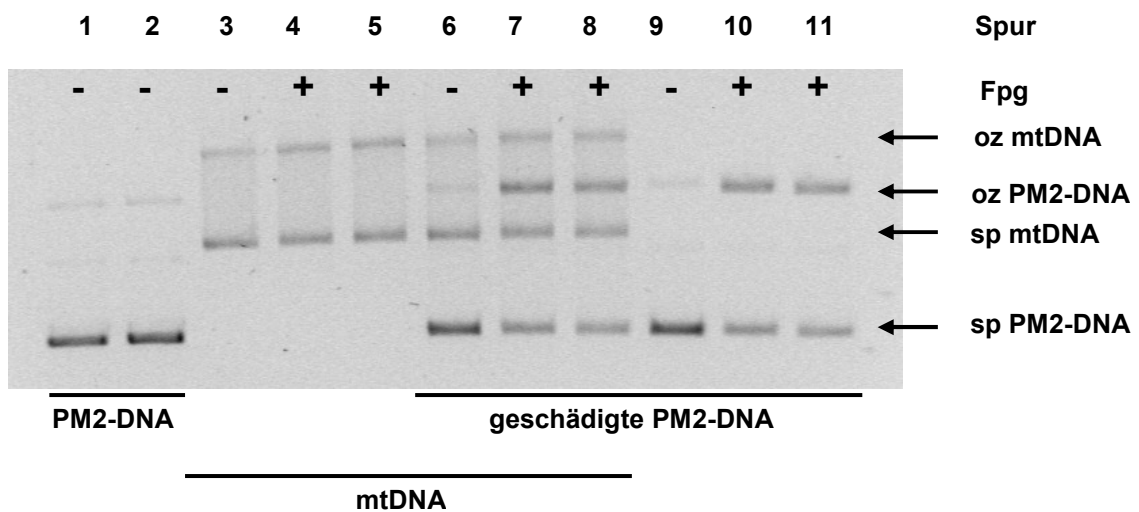


Abbildung 22: Trennung von offen zirkulärer (oz) und superspiralisierter (sp) mtDNA und PM2-DNA im Agarosegel (0,8%). In den unbehandelten Ansätzen (Fpg „-“) sind die Hintergrundspiegel an Einzelstrangbrüchen zu erkennen. In den mit Fpg-Protein behandelten Ansätzen (Fpg „+“) werden oxidative DNA-Schäden erkannt, prozessiert und das DNA-Molekül in eine offen zirkuläre Form überführt. Mit Ro 19-8022 geschädigte PM2-DNA wurde als interne Kontrolle eingesetzt.

Abbildung 22 zeigt, dass mtDNA und PM2-DNA, die in unterschiedlicher Konformation vorliegen, mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt werden können. Um auszuschließen, dass Reagenzien oder Membranbestandteile aus der Leber, die bei der Gewinnung der mtDNA im Reaktionsansatz zurückbleiben, die Erkennung von DNA-Schäden durch Fpg-Protein beeinflussen, wurde bei der Enzyminkubation in einigen Ansätzen dem Reaktionsansatz eine interne Kontrolle zugesetzt. Dazu wurde mit Ro 19-8022 geschädigte PM2-DNA zusammen mit mtDNA (Spuren 7 und 8; Abbildung 22) und jeweils in separaten Ansätzen (Spuren 10 und 11; Abbildung 22) mit Fpg inkubiert. Abbildung 23 zeigt, dass Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitive Modifikationen sowohl in getrennten als auch in gemeinsamen Ansätzen, in gleicher Höhe erkannt werden.

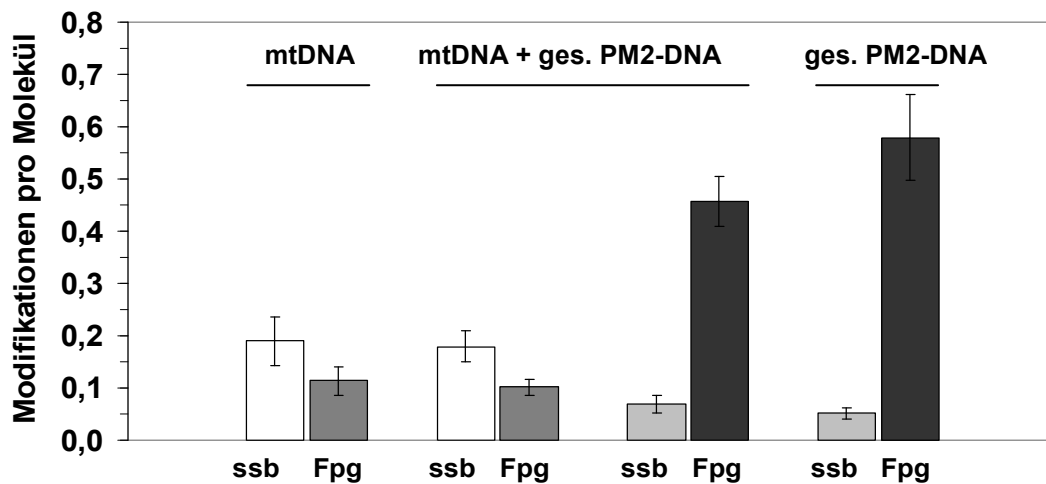


Abbildung 23: Anzahl von Einzelstrangbrüchen (ssb) und Fpg-sensitiven Modifikationen (Fpg) in mtDNA und mit Ro 19-8022 geschädigter PM2-DNA. PM2-DNA wurde, wie in Kapitel 4.2.6.4 beschrieben, geschädigt. Die Schadensdetektion erfolgte für mtDNA und geschädigte PM2-DNA (ges. PM2-DNA) parallel in getrennten Ansätzen oder in einem gemeinsamen Ansatz (mittlere 4 Säulen) mittels mtDNA-Relaxationsassay, wie in Kapitel 4.2.6 beschrieben (vgl. Abbildung 22). $n=3 - 10 \pm SD$).

Die Anwendbarkeit des mtDNA-Relaxationsassays sollte mit Hilfe eines weiteren Kontroll-Versuchs getestet werden. Dazu wurde mtDNA mit einer entsprechenden Menge an PM2-DNA gemischt, mit Ro 19-8022 versetzt und mit sichtbarem Licht bestrahlt (vgl. 4.2.6.4). Nach Fällung der DNA, Enzymbehandlung und Auftrennung im Agarosegel wurde das in Abbildung 24 gezeigte Ergebnis erhalten.

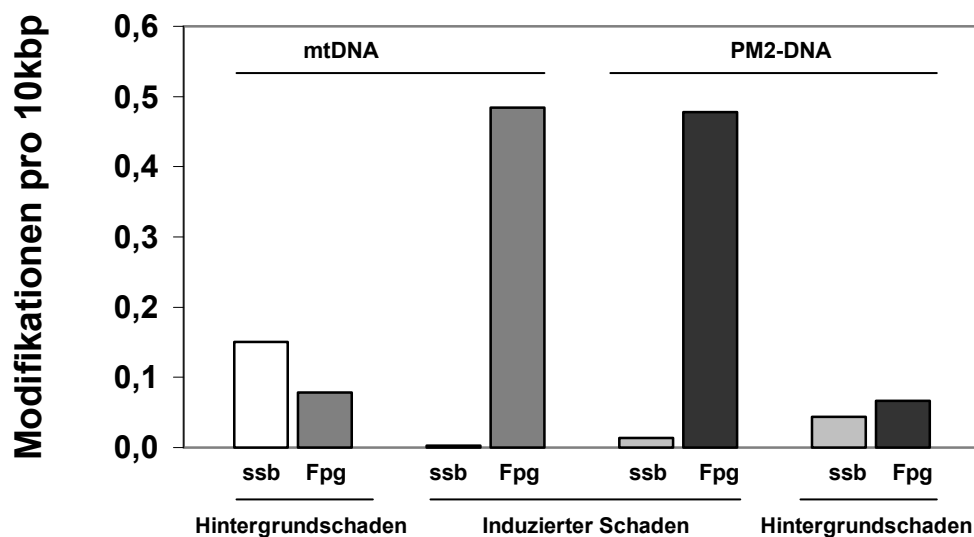


Abbildung 24: Nachweis von Hintergrundschäden und durch Ro 19-8022 (100 μ M) induzierte Einzelstrangbrüche (ssb) und Fpg-sensitive Modifikationen (Fpg) in mtDNA und PM2-DNA. mtDNA und PM2-DNA wurden gemischt, mit Ro 19-8022 versetzt und bestrahlt (vgl. 4.2.6.4). Der induzierte Schaden berechnet sich aus der Differenz der Hintergrundspiegel zu den insgesamt gemessenen Werten. Da mtDNA und PM2-DNA unterschiedliche Molekülgrößen besitzen, wurde der Schaden auf 10 kbp bezogen (n=1).

Die Ergebnisse zeigen, dass jeweils gleich viele Schäden mit Fpg-Protein detektiert wurden und sich mtDNA und PM2-DNA daher in ihrer Suszeptibilität gegenüber oxidativen DNA-Schäden also nicht unterscheiden. Die Anzahl der absolut induzierten Werte in mtDNA und PM2-DNA durch Ro 19-8022 stimmt gut mit einem früheren Bericht überein (Will et al., 1999).

Durch die Kontrollversuche konnte also gezeigt werden, dass Reparaturenukleasen wie das Fpg-Protein DNA-Modifikationen in mtDNA quantitativ erkennen und die superspiralisierte Form in eine „offen zirkuläre“ Form überführen können. Diese beiden Formen können im Agarosegel aufgetrennt und quantifiziert werden. Der hier vorgestellte mtDNA-Relaxationsassay ist deshalb zur Detektion von mtDNA-Schäden geeignet.

5.1.2 Einfluss eines CSB-, OGG1-, und kombinierten CSB/OGG1-Ausfalls auf die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden in mtDNA

Nach dem Nachweis, dass mit Hilfe des DNA-Relaxationsassays und Fpg Protein oxidative mtDNA-Schäden in Mäuselebern bestimmt werden können, sollten die Hintergrundspiegel dieser Schäden in diversen *knockout*-Mäusen untersucht werden.

Kürzlich wurde gezeigt, dass ein Ausschalten des nukleären kodierten *Ogg1*-Gens in Mäusen zu einem kompletten Ausfall der mitochondrialen 8-oxoG:C-Glykosylaseaktivität führt (de Souza-Pinto et al., 2001a). Außerdem wurde postuliert, dass das CSB Protein eine stimulierende Wirkung auf die mitochondriale 8-oxoG:C Glykosylaseaktivität hat (Stevnsner et al., 2002).

Entsprechend der Ausgangshypothese (vgl. Abbildung 1) sollte bei einem kompletten Wegfall des *Ogg1*- und *Csb*-Genproduktes eine starke Veränderung der Gleichgewichtsspiegel der Fpg-sensitiven DNA-Schäden in mtDNA resultieren. Daher wurden in 6 bis 12 Monate alten Tieren die Anzahl der Einzelstrangbrüche und der Fpg-sensitiven Modifikationen bestimmt. Dabei wurden folgende Genotypen verwendet: Wildtyp, *Csb*^{-/-}, *Ogg1*^{-/-} und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}.

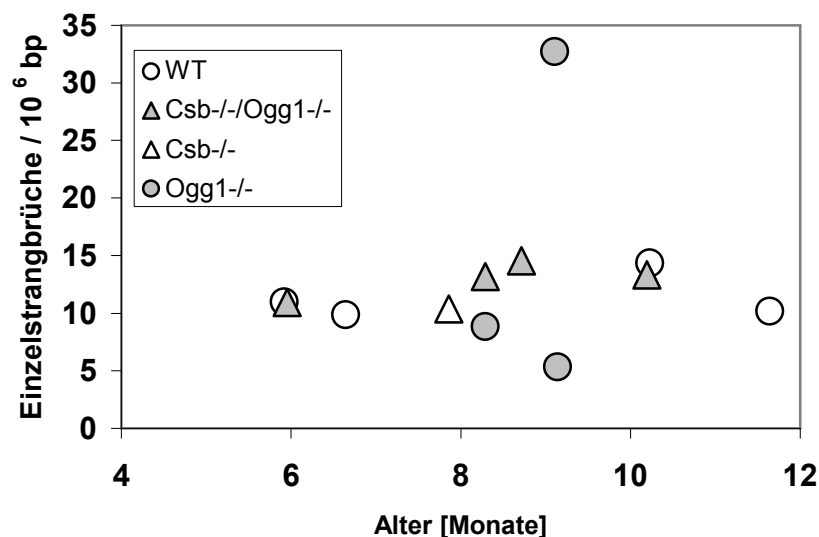


Abbildung 25: Hintergrundspiegel von Einzelstrangbrüchen in mtDNA von Wildtyp-, *Csb*^{-/-}, *Ogg1*^{-/-} und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen im Alter von 6–12 Monaten. Jeder der Punkte repräsentiert eine mtDNA-Isolation aus 3 Mäuselebern des jeweiligen Genotyps.

In Abbildung 25 sind Einzelstrangbrüche mitochondrialer DNA verschiedener Genotypen aufgetragen. Man erkennt, dass ein Großteil der untersuchten Proben zwischen 5 und 15 Einzelstrangbrüche pro 10^6 Basenpaare trägt. Die Ergebnisse zeigen auch, dass es keine erkennbaren Unterschiede zwischen den untersuchten Genotypen gibt.

In Abbildung 26 sind Hintergrundspiegel Fpg-sensitiver Modifikationen verschiedener Mausgenotypen gezeigt. Wiederum ist zwischen den untersuchten Wildtyp-, *Csb*^{-/-}-, *Ogg1*^{-/-}- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen kein signifikanter Unterschied erkennbar. Die absoluten Zahlen bewegen sich hier zwischen 2 und 12 Modifikationen pro 10^6 Basenpaare.

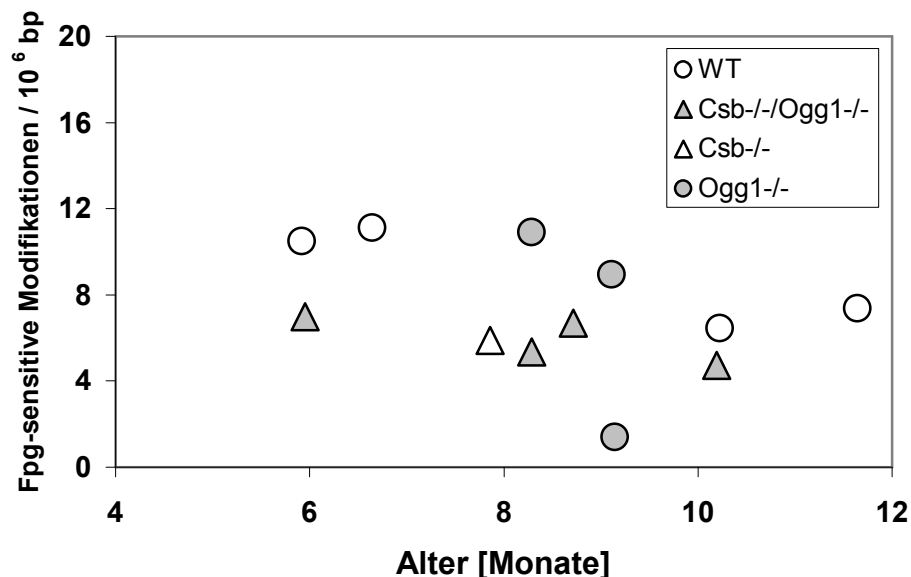


Abbildung 26: Hintergrundspiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen in mtDNA von Wildtyp-, *Csb*^{-/-}-, *Ogg1*^{-/-}- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen im Alter von 6 – 12 Monaten. Jeder Punkt repräsentiert eine mtDNA-Isolation aus 3 Mäuselebern des jeweiligen Genotyps.

5.1.3 Altersabhängigkeit eines kombinierten CSB/OGG1-Ausfalls auf die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen

Da die untersuchten jüngeren Mäuse keinen Unterschied an oxidativen mtDNA-Schäden zeigten, sollte untersucht werden, ob die Schäden erst im Alter ansteigen

bzw. ob ein altersabhängiger Unterschied zwischen Wildtyp- und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen zu erkennen ist (Abbildung 27).

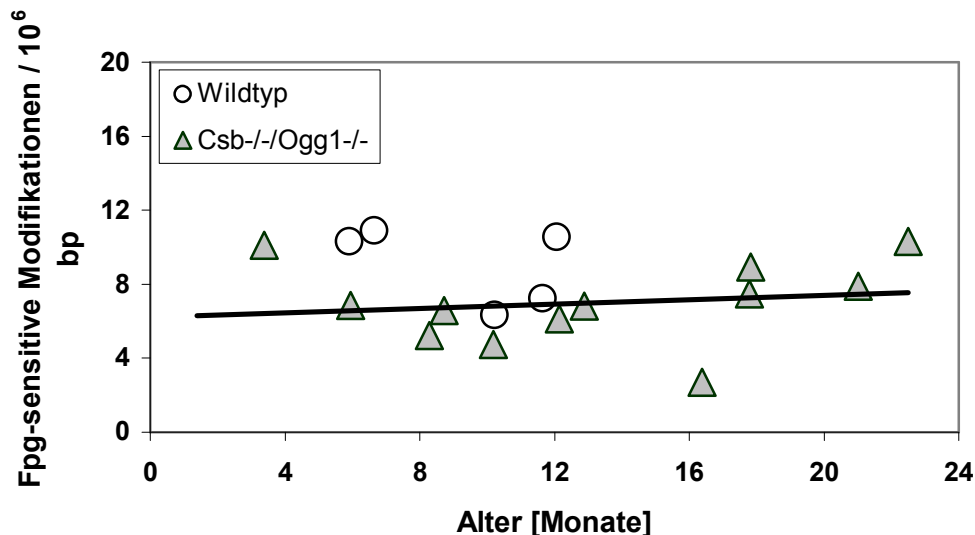


Abbildung 27: Altersabhängiger Verlauf der Hintergrundspiegel Fpg-sensitiver Modifikationen in mtDNA von Wildtyp- und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen pro 10⁶ bp. Jeder Punkt repräsentiert eine mtDNA-Isolation aus 3 Mäuselebern des jeweiligen Genotyps und anschließender Bestimmung der Fpg-sensitiven Modifikationen. Zur besseren Übersicht wurden teilweise Werte aus Abbildung 26 mit in diese Abbildung integriert.

Es besteht weder in Wildtyp- noch in *double-knockout*-Mäusen eine Abhängigkeit der oxidativen DNA-Modifikationen vom Alter. Dennoch zeigen *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäuse einen errechneten Anstieg von 0,73 Fpg-sensitiven Modifikationen pro Lebensjahr.

5.1.4 Nachweis von MutY-sensitiven Läsionen in mtDNA

Nachdem keine altersabhängige Erhöhung der Fpg-sensitiven Läsionen in mtDNA von *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen gefunden werden konnte, stellte sich die Frage, ob 8-oxoG in mtDNA möglicherweise mit Adenin gepaart (8-oxoG:A) vorliegen könnte und sich dadurch einer Analyse durch Fpg-Protein entzieht (vgl. 2.4.2).

Zur Klärung dieser Frage sollte das *E. coli*-Protein MutY eingesetzt werden. Wie in Kapitel 2.4.2.1 beschrieben, spielt MutY eine wichtige Rolle bei der Mismatch-Reparatur von 8-oxoG:A Fehlpaarungen. MutY-Protein erkennt diese Fehlpaarung, schneidet Adenin aus dem DNA-Strang heraus und erzeugt dadurch eine AP-Stelle. Da das MutY-Protein keine AP-Lyase-Funktion besitzt, wird diese AP-Stelle *in vivo* durch eine AP-Endonuklease weiter prozessiert und es entsteht ein Einzelstrangbruch (vgl. 2.4.2). Damit im DNA-Relaxationsassay die durch MutY erzeugte AP-Stelle in einen Einzelstrangbruch überführt und damit detektiert werden kann, wurde MutY-Protein mit Endonuklease IV zusammen zum Reaktionsansatz gegeben. Endonuklease IV erkennt normale, 1'-oxidierte und 4'-oxidierte AP-Läsionen.

Abbildung 28 zeigt die Kombination von MutY-Protein mit Endonuklease IV zur Detektion von 8-oxoG:A (Spur 3) in mtDNA von Wildtyp- und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen. Zur Berechnung der absoluten MutY-Werte wurden auch Ansätze ohne Enzym (Spur 1) und mit Endonuklease IV (Spur 4) quantifiziert.

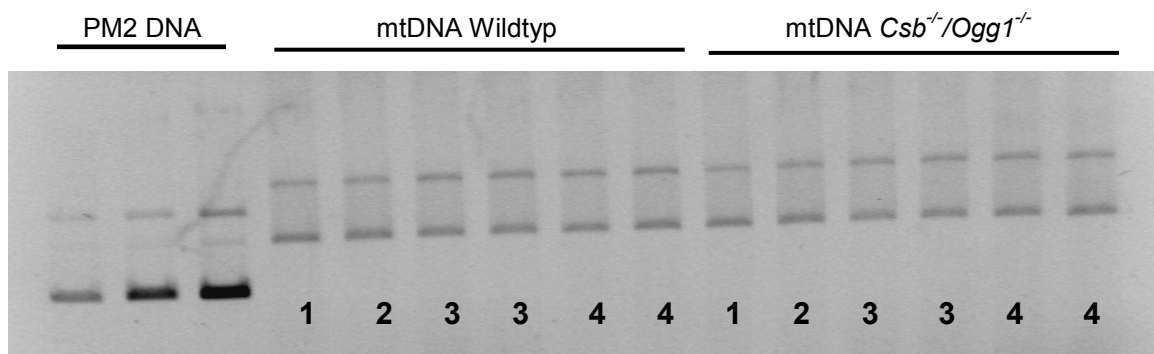


Abbildung 28: Nachweis Endonuklease IV- und MutY-sensitiver Läsionen in mtDNA von alten Wildtyp- und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen. Vor der Auftrennung im Agarosegel (0,8%) wurden die Ansätze mit folgenden Enzymen behandelt (vgl. 4.1.10.9): Spur 1: ohne Enzym; Spur 2: MutY 30µg/ml; Spur 3: MutY 30 µg/ml und Endonuklease IV 30 ng/ml; Spur 4: Endonuklease IV 30 ng/ml. Die Enzyminkubation erfolgte für 3 h bei 37 °C. PM2-DNA wurde in verschiedenen Konzentrationen als interne Kontrolle eingesetzt.

Da rein visuell keine eindeutige Aussage über ein Vorhandensein von MutY-sensitiven Läsionen in der untersuchten mtDNA getroffen werden konnte, wurden die Banden quantifiziert und das Ergebnis in Abbildung 29 dargestellt.

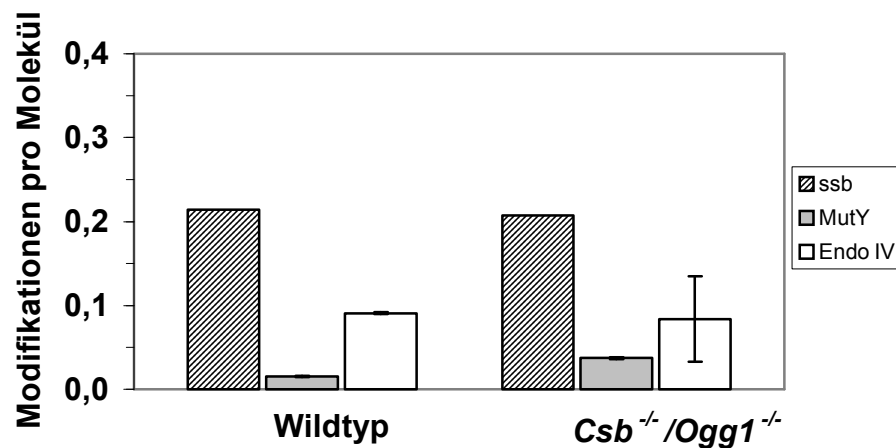


Abbildung 29: Einzelstrangbrüche, MutY- und Endo IV- sensitive Läsionen in mtDNA von Wildtyp- (17 Monate) und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen (27 Monate) (n = 1 – 2). MutY-sensitive Modifikationen wurden bestimmt durch Kombination der Enzyme MutY (30 µg/ml) und Endonuklease IV (30 ng/ml).

Die Daten zeigen, dass in mtDNA von Wildtyp- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen nur ein relativ kleiner Anteil an MutY-sensitiven Läsionen zu finden ist. Somit konnte klar gezeigt werden, dass es nicht zu einer starken Erhöhung von 8-oxoG:A Fehlpaarungen in mtDNA kommt.

5.1.5 Schadensprofile in mtDNA in Abwesenheit von OGG1 und CSB

Um letztendlich die verschiedensten endogenen DNA-Schäden in mitochondrialer DNA von Wildtyp und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen besser vergleichen zu können, sind die Schadensprofile für beide Genotypen in Abbildung 30 zusammengefasst.

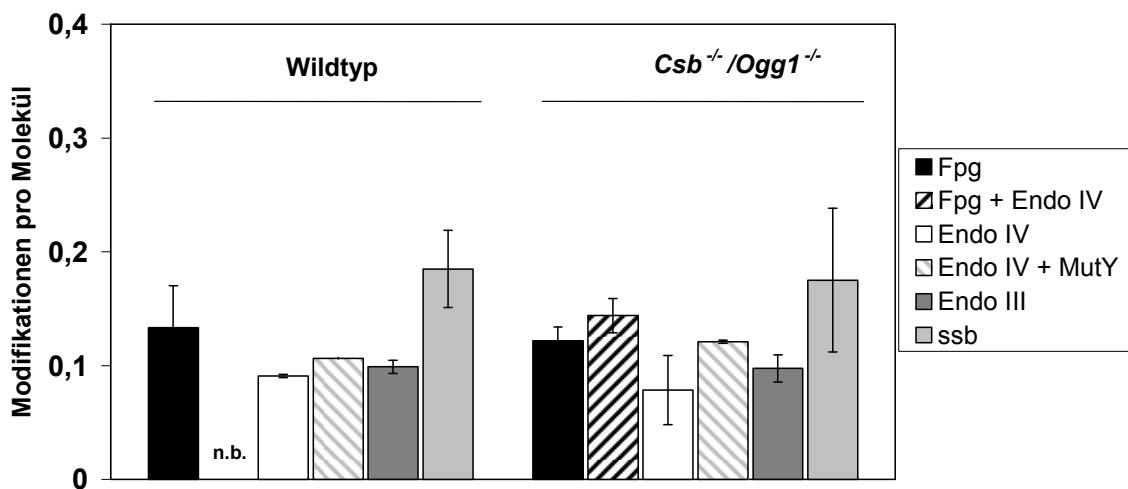


Abbildung 30: mtDNA Schadensprofil von Wildtyp- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen (n=2–6). Alter der eingesetzten Mäuse: Wildtyp = 6-17 Monate; *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-} = 6-27 Monate. n.b. = nicht bestimmt.

Man erkennt, dass das mtDNA-Schadensprofil sowohl in den Wildtyp als auch in den *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen von Einzelstrangbrüchen dominiert wird. Gleichzeitig variiert die Anzahl der Einzelstrangbrüche im Vergleich zu den anderen Werten am stärksten. In geringerer Anzahl sind jeweils Fpg-sensitive Modifikationen und AP-Stellen erkennbar. Da das Fpg-Protein neben 8-oxoG:C auch AP-Stellen in der DNA erkennt (vgl. 2.4.2), sollte durch den Einsatz der Endonuklease IV (erkennt reguläre, 1'-oxidierte und 4'-oxidierte AP-Stellen, vgl. 2.4.2) untersucht werden, wie viele der Fpg-sensitiven Läsionen auf 8-oxoG:C zurückzuführen sind. Durch die Kombination von Fpg und Endo IV erkennt man, dass nur ein geringer Teil der Fpg-sensitiven Läsionen auf 8-oxoG:C zurückzuführen ist. Durch den Einsatz der Endonuklease III (sie erkennt im Vergleich zur Endonuklease IV keine 1'-oxidierten AP-Läsionen, zusätzlich aber noch 5,6-Dihydropyrimidine und Fapy-Adenin) konnte gezeigt werden, dass in mtDNA weder 1'-oxidierten AP-Läsionen, noch Fapy-Adenin zu finden sind. Durch die Verwendung einer Kombination von MutY-Protein mit Endo IV konnte außerdem gezeigt werden, dass quasi kein 8-oxoG in mitochondrialer DNA zu finden ist, das mit Adenin fehlgepaart vorliegt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die Schadensprofile mitochondrialer DNA aus Wildtyp- und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen nicht unterscheiden und dass überwiegend Einzelstrangbrüche und AP-Stellen nachweisbar sind.

5.2 Wirkungen des Peroxisomenproliferators WY-14,643

Um zu überprüfen, ob der Peroxisomenproliferator WY-14,643 über eine Stimulation der Acyl-CoA-Oxidase1 oxidative DNA-Schäden induziert und damit in Peroxisomen generierte ROS in der Lage sind DNA zu schädigen, sollte mit der Substanz sowohl die Hepatomzelllinie HEPA1 als auch Wildtyp- und reparaturdefiziente *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäuse behandelt werden.

5.2.1 Oxidative DNA-Schäden durch WY-14,643 in HEPA1 Zellen

Die Frage, ob der Peroxisomenproliferator (PP) WY-14,643 einen Einfluss auf die Spiegel oxidativer DNA-Modifikationen hat, wurde zunächst an einer Hepatomzelllinie der Maus (HEPA1) untersucht, da PP-induzierte Effekte besonders in der Leber von Nagern auftreten. Dazu wurden die Zellen für 24 h mit ansteigenden Konzentrationen WY-14,643 unter normalen Zellkulturbedingungen behandelt und anschließend Einzelstrangbrüche sowie Fpg-sensitive Modifikationen mit der Alkalischen Elution bestimmt (Abbildung 31).

