

**Aktivität und relative Schutzwirkung zweier konkurrierender  
DNA-Reparaturwege für O<sup>6</sup>-Methylguanin *in vivo***

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.

der Fakultät für Biologie  
an der  
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
**Inga Michele**  
aus Duisburg

Januar 2013

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie, in der Abteilung DNA-Reparatur am Universitätsklinikum Essen der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Dr. Jürgen Thomale
2. Gutachter: Prof. Dr. George Iliakis

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Hemmo Meyer

Tag der mündlichen Prüfung: 29.05.2013

---

# Inhalt

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>IX</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>Alkylierungsschäden in der DNA und ihre biologische Bedeutung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Reparatur von Alkylierungsschäden in der DNA.....	4
1.2 Direkte Reparatur von DNA-Schäden.....	5
1.2.1 AlkB Homolog ( $\alpha$ -ketoglutarat abhängige Dioxygenase).....	5
1.2.2 Methyl-Guanin-DNA-Methyltransferase (MGMT).....	5
1.3 Behebung von DNA-Schäden durch komplexe Reparatursysteme.....	7
1.3.1 <i>Mismatch-Reparatur</i> (MMR).....	7
1.3.2 Basen-Exzisions-Reparatur (BER).....	9
1.3.3 Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER).....	10
1.3.4 Fanconi Anämie/BRCA-Signalweg (FA).....	14
1.3.5 weitere Reparatursysteme.....	16
1.4 Gleichgewicht zwischen Reparatur und Toleranz von O <sup>6</sup> -meG-Schäden?.....	17
1.5 Zusammenhang zwischen Zytotoxizität, Mutagenese und Karzinogenese von O <sup>6</sup> -Methyguaninschäden.....	17
1.6 Ein alternativer Reparaturweg für O <sup>6</sup> -meG-Läsionen.....	18
<b>2 Ziel der Arbeit</b> .....	<b>20</b>
<b>3 Material und Experimenteller Teil</b> .....	<b>21</b>
3.1 Materialien.....	21
3.1.1 verwendete Geräte.....	21
3.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	22
3.1.3 Antikörper.....	23
3.1.4 DNA-reaktive Substanzen und Inhibitoren.....	23
3.1.5 Kommerzielle „Kits“.....	24
3.1.6 Primer.....	24
3.1.7 Verwendete Mausstämme.....	25
3.1.8 Zelllinien.....	26

3.2 Experimenteller Teil .....	26
3.2.1 Haltung von Mäusen .....	26
3.2.2 Genotypisierung der Mausstämmen .....	26
3.2.3 Behandlung von Mäusen mit MNU.....	29
3.2.4 Behandlung mit Cisplatin <i>in vivo</i> .....	30
3.2.5 Blutentnahme .....	30
3.2.6 Organentnahme.....	31
3.2.7 Diagnostik erkrankter Tiere .....	32
3.2.8 Fixierung von Normal- und Tumorgewebe .....	32
3.2.9 Durchflusszytometrische Analysen (FACS) von T- und B-Zellen aus Knochenmark und Milz .....	33
3.2.10 Cytospin von Suspensionszellen .....	34
3.3 <i>In vivo</i> Mutations-Analyse mit Hilfe des <i>lacZ</i> -transgenen Mausmodells (“ <i>small blue mouse</i> “ model) .....	34
3.3.1 Gewinnung des <i>lacZ</i> -Plasmids aus genomischer DNA .....	37
3.3.2 Elektroporation von <i>E. coli</i> -Bakterien .....	39
3.3.3 Mutationsanalyse .....	40
3.3.4 Isolation der Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> .....	43
3.3.5 Sequenzierung des <i>lacZ</i> -Gens.....	44
3.4 DNA-Extraktion aus dem Lebergewebe der Maus .....	45
3.5 Färbemethoden.....	48
3.5.1 Färbung von Blutaussstrichen .....	48
3.5.2 Detektion von Addukten in der DNA mittels Immunfluoreszenzfärbung .....	49
3.6 Zellkulturmethoden.....	51
3.6.1 Behandlung der Fancl-Zelllinie mit MNU .....	51
3.6.2 Kolonienbildungsversuch (CFA-Sensitivitätstest) .....	52
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>54</b>
4.1 Immunzytologische Messung von O <sup>6</sup> -meG in der DNA von humanen Zelllinien und in unterschiedlichen Zelltypen Reparatur-profizienter und -defizienter Mauslinien.....	54
4.1.1 Beteiligung der Methyl-Guanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) an der Entfernung von O <sup>6</sup> -meG-Schäden.....	56
4.1.2 Beteiligung der Nukleotid-Exzisions-Reparatur an der Entfernung von O <sup>6</sup> -meG-Läsionen aus der DNA .....	58
4.1.2.1 Das DNA-Schadenserkennungsprotein XPC als essentieller Faktor für die MGMT-unabhängige Reparatur von O <sup>6</sup> -meG .....	58
4.1.2.2 Rolle des XPA-Proteins im Reparaturprozess von O <sup>6</sup> -meG .....	61

4.1.3 Rolle einzelner Komponenten des Fanconi Anämie/BRCA-Signalweges bei der Elimination von O <sup>6</sup> -meG-Schäden .....	63
4.1.3.1 Welche Rolle spielt das FancD2-Protein in der O <sup>6</sup> -meG-Reparatur?.....	63
4.1.3.2 Einfluss anderer Komponenten des FA-Signalweges an der Reparatur von O <sup>6</sup> -meG in kultivierten Zellen.....	66
4.1.4 Cisplatin-induzierte „cross-link“ Reparatur durch Komponenten des NER und FA-Signalweges.....	67
4.2 Biologische Folgen durch MNU-induzierte Läsionen in der Maus .....	68
4.2.1 Zytotoxische Auswirkungen nach MNU-Exposition <i>ex vivo</i> und <i>in vivo</i> .....	69
4.2.1.1 Koloniebildung als Indikator für das Zellüberleben von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen nach Gabe von MNU <i>ex vivo</i> .....	69
4.2.1.2 Myelosuppression als Maß für die MNU-Toxizität im hämatopoetischen System.....	70
4.2.2 Inzidenz von MNU-induzierten Tumoren in der Maus .....	75
4.2.2.1 Bildungsrate solider Tumoren nach MNU-Exposition .....	75
4.2.2.2 T-Zell Lymphome als dominanter Tumortyp bei der MNU-induzierten Karzinogenese.....	80
4.2.3 Bestimmung der Mutationsrate anhand des <i>lacZ</i> -transgenen Mausmodells ( <i>“small blue mouse“ model</i> ) .....	85
4.2.3.1 Bestimmung der basalen Mutationsrate aus Zellen des Knochenmarks von Reparatur-profizienten und -defizienten Tieren.....	86
4.2.3.2 Ermittlung der MNU-induzierten Mutationsrate in Reparatur-profizienten und -defizienten Mäusen.....	88
4.2.3.3 Sequenzanalyse von MNU-induzierten Punktmutationen im <i>lacZ</i> -Gen .....	89
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>95</b>
5.1 Der Einfluss des MGMT-Proteins auf die Reparatur von O <sup>6</sup> -meG.....	95
5.2 O <sup>6</sup> -meG wird in primären Mauszellen über einen MGMT-unabhängigen Reparaturweg entfernt, der Komponenten der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) sowie des Fanconi/BRCA-Signalweges (FA) benötigt .....	96
5.2.1 Einfluss der NER-Faktoren auf die O <sup>6</sup> -meG-Reparatur in verschiedenen Zell-/Gewebetypen der Maus.....	97
5.2.2 Zur Rolle von Komponenten des Fanconi Anämie/BRCA-Signalweges (FA) bei der Exzisionsreparatur von O <sup>6</sup> -meG .....	100
5.3 MNU-induzierte DNA-Schäden haben gravierende Effekte auf hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen <i>in vivo</i> .....	103
5.4 Eine reduzierte Reparaturkapazität für O <sup>6</sup> -meG erhöht die Tumorzinzidenz im hämatopoetischen System MNU-behandelter Mäuse .....	106
5.5 MNU-behandelte Mäuse weisen eine stark erhöhte Mutationsrate in ihren hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen auf.....	109

5.6 Andere Proteinkomponenten, die an der Prozessierung von O <sup>6</sup> -meG-Addukten beteiligt sind .....	112
5.7 NER und Chromatin-modulierende Faktoren .....	114
5.8 Fazit und Ausblick.....	116
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>119</b>
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>121</b>
<b>8 Anhang .....</b>	<b>133</b>
Danksagung	
Erklärung	
Lebenslauf	

# Abkürzungsverzeichnis

## Abkürzungen

%	Prozent	DNA	Desoxyribonukleinsäure
(-/-)	Homozygot Knockout	DSB	Doppelstrangbruch
(+/-)	Heterozygot	EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
(+/+)	Homozygot Wildtyp	EMS	Ethylethansulfonat
°C	Grad Celsius	ENU	N-Ethyl-N-nitroseharnstoff
μ	Mikro 10 <sup>-6</sup>	EPO	Erythropoetin
6-4pp	Pyrimidin (6-4) Pyrimidon Photoprodukt	<i>et al.</i>	et alias, und weitere
8-oxoG	8-Oxoguanin	F	<i>Forward</i> (Primer)
A	Adenin	FA	Fanconi Anämie
ABH	<i>Alkylation repair</i> Homolog	Fa	Farad
AFU	<i>arbitrary fluorescence units</i>	FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
AGT	Alkyl-Guanin-Transferase (Prokaryoten <i>E. coli</i> )	FBS	<i>fetal bovine serum</i>
AP	Apurin/Apyrimidin Stellen	FCS	<i>fetal calf serum</i>
ATL	<i>Alkyltransferase like Proteins</i>	g	Gramm
ATM	Ataxia Telangiectasia mutierte Kinase	G	Guanin
ATR	Ataxia Telangiectasia und Rad3-bezogene Kinase	GG-NER	Global genomische Nukleotid-Exzisions-Reparatur
BCNU	Bis-chloroethylnitroseharnstoff	HCL	Salzsäure
BER	Basen-Exzisions-Reparatur	HE	Hämalaun-Eosin
BG	O <sup>6</sup> -Benzylguanin	HHR	Homologe Rekombinations-Reparatur
Bp	Basenpaar	HPRT	Hypoxanthine-Phosphoribosyltransferase
BRCA	<i>breast cancer</i> Protein	<i>i.p.</i>	Intra-peritoneal
BSA	Bovines Serum Albumin	ICA	Immunzytologischer Assay
C	Cytosin	ICL	Interstrang-crosslink
Cen	Centrin 2	IFZ	Institut für Zellbiologie
CFU	<i>colony formation unit</i>	IgG	Immunglobulin G
cm	Zentimeter	IL-3	Interleucin 3
CPD	Cyclobutan Pyrimidin Dimer	IMDM	<i>Iscove's modified Dulbecco's Medium</i>
CS	Cockayne Syndrom	IR	Infrarot
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol	IVC	<i>Individually ventilated Cages</i>
DDB	<i>DNA damage binding Protein</i>	K.O.	knockout
DEB	Diepoxybutan	kV	kilo Volt
dH <sub>2</sub> O	deionisiertes Wasser	L	Liter
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle Medium</i>	LB	Luria Broth
DMSO	Dimethylsulfoxid	M	Mol
MAK	Monoklonaler Antikörper	Pol	Polymerase

MAPO1	<i>O<sup>6</sup>-meG induced apoptosis 1</i>	Prä, Post	vor, nach
mg	Milligramm	Pt-[GpG]	1,2, Platin-GpG-Intrastrang Verknüpfung
MGMT	Methyl-Guanin-Methyltransferase	R	Reverse (Primer)
Min	Minute	Rel.	relative
ml	Milliliter	RFC	<i>Replication factor C</i>
MLH	mutL-Homolog Protein	RNA	Ribonukleinsäure
mm	Millimeter	RPA	Replikation Protein A ( <i>replication protein A</i> )
MMC	Mitomycin C	rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehung pro Minute)
MMR	<i>Mismatch Reparatur</i>	RT	Raumtemperatur
MMS	Methylmethansulfonat	SDS	sodium dodecyl sulfate
MNNG	Methyl-N-nitro-N-Nitrosoguanidin	Sec	Sekunde
MNU	N-Methyl-N-nitroseharnstoff	SN2	Nukleophile Substitution
mSCF	<i>murine stem cell factor</i>	S-Phase	Synthese-Phase im Zellzyklus
MSH	mutS-Homolog Protein	β-Me	β-Mercapthoethanol
n x g	n-fache Erdbeschleunigung	T	Thymin
N	Stickstoff	TAE	Tris/Acetat/EDTA Pufferlösung
NaCL	Natriumchlorid	TC-NER	Transkriptions-gekoppelte Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NaOH	Natriumhydroxid	TE	Tris/EDTA Pufferlösung
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur	TLS	Translänionssynthese
NHEJ	<i>non-homologous end Joining</i>	TMZ	Temozolomid
Ntg	Nicht-transgene Kontrolle	TTD	Trichothiodystrophy
O	Sauerstoff	U	Unit
O <sup>6</sup> -meG	O <sup>6</sup> -Methylguanin	Ub	Ubiquitin
P	Phosphorylierung	UBE2T	Ubiquitin E2 Ligase
PARP1	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1	UK	Uniklinik
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung	UV	Ultraviolett
PBST	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung + Tween20	UvrA/B/C	Exonuklease A/B/C (Prokaryoten <i>E. coli</i> )
PCNA	<i>proliferating cell nuclear Antigen</i>	v/v	Volumenprozent
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion	W	Watt
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin	WT	Wildtyp
P-Gal	phosphoglyceraldehyde	X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid
PGK	phosphoglycerat kinase	XP	Xeroderma Pigmentosum
PMS2	<i>postmeiotic segregation protein 2</i>	XRCC1	<i>X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells</i>



## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> DNA-alkylierende Verbindungen.....	1
<b>Abb. 2:</b> MNU-induzierte Alkylierungsschäden an DNA-Basen .....	2
<b>Abb. 3:</b> Mutagene Effekte durch O <sup>6</sup> -meG-Schäden nach der Replikation .....	3
<b>Abb. 4:</b> Übersicht zu den verschiedenen DNA-Schadenstypen und den wichtigsten zugehörigen Reparatursystemen .....	4
<b>Abb. 5:</b> Reparatur von N-Alkyl-Schäden durch ABH2 und ABH3 Reparaturproteine.....	5
<b>Abb. 6:</b> MGMT-gekoppelte Reparatur von O <sup>6</sup> -meG in der DNA .....	6
<b>Abb. 7:</b> Reparatur von Basenfehlpaarungen durch die <i>Mismatch-Reparatur</i> .....	8
<b>Abb. 8:</b> Reparatur von Basenschäden in der DNA durch die Basen-Exzisions-Reparatur (BER) .....	10
<b>Abb. 9:</b> Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER).....	13
<b>Abb. 10:</b> Aktivierung des FA/BRCA-Signalweges in der DNA.....	15
<b>Abb. 11:</b> Reparatursysteme für die Entfernung von O <sup>6</sup> -meG aus der DNA .....	18
<b>Abb. 12:</b> Genotypen-Nachweis der verwendeten Mauslinien.....	29
<b>Abb. 13:</b> Ablauf einer Blutentnahme aus der <i>V. saphena</i> bei der Maus .....	30
<b>Abb. 14:</b> Ausschnitt des <i>lacZ</i> -Gens.....	35
<b>Abb. 15:</b> Methodischer Überblick der Mutationsanalyse mit Hilfe <i>lacZ</i> -transgener Mauslinien ("small blue mouse" model).....	36
<b>Abb. 16:</b> Nachweis „echter“ <i>lacZ</i> -mutierter Bakterien 24 Stunden nach Inkubation auf einer X-Gal Sensitivitätsplatte .....	40
<b>Abb. 17:</b> Gelanalyse von <i>lacZ</i> -Mutationstypen .....	42
<b>Abb. 18:</b> Blut-Färbung nach Pappenheim (1912) .....	48
<b>Abb. 19:</b> Immunfärbung von O <sup>6</sup> -meG-Addukten in der Kern-DNA von MNU-behandelten humanen Fibroblasten .....	54
<b>Abb. 20:</b> MNU-Dosis-abhängiger Nachweis von O <sup>6</sup> -meG-Addukten in der DNA humaner Fibroblasten .....	55
<b>Abb. 21:</b> Reparaturkinetik von O <sup>6</sup> -meG in der nukleären DNA von Milzlymphozyten nach MNU-Exposition <i>in vivo</i> .....	57
<b>Abb. 22:</b> MGMT-unabhängige Reparatur von O <sup>6</sup> -meG in der DNA von Nierencortex-Zellen und von Hepatozyten nach MNU-Exposition <i>in vivo</i> .....	57
<b>Abb. 23:</b> Reparaturkinetiken für O <sup>6</sup> -meG in Milzlymphozyten von NER-profizienten und -defizienten Mäusen.....	59
<b>Abb. 24:</b> Reparatur von O <sup>6</sup> -meG in MNU-behandelten murinen Cortex-Zellen der Niere <i>in vivo</i> .....	60
<b>Abb. 25:</b> Reparaturkinetiken für O <sup>6</sup> -meG aus Hepatozyten NER-profizienter und -defizienter Mäuse .....	60
<b>Abb. 26:</b> XPA spielt eine untergeordnete Rolle in der O <sup>6</sup> -meG-Reparatur <i>in vivo</i> .....	61
<b>Abb. 27:</b> Ein Verlust der XPA-Funktion verringert die O <sup>6</sup> -meG-Reparatur in murinen Nierencortex-Zellen nur geringfügig .....	62

<b>Abb. 28:</b> XPA-defiziente Maus-Hepatozyten behalten die Fähigkeit O <sup>6</sup> -meG-Schäden aus der DNA zu entfernen.....	63
<b>Abb. 29:</b> Das FancD2-Protein ist essentiell für die Exzisionsreparatur von O <sup>6</sup> -meG <i>in vivo</i> .....	64
<b>Abb. 30:</b> Ein Verlust des FancD2-Proteins führt zu einem Ausfall der O <sup>6</sup> -meG-Reparatur in der Niere.....	65
<b>Abb. 31:</b> Ein Ausfall von FancD2 führt zu einer deutlich erhöhten Konzentration von O <sup>6</sup> -meG in der DNA von Leberzellen .....	65
<b>Abb. 32:</b> Ein Ausfall der FancI-Funktion zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die O <sup>6</sup> -meG-Reparatur in humanen Fibroblasten .....	66
<b>Abb. 33:</b> Einfluss von NER- und FA-Komponenten auf die Reparatur von Intrastrang „cross-links“ <i>in vivo</i> .....	68
<b>Abb. 34:</b> Nachweis von MNU-induzierter Zytotoxizität in hämatopoetischen Zellen der Maus anhand des Kolonienbildungs-Assay <i>ex vivo</i> .....	70
<b>Abb. 35:</b> Der Einfluss unterschiedlicher MNU-Dosen auf die Leukozytenzahl im peripheren Blut der Maus.....	72
<b>Abb. 36:</b> Entwicklung der Leukozytenzahl im peripheren Blut der unbehandelten Maus .....	73
<b>Abb. 37:</b> MNU-induzierte Myelosuppression bei Reparatur-profizienten und –defizienten Mäusen .....	74
<b>Abb. 38:</b> Differenzialblutbild der Maus .....	76
<b>Abb. 39:</b> Überlebenszeitanalyse von verschiedenen Reparatur-profizienten und –defizienten Mäusen nach MNU-Behandlung .....	78
<b>Abb. 40:</b> Eine Depletion der MGMT-Aktivität reduziert die tumorfreie Überlebenszeit von XPA-defizienten Mäusen dramatisch .....	79
<b>Abb. 41:</b> Durchflusszytometrische Bestimmung des T- und B-Zellanteils im Knochenmark von Mäusen nach MNU ± O <sup>6</sup> -BG-Behandlung.....	81
<b>Abb. 42:</b> Durchflusszytometrische Analyse des T- und B-Zellanteils bei Milzlymphozyten von verschiedenen Reparatur-profizienten und –defizienten Mausstämmen nach MNU-Behandlung.....	82
<b>Abb. 43:</b> Beispiel einer Leukämie bei einer MNU-behandelten Maus.....	83
<b>Abb. 44:</b> Zellen aus dem Knochenmark einer gesunden Maus (Wright-Giemsa) .....	83
<b>Abb. 45:</b> Paraffin-Gewebeschnitt des Thymus der Maus (HE-Färbung).....	84
<b>Abb. 46:</b> Paraffin-Gewebeschnitt der Milz bei der Maus (HE-Färbung).....	85
<b>Abb. 47:</b> Bestimmung der basalen Mutationsrate in den hämatopoetischen Zellen von Wildtyp- und von NER-defizienten Mäusen ( <i>lacZ</i> -transgenes Mausmodell).....	87
<b>Abb. 48:</b> MNU-induzierte Mutationsraten in den hämatopoetischen Zellen von Reparatur-profizienten und -defizienten Mäusen.....	89
<b>Abb. 49:</b> MNU-induzierte Punktmutationen im <i>lacZ</i> -Gen .....	91
<b>Abb. 50:</b> Typische O <sup>6</sup> -meG-vermittelte Punktmutation (G:C->A:T) nach MNU-Behandlung .....	94
<b>Abb. 51:</b> Modell der möglichen Interaktionspartner in der O <sup>6</sup> -meG-Reparatur.....	117

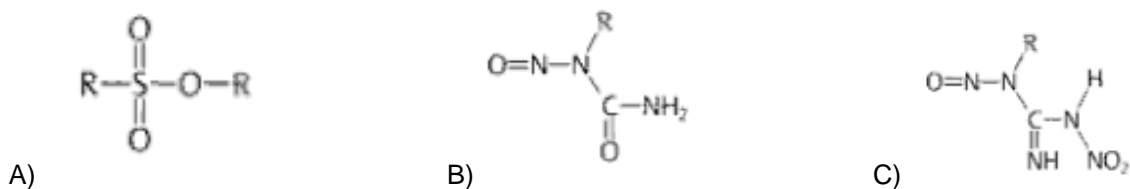
## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Ausgewählte Komponenten der NER und ihre Bedeutung in der Reparatur.....	12
<b>Tab. 2:</b> Primersequenzen für Genotypenbestimmung.....	24
<b>Tab. 3:</b> Primersequenzen für Sequenz-Analysen des <i>lacZ</i> -Plasmids (pUR 288) .....	25
<b>Tab. 4:</b> Eingesetzte Mauslinien .....	25
<b>Tab. 5:</b> Primäre Fibroblastenzelllinie aus Fanconi Patienten.....	26
<b>Tab. 6:</b> PCR-Bedingungen der eingesetzten Mauslinien.....	27
<b>Tab. 7:</b> PCR-Bedingung für die Bestimmung des <i>lacZ</i> -Produktes.....	28
<b>Tab. 8:</b> PCR-Bedingung zur Amplifikation des <i>lacZ</i> -Plasmid Produktes .....	41
<b>Tab. 9:</b> Kulturbedingungen von immortalisierten primären humanen Fancl-Fibroblasten .....	51
<b>Tab. 10:</b> Übersicht der Befunde karzinogener Veränderungen in den MNU ± O <sup>6</sup> -BG-behandelten Mauslinien .....	77
<b>Tab. 11:</b> Übersicht der MNU-induzierten Punktmutationen im <i>lacZ</i> -Gen .....	92
<b>Tab. 12:</b> Veränderungen in der angenommenen Aminosäuresequenz durch MNU-induzierte Punktmutationen im <i>lacZ</i> -Gen.....	92
<b>Tab. 13:</b> Anteil O <sup>6</sup> -meG-induzierter Punktmutationen im <i>lacZ</i> -Gen .....	93

## 1 Einleitung

### Alkylierungsschäden in der DNA und ihre biologische Bedeutung

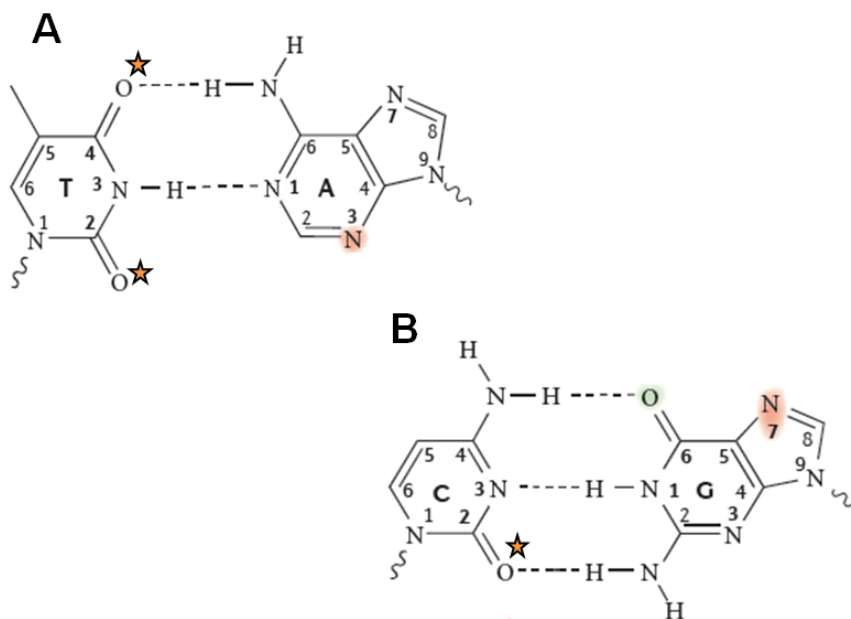
Die genomische Stabilität von Zellen und Organismen wird ständig durch Strukturveränderungen in ihrer DNA gefährdet. Dies kann sowohl das Schicksal von einzelnen terminal differenzierten Zellen beeinflussen, aber auch, falls Stamm- oder Keimzellen betroffen sind, negative Einflüsse auf die Integrität der Nachkommen oder der entsprechenden Zell-Lineage haben. Zu solchen Veränderungen gehören auch DNA-Alkylierungsschäden, die entweder durch endogene Prozesse entstehen oder durch exogene Noxen induziert werden können. Endogen entstehen sie häufig durch sekundäre Amine, den Nitrosaminen, die beispielsweise als Abbauprodukte aus Oxidationsschäden (Lipidperoxidation) entstehen oder aus Metaboliten des Zellstoffwechsels hervorgehen können wie dem S-Adenosylmethionin (Rydberg 1982, Taverna 1996, Jakszyn 2006, Fu 2012). Exogene DNA-reaktive Nitrosamine werden unter anderem auch in Tabakrauch, in Nahrungsmitteln und im Wasser nachgewiesen (Beranek 1990, Tricker 1991, Ministry of Agriculture 1992, Bartsch 1996, Hecht 1999, Wogan 2004). Solche DNA-alkylierenden Substanzen zeigen sowohl zytotoxische als auch mutagene und karzinogene Eigenschaften. Besonders gut untersucht sind in diesem Zusammenhang vor allem methylierende Nitrosamide und Nitrosamine, wie N-Methyl-N-nitrosequanid (MNU) und Methyl-N-nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) oder Alkylsulfate, wie Methylmethansulfonat (MMS) sowie deren homologen Ethyl-Verbindungen, dem N-Ethyl-N-nitrosequanid (ENU) (Abb. 1).



**Abb. 1: DNA-alkylierende Verbindungen:** Auswahl einiger typischer in der Tumor- und Zellforschung eingesetzter alkylierender Verbindungen: A) Alkylalkansulfonat Verbindungen: Methylmethansulfonat (MMS) und Ethylethansulfonat (EMS); B) N-Nitrosequanid Derivate: Methylnitrosequanid (MNU) und Ethylnitrosequanid (ENU); C) N-Alkyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin Verbindungen: N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG); R = Rest (Methyl- [CH<sub>3</sub>] oder Ethyl- [CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>]) (Knippers 2006).

## Einleitung

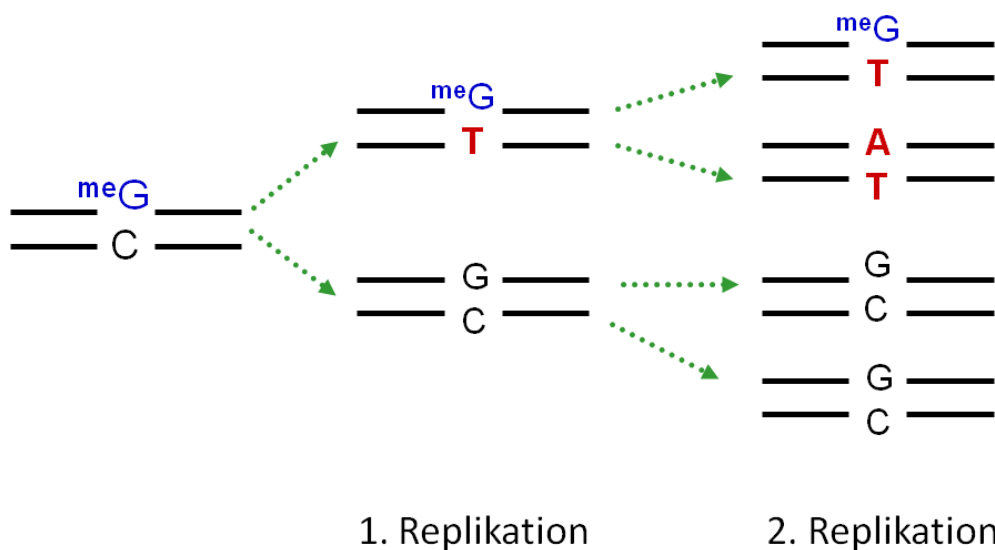
Bei der Reaktion von methylierenden Nitrosamiden wie MNU mit Wasser, entstehen intermediär kurzlebige, hochreaktive Methyl-Diazonium-Ionen, die über eine sogenannte  $S_N2$ -Reaktion (nukleophile Substitution) direkte Alkylierungen in der DNA hervorrufen können (Ford 1990, Ekanayake und Lebreton 2005). Obwohl Sauerstoff (O)-Atome eine deutlich stärkere Bindung alkylierender Substanzen [Oxyphilie] ermöglichen als Stickstoff (N) – Atome, zeigen N-Verbindungen mit 60-80 % aller induzierbaren Alkylierungsschäden den weitaus höchsten Anteil (Beranek 1990, Lu 2005). Dabei sind vor allem die Positionen  $N^7$  des Guanins ( $N^7$ -meG),  $N^3$  des Adenins ( $N^3$ -meA) und  $N^3$  des Guanins ( $N^3$ -meG) durch methylierende Substanzen am stärksten betroffen. Außerdem wird häufig die Phosphatgruppe zwischen den Zuckerresten alkyliert und es bilden sich Alkyl-Phosphotriester-Verbindungen (Dipple 1995). Mit deutlich geringerer Häufigkeit entstehen auch O-Alkylierungsschäden an den Positionen  $O^6$  des Guanins ( $O^6$ -meG) sowie an der  $O^4$ - und  $O^2$ -Position des Thymins ( $O^4$ -meT,  $O^2$ -meT; siehe Abb. 2) (Beranek 1990, Drabløs 2004).



**Abb. 2: MNU-induzierte Alkylierungsschäden an DNA-Basen:** Die Abbildung zeigt die am häufigsten induzierten Alkylierungsschäden durch MNU an den unterschiedlichen Positionen in der DNA an. Es können am Adenin (A) – Thymin (T) (A) Basenpaar sowie am Guanin (G) – Cytosin (C) (B) bis zu 15 verschiedene Schadenstypen durch alkylierende Substanzen auftreten. Die prominentesten Schäden stellen dabei N-Alkylierungen (rot), wie z.B.  $N^7$ -Methylguanin (60-80 %) und  $N^3$ -Methyladenin (7 %) oder O-Alkylierungen (grün), wie  $O^6$ -Methylguanin (8 %) dar. Andere seltene Alkylierungsschäden (★) sind z.B.  $O^4$ -Methylthymidin (0,4 %),  $O^2$ -Methylthymidin (0,1 %),  $O^2$ -Methylcystein (< 0,1%) und andere betroffene N-Positionen (1 %) (modifiziert nach Drabløs 2004, Fu 2012).

## Einleitung

Trotz der geringen Bildungsrate von O-Alkylierungsschäden wird speziell dem O<sup>6</sup>-meG wegen seines mutagenen und karzinogenen Potentials eine weit bedeutsamere biologische Wirkung zugeschrieben als den N-Alkylierungsschäden (Gerson 2004, Roos 2004, Kaina 2007, Fu 2012). Das mutagene Potential des O<sup>6</sup>-meG entwickelt sich aus einer Basenfehlpaarung während der Replikation (Pegg 1984). Eine Alkylgruppe an dem O<sup>6</sup>-Atom des Guanin verändert die Basenpaarung durch den Verlust einer Wasserstoffbrückenbindung, so dass während der Replikation im neusynthetisierten Strang fälschlicherweise ein Thymin anstelle eines Cytosins eingebaut wird. Es entsteht eine O<sup>6</sup>-meG:T Basenfehlpaarung. Ohne Reparatur führt diese Fehlpaarung in der nächsten Replikation einerseits zu einer erneuten O<sup>6</sup>-meG:C → O<sup>6</sup>-meG:T Basenfehlpaarung in der nachfolgenden Tochterzelle, andererseits zu einer persistierenden G:C nach A:T Mutation im Genom. Dieser Prozess scheint die Hauptursache für die mutagene Wirkung von O<sup>6</sup>-G-alkylierenden Substanzen zu sein (Margison 2002) (Abb. 3).



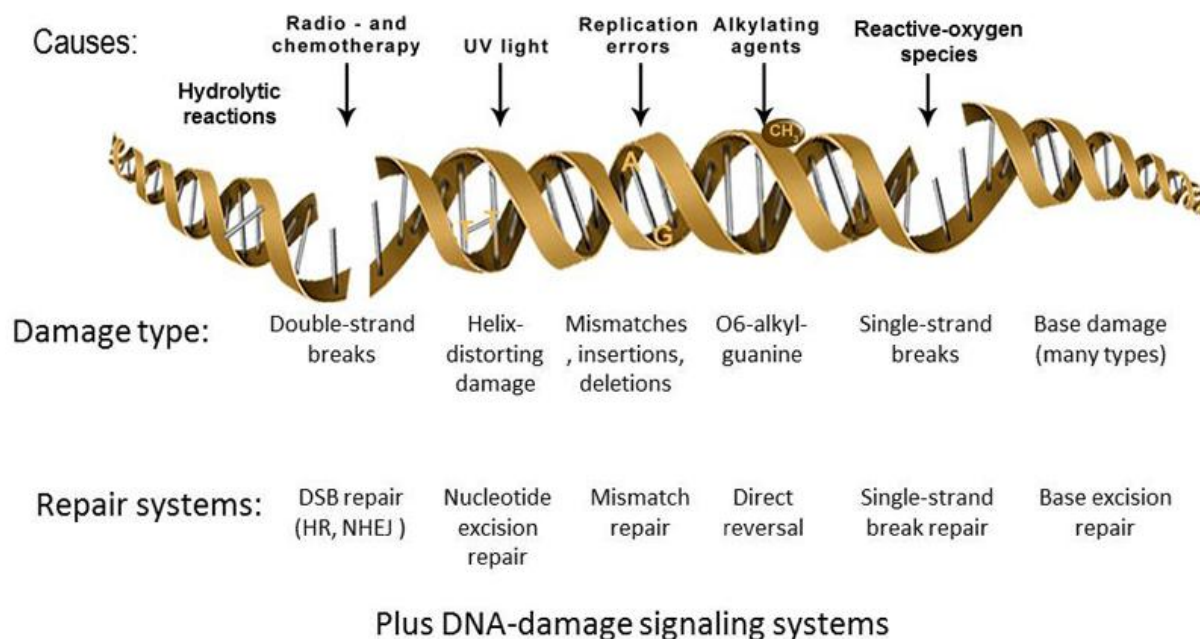
**Abb. 3: Mutagene Effekte durch O<sup>6</sup>-meG-Schäden nach der Replikation:** Bei Abwesenheit spezifischer Reparatursysteme für O<sup>6</sup>-meG können während der ersten zwei Replikationszyklen sowohl zytotoxische Vorgänge als auch Mutationen ausgelöst werden. Dabei verursacht ein O<sup>6</sup>-meG in der DNA (blau) nach der ersten Replikation zunächst eine O<sup>6</sup>-meG:C→O<sup>6</sup>-meG:T Basenfehlpaarung, die nach der zweiten Replikation in je einer der vier Tochterzellen eine weitere O<sup>6</sup>-meG:C→O<sup>6</sup>-meG:T Basenfehlpaarung (blau/rot) und zudem eine A:T Mutation (rot) induziert.

Neben seiner mutagenen Wirkung ist auch der zytotoxische Effekt von persistierenden O<sup>6</sup>-meG-Addukten lange bekannt, ohne das man diesen auf vergleichsweise einfache Mechanismen wie einer Transkriptionsblockade

zurückführen kann. Die derzeit gültige Hypothese zur zytotoxischen Wirkung dieser DNA-Läsion ist relativ komplex und wird in Kap. 1.3.1 näher erläutert.

## 1.1 Reparatur von Alkylierungsschäden in der DNA

Viele der durch Basenalkylierung induzierten strukturellen Veränderungen in der DNA sind von großer Bedeutung, da sie nicht nur zytotoxische sondern auch mutagene und karzinogene Effekte im Organismus auslösen können. Werden diese Schäden nicht repariert, kann es durch die Entstehung von Mutationen zu chromosomalen Veränderungen kommen, die eine Progression von malignen Transformationen begünstigt oder aber zum Zelltod führt (Sugasawa 1998). Deshalb ist die Reparatur solcher Schäden für das Überleben des Organismus essenziell. In den letzten Jahren sind viele unterschiedliche Reparatursysteme entdeckt worden, die sich in Komplexität, Spezifität und Effizienz unterscheiden (Liu und Gerson 2006). Sie können DNA-Schäden entweder direkt über kleine Reparaturproteine oder mit Hilfe komplexer Reparaturwege entfernen (Abb. 4).



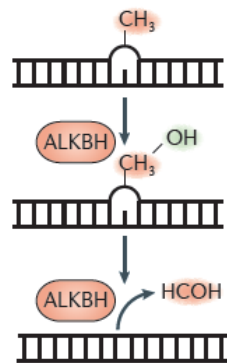
**Abb. 4: Übersicht zu den verschiedenen DNA-Schadenstypen und den wichtigsten zugehörigen Reparatursystemen:** Jedes Reparatursystem besitzt ein Spektrum an DNA-Schäden, die effizient repariert werden können. In der Grafik dargestellt sind die heute bekannten Reparatursysteme sowie deren individuellen DNA Modulatoren, die spezifische DNA-Schäden induzieren und von dem jeweiligen Reparatursystem erkannt und repariert werden (Jackson 2012).

Für die Reparatur von O<sup>6</sup>-meG sind verschiedene Reparaturwege bislang bekannt, die sowohl prä- als auch post- replikativ eingreifen können (siehe Kap. 1.2.2). Zudem ist ein Zusammenspiel mehrerer Reparatursysteme an der Entfernung dieses Schadenstyps möglich. Eine wichtige Rolle spielt dabei möglicherweise der Nukleotid- Exzisions-Reparaturweg (siehe Kap. 1.3.3).

## 1.2 Direkte Reparatur von DNA-Schäden

### 1.2.1 AlkB Homolog ( $\alpha$ -ketoglutarat abhängige Dioxygenase)

Das AlkB Homolog gehört zu den  $\alpha$ -ketoglutarat und Fe(II)-abhängigen Dioxygenasen. Die humanen AlkB Homologe ABH2 und ABH3, die analog zu *alkB* aus *E. coli* sind (Kaina 2007), spielen eine große Rolle bei der Entfernung von N-Alkylierungsschäden. Vor allem Methylierungen an den Positionen N<sup>1</sup> des Adenins (N<sup>1</sup>-meA), N<sup>3</sup> des Cytosins (N<sup>3</sup>-meC), N<sup>3</sup> des Thymins (N<sup>3</sup>-meT) und N<sup>1</sup> des Guanins (N<sup>1</sup>-meG) werden von ABH2 und ABH3 erkannt. Dabei bindet das ABH2 mit höherer Präferenz an Doppelstrang-DNA, ABH3 besser an Einzelstrang DNA/RNA. Die Reparatur erfolgt über eine oxidative Demethylierung der Alkylgruppe, so dass die ursprüngliche Basenpaarung wiederhergestellt wird (Abb. 5).



**Abb. 5: Reparatur von N-Alkyl-Schäden durch ABH2 und ABH3 Reparaturproteine:** Über oxidative Demethylierung werden die N-Alkyl-Schäden entfernt (Fu 2012).

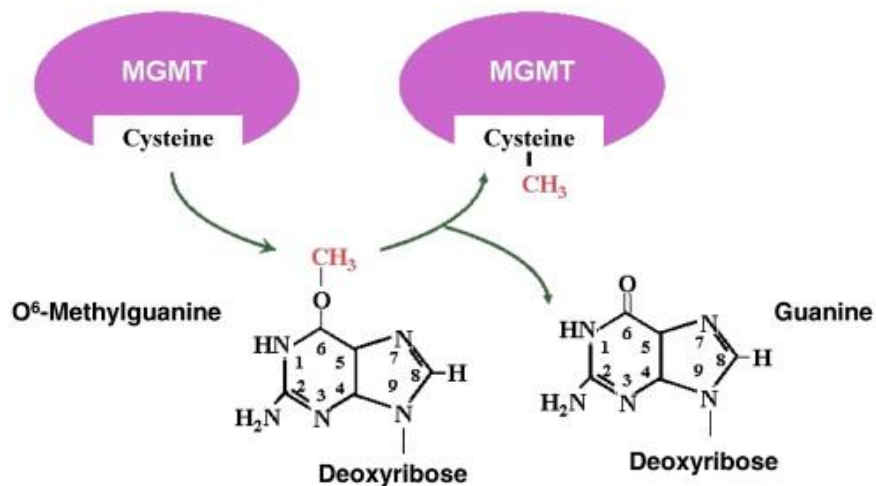
### 1.2.2 Methyl-Guanin-DNA-Methyltransferase (MGMT)

Bei der Entfernung von kritischen Läsionen wie O-Alkylierungsschäden ist eine schnelle und effiziente Reparatur von entscheidender Bedeutung, durch die das



## Einleitung

Überleben der Zelle und des Organismus gesichert wird. Frühe Untersuchungen von Samson *et al.* (1988) in *E. coli* beschreiben eine Reparatur von O<sup>6</sup>-meG-Schäden durch die bakterielle DNA-Methyltransferase (ada Protein). Die Entfernung der Läsion erfolgt dabei über eine Einzelschritt-Reparatur, bei der die Methylgruppe an der geschädigten Base entfernt wird. Später ist als funktionelles Homolog zu ada in Eukaryoten das Reparaturprotein O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) beschrieben worden. Das MGMT-Protein erkennt in der Doppelstrang-DNA spezifisch Alkylgruppen an der O<sup>6</sup>-Position vom Guanin und überträgt diese Reste auf ein internes Cystein im aktiven Zentrum. Durch diese Reaktion wird die MGMT irreversibel inaktiviert (Suizid-Protein) und nachfolgend durch einen Ubiquitinierungsprozess über das Proteasom degradiert (Srivenugopal 1996, Xu-Welliver und Pegg 2002, Mollwitz 2012) (Abb. 6).



**Abb. 6: MGMT-gekoppelte Reparatur von O<sup>6</sup>-meG in der DNA:** Durch den Transfer der Methylgruppe auf das Akzeptormolekül Cystein im aktiven Zentrum der MGMT wird der O<sup>6</sup>-meG-Schaden behoben. Die MGMT wird durch die Bindung inaktiviert und degradiert (Silber 2012).

Die MGMT ist vorwiegend im Zytoplasma lokalisiert und wird erst nach DNA-Alkylierung über ein Holoprotein in den Zellkern rekrutiert (Lim 1996). Die Effizienz der MGMT-Reparatur hängt ab von der akuten Anzahl an O<sup>6</sup>-meG-Addukten sowie vom zellulären Proteinvorrat und von der jeweiligen Neusyntheserate. In einer ganzen Reihe von Studien ist gezeigt worden, dass die MGMT-vermittelte Reparatur von O<sup>6</sup>-meG die mutagenen und karzinogenen Effekte von alkylierenden Nitroso-

Verbindungen erheblich reduziert (Dolan 1990, Pegg 1990). Umgekehrt führt ein Verlust der zellulären MGMT-Aktivität zu schweren Folgen für die Zelle durch einen erhöhten Zelltod in schnell proliferierenden Zellen (Knochenmark, Thymus) und ist assoziiert mit Apoptose und chromosomalen Veränderungen (Schwester-Chromatid-Austausch (SCE)) (Kaina 1985, Fu 2012). Dies ist auch in MGMT-knockout Mäusen bestätigt worden, welche zwar keinen auffälligen Phänotyp zeigen, aber eine hohe Sensitivität gegenüber den genotoxischen Effekten methylierender Agenzien aufweisen. Dies manifestiert sich in deutlich erhöhten Mutations- und Tumorraten im Vergleich zu entsprechenden Wildtypmäusen (Glassner 1999, Kaina 2007). Dieser Effekt kann auch für die Tumorthherapie eine wichtige Rolle spielen, da die Expression der MGMT nicht nur im Normalgewebe stark variiert, sondern auch zwischen Normal- und Tumorgewebe (Margison 2003). Als ein effizienter Inhibitor der MGMT ist in den 90er Jahren das Substrat O<sup>6</sup>-Benzylguanin (O<sup>6</sup>-BG) etabliert worden. Als nicht-toxisches Guanin-Analog blockiert O<sup>6</sup>-BG die MGMT durch Bindung an deren aktives Zentrum und sorgt für eine dauerhafte Inaktivierung der MGMT (Dolan 1990).

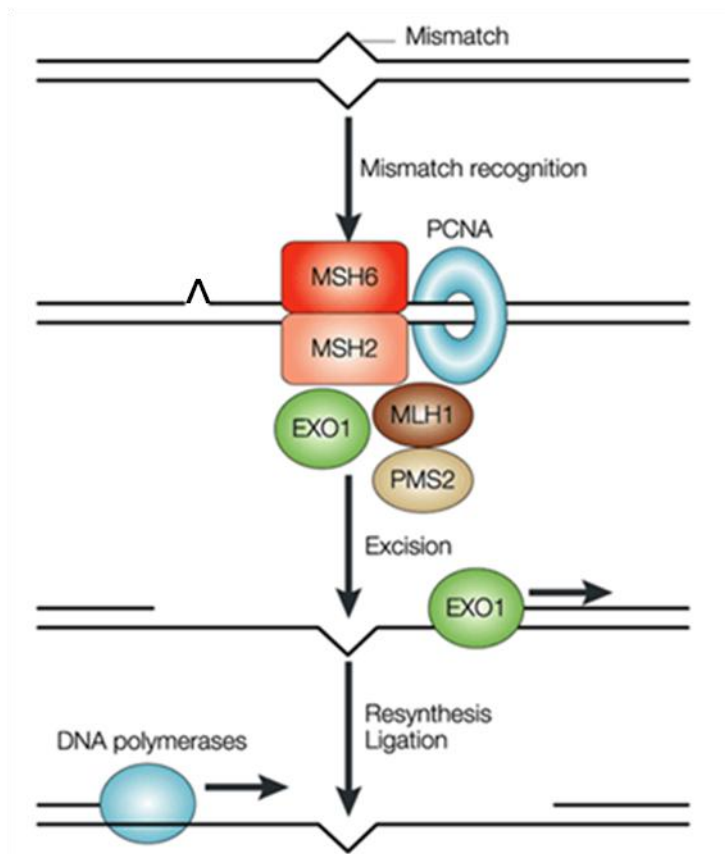
### 1.3 Behebung von DNA-Schäden durch komplexe Reparatursysteme

#### 1.3.1 *Mismatch-Reparatur* (MMR)

Entstehen durch Replikationsfehler, Oxidations- und Methylierungsprozesse Basenfehlpaarungen in der DNA, wird die *Mismatch-Reparatur* (MMR) initiiert (Modrich und Lahue 1996, Umar und Kunkel 1996, Christmann 2003). Die MMR erkennt dabei sowohl Fehlpaarungen unmodifizierter Basen (wie G:T, A:C oder C:C) als auch durch chemische Modifikation hervorgerufene Helixstrukturänderungen wie bei 8-oxo-Guanin-Schäden (8-oxoG:C) (Colussi 2002). Die MMR scheint auch bei der Erkennung und Prozessierung von O<sup>6</sup>-meG-induzierten Basenfehlpaarungen eine wichtige Rolle zu spielen und greift vor allem auf die post-replikative O<sup>6</sup>-meG:T Situation zu (Duckett 1996, Quiros 2010). Die Schadenserkennung erfolgt über die Phosphorylierung des MutS $\alpha$  Komplexes, bestehend aus den Proteinen MSH2 und MSH6, der an die geschädigte DNA-Stelle bindet (Kaina 2007). Im weiteren Verlauf rekrutiert MutS $\alpha$  den MutL $\alpha$  Komplex, zusammengesetzt aus den Komponenten PMS2 und MLH6 und entfernt im neusynthetisierten Strang mit Hilfe der

## Einleitung

Exonuklease I die modifizierte Base, zusammen mit einer großen Anzahl benachbarter Nukleotide (Genschel 2002). Die Neusynthese erfolgt dann über die DNA-Polymerase  $\delta$  (Pol  $\delta$ ) (Longley 1997) (Abb. 7). Bei bestehenden  $O^6$ -meG:T Basenfehlpaarungen in der DNA versucht das MMR-System das Problem zu beheben, indem die Exonuklease I den Thymin-Rest entfernt und die Polymerase  $\delta$  wiederum erneut ein T gegenüber  $O^6$ -meG einbaut. Durch diese wiederkehrenden Reparaturzyklen (*"futile repair cycles"*) werden langanhaltende, ausgedehnte Einzelstrangbrüche induziert, die im weiteren Verlauf zu Doppelstrangbrüchen und der Induktion von Apoptose führen können (Margison 2002, Roos 2004). Für die Tumorthherapie stellt die Funktionalität der MMR offenbar einen wichtigen Indikator dar, denn die Expression der MutS $\alpha$  Komponenten korreliert mit der Sensitivität gegen alkylierende Agenzien (Kaina 2007).



**Abb. 7: Reparatur von Basenfehlpaarungen durch die *Mismatch-Reparatur*:** Der MutS $\alpha$  (MSH2/MSH6) Komplex ist der Initiator in der Schadenserkennung. Er leitet durch Bindung an den MutL $\alpha$  (MLH1/PMS2) Komplex die Exzision der fehlgepaarten Base über die Exonuklease I ein. Abschließend erfolgt die Neusynthese und Ligation des neu synthetisierten Stranges über die Polymerase  $\delta$  (modifiziert nach Martin und Scharff 2002).

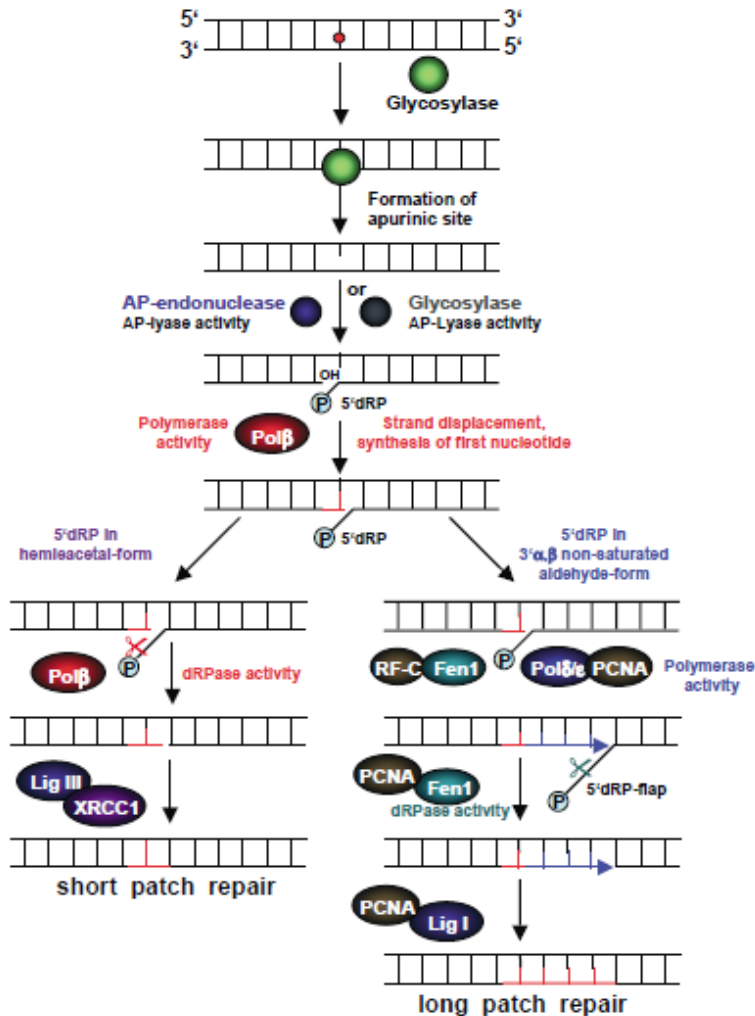
Umgekehrt führt ein funktioneller Ausfall der MMR auch bei mangelhafter Reparatur von O<sup>6</sup>-meG-Schäden sowohl bei Mäusen als auch bei Zelllinien zur Toleranz gegenüber Alkylanzien (*methylation tolerance*) und ist mit hohen Mutationsraten und einer stark erhöhten Tumorzinzidenz verknüpft (Karran 1996, Kawate 1998, Jirincy 2006, Kaina 2007).

### 1.3.2 Basen-Exzisions-Reparatur (BER)

Einen weiteren effizienten Reparaturweg für DNA-Läsionen stellt die Basen-Exzisions-Reparatur (BER) dar. Diese erkennt vorwiegend Basenschädigungen im Genom, insbesondere die Alkylierungsschäden N<sup>7</sup>-meG und N<sup>3</sup>-meA (Drabløs 2004). Aber auch spontane oder exogen induzierte Oxidationsschäden (z.B. 8-oxo-G) sowie hydrolytische Deaminierungen und die Folgen ionisierender Strahlung stellen Substrate für die BER dar (Engelward 1997, Christmann 2003, Barnes und Lindahl 2004, Prasad 2011) (Abb. 8). Bei der BER erfolgt die Erkennung und Markierung des Schadens über eine Glykosylase, die durch Hydrolyse der N-glykosidischen Bindung nur die modifizierte Base entfernt, aber das Zucker-Phosphat-Rückgrat des betroffenen Stranges zunächst intakt lässt (Schärer und Jirincy 2001, Kondo 2010). An den dadurch entstandenen Apurin/Apyrimidin (AP) Stellen schneiden anschließend AP-Endonukleasen ein und erzeugen einen Einzelstrangbruch, an dessen Enden ein 5'-Desoxyribose-5-Phosphat (5'dRP) und ein 3'OH entstehen (Wilson und Barsky 2001).

Die Reparatur dieser Lücke kann nun entweder über den „*short patch*“ oder den „*long patch*“ Weg abgeschlossen werden. Bei dem „*short patch*“-Mechanismus wird zunächst das 5'dRP mit Hilfe der Polymerase  $\beta$  entfernt (Matsumoto 1995) und anschließend die Lücke mit einem Nukleotid resynthetisiert (Sobol 1996). Die Ligation erfolgt entweder über die Ligase I oder den XRCC1-Ligase III Komplex. Bei der „*long patch*“ BER werden meist mehrere Nukleotide im geschädigten DNA-Abschnitt ersetzt. Die Bindung von XRCC1 an die Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP) leitet dabei die Reparatur ein. Die Polymerasen  $\delta$  oder  $\epsilon$  ersetzen in Verbindung mit dem „*proliferating cell nuclear antigen*“ (PCNA) die entfernte Base und synthetisieren eine bis zu 10 Nukleotide lange Sequenz in 5' Richtung in die DNA ein. Defekte in der BER sensitivieren Zellen stark gegen alkylierende

Substanzen durch Entstehung toxischer Intermediate. Die Folgen sind Strangbrüche und Zelltod (Engelward 1997, Kaina 2007). Untersuchungen zeigen, dass O<sup>6</sup>-meG kein Substrat der BER darstellt (Elder 1998).



**Abb. 8: Reparatur von Basenschäden in der DNA durch die Basen-Exzisions-Reparatur (BER):** Basenschäden werden von einer Glykosylase erkannt und entfernt. Die resultierten AP-Seiten werden anschließend von einer AP-Endonuklease eingeschnitten und entweder über die *short patch* oder die *long patch* BER repariert. Dabei werden in beiden Wegen 5'dRP Intermediate entfernt und die ausgeschnittene Base ersetzt. Die Ligation erfolgt über Ligase I oder den Ligase III-XRCC1 Komplex (Christmann 2003).

### 1.3.3 Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER)

Die NER ist ein sehr effizienter und variabler Reparaturweg, der ein breites Spektrum an unterschiedlichen DNA-Schadenstypen detektieren und reparieren kann (Friedberg 2001, Sancar 2004, Fousteri 2008). Dazu zählen UV-induzierte Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und Pyrimidin (6-4) Pyrimidon Addukte (6-4 PP), die durch kovalente Bindung zwischen zwei benachbarten Basen die Helixstruktur

## Einleitung

---

der DNA so verändern, dass es zum Verlust von Basenpaarungen kommt (Kim und Choi 1995). Gleiches gilt für 1,2-Intrastrang DNA-Verknüpfungen, die durch bifunktionale Substanzen wie Cisplatin hervorgerufen werden. Aktuelle Studien weisen zudem auf eine Beteiligung der NER an der Reparatur von Cisplatin-induzierten Interstrang Verknüpfungen hin (Ziehe 2012). Weitere typische Substrate, sogenannte „*bulky adducts*“, hervorgerufen durch genotoxische Substanzen wie Aflatoxin B oder Benz[*a*]apyren, werden ebenfalls über den NER-Weg entfernt (Hanawalt 2001, Christmann 2003). Frühe Untersuchungen in *E. Coli* Bakterien (Setlow 1964, Boyce 1964, Gillet und Schärer 2006) zeigen den speziellen Mechanismus des NER-Weges auf, der nach neueren Studien auch in vielen Eukaryoten konserviert ist (Petit und Sancar 1999, Hanawalt 2001). Dabei gleicht der NER-Weg einem „*cut and patch*“- Mechanismus, bei dem nach der Schadensdetektion eine kurze Nukleotidsequenz, die den Schaden enthält, über duale Inzision entfernt wird. Anschließend wird die Lücke mit Hilfe des ungeschädigten Stranges als Vorlage resynthetisiert (Gillet und Schärer 2006, Fousteri 2008). An diesem komplexen Reparatur-Mechanismus sind über 30 Proteinkomponenten beteiligt (Tab. 1). Bei der NER unterscheidet man zwei spezielle Teilwege, die globale genomische Reparatur (GG-NER) und die Transkriptions-gekoppelte Reparatur (TC-NER).

Die GG-NER entfernt mit unterschiedlicher Effektivität und vergleichsweise langsamer Kinetik DNA-Schäden aus dem gesamten Genom, während die TC-NER effizient und schnell Schäden spezifisch aus dem transkribierten Strang aktiver Gene eliminiert (Selby und Sancar 1991, 1993). Der Ablauf beider Mechanismen ist prinzipiell gleich, sie variieren lediglich in der Schadenserkennung und Reparatureinleitung. Bei der GG-NER wird der DNA-Schaden durch Bindung des DNA „*damage-binding protein 1/2*“ (DDB1/DDB2) -Komplexes detektiert (Wakasugi 2002), dessen Anwesenheit die Rekrutierung des XPC/hHR23B Heterodimers zur Schadensstelle zur Folge hat (Sugasawa 1998, Wang 2007).

Im Gegensatz dazu wird der Schaden bei der TC-NER während der Transkription durch die Arretierung der RNA-Polymerase II am DNA-Schaden erkannt, die daraufhin einen Komplex aus den Proteinen CSA und CSB zur Schadensstelle rekrutiert, um die NER einzuleiten. Im weiteren Verlauf beider Mechanismen wird ein Multi-Enzymkomplex (TFIIH), bestehend aus den Helikasen XPB und XPD sowie den Endonukleasen XPG und XPF/ERCC1, zur Schadensstelle herangeführt (Volker

## Einleitung

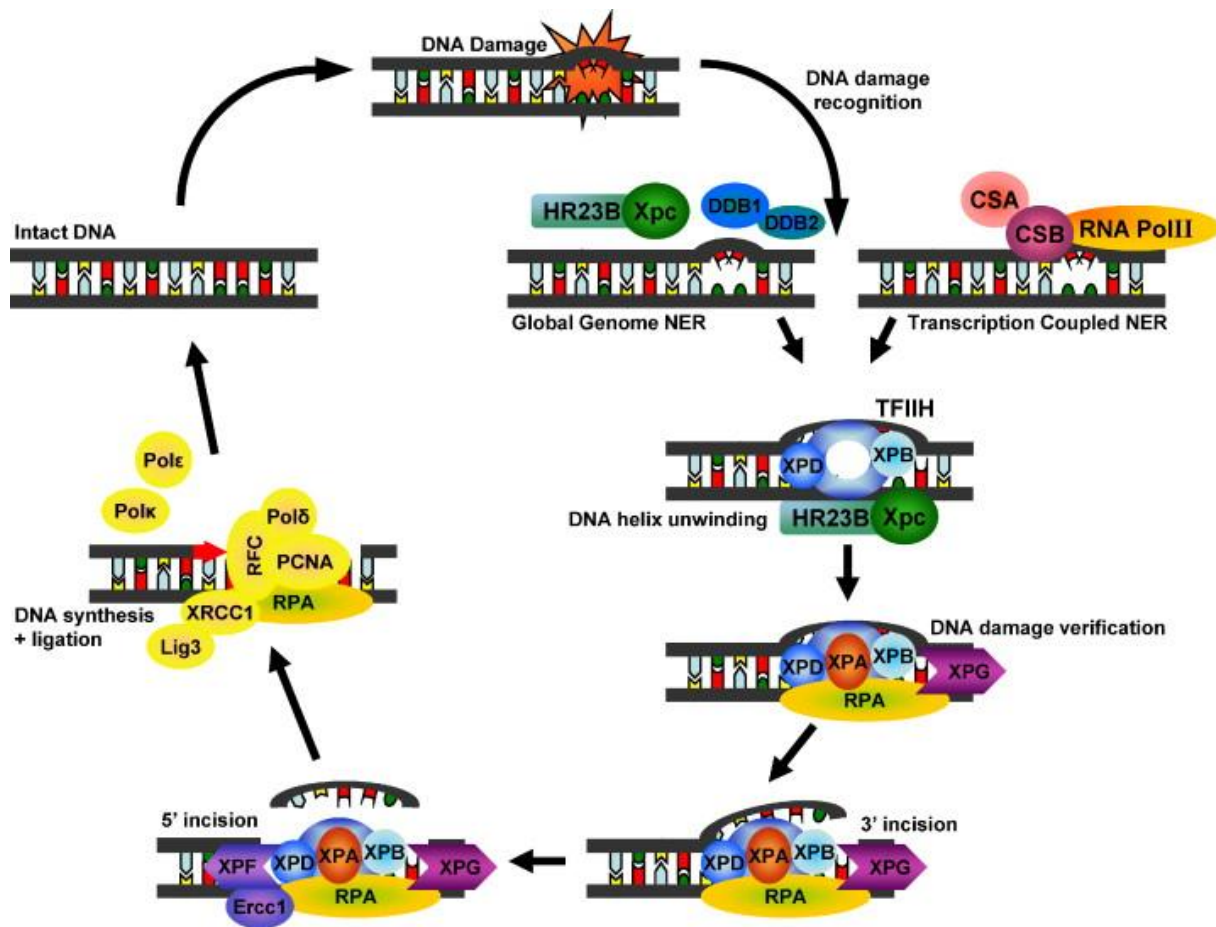
2001). Die ATP-abhängigen Helikasen XPB und XPD entwinden die DNA und ermöglichen so den Zugang weiterer Reparaturproteine zur Läsion (Evans 1997). Dabei entstehen kurze Einzelstrang-Überhänge (3' *flaps*), an denen RPA und XPA binden, um den DNA-Schaden zu verifizieren (Missura 2001, Fousteri 2008).