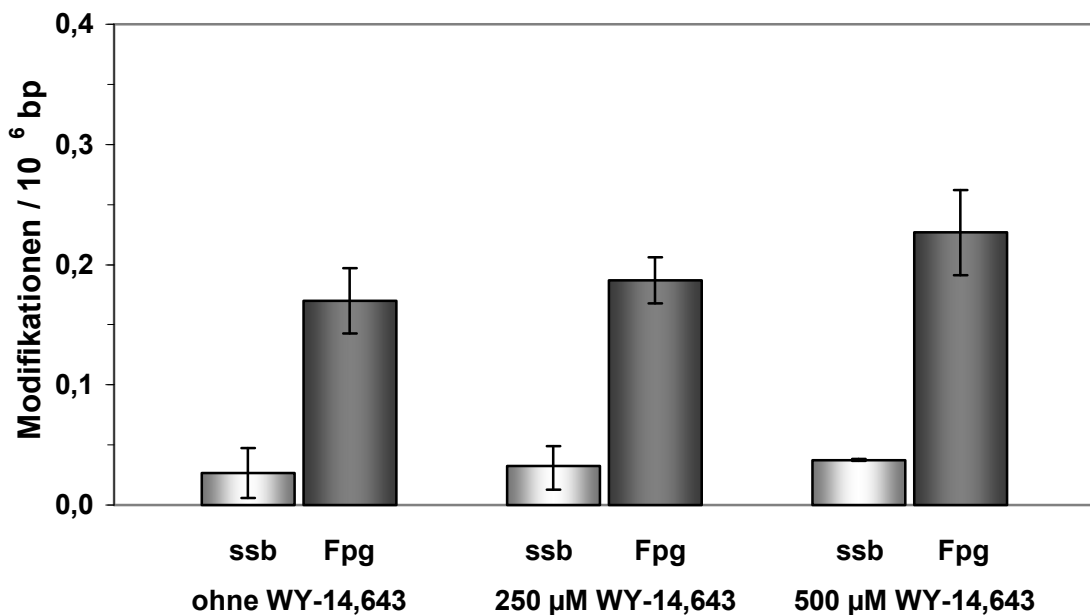


Abbildung 31: Einfluss von WY-14,643 auf die Spiegel an Einzelstrangbrüchen (ssb) und Fpg-sensitiven DNA-Modifikationen (Fpg) in HEPA1-Zellen. Die Zellen wurden für 24 h mit WY-14,643 behandelt und die DNA-Modifikationen mittels Alkalischer Elution quantifiziert (n=3).

Man erkennt, dass es unter einer Behandlung von HEPA1-Zellen mit WY-14,643 weder zu einer Erhöhung der Einzelstrangbrüche, noch zu einer signifikanten Erhöhung der Fpg-sensitiven Modifikationen kommt.

Eine Erklärung für die fehlende Wirkung des PP auf die oxidativen DNA-Schäden im Zellkern könnte darin liegen, dass cytosolische Antioxidantien wie Glutathion ausreichend in der Lage sind, die reaktiven Sauerstoffspezies aus den Peroxisomen abzufangen und so deren Vordringen zur nukleären DNA zu verhindern. Um diese Hypothese zu testen, wurden HEPA1-Zellen durch 24-stündige Behandlung mit Buthioninsulfoximin zunächst Glutathion-depletiert und anschließend mit WY-14,643 behandelt (vgl. 4.2.1.3). Die Ansätze wurden nach der Behandlung aufgeteilt. In einer Hälfte wurde der Glutathion-Gehalt gemessen (vgl. 4.2.1.4), um die Abwesenheit dieses Antioxidans zu verifizieren, in der anderen Hälfte des Ansatzes wurde mittels Alkalischer Elution die Anzahl oxidativer Basenmodifikationen bestimmt. Trotz effektiver Glutathion-Reduktion

des Antioxidans Glutathion, welche die Induktion oxidativer DNA-Modifikationen durch ROS begünstigen sollte, konnte keine signifikante Zunahme dieser DNA-Schäden detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Eine weitere Erklärung für ein fehlendes Ansprechen der HEPA1-Zelllinie auf die Behandlung mit dem Peroxisomenproliferator könnte in einer Entdifferenzierung der Zelllinie während der malignen Entartung begründet sein.

Da fast alle Peroxisomenproliferator-vermittelten Effekte an den so genannten Peroxisomenproliferator aktivierten Rezeptor alpha ($\text{PPAR}\alpha$) gekoppelt sind (Peters et al., 1997), sollte die Expression dieses Rezeptors mit Hilfe der Reversen-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) untersucht werden.



Abbildung 32: Expression des Peroxisomenproliferator aktivierten Rezeptors alpha ($\text{PPAR}\alpha$) in primären Hepatozyten der Maus und der Hepatomzelllinie HEPA1. Zur Untersuchung der Genexpression von $\text{PPAR}\alpha$ wurde RNA isoliert (vgl. 4.2.2.9), diese mit Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und mittels PCR ein spezifisches Amplifikat (654 bp) generiert (vgl. 4.2.1.6). Die Reaktionsprodukte wurden in einem Agarosegel (2%) aufgetrennt. M = DNA-Marker Roche VI.

Abbildung 32 zeigt, dass $\text{PPAR}\alpha$ nicht in HEPA1-Zellen exprimiert wird. Als Positivkontrolle wurde für den Versuch RNA aus der Leber einer Maus eingesetzt. Hier ist deutlich eine Expression des Peroxisomenproliferator aktivierten Rezeptors zu erkennen.

Die Ergebnisse zeigen, dass ohne eine Expression von $\text{PPAR}\alpha$ keine PP-vermittelten Effekte in HEPA1-Zellen untersucht werden können.

5.2.2 Einfluss von WY-14,643 auf das Körpergewicht von Wildtyp- und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen

Zur Untersuchung, ob der Peroxisomenproliferator WY-14,643 oxidative DNA-Schäden *in vivo* erzeugt, wurde die Substanz über eine spezielle Prüfdiät in einer Konzentration von 0,025% über unterschiedlich lange Zeiträume an die Versuchstiere *ad libitum* verabreicht (vgl. 4.2.2.5).

Um toxische Effekte durch die Substanz ausschließen zu können, wurde wöchentlich das Körpergewicht der Wildtyp- (Abbildung 33) und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Tiere (Abbildung 34) bestimmt.

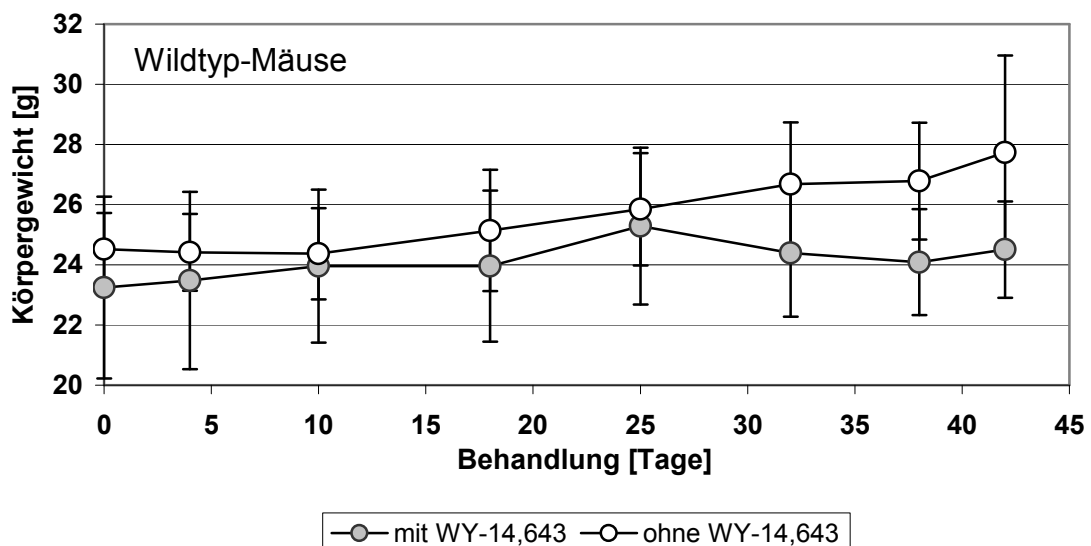


Abbildung 33: Entwicklung des Körpergewichts in Wildtyp-Mäusen unter einer Behandlung mit WY-14,643 und unbehandelten Kontrolltieren. Die Substanz wurde in einer Konzentration von 0,025% dem Haltungsfutter beigemischt und für 6 Wochen *ad libitum* verabreicht. Alter der eingesetzten Tiere: 3 Monate. Wildtyp + WY-14,643: n=6; Wildtyp: n=5.

Sowohl der Gewichtsverlauf der behandelten Wildtyp- als auch der behandelten *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Tiere unterscheidet sich kaum vom Gewichtsverlauf der unbehandelten Kontrolltiere. Selbst nach 6-wöchiger Behandlung der Tiere mit 0,025% WY-14,643 kommt es nicht zu einer Abnahme des Körpergewichts. Dies deutet darauf hin, dass WY-14,643 in der gewählten Konzentration generell nicht zu toxischen Effekten in den behandelten Kollektiven führt.

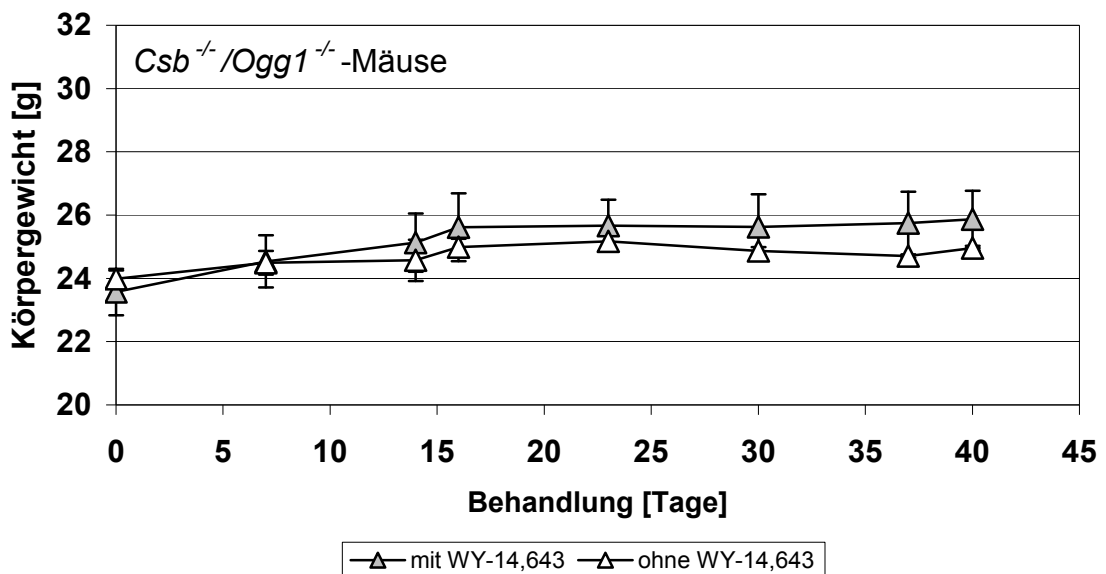


Abbildung 34: Entwicklung des Körpergewichts in *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen unter einer WY-14,643 Behandlung und in unbehandelten Kontrolltieren. Die Substanz wurde in einer Konzentration von 0,025% dem Haltungsfutter beigemischt und den Tieren *ad libitum* verabreicht. Alter der eingesetzten Tiere: 3 Monate. *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-} + WY-14,643: n=6; *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}: n=2.

5.2.3 Einfluss von WY-14,643 auf das Lebergewicht von Wildtyp und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Peroxisomenproliferator WY-14,643 in der angewendeten Konzentration weder in Wildtyp- noch in *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen toxische Effekte zeigt, sollte untersucht werden, ob die Tiere pharmakologisch auf die Behandlung ansprechen. Als sehr guter Marker kann hier das Verhältnis von Lebergewicht zum Körpergewicht herangezogen werden. Wie in Kapitel 2.1.3.2 beschrieben, führen PP zu einer stark vergrößerten Leber und damit zu einem Anstieg des Lebergewichts.

Zur Bestimmung dieses Faktors wurden die Tiere gewogen (vgl. 4.2.2.6), anschließend die Leber entnommen (vgl. 4.2.2.7) und auch von dieser das Gewicht bestimmt. Durch Bildung des Quotienten aus Leber- und Körpergewicht, erhält man eine charakteristische Größe, mit der das Ansprechen der Tiere auf die Behandlung beurteilt werden kann.

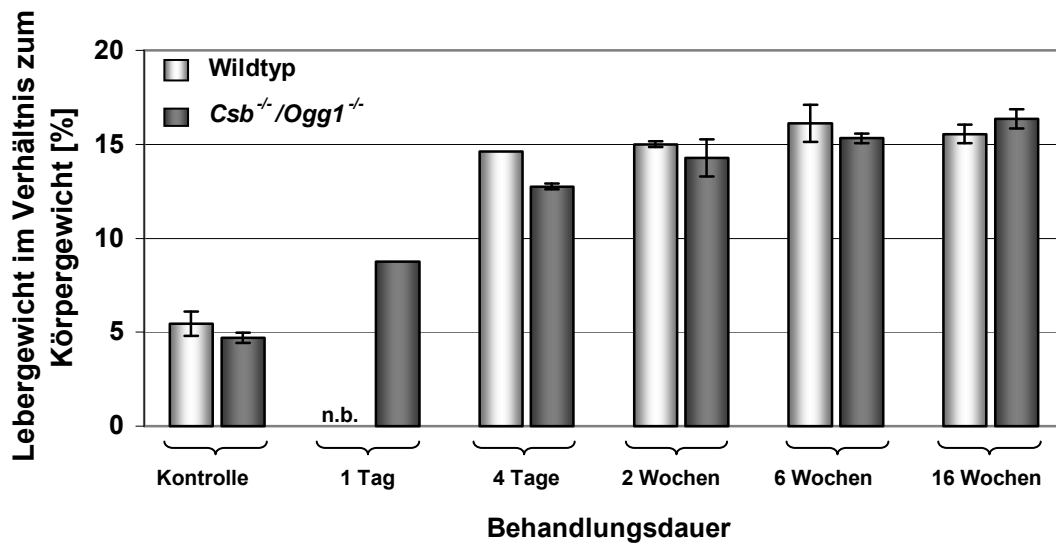


Abbildung 35: Einfluss einer WY-14,643 Behandlung auf das Lebergewicht von Wildtyp- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen. Die Substanz wurde in einer Konzentration von 0,025% dem Haltungsfutter beigemischt und für 2 bis 16 Wochen den Mäusen *ad libitum* verabreicht. Für kürzere Zeitpunkte wurde den Mäusen WY-14,643 (100 mg/kg Körpergewicht) per Schlundsonde verabreicht. Zum Zeitpunkt der Analyse waren die Tiere 4-5 Monate alt. n=1–9; n.b. = nicht bestimmt.

Abbildung 35 zeigt das Verhältnis von Leber- zu Körpergewicht in Prozent. Man erkennt, dass sowohl in unbehandelten Wildtyp- als auch unbehandelten *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen die Leber ca. 5% des Gesamtkörpergewichts ausmacht. Unter der Behandlung mit WY-14,643 kommt es bei beiden Genotypen zu einer kontinuierlichen Zunahme des Lebergewichts, bevor nach ca. zwei Wochen ein Zustand erreicht wird, bei dem das Lebergewicht auf einem Niveau von 16% des Körpergewichts persistiert. Zur Verdeutlichung ist die Gewichtszunahme einer behandelten Leber im Vergleich zu einer unbehandelten Leber in Abbildung 36 dargestellt.

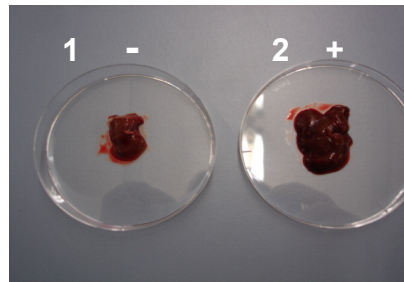


Abbildung 36: Gewichtszunahme einer Nagerleber nach der Behandlung mit 0,025% WY-14,643 (2) im Vergleich zur unbehandelten Leber (1) einer Kontrollmaus. WY-14,643 wurde für 16 Wochen einer *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Maus *ad libitum* verabreicht und dann die Leber entnommen. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Analyse 5 Monate alt.

Die Ergebnisse zeigen, dass Wildtyp und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäuse bereits nach kurzer Behandlungsdauer in gleicher Weise auf eine Behandlung mit WY-14,643 ansprechen.

5.2.4 Einfluss von WY-14,643 auf die Expression der Acyl-CoA-Oxidase in Mäuselebern

Ein weiterer wichtiger Parameter, mit dem das Ansprechen der Tiere auf die WY-14,643 Gabe charakterisiert werden kann, stellen PPAR α -vermittelte Genexpressionsänderungen dar. Typischerweise kommt es unter einer Behandlung mit PP zu einer verstärkten Expression der peroxisomalen Acyl-CoA-Oxidase (ACOX1). Dieses Enzym ist wie unter 2.1.3.1 beschrieben, maßgeblich an der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt.

Eine mögliche Genexpressionsänderung in den Lebern der Tiere sollte deshalb mit Hilfe einer semiquantitativen RT-PCR bestimmt werden (vgl. 4.2.2.9).

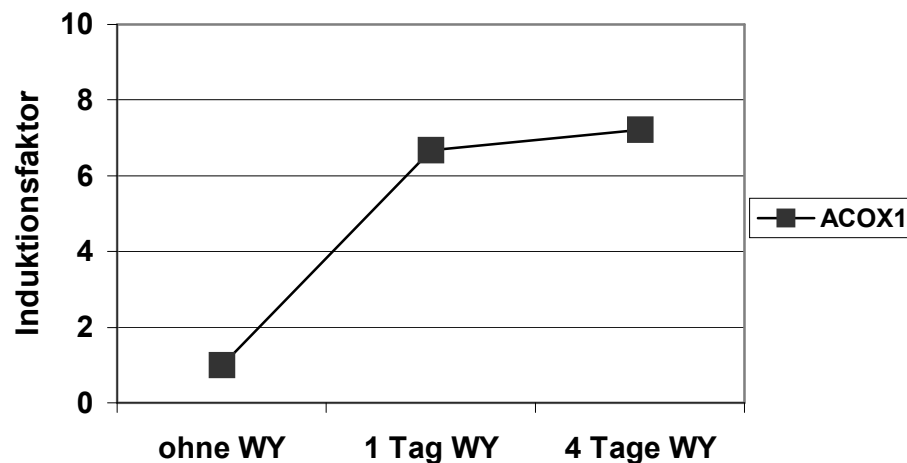


Abbildung 37: Einfluss einer WY-14,643 Behandlung auf die Genexpression der Acyl-CoA-Oxidase (ACOX1) in *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen. Die Substanz wurde den Mäusen in einer Dosierung von 100 mg/kg Körpergewicht täglich per Schlundsonde für 1 oder 4 Tage verabreicht und die Induktion der Genexpression von GAPDH und ACOX1 mittels semiquantitativer RT-PCR gemessen (vgl. 4.2.2.9). Zur Berechnung des Induktionsfaktors (relativer Anstieg unter WY-14,643-Behandlung) wurde die Expression der Acyl-CoA-Oxidase jeweils über die GAPDH-Expression normiert.

Abbildung 37 zeigt, dass es bereits durch einmalige Gabe von WY-14,643 zu einer 7-fach gesteigerten Expression der peroxisomalen Acyl-CoA-Oxidase kommt. Nach drei zusätzlichen Behandlungstagen kommt es zu einer weiteren leichten Erhöhung der Genexpression.

5.2.5 Einfluss von WY-14,643 auf die Hintergrundspiegel Fpg-sensitiver Modifikationen in Wildtyp und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Wildtyp- und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäuse stark auf eine Behandlung mit WY-14,643 ansprechen, sollte untersucht werden, ob der PP einen Einfluss auf die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen in den Lebern dieser Mäuse hat. Dazu wurden primäre Hepatozyten mittels einer Kollagenase-Perfusionstechnik (vgl. 4.2.2.3) aus behandelten und unbehandelten 5 Monate alten Tieren gewonnen und oxidative DNA-Schäden mittels Alkalischer Elution quantifiziert (vgl. 4.2.3). Die Ergebnisse sind in Abbildung 38 zusammengefasst.

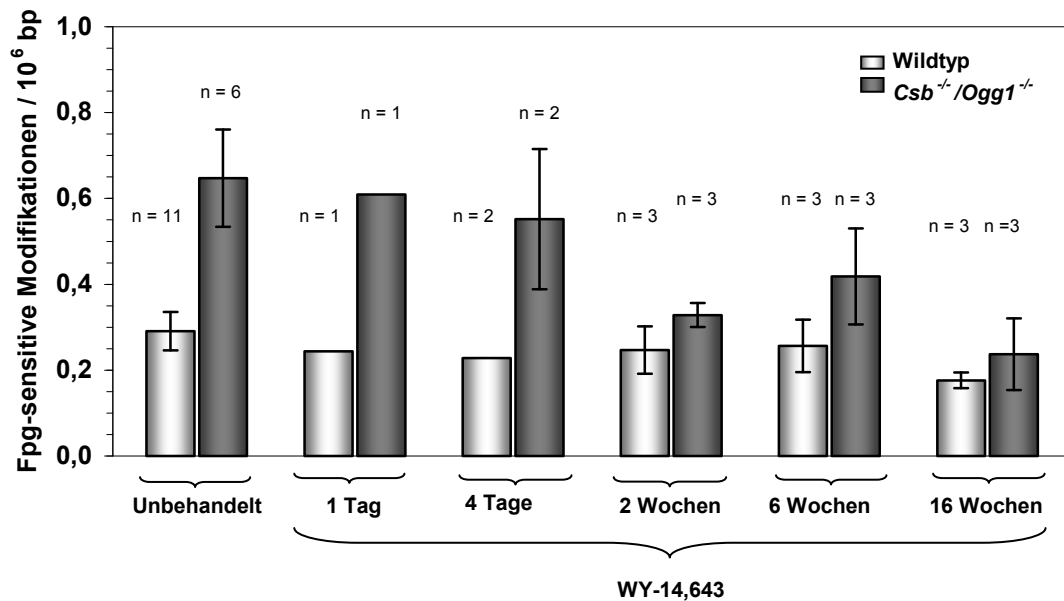


Abbildung 38: Einfluss einer WY-14,643 Behandlung auf die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen in Lebern von Wildtyp- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen. Die Substanz wurde in einer Konzentration von 0,025% dem Haltungsfutter beigemischt und für 2 bis 16 Wochen den Mäusen *ad libitum* verabreicht. Für kürzere Zeitpunkte (1 und 4 Tage) wurde den Mäusen WY-14,643 (100 mg/kg Körpergewicht) per Schlundsonde verabreicht. Die Anzahl der durchgeführten Versuche pro Zeitpunkt ist über dem jeweiligen Balken angegeben.

Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass es vor der Behandlung einen deutlichen Unterschied in den Hintergrundspiegeln oxidativer DNA-Schäden zwischen unbehandelten Wildtyp- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen gibt. Dieser Unterschied ist, wie bereits erwähnt (vgl. 2.4.6.1), auf das defekte *Csb*- und *Ogg1*-Gen zurückzuführen.

Vergleicht man behandelte Wildtyp-Mäuse mit den unbehandelten Wildtyp-Mäusen, so erkennt man, dass es überraschenderweise nicht zu einem Anstieg oxidativer DNA-Schäden in den Lebern dieser Tiere kommt. Dagegen zeigte die Analyse der oxidativen DNA-Schäden in den Lebern der *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäuse weder einen Anstieg noch ein „Gleichbleiben“ der DNA-Schäden auf einem Niveau wie im Fall der Wildtyp-Mäuse, sondern vielmehr ein von der Behandlungsdauer abhängiges Absinken der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden.

5.2.6 Einfluss von WY-14,643 auf die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden in mitochondrialer DNA

Neben einer Beeinflussung der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden in nukleärer DNA durch den PP WY-14,643 sollte ebenfalls untersucht werden, ob es zu einer Veränderung der basalen Spiegel oxidativer DNA-Modifikationen in mtDNA kommt. Dazu wurden *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäuse für vier bzw. sechs Wochen mit WY-14,643 behandelt (vgl. 4.2.2.5), die Lebern entnommen (vgl. 4.2.2.7) und mitochondriale DNA isoliert (vgl. 4.2.6.3), um darin DNA-Einzelstrangbrüche sowie Fpg-sensitive Modifikationen mit einem DNA-Relaxationsassay zu bestimmen (vgl. 4.2.6 und 5.1.1) (Abbildung 39).

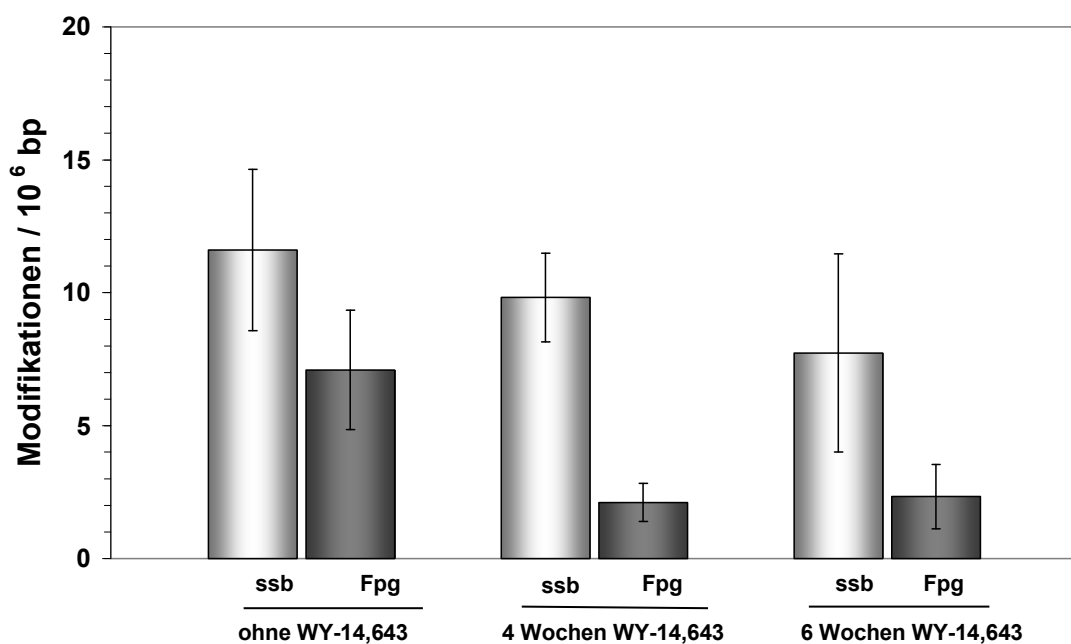


Abbildung 39: Einfluss von WY-14,643 auf Einzelstrangbrüche (ssb) und oxidative DNA-Schäden (Fpg) in mitochondrialer DNA von *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen. Die Behandlung der Mäuse erfolgte für 4 bzw. 6 Wochen mit 0,025% WY-14,643 *ad libitum* (n=2-11).

Die Behandlung von *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen mit WY-14,643 hat keine signifikante Veränderung der Spiegel an DNA-Einzelstrangbrüchen zur Folge. Interessanterweise kommt es jedoch in der mtDNA aller behandelten Tiere zu einem signifikanten Absinken ($p < 0,05$) der Fpg-sensitiven Modifikationen, ähnlich wie für die nukleäre DNA beobachtet (vgl. 5.2.5).

5.2.7 Einfluss von WY-14,643 auf die Mutationsfrequenz in Wildtyp- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen

Nachdem die Spiegel oxidativer DNA-Modifikationen sowohl in der nukleären als auch in der mitochondrialen DNA unter Behandlung mit WY-14,643 abfallen, war es interessant zu untersuchen, wie sich die Spiegel spontaner Mutationen in nukleärer DNA unter den selben Bedingungen verändern.

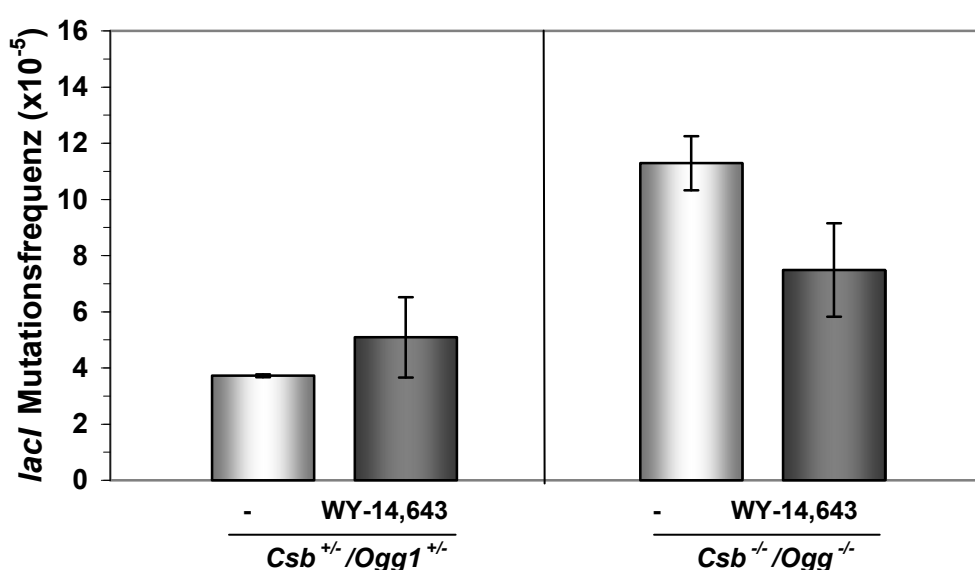


Abbildung 40: Einfluss einer WY-14,643 Behandlung auf die Mutationsfrequenz im *lacI*-Gen von Wildtyp- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen. Pro Genotyp wurden 2 Lebern untersucht. DNA wurde, wie in Kapitel 4.2.5.2 beschrieben, isoliert und durch mehrere „Verpackungsreaktionen“ in Phagen eingeschleust (vgl. 4.2.5.3). Ein Teil der untersuchten Genotypen wurde für drei Wochen mit 0,025% WY-14,643 *ad libitum* gefüttert. Zur Generierung der Tiere vgl. Kapitel 4.2.2.1 und 5.5.1.

Die Mutationsfrequenzen im *lacI*-Gen von unbehandelten und WY-14,643 behandelten Kontroll- (*Csb*^{+/+}/*Ogg1*^{+/+}) und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen sind in Abbildung 40 dargestellt. Man erkennt zunächst, dass in den Lebern der Doppel-*knockout*-Tiere eine deutlich erhöhte Mutationsfrequenz zu finden ist (vgl. 5.5.2). Die Behandlung der Kontrolltiere mit dem PP WY-14,643 führt nicht zu einer signifikanten Veränderung der Mutationsfrequenz. In den Lebern der

Csb^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäuse führt die Behandlung überraschenderweise zu einer Abnahme der Mutationsfrequenz.

5.3 Einfluss eines defekten Cockayne Syndrom B Proteins auf Reparatur und Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden in humanen Zellen

Wie bereits in Kapitel 2.4.6.1 beschrieben, ist die genaue Rolle des Cockayne Syndrom B Proteins bei der Reparatur oxidativer DNA-Schäden noch weitgehend ungeklärt.