**Tab. 1: Ausgewählte Komponenten der NER und ihre Bedeutung in der Reparatur:** (modifiziert nach Gillet und Schärer 2006)

Gen	Protein	Produkt (kDa)	Funktion	Krankheit
<b>hHR23B</b>	HR23B	43 kDa	Schadenserkennung;	XP (GG-NER)
<b>XPC</b>	XPC	106 kDa	Interaktion mit TFIIH, XPA,	
<b>Cen2</b>	Cen2	20 kDa	DDB	
<b>DDB1</b>	DDB1	127 kDa	Schadensdetektion; Interaktion	Milde XP
<b>DDB2</b>	DDB2	48 kDa	mit XPC	
<b>XPA</b>	XPA	31 kDa	Verifizierung des Schadens, Interaktion mit RPA, TFIIH, XPC, ERCC1-XPF	XP (TC-NER)
<b>RPA 1-3 (3 Subtypen)</b>	RPA 1-3	14-68 kDa	Bindung an XPA, Interaktion mit XPG, PCNA, RFC	Nicht lebensfähig
<b>XPB (ERCC3)</b>	XPB	89 kDa	ATP-abhängige 3'->5'Helikase	XP/CS
<b>XPD (ERCC2)</b>	XPD	87 kDa	ATP abhängige 5'->3' Helikase	
<b>XPF-ERCC1 (ERCC4)</b>	XPF- ERCC1	103 kDa, 33 kDa	5' Endonuklease, Bindung an TFIIH	XP, FA?
<b>XPG (ERCC5)</b>		133 kDa	3' Endonuklease, Bindung an TFIIH	XP/CS
<b>RFC 1-5 (5 Subtypen)</b>	RFC 1-5	38-128 kDa	Bindung mit PCNA, XPA	
<b>PCNA</b>	PCNA (Trimer)	3x29 kDa (261 kDa)		
<b>Pol δ</b>	Pol δ		DNA-Polymerase, Bindung mit PCNA	
<b>Pol ε</b>	Pol ε		DNA-Polymerase, Bindung mit PCNA	
<b>LIG 1</b>	Ligase 1	102 kDa	DNA-Ligation	XP ähnlich

## Einleitung

Die spezifischen Endonukleasen XPG (3'-5' Aktivität) und XPF/ERCC1 (5'-3' Aktivität) schneiden anschließend, beginnend am Schaden, eine Nukleotidsequenz von 25-32 Nukleotiden heraus. An der entstandenen Lücke bindet PCNA in Verbindung mit dem "replication factor C" (RFC) und koordiniert mit den Polymerasen  $\delta$  und  $\epsilon$  die Resynthese (Gillet und Schärer 2006). Die Ligation erfolgt abschließend über die Ligase I (Abb. 9).



**Abb. 9: Die Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER):** Die NER beinhaltet zwei distinkte Schadenserkennungsmechanismen, die globale genomische Reparatur (GG-NER) und die Transkriptions-gekoppelte Reparatur (TC-NER), die an der Reparatur verschiedener DNA-Schäden beteiligt sind (Melis 2011).

Funktionale Defekte in einzelnen Komponenten des NER-Weges führen zu schweren humanen Erkrankungen wie Xeroderma Pigmentosum (XP), Cockayne Syndrom (CS) und Trichothiodystrophy (TTD). Primäre Zellen von XP-Patienten weisen dabei Defekte in einer der NER-Komponenten XPA bis XPG auf. Homozygot betroffene



Personen zeigen häufig eine stark erhöhte Sensitivität gegen UV-Strahlung sowie neuronaler Degenerationen. XP-Patienten haben zudem ein über 1000-fach erhöhtes Risiko für Hautkrebs (de Boer und Hoeijmakers 2000, Gillet und Schärer 2006). XP-defiziente Mäuse zeigen im Gegensatz dazu meist nur einen sehr abgeschwächten Phänotyp (de Boer und Hoeijmakers 1999, Hoeijmakers 2001).

Bei der Entfernung von kritischen O<sup>6</sup>-meG-Läsionen scheint neben der MGMT und der MMR möglicherweise auch die NER von Bedeutung zu sein. Daten von Samson *et al.* (1988) aus Experimenten an *E. coli* zeigen, dass neben dem MGMT-Analog *ada* auch die NER-Faktoren UvrA/B/C an der Reparatur von O<sup>6</sup>-meG beteiligt sind.

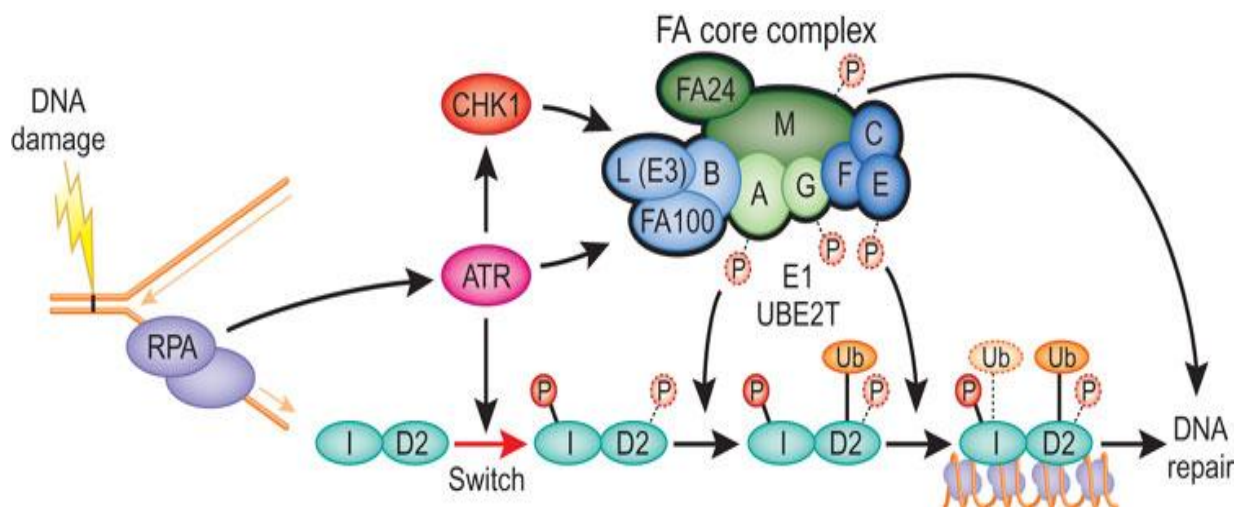
### 1.3.4 Fanconi Anämie/BRCA-Signalweg (FA)

Die Fanconi Anämie (FA) wurde 1927 von G. Fanconi beschrieben und stellt eine autosomal rezessive x-chromosomale Erberkrankung dar, die mit schweren klinischen Befunden einhergeht (Fanconi 1927, Kennedy und D'Andrea 2005, Kim und D'Andrea 2012). Charakteristisch sind multiple kognitive Abnormitäten, Entwicklungsstörungen wie verkürzter Körperbau oder Daumenveränderungen sowie fortschreitende Knochenmarkdefekte (Panzytopenie, Leuko- und Thrombozytopenie) und erhöhte Tumorzinzidenz (San Filippo 2008, Shimamura 2010). FA-Patienten entwickeln schon im Kindesalter häufig akute Leukämien aufgrund zunehmender Schädigungen des Knochenmarks sowie myeloiden Tumoren oder Leber- und Kopf-Hals-Tumoren im Erwachsenenalter (D'Andrea und Grompe 2003, Soulier 2011, Kim und D'Andrea 2012). Auf molekularer Ebene beruht die FA auf einer Keimbahnmutation, die zu einem kompletten Funktionsverlust in einem der aktuell 15 bekannten Fanconi Gene führt (FancA, -B, -C, -D1, -D2, -E, -F, -G, -L, -M, -N, -O, -P) (Garner und Smogorzewska 2011, Kim und D'Andrea 2012).

Dabei zeigen primäre Zellen von FA-Patienten spontane Chromosomenbrüche sowie Hypersensitivitäten nach Gabe von Strang-verknüpfenden (*cross-link*) DNA-reaktiven Substanzen wie Mitomycin C (MMC), Diepoxybutan (DEB) oder Cisplatin. Dies belegt die maßgebliche Beteiligung des FA-Signalweges auch an der Reparatur von Interstrang „*cross-links*“ (ICL) und DSB in der DNA. ICL's stellen Quervernetzungen zwischen den beiden DNA-Strängen dar, die bidirektionale Blockaden für die Polymerasen während der Replikation und Transkription verursachen (Sancar 2004, Schärer 2005, O'Donnell 2010).

## Einleitung

Der FA-Weg stellt einen sehr komplexen Mechanismus dar, der aus zahlreichen regulatorischen Komponenten besteht. Zusammengesetzt ist dieser Mechanismus aus einem nuklearen E3 Ligase Kernkomplex (FancA, -B, -C, -E, -F, -G, -L, -M, FAAP20, -24 und -100), einem Chromatin-assoziierten ID (FancD2 und FancI) - Komplex und den weiteren Effektorproteinen FancD1/BRCA2, FancJ/BRIP/BACH1, FancN/PALB2, FancO/Rad51c und FancP/SLX4 (Kennedy und D'Andrea 2005, Leung 2012). Treten DNA-Läsionen wie ICL oder DSB durch UV- oder IR-Exposition oder durch Substanzen wie Mitomycin C, Diepoxybutan und Cisplatin während der S-Phase (Taniguchi 2002) auf, wird der Signalweg aktiviert. Dazu monoubiquitiniert der Kernkomplex das FancD2/I-Dimer und rekrutiert es zur Schadensstelle. Die Monoubiquitinierung erfolgt über das FancL-Protein in Verbindung mit der Ubiquitin E2 Ligase (UBE2T) am Lysin 561 des FancD2-Proteins sowie am Lysin 523 von FancI. Unter Bildung von Reparaturfoci wird der ID-Komplex zur Schadensstelle transloziert und leitet mit den Effektorproteinen die Reparatur ein (Knipscheer 2009, Garner und Smogorzewska 2011) (Abb. 10).



**Abb. 10: Aktivierung des FA/BRCA-Signalweges in der DNA:** Während der S-Phase wird der FA-Signalweg durch DSB oder ICL aktiviert. Dabei monoubiquitiniert der Kernkomplex den FancD2/I-Komplex, der daraufhin zur Schadensstelle rekrutiert wird. Unter Beteiligung weiterer FA-Proteine wird die Reparatur der DNA-Läsionen eingeleitet (Wang 2008).

Ausschlaggebend für die Aktivierung des FA-Signalweges sind die beiden Zellzykluskinasen ATM und ATR (Cortez 2001, Pichierri 2004, Kennedy 2007). Sie

phosphorylieren mehrere FA-Proteine des Kernkomplexes sowie FancD2 und verstärken dadurch deren Aktivierungspotential (Matsuoka 2007, Wang 2007a). ATM wird dabei durch UV oder vorhandene DSB aktiviert, während ATR nach genotoxischem Stress über Bindung an RPA an vorhandene Einzelstrang-DNA rekrutiert wird (Kennedy und D'Andrea 2005, Jones 2012).

Über eine Beteiligung der Fanconi-Proteine an der Reparatur von Alkylierungsschäden ist bisher wenig bekannt. Untersuchungen von Chen *et al.* (2007) beschreiben, dass ein Ausfall von FancD2 zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber TMZ führt. Auch Arbeiten von Kondo *et al.* (2011) unterstützen diese Ergebnisse, wonach murine Mausfibroblasten mit einem funktionellen Ausfall im FancD2-, FancD1/BRCA1- oder FancG-Protein deutlich empfindlicher gegenüber den zytotoxischen Effekten von TMZ reagieren als Wildtypzellen, während FancA<sup>(-/-)</sup>- oder FancC<sup>(-/-)</sup>-Fibroblasten keine erhöhte TMZ-Sensitivität zeigen.

### 1.3.5 Weitere Reparatursysteme

Zusätzlich zu den oben aufgeführten Reparatursystemen gibt es noch weitere Reparaturmechanismen, die unterschiedliche Schadenstypen aus der DNA entfernen können. Dabei stellen neben den strukturverändernden Basenalkylierungen auch endogen prozessierte sowie durch ionisierende oder UV- Strahlung induzierte Doppelstrangbrüche (DSB) sehr gefährliche DNA-Läsionen dar, da bereits ein Doppelstrangbruch zum Tod der Zelle führen kann (Hartlerode 2009). In Säugerzellen können solche Schäden über zwei Mechanismen repariert werden, die Homologe-Rekombinations-Reparatur (HRR) oder das *Non-homologous end joining* (NHEJ). Die HRR läuft vorwiegend in der S- und G2-Phase ab und findet in der Regel fehlerfrei statt, da eine homologe DNA-Sequenz als Vorlage zur Verfügung steht. Das NHEJ dagegen verknüpft während der G0- und G1-Phase lediglich die geschädigten DNA-Enden ohne eine entsprechende DNA-Sequenz als Vorlage. Durch den möglichen Verlust von Geninformationen ist damit dieser Mechanismus sehr fehlerbehaftet (San Filippo 2008, Kondo 2010). Im Zusammenhang mit alkylierenden Agenzien können auch DSB entstehen, die dann unter Umständen ein Signal der HRR bzw. des NHEJ darstellen und den Reparaturprozess einleiten.

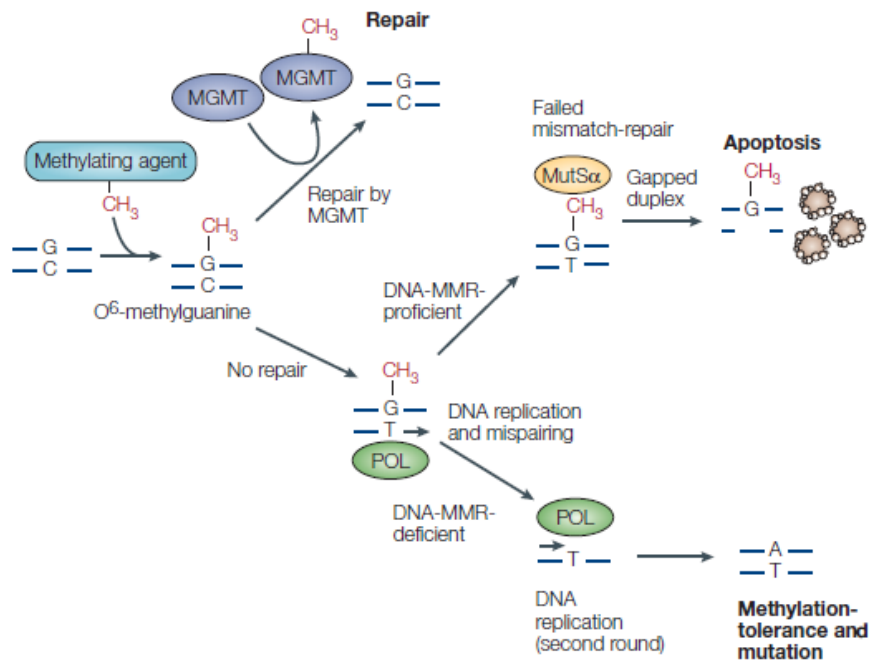
### **1.4 Gleichgewicht zwischen Reparatur und Toleranz von O<sup>6</sup>-meG-Schäden?**

Auf Strukturveränderungen durch Alkylierungsschäden in der DNA kann eine Zelle entweder mit dem Versuch reagieren, diesen Schaden zu reparieren und dadurch das Zellüberleben zu sichern, oder durch Induktion pro-apoptotischer Prozesse zu verhindern, dass Folgeschäden wie Mutationen oder Tumore entstehen (Modrich und Lahue 1996, Komori 2009). Welcher dieser beiden Wege dominiert, ist abhängig von der Art der Schäden und deren Häufigkeit. Die Entscheidung ist besonders wichtig bei den kritischen O<sup>6</sup>-meG-Läsionen, da sie nicht nur zytotoxische, sondern auch stark mutagene und karzinogene Folgen haben. Eine Möglichkeit, DNA-Alkylierungsschäden zu tolerieren, ist der Einsatz der Transläsionssynthese (TLS). Durch verschiedene DNA-Polymerasen ( $\eta$ ,  $\kappa$ ,  $\iota$ ,  $\zeta$  und REV1), die einen Verlust der 3'-5' Korrektur aufweisen, können vermehrt Basenfehlpaarungen und andere strukturelle Schäden in der DNA toleriert werden (Christman 2003, Sale 2012). Als Folge steigt die Mutationsfrequenz in der Zelle und damit das Risiko der malignen Transformation (Engelbergs 2000, Jones 2012). Durch eine Toleranz der DNA-Schäden wird allerdings der Zelle eine ungehinderte Replikation gewährleistet und so das Überleben gesichert (Friedberg 2005). Durch welche Signale O<sup>6</sup>-meG-Läsionen in der DNA geduldet (Mutagenese/Karzinogenese) oder pro-apoptotische Prozesse (Zytotoxizität) induziert werden können, ist bislang wenig bekannt. Wichtig dabei aber scheint der Einfluss der unterschiedlichen Reparaturmechanismen zu sein, die entweder mutagene oder zytotoxische Effekte auslösen (Modrich und Lahue 1996, Meikrantz 1998).

### **1.5 Zusammenhang zwischen Zytotoxizität, Mutagenese und Karzinogenese von O<sup>6</sup>-Methylguaninschäden**

Die aufgeführten Reparaturmechanismen zeigen, dass DNA-Alkylierungsschäden sehr individuell repariert werden können. Für die als besonders kritisch eingestuftes O<sup>6</sup>-meG-Läsionen zeigen die unterschiedlichen Reparaturvorgänge verschiedene Auswirkungen, woraus die zytotoxischen und mutagenen Effekte dieses Schadenstyps resultieren. Mutagene Eigenschaften durch O<sup>6</sup>-meG, ohne Einbeziehung funktioneller Reparatursysteme, entstehen durch persistierende Addukte in der DNA. Laufen diese Schäden durch die Replikation, entsteht eine

Basenfehlpaarung, die nach einer weiteren Replikation zu einer fixierten Mutation im Genom führt (Margison 2002). Zytotoxische Ereignisse durch O<sup>6</sup>-meG-Schäden sind mit dem post-replikativen Einsatz der *Mismatch-Reparatur* verbunden. Durch wiederholte Reparaturzyklen im neusynthetisierten Strang versucht die MMR den Schaden durch Exzision des vermeintlich fehlgepaarten Thymin-Restes zu entfernen, setzt allerdings nach jedem Zyklus erneut ein Thymin anstelle eines Cytosins ein. Diese *futile repair cycles* verursachen mit der Zeit Einzelstrangbrüche in der DNA, die im weiteren Verlauf Doppelstrangbrüche generieren und zum Zelltod führen (Modrich und Lahue 1996, Meikrantz 1998, Roos 2004, Kaina 2007, Komori 2009) (Abb. 11).



**Abb. 11: Reparatursysteme für die Entfernung von O<sup>6</sup>-meG aus der DNA:** Diese Grafik zeigt die unterschiedlichen Reparaturwege, die an der Beseitigung von O<sup>6</sup>-meG-Schäden beteiligt sind sowie deren biologischen Konsequenzen durch persistierende Schäden in der DNA. MGMT = Methyl-Guanin-DNA-Methyltransferase, POL= DNA-Polymerase, MutSα=Komponenten der *Mismatch-Reparatur* (MMR) (Allan und Travis 2005).

## 1.6 Ein alternativer Reparaturweg für O<sup>6</sup>-meG-Läsionen

In der Arbeit von Nickel (Dissertation 2010) ist ein neuer, alternativer Reparaturweg in Säugerzellen identifiziert worden, der parallel zu den bekannten Reparatursystemen arbeitet und für die Entfernung von O<sup>6</sup>-meG-Schäden essentiell ist.

## Einleitung

---

Im Gegensatz zu der direkten Demethylierung durch das MGMT-Protein wird der O<sup>6</sup>-meG-Schaden bei dem alternativen Reparaturweg über einen NER-ähnlichen Exzisionsmechanismus entfernt. Mit Hilfe verschiedener biochemischer und zellbiologischer Methoden wird an humanen Fibroblastenzelllinien und Primärzellen gezeigt, dass das XPC-Protein (NER) sowie das FancD2-Protein (FA) die Hauptfaktoren dieses Reparaturweges darstellen. Interessant dabei ist, dass XPC und FancD2 auch unabhängig von endogener MGMT-Aktivität den O<sup>6</sup>-meG-Schaden entfernen können. Dieser Mechanismus scheint demnach eigenständig und parallel zum MGMT-Protein spezifisch für die Entfernung von O<sup>6</sup>-G-Alkylierungen zu sein. Durchgeführte Bindungsstudien belegen zudem, dass die Erkennung des Schadens durch das XPC-Protein erfolgt und auf die prä-replikative O<sup>6</sup>-meG:C Situation beschränkt ist, da O<sup>6</sup>-meG:T Basenpaare nicht von diesem Reparaturweg erkannt werden.

### 2 Ziel der Arbeit

In dieser Dissertation sollte zunächst untersucht werden, welchen relativen Beitrag der neu beschriebene, alternative Reparaturweg für die Entfernung von O<sup>6</sup>-meG-Addukten aus der DNA verschiedener Typen von Säugerzellen leistet. Das wurde nach Exposition mit dem Alkylanz MNU sowohl an humanen Zelllinien als auch an primären Mauszellen *in vivo* in An- oder Abwesenheit der MGMT-Aktivität mit einem quantitativen Immunzytologischen Assay (ICA) gemessen. Weiterhin sollte geprüft werden, ob bestimmte Proteine des „klassischen“ Nukleotid-Exzisions-Weges und des Fanconi-Anämie (FA)-Komplexes essentielle Komponenten für diese Reparatur darstellen. Um dabei keinen Fehlschlüssen durch die „unnatürliche Situation“ in Zelllinien zu unterliegen, wurden Reparaturkinetiken für das O<sup>6</sup>-meG-Addukt vorrangig in verschiedenen Gewebe-/Zelltypen von Wildtypmäusen im Vergleich zu Reparatur-defizienten (XPC<sup>(-/-)</sup>, XPA<sup>(-/-)</sup>, FancD2<sup>(-/-)</sup>) Stämmen durchgeführt.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die relative Bedeutung der beiden Reparaturwege (MGMT und alternativer Reparaturweg) für den Schutz vor den biologischen Auswirkungen einer Alkylanzien-Exposition *in vivo* bestimmt werden. Analysiert werden sollte dabei an den verschiedenen Mausstämmen, wobei insbesondere das Ausmaß der zytotoxischen Effekte im hämatopoetischen System sowie die Frequenz der mutagenen und karzinogenen Endpunkte nach einmaliger Behandlung mit MNU im Fokus der Arbeit stand.

In der Zusammenschau sollten diese Daten dann eine Abschätzung der biologischen Relevanz der beiden DNA-Reparaturfunktionen für die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität und für das Zellüberleben erlauben.

### 3 Material und Experimenteller Teil

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Verwendete Geräte

ABI 3130 Sequencer	Applied Biosystems, Kalifornien (USA)
Agarosegel Dokumentationssystem	Vilber Lourmat, Eberhardzell (DE)
C1000 Thermal Cycler	Bio-Rad, Hercules (USA)
Cellspin Zentrifuge R2	Tharmac, Waldsolms (DE)
Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg (DE)
CO <sub>2</sub> Inkubator (C200)	Labotect, Göttingen (DE)
Cuvettes: 0.1cm Gene Pulser	Bio-Rad, Hercules (USA)
FACS vantage SE Diva	BD, San José (USA)
Feinwaage	Sartorius, Göttingen (DE)
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Jena (DE)
Gene Pulser (Elektroporation)	Bio-Rad , Hercules (USA)
HB 500 Minidizer Hybridization Oven	UVP, Kalifornien (USA)
Inkubator	Heraeus, Hanau (DE)
Mikroliterzentrifugen MIKRO 200	Hettich Lab Technology, Tuttlingen (DE)
Mikroliterzentrifugen MIKRO 200 R	Hettich Lab Technology, Tuttlingen (DE)
Mikroskop	Zeiss, Jena (DE)
Minifuge T	Heraeus, Hanau (DE)
Nanodrop 1000	Peqlab, Erlangen (DE)
Neubauer Zählkammer	GLW, Würzburg (DE)
pH Meter AE 240	Mettler-Toledo, Giessen (DE)
Photometer	Eppendorf, Hamburg (DE)
PTC-200 PCR-Cycler	BioRad, Hercules (USA)
Sicherheitswerkbank	NUAIRE, Plymouth (USA)
Ultrathorax PCU	Kinematica AG, Luzern (CH)
Ultraschallgerät Sonoplus	Bandelin, Berlin (DE)



## Material und Experimenteller Teil

---

Wasserbad SW21-C	Julabo, Seelbach
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg (DE)
Zentrifuge Rotina 48	Hettich Lab Technology, Tuttlingen (DE)

### 3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Adhäsionsobjektträger (Superfrost Plus Gold)	ThermoFisher, Schwerte (DE)
BSA (Bovine Serum Albumin)	PAA, Cölbe (DE)
DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Dextran Blau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Di-Natriumhydrogenphosphat -Dihydrat)	Merck, Darmstadt (DE)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Merck, Darmstadt (DE)
EDTA Blutentnahmeröhrchen	Greiner-bio-one, Frickenhausen (DE)
Eindeckmedium (Antifading Reagenz)	Squarix, Marl (DE)
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Ethidiumbromid (0,025 %)	Roth, Karlsruhe (DE)
Essigsäure	Merck, Darmstadt (DE)
Ficoll (Dichte $1,077 \pm 0,001$ g/ml)	GE Healthcare, München (DE)
Formalin (Roti-Histo-Fix 4,5 %)	Roth, Karlsruhe (DE)
Glycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Häma-Schnellfärbung	Niepkötter Lab-Technik, Bürstadt (DE)
LE Agarose	Biozym, Oldendorf (DE)
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe (DE)
Methanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
NaCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Natriumacetat	Merck, Darmstadt (DE)
NaOH	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)
Phenol-Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1)	Roth, Karlsruhe (DE)

---

## Material und Experimenteller Teil

---

Phenol	Roth, Karlsruhe (DE)
Red blood cell Lysepuffer	Stem cell Technologies, Grenoble (F)
SDS	Merck, Darmstadt (DE)
TBE	AppliChem, Darmstadt (DE)
Tris-HCL (Tris (hydroxymethyl) aminomethane Hydrochloride)	Roth, Karlsruhe (DE)
Tween-20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (DE)

### 3.1.3 Antikörper

Maus-anti-[O <sup>6</sup> -meG] (EM-2-3)	Squarrix, Marl (DE)
Ratte-anti-[Pt-(GpG)] (R-C18)	Dr. J. Thomale, Essen (DE)
Kaninchen-anti-[Maus Ig]-Cy3	Dianova, Hamburg (DE)
Kaninchen-anti-[Ratte Ig]-Cy3	Dianova, Hamburg (DE)
Dynabeads-Schaf-anti-[Maus Ig] (LacZ/Lacl)	Invitrogen, Darmstadt (DE)
Maus-anti-[ $\beta$ -Galaktosidase]	Promega, Madison (USA)
Ratte-anti-[Maus-CD4]-PerCP-Cy5.5	BD, Heidelberg (DE)
Ratte-anti-[Maus-CD8a]-PE	BD, Heidelberg (DE)
Ratte-anti-[Maus-B220]-APC-Cy7	BD, Heidelberg (DE)

### 3.1.4 DNA-reaktive Substanzen und Inhibitoren

Methylnitroseharnstoff (MNU)	Sigma, Hamburg (DE)
O <sup>6</sup> -Benzylguanin (O <sup>6</sup> -BG)	Sigma, Hamburg (DE)
Cisplatin	Teva und KL, Ulm (DE)

### 3.1.5 Kommerzielle „Kits“

DNeasy Blood & Tissue Kit	Qiagen, Hilden (DE)
NucleoBond AXG® 500	Machery und Nagel, Düren (DE)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden (DE)
ABI Big Terminator v3.1Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Kalifornien (USA)

### 3.1.6 Primer

**Tab. 2: Primersequenzen für Genotypenbestimmung**

Genotyp	Primer	Nukleotidsequenz
<b>FancD2</b>		
	FancD2 WT	5'-CAG GGA TGA AAG GGT CTT ACG C-3'
	FancD2 KO	5'-GCT ACA CAG CATT GCC CAT AAA G-3'
	FancD2 KO/WT	5'-TCA GCC TCA CAT GGA GTT TAA CG-3'
<b>XPA</b>		
	XPA WT	5'-GTG GGT GCT GGG CTG TCT AA-3'
	XPA KO	5'-ATG GCC GCT TTT CTG GAT TC-3'
	XPA KO/WT	5'-ATG GCG TGG GTT CTT CTT C-3'
<b>XPC</b>		
	XPC K.O. (PGK) (F)	5'-CGC ACG CTT CAA AAG CGC ACG TCT GCC GCG-3'
	XPC K.O. (HPRT) (R)	5'-CGA GCG TGG GAC TGC GGG TCG GCA TGA CGG-3'
	XPC WT (F)	5'-ACA GCC TAC CCA GGG GAT GTG ATG CTT CCT-3'
	XPC WT (R)	5'-TGG TCT GTG GAC AGA GAA CAC TGG CTG TGC-3'
<b>LacZ</b>		
	LacZ WT (F)	5'-ACC CCA GGC TTT ACA CTT TAT GC-3'
	LacZ WT(R)	5'-GTG GGA ACA AAC GGC TT-3'

Tab. 3: Primersequenzen für Sequenz-Analysen des *lacZ*-Plasmids (pUR 288)

Gen	Primer	Nukleotidsequenz
<b>LacZ</b>		
	pUR0366 (F)	5'-CAG TTG CGC AGC CTG AAT GG-3'
	pUR0794 (F)	5'-TGA CGG CAG TTA TCT GGA AG-3'
	pUR1234 (F)	5'-ATG GTC TGC TGC TGC TGA AC-3'
	pUR1671 (F)	5'-CAG TAT GAA GGC GGC GGA GC-3'
	pUR2113 (F)	5'-CCG GGC AAA CCA TCG AAG TG-3'
	pUR2552 (F)	5'-GCC GCT GCG CGA TCA GTT CA-3'
	pUR5268 (F)	5'-CCG CTT TGA GTG AGC TGA T-3'
	pUR3367 (R)	5'-GCG TAT CAC GAG GCC CTT TC-3'

### 3.1.7 Verwendete Mausstämme

Tab. 4: Eingesetzte Mauslinien

Mausstamm	Defekt	Phänotyp	Besonderheiten	Quelle
<b>FancD2</b>	FancD2 knockout	Microphthalmia, perinatale Letalität	Sensitiv gegen „Cross-link“ induzierende Substanzen	Houghtaling 2003
<b>XPA</b>	XPA knockout	Keinen	induzierbare Tumore (UV)	De Vries 1995
<b>B6;129s7-XPCtml/Brd</b>	XPC knockout	Keinen	induzierbare Tumore (UV)	Sands 1995
<b>C57BL/6J (Wildtyp)</b>	Keinen	Keinen		Jackson Laboratories
<b>LacZ</b>	<i>lacZ</i> -Plasmid	Keinen		Boerrigter 1995

## 3.1.8 Zelllinien

Tab. 5: Primäre Fibroblastenzelllinie aus Fanconi Patienten

Zelllinie	Zelltyp	Spezies	Quelle	Anmerkung
<b>SII-ip (FA-I<sup>(-/-)</sup>)</b>	Fibroblasten	Human	H. Hanenberg (Düsseldorf)	SFbeta virus leader 11 IRES Puroresistenz-immortalisiertes FA-I
<b>S91 (SII-ip, FA-I<sup>(-/-)</sup> rekonstituiert)</b>	Fibroblasten	Human	H. Hanenberg (Düsseldorf)	SFbeta virus leader 91 FANCI cDNA codon-optimiert IRES Puroresistent-immortalisiertes FA-I rekonstituiert

## 3.2 Experimenteller Teil

### 3.2.1 Haltung von Mäusen

Zucht und Haltung der verschiedenen Mausstämme erfolgte in der Tierversuchsanlage des Instituts für Zellbiologie (IFZ) unter vorgeschriebenen Bedingungen (konventionelle sehr saubere Haltung). Die Mäuse wurden unter einem 12 Stunden Tag-/Nacht-Rhythmus gehalten und erhielten sterilisiertes (5 min, 134 °C) Zuchtfutter (Altromin 1314 Forti, fortified) sowie filtriertes Wasser (0,2 µm), 55 % ± 5 % rel. Luftfeuchtigkeit, bei 21 °C ±1°C als Grundversorgung. Die Unterbringung der Tiere erfolgte in IVC (*individually ventilated cages*) -Käfigen je nach Anzahl der Tiere in den entsprechenden Käfiggrößen. Alle Versuchsvorbereitungen für die Behandlung der Mäuse fanden unter sterilen Bedingungen statt.