In einer früheren Arbeit konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass ein Ausfall des kompletter Ausfall CSB-Proteins zu einer verlangsamten Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen in *Csb*^{-/-}-Mausembryofibroblasten führt (Osterod et al., 2002). Durch Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von K. Tanaka (Osaka) ergab sich die Möglichkeit zu prüfen, ob auch humane Mutationen mit einem ähnlichen Defekt verbunden sind. *Tanaka et al.* konnte bei einem Patienten, der unter einem UV-Syndrom leidet, ein mutiertes CSB-Gen identifizieren, welches für ein verkürztes CSB-Protein kodiert (Horibata et al., 2004). Deshalb wurden Reparaturkinetiken und Hintergrundspiegel Fpg-sensitiver Modifikationen in der humanen Zelllinie UV^S1KOSV (mutiertes CSB Gen) und der Kontroll-CSB-Zelllinie HA-CSB/UV^S1KOSV (UV^S1KOSV stabil transfiziert mit humaner cDNA für CSB) mit Hilfe der Alkalischen Elution bestimmt.

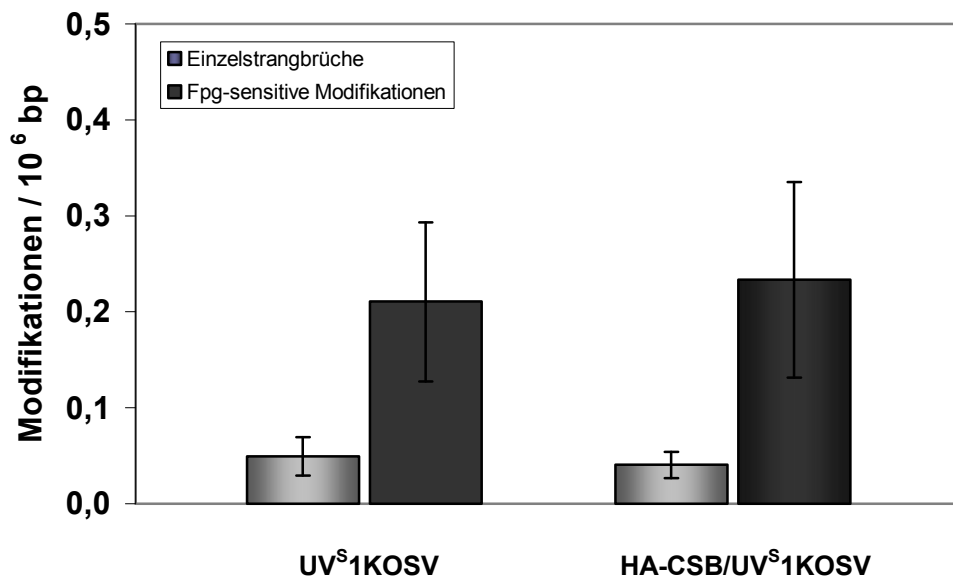


Abbildung 41: Hintergrundspiegel der Einzelstrangbrüche und Fpg-sensitiven Modifikationen in der menschlichen Zelllinie UV^S1KOSV, die infolge einer Punktmutation ein verkürztes CSB-Protein exprimiert. Die Kontrollzelllinie (HA-CSB/UV^S1KOSV) wurde mit der humanen cDNA für das CSB-Protein komplementiert (n=3).

Abbildung 41 zeigt die Hintergrundspiegel an DNA-Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Modifikationen in UV^S1KOSV Zellen und der entsprechenden Kontrollzelllinie (HA-CSB/UV^S1KOSV). Man erkennt, dass sich die beiden Zelllinien weder in den Hintergrundspiegeln an DNA-Einzelstrangbrüchen noch in den Hintergrundspiegeln an oxidativen DNA-Modifikationen unterscheiden.

Zur Bestimmung der Reparaturkinetiken wurden mit dem Photosensibilisator Ro 19-8022 und sichtbarem Licht oxidative DNA-Schäden in beiden Zelllinien induziert (vgl. 4.2.3.6). Da bekannt war, dass die beiden Zelllinien unterschiedlich auf eine Bestrahlung mit UV-Licht reagieren, wurde zunächst untersucht, ob die Expression eines mutierten CSB- im Vergleich zum Wildtyp-CSB-Protein einen Einfluss auf das Ausmaß des induzierten DNA-Schadens hat. In der folgenden Abbildung (Abbildung 42) ist die Anzahl der Fpg-sensitiven Basenmodifikationen dargestellt, die auf das schädigende Agens zurückzuführen sind.

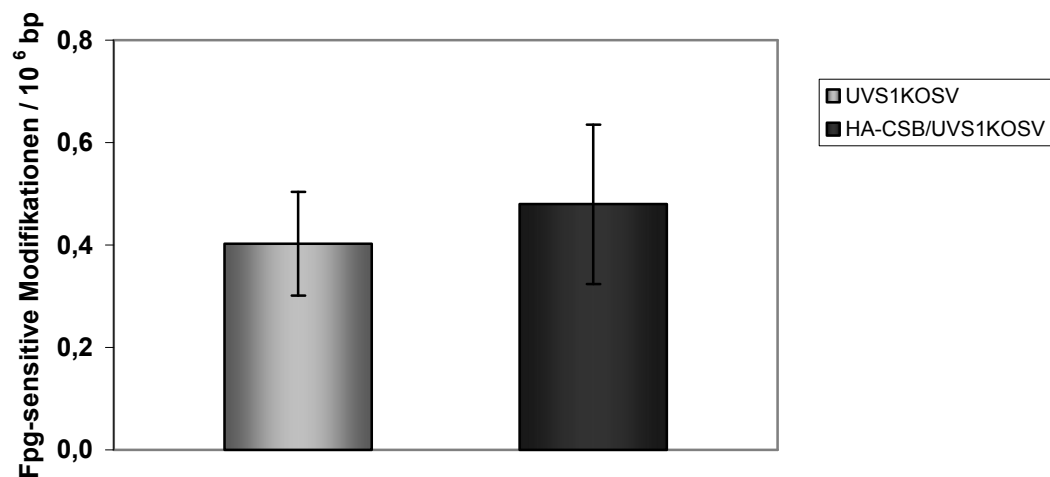


Abbildung 42: Induktion Fpg-sensitiver oxidativer DNA-Modifikationen in UV^S1KOSV- und HA-CSB/UV^S1KOSV-Zellen durch den Photosensibilisator Ro 19-8022 (50 nM) und sichtbares Licht (166 kJ/m²). Die Bestrahlung mit einer 1000 W-Halogenlampe wurde wie in Kapitel 4.2.3.6 beschrieben durchgeführt (n=3).

Die durch Ro 19-8022 in Gegenwart von sichtbarem Licht induzierten DNA-Schäden unterscheiden sich, wie in Abbildung 42 dargestellt, nicht signifikant in UV^S1KOSV- und HA-CSB/UV^S1KOSV-Zellen. Bei der Schädigung wurden überwiegend Fpg-sensitive Basenmodifikationen und nur wenige DNA-Einzelstrangbrüche generiert (Daten nicht gezeigt).

Zur Untersuchung, ob ein verkürztes CSB-Protein zu einer veränderten Reparatur von oxidativen DNA-Schäden führt, wurden Reparaturkinetiken für beide Zelllinien bestimmt (Abbildung 43). Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 4.2.3.6 beschrieben.

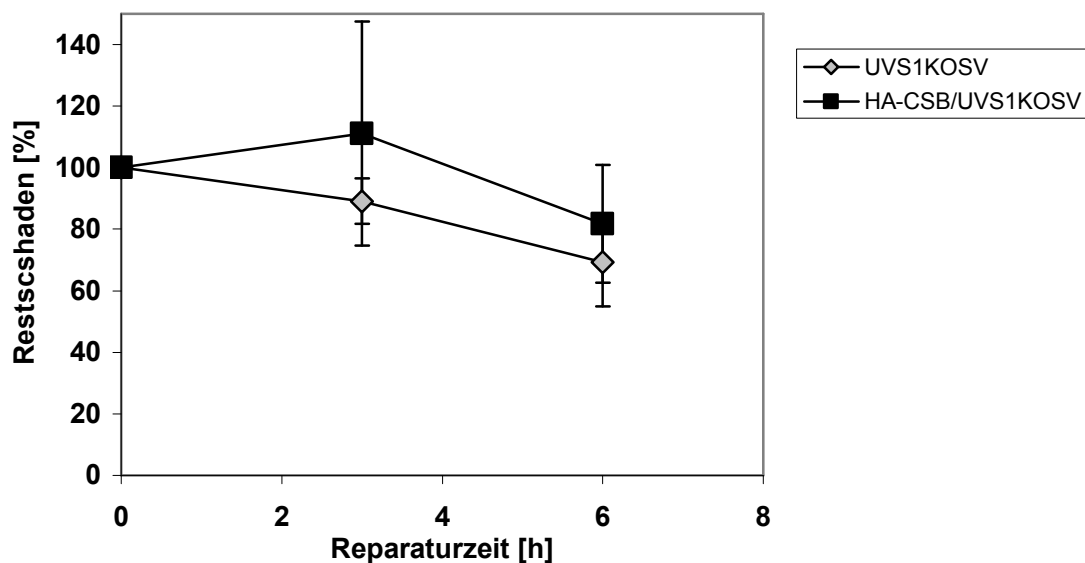


Abbildung 43: Reparatur Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen in der menschlichen Zelllinie UVS1KOSV, die infolge einer Punktmutation ein verkürztes CSB-Protein exprimiert. Die Kontrollzelllinie (HA-CSB/UVS^S1KOSV) wurde mit der humanen cDNA für das CSB-Protein komplementiert (n=3).

Wie Abbildung 43 zeigt, gab es nach 3 und 6 Stunden keinen Unterschied in der Reparatur oxidativer DNA-Schäden zwischen der Zelllinie UV^S1KOSV, die nur das verkürzte CSB-Protein exprimiert und der entsprechend korrigierten Kontrollzelllinie HA-CSB/UV^S1KOSV. Beide Zelllinien reparieren innerhalb von 6 Stunden ungefähr 20% des induzierten Schadens.

5.4 Einfluss der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 auf die Reparatur oxidativer DNA-Schäden

Wie in Kapitel 2.4.2.1 beschrieben, scheint es bei der Reparatur oxidativer DNA-Schäden ein *back-up* System zu geben, das einen Ausfall des OGG1-Proteins kompensieren kann (Osterod et al., 2002). Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass neben dem Cockayne Syndrom B Protein (CSB) auch die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP1) eine wichtige Rolle bei diesem Reparaturweg spielt (Flohr et al., 2003).

Während der praktischen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation gelang A. Klungland und Mitarbeitern die Herstellung von *Parp1*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Doppel-*knockout*-Mäusen. Durch die Bereitstellung dieser Tiere, den entsprechenden Kontrollen und daraus etablierter Zelllinien, wurde die Beantwortung der Fragestellung ermöglicht, welche Rolle ein kombinierter Ausfall des PARP1- und OGG1-Proteins bei der Reparatur oxidativer DNA-Schäden im gesamten Genom spielt.

5.4.1 Auswirkungen des PARP1-Ausfalls sowie eines kombinierten OGG1/PARP1-Ausfalls auf die Hintergrundspiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen und DNA-Einzelstrangbrüche in primären Maushepatozyten

Zunächst wurden primäre Hepatozyten durch Leberperfusion aus Wildtyp-, *Parp1*^{-/-}- und *Parp1*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen isoliert (vgl. 4.2.2.3) und DNA-Modifikationen mit Hilfe der Alkalischen Elution (vgl. 4.2.3) bestimmt. In Abbildung 44 sind die Hintergrundspiegel Fpg-sensitiver Modifikationen von Wildtyp-, *Ogg1*^{-/-}-, *Parp1*^{-/-}- und *Ogg1*^{-/-}/*Parp1*^{-/-}-Mäusen gegen das Alter der untersuchten Tiere aufgetragen.

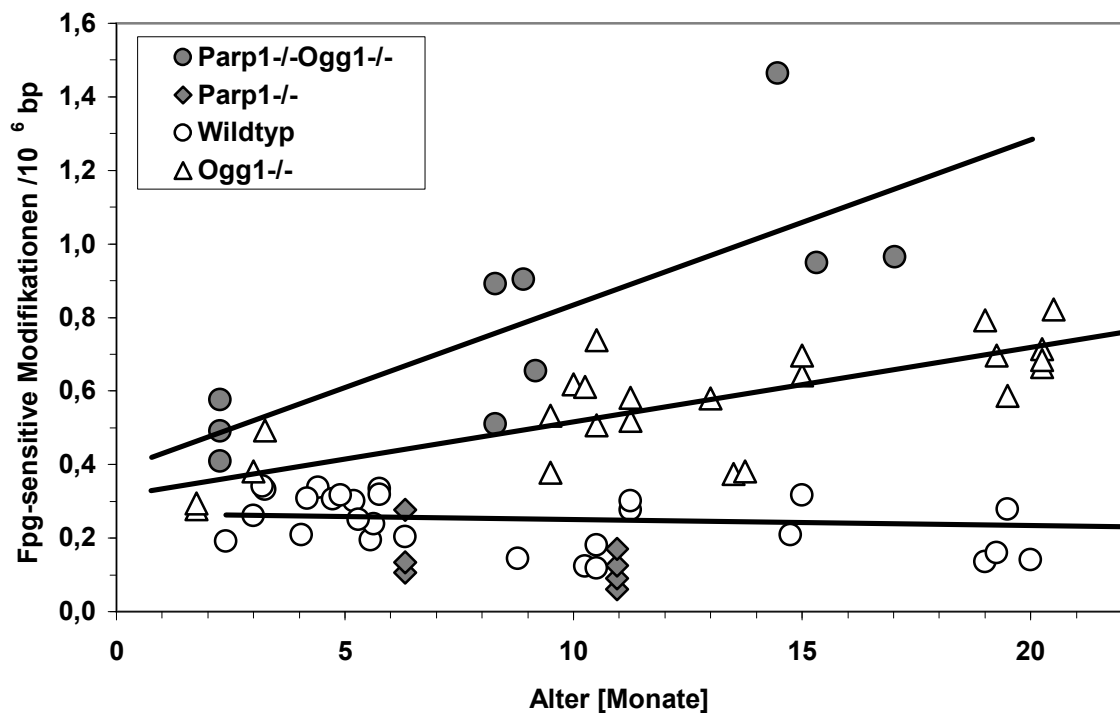


Abbildung 44: Altersabhängigkeit der Hintergrundspiegel Fpg-sensitiver DNA-Modifikationen in frisch isolierten und unbehandelten Hepatozyten von Wildtyp-, *Ogg1*^{-/-}-, *Parp1*^{-/-}- und *Ogg1*^{-/-}/*Parp1*^{-/-}-Mäusen im Alter von 2 bis 21 Monaten. Jeder der Punkte repräsentiert eine untersuchte Maus. Die Trendlinien beruhen auf einer linearen Regression des jeweiligen Genotyps. Daten für *Ogg1*^{-/-}- und teilweise für Wildtyp-Mäuse sind der Dissertation von M. Osterod entnommen (Osterod, 2002).

Wie bereits beschrieben (Osterod et al., 2001), kommt es in *Ogg1*^{-/-}-Mäusen zu einer altersabhängigen Akkumulation oxidativer DNA-Schäden. Die Ergebnisse zeigen, dass der zusätzliche Ausfall des *Parp1*-Gens in *Parp1*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen zu einer deutlichen Verstärkung dieses altersabhängigen Anstiegs führt. Demgegenüber sind die Hintergrundspiegel in *Parp1*^{-/-}-Mäusen genauso hoch wie in den Wildtyp-Mäusen und akkumulieren nicht mit zunehmendem Alter.

Da bekannt ist, dass die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 an DNA-Einzelstrangbrüche binden kann und wichtige Funktionen bei deren Reparatur übernimmt (2.4.6.2), sollte auch untersucht werden, welchen Einfluss ein Fehlen dieses Enzyms auf die Hintergrundspiegel an DNA-Einzelstrangbrüchen hat.

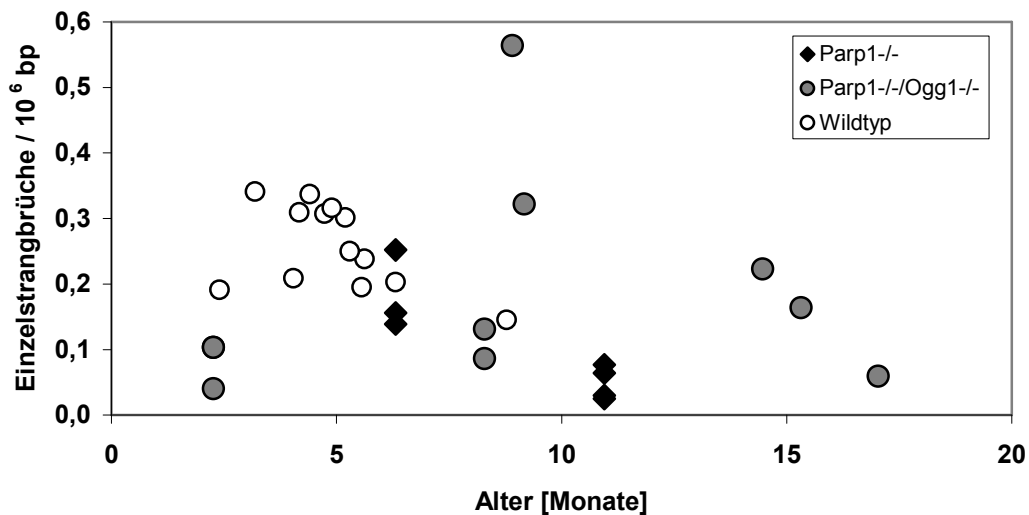


Abbildung 45: Hintergrundspiegel von DNA-Einzelstrangbrüchen in frisch isolierten Hepatozyten von Wildtyp-, *Parp1*^{-/-}- und *Ogg1*^{-/-}/*Parp1*^{-/-}-Mäusen im Alter von 2 bis 17 Monaten. Jeder der Punkte repräsentiert eine untersuchte Maus.

Aus Abbildung 45 ist zu erkennen, dass die in den Mäusehepatozyten bestimmte Anzahl an DNA-Einzelstrangbrüchen stark variiert und in einem Bereich zwischen 0,02 und 0,58 Strangbrüchen pro 10^6 bp liegt. Dabei zeigt die DNA der Hepatozyten aus *Parp1*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen keine höheren Spiegel an DNA-Einzelstrangbrüchen auf als die DNA von *Parp1*^{-/-}- oder Wildtyp-Mäusen. Es ist keine altersabhängige Akkumulation der Einzelstrangbrüche erkennbar. Vielmehr zeigte sich ein anderer Parameter für die Hintergrundspiegel an DNA-Einzelstrangbrüchen von größerem Einfluss als das Alter, nämlich die Vitalität der isolierten Zellen. Abbildung 46 zeigt die Vitalität frisch isolierter Hepatozyten (bestimmt über Trypanblau-Ausschluß, vgl. 4.2.2.4) in Abhängigkeit von den DNA-Einzelstrangbrüchen. Man erkennt, dass die Zahl der Einzelstrangbrüche mit abnehmender Vitalität der Zellen zunimmt.

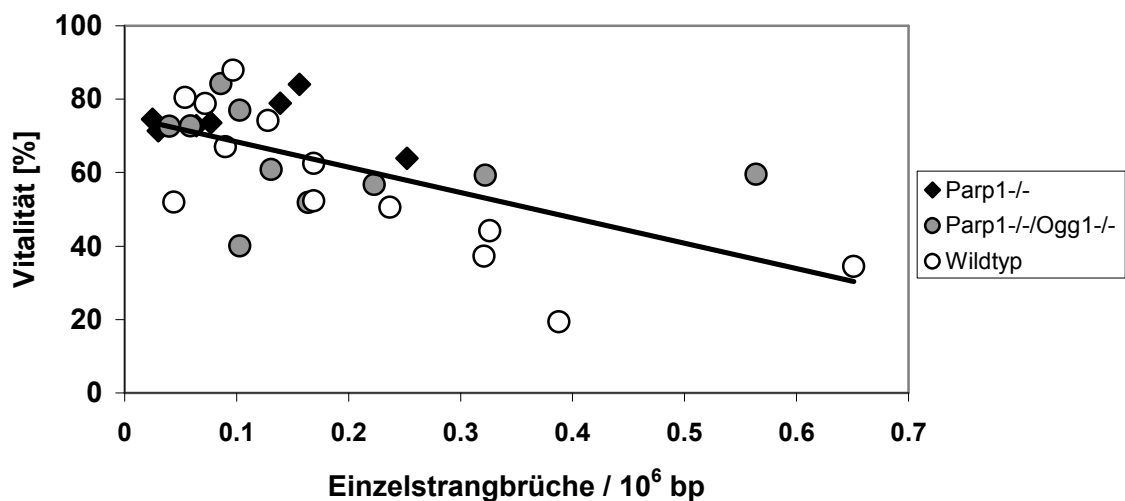


Abbildung 46: Abhängigkeit der Vitalität (bestimmt über Trypanblau-Ausschluß) frisch isolierter Hepatozyten von DNA-Einzelstrangbrüchen in Wildtyp-, *Parp1*^{-/-}- und *Parp1*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen. Jeder der Punkte repräsentiert eine untersuchte Maus. Die Trendlinie beruht auf einer linearen Regression aller untersuchter Genotypen.

Im Falle der Fpg-sensitiven Modifikationen wurde keine Abhängigkeit der gemessenen Werte von der Vitalität der isolierten Zellen beobachtet (Daten nicht gezeigt). Dies beweist, dass weder der altersabhängige Anstieg noch die interindividuelle Variation der Hintergrundspiegel Fpg-sensitiver Modifikationen Artefakte sind, die durch unterschiedlich starke Schädigung der Zellen während des Isolierungsprozesses entstanden. Andererseits zeigen die Ergebnisse aber auch, dass die mittels Alkalischer Elution gefundenen Einzelstrangbrüche in primären Hepatozyten wohl (teilweise) Artefakte darstellen, die durch Zelltod während der Aufarbeitung entstehen.

5.4.2 Auswirkung eines PARP1 und eines kombinierten PARP1/OGG1-Ausfalls auf die Mikrokernrate in peripheren Mauserythrozyten

Da die Analyse der DNA-Einzelstrangbrüche mit Hilfe der Alkalischen Elution keine brauchbare Ergebnisse lieferte (vgl. 5.4.1), sollte ein mögliche genomische Instabilität eines PARP1 und kombinierten PARP1/OGG1-Ausfalls in Mäusen mit Hilfe eines Mikrokerntests (vgl. 4.2.2.10) untersucht werden. Dazu wurde den

verschiedenen Genotypen Blutproben entnommen (vgl. 4.2.2.7), Blutpräparate angefertigt und Mikrokerne in Erythrozyten des Bluts bestimmt (vgl. 4.2.2.10) (Abbildung 47).

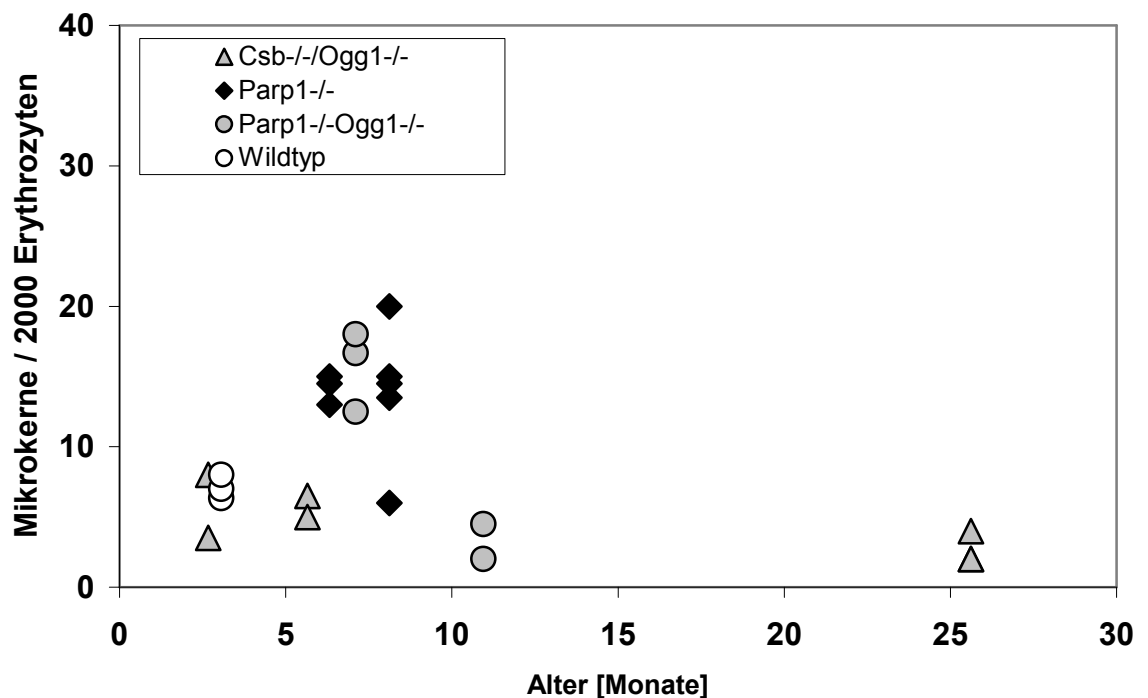


Abbildung 47: Anzahl der Mikrokerne pro 2000 Erythrozyten im Blut von Wildtyp-, *Parp1*^{-/-}-, *Parp1*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen. Für jedes Tier wurden, wie in Kapitel 4.2.2.10 beschrieben, 3–5 Blutpräparate erstellt und jeweils 2000 Erythrozyten ausgezählt. Jeder Punkt repräsentiert ein untersuchtes Tier.

Man erkennt, dass die untersuchten Wildtyp-Mäuse durchschnittlich 8 Mikrokerne pro 2000 Erythrozyten tragen. Im Vergleich dazu ist die Mikrokernrate in den *Parp1*^{-/-}-Mäusen moderat, aber nicht signifikant, erhöht. Ein zusätzliches Ausschalten des *Ogg1*^{-/-}-Gens führt nicht zu einer weiteren Steigerung der Mikrokernrate in den untersuchten Tieren.

Zur weiteren Klärung der Frage, ob oxidative DNA-Schäden zu einer erhöhten Mikrokernrate in *Parp1*^{-/-}- und *Parp1*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen beitragen, wurden auch Mikrokerne in *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen untersucht. Diese Tiere zeigen trotz stark erhöhter Hintergrundspiegel an oxidativen DNA-Schäden (in der Leber) (Osterod et al., 2002) im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren altersabhängig keine erhöhten Mikrokernraten.

5.5 Untersuchungen zur Mutagenität von oxidativen DNA-Schäden (8-oxoG) *in vivo*

Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden wie 8-oxoG können wie beschrieben, in allen Zellen in unterschiedlichem Ausmaß beobachtet werden. Diese Hintergrundspiegel werden einerseits beeinflusst durch eine ständige Bildung aus reaktiven Sauerstoffspezies und andererseits durch eine effektive Reparatur (vgl. 2.4.2). Es wurde immer wieder vermutet, dass 8-oxoG eine wichtige Rolle bei der Initiation der Kanzerogenese spielt. Experimentelle Beweise für diese Theorie können durch eine Modulation der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden erhalten werden, indem man die Hintergrundspiegel durch Prooxidantien erhöht oder durch Antioxidantien erniedrigt und die daraus resultierenden Ereignisse bezüglich Mutationsfrequenz und Krebsinzidenz studiert.

Ein gänzlich neuer Ansatz zur Lösung dieser Frage wurde geschaffen durch die Generierung von *knockout*-Mäusen, die defekte DNA-Reparaturgene tragen. Es konnte gezeigt werden, dass diese *Ogg1*^{-/-}, *Csb*^{-/-} und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäuse unterschiedlich hohe Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden in der Leber besitzen (Osterod et al., 2001; Osterod et al., 2002). Es lag daher nahe, in diesen Mäusen die spontanen Mutationsfrequenzen zu bestimmen. Dies sollte mit Hilfe eines transgenen BigBlue[®]-Mutations-Assay untersucht werden (vgl. 4.1.10.8).

5.5.1 Generierung transgener reparaturdefizienter Mäuse

Durch verschiedene Kreuzungsschritte wurden, wie in Kapitel 4.2.2.1 beschrieben, diverse BigBlue[®]-Mausgenotypen generiert und mittels allelspezifischer PCR genotypisiert (vgl. 4.2.2.2). Ziel dabei war es, für alle vier möglichen Genotypkombinationen *lacI*-positive und damit für die Mutationsanalyse geeignete Mäuse zu identifizieren.

Abbildung 48 zeigt, dass 41% aller genotypisierten Mäuse des 2. Zuchtschritts (vgl. 4.2.2.1) das *lacI*-Gen getragen haben.

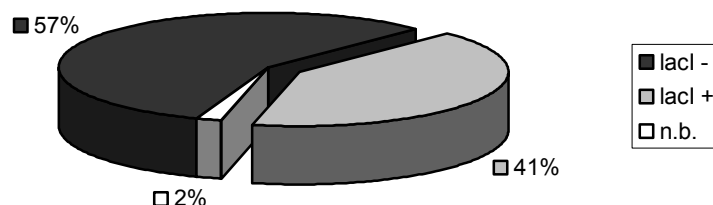


Abbildung 48: Übersicht über die prozentuale Verteilung des *lacI*-, *Csb*- und *Ogg1*-Genotyps in untersuchten Mäusen, die durch Kreuzung von *Csb*^{+/-}/*Ogg1*^{+/-}*Blue*^{+/-} mit *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Tieren (2. Zuchtschritt, vgl. 4.2.2.1) generiert wurden. *lacI*⁻ = Mäuse tragen nicht den λLIZ shuttle vector; *lacI*⁺ = Mäuse tragen den λLIZ shuttle vector; n.b. = nicht bestimmt.

Aus Abbildung 49 ist ersichtlich, dass in den untersuchten *lacI*⁺-Mäusen aus dem 2. Zuchtschritt (vgl. 4.2.2.1) alle möglichen *Csb*- und *Ogg1*-Genotypkombinationen zu ungefähr gleichen Teilen auftreten.

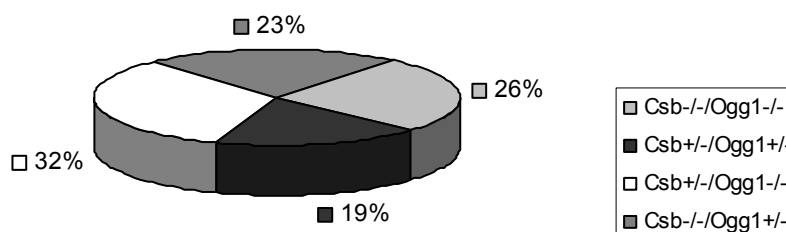


Abbildung 49: Übersicht über die prozentuale Verteilung der verschiedenen *Csb*^{-/-}- und *Ogg1*^{-/-}-Genotypen in *lacI*⁺-Mäusen. Die untersuchten Tiere wurden durch Kreuzung von *Csb*^{+/-}/*Ogg1*^{+/-}*Blue*^{+/-} mit *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Tieren (2. Zuchtschritt, vgl. 4.2.2.1) generiert.

Auch eine Analyse der Geschlechterverteilung ergibt, dass ähnlich viele weibliche wie männliche Tiere geboren wurden (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse demonstrieren, dass durch Verpaarung transgener BigBlue[®]-Mäuse mit *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen, die gewünschten transgenen *knockout*-Genotypen den Mendelschen Gesetzen entsprechend generiert werden konnten. Es erfolgte also keine Selektion über den Phänotyp.

5.5.2 Spontane Mutationsfrequenzen in Lebern transgener *knockout*-Mäuse

Zur Bestimmung der spontanen Mutationsfrequenzen in der Leber wurde aus je zwei Tieren je untersuchtem Genotyp im Alter von 5 Monaten die Lebern entnommen (vgl. 4.2.2.7). Die Bestimmung der Mutationsfrequenzen erfolgte wie in Punkt 4.2.5 beschrieben. Typischerweise wurden pro Versuch bis zu 30000 Plaque bildende Einheiten (*pfu*) ausplattiert.

Um sicherzustellen, dass die Screeningversuche unter optimalen Bedingungen ablaufen, wurden bei jedem Versuch so genannte *Color-Mutant-Plaques* (Farbkontrollen CM0 und CM1, teilweise auch CM2 und CM3) ausplattiert. Diese Farbkontrollen besitzen unterschiedliche Mutationen im *lacI*-Gen, die auf X-Gal haltigem Agar zu unterschiedlichen Farbintensitäten führen. Typischerweise waren stets zwischen 15 und 25 mutierte Plaques je Farbkontrollplatte zu finden (Daten nicht gezeigt). Dies entspricht den Vorgaben des Herstellers und ist somit eine Bestätigung für die Qualität der durchgeführten Analysen.

Um sicherzustellen, dass alle X-Gal-positiven Plaques ein mutiertes *lacI*-Gen tragen und um eine Aussage über die vorliegenden Mutationen treffen zu können, wurden alle mutierten Plaques weiter charakterisiert, indem das *lacI*-Gen mittels PCR amplifiziert (vgl. 4.2.5.7) und anschließend sequenziert wurde.

Die Art der gefundenen Mutation und die daraus resultierende Veränderung der Proteinsequenz sind für *Csb*^{+/-}/*Ogg1*^{+/-}-, *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{+/-}-, *Csb*^{+/-}/*Ogg1*^{-/-}- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäuse in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: Spontane Mutationen im *lacI*-Gen von *Csb^{+/-}/Ogg1^{+/-}*-, *Csb^{-/-}/Ogg1^{+/-}*-, *Csb^{+/-}/Ogg1^{-/-}*- und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen. Jeder Abschnitt zeigt die Mutationen aus der Leber eines Tieres. *pfu* = plaque forming units; CpG = Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-Inseln; wt aa = Wildtyp Aminosäure; mut aa = mutierte Aminosäure.

Csb^{+/-}/Ogg1^{+/-}

	<i>pfu</i>	Mutationen	Mut.freq. (x10⁻⁵)	GC zu TA (x10⁻⁵)
Maus 1:	147.000	5	3,4	0 (0,0)
Maus 2:	175.000	7	4,0	1 (0,6)

Basen Nr.	Sequenz (5'-3')		CpG	wt aa	mut aa
Maus 1:					
56	GCA	→ ACA	+	Ala	Thr
180	CGC	→ CAC	+	Arg	His
269	GCG	→ ACG	+	Ala	Thr
357	GCG	→ GTG	+	Ala	Val
366	AAT	→ ATT		Asn	Ile
Maus 2:					
131	CGG	→ TGG	+	Arg	Trp
158	GCG GAG	→ GCG AGC		-1 Deletion	
168	TAC	→ TCC		Tyr	Ser
178	AAC	→ AAA		Asn	Lys
768	GAT	→ GGT		Asp	Gly
833	TCG	→ CCG		Ser	Pro
882	CCG	→ CTG	+	Pro	Leu

Csb^{-/-}/Ogg1^{+/-}

	<i>pfu</i>	Mutationen	Mut.freq. (x10⁻⁵)	G:C zu T:A (x10⁻⁵)
Maus 1:	152.000	8	5,3	1 (0,7)
Maus 2:	230.000	12	5,2	4 (1,7)

Basen Nr..	Sequenz (5'-3')		CpG	wt aa	mut aa
Maus 1:					
33	AAA	→ ACA		Lys	Thr
56	GCA	→ CCA		Ala	Pro
56	GCA	→ ACA	+	Ala	Thr
131	CGG	→ TGG	+	Arg	Trp
131	CGG	→ TGG	+	Arg	Trp
270	GCG	→ GTG	+	Ala	Val
311	GTG	→ TTG		Val	Leu
777	GCG	→ GTG		Ala	Val
Maus 2:					
56	GCA	→ ACA	+	Ala	Thr
221	GGC	→ TGC		Gly	Cys
222	GGC	→ GCC		Gly	Ala
250	CAC	→ CAA		His	Gln
253	GCG CCG	→ GCC CGT		-1 Deletion	
258	TCG	→ TAG		Ser	STOP
308	GTG	→ ATG	+	Val	Met
329	CGA	→ TGA	+	Arg	STOP
329	CGA	→ TGA	+	Arg	STOP
632	CAT	→ CTG GCA		+4 Insertion	
803	GAG	→ TAG		Glu	STOP
882	CCG	→ CTG	+	Pro	Leu

Csb^{+/-}/Ogg1^{-/-}

	<i>pfu</i>	Mutationen	Mut.freq. (x10 ⁻⁵)	G:C zu T:A (x10 ⁻⁵)
Maus 1 :	135.000	12	8,9	3 (2,2)
Maus 2 :	137.000	09	6,6	3 (2,2)

Base pos.	Sequence (5'-3')	CpG	wt aa	mut aa
Maus 1:				
56	GCA	→ TCA	Ala	Ser
95	GTG	→ ATG	Val	Met
129	ACG	→ AAG	Thr	Lys
129	ACG	→ AAG	Thr	Lys
180	CGC	→ CAC	Arg	His
269	GCG	→ ACG	Ala	Thr
269	GCG	→ ACG	Ala	Thr
269	GCG	→ ACG	Ala	Thr
269	GCG	→ ACG	Ala	Thr
269	GCG	→ ACG	Ala	Thr
380	CGC	→ TGC	Arg	Cys
406	TAT CCG	→ TAT AAC TAT CCG	+ 6 Insertion	
Maus 2:				
56	GCA	→ ACA	Ala	Thr
86	GTT	→ TTT	Val	Phe
120	TCT	→ TTT	Ser	Phe
131	CGG	→ TGG	Arg	Trp
169	TAC	→ TAA	Tyr	STOP
381	CGC	→ CAC	Arg	His
381	CGC	→ CTC	Arg	Leu
633	TGG CAT	→ TGG CTG GCA	+4 Insertion	
954	Deletion / Translokation		Leserasterverschiebung	

Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}

	<i>pfu</i>	Mutationen	Mut.freq. (x10 ⁻⁵)	G:C zu T:A (x10 ⁻⁵)
Maus 1 :	164.000	22	13,4	7 (4,3)
Maus 2 :	140.000	15	10,7	3 (2,1)

Basen Nr. :	Sequenz (5'-3')	CpG	wt aa	mut aa
Maus 1:				
42	ACG	→ ATG	Thr	Met
86	GTT	→ TTT	Val	Phe
86	GTT	→ TTT	Val	Phe
90	TCC	→ TTC	Ser	Phe
95	GTG	→ CTG	Val	Leu
131	CGG	→ TGG	Arg	Trp
149	GCG GCG	→ GCG CGA	-1 Deletion	
196 – 282	Deletion		-87 Deletion	
196 – 282	Deletion		-87 Deletion	
285	CGC	→ CCC	Arg	Pro
380	CGC	→ AGC	Arg	Thr
381	CGC	→ CAC	Arg	His
454	AAT GTT	→ AAG TTC	-1 Deletion	
518	GAA	→ TAA	Glu	STOP
558	TTG	→ TAG	Leu	STOP
561	GGT	→ GTT	Gly	Val
633	CAT	→ CTG GCA	+4 Insertion	
710	CAA	→ TAA	Gln	STOP
747	ACT	→ ATT	Thr	Ile

750	GCG	→ GAG		Ala	Glu
791	CGC	→ TGC	+	Arg	Cys
928	AGC	→ AGA		Ser	Arg
Maus 2:					
- 12	GCA	→ GAA		Ala	Glu
42	ACG	→ ATG	+	Thr	Met
56	GCA	→ ACA	+	Ala	Thr
56	GCA	→ ACA	+	Ala	Thr
108	GCC	→ GAC		Ala	Asp
139	AAA GTG	→ AAG TGG		-1 Deletion	
239	CTG	→ CGT		Leu	Arg
260	CAA	→ GAA		Gln	Glu
530	CGA	→ TGA	+	Arg	STOP
530	CGA	→ TGA	+	Arg	STOP
530	CGA	→ TGA	+	Arg	STOP
530	CGA	→ TGA	+	Arg	STOP
530	CGA	→ TGA	+	Arg	STOP
554	GTC GCA	→ GTC		-3 Deletion	
588	GGC	→ TGC		Gly	Cys

Zur besseren Übersicht sind die verschiedenen Mutationstypen und -frequenzen nach Genotyp getrennt nochmals in Tabelle 10 bzw. Tabelle 9 zusammengefasst.

Tabelle 9: Durch Sequenzierung verifizierte Mutationen und Mutationsfrequenzen im *lacI*-Gen von verschiedener *Csb*- und *Ogg1*- Genotypen. Die Daten zeigen alle gefundenen Mutationen (total) und individuelle Mutationen (unabhängig). *pfu* = plaque-forming-units.

Genotyp	<i>pfu</i>	Mutanten		Mutationsfrequenz x10 ⁻⁵	
		total	unabhängig	total	unabhängig
<i>Csb</i> ^{+/-} / <i>Ogg1</i> ^{+/-}	322.000	12	12	3,7 ± 0,4	3,7 ± 0,4
<i>Csb</i> ^{-/-} / <i>Ogg1</i> ^{+/-}	382.000	20	18	5,2 ± 0,0	4,7 ± 0,1
<i>Csb</i> ^{+/-} / <i>Ogg1</i> ^{-/-}	272.000	21	16	7,7 ± 1,6	5,9 ± 1,0
<i>Csb</i> ^{-/-} / <i>Ogg1</i> ^{-/-}	304.000	37	30	12,2 ± 1,9	9,9 ± 3,6

Die absolute Mutationsfrequenz, die in den heterozygoten Kontrolltieren gefunden wurde ($3,7 \pm 0,4 \times 10^{-5}$), ist in guter Übereinstimmung mit früher berichteten Werten für homozygote (Wildtyp) BigBlue[®]-Mäuse (Young et al., 1995). In Übereinstimmung mit einer früheren Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass die Mutationsfrequenz in den *Ogg1*^{-/-}-Mäusen 2,1-fach ($p = 0.053$) erhöht ist (Klungland et al., 1999).

Die Erhöhung der Mutationsfrequenz war, verglichen mit den heterozygoten Kontrolltieren (*Csb*^{+/-}/*Ogg1*^{+/-}), noch höher in *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen (3,3-fach; $p < 0,005$), jedoch nur leicht und auch statistisch nicht signifikant erhöht in *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{+/-}-Mäusen (1,4-fach; $p = 0,380$). Vergleicht man *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäuse mit *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{+/-}-Mäusen, so ist auch hier ein signifikanter Anstieg der spontanen Mutationsfrequenz zu erkennen (2,4-fach; $p < 0,002$). Die spontane Mutationsfrequenz in den *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen war auch 1,6-fach erhöht im Vergleich zu *Csb*^{+/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen ($p = 0,11$). Der Unterschied in der Mutationsfrequenz in diesen beiden Stämmen wird noch deutlicher ($p = 0,04$), wenn G:C zu T:A Transitionen (die einer Deaminierung von Cytosin zugeschrieben werden) aus der Analyse ausgeschlossen werden (vgl. auch Tabelle 10).

Die molekulare Analyse der Mutationen erlaubt auch eine Aussage, wie viele unabhängige Mutationen im *lacI*-Gen der untersuchten Tiere zu finden und wie viele Mutationen möglicherweise auf eine klonale Expansion zurückzuführen sind. Es wird deutlich, dass mindestens 76% der gefundenen Mutationen unabhängig, d.h. nicht auf eine klonale Expansion zurückzuführen sind. Die gefundenen „unabhängigen“ Mutationen verteilen sich ähnlich auf die verschiedenen Genotypen wie die Gesamt-Mutationen.

Tabelle 10: Spektrum spontaner Mutationen im *lacI*-Gen diverser Mausgenotypen. Nr. = Anzahl der X-Gal positiven Plaques; MF = Mutationsfrequenz.

	<i>Csb</i> ^{+/-} / <i>Ogg1</i> ^{+/-} Nr. MF ($\times 10^{-5}$)		<i>Csb</i> ^{-/-} / <i>Ogg1</i> ^{+/-} Nr. MF ($\times 10^{-5}$)		<i>Csb</i> ^{+/-} / <i>Ogg1</i> ^{-/-} No. MF ($\times 10^{-5}$)		<i>Csb</i> ^{-/-} / <i>Ogg1</i> ^{-/-} No. MF ($\times 10^{-5}$)	
Transversionen								
G:C zu T:A	1	0,3	5	1,3	6	2,2	10	3,3
G:C zu C:G	0	0,0	2	0,5	0	0,0	3	1,0
A:T zu T:A	1	0,3	0	0,0	0	0,0	1	0,3
A:T zu C:G	1	0,3	1	0,3	0	0,0	0	0,0
Transitionen								
G:C zu A:T	6	1,9	10	2,6	12	4,4	15	4,9
A:T zu G:C	2	0,6	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Deletionen	1	0,3	1	0,3	1	0,4	6	2,0
Insertionen	0	0,0	1	0,3	2	0,7	1	0,3
Komplex	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	0,3
Total	12	3,7	20	5,2	21	7,7	37	12,2

Tabelle 10 zeigt unterschiedliche Mutationstypen in den verschiedenen Mausgenotypen. Es wird deutlich, dass das Mutationsspektrum in *Csb^{+/-}/Ogg1^{+/-}*-Mäusen vor allem durch G:C zu A:T Transitionen dominiert wird. Diese sind zu 100% an so genannten CpG-Inseln lokalisiert (vgl. Tabelle 8) und daher auf die spontane Desaminierung von Cytosin zurückzuführen. Alle sonstigen Mutationstypen, wie z.B. Transversionen, Deletionen und Insertionen sind vergleichsweise selten.

In den Lebern von *Csb^{+/-}/Ogg1^{+/-}*-Mäusen kommt es im Vergleich zu *Csb^{+/-}/Ogg1^{+/-}*-Mäusen zu einer 7,1-fachen Erhöhung der G:C zu T:A Transversionen, die typischerweise auf nicht repariertes 8-oxoG zurückzuführen sind und bereits früher beobachtet wurde (Klungland et al., 1999; Minowa et al., 2000). Außerdem ist eine leichte Zunahme der G:C zu A:T Transitionen zu verzeichnen, die auch in diesem Genotyp zu 100% an CpG-Inseln lokalisiert sind (vgl. Tabelle 9).

Schaltet man zusätzlich zum *Ogg1*- auch noch das *Csb*-Gen aus, so kommt es zu einem weiteren, im Vergleich zu den heterozygoten Kontrolltieren, hochsignifikanten 10,6-fachen Anstieg ($p = 0,005$) der G:C zu T:A Transversionen. Vergleicht man die *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-*knockout*-Tiere mit den anderen untersuchten Genotypen, so sieht man interessanterweise nur in den *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen eine Erhöhung von Deletionen, die mit 16% zur Gesamtmutationsfrequenz beitragen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass OGG1 alleine und in Kombination mit CSB vor allem zur Verhinderung von G:C zu T:A Transversionen beiträgt, wohingegen ein alleiniger Ausfall von CSB nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Mutationsfrequenz führt.

5.5.3 Spontane Mutationsfrequenzen in Lungen transgener *knockout*-Mäuse

Untersuchungen der 8-oxoG:C Glycosylaseaktivität in humanen Lymphozyten haben gezeigt, dass eine verminderte Glykosylaseaktivität möglicherweise mit einem erhöhten Risiko an Lungenkrebs zu erkranken assoziiert ist (Paz-Elizur et al., 2003). Außerdem wurde berichtet, dass *Ogg1^{-/-}*-Mäuse ein erhöhtes Risiko haben an Lungentumoren zu erkranken (Sakumi et al., 2003). Deshalb sollte

untersucht werden, ob in *Ogg1*^{-/-}- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen die spontane Mutationsfrequenz in Lungengewebe im Vergleich zu Kontrolltieren erhöht ist.

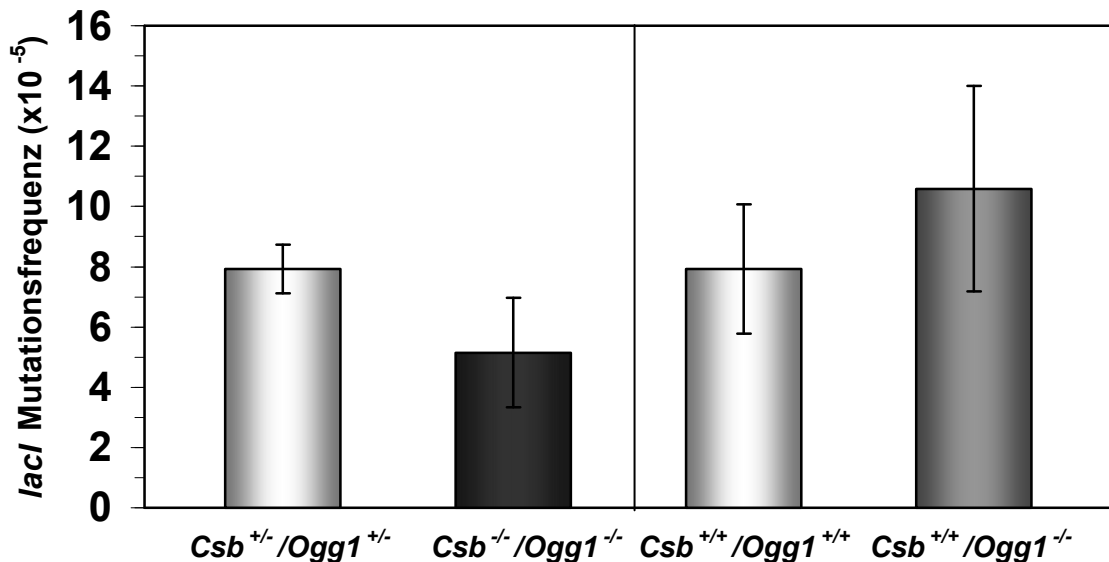


Abbildung 50: Spontane Mutationsfrequenz im *lacI*-Gen von Lungengewebe diverser BigBlue[®]-Genotypen. Pro Genotyp wurden 2 Lungen untersucht, DNA isoliert und durch mehrere „Verpackungsreaktionen“ in Phagen eingeschleust (vgl. 4.2.5.3). Die Mutationsfrequenz berechnete sich durch Division der X-Gal-positiven plaque forming units (*pfu*), durch die Anzahl der ausplattierten *pfu*. Je Genotyp wurden zwischen 180000 und 270000 *pfu* ausplattiert. Die beiden Genotypen im rechten Feld wurden von A. Klungland et al., Oslo, analysiert (persönliche Mitteilung).

Aus Abbildung 50 ist ersichtlich, dass *Ogg1*^{-/-}- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Kontrolltieren (*Csb*^{+/-}/*Ogg1*^{+/-} und *Csb*^{+/-}/*Ogg1*^{+/-}) keine signifikante Erhöhung der spontanen Mutationsfrequenzen in Lungengewebe zeigen.

5.6 Untersuchungen zum initiierenden Potential von 8-oxoG

Trotz der (stark) erhöhten Hintergrundspiegel an oxidativen DNA-Schäden und Mutationen (vgl. 5.5) in Lebern von *Ogg1*^{-/-} und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-} Mäusen, gibt es bislang keine Hinweise, dass die Lebertumorinzidenz in diesen Tieren gegenüber Kontrolltieren erhöht ist. Dies könnte zum einen darin begründet sein, dass der Hintergrundstamm der *knockout*-Mäuse (C57BL/6) nur eine geringe spontane Lebertumorinzidenz zeigt (Frith et al., 1983) und zum anderen das gehaltene Kollektiv an alten Tieren nicht ausreichen könnte, um aus epidemiologischer Sicht einen Anstieg der Tumorinzidenz in den *knockout*-Tieren erkennen zu können.

Zur Beantwortung der Frage, welchen Beitrag oxidative DNA-Schäden bei der Kanzerogenese spielen, sollten Wildtyp- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäuse mit dem Peroxisomenproliferator WY-14,643 als spezifischem Leberpromotor behandelt werden (vgl. 5.2), um initiierte Hepatozyten (vgl. 5.5.2), in Anlehnung an das *2-Stufen-Modell* der Kanzerogenese, zur Promotion anzuregen.

Als Endpunkt für die Analyse wurde das Auftreten präneoplastischer Läsionen gewählt, die als Vorstufen von malignen Entartungen angesehen werden können (Pitot, 1990). Diese wurden immunohistochemisch in Leberschnitten der beiden untersuchten Genotypen als so genannte Glucose-6-Phosphatase positive bzw. negative Läsionen nachgewiesen.

Um den idealen Zeitpunkt für die Analyse der präneoplastischen Läsionen zu finden, wurden je drei Tiere der untersuchten Gruppen nach 91, 176 und 211 Tagen getötet. Der Endpunkt der Studie wurde danach auf 250 Tage festgesetzt.

5.6.1 Einfluss von WY-14,643 auf das Körpergewicht von Wildtyp- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen

Zur Induktion der Leberproliferation wurde der Peroxisomenproliferator WY-14,643 in einer Konzentration von 0,025% *ad libitum* an die Versuchstiere verfüttert. Um toxische Effekte durch die Substanz ausschließen zu können, wurde das Körpergewicht der Versuchstiere überwacht (vgl. 4.2.2.6).

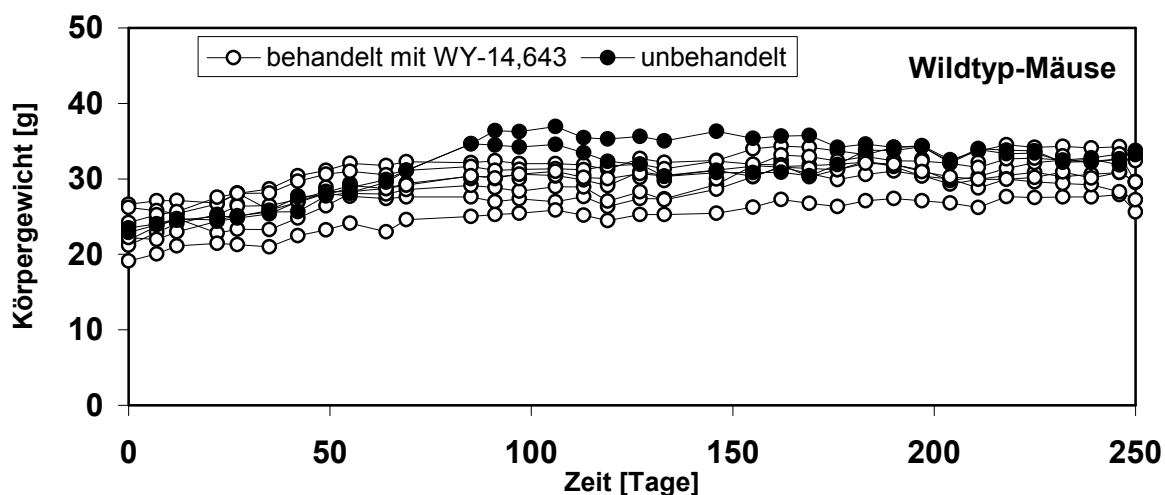


Abbildung 51: Abhängigkeit des Körpergewichts von einer WY-14,643 Behandlung in Wildtyp-Mäusen. Die Substanz wurde in einer Konzentration von 0,025% dem Haltungsfutter beigemischt und *ad libitum* verabreicht. Die Gewichtskontrolle der Tiere wurde wöchentlich durchgeführt. Es wurden insgesamt 8 Wildtyp-Tiere über einen Zeitraum von 250 Tagen gefüttert. Jeder Punkt entspricht einer Körpergewichtsbestimmung.

Vergleicht man unbehandelte mit WY-14,643 behandelten Wildtyp-Mäusen, so erkennt man, dass es unter der Behandlung, wie bereits in Kapitel 5.2.2 beschrieben, nicht zu signifikanten Körpergewichtsunterschieden kommt (Abbildung 51). Der Gewichtsverlauf der Tiere, die für die Voranalysen eingesetzt wurden, verlief ähnlich (Daten nicht gezeigt).

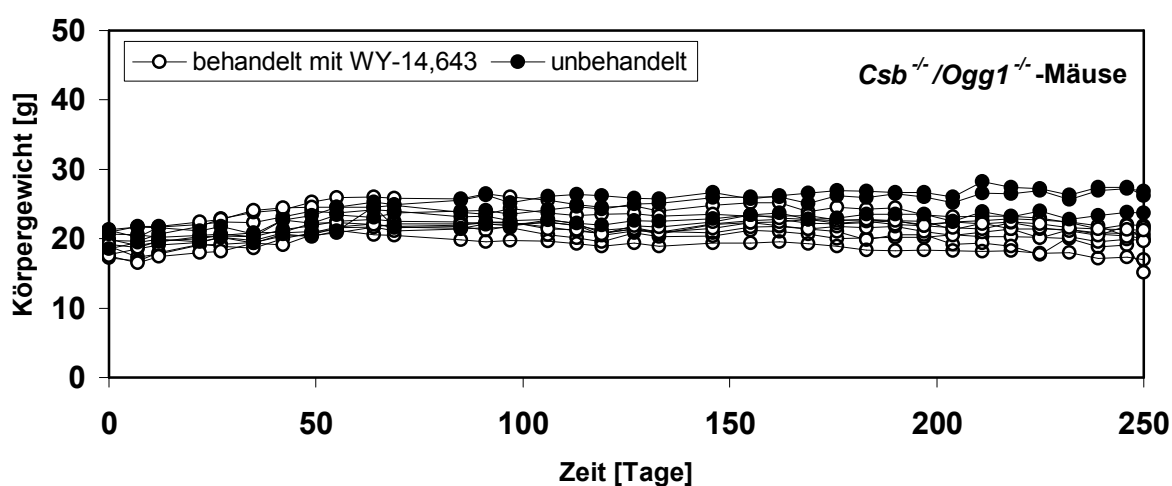


Abbildung 52: Abhängigkeit des Körpergewichts von einer WY-14,643-Behandlung in *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen. Die Substanz wurde in einer Konzentration von 0,025% dem Haltungsfutter beigemischt und *ad libitum* verabreicht. Die Gewichtskontrolle der Tiere wurde wöchentlich durchgeführt. Es wurden insgesamt 9 *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Tiere über einen Zeitraum von 250 Tagen gefüttert. Jeder Punkt entspricht einer Körpergewichtsbestimmung.

Abbildung 52 zeigt den Gewichtsverlauf in *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}* Mäusen während der Behandlung mit WY-14,643. Man erkennt wiederum, dass sowohl behandelte, als auch unbehandelte Tiere einen ähnlichen Gewichtsverlauf zeigen. Gegen Ende der Behandlung kam es in einigen behandelten, aber auch unbehandelten Tieren zu einem leichten Gewichtsabfall, der jedoch stets geringer als 10% des Körpergewichts war.

5.6.2 Einfluss von WY-14,643 auf das Lebergewicht von Wildtyp und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen

Wie in Kapitel 5.2.3 beschrieben, stellt das Verhältnis aus Lebergewicht zu Körpergewicht einen sehr guten Parameter dar, mit dem das Ansprechen der Tiere auf die Behandlung mit WY-14,643 beurteilt werden kann.

Tabelle 11: Einfluss einer WY-14,643 Behandlung auf das Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht [%] in Wildtyp- und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen. Die Substanz wurde in einer Konzentration von 0,025% dem Haltungsfutter beigemischt und für 91 bis 250 Tage den Mäusen *ad libitum* verabreicht (n=3–9).

Zeit	0 Tage	91 Tage	176 Tage	211 Tage	250 Tage
Fütterung	-	0,025% WY-14,643			
Wildtyp	4,7 ± 0,3	15,3 ± 0,8	23,5 ± 3,9	15,0 ± 0,6	16,3 ± 1,8
<i>Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}</i>	4,4 ± 0,1	14,4 ± 0,5	15,7 ± 2,3	14,8 ± 1,3	17,7 ± 1,3

Tabelle 11 zeigt das Verhältnis von Lebergewicht zu Körpergewicht in unbehandelten und WY-14,643-behandelten Wildtyp- und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen. Man erkennt, dass es unter einer WY-14,643-Behandlung sowohl in Wildtyp-, als auch in *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen zu einem signifikanten Anstieg ($p < 0,05$) des Verhältnisses aus Leber- zu Körpergewicht kommt. Wie bereits in 5.2.3 gezeigt, kommt es in beiden Tierkollektiven zu einer gleichmäßig starken Leberzellproliferation, die zu einer Gewichtszunahme der Lebern führt.

5.6.3 Einfluss von WY-14,643 auf klinische Parameter in Wildtyp- und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen

Das Ansprechen der beiden Genotypen auf eine Behandlung mit WY-14,643 sollte auch durch diverse klinische Parameter bestimmt werden. Dazu wurde den 250 Tage behandelten Mäusen Blut entnommen und im daraus gewonnenen Plasma durch die Firma Biocontrol (Ingelheim) diverse Laborparameter bestimmt (vgl. 4.2.2.8).

Tabelle 12: Einfluss von WY-14,643 auf klinische Parameter in unbehandelten und WY-14,643- behandelten Wildtyp- und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen. WY-14,643 wurde den behandelten Tieren in einer Konzentration von 0,025% *ad libitum* über das Haltungsfutter verabreicht. GPT = Glutamat-Pyruvat-Transaminase; ALT = Alanin-Aminotransferase; GOT = Glutamat-Oxalacetat-Transaminase; AST = Aspartat-Amino-Transferase; GLDH = Glutamatdehydrogenase. n=3 für unbehandelte Tiere und n=8-9 für WY-14,643 behandelte Tiere.