### 3.2.2 Genotypisierung der Mausstämme

Es wurden Ohr- oder Schwanzbiopsien entnommen, aus denen das gewonnene Zelllysat für eine PCR-Reaktion eingesetzt wurde. Die Ohrbiopsien wurden in 200 µl Ohrenpuffer (IFZ, UK Essen) über Nacht bei 57 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 100 °C für 10 min erhitzt und bis zur Weiterverwendung kühl gelagert. Die so extrahierte DNA wurde für die PCR genutzt. Die PCR-Bedingungen sind in

## Material und Experimenteller Teil

der folgenden Liste angegeben (Tab. 6). Die Analyse des PCR-Produktes erfolgte über ein 1,5 %-iges Agarosegel, bei dem ein 100 bp Marker (Fermentas) als Standardmarker eingesetzt wurde (Abb. 12).

**Tab. 6: PCR-Bedingungen der eingesetzten Mauslinien**

Genotyp	PCR-Master Mix	PCR-Bedingungen
<b>FancD2</b>	12,5 µl GoTaq (Green Master Mix)	94 °C 3 min
	0,15 µl Primer (12,5 µM) WT	94 °C 25 sec
	0,5 µl Primer (12,5 µM) KO	46 °C 25 sec
	<b>Produkt:</b> 0,3 µl Primer (12,5 µM) KO/WT	72 °C 2 min
	<b>FancD2 WT: 303 bp</b> <b>FancD2 KO: 459 bp</b>	10,55 µl dH <sub>2</sub> O 1 µl DNA
<b>XPA</b>	0,5 µl GoTaq Polymerase	94°C 2 min
	2,5 µl 10x PCR Puffer	94°C 25 sec
	0,5 µl dNTP's	58°C 30 sec
	1 µl Primer (12,5 µM) WT	72°C 60 sec
	1 µl Primer (12,5 µM) KO/WT	72°C 4 min
	<b>Produkt:</b> 0,25 µl Primer (12,5 µM) KO	4°C dauerhaft
<b>XPA WT: 279 bp</b> <b>XPA KO: 205 bp</b>	18,25 µl dH <sub>2</sub> O 1 µl DNA	
<b>B6129s7-XPCtm1/Brd</b>	12,5 µl GoTaq (Green Master Mix)	94°C 3 min
	0,5 µl Primer (12,5 µM)	94°C 30 sec
	0,5 µl Primer (12,5 µM)	65°C -0,5°C
	9,5 µl dH <sub>2</sub> O	/Zyklus 30 sec
	1 µl DNA	72°C 1 min
	<b>Produkt:</b>	94°C 30 sec
	<b>XPC WT: 238 bp</b>	58°C 30 sec
	<b>XPC KO: 180 bp</b>	72°C 1 min
		72°C 10 min
		4°C dauerhaft

Die DNA aus der Schwanzspitze wurde mittels der NaOH-Methode (UK Ulm) isoliert. Dabei wurden 1-2 mm der Schwanzspitze zunächst in 300 µl einer 50 mM NaOH-Lösung für 1 Stunde bei 95 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben geschüttelt und das Lysat für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Je 250 µl des Überstandes wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Diesem wurden 50 µl

## Material und Experimenteller Teil

---

einer 1 M Tris-HCL Lösung zugegeben. Für die PCR wurden 2 µl der gewonnenen DNA eingesetzt. In der folgenden Tabelle sind die PCR-Bedingungen dieser Methode aufgelistet (Tab. 7).

**Tab. 7: PCR-Bedingung für die Bestimmung des *lacZ*-Produktes**

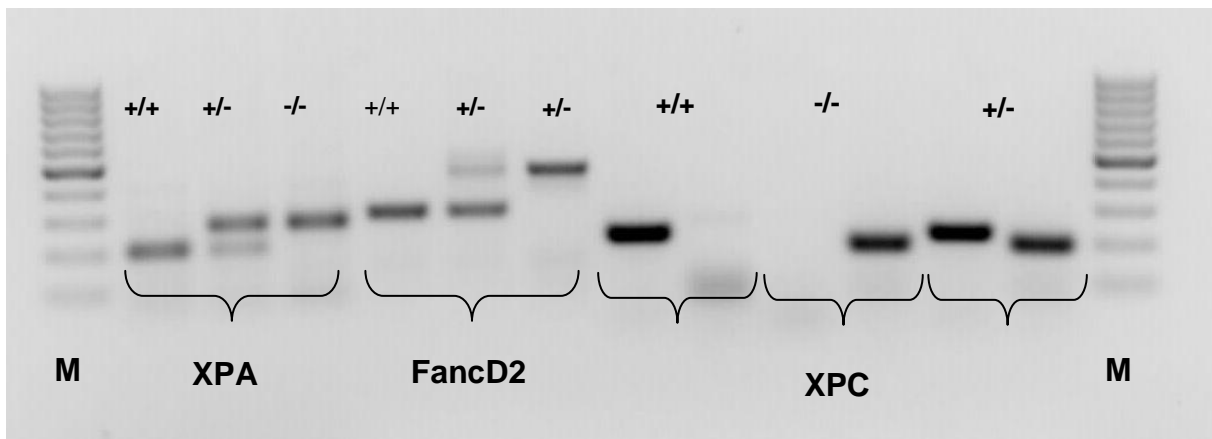
Genotyp	PCR-Master Mix	PCR-Bedingungen	
<b>LacZ</b>	12,5 µl GoTaq (Green Master Mix)	94°C 5 min,	
	0,5 µl Primer (12,5 µM) WT	94°C 30 sec,	
	0,5 µl Primer (12,5 µM) WT	58°C 45 sec,	} 34 Zyklen
	0,5 µl DMSO	72°C 45 sec,	
	9 µl dH <sub>2</sub> O	94°C 30 sec	
	2 µl DNA	72°C 5 min,	
<b>Produkt:</b>		4°C dauerhaft	
<b>LacZ: 433 bp</b>			

### Lösungen für die Genotypisierung:

1x TAE (1 L):                      4,84 g (40 mM) Tris  
    1,14 ml Essigsäure  
    2 ml 0,5 M EDTA  
    pH 8,0

1x TE (1 L):                              10 ml 1M Tris-HCL  
    2 ml 0,5M EDTA, pH 8.0  
    auffüllen auf 1L dH<sub>2</sub>O, pH 7,2

Ohrenpuffer  
 (Waldschütz, IFZ):                      1x PCR Puffer, 0,04 % Tween-20, 0,04 % MP 40,  
    300 µg/ml Proteinase K



**Abb. 12: Genotypen-Nachweis der verwendeten Mauslinien:** Die Genotypisierung der unterschiedlichen Mauslinien erfolgte über eine quantitative PCR, entweder mit einer 3 Primer Methode (XPA, FancD2) oder mit einer 2 Primer Methode (XPC), wobei ein Primerpaar in der Wildtyp-Sequenz dieses Gens lag und ein zweites Primerpaar in der eingefügten (knockout) Kasette des menschlichen PGK-HPRT Gens. Die PCR-Produkte der einzelnen Genotypen stellten sich wie folgt dar: +/+ homozygot Wildtyp; +/- heterozygot, -/- homozygot Knockout; M = 100 bp Marker

### 3.2.3 Behandlung von Mäusen mit MNU

Für den Nachweis von DNA Läsionen durch alkylierende Substanzen und deren zelluläre Auswirkungen auf den Organismus wurden verschiedene C57BL/6J Wildtyp- und Reparatur-defiziente (NER<sup>(-/-)</sup> oder FA<sup>(-/-)</sup>) Mauslinien (Kap. 3.1.5) mit nicht-toxischen Dosen an Methylnitroserharnstoff (MNU; 15-50 mg/kg *i.p.*) und mit/ohne O<sup>6</sup>-Benzylguanin (O<sup>6</sup>-BG; 25 mg/kg *i.p.*) behandelt.

Das Substrat O<sup>6</sup>-BG wurde jeweils 30 min vor der MNU-Behandlung eingesetzt, um eine vollständige Inaktivierung des MGMT-Proteins zu gewährleisten. Es blockiert das Reparaturenzym MGMT, indem es am internen Akzeptormolekül Cystein im aktiven Zentrum der MGMT gebunden wird und somit für dessen Inaktivierung und anschließende Degradation sorgt (Dolan 1990).

Alle Vorbereitungen fanden unter sterilen Bedingungen statt. Die Mäuse wurden für die im Versuch angegebenen Zeitpunkte unter Normalbedingungen gehalten.

#### Lösungen für die *in vivo* Behandlung:

MNU Stock Lösung (100 mg/ml):	100 mg Methylnitroserharnstoff in 1 ml DMSO Lagerung bei -20 °C
O <sup>6</sup> -BG Stock Lösung (50 mg/ml):	50 mg O <sup>6</sup> -Benzylguanin in 1 ml DMSO Lagerung bei -20 °C



### 3.2.4 Behandlung mit Cisplatin *in vivo*

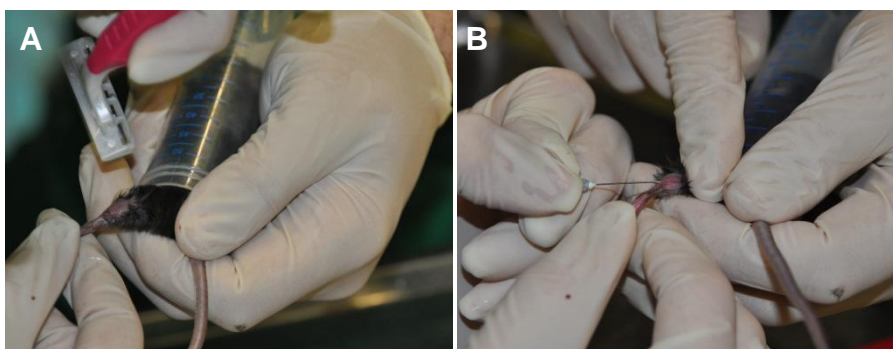
Neben Alkylierungsschäden zeigen auch andere Typen von DNA-Schäden negative Folgen für den Organismus. Um die Cisplatin-induzierenden Pt-[GpG] DNA-Schäden auf zellulärer Ebene und im Organismus zu untersuchen, wurden C57BL/6J Wildtyp- und verschiedene Reparatur-defiziente Mäuse mit nicht-toxischen Dosen an Cisplatin (10 mg/kg, *i.p.*) über verschiedene Zeitpunkte (0, 16, 30, 48 Stunden) behandelt. Alle Vorbereitungen fanden unter sterilen Bedingungen statt. Die Mäuse wurden für die im Versuch angegebenen Zeitpunkte unter Normalbedingungen gehalten.

#### Lösungen für die *in vivo* Behandlung:

Cisplatin (Teva und KL): 100 ml Infusionslösung mit 1 mg/ml Cisplatin Konzentrat

### 3.2.5 Blutentnahme

Einmal pro Woche wurde den Tieren 12  $\mu$ l Venenblut über die *V. saphena* (Oberschenkelvene, außen) entnommen. Mit Hilfe einer Kanüle (20 Gauge, 0,3 mm) wurde die *V. saphena* punktiert und anschließend mit einer Pipette das Vollblut in EDTA-beschichtete Röhrchen (Greiner-bio-one) überführt (Abb. 13).



**Abb. 13: Ablauf einer Blutentnahme aus der *V. saphena* bei der Maus:** Die Mäuse wurden zunächst mit Hilfe eines 50 ml Röhrchens (mit Luftlöchern) fixiert und am Oberschenkel rasiert (A) um den Verlauf der *V. saphena* sichtbar zu machen. Danach erfolgte die Blutentnahme durch Punktion der *V. saphena* (B) mit einer 20 Gauge Kanüle und die Abnahme des Vollblutes mit einer Pipette, die (0,5 M) EDTA beschichtete Spitzen besaß. Das Vollblut wurde anschließend in EDTA beschichteten Blutentnahme-Röhrchen (Greiner-bio-one) gesammelt

Aus den Blutproben wurde anschließend ein Differenzialblutbild mittels des Analysegerätes „Vet ABC“ (Firma Scil proteins) erstellt. Zusätzlich wurden von jedem Tier Blutaussstriche auf Glasobjektträgern angefertigt und mikroskopisch untersucht. Alle Vorbereitungen fanden unter sterilen Bedingungen statt. Die Mäuse wurden für einen Zeitraum von 200 Tagen im Versuch gehalten und beobachtet.

### 3.2.6 Organentnahme

Nach der gewünschten Inkubationszeit wurden die Versuchsmäuse mit CO<sub>2</sub> euthanasiert. Für weitere Analysen wurden Leber, Niere, Milz sowie Knochenmarkzellen entnommen. Das Leber- und Nierengewebe wurde nach der Entnahme direkt in Flüssigstickstoff schockgefroren, um Eiskristallbildungen im Gewebe zu verhindern und langfristig bei -80 °C aufbewahrt.

Das Milzgewebe wurde nach der Entnahme direkt in 5 ml PBS-Lösung kühl gelagert und für weitere Analysen in dieser Lösung unter sterilen Bedingungen zerkleinert. Dabei wurde das Gewebe zwischen zwei Glasobjektträgern so lange zerrieben bis eine homogene Zellsuspension erreicht wurde. Im nächsten Schritt wurden die Lymphozyten aus der Milz isoliert, indem die entstandene Zellsuspension durch ein Zellsieb (75 µm) gegeben wurde, um zunächst eine Einzelzellsuspension zu erhalten. Anschließend erfolgte die Separation der Lymphozyten mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten (GE Healthcare, Dichte 1,077 ± 0,001 g/ml) durch eine Zentrifugation von 30 min, bei 1800 rpm (Rotina 48, Hettich) (ohne Bremse). Die entstandene Interphase, in der sich die Lymphozytenfraktion befand, wurde entnommen und zweimal mit PBS gewaschen (5 min bei 1200 rpm) (Rotina 48, Hettich). Die gereinigten Lymphozyten wurden erneut in PBS resuspendiert und nach Bestimmung der Zellzahl für weitere Analysen verwendet.

Zur Isolation von mononukleären Zellen aus dem Knochenmark wurden zunächst die Knochen von Femur und Tibia der Maus entnommen und in 5 ml PBS kühl aufbewahrt. Unter sterilen Bedingungen wurden die Knochenstücke an beiden Seiten geöffnet und mit einer PBS-beladenen Spritze mit Kanüle (20 Gauge) vorsichtig ausgespült. Die gewonnene Zellsuspension wurde durch ein Zellsieb gegeben und über einen Ficoll-Gradienten aufgetrennt. Die mononukleären Zellen, die als

Interphase sichtbar wurden, konnten entnommen und nach erneutem Waschen in PBS (5 min, 1200 rpm) (Rotina 48, Hettich) für weitere Versuche genutzt werden.

### **3.2.7 Diagnostik erkrankter Tiere**

Für den Karzinogeneseversuch in den verschiedenen Mausmodellen war es wichtig, den Gesundheitszustand der Tiere während der gesamten Versuchsdauer von 200 Tagen zu kontrollieren. Als Gesundheitskriterien galten Gewicht, Sozialverhalten (Ausgrenzung aus dem Gruppenverband), Fellbeschaffenheit (glänzend oder matt) und Körperhaltung (gekrümmter Rücken). Zeigte ein Tier eines der oben beschriebenen äußerlichen Krankheitssymptome oder stark abweichende Erythrozyten- oder Leukozytenzahlen im Blutbild, wurde das Tier mit CO<sub>2</sub> euthanasiert und sezziert. Daraufhin erfolgte eine detaillierte Beschreibung über Veränderungen der Organe und gegebenenfalls entstandener Tumore. Diese wurden daraufhin gewogen und fotografisch dokumentiert.

Die für den Versuch wichtigen Organe wurden entnommen und nach Kap. 3.2.6 verarbeitet. Vorhandenes Tumorgewebe wurde in gekühltem PBS gesammelt und anschließend fixiert.

### **3.2.8 Fixierung von Normal- und Tumorgewebe**

Die in PBS-Lösung gesammelten Gewebeproben wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 24 - 48 Stunden in 4,5 % Formalinlösung (Histofix, PBS-gepuffert, Roth) fixiert. Das Formalin wurde danach entfernt und das Gewebematerial bis zur Anfertigung von Paraffinschnitten in PBS gelagert. Alle Proben wurden im Institut für Pathologie des UK-Essen in Paraffin eingebettet und histologische Schnitte angefertigt.

### 3.2.9 Durchflusszytometrische Analysen (FACS) von T- und B-Zellen aus Knochenmark und Milz

Bei Mäusen mit Anzeichen für ein Lymphom wurde neben der Entnahme von gegebenenfalls vorhandenem Tumormaterial zusätzlich der relative Anteil von T- und B-Zellen in der Lymphozytenfraktion aus Milz und den Zellen des Knochenmarks per FACS („*fluorescence activated cell sorting*“) bestimmt. Zur Vorbereitung der FACS-Analyse wurden alle Isolierungs- und Färbeschritte auf Eis ausgeführt, um eine Zelllyse zu vermeiden. Die Milz- und Knochenmarkszellen wurden zunächst durch ein 75 µm Zellsieb passiert, um makroskopische Gewebereste abzutrennen. Die Einzelzellsuspension wurde dann für 5 min bei 1200 rpm (Rotina 48, Hettich) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und dem Pellet 1 ml „Red blood cell“-Lysepuffer (Stem Cell Technologies) zugefügt. Nach der Inkubationszeit (8 min, RT) wurden die Zellen mit 9 ml kalter PBS/FCS-Lösung gewaschen und für 5 min bei 1200 rpm (Rotina 48, Hettich) zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 5-10 ml PBS/FCS resuspendiert und die Zellen mit Hilfe der Neubauer Zählkammer gezählt. Für die Analyse wurden je  $1 \times 10^6$  Zellen in 200 µl PBS/FCS-Lösung in ein 5 ml FACS-Röhrchen überführt. Für die Inkubation mit den T-Zell-(CD4/CD8) und B-Zell-(B220) spezifischen Antikörpern wurde wie folgt ein Master Mix (je einzelne Probe und Zellpopulation) angesetzt:

#### Master-Mix-Ansatz:

- > 1 µl CD4 Antikörper
- > 1 µl B220 Antikörper
- > 1 µl CD8a Antikörper
- > 50 µl PBS/FCS-Lösung

Der Master Mix wurde zu gleichen Teilen den Proben zugefügt und 10 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml PBS/FCS gewaschen und 5 min bei 1200 rpm (Rotina 48, Hettich) zentrifugiert.

Der Überstand wurde entnommen, das Pellet in 400-500 µl PBS/FCS resuspendiert und für die FACS-Messung verwendet. Damit bei der Analyse nur lebende Zellen berücksichtigt werden, wurde direkt vor der Messung zu jeder Probe 2 µl DAPI-Lösung (1 mg/ml) zugefügt. Die Analyse erfolgte mit dem FACS vantage SE Diva

(BD). Es wurden jeweils 100.000 Zellen gemessen und mit Hilfe der Software FACSdiva (BD) ausgewertet.

### Lösungen für die FACS-Analyse:

PBS/FCS (50 ml): 1,5 ml FCS-Lösung in 48,5 ml (1x) PBS

DAPI-Lösung (1 mg/ml): 1 mg DAPI in 1 ml dH<sub>2</sub>O

### **3.2.10 Cytospin von Suspensionszellen**

Mit Hilfe einer Cytospin-Zentrifuge (Tharmac) wurden Zellen gezielt auf eine definierte Position auf einen Objektträger gebracht, um diese für spezifische Färbungen nutzen zu können. Aus Milzlymphozyten und mononukleären Zellen des Knochenmarks wurden je  $1 \times 10^5$  isolierte Zellen in 100  $\mu$ l PBS aufgenommen, in die für den Cytospin (Tharmac) vorgesehene Vorrichtung einpipettiert und für 10 min bei 500 rpm zentrifugiert (Cellspin R2, Tharmac). Anschließend wurden die Objektträger der Zentrifuge entnommen, über Nacht getrocknet und am nächsten Tag mit Hilfe einer Wright-Giemsa-Färbung nach Romanovsky (1891) gefärbt.

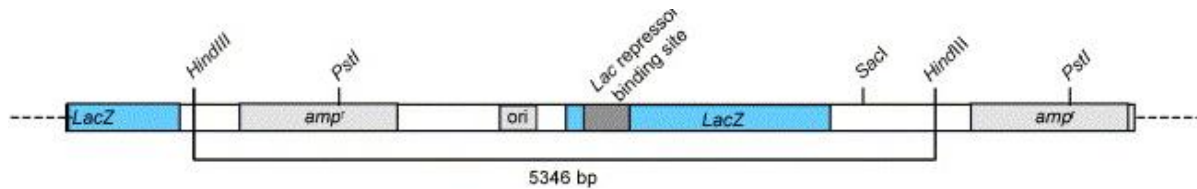
### **3.3 *In vivo* Mutations-Analyse mit Hilfe des *lacZ*-transgenen Mausmodells ("small blue mouse" model)**

Für die Bestimmung der mutagenen Wirkungen von MNU in primären Mauszellen *in vivo* bei An- oder Abwesenheit verschiedener Reparaturkomponenten wurde das transgene Mausmodell (*lacZ*-Mausmodell) nach Boerrigter *et al.* (1995) genutzt, das im Kollaborationslabor von H. Geiger (UK Ulm) etabliert ist. Es stellt das erste Modell dar, bei dem man effizient die Mutationsrate im lebenden Organismus detektieren kann.

Hierzu wurden mehrere Kopien des Plasmids pUR288 (Abb. 14) mit integriertem *lacZ*-Gen über Mikroinjektion in die Keimbahn der Maus integriert (Boerrigter 1995).

## Material und Experimenteller Teil

Das bakterielle *lacZ*-Gen wird im murinen Organismus nicht transkribiert und stellt somit ein repräsentatives Zielgen der globalen Reparatur des Nukleotid Exzisionsreparaturweges dar.



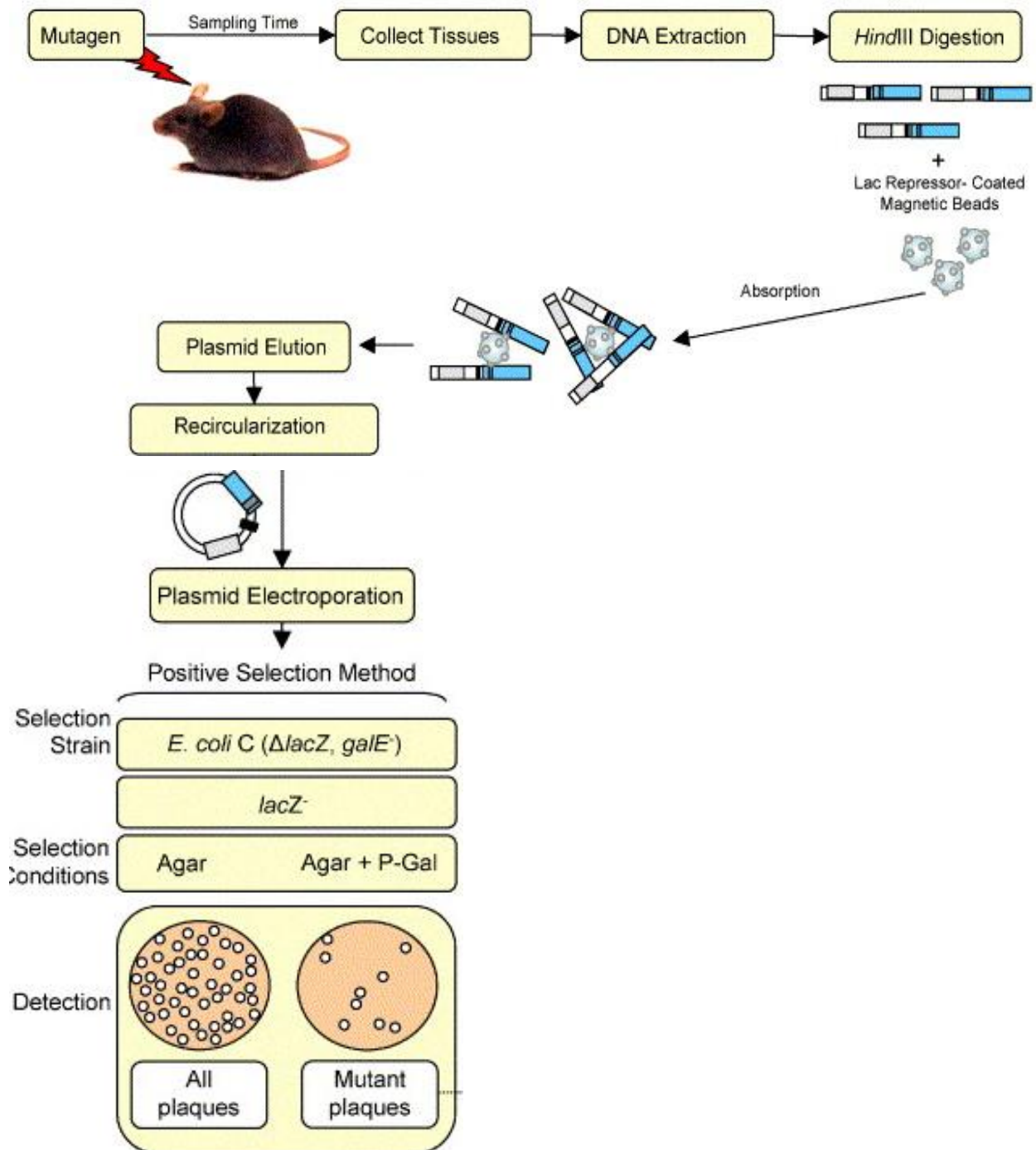
**Abb. 14: Ausschnitt des *lacZ*-Gens:** Dargestellt ist eine von 20 repetitiven *lacZ*-Sequenzen, die in die Keimbahn der ("small blue mouse") Maus integriert wurden. HindIII = Restriktionsenzym-Bindungsstelle; *lac*-Sequenz; *lacZ* repressor binding site = LacI Operon (Lambert 2005).

Es wurden C57BL/6J-Mäuse, die mindestens ein *lacZ*-Gen trugen, mit homozygot Reparatur-defizienten Mäusen ( $XPA^{(-/-)}$  oder  $XPC^{(-/-)}$ ) eingekreuzt und die erhaltenen Genotypen jedes Wurfes über PCR bestimmt. Nach 2 Generationen lagen neben dem  $LacZ^{(+)}$ -transgenen Wildtypstamm auch  $LacZ^{(+)}/XPA^{(-/-)}$  und  $LacZ^{(+)}/XPC^{(-/-)}$ -Mäuse vor.

Je vier Tiere (Alter: 12 Wochen) dieser drei Genotypen wurden zur Mutationsinduktion entweder mit einer einmaligen Injektion von MNU (50 mg/kg; *i.p.*) oder in Kombination mit dem MGMT-Inhibitor  $O^6$ -BG (25 mg/kg, 1 Stunde vor MNU, *i.p.*) behandelt. Die Mäuse wurden während der gesamten Versuchsdauer unter Normalbedingungen gehalten.

Zehn Tage nach der Behandlung wurden die Mäuse mit  $CO_2$  euthanasiert und Knochenmark-, Milz-, Leber-, Nieren- und Gehirngewebe entnommen. Das Milz-, Leber-, Nieren- und Gehirngewebe wurde direkt bei  $-80^\circ C$  eingefroren, während aus dem Knochenmark die DNA direkt mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) isoliert wurde. Die gereinigte DNA wurde in 50  $\mu l$   $dH_2O$  aufgenommen und anschließend für die Mutationsanalyse (Abb. 15) eingesetzt.