Parameter	Wildtyp		<i>Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}</i>	
Behandlung	-	WY-14,643	-	WY-14,643
GPT (ALT) [U/l]	37 ± 2	432 ± 167	27 ± 4	505 ± 205
GOT (AST) [U/l]	118 ± 19	458 ± 265	116 ± 13	421 ± 124
Alkal. Phosphatase [U/l]	81 ± 14	1468 ± 918	62 ± 2	2723 ± 504
GLDH [U/l]	4 ± 2	124 ± 56	6 ± 1	74 ± 30
Bilirubin, gesamt [mg/dl]	1,0 ± 0,7	1,3 ± 1,1	0,4 ± 0,1	1,5 ± 1,6
Eiweiß, gesamt [g/l]	54 ± 4	63 ± 3	48 ± 1	61 ± 5
Triglyceride [mg/dl]	86 ± 25	31 ± 11	28 ± 5	14 ± 6
Cholesterol, gesamt [mg/dl]	82 ± 16	118 ± 25	78 ± 7	153 ± 26

Tabelle 12 zeigt verschiedene Leberparameter in unbehandelten und WY-14,643 behandelten Wildtyp- und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen. Es ist ersichtlich, dass sich die meisten Parameter in den unbehandelten Genotypen nicht signifikant unterscheiden. Lediglich die Triglyceridspiegel sind in den Wildtyp- im Vergleich zu den *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen erhöht. Vergleicht man die unbehandelten mit den behandelten Tieren so ist erkennbar, dass WY-14,643 zu einer Erhöhung der Leberparameter GPT, GOT, Alkalische Phosphatase und GLDH führt. Diese Erhöhung könnte ein Zeichen für eine Leberzellschädigung durch die Behandlung mit WY-14,643 sein. Wahrscheinlicher jedoch ist, dass diese Veränderungen mit

der stark gesteigerten Leberzellproliferation oder mit der zunehmenden Entartung der Leber nach 250 Behandlungstagen einhergehen (vgl. 5.6.4). Wie zu erwarten wurden die Triglyceridspiegel durch WY-14,643 um 50% in Wildtyp- und 65% *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen (vgl. 2.1.3.2) gesenkt. Gleichzeitig kam es zu einem Anstieg des Gesamtcholesterols.

5.6.4 Einfluss des Reparaturdefekts in *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen auf die Induktion präneoplastischer Läsionen unter WY-14,643-Behandlung

Zur Analyse der präneoplastischen Läsionen wurden den Tieren die Lebern entnommen (vgl. 4.2.2.7), in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Anschließend wurden von jeder Leber mindestens drei Leberschnitte angefertigt und auf das Auftreten von Glucose-6-Phosphatase positiven bzw. negativen Läsionen gefärbt.

Abbildung 53 zeigt einen gefärbten Leberschnitt einer mit WY-14,643 behandelten Maus. Die zwei enzymveränderten Läsionen sind deutlich zu erkennen und jeweils mit einem Pfeil gekennzeichnet.

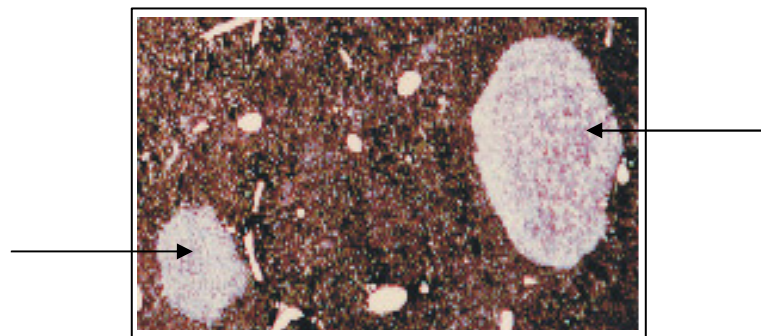


Abbildung 53: Präneoplastische Läsionen (Glucose-6-Phosphatase negative Läsionen) im Leberschnitt einer Maus.

Mindestens drei Leberschnitte einer Maus wurden ausgewertet und der Volumenanteil der enzymveränderten Läsion bestimmt bzw. mit einem Verfahren nach Fulman die Anzahl der Läsionen pro cm³ bestimmt (so genannte Fulman

Inseln). Der Volumenanteil gibt dabei die Größe der gefundenen Läsionen und die Darstellung nach Fulman die Anzahl der Läsionen pro cm^3 an.

Der Volumenanteil der enzymveränderten Läsionen in Wildtyp- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen ist in Abbildung 54 dargestellt.

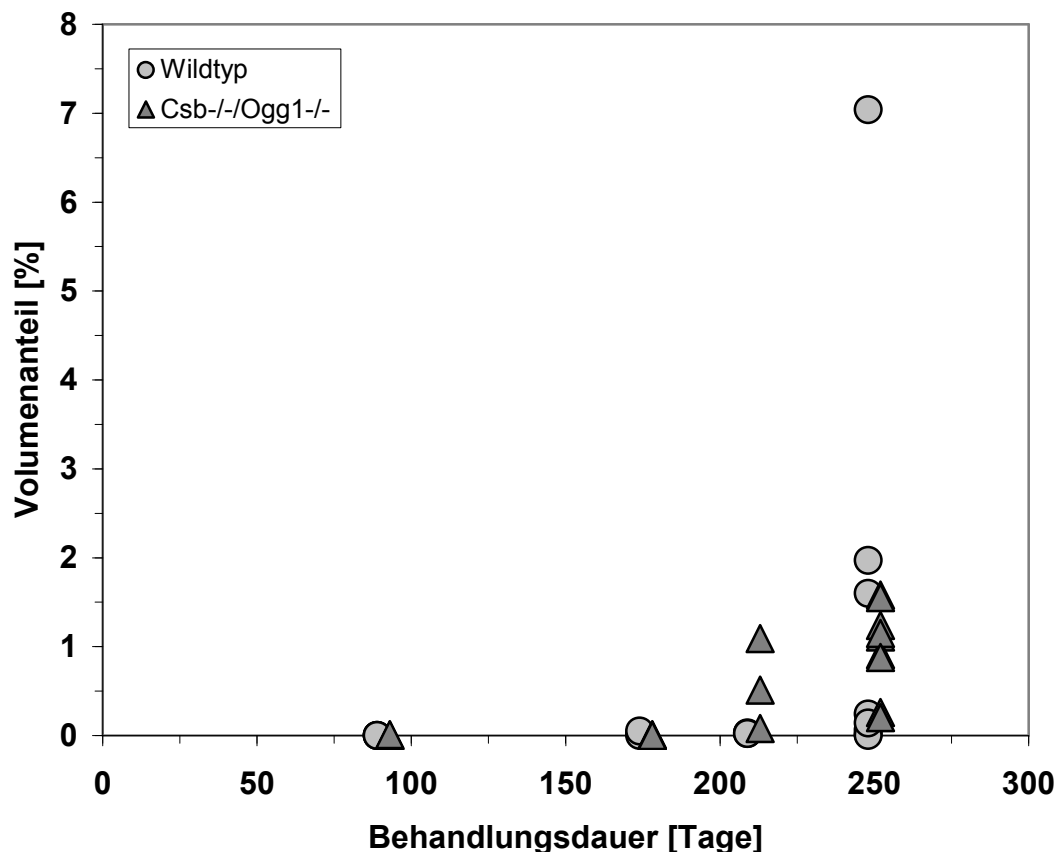


Abbildung 54: Glucose-6-Phosphatase positive und negative Läsionen in Leberschnitten von Wildtyp- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen. Dargestellt ist der prozentuale Volumenanteil der enzymveränderten Läsionen. Die Tiere wurden 91, 176, 211 oder 250 Tage mit 0,025% WY-14,643 *ad libitum* behandelt (vgl. 4.2.2.5), die Lebern entnommen (vgl. 4.2.2.7) und direkt auf einem auf -70°C gekühlten Metallblock eingefroren. Jeder Punkt repräsentiert ein untersuchtes Tier (n=3 für 91-211 Tage; n=8–9 für 250 Tage. Zur besseren Übersicht sind die Genotypen in der Horizontalen entzerrt.

Man erkennt, dass in Leberschnitten von Wildtyp-Tieren weder nach 91, 176 noch 211 Behandlungstagen enzymveränderte Läsionen auftreten. Erst nach 250 Behandlungstagen kommt es in drei von acht untersuchten Tieren zu einem Anstieg enzymveränderter Läsionen. Eines dieser Tiere entwickelte dabei einen auffälligen basophilen Tumor, der durch die immunohistochemische

Färbemethode ebenfalls sichtbar gemacht wird und dadurch das Ergebnis für die Wildtyp-Mäuse etwas verzerrt.

Zwei von drei der behandelten *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäuse zeigten bereits nach 211 Tagen einen deutlichen Anstieg der enzymveränderten Läsionen. Nach 250 Behandlungstagen zeigten anders als in den Wildtyp-Mäusen alle *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäuse enzymveränderte Läsionen.

Zur besseren Übersicht sind die Einzeldaten nochmals in Abbildung 55 in Form von „Boxplots“ zusammengefasst.

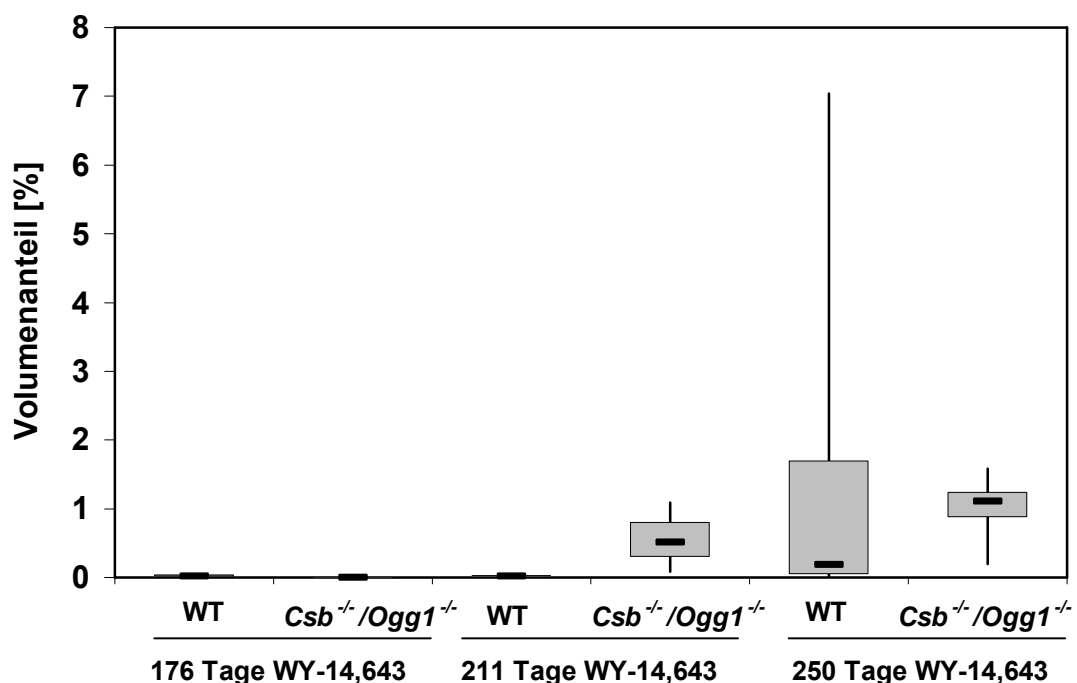


Abbildung 55: Glucose-6-Phosphatase positive und negative Läsionen in Leberschnitten von Wildtyp- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen. Die Tiere wurden 176, 211 oder 250 Tage mit 0,025% WY-14,643 *ad libitum* behandelt (vgl. 4.2.2.5), die Lebern entnommen (vgl. 4.2.2.7) und direkt auf einem auf -70°C gekühlten Metallblock eingefroren. Die Ergebnisse eines Genotyps und Behandlungszeitpunkts sind als Volumenanteil der enzymveränderten Läsionen mittels eines Boxplots dargestellt (n=3 für 176 und 211 Tage; n=8–9 für 250 Tage).

Abbildung 55 zeigt den Volumenanteil der enzymveränderten Läsionen in Abhängigkeit der WY-14,643-Behandlungsdauer in Wildtyp- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen. Man erkennt, dass der Median der untersuchten *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäuse im

Vergleich zu den entsprechend behandelten Wildtyp-Tieren jeweils deutlich, jedoch statistisch nicht signifikant, erhöht ist.

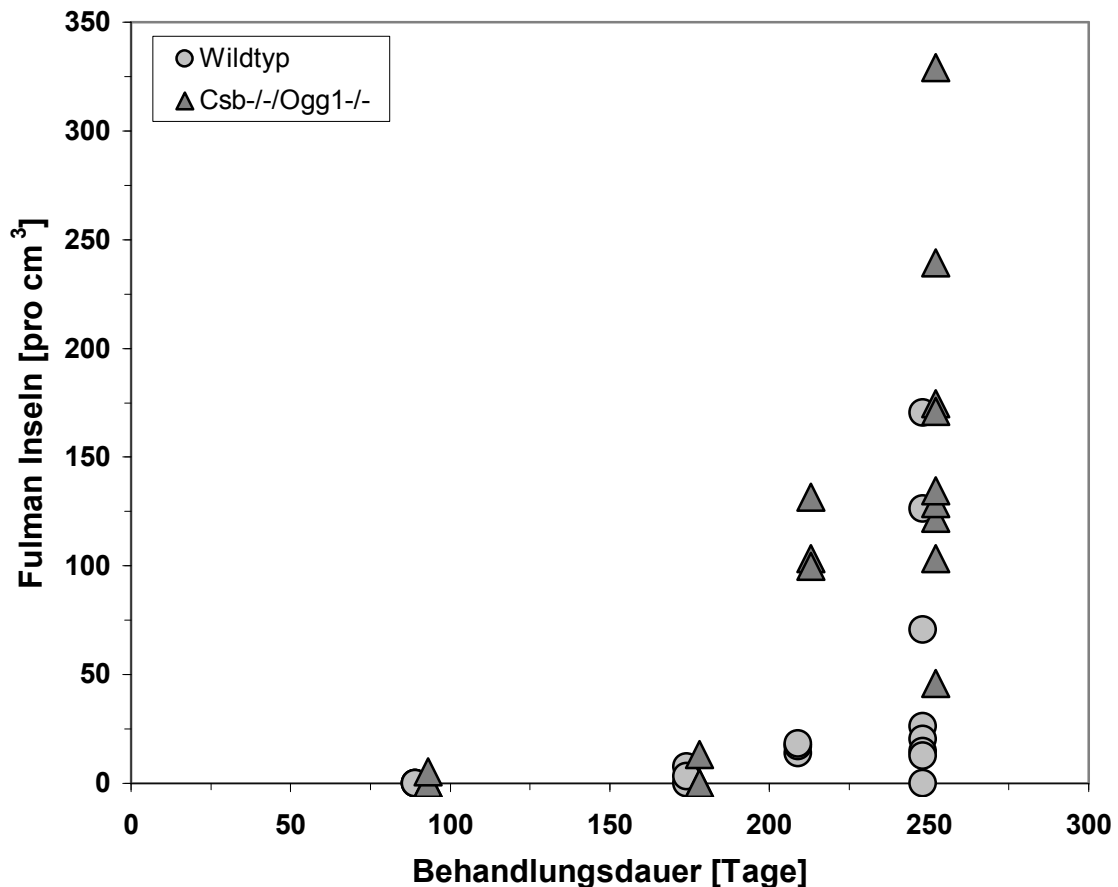


Abbildung 56: Glucose-6-Phosphatase positive und negative Läsionen in Leberschnitten von Wildtyp- und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen. Dargestellt sind sogenannte Fulham Inseln pro cm³. Die Tiere wurden 91, 176, 211 oder 250 Tage mit 0,025% WY-14,643 *ad libitum* behandelt (vgl. 4.2.2.5), die Lebern entnommen (vgl. 4.2.2.7) und direkt auf einem auf -70°C gekühlten Metallblock eingefroren. Jeder Punkt repräsentiert ein untersuchtes Tier (n=3 für 91-211 Tage; n=8–9 für 250 Tage). Zur besseren Übersicht sind die Genotypen in der Horizontalen entzerrt.

Abbildung 56 zeigt die Anzahl der „Fulman Inseln“ pro cm³ in Leberschnitten von WY-14,643-behandelten Wildtyp- und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen. Aus den Daten geht hervor, dass es erst ab ca. 211 Behandlungstagen mit WY-14,643 zu einer nachweisbaren Bildung enzymveränderter Läsionen kommt. Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass in *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Tieren wesentlich mehr Läsionen zu finden sind, als in Wildtyp Tieren. Nach 250 Behandlungstagen ist der Genotypunterschied noch deutlicher erkennbar.

Auch für die untersuchten „Fulman Inseln“ sind die Ergebnisse in Boxplots zusammengefasst (vgl. Abbildung 57).

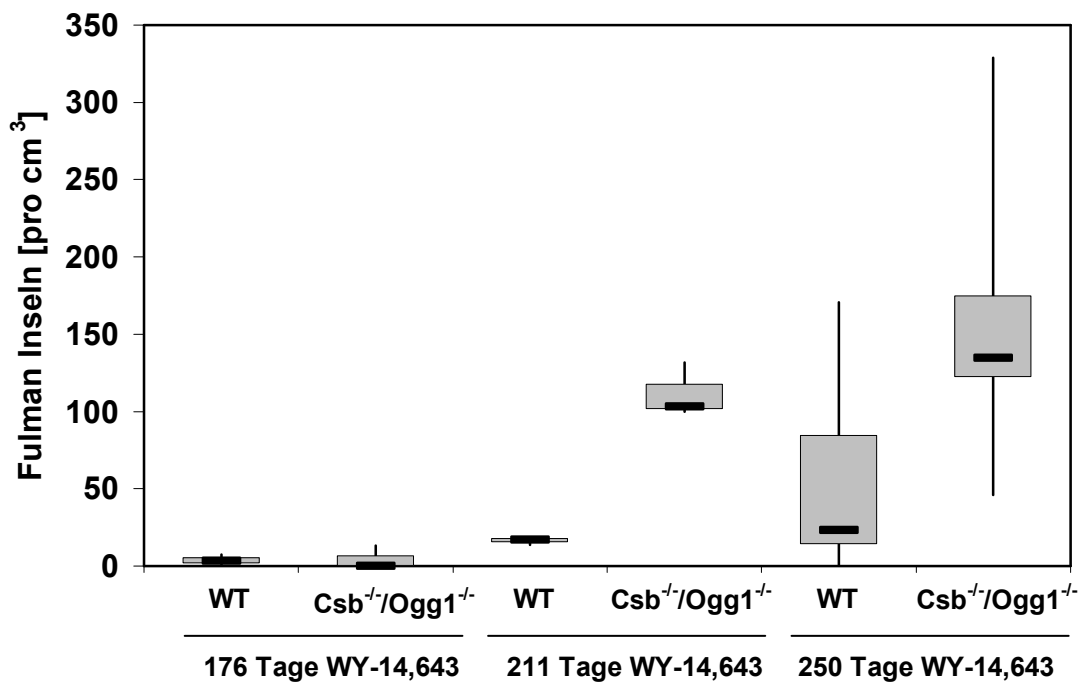


Abbildung 57: Glucose-6-Phosphatase positive und negative Läsionen in Leberschnitten von Wildtyp- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen. Die Tiere wurden 176, 211 oder 250 Tage mit 0,025% WY-14,643 *ad libitum* behandelt (vgl. 4.2.2.5), die Lebern entnommen (vgl. 4.2.2.7) und direkt auf einem auf -70°C gekühlten Metallblock eingefroren. Die Ergebnisse eines Genotyps und Behandlungszeitpunkts sind als sogenannte Fulman Inseln mittels eines Boxplots dargestellt (n=3 für 176 + 211 Tage; n=8–9 für 250 Tage).

Abbildung 57 zeigt die Anzahl der gefundenen „Fulman Inseln“ pro cm³ in Leberschnitten von WY-14,643 behandelten Wildtyp und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen. Man erkennt hier bereits bei Behandlungstag 211 den sehr deutlichen, 6-fach erhöhten signifikanten Anstieg ($p = 0,01$) der „Fulman Inseln“ in den *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Ein ähnlich großer Anstieg ist nach 250 Tagen Behandlungsdauer zu erkennen (5,7-fach). Auch dieser Unterschied ist statistisch signifikant ($p = 0,009$).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass reparaturdefiziente *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-*knockout*-Mäuse im Vergleich zu reparaturprofizienten Wildtyp-Mäusen nach der Behandlung mit dem leberspezifischen Promotor WY-14,643 eine signifikant erhöhte Anzahl an enzymveränderten Läsionen in ihrer Leber tragen. Unter der Annahme, dass sich die enzymveränderten Läsionen zu Tumoren

weiterentwickeln, kann man aus diesem Experiment schließen, dass die in den *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen erhöhten Hintergrundspiegel an oxidativen DNA-Schäden und daraus resultierenden spontanen Mutationen entscheidend zur Tumorentstehung beitragen.

6 DISKUSSION

6.1 Sind Mitochondrien endogene Quellen reaktiver Sauerstoffspezies, die zu oxidativen DNA-Schäden führen?

Ein erstes Ziel dieser Arbeit war es, endogene Quellen reaktiver Sauerstoffspezies zu identifizieren, deren ROS-Produktion zu oxidativen DNA-Schäden führt. Zur Klärung der Frage, in welchem Ausmaß ROS aus Mitochondrien die mitochondriale DNA schädigen, wurde daher ein DNA-Relaxationsassay etabliert, um mitochondriale DNA-Schäden altersabhängig in verschiedenen *Csb*- und *Ogg1*-Genotypen zu bestimmen.

Die Anwendbarkeit dieses mitochondrialen DNA-Relaxationsassay zur Messung mitochondrialer DNA-Schäden wurde mittels eines internen Standards überprüft, und es konnte gezeigt werden, dass Fpg-Protein quantitativ alle vorhandenen Fpg-sensitiven Modifikationen in mitochondrialer DNA erkennt (Abbildung 22, Abbildung 23 und Abbildung 24). Ferner konnte gezeigt werden, dass mtDNA aus Lebern von Wildtyp-Mäusen $9,2 \pm 2,2$ Fpg-sensitive Modifikationen pro 10^6 Basenpaare trägt und dass es nicht zu einem altersabhängigen Anstieg dieser Modifikationen kommt. Dieser Wert stimmt gut mit einem früheren Bericht von *Hegler et al.* überein (Hegler et al., 1993). Sie zeigten mit der selben Methode, dass mtDNA aus Rattenlebern $8,0 \pm 1,5$ Fpg-sensitive Modifikationen pro 10^6 Basenpaare trägt. Dennoch wurden von anderen Arbeitsgruppen, vor allem mit Hochleistungsflüssigkeitschromatographie, mitochondriale DNA-Schäden in einer Höhe detektiert, die sich von den hier gezeigten Ergebnissen deutlich unterscheiden. Zur besseren Übersicht sind die in der Literatur beschriebenen Hintergrundspiegel und die benutzte Messmethode in Tabelle 13 zusammengestellt.

Tabelle 13: Übersicht über Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen (8-oxoG für HPLC und Fpg-sensitive Modifikationen für enzymatische Methoden) in mitochondrialer DNA von Nagerlebern. Die Werte wurden mit den angegebenen Techniken bestimmt. HPLC-ECD-Werte, die in 8-oxoG pro 10^5 Guaninmoleküle angegeben wurden, wurden umgerechnet, wobei angenommen wurde, dass mitochondriale DNA aus Mäuselebern einen Guanin-Anteil von 18% hat (NC_006914). D.h. die Werte wurden mit dem Faktor 0,36 multipliziert, um auch der Tatsache Rechnung zu tragen, dass die DNA als Doppelstrang vorliegt. HPLC-ECD = Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit elektrochemischer Detektion.

Technik	Spezies, Organ, (Alter)	Läsionen pro 10^6 bp	Referenz
HPLC-ECD	Ratte, Leber, 6 Mon.	$\sim 247 \pm 36$	(Richter et al., 1988)
HPLC-ECD	rat, liver	~ 107	(Suter und Richter, 1999)
HPLC-ECD	rat, liver	$\sim 30,7 \pm 3,4^a$	(Suter und Richter, 1999)
HPLC-ECD	Maus, Leber, 4 Mon. (wt)	$\sim 4,6 \pm 1,8$	(de Souza-Pinto et al., 2001a)
HPLC-ECD	Maus, Leber, 4 Mon. (<i>Ogg1</i> ^{-/-})	$\sim 51,8 \pm 35,7$	(de Souza-Pinto et al., 2001a)
HPLC-ECD	Maus, Leber, 6 Mon.	$0,7 \pm 0,2^b$	(Hamilton et al., 2001)
HPLC-ECD	Maus, Leber, 26 Mon.	$9,5 \pm 0,3$	(Van Remmen et al., 2003)
Fpg, Southern	Ratte, Leber, 6 Mon.	$\sim 10 \pm 2$	(Anson et al., 2000)
Fpg, Southern	Ratte, Leber, 6 Mon.	$\sim 36 \pm 5^c$	(Anson et al., 2000)
Fpg	Ratte, Leber	$8,0 \pm 1,5$	(Hegler et al., 1993)
Fpg	Maus, Leber, 5-12 Mon. (wt)	$9,2 \pm 2,2$	Abbildung 27
Fpg	Maus, Leber, 4-23 Mon. (<i>Csb</i> ^{-/-} / <i>Ogg1</i> ^{-/-})	$7,1 \pm 2,2$	Abbildung 27

^a Messung nur in nicht fragmentierter mtDNA

^b altersabhängige Zunahme der DNA-Schäden detektiert

^c mtDNA wurde vor der Vermesung mittels Southern-Blot von nukleärer DNA abgetrennt

Es ist nicht neu, dass die Bestimmung oxidativer DNA-Schäden mit verschiedenen Methoden zu unterschiedlichen Ergebnissen führt. Dies kann mit der unterschiedlichen Sensitivität der Methoden zusammenhängen. Außerdem wurde gezeigt, dass es während der Aufarbeitung des Probenmaterials zu einer artifiziellen Bildung von 8-oxoG kommen kann (ESCODD, 2002; ESCODD, 2003; Collins et al., 2004).

Vergleicht man die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden in mtDNA von Wildtyp- und reparaturdefizienten *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen, so erkennt man keinen Unterschied in den gefundenen Werten bei jungen Tieren (Abbildung 26). In den *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Tieren ist nur ein schwacher altersabhängiger Anstieg der oxidativen DNA-Modifikationen zu erkennen (Abbildung 27). Auch die jeweiligen *Csb*^{-/-}- und *Ogg1*^{-/-}- *single-knockout*-Mäuse zeigen keinen Unterschied zu den Wildtyp-Tieren

(Abbildung 26). Diese Befunde stehen in klarem Widerspruch zu einem Bericht von *de Souza-Pinto et al.*, die einen 11-fachen Anstieg von 8-oxoG in mtDNA von *Ogg1*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen haben (*de Souza-Pinto et al.*, 2001a). Diese Arbeitsgruppe berichtete für *Ogg1*^{-/-}-Mäuse Hintergrundspiegel in mtDNA von 52 ± 36 8-oxoG pro 10^6 bp (Tabelle 13). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte in der benutzten Messmethode begründet sein. Während für die Analyse der oxidativen DNA-Schäden mittels DNA-Relaxationsassay nur intakte, zirkuläre mtDNA-Moleküle einbezogen werden, werden bei der Analyse mittels HPLC auch fragmentierte mtDNA-Moleküle in der Analyse erfasst. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass fragmentierte mtDNA mehr oxidative DNA-Schäden trägt als intakte DNA-Moleküle (Suter und Richter, 1999). Eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte in der Tatsache begründet sein, dass das im DNA-Relaxationsassay verwendete Fpg-Protein nur 8-oxoG:C Fehlpaarungen erkennt (vgl. 2.4.2.1), jedoch berichtet wurde, dass 8-oxoG in mitochondrialer DNA vor allem mit Adenin gepaart vorliegt (Miyako et al., 2000). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit durch die Verwendung von MutY-Protein als Sonde für 8-oxoG:A ausgeschlossen werden. Die von mir untersuchte mtDNA zeigt keine erhöhten Spiegel an mit Adenin fehlgepaartem 8-oxoG (Abbildung 29). Dieses Ergebnis wird gestützt von dem Befund, dass zumindest beim Menschen das humane MutY-Homolog (hMYH), welches 8-oxoG:A Fehlpaarungen aus dem Genom entfernt, in Mitochondrien nachgewiesen werden konnte (Ohtsubo et al., 2000; Cotter et al., 2004). Vergleicht man die Schadensprofile der Wildtyp- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäuse, so erkennt man, dass sich auch die Anzahl der gefundenen regulären- und oxidierten AP-Läsionen in beiden Genotypen nicht unterscheidet (Abbildung 30).

Gegen die von *de Souza-Pinto et al.* gefundenen erhöhten Spiegel oxidativer mtDNA-Schäden in *Ogg1*^{-/-}-Mäusen spricht der Befund, dass Mitochondrien aus alten Wildtyp- und *Ogg1*^{-/-}-Mäusen keine funktionellen Unterschiede aufweisen und Mitochondrien aus *Ogg1*^{-/-}-Mäusen keine Anzeichen von erhöhtem oxidativen Stress zeigen (Stuart et al., 2005). Der fehlende Anstieg oxidativer mtDNA-Schäden in reparaturdefizienten *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen könnte aber auch bedeuten, dass die „wahren“ Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden in den

verschieden Mausgenotypen unterhalb der Nachweisgrenze des mtDNA-Relaxationsassays liegen. Gegen diese Vermutung spricht allerdings, dass die mtDNA-Schäden durch die Gabe eines Peroxisomenproliferators, der auch zu einer Proliferation der Mitochondrien beim Menschen führen kann (Hanefeld et al., 1983), signifikant gesenkt werden konnten (Abbildung 41). Dies deutet darauf hin, dass der Replikation möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Abwehr oxidativer mtDNA-Modifikationen zukommt. Einerseits werden bei der Zellteilung nur nicht oxidierte Guanin-Moleküle bei der DNA-Neusynthese verwendet, andererseits könnte während der Zellteilung eine Selektion gegenüber nicht geschädigten Mitochondrien und nicht geschädigter mtDNA stattfinden. Möglicherweise kann die Reduktion der oxidativen mtDNA-Schäden auch mit einer replikationsgekoppelten Reparatur erklärt werden. Diese Hypothese wird gestützt durch den Befund, dass Pif1p, eine Helikase, die an verschiedenen replikationsgekoppelten Funktionen beteiligt ist, Ntg-sensitive DNA-Modifikationen in mtDNA von Hefe senken konnte, unabhängig vom Vorhandensein von Ntg (Doudican et al., 2005). Ferner konnte vor kurzem gezeigt werden, dass die Familie der NEIL-Reparaturproteine bevorzugt oxidative DNA-Schäden in sich replizierenden Bereichen der DNA repariert (Dou et al., 2003) und dass NEIL1-defiziente Mäuse mtDNA-Schäden und Deletionen in ihrem Genom akkumulieren (Vartanian et al., 2006).

Da jedes Mitochondrium 2–20 Kopien mtDNA enthält (Lee und Wei, 2001), wäre es auch durchaus denkbar, dass die mtDNA-Schäden in jedem Mitochondrium sehr heterogen verteilt sind und daher „Durchschnittswerte“ bei der Erfassung von mitochondrialen DNA-Schäden nur unzureichend die tatsächlichen Werte wiedergeben. Mittlerweile gibt es auch Hinweise, dass mitochondriale DNA aktiv durch den mitochondrialen Transkriptionsfaktor A (TFAM), der zu den *high-mobility-group*-Proteinen gehört, vor Angriffen durch ROS geschützt wird (Ekstrand et al., 2004; Kanki et al., 2004).

Letztendlich lässt sich aus den erhaltenen Ergebnissen nicht ableiten, welche Rolle das Cockayne Syndrom B Protein und die 8-oxoGuanin-Glykosylase bei der Reparatur oxidativer mitochondrialer DNA-Schäden spielen. Betrachtet man die Ergebnisse in ihrer Gesamtheit, so muss man aber davon ausgehen, dass die mitochondriale ROS-Produktion und daraus resultierende oxidative DNA-Schäden

auch in alternden Individuen überschätzt wurden und die mitochondriale DNA wohl auch durch antioxidative Systeme sehr gut gegen den Angriff durch reaktive Sauerstoffspezies geschützt ist.

Wahrscheinlich könnte die Analyse mitochondrialer Mutationen in den verschiedenen Mausgenotypen Aufschluss geben, welchen Beitrag das OGG1- und das CSB-Protein bei der Wahrung der genomischen Integrität der mitochondrialen DNA leisten.

6.2 Induziert der Peroxisomenproliferator WY-14,643 oxidative DNA-Schäden *in vivo*?

Als weitere Quelle reaktiver Sauerstoffspezies kommen Peroxisomen in Betracht (vgl. 2.1.3). Zur Überprüfung welchen Beitrag diese Zellorganellen zum Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden leisten, sollte die ROS-Produktion mit dem Peroxisomenproliferator WY-14,643 in der Hepatomzelllinie HEPA1 und in Hepatozyten von Mäusen stimuliert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass 250 bzw. 500 μ M WY-14,643 in HEPA1-Zellen nicht zu einer Erhöhung der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden führen (Abbildung 31), auch nicht in Glutathion-depletierten Zellen. Dies kann auf eine fehlende Expression des PPAR α -Rezeptors, der über eine Expressionssteigerung der Acyl-CoA-Oxidase zu einer erhöhten Bildung von ROS beiträgt, in den HEPA1-Zellen zurückgeführt werden (Abbildung 32).

Um zu überprüfen, ob der PP WY-14,643 oxidative DNA-Schäden in Nagerlebern induziert, wurde Wildtyp- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen die Substanz für unterschiedlich lange Zeiträume über das Futter verabreicht, primäre Hepatozyten isoliert (4.2.2.3), die mittels Alkalischer Elution analysiert wurden (4.2.3).

Anhand der Versuche wird deutlich, dass die Gabe der Substanz nicht zu einer signifikanten Änderung des Gewichtsverlaufs in den behandelten Tieren führt (Abbildung 33 und Abbildung 34). Dies lässt schließen, dass der PP in der verwendeten Konzentration, keine akut toxischen Wirkungen besitzt. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die behandelten Wildtyp- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäuse

bereits nach vier Behandlungstagen quantitativ gleich stark mit einer Zunahme des Lebergewichts reagieren (Abbildung 35), was auf eine starke Zunahme der Zellproliferation zurückgeführt werden kann (Peters et al., 2005). Auch die Expression der ROS-generierenden peroxisomalen Acyl-CoA-Oxidase wird durch die Behandlung mit WY-14,643 stark gesteigert (Abbildung 37). Betrachtet man nun die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen in Wildtyp-Mäusen in Abhängigkeit von der WY-14,643-Behandlung, so erkennt man, dass es unter dem Einfluss des PP nicht zu einer erkennbaren Erhöhung der Hintergrundspiegel kommt (Abbildung 38). Um auszuschließen, dass durch den PP möglicherweise induzierte, oxidative DNA-Modifikationen direkt durch die BER repariert werden, wurden in einem weiteren Experiment reparaturdefiziente *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäuse eingesetzt. Wie in Kapitel 2.4.6.1 beschrieben, zeigen diese Mäuse physiologischerweise einen erhöhten Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen in der Leber und sollten daher leicht auf eine zusätzliche Induktion reaktiver Sauerstoffspezies ansprechen. Dennoch war nach verschiedenen Behandlungszeitpunkten mit WY-14,643 auch in diesen Tieren kein Anstieg oxidativer DNA-Schäden zu erkennen, sondern vielmehr ein Absinken der Hintergrundspiegel (Abbildung 38). Diese mit der Behandlungsdauer korrelierende Absenkung der Hintergrundspiegel muss wohl auf die starke Leberzellproliferation zurückgeführt werden, da bei der DNA-Neusynthese nicht oxidierte Guanin-Moleküle in die DNA eingebaut werden und es dadurch zu einer Verdünnung der oxidativen DNA-Schäden in der DNA kommt. In diesem Zusammenhang sollte nochmals betont werden, dass auch die Hintergrundspiegel oxidativer mitochondrialer DNA-Schäden durch eine Behandlung mit dem PP WY-14,643 gesenkt wurden (Abbildung 39). Die Hypothese, dass es zu einem „Verdünnungseffekt“ der oxidativen DNA-Schäden kommt, wird gestützt durch den Befund, dass unter einer Behandlung mit WY-14,643 die Mutationsfrequenz, gemessen im *lacI*-Gen von *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen, absinkt (Abbildung 40). Dies lässt vermuten, dass die Gewebeneubildung in den Lebern der Tiere hauptsächlich von hepatozytären Stammzellen ausgeht, die weniger DNA-Schäden und weniger Mutationen tragen als die enddifferenzierten Hepatozyten.

Es bleibt die Frage, warum die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden und Mutationen jeweils nur in den *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen und nicht in den Wildtyp-

Mäusen abgesenkt wurden. Dieser Befund könnte damit erklärt werden, dass die gemessenen Hintergrundspiegel in den Wildtyp-Mäusen zumindest teilweise als Artefakte anzusehen sind, in Wahrheit noch tiefer liegen und deshalb nicht weiter abgesenkt werden können (Epe, 2002). Andererseits könnten die gemessenen Hintergrundspiegel das Ausmaß oxidativer DNA-Modifikationen widerspiegeln, das auch in replizierenden Zellen nicht unterschritten werden kann.

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse werden bestätigt durch eine Analyse von 8-oxoG in Rattenlebern nach Gabe von WY-14,643 von *Hayashi et al.*. In dieser Studie kam es selbst nach 30 Behandlungswochen nicht zu einer gesteigerten Bildung von 8-oxoG (Hayashi et al., 1994). In der Literatur sind aber auch Arbeiten beschrieben, die erhöhte Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen nach der Gabe der PP Ciprofibrat und Clofibrat an Ratten berichten (Takagi et al., 1990; Huang et al., 1994; Nilakantan et al., 1998). Klar gegen eine Beteiligung oxidativer DNA-Schäden bei der PP-induzierten Kanzerogenese spricht der Befund, dass das Ausmass der Peroxisomenproliferation nach der Gabe verschiedener PP an Ratten nicht mit der kanzerogenen Potenz dieser Stoffe korreliert (Marsman et al., 1988). Interessant erscheint in diesem Zusammenhang auch, dass ein Ausschalten des *Aco*-Gens in Mäusen, welches für die peroxisomale Acyl-CoA-Oxidase codiert und damit ursächlich für die gesteigerte ROS-Produktion verantwortlich gemacht wird, die PP-induzierte Kanzerogenese in diesen Tieren nicht verhindern konnte (Fan et al., 1998). Es muss an dieser Stelle allerdings darauf hingewiesen werden, dass *Aco*^{-/-}-Mäuse bereits eine hohe spontane Leberkrebsinzidenz zeigen (Fan et al., 1998).

Die erhaltenen Ergebnisse lassen eine weitere Schlussfolgerung zu: Da selbst nach einer Induktion der Peroxisomenproliferation durch WY-14,643 in den untersuchten Mäusen keine Erhöhung der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen zu erkennen war, kann man schlussfolgern, dass die physiologische ROS-Produktion aus Peroxisomen auch im nicht-stimulierten Normalzustand keinen Beitrag zu den Hintergrundspiegeln oxidativer DNA-Modifikationen leistet.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die Peroxisomenproliferator-induzierte Kanzerogenese auf einer Promotion von spontan initiierten Läsionen

beruht und die Induktion von oxidativen DNA-Schäden keine Rolle zu spielen scheint. Welche Rolle die gebildeten ROS bei der Zellteilung spielen, ist derzeit noch Gegenstand wissenschaftlicher Diskussion (Peters et al., 2005).

6.3 Welche Rolle spielt das CSB-Protein bei der Wahrung der genomischen Integrität?

Neben einer gesteigerten Bildung oxidativer DNA-Schäden könnte auch ein Ausfall spezifischer DNA-Reparaturproteine zu einem erhöhten Krebsrisiko beitragen (Abbildung 1). Die Rolle eines dieser Proteine, nämlich die des Cockayne Syndrom B-Proteins, bei der Reparatur oxidativer DNA-Schäden ist bis heute weitgehend ungeklärt. Auch die Frage, ob ein Ausfall des *Csb*-Gens, vor allem bei gleichzeitigem Ausfall des *Ogg1*-Gens, einen Einfluss auf die genomische Integrität in Säugern hat, konnte bisher noch nicht gelöst werden (vgl. 2.4.6.1). Um diese Fragen zu beantworten, wurden zwei verschiedene Ansätze gewählt. Zum einen wurde mit einer SV40-transformierten Fibroblastenzelllinie eines Cockayne Syndrom B-Patienten gearbeitet, die ein verkürztes CSB-Protein exprimiert (vgl. 4.1.7). Zum anderen wurde mit *knockout*-Mäusen der folgenden Genotypen gearbeitet: *Csb*^{-/-}, *Ogg1*^{-/-}, *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-} sowie den entsprechenden Kontrolltieren (*Csb*^{+/-}/*Ogg1*^{+/-}).

Um herauszufinden, welchen Einfluss ein funktionierendes CSB-Protein auf die genomische Integrität hat, wurden die o.g. Genotypen durch Einkreuzung von transgenen BigBlue[®]-Mäusen mit einem bakteriellen *lacI* Gen ausgestattet (vgl. 4.2.2.1). Das *lacI*-Gen erlaubt sowohl eine spontane als auch durch Xenobiotika induzierte organspezifische Mutagenitätsprüfung in diesen Tieren. Um eine maximale genetische Homogenität der Tiere zu erhalten, wurden zur Analyse alle Tiere demselben Zuchtschritt entnommen. Abbildung 48 und Abbildung 49 zeigen, dass bei der Generierung der transgenen *knockout*-Tiere alle Genotypen wie erwartet auftraten und gleich viele Männchen und Weibchen geboren wurden. Da das transgene *lacI*-Gen in den generierten Mäusen nicht transkribiert wird (Provost und Short, 1994), sind alle in diesem Genabschnitt erfassten Effekte nicht auf eine

transkriptionsgekoppelte Reparatur, sondern auf eine „globale“ Reparatur endogen erzeugter oxidativer DNA-Schäden zurückzuführen.

Die Analyse der Mutationsfrequenzen im *lacI*-Gen von *Csb^{-/-}/Ogg1^{+/-}*-Mäusen zeigte nur eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der Mutationsfrequenz im Vergleich zu den Kontrolltieren (*Csb^{+/-}/Ogg1^{+/-}*) (Tabelle 9). Dieser Befund ist in Einklang mit einer vor kurzem publizierte Arbeit von *Dolle et al.*. Die Arbeitsgruppe fand keine Erhöhung der Mutationsfrequenz im transgenen *lacZ*-Gen von *Csb^{-/-}*-Mäusen (Dolle et al., 2006). Dass die gefundene Mutationsfrequenz in *Ogg1^{-/-}*-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren (*Csb^{+/-}/Ogg1^{+/-}*) stärker erhöht war (2,1-fach) als in *Csb^{-/-}*-Mäusen (1,4 fach) (vgl. Tabelle 9) unterstützt die Hypothese, dass OGG1 und möglicherweise andere Glykosylasen, die die BER initiieren, das primäre Abwehrsystem gegen oxidative DNA-Modifikationen darstellen (Fortini et al., 2003). Der gleichzeitige Ausfall von CSB- und OGG1-Protein in *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Tieren führte zu einer Erhöhung der Mutationsfrequenz im Vergleich zu den beiden *single-knockout*-Genotypen (Tabelle 9).

Durch Amplifizierung der gefundenen Mutanten mittels PCR (vgl. 4.2.5.7) und anschließender Sequenzierung konnten alle Mutationen identifiziert werden. In guter Übereinstimmung mit bisherigen Erkenntnissen ist der Befund, dass das Mutationsmuster in Kontrolltieren (*Csb^{+/-}/Ogg1^{+/-}*) durch G:C zu A:T Transitionen geprägt wird (Hill et al., 2004), die typischerweise durch spontane Deaminierung von Cytosin entstehen. Zwischen 80 und 100% der gefundenen G:C zu A:T Transitionen in den verschiedenen Genotypen war an so genannten CpG-Inseln lokalisiert, was typisch für nicht transkribierte Gene wie das *lacI*-Gen in den BigBlue[®]-Mäusen ist. Interessiert man sich nur für die Mutationen, die durch einen Defekt im *Csb*- und / oder *Ogg1*-Gen verursacht werden, sind deshalb Mutationen vom Typ G:C zu A:T von der Analyse auszuschließen. Es konnte gezeigt werden, dass in *Ogg1^{-/-}*-Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren die G:C zu T:A Transversionen stark (7,1-fach) erhöht sind. Das gleichzeitige Ausschalten von CSB und OGG1 in *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen führt zu einer weiteren signifikanten Erhöhung der Mutationsfrequenz im Vergleich zu *Ogg1^{-/-}*-Mäusen. Interessanterweise wurden in den Doppelknockout-Tieren nicht nur G:C zu T:A Transversionen gefunden, sondern auch kleine Deletionen (1–4 bp), die nicht an bekannten Mutationshotspots auftraten (Halangoda et al., 2001) und auch nicht in

Csb^{-/-}- und *Ogg1*^{-/-}-Tieren zu finden waren. Dies könnten Anzeichen für alternative Reparaturversuche durch fehlerhaftete Reparaturwege darstellen.

Dieser Befund wurde durch Untersuchungen an Fibroblasten (UV^S1KO) eines Patienten, der am Cockayne Syndrom B leidet, bestätigt. Der Patient aus dem die Zelllinie gewonnen wurde, exprimiert nur ein verkürztes CSB Protein (Horibata et al., 2004). Mit Hilfe der Alkalischen Elutionstechnik wurden keine Unterschiede in den UV^S1KO-Zellen im Vergleich zur CSB-korrigierten Zelllinie HA-CSB/UV^S1KO bezüglich der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen gefunden (Abbildung 41). Es wurden auch keine Unterschiede in der Induktion oxidativer DNA-Schäden durch Ro 19-8022 und sichtbarem Licht (Abbildung 42) sowie in der Reparatur oxidativer DNA-Schäden detektiert (Abbildung 43). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass das CSB-Protein nicht primär an der Abwehr oxidativer Basenmodifikationen beteiligt ist, sondern ein Ausfall des CSB-Proteins sich klinisch vor allem durch eine gestörte transkriptionsgekoppelte Reparatur manifestiert. Die Befunde an der menschlichen CSB-Zelllinie sind in Einklang mit Untersuchungen durch *Osterod et. al.* (Osterod et al., 2002), der zeigen konnte, dass *Csb*^{-/-}-Mäuse keine Erhöhung der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden zeigen.

Zusammenfassend zeigen die erhaltenen Ergebnisse eindeutig, dass das Cockayne Syndrom B-Protein selbst in nicht transkribierten Genen einen Ausfall von OGG1 bei der Reparatur oxidativer DNA-Schäden funktional korrigieren kann. Dennoch stellt CSB in einem OGG1 profizienten Hintergrund nicht das primäre Abwehrsystem gegen oxidative DNA-Schäden dar. Welche Rolle CSB bei der globalen Reparatur oxidativer DNA-Schäden spielt und welche weiteren Proteine an diesem *back-up*-Mechanismus beteiligt sind, soll im folgenden Kapitel (6.4) deutlich werden.

6.4 Welche Rolle spielt die Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 bei der Reparatur nukleärer oxidativer DNA Schäden?

Die genaue Funktion der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (PARP1) bei der Reparatur oxidativer DNA-Schäden ist noch weitgehend ungeklärt. Speziell die

Frage, ob dieses Enzym eine Rolle bei der beobachteten *back-up*-Reparatur oxidativer DNA-Schäden spielt, sollte untersucht werden. Ein erster Hinweis auf eine Beteiligung der PARP1 bei dieser *back-up*-Reparatur ergab sich aus dem Befund, dass eine Beschleunigung der „globalen“ DNA-Reparatur durch das CSB-Protein abhängig ist von der enzymatischen Aktivität der Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1 (Flohr et al., 2003). Dieser Befund sollte mit Hilfe von *knockout*-Tiermodellen näher beleuchtet werden. Dazu wurden die Hintergrundspiegel an Fpg-sensitiven Modifikationen in frisch isolierten Hepatozyten von *Parp1*^{-/-}, *Parp1*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-} und Wildtyp-Mäusen bestimmt. Die Ergebnisse zeigen, dass ein Ausfall von PARP1 und OGG1 in *Parp1*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen zu einem stärkeren Anstieg der Fpg-sensitiven Modifikationen führt als der alleinige Ausfall von OGG1 in *Ogg1*^{-/-}-Mäusen (Abbildung 44). Dieser Anstieg ist vergleichbar mit dem Anstieg der für *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäuse beschrieben wurde (Osterod et al., 2002). Der alleinige Ausfall von PARP1 führt nicht zu einem Anstieg oxidativer DNA-Modifikationen (Abbildung 44).

Die Bedeutung von PARP1 für die Reparatur oxidativer DNA-Schäden wird untermauert durch Untersuchungen an spontan immortalisierten Mausembryofibroblasten der verschiedenen Mausgenotypen, die in unserem Arbeitskreis durchgeführt wurden. Während in *Ogg1*^{-/-}-Zellen noch eine Reparatur oxidativer DNA-Schäden erkennbar ist (Klungland et al., 1999; Osterod et al., 2002), zeigen *Parp1*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Zellen auch nach 48 Stunden keine Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen (persönliche Mitteilung C. Flohr-Beckhaus). Des weiteren ist die erhaltene Reparaturkinetik der *Parp1*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Zellen nahezu identisch mit der Reparaturkinetik von *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Zellen. Ein weiterer wichtiger Hinweis für das Zusammenwirken von PARP1 und CSB in einem *back-up*-Reparaturweg für OGG1 bringt die Erkenntnis, dass es zwischen beiden Proteinen eine physische und funktionelle Interaktion gibt (Thorslund et al., 2005).

Was ist nun die Rolle von PARP1 und CSB in diesem *back-up*-Reparaturweg?

Möglicherweise können sowohl PARP1 als auch CSB zu einer Veränderung der Chromatinstruktur führen. Diese Hypothese wird gestützt durch den Befund, dass CSB durch eine ATP-abhängige Umgestaltung des Chromatins (Citterio et al., 2000) die Reparatur durch Öffnung der DNA erleichtern kann (Ura und Hayes, 2002). In diesen Mechanismus scheinen auch die direkte Poly(ADP-Ribosyl)ierung

von Histonen und die Automodifikation von PARP1, die zur Dekondensation des Chromatins führt (Kraus und Lis, 2003), beteiligt zu sein. In diesem Zusammenhang wäre es vorstellbar, dass durch die Strukturänderung des Chromatins der Zugang von DNA-Reparaturproteinen zur geschädigten Läsion erleichtert wird. Diese Hypothese wird durch den Befund gestützt, dass PARP1 und CSB die Glykosylaseaktivität von OGG1 nicht direkt beeinflussen (Osterod et al., 2002; Flohr et al., 2003 und persönliche Mitteilung C. Flohr-Beckhaus).

Welche weiteren Proteine sind an dieser CSB- und PARP1-abhängigen, aber OGG1-unabhängigen Reparatur oxidativer DNA-Modifikationen beteiligt?

Zur Publikation eingereichte Ergebnisse von *C. Flohr-Beckhaus et al.* zeigen, dass das Xeroderma pigmentosum A-Protein (XPA), welches bisher nur mit der globalen und transkriptionsgekoppelten-NER in Verbindung gebracht wurde, auch bei der OGG1-unabhängigen Reparatur von oxidativen DNA-Schäden eine Rolle spielt (persönliche Mitteilung C. Flohr-Beckhaus). Interessanterweise gibt es keine Anzeichen einer Beteiligung des Xeroderma pigmentosum C Proteins (XPC), welches bei der Erkennung von Basenmodifikationen bei der NER benötigt wird (Sugasawa et al., 1998; Volker et al., 2001).

Untersuchungen zur Funktion der Reparaturproteine OGG1, CSB und PARP1 bei der Prävention von Mikrokernen im Blut von Mäuseerythrozyten zeigen, dass nur die PARP1 einen Einfluss auf die Bildung von Mikrokernen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen hat (Abbildung 47). Geht man davon aus, dass Mikrokerne vor allem aus DNA-Einzel- und DNA-Doppelstrangbrüchen entstehen, so bestätigt dieses Ergebnis frühere Befunde zur Rolle der PARP1 bei der Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen (de Murcia et al., 1997; Shall und de Murcia, 2000; Flohr et al., 2003; Dantzer et al., 2006). Die Ergebnisse machen aber auch deutlich, dass die erhöhten Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen in *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen nicht zu einer erhöhten Mikrokernrate führen.

6.5 Welche Mutagenität besitzt 8-oxoG *in vivo*?

Um das mutagene Potential von endogenen oxidativen DNA-Modifikationen, deren Reparatur vom OGG1- und CSB-Protein abhängig ist, abzuschätzen, wurden die Mutationsfrequenzen in den Lebern von Wildtyp-, *Csb*^{-/-}, *Ogg1*^{-/-} und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen mit den Hintergrundspiegeln oxidativer DNA-Modifikationen korreliert (Abbildung 58).

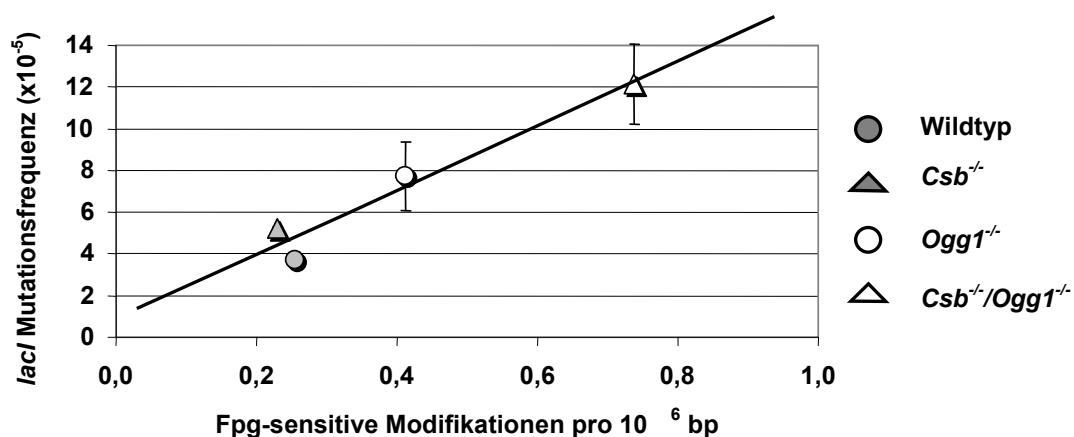


Abbildung 58: Korrelation der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden in Hepatozyten von Wildtyp-, *Csb*^{-/-}, *Ogg1*^{-/-} und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen mit spontanen Mutationsfrequenzen im *lacI*-Gen. Die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen wurden mit Hilfe der Alkalischen Elution (vgl. 4.1.10.6) in frisch isolierten Hepatozyten (vgl. 4.2.2.3) von Osterod *et al.* bestimmt (Osterod *et al.*, 2002). Die alterskorrigierten Werte für die Korrelation wurden durch eine lineare Regression erhalten.

Eine Analyse der Daten zeigt, dass es eine starke Korrelation zwischen den Hintergrundspiegeln oxidativer DNA-Modifikationen (bestimmt als Fpg-sensitive Modifikationen pro 10⁶ Basenpaaren) in den Lebern von 5 Monate alten Mäusen und der totalen Mutationsfrequenz (Abbildung 58) ($R^2 = 0,948$) und auch der Frequenz an G:C zu T:A Transversionen (Abbildung 59) ($R^2 = 0,868$) gibt. Die Mutationen wurden wie in Kapitel 4.2.5 beschrieben im bakteriellen *lacI*-Gen bestimmt.

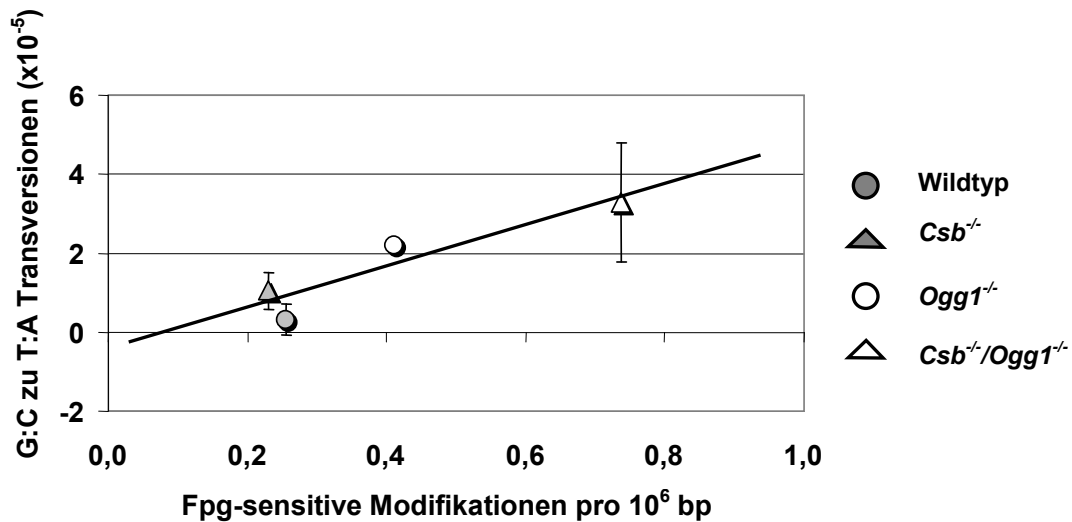


Abbildung 59: Korrelation der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden in Hepatozyten von Wildtyp-, *Csb*^{-/-}-, *Ogg1*^{-/-}- und *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-}-Mäusen mit spontanen G:C zu T:A Transversionen im *lacI*-Gen. Die Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen wurden mit Hilfe der Alkalischen Elution (vgl. 4.1.10.6) in frisch isolierten Hepatozyten (vgl. 4.2.2.3) von Osterod *et al.* bestimmt (Osterod *et al.*, 2002). Die alterskorrigierten Werte für die Korrelation wurden durch eine lineare Regression erhalten.

Diese lineare Korrelation lässt erstmals eine Abschätzung über das mutagene Potential oxidativer DNA-Modifikationen *in vivo* zu. Man erkennt, dass weniger als 0,2 zusätzliche Modifikationen pro 10⁶ Basenpaaren ausreichen, die spontane Mutationsfrequenz zu verdoppeln. Dies bedeutet, dass alle anderen endogen gebildeten Modifikationen und Replikationsfehler entweder weniger häufig auftreten oder aber ein geringeres mutagenes Potential im *lacI*-Gen besitzen.

Da die Bestimmung auf zusätzlich gebildeten DNA-Modifikationen in *knockout*-Mäusen beruht, hätte eine Überschätzung der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Modifikationen durch Oxidation bei der Aufarbeitung der DNA (Pflaum *et al.*, 1997; Helbock *et al.*, 1998; ESCODD, 2003), keinen Einfluss auf das Ergebnis.

Es sollte erwähnt werden, dass viele der gefundenen Mutationen möglicherweise bereits früh während der Organogenese, wenn die Zellproliferation hoch ist, gebildet werden könnten. Zu diesen frühen Zeitpunkten ist die Anzahl der oxidativen DNA-Modifikationen wahrscheinlich jedoch tiefer als zum Zeitpunkt der Mutationsanalyse. Deshalb sind die absoluten Spiegel oxidativer DNA-

Modifikationen, die zu einer Verdopplung der Mutationsfrequenz führen, wahrscheinlich niedriger als 0,2 Fpg-sensitive Modifikationen pro 10^6 Basenpaare.

6.6 Welche Rolle spielen oxidative DNA-Schäden bei der Kanzerogenese?

Die genaue Rolle oxidativer DNA-Schäden bei der Krebsentstehung ist nach wie vor ungeklärt. Wie in Kapitel 2 beschrieben gibt es Hinweise, dass ein Ausfall von Proteinen, die an der Reparatur oxidativer DNA-Schäden beteiligt sind zu einer Erhöhung der Krebsinzidenz beitragen könnten.

Ein interessantes Werkzeug zur Klärung der Frage, welche Rolle oxidative DNA-Schäden bei der Kanzerogenese spielen, stellen *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}-knockout*-Mäuse dar. Diese Tiere zeigen – wie beschrieben – erhöhte Spiegel an oxidativen DNA-Schäden (vgl. Kapitel 2.4.6.1 und 5.2.5) und an Mutationen (vgl. Tabelle 10), im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollen.