## Material und Experimenteller Teil



**Abb. 15: Methodischer Überblick der Mutationsanalyse mit Hilfe *lacZ*-transgener Mauslinien ("small blue mouse" model) (modifiziert nach Lambert 2005).**

Für die Analyse wurden vorab elektrokompente *E. coli* Stämme ( $\Delta lacZ/galE^-$ ) nach Geiger *et al.* (2009) generiert, sowie das Fusionsprotein LacZ/LacI und deren Kopplung an Schaf-anti-[Maus IgG]-Magnet-Beads, um spezifisch die *lacZ*-Sequenzen aus der murinen DNA isolieren zu können.

### Kopplung des Fusionsproteins LacZ/LacI an Magnet-Beads:

- 1 ml Dyna Magnet-Beads, gekoppelt an Schaf-anti-[Maus IgG], 3-Mal mit 1 ml PBS waschen
- Magnet-Beads in 950  $\mu$ l PBS und 50  $\mu$ l Maus-anti-[ $\beta$ -galactosidase] (MAK) (2 mg/ml) resuspendieren
- 1 Stunde im Hybridisierungssofen bei 37 °C inkubieren
- Magnet-Beads kurz abzentrifugieren und den klaren Überstand verwerfen
- 3-Mal Waschen der Magnet-Beads mit je 1 ml PBS
- Beads in 990  $\mu$ l PBS und 10  $\mu$ l LacZ/LacI Fusionsprotein (Fusion zwischen  $\beta$ -Galaktose und LacI-Repressorprotein) aufnehmen
- Komplex aus Magnet-Beads und LacZ/LacI Fusionsprotein für 2 Stunden im Hybridisierungssofen bei 37 °C inkubieren ( $\beta$ -Galaktosidase Antikörper bindet Galaktose des Fusionsprotein, LacI-Repressorprotein liegt frei)
- 3-Mal Waschen der Magnet-Beads mit je 1 ml PBS
- Resuspendieren der Magnet-Beads in 1 ml PBS und bei 4 °C lagern

### 3.3.1 Gewinnung des *lacZ*-Plasmids aus genomischer DNA

Für die Analyse wurden je 10–20  $\mu$ g genomische DNA aus der Knochenmarkfraktion von LacZ<sup>(+)</sup>/Wildtyp-, LacZ<sup>(+)</sup>/XPA<sup>(-/-)</sup> - oder LacZ<sup>(+)</sup>/XPC<sup>(-/-)</sup>-Mäusen untersucht. Diese DNA wurde in 150  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O mit 30  $\mu$ l 5x Puffer (NEB) und 3  $\mu$ l HindIII für 1 Stunde bei 37 °C im Wasserbad verdaut, um die einzelnen *lacZ*-Sequenzen auf separaten DNA-Fragmenten zu erhalten. Zusätzlich zu jeder Analyse wurde eine nicht-transgene Kontroll-DNA (ntg) mitgeführt.

Die zuvor gekoppelten Schaf-anti-[Maus IgG]-Magnet-Beads wurden nun über einen Magneten pelletiert und das PBS abgenommen. Den Magnet-Beads wurde die DNA Lösung zugegeben und nach leichtem Schütteln für 1 Stunde im Hybridisierungssofen bei 37°C inkubiert, um eine optimale Bindung der Magnet-gekoppelten anti- $\beta$ -Galaktosidase Antikörper zum lacI Operon, das direkt vor der *lacZ*-Sequenz liegt, zu ermöglichen. Dadurch wurden gezielt die *lacZ*-Fragmente an den Bead-gekoppelten Antikörper (Maus-anti-[ $\beta$ -Galaktosidase]) gebunden. Das Bead-DNA-Gemisch wurde dreimal mit 250  $\mu$ l (1x) Bindungs-Puffer über einen Magneten gewaschen und



## Material und Experimenteller Teil

---

nachfolgend in 100 µl dH<sub>2</sub>O, 75 µl IPTG Elutionspuffer, 5 µl IPTG-Lösung und 20 µl NEB Puffer #2 resuspendiert und wiederum nach leichtem Schwenken für 30 min bei 37 °C im Hybridisierungssofen rotiert. Das Gemisch wurde anschließend 20 min bei 65 °C geschüttelt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur (RT) wurde die DNA-Lösung kurz abzentrifugiert und in 2 µl ATP und 1 µl T4 DNA Ligase resuspendiert und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach Gewinnung der *lacZ*-Fragmente wurden die Beads wieder von der DNA getrennt, indem das DNA-Bead Gemisch an den Magneten angebracht und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt wurde. Dieser Vorgang wurde 3 – 4 Mal wiederholt. Schließlich wurde die DNA in 1,5 µl Glycogen, 22 µl (3 M) Natriumacetat (pH 4,9) und 560 µl 95 % Ethanol (2,5 Volumen) für 30 min bei -80 °C gefällt. Das Präzipitat wurde 30 min bei 14.000 g, 4 °C, zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in 250 µl 70 % Ethanol resuspendiert und erneut 5 min bei 14.000 g, 4 °C zentrifugiert. Wiederum wurde der komplette Überstand abgenommen und die DNA 10 min getrocknet. Erst nachdem kein Rest-Ethanol mehr vorhanden war, wurde die reine Plasmid-DNA in 5 µl dH<sub>2</sub>O aufgenommen und für die Elektroporation des *E. coli* Stammes verwendet.

### Lösungen für die Plasmid Isolation:

HindIII:	3 µl (60 U) vom 20 U/µl Ansatz
TB-Medium (direkt ansetzen):	0,9 g Trypton, 1,18 g Hefe, 0,47 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,11 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in 50 ml dH <sub>2</sub> O → Autoklavieren für 20 min 400 µl 50 % Glycerol zugeben → lagern bei 42 °C im Wasserbad
Top-Agar:	1 g Trypton, 0,5 g Hefe, 0,025 g NaCl, 0,35 g Agar in 100 ml dH <sub>2</sub> O
ATP (0,1 mM):	2 µl vom 10 mM Ansatz
T4 DNA Ligase (0,1 U):	1 µl von 10x 1 U/µl T4 DNA Ligase in 1x T4 DNA Ligase Puffer
Gylcogen:	1,5 µl vom 20 µg/µl Ansatz
Natriumacetat (3 M):	22 µl (0,1-fache Volumen)

### 3.3.2 Elektroporation von *E. coli*-Bakterien

Die speziellen Küvetten für die Elektroporation (0,1 cm Gene Pulser, Bio-Rad) wurden für 20 min auf Eis gekühlt. Dann wurden 60 µl der elektrokompetenten *E. coli* ( $\Delta lacZ/galE^-$ ) Bakteriensuspension zu jeweils 5 µl der zirkulären *lacZ*-Plasmide gegeben und mit der Pipette durch auf- und abpipettieren leicht gemischt. Die Zellsuspension wurde in die Küvetten überführt und in den Gene Pulser (25 µFa, 1,85 kV, Controller 200 W) gestellt, um die Plasmid-DNA in die *E. coli* Bakterien zu transfizieren. Anschließend wurde die *E.coli*-Suspension mit 1 ml eiskaltem TB Medium versetzt und in ein neues 15 ml Reaktionsgefäß mit 1 ml TB Puffer überführt. Die Lösung wurde für 1 Stunde auf dem Schüttler (225 rpm) bei 37 °C inkubiert.

Vier µl der Zellsuspension wurden zu 13 ml X-Gal Top-Agar zugefügt und auf X-Gal Platten ausplattiert. Die restlichen Zellen wurden in 13 ml P-Gal Top-Agar pipettiert und ebenfalls ausplattiert. Die X-Gal und P-Gal Platten wurden für 15 Stunden im Inkubator bei 37 °C gelagert. Dabei stellte die X-Gal Platte die Kontrollplatte dar, auf der alle Bakterien sowohl mit funktionellem als auch mutiertem *lacZ*-Gen wachsen konnten, während auf der Selektionsplatte P-Gal nur Bakterien mit mutiertem *lacZ*-Gen wachsen konnten.

Für die Bestimmung der vorläufigen Mutationsfrequenz galten folgende Parameter:

$$\frac{\text{Anzahl roter Kolonien (P-Gal)}}{\text{Anzahl blauer Kolonien (X-Gal)}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} = \text{vorläufige Mutationsrate}$$

X-Gal: Kontrollplatte

P-Pal: Selektionsplatte

Verdünnungsfaktor: 500

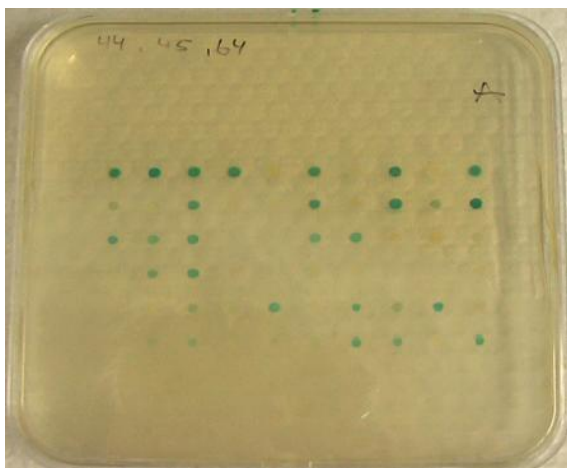
#### Lösungen für die Elektroporation:

X-Gal Top-Agar: 50 µg/ml 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid, 50 µl Kanamycin (50 mg/ml), 75 µl X-Gal (50 mg/ml), 300 µl Ampicillin (50 mg/ml), In 100 ml Top Agar Medium

P-Gal Top-Agar: 50 µg/ml 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazoliumchlorid, 50 µl Kanamycin (50 mg/ml), 0,3 % phenyl-b-D Galactosidase (0,3 g vom Ansatz), 300 µl Ampicillin (50 mg/ml)  
In 100 ml Top Agar Medium

### 3.3.3 Mutationsanalyse

Um „echte“ *lacZ*-Mutanten von Falschmutanten zu unterscheiden, wurden repräsentativ 20 Kolonien pro Tier und Gewebe der jeweiligen P-Gal Platten gepickt und in 150 µl LB+ Medium über Nacht bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Mit Hilfe eines Mikroplatten Replikators (Boekel) wurden daraufhin die Bakterien auf eine neue X-Gal Platte für den Galaktose-Sensitivitätstest gebracht und für 1 - 2 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Wenn eine Blaufärbung der entstandenen Kolonien sichtbar wurde, waren diese Bakterien Galaktose-insensitiv und enthielten ein Wildtyp-Plasmid (Falschmutante). Gab es keine Blaufärbung nach 1 – 2 Stunden, sondern frühestens nach 24 Stunden eine leichte Färbung, galten diese Bakterien als echte Mutanten, da das auf dem Plasmid kodierte LacZ-Protein durch Mutationen teilweise oder vollständig inaktiviert wurde (Abb. 16).



**Abb. 16: Nachweis „echter“ *lacZ*-mutierter Bakterien 24 Stunden nach Inkubation auf einer X-Gal Sensitivitätsplatte:** Es wurden 20 *lacZ*-mutierte Bakterienklone von der P-Gal Selektionsplatte gepickt und auf eine X-Gal Platte überführt und für 1 Stunde im Brutschrank (37 °C) inkubiert. Entstanden nach der Inkubationszeit keine Kolonien, konnten Falschmutanten ausgeschlossen werden. Je nach Position der Mutation im *lacZ*-Gen allerdings konnten nach weiteren 24 Stunden (Brutschrank) noch Kolonien gebildet werden. Blaue Kolonien = Mutation, die keinen Funktionsausfall im *lacZ* hervorrief; schwach blaue Kolonien = Mutation, mit Funktionseinschränkung im *lacZ*-Gen; weiße Kolonie = Mutation mit vollständigem Funktionsausfall im *lacZ*-Gen.

## Material und Experimenteller Teil

Für die Mutationsanalyse wurden abermals Bakterienkolonien von der P-Gal Platte gepickt und über Nacht in einer 96-well Platte herangezogen. Am nächsten Tag wurden die herangewachsenen Bakterien resuspendiert und 2 µl für die PCR-Reaktion eingesetzt. Für die Amplifikation der *lacZ*-Plasmid Sequenz galten folgende PCR-Bedingungen:

**Tab. 8: PCR-Bedingung zur Amplifikation des *lacZ*-Plasmid Produktes**

Genotyp	PCR-Master Mix	PCR-Bedingungen
<b>LacZ</b>	12,5 µl HotStarTaq Master Mix (Qiagen)	95°C 10 min,
	0,5 µl Primer pUR4923-F (12,5 µM)	95°C 20 sec, } 34 Zyklen
	0,5µl Primer pUR3829-R (12,5 µM)	68°C 8 min,
		95°C 20 sec
		68°C 10 min,
<b>Produkt:</b> <i>lacZ</i> -Plasmid (pUR 288): 4200 bp	11,5 µl dH <sub>2</sub> O 2 µl DNA	4°C dauerhaft

Anschließend wurden zwei Proben des PCR-Produktes separat mit HindIII und Aval verdaut:

HindIII:

10,25 µl dH<sub>2</sub>O  
1,5 µl NEB Puffer #2  
0,25 µl HindIII

Aval:

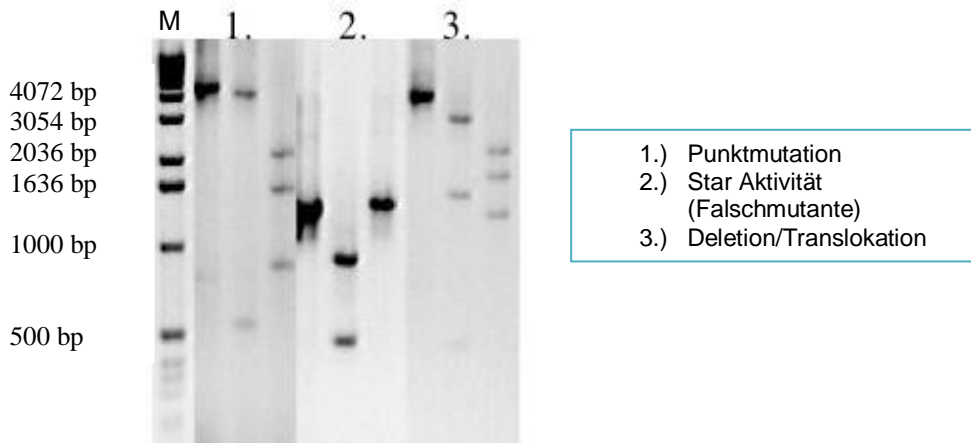
10 µl dH<sub>2</sub>O  
1,5 µl NEB Puffer #4  
0,5 µl Aval

Je 12 µl des HindIII und Aval Master Mix wurden in eine neue 96-well Platte überführt und mit je 3 µl des PCR-Produktes 1 Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Abschließend wurden je 5 µl der PCR-Proben und dem HindIII und Aval Verdau mit je 5 µl Ladepuffer (6x) versetzt und von diesem Ansatz 8 µl in der Reihenfolge a) PCR-Produkt *lacZ*, b) HindIII Verdau, c) Aval Verdau auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen.

## Material und Experimenteller Teil

Dabei ergab sich ein spezifisches Bandenmuster, das Punktmutationen detektieren und von Deletionen/Translokationen und Falschmutanten unterscheiden konnte (Abb. 17). Als Größenstandard diente ein 1 kb Marker (Fermentas).



**Abb. 17: Gelanalyse von *lacZ*-Mutationstypen:** Die unterschiedlichen PCR-Produkte wurden in der Reihenfolge (*lacZ*-Produkt, HindIII Verdau, Aval Verdau) auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Anhand des spezifischen Bandenmusters konnten die verschiedenen Mutationstypen bestimmt werden (1 -> Punktmutation; 2 -> Falschmutante; 3 -> Deletion/Translokation; M -> 1 kb Marker).

Anhand des spezifischen Bandenmusters konnte die tatsächliche Mutationsrate des *lacZ*-Plasmids berechnet werden. Dabei galten die 20 Klone pro Gewebe als 100 % von denen die Anzahl der Falschmutanten und Deletionen/Translokationen prozentual abgezogen wurden. Damit ergab sich eine Mutationsrate bezogen auf 20 *lacZ*-Sequenzen/Gewebe.

Für weitere Analysen wurden je 5 *lacZ*-mutierte Bakterienklone pro Tier und Genotyp in Glycerin-Stocks bei -20 °C eingefroren und aufbewahrt.

### Lösungen für die Mutationsanalyse:

LB+ Medium (500 ml):

5 g Trypton, 2,5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl  
in 500 ml dH<sub>2</sub>O → autoklavieren für 20 min  
250 µl (25 µg/ml) Kanamycin, 750 µl (75 µg/ml) Ampicillin

X-Gal Platte:

20 Spatel LB Agar, 250µl (25 µg/ml)  
Kanamycin, 1500 µl (150 µg/ml) Ampicillin,  
375 µl X-Gal (75 µg/ml)

1 % Agarose TBE Gel:

3 g Agarose, 300 ml 1x TBE, 6 µl EtBr

### 3.3.4 Isolation der Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Gewinnung der Plasmid DNA aus den *lacZ*-mutierten *E. coli* (Kap. 3.3.3) wurden die Bakterienklone zunächst mit einem Zahnstocher aus den gefrorenen Glycerin-Stocks in 5 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht im Inkubator (37 °C) geschüttelt. Am nächsten Tag wurde 1,5 ml der Bakterienkultur abgenommen, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 20 sec bei maximaler Geschwindigkeit (18.000 g, RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 300 µl P1 Resuspensionspuffer gelöst und gemischt. Nach einer Zugabe von 300 µl P2 Lysepuffer wurde die Probe vorsichtig geschwenkt und für maximal 5 min inkubiert. Danach wurden weitere 300 µl P3 Neutralisierungspuffer zum Stoppen der Reaktion zugefügt, durch vorsichtiges Schwenken gemischt und der gesamte Ansatz für 10 min bei 18.000 g bei 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß pipettiert und die darin befindliche Plasmid-DNA durch Zugabe von 500 µl (95 %) Ethanol gefällt, gefolgt von einem weiteren Zentrifugationsschritt, bei RT für 10 min und 18.000 g. Der Überstand wurde abgenommen und die DNA im Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 5 min bei 18.000 g und RT wurde der Überstand verworfen und das Pellet 5-15 min (RT) getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 50 µl dH<sub>2</sub>O gelöst und der DNA-Gehalt photometrisch (Nanodrop 1000) gemessen:

#### Lösungen für die Plasmid-Isolierung aus *E. coli*:

LB-Medium:	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl, Auffüllen auf 1 L dH <sub>2</sub> O, 1 ml (100 mg/ml) Ampicillin
P1 Puffer:	Resuspensionspuffer (Qiagen Plasmid Maxi Kit + 28 mg RNase A)
P2 Puffer:	Lysepuffer (Qiagen Plasmid Maxi Kit)
P3 Puffer:	Neutralisationspuffer (Qiagen Plasmid Maxi Kit)

### 3.3.5 Sequenzierung des *lacZ*-Gens

Für die Sequenzierung wurde die gereinigte Plasmid-DNA der *E. coli*-Mutanten (Kap. 3.3.4) verwendet. Die Sequenz-Analyse erfolgte im Institut für Zellbiologie (UK Essen) und beinhaltete die Schritte: a) PCR der Plasmid DNA; b) Fällung der DNA aus dem PCR-Ansatz und c) Sequenzierung der Plasmid-DNA.

Für die PCR der Plasmid-DNA wurde zunächst folgender Master Mix angesetzt:

0,5 µl	Big Dye
3,75 µl	Sequenzierungspuffer (5x)
150-300 ng	Plasmid DNA
0,75 µl (3,2 pmol)	Sequenzierungsprimer (siehe 2.1.4)
auf 20 µl	PCR reines Wasser

Es folgte die PCR-Reaktion mit folgenden Parametern:

96°C für 5 min	} 24 Zyklen
95°C für 15 sec	
50°C für 10 sec	
60°C für 4 min	
10°C dauerhaft	

Nach der PCR-Reaktion wurde die amplifizierte Plasmid-DNA für die Sequenzierungsreaktion gefällt. Dafür wurde folgendes Protokoll benutzt:

- Zu 20 µl PCR-Produkt 40 µl PCR reines H<sub>2</sub>O zugeben
- 150 µl (100 %) Ethanol zufügen, RT
- weitere 6 µl (3 M) NaOAc/dextranblue Lösung beifügen
- vorsichtig mischen
- 30 min bei 13000 rpm (ca. 15000 g) zentrifugieren
- vorsichtig Überstand abnehmen und Pellet mit 200 µl (70 %) Ethanol waschen
- 10 min, 13000 rpm, RT zentrifugieren
- Überstand abnehmen und Pellet lufttrocknen

## Material und Experimenteller Teil

---

Schließlich wurde das DNA-Pellet in 10 µl Formamid gelöst und im ABI 3130 Sequencer gemessen. Für die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse stand eine spezielle Auswertungssoftware (SeqScape 2.5, Applied Biosystems) zur Verfügung, mit der Punktmutationen in den einzelnen Proben zu einer Plasmid-DNA Referenz ermittelt werden konnten.

### Lösungen für die Sequenzierung:

Natriumacetat/ dextranblue (NaOAc) (1 L):	123,06 g (3 M) Natriumacetat in 500 ml dH <sub>2</sub> O; 73,05 g (0,5 M) EDTA in 500 ml dH <sub>2</sub> O; beide Lösungen mischen; 125 ml 1,25 % Dextran Blau-Lösung zugeben (Verhältnis 1:8)
--	--

### **3.4 DNA-Extraktion aus dem Lebergewebe der Maus**

Die DNA von MNU ± O<sup>6</sup>-BG-behandelten C57BL/6J Wildtyp- und Reparaturdefizienten Mäusen wurde aus dem Lebergewebe entweder über eine phenolische Extraktion oder über Aufreinigungssäulen (Machery-Nagel) isoliert.

Bei der phenolischen Extraktion wurden zunächst 1 - 2 mg des Gewebes in 10 ml MT-Puffer gegeben und nach Zugabe von SDS (0,2 %), RNAse A (Endkonzentration: 75 µg/ml) und Proteinase K (Endkonzentration: 0,1 mg/ml) mit Hilfe des Ultrathorax zerkleinert, bis kein Gewebematerial mehr zu sehen war.

Die Gewebesuspension wurde über Nacht im Wasserbad schüttelnd bei 56 °C lysiert. Daraufhin wurde Phenol im Verhältnis 1:1 (v/v) zugegeben und 15 min bei RT über Kopf geschüttelt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 5 min, bei 10 °C und 3000 rpm (Minifuge T, Heraeus), bei dem ein Gemisch entstand, das eine obere wässrige, DNA-haltige Phase zeigte, sowie eine proteinhaltige Interphase und unten eine phenolische Phase aufwies.

Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25/24/1) im Verhältnis 1:1 (v/v) versetzt. Das Gemisch wurde für 15 min bei RT über Kopf geschüttelt und danach 5 min bei 10 °C und 3000 rpm (Minifuge T, Heraeus) abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis keine Interphase mehr erkennbar war.



## Material und Experimenteller Teil

---

Schließlich wurde die obere Phase entnommen und in ein doppeltes Volumen an eiskaltem 100 % Ethanol pipettiert, um die DNA zu fällen. Die ausgefallene DNA bildete weiße Schlieren, die daraufhin mit einer gekrümmten Glaskapillare „gefischt“, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 10 ml 70 % Ethanol kurz gewaschen wurde. Das Ethanol wurde abgenommen, die DNA kurz getrocknet und für weitere Analysen in 1 ml TE-Puffer aufgenommen.

Für die DNA Isolierung über ein Säulenaufreinigungs-Kit (Machery-Nagel) wurde zuerst das Lebergewebe in 20 ml Puffer G2 mittels eines Ultrathorax homogenisiert. Daraufhin wurde das Homogenisat in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und 450 µl Proteinase K (Stock: 20 mg/ml) zugegeben. Die Lösung wurde vorsichtig durch leichtes Schütteln für 30 sec gemischt. Die Probe wurde anschließend für 2 Stunden bei 56 °C inkubiert. Falls nach der Inkubationszeit noch Zellreste sichtbar waren, wurde ein Zentrifugationsschritt für 5 min bei 5000 g angeschlossen.

Es folgte die Equilibrierung der Säule durch Zugabe von 5 ml Puffer N2. Zudem wurden weitere 10 ml Puffer N2 der Probe zugefügt, die kurz für 15 sec mit einem Vortexer gemischt und zuletzt auf die Säule geladen wurde.

Nach dem Durchlauf der Probe wurde die Säule 3-Mal mit je 8 ml Puffer N3 gewaschen und schließlich die DNA in einem neuen Reaktionsgefäß durch Zugabe von 8 ml Puffer N5 direkt auf die Säule eluiert. Dieser Schritt konnte wiederholt werden, um mehr DNA gewinnen zu können. Die Fällung der DNA erfolgte über Zugabe von 5,6 ml Isopropanol bei RT, für 30 - 60 min. Abschließend wurde die gefällte DNA zentrifugiert für 25 min, 15.000 rpm (Centrifuge 5415D, Eppendorf), bei 4 °C. Das DNA Pellet wurde kurz luftgetrocknet und anschließend in 1 ml TE-Puffer gelöst. Für die Bestimmung der DNA Konzentration wurde der Nanodrop 1000 genutzt.

### Lösungen für DNA Isolation:

#### Phenol-Extraktion:

MT-Puffer (1 L):	5,48 g (100 mM) NaCl
	23,38 g (80 mM) EDTA, pH 8,0
	7,88 g (50 mM) Tris/HCl, pH 8,0
	auffüllen auf 1 L mit dH <sub>2</sub> O

## Material und Experimenteller Teil

---

SDS (0,2 %).	0,2 g auf 100 ml dH <sub>2</sub> O
RNAse A (10 mg/ml):	10 mg in 100 µl 1M (10 mM) Tris HCL und 30 µl 5 M (15 mM) NaCL auffüllen auf 10 ml mit dH <sub>2</sub> O 15 min bei 100 °C erhitzen (Heizblock) auf RT abkühlen lassen, je 500 µl Aliquots bei -20 °C lagern
Proteinase K (1 mg/ml):	1 mg Proteinase K auf 1 ml dH <sub>2</sub> O, bei -20 °C lagern
<u>Nucleo Bond AX-G 500 Kit:</u>	
Puffer G2:	800 mM Guanin-HCL, 30 mM EDTA, 30 mM Tris- HCL, 5 % Tween 20, 0,5 % Triton X-100, pH 8.0
Proteinase K (20 mg/ml):	20 mg Proteinase K auf 1ml dH <sub>2</sub> O
Puffer N2:	100 mM Tris/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 15 % Ethanol, 900 mM KCL, pH 6.3
Puffer N3:	100 mM Tris/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 15 % Ethanol, 1150 mM KCL, pH 6.3
Puffer N5:	100 mM Tris/H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 15 % Ethanol, 1000 mM KCL, pH 8.5
TE-Puffer (1 L):	10 ml (10 mM) 1M Tris-HCl (pH7,5) 2 ml 0,5 M (1 mM) EDTA (pH 8,0) auffüllen auf 1 L mit dH <sub>2</sub> O

## 3.5 Färbemethoden

### 3.5.1 Färbung von Blutausstrichen

Die Färbung der Blutausstriche erfolgte über eine Häma-Schnellfärbung (Niepkötter Labortechnik), um krankhafte Veränderungen (z.B. Anwesenheit von Lymphoblasten) im Blutbild der Tiere nachweisen zu können. Die Methode beruht auf der Blutfärbung nach Pappenheim (1912) und beinhaltet eine kombinierte Eosin- und Methylenblau-Färbung. Der saure Farbstoff Eosin zerfällt in wässriger Lösung mit negativer Ladung und färbt positiv geladene Proteinstrukturen an. Das basische Methylenblau bildet in wässriger Lösung positive Ladungen aus und färbt somit Zellbestandteile mit negativer Ladung an. Die Fixierung der Zellen wird durch eine Methanol-Lösung gewährleistet (Abb. 18).

Für die Färbung wurde folgendes Protokoll benutzt:

- Die Objektträger mit den Blutausstrichen über Nacht trocknen
- Die Objektträger 10-Mal 1 sec in Reagenz 1 tauchen
- 5-Mal 1sec in Reagenz 2 tauchen
- 8-Mal 1 sec in Reagenz 3 tauchen
- Färbelösung vom Objektträger kurz abtropfen lassen
- 5 min in PBS waschen und trocknen lassen
- Mikroskopische Auswertung

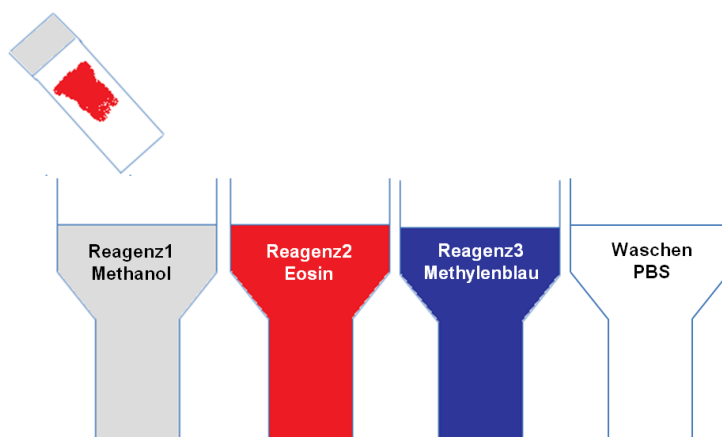


Abb. 18: Blut-Färbung nach Pappenheim (1912)

#### **Darstellung der gefärbten Zelltypen:**

Zellkerne:	rot-violett
Erythrozyten:	pink-bräunlich
Eosinophile Granula:	rot-rotbraun
Neutrophile Granula:	schwach violett
Lymphozyten:	blau
Lymphoblasten*:	blau
(*bis zu 3-fach größer als Lymphozyten oder Monozyten)	

### 3.5.2 Detektion von Addukten in der DNA mittels Immunfluoreszenzfärbung

Die Methode der Addukt-spezifischen *in situ* Fluoreszenzfärbung („Immuncytologischer Assay“, ICA) von DNA-Schäden wurde von Seiler *et al.* (1993) entwickelt und färbt mit Hilfe von spezifischen Antikörpern O<sup>6</sup>-meG- (Maus-anti-[O<sup>6</sup>-meG] EM 2-3) oder Pt-(GpG)-Addukte (Ratte-anti-[Pt-(GpG)] R-C18) in der DNA von Zellpräparaten und Gewebeschnitten an.

Einzelzellen: Für die Färbung von Einzelzell-Suspensionen (Zelllinien bzw. Lymphozytenfraktion aus Milz oder mononukleäre Zellen des Knochenmarks) wurden die Zellen 2-Mal mit PBS gewaschen und auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen / ml in PBS eingestellt. Davon wurden je 10  $\mu$ l auf einen Adhäsions-Objektträger (Superfrost Plus Gold, ThermoFisher) aufgetragen und bei RT getrocknet.

Gewebeschnitte: Von tiefgefrorenem Leber- oder Nierengewebe wurden in einem Kryostat-Mikrotom 8  $\mu$ m Gefrierschnitte angefertigt und auf Adhäsions-Objektträger (Superfrost Plus Gold, ThermoFisher) aufgetragen und getrocknet.

Bis zur Analyse wurden die Objektträger bei -20 °C gelagert.