Die Beobachtung eines kleinen Tierkollektivs zeigte allerdings weder eine erkennbar erhöhte Krebsinzidenz im Vergleich zu den Kontrolltieren, noch eine daraus resultierende Verkürzung der Lebenserwartung (eigene Beobachtung und persönliche Mitteilung von A. Klungland, Oslo). Um dennoch eine Aussage über das kanzerogene Potential von oxidativen DNA-Modifikationen treffen zu können, wurde in dieser Arbeit in Anlehnung an ein klassisches *Initiations-Promotions*-Experiment der leberspezifische Promotor WY-14,643 eingesetzt, um spontan initiierte Zellen (Mutationen) in den Lebern von Wildtyp- und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen zur Zellproliferation anzuregen. Wie in 4.2.2.5 beschrieben, wurde deshalb Wildtyp- und *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen WY14,643 über das Futter verabreicht und nach definierten Zeitpunkten das Ansprechen der Behandlung überprüft. Das Verhältnis aus Leber- zu Körpergewicht zeigt, dass beide Genotypen quantitativ gleich stark auf die Behandlung mit WY-14,643 ansprechen (Tabelle 11) und es in beiden Kollektiven durch die verstärkte Zellteilung zu einer starken Vergrößerung der Lebern kommt. Auch die untersuchten klinischen Parameter (Tabelle 12) deuten nicht auf ein unterschiedliches Ansprechen der beiden untersuchten Kollektive hin. Die Behandlung mit WY-14,643 ist generell als nicht toxisch

anzusehen, da es in den untersuchten Tieren nicht zu einer Gewichtsabnahme kommt (Abbildung 51 und Abbildung 52).

Als Marker für eine beginnende Entartung der Lebern wurden enzymveränderte Läsionen in den behandelten Genotypen untersucht. Die Analyse zeigt, dass sowohl die Größe (Abbildung 54 und Abbildung 55), als auch die Anzahl (Abbildung 56 und Abbildung 57) der enzymveränderten Läsionen in *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht sind. Die Unterschiede werden besonders beim letzten Analysezeitpunkt, nach 250 Behandlungstagen, deutlich. Hier ist die Anzahl der enzymveränderten Läsionen in *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen statistisch signifikant 6-fach erhöht (Abbildung 57). Unter der Annahme, dass enzymveränderten Läsionen einen der ersten Schritte bei der malignen Entartung darstellen, zeigt dieses Experiment eindeutig, dass oxidative DNA-Schäden und daraus resultierende Mutationen einen Beitrag bei der Krebsentstehung leisten können.

Die Resultate werden bestätigt durch den Befund, dass der kombinierte Ausfall von OGG1- und MYH-Protein in *Myh^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen, der nicht nur zu einer Erhöhung oxidativer DNA-Schäden führt, sondern auch die Mutagenität von 8-oxoG durch Beseitigung der *mismatch*-Korrektur erhöht, mit einer erhöhten Krebsinzidenz einhergeht (Russo et al., 2004). 65% aller untersuchten *Myh^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäuse zeigen eine Predisposition für Tumoren und daraus resultierend eine verringerte Lebenserwartung (Xie et al., 2004). Die Tatsache, dass in 75% aller untersuchten Lungentumore eine G:C zu T:A Punktmutation, die typischerweise auf nicht repariertes 8-oxoG zurückgeführt werden kann, in Kodon 12 des *K-ras*-Oncogens gefunden wurde, unterstreicht die Rolle oxidativer DNA-Schäden bei der malignen Entartung.

Interessanterweise konnten Xie et al. keine direkte Korrelation zwischen der Höhe der oxidativen DNA-Schäden in verschiedenen Geweben und der spontanen Krebsinzidenz in diesen Organen finden (Xie et al., 2004). Obwohl in Lebern von *Myh^{-/-}/Ogg1^{-/-}*-Mäusen die deutlichste Erhöhung der Hintergrundspiegel oxidativer DNA-Schäden beobachtet wurde (10fach) (Russo et al., 2004), waren nur 9% aller gefundenen Tumoren in diesem Organ lokalisiert (Xie et al., 2004). Dies deutet darauf hin, dass der DNA-Schaden an sich zwar eine notwendige aber nicht unbedingt ausreichende Bedingung für das Auftreten einer malignen Entartung

darstellt. Vielmehr spielen vermutlich auch Zellproliferation und Apoptose eine entscheidende Rolle. Interessant erscheint in diesem Zusammenhang der Befund, dass eine Behandlung von *Ogg1*^{-/-}-Mäusen mit KBrO₃ zwar zu einer 250-fachen Erhöhung von 8-oxoG in den Nieren führt, es aber dennoch selbst nach einem Jahr nicht zur Bildung von enzymveränderten Läsionen in diesen Tieren kommt (Arai et al., 2006).

Fasst man die erhaltenen Ergebnisse zusammen, so kann man schließen, dass oxidative DNA-Schäden und daraus resultierende Mutationen vermutlich einen erheblichen Beitrag zur hohen spontanen Krebsinzidenz in der Bevölkerung leisten.

7 LITERATURVERZEICHNIS

- Aas, P.A., Otterlei, M., Falnes, P.O., Vagbo, C.B., Skorpen, F., Akbari, M., Sundheim, O., Bjoras, M., Slupphaug, G., Seeberg, E. and Krokan, H.E.: Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA. *Nature* 421 (2003) 859-63.
- Aburatani, H., Hippo, Y., Ishida, T., Takashima, R., Matsuba, C., Kodama, T., Takao, M., Yasui, A., Yamamoto, K. and Asano, M.: Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue. *Cancer Res* 57 (1997) 2151-6.
- Althaus, F.R., Hofferer, L., Kleczkowska, H.E., Malanga, M., Naegeli, H., Panzeter, P.L. and Realini, C.A.: Histone shuttling by poly ADP-ribosylation. *Mol Cell Biochem* 138 (1994) 53-9.
- Ames, B.N. and Gold, L.S.: Paracelsus to parascience: the environmental cancer distraction. *Mutat Res* 447 (2000) 3-13.
- Anson, R.M., Hudson, E. and Bohr, V.A.: Mitochondrial endogenous oxidative damage has been overestimated. *Faseb J* 14 (2000) 355-60.
- Arai, K., Morishita, K., Shinmura, K., Kohno, T., Kim, S.R., Nohmi, T., Taniwaki, M., Ohwada, S. and Yokota, J.: Cloning of a human homolog of the yeast OGG1 gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage. *Oncogene* 14 (1997) 2857-61.
- Arai, T., Kelly, V.P., Minowa, O., Noda, T. and Nishimura, S.: The study using wild-type and Ogg1 knockout mice exposed to potassium bromate shows no tumor induction despite an extensive accumulation of 8-hydroxyguanine in kidney DNA. *Toxicology* 221 (2006) 179-86.
- Arnaiz, S.L., Travacio, M., Llesuy, S. and Boveris, A.: Hydrogen peroxide metabolism during peroxisome proliferation by fenofibrate. *Biochim Biophys Acta* 1272 (1995) 175-80.
- Asagoshi, K., Yamada, T., Terato, H., Ohyama, Y., Monden, Y., Arai, T., Nishimura, S., Aburatani, H., Lindahl, T. and Ide, H.: Distinct repair activities of human 7,8-dihydro-8-oxoguanine DNA glycosylase and formamidopyrimidine DNA glycosylase for formamidopyrimidine and 7,8-dihydro-8-oxoguanine. *J Biol Chem* 275 (2000) 4956-64.
- Audebert, M., Radicella, J.P. and Dizdaroglu, M.: Effect of single mutations in the OGG1 gene found in human tumors on the substrate specificity of the Ogg1 protein. *Nucleic Acids Res* 28 (2000) 2672-8.
- Baeuerle, P.A., Rupec, R.A. and Pahl, H.L.: Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. *Pathol Biol (Paris)* 44 (1996) 29-35.

- Bailly, V., Verly, W.G., O'Connor, T. and Laval, J.: Mechanism of DNA strand nicking at apurinic/apyrimidinic sites by *Escherichia coli* [formamidopyrimidine]DNA glycosylase. *Biochem J* 262 (1989) 581-9.
- Ballmaier, D.: Oxidative Sauerstoffmodifikationen durch extrazellulär und intrazellulär gebildete reaktive Sauerstoffspezies. Dissertation, Pharmakologie & Toxikologie, Universität Würzburg (1997).
- Ballmaier, D. and Epe, B.: Oxidative DNA damage induced by potassium bromate under cell-free conditions and in mammalian cells. *Carcinogenesis* 16 (1995) 335-42.
- Ballmaier, D. and Epe, B.: DNA damage by bromate: mechanism and consequences. *Toxicology* 221 (2006) 166-71.
- Bandy, B. and Davison, A.J.: Mitochondrial mutations may increase oxidative stress: implications for carcinogenesis and aging? *Free Radic Biol Med* 8 (1990) 523-39.
- Beckman, K.B. and Ames, B.N.: Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem* 272 (1997) 19633-6.
- Berneburg, M., Kamenisch, Y. and Krutmann, J.: Repair of mitochondrial DNA in aging and carcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci* 5 (2006) 190-8.
- Bjelland, S. and Seeberg, E.: Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res* 531 (2003) 37-80.
- Bjoras, M., Luna, L., Johnsen, B., Hoff, E., Haug, T., Rognes, T. and Seeberg, E.: Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites. *Embo J* 16 (1997) 6314-22.
- Bogenhagen, D.F., Pinz, K.G. and Perez-Jannotti, R.M.: Enzymology of mitochondrial base excision repair. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68 (2001) 257-71.
- Bohr, V.A.: Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 32 (2002) 804-12.
- Bohr, V.A. and Dianov, G.L.: Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie* 81 (1999) 155-60.
- Boiteux, S., O'Connor, T.R. and Laval, J.: Formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli*: cloning and sequencing of the fpg structural gene and overproduction of the protein. *Embo J* 6 (1987) 3177-83.
- Boiteux, S., O'Connor, T.R., Lederer, F., Gouyette, A. and Laval, J.: Homogeneous *Escherichia coli* FPG protein. A DNA glycosylase which excises imidazole ring-opened purines and nicks DNA at apurinic/apyrimidinic sites. *J Biol Chem* 265 (1990) 3916-22.

- Boiteux, S. and Radicella, J.P.: Base excision repair of 8-hydroxyguanine protects DNA from endogenous oxidative stress. *Biochimie* 81 (1999) 59-67.
- Boiteux, S. and Radicella, J.P.: The human OGG1 gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis. *Arch Biochem Biophys* 377 (2000) 1-8.
- Boveris, A., Oshino, N. and Chance, B.: The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128 (1972) 617-30.
- Burkle, A., Brabeck, C., Diefenbach, J. and Beneke, S.: The emerging role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in longevity. *Int J Biochem Cell Biol* 37 (2005) 1043-53.
- Cabrera, M., Nghiem, Y. and Miller, J.H.: mutM, a second mutator locus in *Escherichia coli* that generates G.C----T.A transversions. *J Bacteriol* 170 (1988) 5405-7.
- Cadet, J., Bourdat, A.G., D'Ham, C., Duarte, V., Gasparutto, D., Romieu, A. and Ravanat, J.L.: Oxidative base damage to DNA: specificity of base excision repair enzymes. *Mutat Res* 462 (2000) 121-8.
- Caldecott, K.W.: Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. *Bioessays* 23 (2001) 447-55.
- Caldecott, K.W.: Protein-protein interactions during mammalian DNA single-strand break repair. *Biochem Soc Trans* 31 (2003) 247-51.
- Chevillard, S., Radicella, J.P., Levalois, C., Lebeau, J., Poupon, M.F., Oudard, S., Dutrillaux, B. and Boiteux, S.: Mutations in OGG1, a gene involved in the repair of oxidative DNA damage, are found in human lung and kidney tumours. *Oncogene* 16 (1998) 3083-6.
- Chmiel, N.H., Golinelli, M.P., Francis, A.W. and David, S.S.: Efficient recognition of substrates and substrate analogs by the adenine glycosylase MutY requires the C-terminal domain. *Nucleic Acids Res* 29 (2001) 553-64.
- Citterio, E., Van Den Boom, V., Schnitzler, G., Kanaar, R., Bonte, E., Kingston, R.E., Hoeijmakers, J.H. and Vermeulen, W.: ATP-dependent chromatin remodeling by the Cockayne syndrome B DNA repair-transcription-coupling factor. *Mol Cell Biol* 20 (2000) 7643-53.
- Clayton, D.A., Doda, J.N. and Friedberg, E.C.: The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71 (1974) 2777-81.
- Collins, A.R.: Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays* 21 (1999) 238-46.
- Collins, A.R., Cadet, J., Moller, L., Poulsen, H.E. and Vina, J.: Are we sure we know how to measure 8-oxo-7,8-dihydroguanine in DNA from human cells? *Arch Biochem Biophys* 423 (2004) 57-65.

- Corton, J.C., Lapinskas, P.J. and Gonzalez, F.J.: Central role of PPARalpha in the mechanism of action of hepatocarcinogenic peroxisome proliferators. *Mutat Res* 448 (2000) 139-51.
- Costa, R.M., Chigancas, V., Galhardo Rda, S., Carvalho, H. and Menck, C.F.: The eukaryotic nucleotide excision repair pathway. *Biochimie* 85 (2003) 1083-99.
- Cotter, D., Guda, P., Fahy, E. and Subramaniam, S.: MitoProteome: mitochondrial protein sequence database and annotation system. *Nucleic Acids Res* 32 (2004) D463-7.
- D'Ham, C., Romieu, A., Jaquinod, M., Gasparutto, D. and Cadet, J.: Excision of 5,6-dihydroxy-5,6-dihydrothymine, 5,6-dihydrothymine, and 5-hydroxycytosine from defined sequence oligonucleotides by *Escherichia coli* endonuclease III and Fpg proteins: kinetic and mechanistic aspects. *Biochemistry* 38 (1999) 3335-44.
- Dantzer, F., Ame, J.C., Schreiber, V., Nakamura, J., Menissier-de Murcia, J. and de Murcia, G.: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during DNA damage and repair. *Methods Enzymol* 409 (2006) 493-510.
- Dantzer, F., de La Rubia, G., Menissier-De Murcia, J., Hostomsky, Z., de Murcia, G. and Schreiber, V.: Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry* 39 (2000) 7559-69.
- de Laat, W.L., Jaspers, N.G. and Hoeijmakers, J.H.: Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev* 13 (1999) 768-85.
- de Murcia, J.M., Niedergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Mark, M., Oliver, F.J., Masson, M., Dierich, A., LeMeur, M., Walztinger, C., Chambon, P. and de Murcia, G.: Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 7303-7.
- de Souza-Pinto, N.C., Eide, L., Hogue, B.A., Thybo, T., Stevnsner, T., Seeberg, E., Klungland, A. and Bohr, V.A.: Repair of 8-oxodeoxyguanosine lesions in mitochondrial dna depends on the oxoguanine dna glycosylase (OGG1) gene and 8-oxoguanine accumulates in the mitochondrial dna of OGG1-defective mice. *Cancer Res* 61 (2001a) 5378-81.
- de Souza-Pinto, N.C., Hogue, B.A. and Bohr, V.A.: DNA repair and aging in mouse liver: 8-oxodG glycosylase activity increase in mitochondrial but not in nuclear extracts. *Free Radic Biol Med* 30 (2001b) 916-23.
- Demple, B. and DeMott, M.S.: Dynamics and diversions in base excision DNA repair of oxidized abasic lesions. *Oncogene* 21 (2002) 8926-34.
- Devasagayam, T.P., Steenken, S., Obendorf, M.S., Schulz, W.A. and Sies, H.: Formation of 8-hydroxy(deoxy)guanosine and generation of strand breaks at guanine residues in DNA by singlet oxygen. *Biochemistry* 30 (1991) 6283-9.

- Dhenaut, A., Boiteux, S. and Radicella, J.P.: Characterization of the hOGG1 promoter and its expression during the cell cycle. *Mutat Res* 461 (2000) 109-18.
- Dherin, C., Radicella, J.P., Dizdaroglu, M. and Boiteux, S.: Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human alpha-hOgg1 protein and the polymorphic alpha-hOgg1(Ser326Cys) protein which is frequently found in human populations. *Nucleic Acids Res* 27 (1999) 4001-7.
- Dianov, G.L., Souza-Pinto, N., Nyaga, S.G., Thybo, T., Stevnsner, T. and Bohr, V.A.: Base excision repair in nuclear and mitochondrial DNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68 (2001) 285-97.
- Dizdaroglu, M.: Oxidative damage to DNA in mammalian chromatin. *Mutat Res* 275 (1992) 331-42.
- Dizdaroglu, M.: Base-excision repair of oxidative DNA damage by DNA glycosylases. *Mutat Res* 591 (2005) 45-59.
- Dolle, M.E., Busuttil, R.A., Garcia, A.M., Wijnhoven, S., van Drunen, E., Niedernhofer, L.J., van der Horst, G., Hoeijmakers, J.H., van Steeg, H. and Vijg, J.: Increased genomic instability is not a prerequisite for shortened lifespan in DNA repair deficient mice. *Mutat Res* 596 (2006) 22-35.
- Dou, H., Mitra, S. and Hazra, T.K.: Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2. *J Biol Chem* 278 (2003) 49679-84.
- Doudican, N.A., Song, B., Shadel, G.S. and Doetsch, P.W.: Oxidative DNA damage causes mitochondrial genomic instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 25 (2005) 5196-204.
- Duncan, T., Trewick, S.C., Koivisto, P., Bates, P.A., Lindahl, T. and Sedgwick, B.: Reversal of DNA alkylation damage by two human dioxygenases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 16660-5.
- Dycaico, M.J., Provost, G.S., Kretz, P.L., Ransom, S.L., Moores, J.C. and Short, J.M.: The use of shuttle vectors for mutation analysis in transgenic mice and rats. *Mutat Res* 307 (1994) 461-78.
- Ekstrand, M.I., Falkenberg, M., Rantanen, A., Park, C.B., Gaspari, M., Hultenby, K., Rustin, P., Gustafsson, C.M. and Larsson, N.G.: Mitochondrial transcription factor A regulates mtDNA copy number in mammals. *Hum Mol Genet* 13 (2004) 935-44.
- Epe, B.: DNA damage profiles induced by oxidising agents. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 127 (1995) 223-249.
- Epe, B.: Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice? *Biol Chem* 383 (2002) 467-75.

- Epe, B., Mutzel, P. and Adam, W.: DNA damage by oxygen radicals and excited state species: a comparative study using enzymatic probes in vitro. *Chem Biol Interact* 67 (1988) 149-65.
- Epe, B., Pflaum, M. and Boiteux, S.: DNA damage induced by photosensitizers in cellular and cell-free systems. *Mutat Res* 299 (1993) 135-45.
- Escher, P. and Wahli, W.: Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res* 448 (2000) 121-38.
- ESCODD: Comparative analysis of baseline 8-oxo-7,8-dihydroguanine in mammalian cell DNA, by different methods in different laboratories: an approach to consensus. *Carcinogenesis* 23 (2002) 2129-33.
- ESCODD: Measurement of DNA oxidation in human cells by chromatographic and enzymic methods. *Free Radic Biol Med* 34 (2003) 1089-99.
- Fan, C.Y., Pan, J., Usuda, N., Yeldandi, A.V., Rao, M.S. and Reddy, J.K.: Steatohepatitis, spontaneous peroxisome proliferation and liver tumors in mice lacking peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase. Implications for peroxisome proliferator-activated receptor alpha natural ligand metabolism. *J Biol Chem* 273 (1998) 15639-45.
- Flohr, C., Burkle, A., Radicella, J.P. and Epe, B.: Poly(ADP-ribosyl)ation accelerates DNA repair in a pathway dependent on Cockayne syndrome B protein. *Nucleic Acids Res* 31 (2003) 5332-7.
- Fortini, P., Parlanti, E., Sidorkina, O.M., Laval, J. and Dogliotti, E.: The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells. *J Biol Chem* 274 (1999) 15230-6.
- Fortini, P., Pascucci, B., Parlanti, E., D'Errico, M., Simonelli, V. and Dogliotti, E.: 8-Oxoguanine DNA damage: at the crossroad of alternative repair pathways. *Mutat Res* 531 (2003) 127-39.
- Friedberg, E.C.: How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer* 1 (2001) 22-33.
- Frith, C.H., Highman, B., Burger, G. and Sheldon, W.D.: Spontaneous lesions in virgin and retired breeder BALB/c and C57BL/6 mice. *Lab Anim Sci* 33 (1983) 273-86.
- Galloway, S.M., Johnson, T.E., Armstrong, M.J. and Ashby, J.: The genetic toxicity of the peroxisome proliferator class of rodent hepatocarcinogen. *Mutat Res* 448 (2000) 153-8.
- Gary, R., Kim, K., Cornelius, H.L., Park, M.S. and Matsumoto, Y.: Proliferating cell nuclear antigen facilitates excision in long-patch base excision repair. *J Biol Chem* 274 (1999) 4354-63.
- Gold, L.S., Slone, T.H., Stern, B.R., Manley, N.B. and Ames, B.N.: Rodent carcinogens: setting priorities. *Science* 258 (1992) 261-5.

- Graziewicz, M.A., Day, B.J. and Copeland, W.C.: The mitochondrial DNA polymerase as a target of oxidative damage. *Nucleic Acids Res* 30 (2002) 2817-24.
- Griffith, O.W.: Glutathione and glutathione disulphide. In: Bernt, E., Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of enzymatic analysis* (1985) 522-529.
- Griffith, O.W. and Meister, A.: Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *J Biol Chem* 254 (1979) 7558-60.
- Grollman, A.P. and Moriya, M.: Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within. *Trends Genet* 9 (1993) 246-9.
- Gros, L., Saporbaev, M.K. and Laval, J.: Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. *Oncogene* 21 (2002) 8905-25.
- Hagiwara, A., Kitajima, Y., Sato, S. and Miyazaki, K.: Allelic loss of the DNA repair gene OGG1 against oxidative damage in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 13 (2005) 1009-16.
- Halangoda, A., Still, J.G., Hill, K.A. and Sommer, S.S.: Spontaneous microdeletions and microinsertions in a transgenic mouse mutation detection system: analysis of age, tissue, and sequence specificity. *Environ Mol Mutagen* 37 (2001) 311-23.
- Halliwell, B. and Aruoma, O.I.: DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281 (1991) 9-19.
- Hamilton, M.L., Van Remmen, H., Drake, J.A., Yang, H., Guo, Z.M., Kewitt, K., Walter, C.A. and Richardson, A.: Does oxidative damage to DNA increase with age? *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 10469-74.
- Hanefeld, M., Kemmer, C. and Kadner, E.: Relationship between morphological changes and lipid-lowering action of p-chlorophenoxyisobutyric acid (CPIB) on hepatic mitochondria and peroxisomes in man. *Atherosclerosis* 46 (1983) 239-46.
- Hayakawa, M., Hattori, K., Sugiyama, S. and Ozawa, T.: Age-associated oxygen damage and mutations in mitochondrial DNA in human hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 189 (1992) 979-85.
- Hayashi, F., Tamura, H., Yamada, J., Kasai, H. and Suga, T.: Characteristics of the hepatocarcinogenesis caused by dehydroepiandrosterone, a peroxisome proliferator, in male F-344 rats. *Carcinogenesis* 15 (1994) 2215-9.
- Hays, T., Rusyn, I., Burns, A.M., Kennett, M.J., Ward, J.M., Gonzalez, F.J. and Peters, J.M.: Role of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha) in bezafibrate-induced hepatocarcinogenesis and cholestasis. *Carcinogenesis* 26 (2005) 219-27.

- Heddle, J.A.: A rapid in vivo test for chromosomal damage. *Mutat Res* 18 (1973) 187-90.
- Hegler, J., Bittner, D., Boiteux, S. and Epe, B.: Quantification of oxidative DNA modifications in mitochondria. *Carcinogenesis* 14 (1993) 2309-12.
- Heinmoller, P.W., Hill, K.A. and Sommer, S.S.: High plating density improves Big Blue system efficiency without loss of sensitivity. *Mutat Res* 453 (2000) 97-103.
- Helbock, H.J., Beckman, K.B., Shigenaga, M.K., Walter, P.B., Woodall, A.A., Yeo, H.C. and Ames, B.N.: DNA oxidation matters: the HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 288-93.
- Hengstler, J.G., Utesch, D., Steinberg, P., Platt, K.L., Diener, B., Ringel, M., Swales, N., Fischer, T., Biefang, K., Gerl, M., Bottger, T. and Oesch, F.: Cryopreserved primary hepatocytes as a constantly available in vitro model for the evaluation of human and animal drug metabolism and enzyme induction. *Drug Metab Rev* 32 (2000) 81-118.
- Hill, K.A., Buettner, V.L., Halangoda, A., Kunishige, M., Moore, S.R., Longmate, J., Scaringe, W.A. and Sommer, S.S.: Spontaneous mutation in Big Blue mice from fetus to old age: tissue-specific time courses of mutation frequency but similar mutation types. *Environ Mol Mutagen* 43 (2004) 110-20.
- Hoivik, D.J., Qualls, C.W., Jr., Mirabile, R.C., Cariello, N.F., Kimbrough, C.L., Colton, H.M., Anderson, S.P., Santostefano, M.J., Morgan, R.J., Dahl, R.R., Brown, A.R., Zhao, Z., Mudd, P.N., Jr., Oliver, W.B., Jr., Brown, H.R. and Miller, R.T.: Fibrates induce hepatic peroxisome and mitochondrial proliferation without overt evidence of cellular proliferation and oxidative stress in cynomolgus monkeys. *Carcinogenesis* 25 (2004) 1757-69.
- Horibata, K., Iwamoto, Y., Kuraoka, I., Jaspers, N.G., Kurimasa, A., Oshimura, M., Ichihashi, M. and Tanaka, K.: Complete absence of Cockayne syndrome group B gene product gives rise to UV-sensitive syndrome but not Cockayne syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 15410-5.
- Huang, C.Y., Wilson, M.W., Lay, L.T., Chow, C.K., Robertson, L.W. and Glauert, H.P.: Increased 8-hydroxydeoxyguanosine in hepatic DNA of rats treated with the peroxisome proliferators ciprofibrate and perfluorodecanoic acid. *Cancer Lett* 87 (1994) 223-8.
- Huttermann, J.: Solid-state radiation chemistry of DNA and its constituents. *Ultramicroscopy* 10 (1982) 25-40.
- Issemann, I. and Green, S.: Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* 347 (1990) 645-50.

- Janicijevic, A., Sugasawa, K., Shimizu, Y., Hanaoka, F., Wijgers, N., Djurica, M., Hoeijmakers, J.H. and Wyman, C.: DNA bending by the human damage recognition complex XPC-HR23B. *DNA Repair (Amst)* 2 (2003) 325-36.
- Johnson, D. and Lardy, H.: Isolation of liver and kidney mitochondria. *Methods Enzymol* 10 (1967) 94-96.
- Jurado, J., Sapparbaev, M., Matray, T.J., Greenberg, M.M. and Laval, J.: The ring fragmentation product of thymidine C5-hydrate when present in DNA is repaired by the *Escherichia coli* Fpg and Nth proteins. *Biochemistry* 37 (1998) 7757-63.
- Kang, D., Nishida, J., Iyama, A., Nakabeppu, Y., Furuichi, M., Fujiwara, T., Sekiguchi, M. and Takeshige, K.: Intracellular localization of 8-oxo-dGTPase in human cells, with special reference to the role of the enzyme in mitochondria. *J Biol Chem* 270 (1995) 14659-65.
- Kanki, T., Nakayama, H., Sasaki, N., Takio, K., Alam, T.I., Hamasaki, N. and Kang, D.: Mitochondrial nucleoid and transcription factor A. *Ann N Y Acad Sci* 1011 (2004) 61-8.
- Karlson, P., Doenecke, D. and Koolman, J.: *Lehrbuch der Biochemie*. 14. Auflage (1993) p. 360.
- Kasai, H., Chung, M.H., Yamamoto, F., Ohtsuka, E., Laval, J., Grollman, A.P. and Nishimura, S.: Formation, inhibition of formation, and repair of oxidative 8-hydroxyguanine DNA damage. *Basic Life Sci* 61 (1993) 257-62.
- Kehrer, J.P.: The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 149 (2000) 43-50.
- Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K. and Wahli, W.: Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 2160-4.
- Klaunig, J.E., Babich, M.A., Baetcke, K.P., Cook, J.C., Corton, J.C., David, R.M., DeLuca, J.G., Lai, D.Y., McKee, R.H., Peters, J.M., Roberts, R.A. and Fenner-Crisp, P.A.: PPARalpha agonist-induced rodent tumors: modes of action and human relevance. *Crit Rev Toxicol* 33 (2003) 655-780.
- Klein, J.C., Bleeker, M.J., Saris, C.P., Roelen, H.C., Brugghe, H.F., van den Elst, H., van der Marel, G.A., van Boom, J.H., Westra, J.G., Kriek, E. and et al.: Repair and replication of plasmids with site-specific 8-oxodG and 8-AAFdG residues in normal and repair-deficient human cells. *Nucleic Acids Res* 20 (1992) 4437-43.
- Klinedinst, D.K. and Drinkwater, N.R.: Mutagenesis by apurinic sites in normal and ataxia telangiectasia human lymphoblastoid cells. *Mol Carcinog* 6 (1992) 32-42.

- Klotz, L.O.: Reaktive Sauerstoffspezies: Mechanismen der Erzeugung und der (Zyto-)Toxizität. Vorlesungsskript zum DGPT-Kurs "Molekulare Zelltoxikologie" (2003).
- Klungland, A. and Lindahl, T.: Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *Embo J* 16 (1997) 3341-8.
- Klungland, A., Rosewell, I., Hollenbach, S., Larsen, E., Daly, G., Epe, B., Seeberg, E., Lindahl, T. and Barnes, D.E.: Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 13300-5.
- Kohler, S.W., Provost, G.S., Kretz, P.L., Fieck, A., Sorge, J.A. and Short, J.M.: The use of transgenic mice for short-term, in vivo mutagenicity testing. *Genet Anal Tech Appl* 7 (1990) 212-8.
- Kohn, K.W., Erickson, L.C., Ewig, R.A. and Friedman, C.A.: Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution. *Biochemistry* 15 (1976) 4629-37.
- Kolodner, R.D. and Marsischky, G.T.: Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* 9 (1999) 89-96.
- Kraus, W.L. and Lis, J.T.: PARP goes transcription. *Cell* 113 (2003) 677-83.
- Krokan, H.E., Nilsen, H., Skorpen, F., Otterlei, M. and Slupphaug, G.: Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett* 476 (2000) 73-7.
- Kuipers, G.K., Poldervaart, H.A., Slotman, B.J. and Lafleur, M.V.: The influence of formamidopyrimidine-DNA glycosylase on the spontaneous and gamma-radiation-induced mutation spectrum of the lacZ alpha gene. *Mutat Res* 435 (1999) 141-50.
- Kuipers, G.K., Slotman, B.J., Poldervaart, H.A., Reitsma-Wijker, C.A. and Lafleur, M.V.: The influence of combined Fpg- and MutY-deficiency on the spontaneous and gamma-radiation-induced mutation spectrum in the lacZalpha gene of m13mp10. *Mutat Res* 461 (2000) 189-95.
- Kunau, W.H., Dommes, V. and Schulz, H.: beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res* 34 (1995) 267-342.
- Kurokawa, Y., Maekawa, A., Takahashi, M. and Hayashi, Y.: Toxicity and carcinogenicity of potassium bromate--a new renal carcinogen. *Environ Health Perspect* 87 (1990) 309-35.
- Laine, J.P. and Egly, J.M.: When transcription and repair meet: a complex system. *Trends Genet* (2006).
- Lakshmipathy, U. and Campbell, C.: The human DNA ligase III gene encodes nuclear and mitochondrial proteins. *Mol Cell Biol* 19 (1999) 3869-76.