Für die *in situ*-Färbung wurden die Objektträger zunächst 30 min in Methanol bei -20 °C fixiert und anschließend 5 min in PBS bei RT gewaschen. Damit die Antikörper an die Addukte in der Kern-DNA binden können, wurde diese in einer Alkali-Methanol-Lösung (60:40 v/v) für 5 min bei 4 °C partiell denaturiert. Nach dem Waschen mit PBS (5 min, RT) folgte ein sequentieller Proteinverdau mit Pepsin (60-100  $\mu$ g/ml in H<sub>2</sub>O/HCL bei Einzelzell-Suspensionen bzw. 600-800  $\mu$ g/ml in H<sub>2</sub>O/HCL bei Gewebeschnitten; pH 6; 10 min; 37 °C) und mit Proteinase K (50-100  $\mu$ g/ml in Proteinase K Puffer bei Einzelzell-Suspensionen bzw. 150-250  $\mu$ g/ml in Proteinase K Puffer; 10 min, 37 °C bei Gewebeschnitten). Die Objektträger wurden dann in PBS/Glycerin gewaschen (5 min, RT).

Im Anschluss folgte eine 30-minütige Inkubation in 5 % Milchpulver-Lösung, um unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper zu blockieren. Danach wurden die Objektträger mit 1 ml des Primärantikörpers EM 2-3 (Maus-anti-[O<sup>6</sup>meG], 0,02  $\mu$ g/ml in 1 % BSA/PBS) oder R-C18 (Ratte-anti-[Pt-(GpG)], 0,2  $\mu$ g/ml in 1 % BSA/PBS) über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach erneuten Waschschrritten mit PBST (5 min) und

## Material und Experimenteller Teil

---

mit PBS (5 min) wurden die Objektträger nochmals in 5 % Milchpulver 30 min geblockt, mit Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörpern (Kaninchen-anti-[Maus-Ig]-Cy3 oder Kaninchen-anti-[Ratte Ig]-Cy3, jeweils 1:200 verdünnt in 1 % BSA/PBS) überschichtet und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach dem Waschen mit PBST (5 min) und PBS (5 min) erfolgte die Gegenfärbung der DNA mit DAPI (1 µg/ml; 30 min). Abschließend wurden die Proben mit Antifading Mounting Medium (Squarix) und einem Deckglas (24 x 60 cm) bedeckt.

Die O<sup>6</sup>-meG-Adduktmessung erfolgte über ein Zeiss Axioplan Fluoreszenzmikroskop, das mit einer digitalen Kamera ausgestattet war und über ein Computerunterstütztes Mehrparameter Bildanalyse-System (ACAS) als Auswertungssoftware verfügte. Dadurch konnte auf Einzelzellebene [Quotient der Fluoreszenzsignale für Cy3 (O<sup>6</sup>-meG) und DAPI (DNA-Gehalt)] die relative Schadensmenge bestimmt werden. Dazu wurden mindestens 100 Zellen pro Probe gemessen.

### Lösungen für die Immunfluoreszenzfärbung:

Alkali-Lösung (1 L):	2,8 g (70 mM) NaOH, 8,2 g (140 mM) NaCl, auffüllen auf 1 L dH <sub>2</sub> O, lagern bei 4 °C, vor Gebrauch Alkali-Lösung mit Methanol 60:40 (v/v) mischen
PBS/Glycerin:	2 mg (0,2 %) Glycerin pro 1 ml Lösung (Ansatz 200 ml)
Milchpulver (5 %):	50 mg Milchpulver pro 1 ml Lösung (Ansatz 200 ml)
PBST (1 L):	2,5 ml (0,25 %) Tween 20 in 1 L PBS
PBS (1 L):	3,58 g (100 mM) Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 7,6 g (1,5 M) NaCl, auffüllen auf 1 L dH <sub>2</sub> O, pH 7,5
DAPI (1 µg/ml):	1 ml (200 µg/ml) DAPI-Lösung in 200 ml (1x) PBS-Lösung

### 3.6 Zellkulturmethoden

Alle Versuche mit Zelllinien oder Primärzellen fanden unter sterilen Bedingungen statt. Die Zelllinien wurden mit dem jeweiligen Kulturmedium bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit im Inkubator gehalten und nach einer Konfluenz von 60 - 80 % geteilt. Die adhärennten Zelllinien wurden dabei mit 1 ml (1x) Trypsin/EDTA angedaut, um diese vom Gefäßboden zu lösen. Anschließend wurde der Verdau durch Zugabe von 9 ml des Kulturmediums gestoppt, die Zellen nach ihrem Konfluenzgrad geteilt und in ein neues Kulturgefäß überführt. Alle zwei bis drei Tage wurde dieser Vorgang wiederholt. Die Kulturbedingungen der Zelllinien sind in der unten dargestellten Tabelle (Tab. 9) aufgeführt.

Tab. 9: Kulturbedingungen von immortalisierten primären humanen Fancl-Fibroblasten

Zelllinie	Zelltyp	Kulturbedingung	Quelle
<b>SII-ip (Fancl<sup>-/-</sup>)</b>	Humane Fibroblasten	DMEM, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep, 5 % CO <sub>2</sub>	Hahnenberg, Düsseldorf
<b>S91 (SII-ip, Fancl rekonstituiert)</b>	Humane Fibroblasten	DMEM, 10 % FCS, 1 % Pen/Strep, 5 % CO <sub>2</sub>	Hahnenberg Düsseldorf

#### 3.6.1 Behandlung der Fancl-Zelllinie mit MNU

Je 150.000 Zellen von SII-ip sowie von S91 Fibroblasten wurden in 1 ml Kulturmedium in Zellkulturplatten (6-well) ausgesetzt. Die Gabe von MNU [50 µg/ml] ± O<sup>6</sup>-BG [25 µg/ml] für 0, 4 und 24 Stunden erfolgte direkt ins Kulturmedium, in dem die Zellen gehalten wurden.

Nach einer 1-stündigen Vorinkubation mit dem MGMT-Inhibitor O<sup>6</sup>-BG folgte die MNU-Behandlung über die komplette Versuchsdauer. Zu den bestimmten Zeitpunkten wurden die Zellen durch Gabe von 0,5 ml Trypsin/EDTA vom Plattenboden gelöst und mit 1,5 ml PBS gewaschen (5 min, 1200 rpm) (Rotina 48, Hettich). Das Zellpellet wurde erneut in 1 ml PBS gelöst und mithilfe der Zählkammer

bestimmt. Anschließend wurden pro Zeitpunkt 10.000 bis 15.000 Zellen in 15 µl Lösung auf einen Adhäsionsobjektträger (Superfrost Plus Gold, ThermoFischer) gegeben und getrocknet. Die Zellen wurden immunzytologisch für O<sup>6</sup>-meG gefärbt und mikroskopisch ausgewertet.

### 3.6.2 Kolonienbildungsversuch (CFA-Sensitivitätstest)

Der Kolonienbildungsversuch (*Colony Formation Assay*) stellt eine gute Möglichkeit dar, das Überleben von Primärzellen nach einer Behandlung mit DNA-reaktiven Substanzen zu messen.

Hierzu wurden primäre mononukleäre Zellen aus dem Knochenmark (Femur und Tibia) der Maus isoliert und *ex vivo* mit steigenden Dosen MNU [0, 2,5, 5, 10, 25, 50 µg/ml] ± dem MGMT-Inhibitor O<sup>6</sup>-BG [25 µg/ml] behandelt.

Die Methylzellulose wurde entweder selbst hergestellt oder gebrauchsfertig (Stem cell Tech) gekauft.

Eingesetzt wurden Triplikate aus je 300.000 Zellen pro Ansatz für je 1 ml MethoCult Ansatz. Die Zellen wurden nach Behandlung mit den oben beschriebenen Dosen an MNU ± O<sup>6</sup>-BG kurz gemischt und direkt in 1 ml MethoCult Ansatz gegeben. Der MethoCult Ansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

#### Ansatz der Methylzellulose (= 100 ml MethoCult Ansatz, Stem cell Tech):

40 ml MethoCult Base  
30 ml FBS  
10 ml 10 % BSA  
1 ml IL-3 (100 ng/ml)  
200 µl mSCF (100 ng/ml)  
200 µl EPO (2000 U/ml)  
1 ml β-Me (10 mM)  
1 ml Pen/Strep  
17 ml IMDM

## Material und Experimenteller Teil

---

Nach Zugabe der MNU-behandelten Zellen in die vorbereitete Methylzellulose wurde die Zellsuspension unter Vermeidung von Luftbläschen leicht gemischt und für sieben Tage bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die entstandenen Kolonien am Mikroskop ausgezählt.

### Lösungen für die *ex vivo* Exposition:

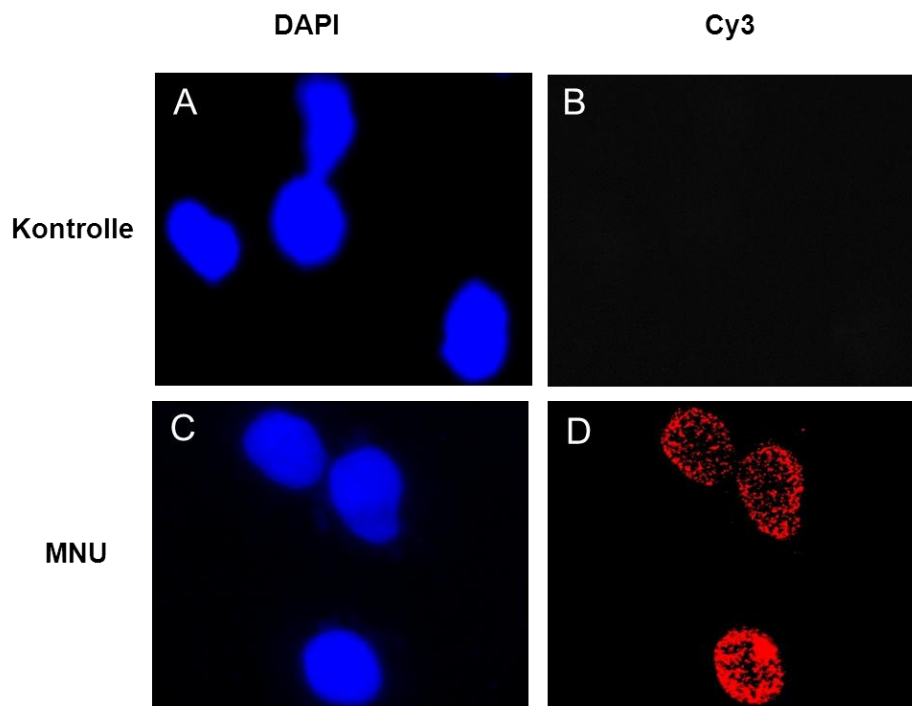
10 % BSA:	4 g BSA in 40 ml IMDM lösen, steril filtrieren (0,22 µm Filter)
IL-3 (100 ng/ml):	Stock 10 µg/ml 1:10 verdünnen
mSCF (100 ng/ml):	Stock 50 µg/ml 1:50 verdünnen
β-Me (10 mM):	7 µl β-Me in 10 ml IMDM lösen



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Immunzytologische Messung von O<sup>6</sup>-meG in der DNA von humanen Zelllinien und in unterschiedlichen Zelltypen Reparatur-profizienter und -defizienter Mauslinien

Die Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht es, O<sup>6</sup>-meG-Schäden direkt im Zellkern zu detektieren. Dazu wird ein spezifischer monoklonaler Primärantikörper (EM 2-3; Maus-anti-[O<sup>6</sup>-meG]) gegen O<sup>6</sup>-meG eingesetzt, der durch Bindung mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Maus-[Ig]-Cy3) ein messbares Signal erzeugt. Zudem wurde eine DAPI Gegenfärbung vorgenommen, um den DNA-Gehalt jeder Zelle zu bestimmen. Die relative Menge an O<sup>6</sup>-meG-Schäden zum DNA-Gehalt jeder Zelle kann anschließend anhand der Fluoreszenzstärken mit einem Mehrkanal-Bildanalysesystem (ACAS II) ermittelt werden. Zum Nachweis, dass dieses Detektionssystem O<sup>6</sup>-meG in der nukleären DNA quantitativ aufzeigt, wurde eine humane Fibroblastenzelllinie mit einer Einzeldosis MNU [50 µg/ml] behandelt und zur Kontrolle eine unbehandelte Probe mitgeführt (Abb. 19).

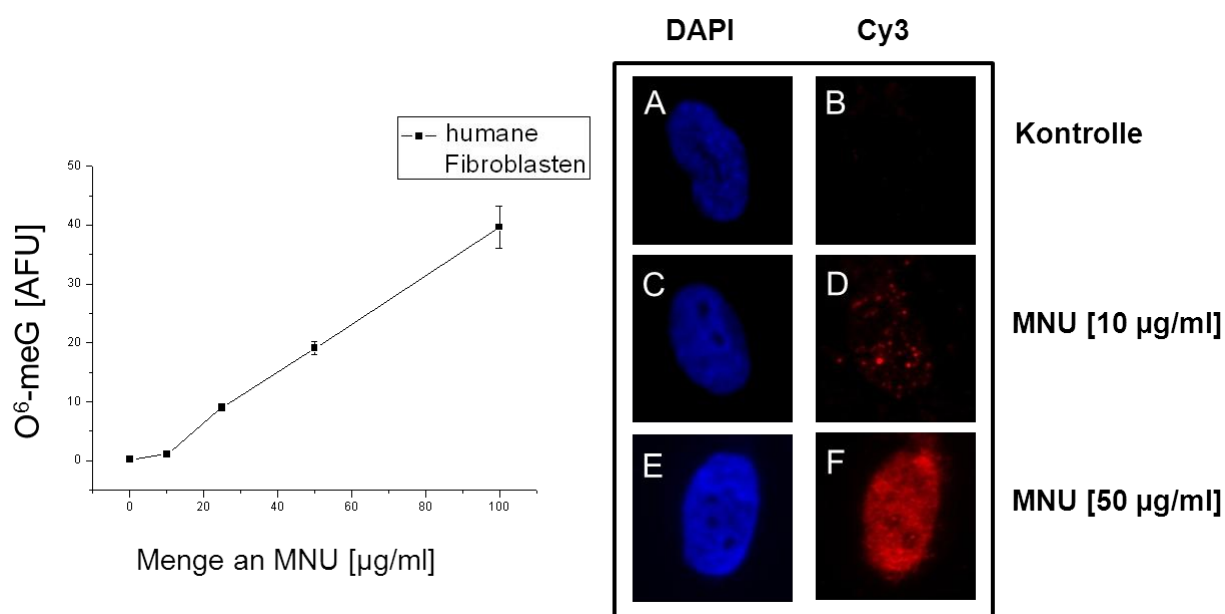


**Abb. 19: Immunfärbung von O<sup>6</sup>-meG-Addukten in der Kern-DNA von MNU-behandelten humanen Fibroblasten:** Humane Fibroblasten wurden unbehandelt (A, B) oder nach MNU [50 µg/ml] + O<sup>6</sup>-BG [25 µg/ml] -Behandlung (C, D) spezifisch für O<sup>6</sup>-meG angefärbt. A und C zeigen den DNA-Gehalt (DAPI), B und D den O<sup>6</sup>-meG-Gehalt (Cy3) in der Kern-DNA an (Objektiv 63-fach).

## Ergebnisse

Anschließend wurden die Zellen immunzytologisch für O<sup>6</sup>-meG gefärbt. Die Menge an O<sup>6</sup>-meG ermittelte sich aus dem Quotienten des Cy3- (O<sup>6</sup>-meG) und des DAPI- (DNA-Gehalt) Signals. Die Einheit der relativen O<sup>6</sup>-meG-Menge (C/D) wurde in *arbitrary fluorescence units* [AFU] angegeben. In den unbehandelten Kontrollzellen wurde ein DAPI-Signal (Abb. 19 A), allerdings kein O<sup>6</sup>-meG-spezifisches Cy3-Signal detektiert (Abb. 19 B). Bei den MNU-behandelten Zellen wurde sowohl ein DAPI- (Abb. 19 C) als auch ein Cy3-Signal (Abb. 19 D) ermittelt, dass die Spezifität des Antikörpers für den O<sup>6</sup>-meG-Schaden zeigt.

Um eine Dosisabhängigkeit von MNU zu bestimmen, wurden erneut humane Fibroblastenzellen mit verschiedenen Dosen an MNU [0, 10, 25, 50, 100 µg/ml] + O<sup>6</sup>-BG [25 µg/ml] behandelt. Bei steigender MNU-Dosis konnte ein zunehmendes Cy3-Signal beobachtet werden. Dies belegte, dass mit steigender Behandlungsdosis vermehrt O<sup>6</sup>-meG-Läsionen auftraten (Abb. 20). In weiteren Versuchen sollte nun die Frage geklärt werden, welche Rolle das Reparaturenzym MGMT bei der Entfernung von O<sup>6</sup>-meG in der DNA spielt.



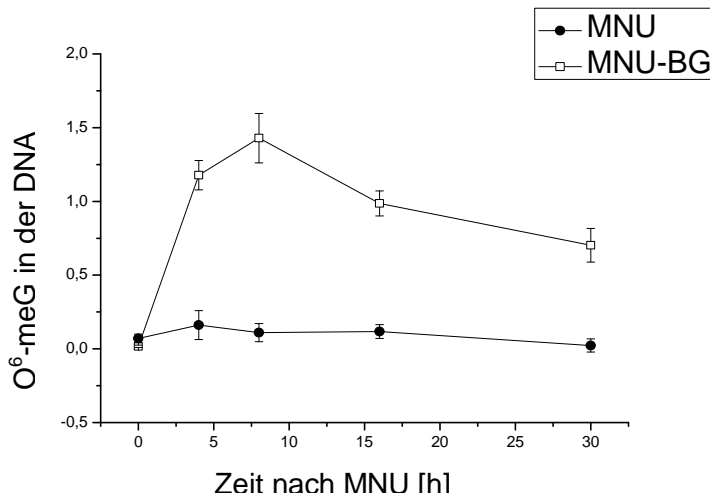
**Abb. 20: MNU-Dosis-abhängiger Nachweis von O<sup>6</sup>-meG-Addukten in der DNA humaner Fibroblasten:** Humane Fibroblasten wurden mit O<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg] vorinkubiert und anschließend mit verschiedenen Dosen MNU [0, 10, 25, 50, 100 µg/ml] über vier Stunden behandelt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen auf Objektträger gebracht und immunzytologisch für O<sup>6</sup>-meG angefärbt. Mit Hilfe der ACAS Software wurden aus je 100 Zellen die DAPI- und Cy3-Signale gemessen und als Varianzparameter jeweils das 95 %-Konfidenzintervall der 100 gemessenen Zellen ermittelt. Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig wiederholt. Links: Auftragung der O<sup>6</sup>-meG-Addukt-Gehalte nach steigenden Dosen MNU; Rechts: Fotografische Darstellung der Zellkerne bei bestimmten MNU-Dosen (Objektiv 40-fach).

### 4.1.1 Beteiligung der Methyl-Guanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) an der Entfernung von O<sup>6</sup>-meG-Schäden

Bislang beschreiben viele Studien, dass ausschließlich das Reparaturprotein MGMT an der Entfernung von MNU-induzierten O<sup>6</sup>-meG:C Schäden beteiligt ist (Roos 2004, Kaina 2007). Die meisten Erkenntnisse sind aus Experimenten an Zelllinien oder an Primärzellen gewonnen, jedoch nur wenige tierexperimentelle Versuche in dieser Richtung durchgeführt worden.

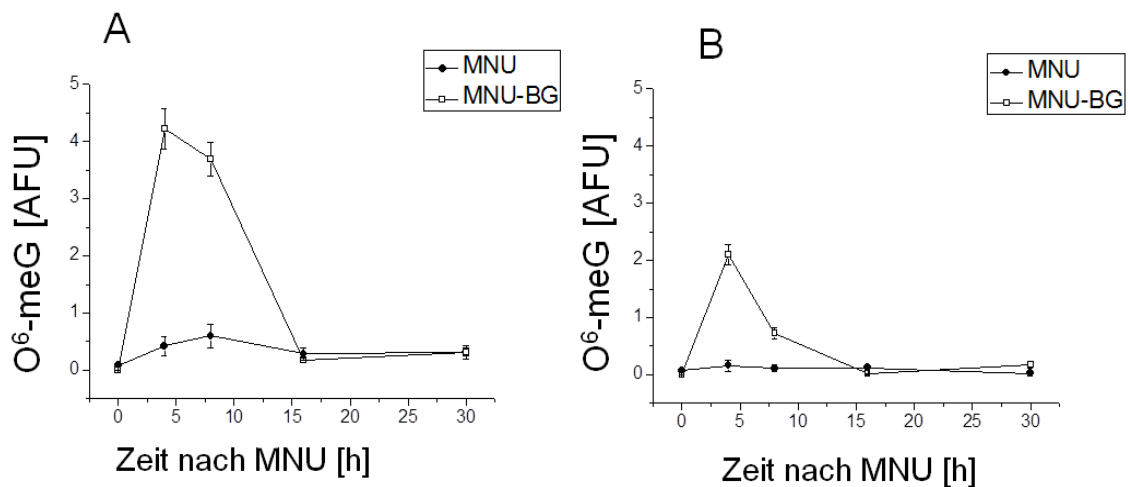
Um zu untersuchen, ob ausschließlich das MGMT-Protein an der Reparatur von O<sup>6</sup>-meG:C Schäden beteiligt ist, wurden Reparatur-profiziente C57BL/6J Wildtypmäuse mit einer Einzeldosis MNU (50 mg/kg) oder in Kombination mit dem MGMT-Inhibitor O<sup>6</sup>-BG (25 mg/kg) behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 4, 8, 16, 30 Stunden) euthanasiert. Für die Analyse wurden Lymphozyten aus der Milz und mononukleäre Zellen des Knochenmarks als Repräsentanten des hämatopoetischen System ausgewählt sowie Nierencortex-Zellen und Hepatozyten der Leber. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die oben genannten Blutzellen isoliert und auf Objektträger aufgebracht sowie Niere und Leber entnommen, schockgefroren und 8 µm-Schnitte angefertigt. Die Proben wurden anschließend im ICA für O<sup>6</sup>-meG spezifisch gefärbt. Anhand der ermittelten relativen O<sup>6</sup>-meG-Adduktgehalte konnten dann Reparaturkinetiken erstellt werden. In den Lymphozyten der Milz (Abb. 21) sowie den Zellen des Knochenmarks (nicht gezeigt) wurde nach MNU-Exposition ein Anstieg des O<sup>6</sup>-meG-Gehaltes innerhalb von acht Stunden erkennbar sowie eine vollständige Reparatur innerhalb von 30 Stunden. Nach Depletion der MGMT-Aktivität mit dem Inhibitor O<sup>6</sup>-BG zeigten sich zu allen Zeitpunkten erheblich (bis zu achtfach) höhere O<sup>6</sup>-meG-Spiegel in der DNA als bei den nur mit MNU-behandelten Tieren und eine lediglich partielle (ca. 40 %-tige) Abnahme nach 30 Stunden. Dieser Versuch zeigte, wie auch in der Literatur beschrieben, eine erhebliche Beteiligung der MGMT an der Reparatur von O<sup>6</sup>-meG-Läsionen, belegte aber gleichzeitig auch die Rolle weiterer Reparaturmechanismen, da auch bei Depletion der MGMT weiterhin eine Entfernung dieser Schäden in den untersuchten Zellen stattfand. Weiter sollte geprüft werden, ob dieser Effekt speziell für hämatopoetische Zellen zutrifft oder auch in anderen Gewebetypen sichtbar wird.

## Ergebnisse



**Abb. 21: Reparaturkinetik von O<sup>6</sup>-meG in der nukleären DNA von Milzlymphozyten nach MNU-Exposition *in vivo*:** C57BL/6J Wildtypmäuse wurden entweder mit MNU [50 mg/kg] alleine (●) oder mit MNU [50 mg/kg] und O<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg] (□) *i.p.* behandelt. Zu ausgewählten Zeitpunkten wurden Lymphozyten aus der Milz isoliert und spezifisch die O<sup>6</sup>-meG-Läsionen angefärbt. Mit Hilfe der ACAS Software wurden je 100 Zellen ausgewertet. Mittelwerte und Varianzparameter (95 %-Konfidenzintervall) wurden aus jeweils 100 gemessenen Zellen berechnet. Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig wiederholt.

Bei der Analyse wurde in den Cortex-Zellen des Nierengewebes sowie den Hepatozyten der C57BL/6J-Wildtypmäuse, parallel zu den Lymphozyten, ein Anstieg der O<sup>6</sup>-meG-Konzentration in den ersten vier Stunden nach MNU-Behandlung sowie eine vollständige Reparatur nach 30 Stunden detektiert. Bei Blockierung der MGMT zeigten die Cortex-Zellen innerhalb der ersten acht Stunden bis zu 9-fach und die Hepatozyten bis zu 10-fach höhere O<sup>6</sup>-meG-Spiegel als die Tiere ohne Inhibitor-Behandlung (Abbildungen 22 A und B).



**Abb. 22: MGMT-unabhängige Reparatur von O<sup>6</sup>-meG in der DNA von Nierencortex-Zellen und von Hepatozyten nach MNU-Exposition *in vivo*:** Die experimentellen Bedingungen waren wie in Abbildung 21 angegeben. Die ICA-Analysen wurden an Gefrierschnitten von Niere (A) und Leber (B) durchgeführt.

In beiden Zelltypen waren die O<sup>6</sup>-meG-Addukte aber auch unter MGMT-Inhibition bereits nach 16 Stunden nicht mehr nachweisbar. Dies zeigte, dass eine Entfernung von O<sup>6</sup>-meG in allen untersuchten Geweben gleichermaßen stattfand und auch MGMT-unabhängig ablief. Es ist daher wahrscheinlich, dass neben der MGMT auch ein Exzisions-Reparaturweg an der Entfernung von O<sup>6</sup>-meG-Schäden beteiligt ist.

### **4.1.2 Beteiligung der Nukleotid-Exzisions-Reparatur an der Entfernung von O<sup>6</sup>-meG-Läsionen aus der DNA**

#### **4.1.2.1 Das DNA-Schadenserkennungsprotein XPC als essentieller Faktor für die MGMT-unabhängige Reparatur von O<sup>6</sup>-meG**

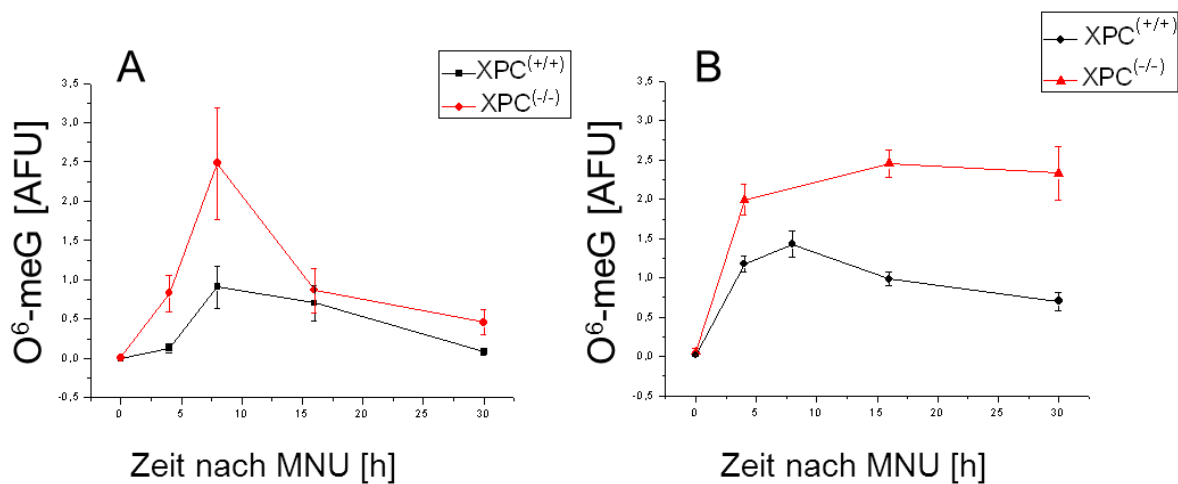
Der komplexe NER-Mechanismus erkennt ein breites Spektrum von DNA-Schadenstypen, die mit unterschiedlicher Effizienz repariert werden. Dabei spielt das XPC-Protein als initiale Komponente der global genomischen Reparatur (GG-NER) der NER eine entscheidende Rolle in der Schadenserkennung. Um zu prüfen, ob dieser Exzisionsreparaturweg unter *in vivo*-Bedingungen an der Entfernung von O<sup>6</sup>-meG aus der DNA von primären Zellen beteiligt ist, wurden syngenen XPC-profizienten (XPC<sup>(+/+)</sup>) und XPC-defizienten (XPC<sup>(-/-)</sup>) Mäusen einmalig entweder nur MNU [50 mg/kg] oder MNU [50 mg/kg] und O<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg] *i.p.* verabreicht. Zu den Zeitpunkten 0, 4, 8, 16 und 30 Stunden nach Behandlung wurden, wie unter 4.1.1 angegeben, Milzlymphozyten und mononukleare Zellen des Knochenmarks isoliert, Gewebeschnitte von Niere und Leber angefertigt und O<sup>6</sup>-meG-spezifisch gefärbt.

In den Milzlymphozyten beider Mauslinien wurde zum Zeitpunkt acht Stunden nach MNU der höchste Adduktspiegel gemessen, der jedoch bei den XPC-defizienten Tiere etwa 2,5-fach höher war als bei den Wildtypmäusen. Bei beiden Linien waren die Werte nach 16 Stunden auf etwa das gleiche Niveau abgefallen und nach 30 Stunden waren die Addukte auch in den XPC<sup>(-/-)</sup>-Zellen zu etwa 80 % repariert (Abb. 23 A).

Bei Blockierung der endogenen MGMT erreichte der Adduktspiegel in den Lymphozyten der Wildtypiere bereits nach vier Stunden ein deutlich höheres Niveau und die Reparatur verlief langsamer (Abb. 23 B). Bei den XPC<sup>(-/-)</sup>-Tieren war das Adduktmaximum ebenfalls nach vier Stunden erreicht und die O<sup>6</sup>-meG-Läsionen

## Ergebnisse

persistierten über die gesamte Beobachtungszeit von 30 Stunden, ohne dass eine nennenswerte Reparatur zu beobachten war.

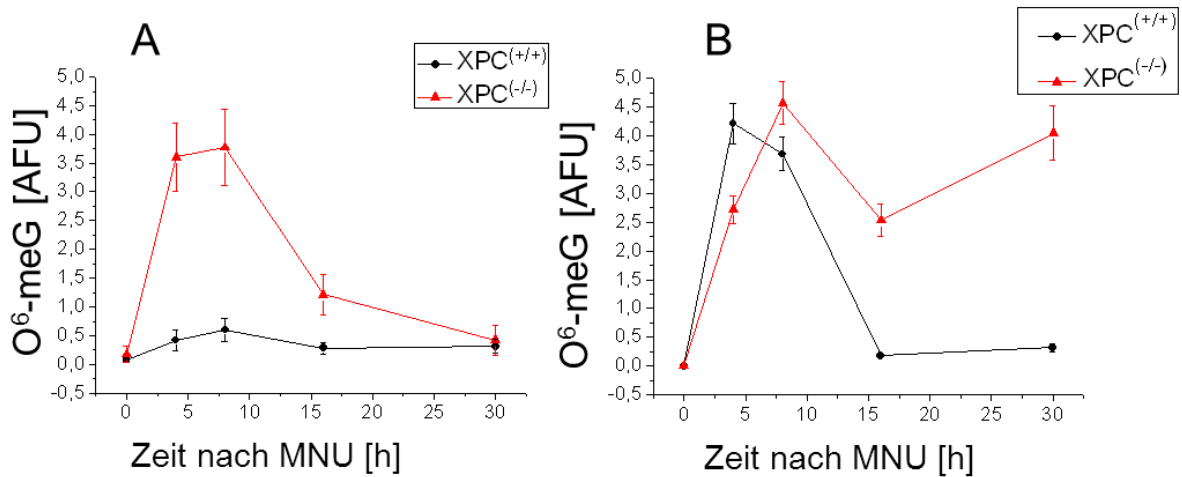


**Abb. 23: Reparaturkinetiken für O<sup>6</sup>-meG in Milzlymphozyten von NER-profizienten und -defizienten Mäusen:** Wildtyp- und XPC<sup>(-/-)</sup>-Mäuse wurden entweder mit MNU [50 mg/kg] alleine (A) oder mit MNU [50 mg/kg] und O<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg] (B) *i.p.* behandelt und zu verschiedenen Zeitpunkten die Lymphozyten aus der Milz isoliert. Diese wurden anschließend für O<sup>6</sup>-meG gefärbt und 100 Zellen gemessen, wie in Abb. 21 angegeben. Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig wiederholt.

Vergleichbare Addukverläufe wurden auch in den Cortex-Zellen der Niere gemessen (Abb. 24). Bei den XPC<sup>(-/-)</sup>-Mäusen erreichten die O<sup>6</sup>-meG-Konzentrationen vier und acht Stunden nach MNU-Behandlung etwa 7-fach höhere Werte als bei den Wildtyptieren, zeigten aber bereits nach 16 Stunden einen deutlichen Abfall und waren nach 30 Stunden auf das niedrige Niveau der Wildtypiere wieder abgesunken (Abb. 24 A). Dagegen war bei XPC-Verlust und pharmakologischer Blockierung der MGMT ein durchgehend hoher O<sup>6</sup>-meG-Spiegel in der DNA über 30 Stunden detektierbar (Abb. 24 B).

Im Gegensatz zu den Wildtyptieren waren in den Hepatozyten der Leber von XPC<sup>(-/-)</sup>-Mäusen vier Stunden nach MNU ebenfalls nennenswerte Addukt Mengen messbar. Diese fielen dann aber schnell ab und waren nach 30 Stunden fast vollständig repariert (Abb. 25 A). Wurde die MGMT-Aktivität durch die O<sup>6</sup>-BG-Injektion blockiert, wurden zwar bei beiden Mausstämmen innerhalb der ersten acht Stunden deutlich erhöhte O<sup>6</sup>-meG-Konzentrationen in der DNA nachgewiesen, aber auch bei Funktionsausfall des XPC-Proteins erfolgte in den Hepatozyten im weiteren Verlauf eine fast vollständige Reparatur (Abb. 25 B).

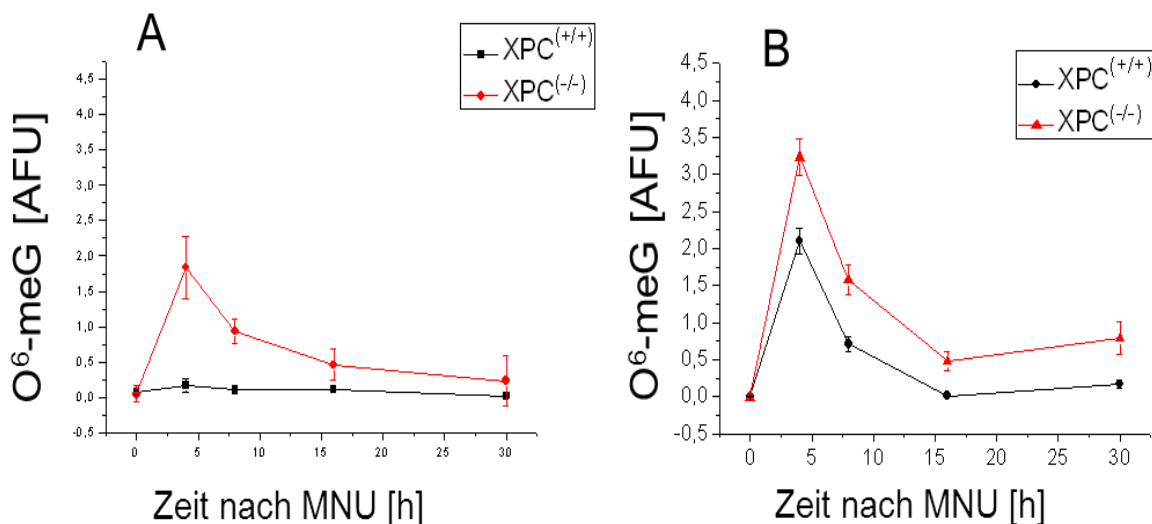
## Ergebnisse



**Abb. 24: Reparatur von O<sup>6</sup>-meG in MNU-behandelten murinen Cortex-Zellen der Niere *in vivo*:** Wildtyp- und XPC<sup>(-/-)</sup>-Mäuse wurden mit MNU [50 mg/kg] alleine (A) oder mit MNU [50 mg/kg] und O<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg] (B) *i.p.* behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und für O<sup>6</sup>-meG angefärbt und gemessen (siehe Abb.21). Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig wiederholt.

Dies konnte durch die hohe MGMT-Aktivität in der Leber bedingt sein, die vermutlich durch eine einmalige O<sup>6</sup>-BG-Injektion nur unvollständig blockiert wurde.

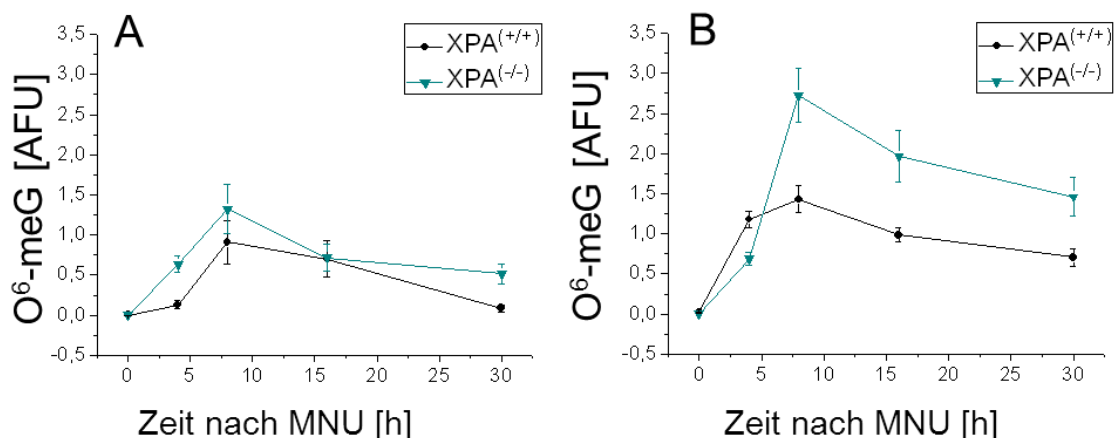
Die lange Persistenz der O<sup>6</sup>-meG-Läsionen in Milzlymphozyten und Nierencortex-Zellen bei gleichzeitigem Verlust von MGMT- und XPC-Aktivität belegen die große funktionelle Bedeutung der Exzisionsreparatur für die Entfernung dieser kritischen Schäden aus dem Genom.



**Abb. 25: Reparaturkinetiken für O<sup>6</sup>-meG aus Hepatozyten NER-profizienter und -defizienter Mäuse:** Wildtyp- und XPC<sup>(-/-)</sup>-Mäuse wurden jeweils mit MNU [50 mg/kg] allein (A) oder mit MNU [50 mg/kg] + O<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg] (B) *i.p.* injiziert. Die ICA-Analyse wurde an Gefrierschnitten der Leber durchgeführt. Die Auswertung von drei unabhängigen Analysen erfolgte wie in Abb. 21 dargestellt.

## 4.1.2.2 Rolle des XPA-Proteins im Reparaturprozess von O<sup>6</sup>-meG

Neben XPC stellt das XPA-Protein eine weitere Komponente des NER-Systems dar. XPA ist sowohl in der globalen (GG-NER) als auch der Transkriptions-gekoppelten Reparatur (TC-NER) involviert und ist ein wichtiger Faktor bei der Verifizierung von DNA-Schäden. Ein Ausfall dieses Proteins führt zum Erliegen der TC-NER sowie der GG-NER. Um zu untersuchen, welche Bedeutung XPA für die Entfernung von O<sup>6</sup>-meG-Schäden hat, wurden XPA-profiziente (XPA<sup>(+/+)</sup>) und XPA-defiziente (XPA<sup>(-/-)</sup>)-Mäuse mit MNU [50 mg/kg] oder MNU [50 mg/kg] und dem MGMT-Inhibitor O<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg] *i.p.* behandelt. Nach 4, 8, 16 und 30 Stunden sowie einer unbehandelten Kontrolle wurden Milzlymphozyten und mononukleäre Zellen des Knochenmarks entnommen sowie 8 µm Schnitte von Niere und Leber angefertigt und immunzytologisch angefärbt. In den Lymphozyten von MNU-behandelten Wildtyp- und XPA<sup>(-/-)</sup>-Tieren wurden innerhalb der ersten acht Stunden ähnliche Addukt-Mengen detektiert, die nach 30 Stunden in Wildtyp-Tieren vollständig und in XPA<sup>(-/-)</sup>-Tieren zu 50 % entfernt wurden (Abb. 26 A). Die Blockierung der MGMT zeigte in den XPA<sup>(-/-)</sup>-Zellen nach acht Stunden bis zu 2-fach höhere O<sup>6</sup>-meG-Mengen als in den XPA<sup>(+/+)</sup>-Zellen, wobei in beiden Mausstämmen daraufhin eine eingeschränkte Reparatur erfolgte (Abb. 26 B).



**Abb. 26: XPA spielt eine untergeordnete Rolle in der O<sup>6</sup>-meG-Reparatur *in vivo*:** Wildtyp- und XPA<sup>(-/-)</sup>-Mäuse wurden einmalig mit MNU [50 mg/kg] (A) oder mit MNU [50 mg/kg] und O<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg] (B) *i.p.* behandelt. Lymphozyten der Milz wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und einer O<sup>6</sup>-meG-Färbung unterzogen. Die Standardabweichung erfolgte aus den Werten von drei unabhängigen Experimenten.

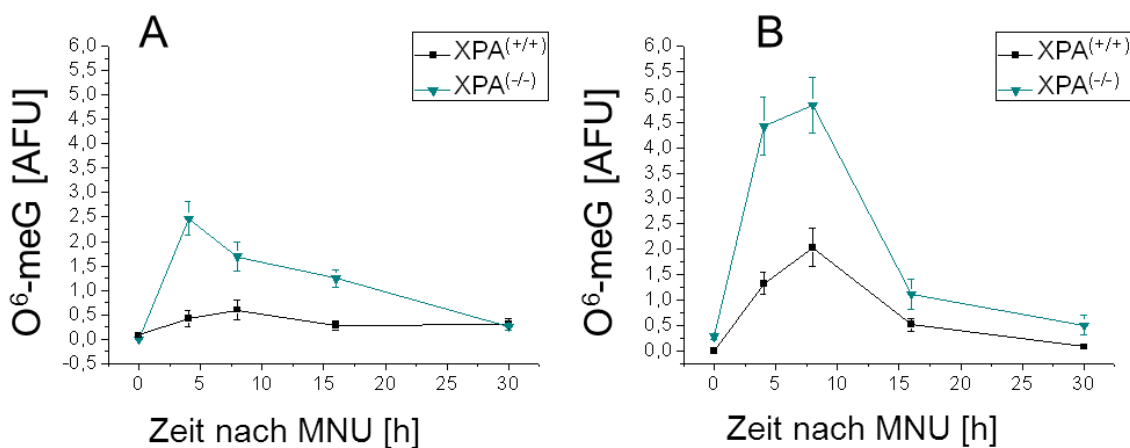


## Ergebnisse

In den Zellen des Nierengewebes führte ein Verlust der XPA-Funktion zunächst zu einer 6-fach höheren Schadensinduktion vergleichsweise zu XPA<sup>(+/+)</sup>-Tieren, die allerdings nach 30 Stunden wie bei den Wildtyptieren wieder vollständig entfernt wurden (Abb. 27 A).

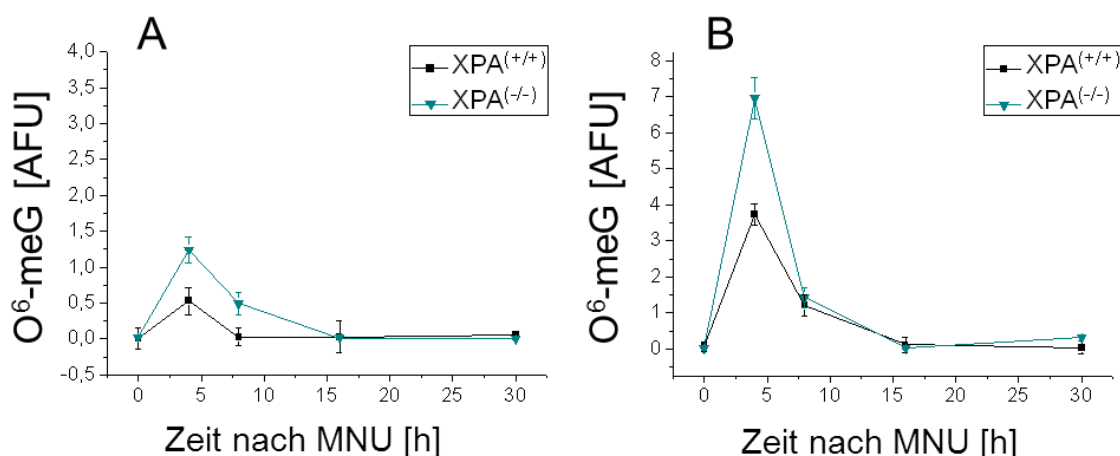
Die zusätzliche Depletion der MGMT verursachte in den XPA<sup>(-/-)</sup>-Zellen innerhalb von acht Stunden bis zu 2,5-fach höhere Schadensmengen im Vergleich zu Reparaturkompetenten Wildtypzellen. Nach weiteren acht Stunden wurden sowohl in XPA<sup>(-/-)</sup>- als auch XPA<sup>(+/+)</sup>-Zellen die meisten der vorhandenen Schäden wieder repariert, so dass nach 30 Stunden lediglich in den XPA<sup>(-/-)</sup>-Zellen noch 10 % der Schäden zurückblieben (Abb. 27 B).

Die O<sup>6</sup>-meG-Kinetik in den Hepatozyten der XPA<sup>(+/+)</sup>- und XPA<sup>(-/-)</sup>-Tiere lief nach MNU-Behandlung über die Zeit ähnlich ab, wobei durch den XPA-Knockout nach vier Stunden doppelt so viele O<sup>6</sup>-meG-Addukte detektiert wurden als beim Wildtyp. Nach acht Stunden waren in den XPA<sup>(-/-)</sup>-Tieren schon 50 % der induzierten Schäden repariert und nach 16 Stunden sowohl in XPA<sup>(+/+)</sup>- als auch XPA<sup>(-/-)</sup>-Tieren kaum Addukte mehr nachweisbar (Abb. 28 A).



**Abb. 27: Ein Verlust der XPA-Funktion verringert die O<sup>6</sup>-meG-Reparatur in murinen Nierencortex-Zellen nur geringfügig:** Wildtyp- und XPA<sup>(-/-)</sup>-Mäusen wurde einmalig MNU [50 mg/kg] alleine (A) oder MNU [50 mg/kg] und O<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg] (B) *i.p.* injiziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurden Gefrierschnitte der Niere angefertigt und immunzytologisch angefärbt und analysiert (siehe Abb. 21).

Mit Blockierung der MGMT zeigten die XPA<sup>(-/-)</sup>-Zellen zunächst doppelt so viele O<sup>6</sup>-meG-Schäden wie die XPA-profizienten Zellen, die aber in beiden Fällen nach 30 Stunden vollständig entfernt wurden (Abb. 28 B).



**Abb. 28: XPA-defiziente Maus-Hepatozyten behalten die Fähigkeit O<sup>6</sup>-meG-Schäden aus der DNA zu entfernen:** XPA<sup>(+/+)</sup>- und XPA<sup>(-/-)</sup>-Mäuse wurden mit MNU [50 mg/kg] (A) oder in Kombination mit O<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg] (B) *i.p.* behandelt. Die ICA-Analyse an Gewebeschnitten der Leber und die quantitative Auswertung von drei unabhängigen Experimenten erfolgte wie in Abb. 21 angegeben.

Aufgrund der ähnlichen Reparaturverläufe von O<sup>6</sup>-meG-Schäden nach MNU-Behandlung scheint das XPA-Protein bei der Eliminierung dieser Schäden aus der DNA lediglich eine untergeordnete Rolle zu spielen, da ein Verlust von XPA nicht zu persistierenden O<sup>6</sup>-meG-Läsionen führt und die Reparatur nur unwesentlich beeinträchtigt ist.

### 4.1.3 Rolle einzelner Komponenten des Fanconi Anämie/BRCA-Signalweges bei der Elimination von O<sup>6</sup>-meG-Schäden

#### 4.1.3.1 Welche Rolle spielt das FancD2-Protein in der O<sup>6</sup>-meG-Reparatur?

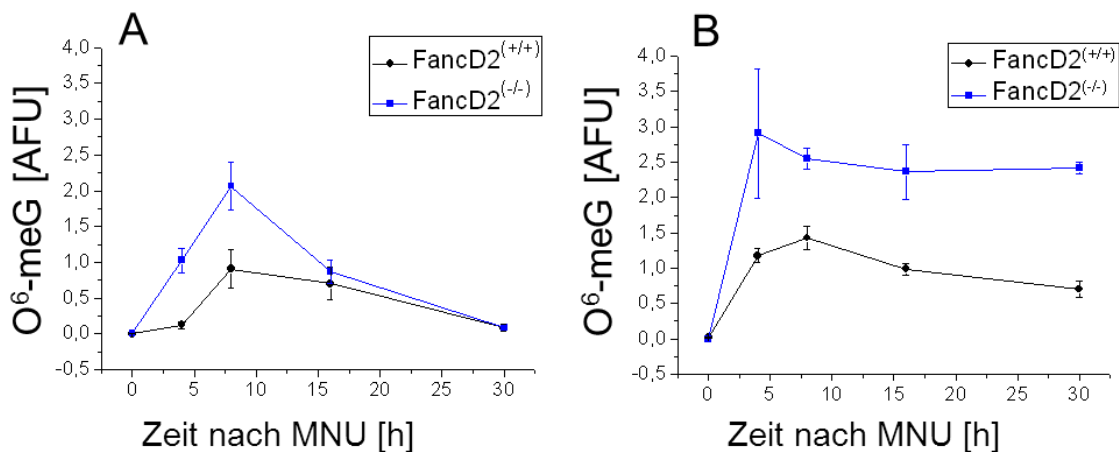
Der FA-Signalweg ist hauptsächlich an der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen und Interstrang-Verknüpfungen beteiligt. Das FancD2-Protein bildet dabei zusammen mit FancI-Protein den ID-Komplex und erfüllt wichtige Schritte im Reparaturprozess.

Aus Daten von Chen *et al.* (2007) und Kondo *et al.* (2010) ist erstmals eine Verbindung zwischen dem FA-Signalweg und Alkylierungsschäden festgestellt worden. Dabei reagieren sowohl murine als auch humane Fibroblasten, mit einem Defekt im FancD2-Protein, extrem sensitiv gegenüber dem methylierenden Agens TMZ. Um nun zu klären, ob FancD2 an der Beseitigung von O<sup>6</sup>-meG-Schäden beteiligt ist, wurden FancD2<sup>(+/+)</sup>- sowie FancD2<sup>(-/-)</sup>-Mäuse mit O<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg *i.p.*] vorbehandelt und anschließend für 0, 4, 8, 16 und 30 Stunden MNU [50 mg/kg *i.p.*]

## Ergebnisse

verabreicht oder ausschließlich mit MNU [50 mg/kg *i.p.*] über den angegebenen Versuchszeitraum behandelt. Zu jedem Zeitpunkt wurden Lymphozyten der Milz und mononukleäre Zellen des Knochenmarks isoliert sowie Gewebeschnitte von Niere und Leber erstellt.

Die Milzlymphozyten der FancD2-knockout-Mäuse wiesen vier Stunden nach MNU-Behandlung bis zu 2-fach höhere, die Nierencortex-Zellen bis zu 5-fach höhere O<sup>6</sup>-meG-Adduktspiegel im Vergleich zu FancD2-Wildtypzellen auf, die nach 30 Stunden aber sowohl in Milzlymphozyten als auch Cortez-Zellen wieder vollständig repariert wurden (Abb. 29 A und Abb. 30 A).



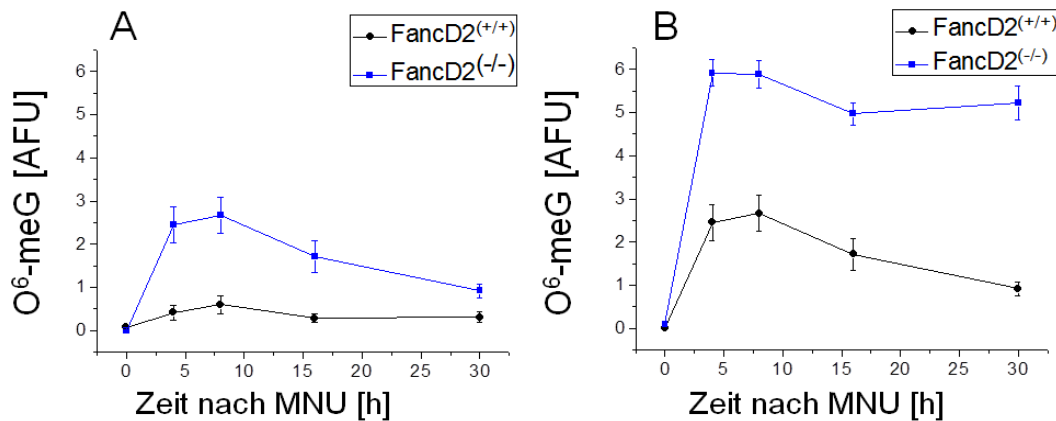
**Abb. 29: Das FancD2-Protein ist essentiell für die Exzisionsreparatur von O<sup>6</sup>-meG *in vivo*:** FancD2<sup>(+/+)</sup>- und FancD2<sup>(-/-)</sup>-Mäuse wurden mit MNU [50 mg/kg] alleine (A) oder in Kombination mit MGMT-Inhibitor O<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg *i.p.*] (B) behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Milzlymphozyten isoliert, für O<sup>6</sup>-meG angefärbt und der Adduktgehalt aus drei unabhängigen Analysen gemessen (siehe Abb. 21).

Allerdings führte die gleichzeitige Blockierung der endogenen MGMT in FancD2<sup>(-/-)</sup>-Milzlymphozyten zu einem Komplettausfall der Reparatur von O<sup>6</sup>-meG über den gesamten Versuchszeitraum, erkennbar durch dauerhaft hohe Schadensmengen in der DNA (Abb. 29 B).

Auch in den Nierencortex-Zellen konnten die MNU-induzierten O<sup>6</sup>-meG-Schäden bei Abwesenheit des Reparaturproteins MGMT nicht repariert werden und persistierten über 30 Stunden in der DNA (Abb. 30 B).

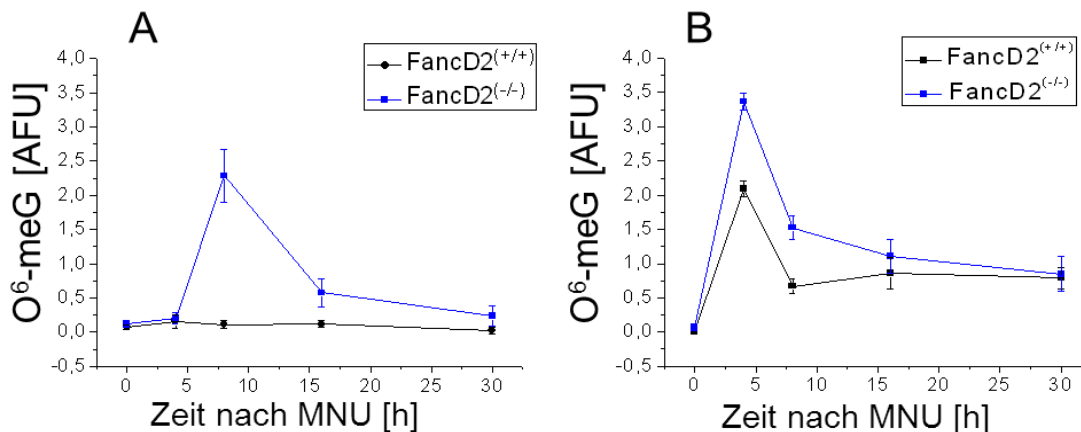
Im Lebergewebe der FancD2-Wildtypiere wurden während des gesamten Untersuchungszeitraumes kaum O<sup>6</sup>-meG-Läsionen detektiert (Abb. 31 A).

## Ergebnisse



**Abb. 30: Ein Verlust des FancD2-Proteins führt zu einem Ausfall der O<sup>6</sup>-meG-Reparatur in der Niere:** Wildtyp- und FancD2<sup>(-/-)</sup>-Tiere wurden mit MNU [50 mg/kg] (A) oder mit MNU [50 mg/kg] und O<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg *i.p.*] (B) behandelt. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde der O<sup>6</sup>-meG-Gehalt in der DNA von Cortex-Zellen der Niere gemessen (siehe Abb. 21).

Erst das gezielte Ausschalten des FancD2-Proteins führte zu einer deutlichen Zunahme der Schadensmenge (12-fach), wobei eine zeitabhängige Reparatur dieser Schäden nach 30 Stunden messbar war. Die Blockierung der MGMT zeigte in den FancD2<sup>(-/-)</sup>-Zellen nach vier Stunden zunächst 2-fach mehr Schäden als im Wildtyp, wobei in beiden Mausstämmen nach 30 Stunden ähnlich viele Läsionen wieder aus der DNA entfernt werden konnten (Abb. 31 B).

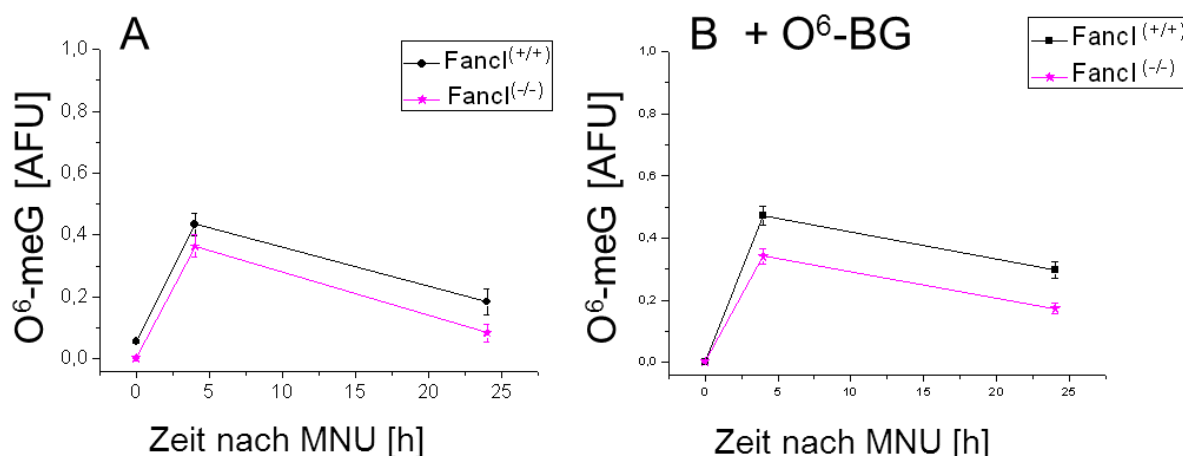


**Abb. 31: Ein Ausfall von FancD2 führt zu einer deutlich erhöhten Konzentration von O<sup>6</sup>-meG in der DNA von Leberzellen:** Es wurden Wildtyp- und FancD2<sup>(-/-)</sup>-Mäuse mit MNU [50 mg/kg] (A) oder mit MNU [50 mg/kg] und O<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg *i.p.*] (B) behandelt. Zu verschiedenen Zeiten wurden Gefrierschnitte der Leber angefertigt und für O<sup>6</sup>-meG angefärbt. Aus 100 gemessenen Zellen wurde die Konfidenz als Standardabweichung angegeben (siehe Abb. 21). Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig durchgeführt.

Diese Ergebnisse zeigen einen alternativen Reparaturweg für O<sup>6</sup>-meG-Schäden auf, der sowohl von Komponenten des klassischen NER-Systems (XPC), als auch von der Funktionalität des FancD2-Proteins (FA-Signalweg) abhängt.

## 4.1.3.2 Einfluss anderer Komponenten des FA-Signalweges an der Reparatur von O<sup>6</sup>-meG in kultivierten Zellen

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass FancD2 einen essentiellen Faktor in der Reparatur von O<sup>6</sup>-meG darstellt. Als Nächstes sollte geklärt werden ob FancI, als Homolog von FancD2, eine ebenso bedeutsame Rolle im alternativen Reparaturweg besitzt. Dazu wurde eine FancI-defiziente Zelllinie (SII-ip), die aus primären Fibroblasten eines FancI-defizienten Patienten etabliert wurde sowie deren retroviral rekonstituierte Wildtypform (S 91), für eine zeitabhängige O<sup>6</sup>-meG-Reparaturkinetik herangezogen. Für den Versuch wurden die Fibroblasten bis zu einer Konfluenz von 60 – 70 % in einer 6-well Schale kultiviert und entweder mit MNU [50 µg/ml] alleine oder mit MNU [50 µg/ml] + O<sup>6</sup>-BG [25 µg/ml] behandelt. Nach 0, 4 und 24 Stunden wurden je 15.000 Zellen abgenommen, auf einen Objektträger getropft, getrocknet und für O<sup>6</sup>-meG angefärbt. Die Addukt mengen über die Zeit wurden in Abbildung 32 dargestellt. Anhand des Schadensverlaufes wurde ersichtlich, dass unabhängig von der An- oder Abwesenheit des funktionellen FancI-Proteins eine effiziente Entfernung von O<sup>6</sup>-meG-Läsionen innerhalb des Versuchszeitraumes messbar war (Abb. 32 A).



**Abb. 32: Ein Ausfall der FancI-Funktion zeigt keinen signifikanten Einfluss auf die O<sup>6</sup>-meG-Reparatur in humanen Fibroblasten:** Es wurden FancI<sup>(-/-)</sup> (SII-ip) und FancI-rekonstituierte (S91) humane Fibroblasten mit MNU [50 µg/ml] (A) oder mit MNU [50 µg/ml] und O<sup>6</sup>-BG [25 µg/ml] (B) behandelt. Zu verschiedenen Zeiten wurden Zellproben entnommen und für O<sup>6</sup>-meG angefärbt. Angegeben sind die Mittelwerte und das 95 %-Konfidenzintervall von jeweils 100 gemessenen Zellen. Alle Versuche wurden mindestens dreimal unabhängig wiederholt.