- Larsen, N.B., Rasmussen, M. and Rasmussen, L.J.: Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways? *Mitochondrion* 5 (2005) 89-108.
- Lawrence, C.W., Borden, A., Banerjee, S.K. and LeClerc, J.E.: Mutation frequency and spectrum resulting from a single abasic site in a single-stranded vector. *Nucleic Acids Res* 18 (1990) 2153-7.
- Le Page, F., Kwoh, E.E., Avrutskaya, A., Gentil, A., Leadon, S.A., Sarasin, A. and Cooper, P.K.: Transcription-coupled repair of 8-oxoguanine: requirement for XPG, TFIIH, and CSB and implications for Cockayne syndrome. *Cell* 101 (2000) 159-71.
- LeDoux, S.P., Wilson, G.L., Beecham, E.J., Stevnsner, T., Wassermann, K. and Bohr, V.A.: Repair of mitochondrial DNA after various types of DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis* 13 (1992) 1967-73.
- Lee, H.C. and Wei, Y.H.: Mitochondrial alterations, cellular response to oxidative stress and defective degradation of proteins in aging. *Biogerontology* 2 (2001) 231-44.
- Lee, Y.S., Choi, J.Y., Park, M.K., Choi, E.M., Kasai, H. and Chung, M.H.: Induction of oh8Gua glycosylase in rat kidneys by potassium bromate (KBrO₃), a renal oxidative carcinogen. *Mutat Res* 364 (1996) 227-33.
- Levin, D.S., Bai, W., Yao, N., O'Donnell, M. and Tomkinson, A.E.: An interaction between DNA ligase I and proliferating cell nuclear antigen: implications for Okazaki fragment synthesis and joining. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 12863-8.
- Licht, C.L., Stevnsner, T. and Bohr, V.A.: Cockayne syndrome group B cellular and biochemical functions. *Am J Hum Genet* 73 (2003) 1217-39.
- Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A. and Hemminki, K.: Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 343 (2000) 78-85.
- Lindahl, T.: Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362 (1993) 709-15.
- Lindahl, T., Karran, P. and Wood, R.D.: DNA excision repair pathways. *Curr Opin Genet Dev* 7 (1997) 158-69.
- Lloyd, R.S., Haidle, C.W. and Robberson, D.L.: Bleomycin-specific fragmentation of double-stranded DNA. *Biochemistry* 17 (1978) 1890-6.
- Lock, E.A., Mitchell, A.M. and Elcombe, C.R.: Biochemical mechanisms of induction of hepatic peroxisome proliferation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 29 (1989) 145-63.

- Loeb, L.A.: Cancer cells exhibit a mutator phenotype. *Adv Cancer Res* 72 (1998) 25-56.
- Loeb, L.A.: A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res* 61 (2001) 3230-9.
- Loeb, L.A., Loeb, K.R. and Anderson, J.P.: Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003) 776-81.
- Loft, S. and Poulsen, H.E.: Cancer risk and oxidative DNA damage in man. *J Mol Med* 74 (1996) 297-312.
- Lu, R., Nash, H.M. and Verdine, G.L.: A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer. *Curr Biol* 7 (1997) 397-407.
- MacGregor, J.T., Wehr, C.M. and Gould, D.H.: Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. *Environ Mutagen* 2 (1980) 509-14.
- Mandavilli, B.S., Santos, J.H. and Van Houten, B.: Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Res* 509 (2002) 127-51.
- Marnett, L.J.: Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21 (2000) 361-70.
- Marsman, D.S., Cattley, R.C., Conway, J.G. and Popp, J.A.: Relationship of hepatic peroxisome proliferation and replicative DNA synthesis to the hepatocarcinogenicity of the peroxisome proliferators di(2-ethylhexyl)phthalate and [4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (Wy-14,643) in rats. *Cancer Res* 48 (1988) 6739-44.
- Marti, T.M., Kunz, C. and Fleck, O.: DNA mismatch repair and mutation avoidance pathways. *J Cell Physiol* 191 (2002) 28-41.
- Mecocci, P., MacGarvey, U. and Beal, M.F.: Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 36 (1994) 747-51.
- Mecocci, P., MacGarvey, U., Kaufman, A.E., Koontz, D., Shoffner, J.M., Wallace, D.C. and Beal, M.F.: Oxidative damage to mitochondrial DNA shows marked age-dependent increases in human brain. *Ann Neurol* 34 (1993) 609-16.
- Michaels, M.L., Pham, L., Nghiem, Y., Cruz, C. and Miller, J.H.: MutY, an adenine glycosylase active on G-A mispairs, has homology to endonuclease III. *Nucleic Acids Res* 18 (1990) 3841-5.
- Michaels, M.L., Tchou, J., Grollman, A.P. and Miller, J.H.: A repair system for 8-oxo-7,8-dihydrodeoxyguanine. *Biochemistry* 31 (1992) 10964-8.
- Minowa, O., Arai, T., Hirano, M., Monden, Y., Nakai, S., Fukuda, M., Itoh, M., Takano, H., Hippou, Y., Aburatani, H., Masumura, K., Nohmi, T., Nishimura, S. and Noda, T.: Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 4156-61.

- Miquel, J.: An integrated theory of aging as the result of mitochondrial-DNA mutation in differentiated cells. *Arch Gerontol Geriatr* 12 (1991) 99-117.
- Miyako, K., Takamatsu, C., Umeda, S., Tajiri, T., Furuichi, M., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M., Hamasaki, N., Takeshige, K. and Kang, D.: Accumulation of adenine DNA glycosylase-sensitive sites in human mitochondrial DNA. *J Biol Chem* 275 (2000) 12326-30.
- Moody, D.E. and Reddy, J.K.: Hepatic peroxisome (microbody) proliferation in rats fed plasticizers and related compounds. *Toxicol Appl Pharmacol* 45 (1978) 497-504.
- Moore, M.H., Gulbis, J.M., Dodson, E.J., Demple, B. and Moody, P.C.: Crystal structure of a suicidal DNA repair protein: the Ada O6-methylguanine-DNA methyltransferase from *E. coli*. *Embo J* 13 (1994) 1495-501.
- Moriya, M.: Single-stranded shuttle phagemid for mutagenesis studies in mammalian cells: 8-oxoguanine in DNA induces targeted G.C-->T.A transversions in simian kidney cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 1122-6.
- Mullis, K.B. and Faloona, F.A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155 (1987) 335-50.
- Nakabeppu, Y.: Regulation of intracellular localization of human MTH1, OGG1, and MYH proteins for repair of oxidative DNA damage. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 68 (2001) 75-94.
- Nance, M.A. and Berry, S.A.: Cockayne syndrome: review of 140 cases. *Am J Med Genet* 42 (1992) 68-84.
- Narayan, S. and Roy, D.: Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer* 2 (2003) 41.
- Nash, H.M., Bruner, S.D., Scharer, O.D., Kawate, T., Addona, T.A., Spooner, E., Lane, W.S. and Verdine, G.L.: Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. *Curr Biol* 6 (1996) 968-80.
- Neto, J.B., Gentil, A., Cabral, R.E. and Sarasin, A.: Mutation spectrum of heat-induced abasic sites on a single-stranded shuttle vector replicated in mammalian cells. *J Biol Chem* 267 (1992) 19718-23.
- Nilakantan, V., Spear, B.T. and Glauert, H.P.: Effect of the peroxisome proliferator ciprofibrate on lipid peroxidation and 8-hydroxydeoxyguanosine formation in transgenic mice with elevated hepatic catalase activity. *Free Radic Biol Med* 24 (1998) 1430-6.
- Nilsen, H. and Krokan, H.E.: Base excision repair in a network of defence and tolerance. *Carcinogenesis* 22 (2001) 987-98.

- Nishioka, K., Ohtsubo, T., Oda, H., Fujiwara, T., Kang, D., Sugimachi, K. and Nakabeppu, Y.: Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs. *Mol Biol Cell* 10 (1999) 1637-52.
- O'Connor, T.R., Boiteux, S. and Laval, J.: Ring-opened 7-methylguanine residues in DNA are a block to in vitro DNA synthesis. *Nucleic Acids Res* 16 (1988) 5879-94.
- O'Connor, T.R., Boiteux, S. and Laval, J.: Repair of imidazole ring-opened purines in DNA: overproduction of the formamidopyrimidine-DNA glycosylase of *Escherichia coli* using plasmids containing the *fpg+* gene. *Ann Ist Super Sanita* 25 (1989) 27-31.
- Ohtsubo, T., Nishioka, K., Imaiso, Y., Iwai, S., Shimokawa, H., Oda, H., Fujiwara, T. and Nakabeppu, Y.: Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria. *Nucleic Acids Res* 28 (2000) 1355-64.
- Osterod, M.: Einfluss genetischer Defekte auf die Reparatur oxidativer DNA-Schäden in Säugerzellen. Dissertation, Pharmakologie & Toxikologie, Universität Mainz (2002).
- Osterod, M., Hollenbach, S., Hengstler, J.G., Barnes, D.E., Lindahl, T. and Epe, B.: Age-related and tissue-specific accumulation of oxidative DNA base damage in 7,8-dihydro-8-oxoguanine-DNA glycosylase (Ogg1) deficient mice. *Carcinogenesis* 22 (2001) 1459-63.
- Osterod, M., Larsen, E., Le Page, F., Hengstler, J.G., Van Der Horst, G.T., Boiteux, S., Klungland, A. and Epe, B.: A global DNA repair mechanism involving the Cockayne syndrome B (CSB) gene product can prevent the in vivo accumulation of endogenous oxidative DNA base damage. *Oncogene* 21 (2002) 8232-9.
- Otterlei, M., Warbrick, E., Nagelhus, T.A., Haug, T., Slupphaug, G., Akbari, M., Aas, P.A., Steinsbekk, K., Bakke, O. and Krokan, H.E.: Post-replicative base excision repair in replication foci. *Embo J* 18 (1999) 3834-44.
- Pascucci, B., Versteegh, A., van Hoffen, A., van Zeeland, A.A., Mullenders, L.H. and Dogliotti, E.: DNA repair of UV photoproducts and mutagenesis in human mitochondrial DNA. *J Mol Biol* 273 (1997) 417-27.
- Paz-Elizur, T., Krupsky, M., Blumenstein, S., Elinger, D., Schechtman, E. and Livneh, Z.: DNA repair activity for oxidative damage and risk of lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 95 (2003) 1312-9.
- Peltomaki, P.: Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 21 (2003) 1174-9.
- Perl, S., Weimer, V., Gassen, H.G.: Das Gehirn - zwischen Perfektion und Katastrophe. *Biologie in unserer Zeit* (2003) pp. 36-44.

- Peters, J.M., Cattley, R.C. and Gonzalez, F.J.: Role of PPAR alpha in the mechanism of action of the nongenotoxic carcinogen and peroxisome proliferator Wy-14,643. *Carcinogenesis* 18 (1997) 2029-33.
- Peters, J.M., Cheung, C. and Gonzalez, F.J.: Peroxisome proliferator-activated receptor-alpha and liver cancer: where do we stand? *J Mol Med* 83 (2005) 774-85.
- Pflaum, M.: Oxidative DNA-Modifikationen durch langwelliges UV-Licht und sichtbares Licht. Dissertation, Pharmakologie & Toxikologie, Universität Würzburg (1996).
- Pflaum, M., Will, O. and Epe, B.: Determination of steady-state levels of oxidative DNA base modifications in mammalian cells by means of repair endonucleases. *Carcinogenesis* 18 (1997) 2225-31.
- Phillips, J. and Eberwine, J.H.: Antisense RNA Amplification: A Linear Amplification Method for Analyzing the mRNA Population from Single Living Cells. *Methods* 10 (1996) 283-8.
- Pitot, H.C.: Altered hepatic foci: their role in murine hepatocarcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30 (1990) 465-500.
- Pleschke, J.M., Kleczkowska, H.E., Strohm, M. and Althaus, F.R.: Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J Biol Chem* 275 (2000) 40974-80.
- Pope, M.A., Porello, S.L. and David, S.S.: Escherichia coli apurinic-apyrimidinic endonucleases enhance the turnover of the adenine glycosylase MutY with G:A substrates. *J Biol Chem* 277 (2002) 22605-15.
- Provost, G.S. and Short, J.M.: Characterization of mutations induced by ethylnitrosourea in seminiferous tubule germ cells of transgenic B6C3F1 mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 6564-8.
- Radicella, J.P., Dherin, C., Desmaze, C., Fox, M.S. and Boiteux, S.: Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 8010-5.
- Rapin, I., Lindenbaum, Y., Dickson, D.W., Kraemer, K.H. and Robbins, J.H.: Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum. *Neurology* 55 (2000) 1442-9.
- Reddy, J.K., Azarnoff, D.L. and Hignite, C.E.: Hypolipidaemic hepatic peroxisome proliferators form a novel class of chemical carcinogens. *Nature* 283 (1980) 397-8.
- Reddy, J.K., Goel, S.K., Nemali, M.R., Carrino, J.J., Laffler, T.G., Reddy, M.K., Sperbeck, S.J., Osumi, T., Hashimoto, T., Lalwani, N.D. and et al.: Transcription regulation of peroxisomal fatty acyl-CoA oxidase and enoyl-CoA hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in rat liver by peroxisome proliferators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 (1986) 1747-51.

- Reddy, J.K. and Lalwai, N.D.: Carcinogenesis by hepatic peroxisome proliferators: evaluation of the risk of hypolipidemic drugs and industrial plasticizers to humans. *Crit Rev Toxicol* 12 (1983) 1-58.
- Reddy, J.K., Moody, D.E., Azarnoff, D.L. and Tomarelli, R.M.: Hepatic effects of some [4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio] acetic acid (WY-14,643) analogs in the mouse. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 225 (1977) 51-7.
- Richter, C., Park, J.W. and Ames, B.N.: Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1988) 6465-7.
- Ringhoffer, M., Schmitt, M., Karbach, J., Jager, E., Oesch, F. and Arand, M.: Quantitative assessment of the expression of melanoma-associated antigens by non-competitive reverse transcription polymerase chain reaction. *Int J Oncol* 19 (2001) 983-9.
- Ringvoll, J., Nordstrand, L.M., Vagbo, C.B., Talstad, V., Reite, K., Aas, P.A., Lauritzen, K.H., Liabakk, N.B., Bjork, A., Doughty, R.W., Falnes, P.O., Krokan, H.E. and Klungland, A.: Repair deficient mice reveal mABH2 as the primary oxidative demethylase for repairing 1meA and 3meC lesions in DNA. *Embo J* 25 (2006) 2189-98.
- Risch, N.: The genetic epidemiology of cancer: interpreting family and twin studies and their implications for molecular genetic approaches. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10 (2001) 733-41.
- Roldan-Arjona, T., Wei, Y.F., Carter, K.C., Klungland, A., Anselmino, C., Wang, R.P., Augustus, M. and Lindahl, T.: Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 8016-20.
- Rosenquist, T.A., Zharkov, D.O. and Grollman, A.P.: Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 7429-34.
- Russo, M.T., De Luca, G., Degan, P., Parlanti, E., Dogliotti, E., Barnes, D.E., Lindahl, T., Yang, H., Miller, J.H. and Bignami, M.: Accumulation of the oxidative base lesion 8-hydroxyguanine in DNA of tumor-prone mice defective in both the Myh and Ogg1 DNA glycosylases. *Cancer Res* 64 (2004) 4411-4.
- Rusyn, I., Denissenko, M.F., Wong, V.A., Butterworth, B.E., Cunningham, M.L., Upton, P.B., Thurman, R.G. and Swenberg, J.A.: Expression of base excision repair enzymes in rat and mouse liver is induced by peroxisome proliferators and is dependent upon carcinogenic potency. *Carcinogenesis* 21 (2000) 2141-5.
- Sakumi, K., Tominaga, Y., Furuichi, M., Xu, P., Tsuzuki, T., Sekiguchi, M. and Nakabeppu, Y.: Ogg1 knockout-associated lung tumorigenesis and its suppression by Mth1 gene disruption. *Cancer Res* 63 (2003) 902-5.

- Salditt, M., Braunstein, S.N., Camerini-Otero, R.D. and Franklin, R.M.: Structure and synthesis of a lipid-containing bacteriophage. X. Improved techniques for the purification of bacteriophage PM2. *Virology* 48 (1972) 259-62.
- Schaaper, R.M.: Suppressors of *Escherichia coli* mutT: antimutators for DNA replication errors. *Mutat Res* 350 (1996) 17-23.
- Schapira, A.H.: Mitochondrial involvement in Parkinson's disease, Huntington's disease, hereditary spastic paraplegia and Friedreich's ataxia. *Biochim Biophys Acta* 1410 (1999) 159-70.
- Scharer, O.D.: Chemistry and biology of DNA repair. *Angew Chem Int Ed Engl* 42 (2003) 2946-74.
- Scharer, O.D. and Jiricny, J.: Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *Bioessays* 23 (2001) 270-81.
- Schrader, M. and Fahimi, H.D.: Mammalian peroxisomes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol* 122 (2004) 383-93.
- Seeberg, E., Eide, L. and Bjoras, M.: The base excision repair pathway. *Trends Biochem Sci* 20 (1995) 391-7.
- Seglen, P.O.: Preparation of isolated rat liver cells. *Methods Cell Biol* 13 (1976) 29-83.
- Sekiguchi, M. and Tsuzuki, T.: Oxidative nucleotide damage: consequences and prevention. *Oncogene* 21 (2002) 8895-904.
- Shall, S. and de Murcia, G.: Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat Res* 460 (2000) 1-15.
- Shibutani, S., Takeshita, M. and Grollman, A.P.: Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349 (1991) 431-4.
- Shinmura, K., Kohno, T., Kasai, H., Koda, K., Sugimura, H. and Yokota, J.: Infrequent mutations of the hOGG1 gene, that is involved in the excision of 8-hydroxyguanine in damaged DNA, in human gastric cancer. *Jpn J Cancer Res* 89 (1998) 825-8.
- Sies, H.: Oxidative Stress: introduction. In: Sies, H. (Ed.), *Oxidative Stress, Oxidants and Antioxidants*. Academic Press, San Diego, CA, pp. XV - XXII. (1991).
- Sies, H.: Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215 (1993) 213-9.
- Slupphaug, G., Kavli, B. and Krokan, H.E.: The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res* 531 (2003) 231-51.

- Slupphaug, G., Olsen, L.C., Helland, D., Aasland, R. and Krokan, H.E.: Cell cycle regulation and in vitro hybrid arrest analysis of the major human uracil-DNA glycosylase. *Nucleic Acids Res* 19 (1991) 5131-7.
- Spivak, G.: The many faces of Cockayne syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (2004) 15273-4.
- Stevnsner, T., Nyaga, S., de Souza-Pinto, N.C., van der Horst, G.T., Gorgels, T.G., Hogue, B.A., Thorslund, T. and Bohr, V.A.: Mitochondrial repair of 8-oxoguanine is deficient in Cockayne syndrome group B. *Oncogene* 21 (2002) 8675-82.
- Stuart, J.A., Bourque, B.M., de Souza-Pinto, N.C. and Bohr, V.A.: No evidence of mitochondrial respiratory dysfunction in OGG1-null mice deficient in removal of 8-oxodeoxyguanine from mitochondrial DNA. *Free Radic Biol Med* 38 (2005) 737-45.
- Sugasawa, K., Ng, J.M., Masutani, C., Iwai, S., van der Spek, P.J., Eker, A.P., Hanaoka, F., Bootsma, D. and Hoeijmakers, J.H.: Xeroderma pigmentosum group C protein complex is the initiator of global genome nucleotide excision repair. *Mol Cell* 2 (1998) 223-32.
- Suter, M. and Richter, C.: Fragmented mitochondrial DNA is the predominant carrier of oxidized DNA bases. *Biochemistry* 38 (1999) 459-64.
- Svejstrup, J.Q.: Mechanisms of transcription-coupled DNA repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3 (2002) 21-9.
- Takagi, A., Sai, K., Umemura, T., Hasegawa, R. and Kurokawa, Y.: Relationship between hepatic peroxisome proliferation and 8-hydroxydeoxyguanosine formation in liver DNA of rats following long-term exposure to three peroxisome proliferators; di(2-ethylhexyl) phthalate, aluminium clofibrate and simfibrate. *Cancer Lett* 53 (1990) 33-8.
- Takao, M., Aburatani, H., Kobayashi, K. and Yasui, A.: Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res* 26 (1998) 2917-22.
- Tani, M., Shinmura, K., Kohno, T., Shiroishi, T., Wakana, S., Kim, S.R., Nohmi, T., Kasai, H., Takenoshita, S., Nagamachi, Y. and Yokota, J.: Genomic structure and chromosomal localization of the mouse Ogg1 gene that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in DNA damage. *Mamm Genome* 9 (1998) 32-7.
- Tchou, J. and Grollman, A.P.: Repair of DNA containing the oxidatively-damaged base, 8-oxoguanine. *Mutat Res* 299 (1993) 277-87.
- Tell, G., Crivellato, E., Pines, A., Paron, I., Pucillo, C., Manzini, G., Bandiera, A., Kelley, M.R., Di Loreto, C. and Damante, G.: Mitochondrial localization of APE/Ref-1 in thyroid cells. *Mutat Res* 485 (2001) 143-52.

- Teoule, R.: Radiation-induced DNA damage and its repair. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med* 51 (1987) 573-89.
- Thorslund, T., von Kobbe, C., Harrigan, J.A., Indig, F.E., Christiansen, M., Stevnsner, T. and Bohr, V.A.: Cooperation of the Cockayne syndrome group B protein and poly(ADP-ribose) polymerase 1 in the response to oxidative stress. *Mol Cell Biol* 25 (2005) 7625-36.
- Tomkinson, A.E., Bonk, R.T. and Linn, S.: Mitochondrial endonuclease activities specific for apurinic/apyrimidinic sites in DNA from mouse cells. *J Biol Chem* 263 (1988) 12532-7.
- Tsuchimoto, D., Sakai, Y., Sakumi, K., Nishioka, K., Sasaki, M., Fujiwara, T. and Nakabeppu, Y.: Human APE2 protein is mostly localized in the nuclei and to some extent in the mitochondria, while nuclear APE2 is partly associated with proliferating cell nuclear antigen. *Nucleic Acids Res* 29 (2001) 2349-60.
- Tsutakawa, S.E. and Cooper, P.K.: Transcription-coupled repair of oxidative DNA damage in human cells: mechanisms and consequences. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 65 (2000) 201-15.
- Tsuzuki, T., Egashira, A., Igarashi, H., Iwakuma, T., Nakatsuru, Y., Tominaga, Y., Kawate, H., Nakao, K., Nakamura, K., Ide, F., Kura, S., Nakabeppu, Y., Katsuki, M., Ishikawa, T. and Sekiguchi, M.: Spontaneous tumorigenesis in mice defective in the MTH1 gene encoding 8-oxo-dGTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 11456-61.
- Tudek, B., Boiteux, S. and Laval, J.: Biological properties of imidazole ring-opened N7-methylguanine in M13mp18 phage DNA. *Nucleic Acids Res* 20 (1992) 3079-84.
- Turrens, J.F. and Boveris, A.: Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191 (1980) 421-7.
- Ura, K. and Hayes, J.J.: Nucleotide excision repair and chromatin remodeling. *Eur J Biochem* 269 (2002) 2288-93.
- van den Boom, V., Jaspers, N.G. and Vermeulen, W.: When machines get stuck--obstructed RNA polymerase II: displacement, degradation or suicide. *Bioessays* 24 (2002) 780-4.
- Van Remmen, H., Ikeno, Y., Hamilton, M., Pahlavani, M., Wolf, N., Thorpe, S.R., Alderson, N.L., Baynes, J.W., Epstein, C.J., Huang, T.T., Nelson, J., Strong, R. and Richardson, A.: Life-long reduction in MnSOD activity results in increased DNA damage and higher incidence of cancer but does not accelerate aging. *Physiol Genomics* 16 (2003) 29-37.
- Vartanian, V., Lowell, B., Minko, I.G., Wood, T.G., Ceci, J.D., George, S., Ballinger, S.W., Corless, C.L., McCullough, A.K. and Lloyd, R.S.: The metabolic syndrome resulting from a knockout of the NEIL1 DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103 (2006) 1864-9.

- Volker, M., Mone, M.J., Karmakar, P., van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H., van Driel, R., van Zeeland, A.A. and Mullenders, L.H.: Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo. *Mol Cell* 8 (2001) 213-24.
- von Ledebur, M. and Schmid, W.: The micronucleus test. Methodological aspects. *Mutat Res* 19 (1973) 109-17.
- Von Sonntag, C.: The chemical basis of radiation biology. Taylor & Francis, London (1987).
- Wallace, S.S.: Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med* 33 (2002) 1-14.
- Waris, G. and Ahsan, H.: Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. *J Carcinog* 5 (2006) 14.
- Will, O., Gocke, E., Eckert, I., Schulz, I., Pflaum, M., Mahler, H.C. and Epe, B.: Oxidative DNA damage and mutations induced by a polar photosensitizer, Ro19-8022. *Mutat Res* 435 (1999) 89-101.
- Willson, T.M. and Wahli, W.: Peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Curr Opin Chem Biol* 1 (1997) 235-41.
- Winkler, G.S., Sugasawa, K., Eker, A.P., de Laat, W.L. and Hoeijmakers, J.H.: Novel functional interactions between nucleotide excision DNA repair proteins influencing the enzymatic activities of TFIIH, XPG, and ERCC1-XPF. *Biochemistry* 40 (2001) 160-5.
- Wiseman, H. and Halliwell, B.: Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 313 (Pt 1) (1996) 17-29.
- Wood, R.D.: Nucleotide excision repair in mammalian cells. *J Biol Chem* 272 (1997) 23465-8.
- Wood, R.D., Mitchell, M. and Lindahl, T.: Human DNA repair genes, 2005. *Mutat Res* 577 (2005) 275-83.
- Xie, Y., Yang, H., Cunanan, C., Okamoto, K., Shibata, D., Pan, J., Barnes, D.E., Lindahl, T., McIlhatton, M., Fishel, R. and Miller, J.H.: Deficiencies in mouse Myh and Ogg1 result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors. *Cancer Res* 64 (2004) 3096-102.
- Yakes, F.M. and Van Houten, B.: Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 514-9.
- Yeldandi, A.V., Rao, M.S. and Reddy, J.K.: Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. *Mutat Res* 448 (2000) 159-77.

- Young, R.R., Rogers, B.J., Provost, G.S., Short, J.M. and Putman, D.L.: Interlaboratory comparison: liver spontaneous mutant frequency from lambda/lacI transgenic mice (Big Blue) (II). *Mutat Res* 327 (1995) 67-73.
- Yu, S.L., Lee, S.K., Johnson, R.E., Prakash, L. and Prakash, S.: The stalling of transcription at abasic sites is highly mutagenic. *Mol Cell Biol* 23 (2003) 382-8.
- Yu, Z., Chen, J., Ford, B.N., Brackley, M.E. and Glickman, B.W.: Human DNA repair systems: an overview. *Environ Mol Mutagen* 33 (1999) 3-20.
- Ziegler, M. and Oei, S.L.: A cellular survival switch: poly(ADP-ribosylation) stimulates DNA repair and silences transcription. *Bioessays* 23 (2001) 543-8.

Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht:**Publikationen:**

Flohr-Beckhaus, C. Trapp, C. Mahler, HC. Eckert, I. van der Pluijm, I. van der Horst, GT. Tanaka, K. de Murcia, JK. Kaina, B. Klungland, A. and Epe, B.: PARP1 is required for the rapid global repair of oxidative DNA base modifications and inhibits their accumulation in *Ogg1*^{-/-} mice. *under revision*

Trapp, C. Reite, K. Klungland, A. and Epe, B.: Deficiency of the Cockayne syndrom B (CSB) gene aggravates the genomic instability caused by endogenous oxidative DNA base damage in mice. *Oncogene*, *in press*

Trapp, C. and Epe, B.: The basal levels of 8-hydroxyguanine and other oxidative modifications in intact mitochondrial DNA are low even in repair-deficient (*Ogg1*^{-/-}/*Csb*^{-/-}) mice. *submitted*

Trapp, C. Schwarz, M. and Epe, B.: The peroxisome proliferator WY-14,643 promotes hepatocarcinogenesis from endogenously generated oxidative DNA base modifications in repair-deficient *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-} mice. *in preparation*

Vortrag bei Fachtagung:

47. Frühjahrstagung der Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz (April 2006)

C. Trapp, A. Klungland, B. Epe

The peroxisome proliferator WY-14,643 does not induce oxidative DNA damage in repair-deficient *Csb*^{-/-}/*Ogg1*^{-/-} mice.

Posterbeiträge bei Fachtagungen:

Fourth DNA repair workshop on DNA damage and repair: mechanisms and biological consequences, Smolenice Castle, Slowakei (Mai 2004)

C. Trapp, M. Ringel, A. Klungland, B. Epe

Influence of peroxisome proliferators on the level of oxidative DNA base modifications in hepatocytes of *Csb^{-/-}/Ogg1^{-/-}* knockout mice.

Tagung der Gesellschaft für Umwelt- und Mutationsforschung, Würzburg (Oktober 2004)

C. Trapp, M. Ringel, A. Klungland, M. Osterod, B. Epe

Modulation of steady-state levels of oxidative DNA damage by the peroxisome proliferator WY-14,643 in repair-deficient *Ogg1^{-/-}/Csb^{-/-}* knockout mice.

Jahrestagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, Mainz (Oktober 2005)

C. Trapp, A. Klungland, B. Epe

Influence of the peroxisome proliferator WY-14,643 on steady-state levels of oxidative DNA damage in repair-deficient *Ogg1^{-/-}/Csb^{-/-}*-knockout mice..

Tagung der Gesellschaft für Umwelt- und Mutationsforschung, Darmstadt (Februar 2006)

C. Trapp, A. Klungland, B. Epe

Mutagenicity of oxidative DNA base modifications *in vivo*.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Thema

Untersuchungen zur Reparatur und Mutagenität oxidativer DNA-Schäden *in vivo* und deren Bedeutung für die Kanzerogenese

selbstständig und ohne die Benutzung anderer als die angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die Arbeit wurde in gleicher oder abgewandelter Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Unterschrift