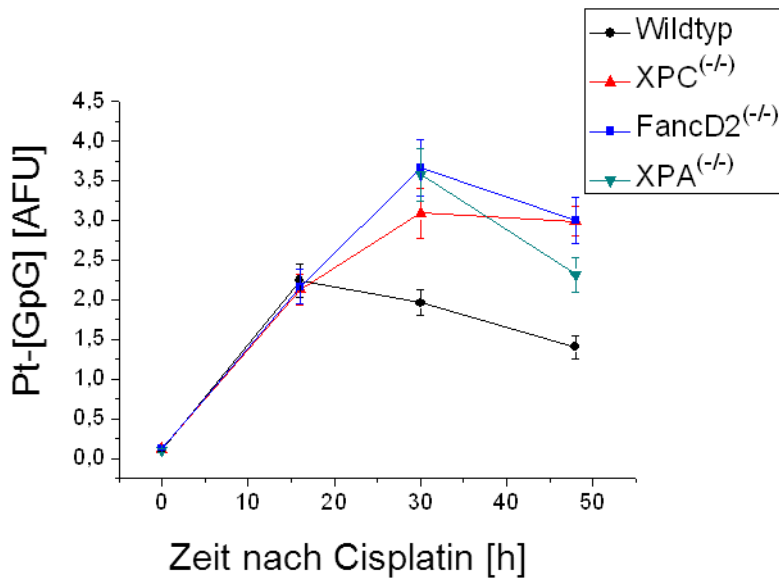
Auch die MNU-induzierten O<sup>6</sup>-meG-Mengen ähnelten sich über die gesamte Versuchsdauer. Die Blockierung der MGMT zeigte keine signifikanten Unterschiede in der O<sup>6</sup>-meG-Schadensentwicklung zwischen FancI-profizienten und -defizienten

Zellen. Über 24 Stunden verliefen die Addukt mengen auf ähnlichem Niveau mit einer deutlichen Reduktion der Schäden nach 24 Stunden (Abb. 32 B). Dies legt nahe, dass diese Fibroblasten nur eine vergleichsweise geringe MGMT-Aktivität besitzen und dass FancI keinen relevanten Effekt bei der Entfernung von O<sup>6</sup>-meG-Schäden aus der DNA zeigt. FancI ist somit kein Bestandteil des alternativen Reparaturweges.

#### **4.1.4 Cisplatin-induzierte „cross-link“ Reparatur durch Komponenten des NER und FA-Signalweges**

Aus den bisherigen Ergebnissen stellte sich die Frage, ob der hier zumindest in Teilen charakterisierte Exzisionsmechanismus ausschließlich auf O<sup>6</sup>-Alkylierungen am Guanin zugreift oder ob er ein breiteres Substratspektrum hat. Deshalb wurden analoge DNA-Reparaturanalysen bei Mäusen nach Behandlung mit dem DNA-reaktiven Zytostatikum Cisplatin durchgeführt. Cisplatin induziert eine Palette unterschiedlicher DNA-Addukte, von denen das mengenmäßig häufigste die kovalente Intrastrang-Verknüpfung zweier benachbarter Guanin-Basen (Pt-[GpG]) darstellt. In dem experimentellen Ansatz sollte die Reparaturfähigkeit für dieses Platin-Addukt bei Wildtypmäusen mit der von NER- und FA-defizienten Mäusen verglichen werden. Dazu wurden C57BL/6J- Wildtypmäuse, XPC<sup>(-/-)</sup>-, XPA<sup>(-/-)</sup>- und FancD2<sup>(-/-)</sup>-Mäuse mit einer einmaligen Dosis Cisplatin [10 mg/kg] *i.p.* behandelt. Nach 0, 16, 30 und 48 Stunden wurden die Nieren entnommen und Gefrierschnitte angefertigt. Nach Immunfärbung mit dem Pt-[GpG]- spezifischen Antikörper R-C18 wurden Reparaturkurven über die Zeit erstellt (Abb. 33).

In Wildtypmäusen mit funktionellen Reparaturproteinen wurde nach 16 Stunden das Adduktmaximum gemessen, sowie eine Reparaturinduzierte Abnahme bei 30 und 48 Stunden. Bei allen drei „knockout“-Stämmen stieg der Adduktspiegel bis 30 Stunden weiter an und nahm nur bei den XPA-defizienten Tieren in den folgenden 18 Stunden signifikant ab. Wie oben bereits für die O<sup>6</sup>-meG-Läsionen gezeigt, scheint auch bei der Reparatur von Cisplatin induzierten Pt-[GpG]-Addukten das XPA-Protein nur von untergeordneter Bedeutung zu sein, da die Nierencortex-Zellen zum Zeitpunkt 48 Stunden eine deutlich verringerte Schadensdichte aufwiesen und die Reparatur nur partiell verzögert abgelaufen war. Demgegenüber führte ein Funktionsverlust von XPC oder FancD2, wie bei O<sup>6</sup>-meG, zu persistierenden Platinschäden in der DNA. Diese Ergebnisse deuten also daraufhin, dass der alternative Reparaturweg nicht exklusiv an O<sup>6</sup>-G-Alkylierungen angreift.



**Abb. 33: Einfluss von NER- und FA-Komponenten auf die Reparatur von Intrastrang „cross-links“ *in vivo*:** Wildtyp-, XPA<sup>(-/-)</sup>-, XPC<sup>(-/-)</sup>- und FancD2<sup>(-/-)</sup>- Mäuse wurden einmalig mit Cisplatin [10 mg/kg *i.p.*] behandelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Gefrierschnitte der Niere angefertigt und mit dem Antikörper R-C18 für Pt-[GpG]-Addukte in der Kern-DNA angefärbt. Die quantitative Auswertung erfolgte wie in Abbildung 21 angegeben.

## 4.2 Biologische Folgen durch MNU-induzierte Läsionen in der Maus

Aus den Reparaturkinetiken der verschiedenen NER- und FA-defizienten Mäuse im Vergleich zu Wildtyptieren ging hervor, dass eine MGMT-unabhängige Reparatur von O<sup>6</sup>-meG unbedingt die Anwesenheit von XPC und FancD2, nicht aber von XPA, benötigt. Ohne funktionelles XPC- und FancD2-Protein verbleiben in Abwesenheit der MGMT-Aktivität dauerhaft hohe Addukt Mengen in der DNA der untersuchten Zelltypen. Da es sich bei der MGMT und dem hier beschriebenen Exzisionsmechanismus um „überlappende“ Reparaturwege für den gleichen kritischen Schaden handelt, stellte sich natürlich die Frage nach der relativen Bedeutung beider Mechanismen für den Schutz vor den biologischen Auswirkungen nach Exposition mit alkylierenden Substanzen. Anhand verschiedener *in vivo*-Versuchsmodelle sollten im Folgenden die zytotoxischen sowie mutagenen und karzinogenen Effekte von MNU-induzierten Schäden in Abhängigkeit von beiden Reparaturaktivitäten näher analysiert werden.

### 4.2.1 Zytotoxische Auswirkungen nach MNU-Exposition *ex vivo* und *in vivo*

#### 4.2.1.1 Koloniebildung als Indikator für das Zellüberleben von hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen nach Gabe von MNU *ex vivo*

Nach dem derzeit gültigen Konzept zur zytotoxischen Wirkung von persistierenden O<sup>6</sup>-meG-Schäden der DNA ist zumindest eine Replikationsrunde notwendig (siehe Einleitung). Diese Bedingung ist in primärem Mausgewebe mit weit überwiegend terminal differenzierten Zellen in der Regel nicht zu realisieren. Deshalb wurde der Nachweis der Zytotoxizität bzw. des Zellüberlebens nach MNU-Behandlung zunächst an hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen der Maus mit einem Koloniebildungsversuch (*Colony formation assay*) bestimmt. Dafür wurden aus dem Knochenmark von Wildtyp-, XPC<sup>(-/-)</sup>-, FancD2<sup>(-/-)</sup>- und XPA<sup>(-/-)</sup>-Mäusen die mononukleäre Zellfraktion über eine Ficoll-Zentrifugation isoliert, *ex vivo* mit steigenden Dosen MNU [0, 2,5, 5, 10, 25, 50 µg/ml] ± O<sup>6</sup>-BG [25 µg/ml] behandelt und in eine mit Zytokinen versetzte semifluide Methylcellulose überführt. Die Zytokine stimulieren die hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen zur Proliferation und erlauben nach einer Inkubation von sieben Tagen bei 37 °C das Auszählen der entstandenen Kolonien (Einheit: CFU; **Colony Formation Unit**). Die Koloniezahl in der unbehandelten Zellfraktion wurde auf 100 % normiert und das prozentuale Zellüberleben in Relation zur eingesetzten MNU-Konzentration als Überlebenskurve dargestellt (Abb. 34).

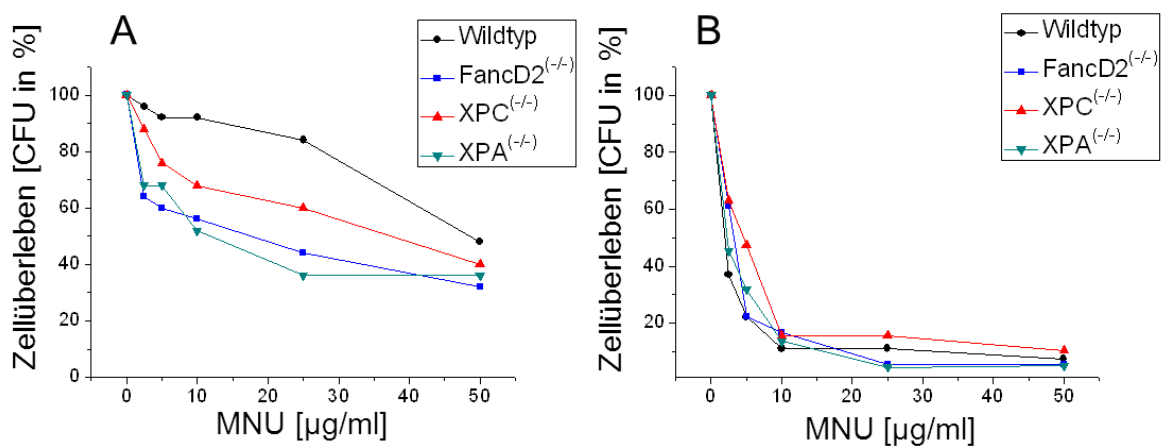
Die Wildtypzellen zeigten nach sieben Tagen eine MNU-Dosis-abhängige Abnahme der CFU's über den gesamten Konzentrationsbereich. Bei 25 µg MNU/ml waren noch 90 % der Zellen fähig Kolonien auszubilden, während bei 50 µg MNU/ml die Koloniebildung auf 50 % der Kontrolle abgesunken war. Die Überlebenskurven bei den Reparatur-defizienten Zellen zeigten ein deutlich geringes Zellüberleben im Vergleich zu den Wildtypzellen. In XPC<sup>(-/-)</sup>-Zellen waren bei 25 µg MNU/ml im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nur noch 60 % der CFU detektierbar und bei 50 µg MNU/ml lediglich 40 %. Noch sensitiver reagierten die Knochenmarkszellen der FancD2<sup>(-/-)</sup>- und XPA<sup>(-/-)</sup>-Tiere. Dort wurde die IC<sub>50</sub> Dosis bereits bei 25 µg MNU/ml erreicht (Abb. 34 A).



## Ergebnisse

Die Blockierung der endogenen MGMT durch O<sup>6</sup>-BG erhöhte die MNU-induzierte Zytotoxizität sowohl in Wildtyp- als auch in Reparatur-defizienten Zellen gleichermaßen stark. Hier wurden schon bei einer Konzentration von 5 µg MNU/ml eine CFU von < 50 % und bei 10 µg MNU/ml von < 20 % gezeigt (Abb. 34 B).

Durch den Koloniebildungsversuch wird deutlich, dass proliferationskompetente primäre Mauszellen mit Defekten in den Komponenten XPC, FancD2 oder XPA deutlich sensitiver gegenüber MNU sind als die entsprechenden Exzisionsreparatur-kompetenten Wildtypzellen. Die Funktionalität der untersuchten Reparaturproteine ist demnach entscheidend, um MNU-induzierte DNA-Schäden zu beheben und das Zellüberleben zu sichern. Daneben besitzt die MGMT eine ebenso bedeutsame Schutzfunktion vor zytotoxischen Auswirkungen einer MNU-Exposition, dass an der starken Empfindlichkeit der Reparaturaktiven Wildtypzellen nach gleichzeitiger BG-Injektion sichtbar wird.



**Abb. 34: Nachweis von MNU-induzierter Zytotoxizität in hämatopoetischen Zellen der Maus anhand des Koloniebildungs-Assay *ex vivo*:** Mononukleäre Zellen wurden aus dem Knochenmark von Wildtyp-, XPA<sup>(-/-)</sup>-, XPC<sup>(-/-)</sup>- und FancD2<sup>(-/-)</sup>-Mäusen isoliert und mit steigenden Dosen MNU (A) oder MNU + O<sup>6</sup>-BG [25 µg/ml] (B) behandelt. Nach einer Inkubationszeit von sieben Tagen in einem mit Zytokinen versetzten Methylzellulose-Medium wurde das Zellüberleben anhand der Zahl entstandener Kolonien bestimmt. Die Werte wurden auf die Anzahl der Kolonien in der jeweils unbehandelten Kontrolle (100 %) normiert. Jeder Versuch wurde mindestens dreimal unabhängig durchgeführt.

### 4.2.1.2 Myelosuppression als Maß für die MNU-Toxizität im hämatopoetischen System

Um die relative Schutzfunktion der beiden konkurrierenden Reparatursysteme nicht nur an Primärzellen in Kultur sondern auch unter *in vivo*-Bedingungen näher zu beleuchten, bietet sich die Messung der Zellularität im peripheren Blutbild von Mäusen nach MNU-Exposition an.

## Ergebnisse

---

Dazu wurden in einem Vorversuch 12 Wochen alte Wildtyp-, XPC<sup>(-/-)</sup>-, XPA<sup>(-/-)</sup>- und FancD2<sup>(-/-)</sup>-Mäuse mit zwei verschiedenen MNU-Dosen [15 mg/kg; 30 mg/kg] *i.p.* behandelt. Die dadurch induzierte Myelotoxizität in hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen wurde anhand einer differenziellen Zellzählung im peripheren Blut über einen Zeitraum von 10 Wochen beobachtet. Wöchentlich erfolgte bei allen Tieren eine Blutentnahme (12 µl) mittels Punktion der *V. saphena*. Daraus wurde dann mit einem Vet ABC-Gerät ein Differentialblutbild erstellt, um Anzahl und Typ der Zellen im peripheren Blut über die Zeit zu verfolgen. Für die jeweiligen MNU-Dosen wurde zunächst ein Tier pro Genotyp für den Versuch eingesetzt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde für jedes Tier die gemessene Zahl der weißen Blutzellen als Prozentsatz des Messwertes vor der Behandlung (= 100) gesetzt und in einer Verlaufsgrafik dargestellt (Abb. 35). Ein Abfall der Werte ließ dann Rückschlüsse auf die zytotoxische Wirkung von MNU auf hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen im Knochenmark zu.

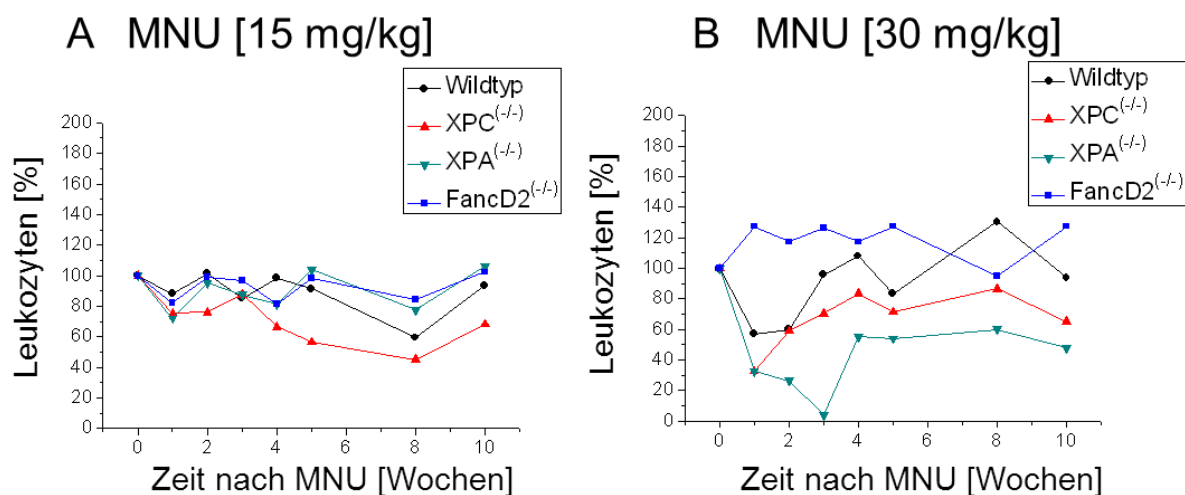
Die Behandlung mit einer niedrigen MNU-Dosis [15 mg/kg] zeigte bei dem Wildtyp-, XPA<sup>(-/-)</sup>- und FancD2<sup>(-/-)</sup>-Tier über die gesamte Beobachtungsdauer keine wesentliche Veränderung der Leukozytenzahl im peripheren Blut. Bei dem XPC<sup>(-/-)</sup>-Tier wurde demgegenüber für den Zeitraum vierte bis achte Woche eine leichte Abnahme der Zellzahl (auf ca. 60 % der unbehandelten Kontrolle) gemessen, die sich erst in der 10. Woche erholte (Abb. 35 A).

Ein deutlich anderes Bild ergab sich nach einer höheren MNU-Dosis von 30 mg/kg (Abb. 35 B). Hier reduzierte sich die Zahl der Leukozyten bei dem Wildtyp-Tier bereits eine Woche nach Behandlung um 40 % mit einer relativ raschen Erholung während der folgenden zwei Wochen. Bei dem XPC<sup>(-/-)</sup>-Tier sank die Zellzahl innerhalb der ersten Woche um 70 % und blieb über die ganze Beobachtungszeit von 10 Wochen unterhalb der Ausgangswerte. Das FancD2-defiziente Tier zeigte hingegen keine signifikanten Schwankungen der Leukozytenzahl über den gesamten Beobachtungszeitraum. Der stärkste myelosuppressive Effekt wurde bei dem XPA<sup>(-/-)</sup>-Tier gemessen. Nach MNU-Behandlung nahm die Zellzahl über drei Wochen kontinuierlich ab und erreichte dann ein Minimum von <10 % des Ausgangswertes. Erst in der vierten Woche erholte sich die Zahl der Leukozyten im Blut und erreichte bis zur 10. Woche lediglich 60 % der Ausgangszellzahl.

Zusammengefasst kann aus diesen Daten geschlossen werden, dass bei dem adulten Wildtyp- und FancD2<sup>(-/-)</sup>-Tier nach den hier verwendeten Dosen kein oder nur

## Ergebnisse

ein kurzfristiger myelosuppressiver Effekt auftrat. Bei einer XPC-Defizienz trat jedoch eine deutliche und länger anhaltende zytotoxische Wirkung im hämatopoetischen System auf und beim Verlust der XPA-Funktion und hoher MNU-Belastung ein dramatischer Zellverlust im peripheren Blut.



**Abb. 35: Der Einfluss unterschiedlicher MNU-Dosen auf die Leukozytenzahl im peripheren Blut der Maus:** Je ein Wildtyp-, XPC<sup>(-/-)</sup>-, XPA<sup>(-/-)</sup>- und FancD2<sup>(-/-)</sup>-Tier im Alter von 12 Wochen wurde mit einer niedrigen [15 mg/kg] (A) und einer höheren [30 mg/kg] (B) MNU-Dosis *i.p.* behandelt. Die vor der Behandlung bestimmte Zellzahl der Leukozyten im peripheren Blut wurde als Prozentsatz = 100 gesetzt, aus denen die weiteren Messwerte berechnet wurden.

Da, wie eingangs beschrieben, die zytotoxische Wirkung von O<sup>6</sup>-meG-Addukten nach den derzeit gängigen Vorstellungen erst post-replikativ eintritt, hängt das Ausmaß der MNU-induzierten Myelosuppression im Wesentlichen auch von der Proliferationsrate im hämatopoetischen System der Maus ab. Diese ist im Alter von 4-6 Wochen deutlicher höher als bei adulten Mäusen.

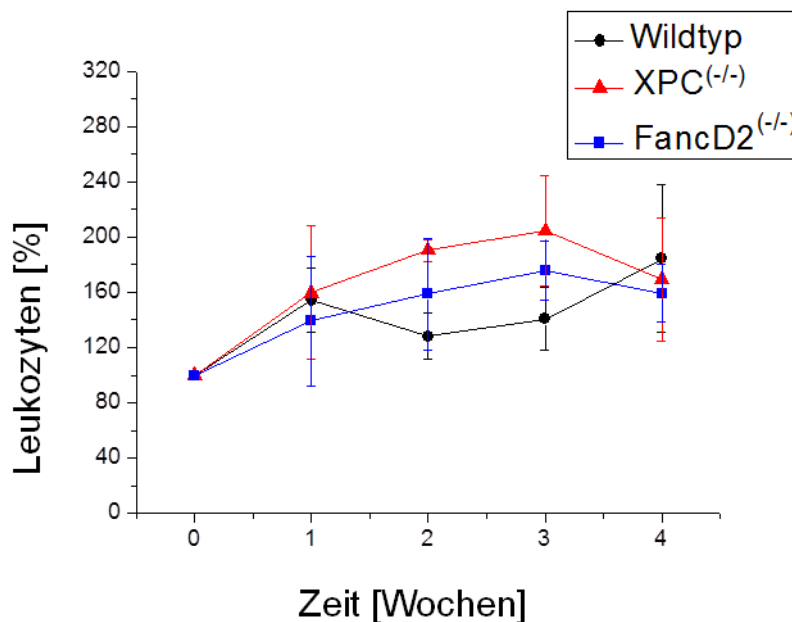
Zu diesem Zeitpunkt weisen die Mäuse im peripheren Blut eine Leukozytenzahl von 4.000 – 8.000/μl auf gegenüber von 12.000 -- 14.000 Zellen/μl bei adulten Tieren.

Für den Hauptversuch wurden deshalb 4-6 Wochen alte Tiere eingesetzt, um einen möglichst hohen myelotoxischen Wirkungsgrad der MNU-Behandlung zu erzielen. Außerdem wurde in der Versuchsreihe ein Teil der Mäuse zusätzlich mit O<sup>6</sup>-BG vorbehandelt, um die protektive Rolle der MGMT-Aktivität in diesem *in vivo*-Modell mit zu erfassen.

Wildtyp-, XPC<sup>(-/-)</sup>-, XPA<sup>(-/-)</sup>- und FancD2<sup>(-/-)</sup>-Mäusen (5 Tiere pro Stamm und Behandlungsgruppe) wurde MNU [50 mg/kg] oder MNU + O<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg] *i.p.* appliziert.

## Ergebnisse

Wie auch beim Vorversuch wurde allen Tieren wöchentlich Blut entnommen und ein Differenzialblutbild erstellt. Außerdem wurde bei jeder Probenahme zusätzlich ein Blutausstrich angefertigt, um eventuelle maligne Zelltypen (Lymphoblasten) mikroskopisch zu erfassen. Der Verlauf der Leukozytenzahl über 10 Wochen wurde als Mittelwert für jede experimentelle Gruppe berechnet. Anhand einer mitgeführten Gruppe gleichaltriger unbehandelter Mäuse der verschiedenen Genotypen (Wildtyp, XPC<sup>(-/-)</sup> und FancD2<sup>(-/-)</sup>) wurde der „Normalverlauf“ des Leukozytenspiegels im peripheren Blut dokumentiert. Dieser zeigte, dass der Leukozytenwert nach vier Wochen auf etwa 150 % anstieg und dass ein Funktionsverlust der beiden Reparaturproteine keine messbaren Auswirkungen auf diesen Parameter hatte (Abb. 36).



**Abb. 36: Entwicklung der Leukozytenzahl im peripheren Blut der unbehandelten Maus:** Wildtyp-, XPC<sup>(-/-)</sup>- und FancD2<sup>(-/-)</sup>-Mäuse wurden im Alter von 4-6 Wochen wöchentlich 12 µl peripheres Blut entnommen und der natürliche Verlauf des Leukozytenspiegels im peripheren Blut analysiert. Der Mittelwert der Leukozyten pro Genotyp wurde zu Beginn des Versuchs = 100 % gesetzt, aus denen die weiteren Messwerte berechnet wurden. Die Standardabweichung setzt sich aus den Werten von zwei Tieren pro Genotyp zusammen.

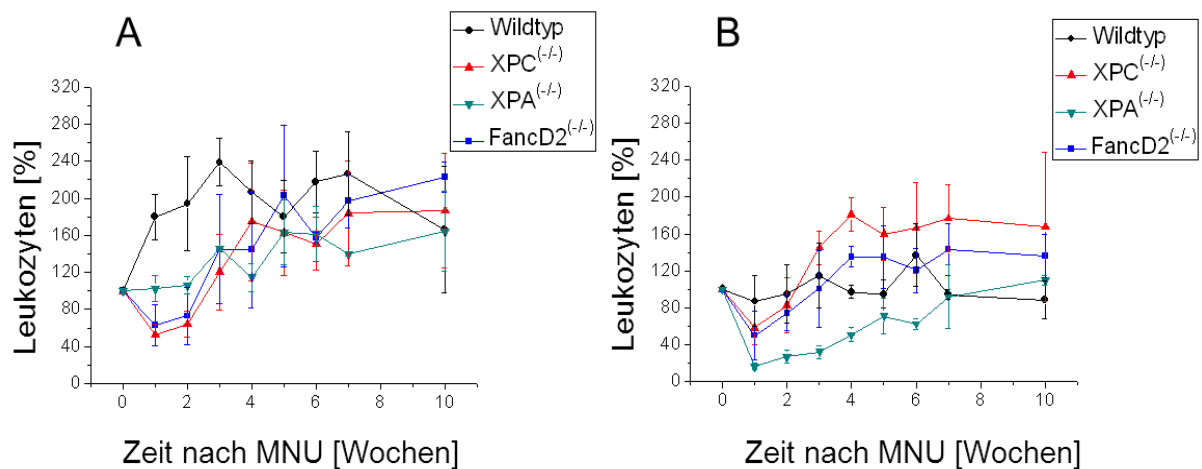
Die Behandlung mit MNU hatte bei den Wildtypmäusen keinen suppressiven Effekt auf den Leukozytenspiegel im peripheren Blut. Es wurde, wie bei den unbehandelten Kontrolltieren, ein kontinuierlicher Anstieg innerhalb der ersten drei Wochen mit anschließend etwa gleichbleibendem Niveau bis zum Versuchsende nach 10 Wochen gemessen (Abb. 37). Demgegenüber stagnierte die Zahl der Leukozyten bei

## Ergebnisse

den XPA<sup>(-/-)</sup>-Tieren nach MNU-Gabe zunächst für drei Wochen bei 100 % und stieg danach auf das Niveau der Wildtyptiere an.

Der Verlust von XPC oder FancD2 hatte zunächst eine messbare Reduktion der Zellzahl auf ca. 60 % der Ausgangswerte zur Folge, sie regenerierte sich ab der 2. Behandlungswoche stetig und hatte drei Wochen nach MNU-Gabe wieder das Ausgangsniveau (100 %) erreicht. Ab der fünften Woche bis zum Versuchsende waren keine signifikanten Unterschiede zu den beiden anderen Gruppen mehr erkennbar (Abb. 37 A).

Die zusätzliche pharmakologische Inhibition der MGMT-Aktivität führte bei den vier untersuchten Genotypen zu sehr unterschiedlichen Effekten. Anders als bei der alleinigen MNU-Behandlung stagnierte die Leukozytenzahl bei den Wildtyptieren für zwei Wochen bei 100 % und stieg nachfolgend, wenn überhaupt, nur sehr langsam an. Bei den XPC- oder FancD2-defizienten Tieren hatte die zusätzliche Blockierung der MGMT-Aktivität keinen verstärkten Einfluss auf die myelotoxische Wirkung von MNU. Diese Tiere zeigten eine annähernd gleichermaßen starke Abnahme der Leukozytenzahl im peripheren Blut um ca. 50 % (Abb. 37 B).



**Abb. 37: MNU-induzierte Myelosuppression bei Reparatur-profizienten und -defizienten Mäusen:** Wildtyp-, XPC<sup>(-/-)</sup>-, XPA<sup>(-/-)</sup>- und FancD2<sup>(-/-)</sup> wurden im Alter von 4-6 Wochen mit MNU [50 mg/kg] (A) oder in Kombination mit O<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg] (B) *i.p.* behandelt. Über einen Beobachtungszeitraum von 10 Wochen erfolgte wöchentlich eine Blutentnahme aus der *V. saphena* sowie die differenzielle Zellanalyse über den Vet ABC. Die Mittelwerte und die Standardabweichung setzten sich aus den Werten von mindestens 5 Tieren zusammen. Die Startwerte wurden als 100 % gesetzt, aus denen die weiteren Messungen berechnet wurden.

Den stärksten suppressiven Effekt bei diesem Behandlungsschema wurde in den XPA<sup>(-/-)</sup>-Tieren gemessen. Innerhalb der ersten sieben Tage kombinierter O<sup>6</sup>-BG-/MNU-Behandlung sank die Zahl der Leukozyten auf 20 % des Ausgangswertes.

Auch nachfolgend erholte sich die Zellzahl der Leukozyten nur langsam, so dass erst am Ende des Beobachtungszeitraums der Ausgangswert von 100 % erreicht wurde. Die Ergebnisse machen deutlich, dass bei der gewählten MNU-Behandlungsdosis die Funktionalität aller untersuchten Reparaturproteine notwendig ist, um im peripheren Blut nachweisbare myelosuppressive Effekte durch DNA-Alkylierung zu vermeiden. Dabei scheinen die Effekte bei XPC- oder FancD2-knockout nicht von der An- oder Abwesenheit funktioneller MGMT-Aktivität in den Stamm- und Vorläuferzellen abhängig zu sein.

Demgegenüber wird die vergleichsweise milde Myelotoxizität von MNU bei Ausfall des XPA-Proteins ganz erheblich verstärkt, wenn gleichzeitig die endogene MGMT blockiert wird.

### **4.2.2 Inzidenz von MNU-induzierten Tumoren in der Maus**

Neben der zytotoxischen Wirkung von O<sup>6</sup>-meG ist, wie oben beschrieben, ein weiterer biologischer Stressfaktor das mutagene Potential dieser DNA-Läsion sowie das daraus resultierende Risiko maligner Erkrankungen. Um die Rolle der beiden Reparatursysteme auch für diesen Aspekt quantitativ zu erfassen, wurde die Beobachtungszeit der Mäuse aus dem zuvor durchgeführten Myelosuppressions-Experiment (siehe Abb. 37) auf maximal 200 Tage nach MNU-Exposition verlängert. Die behandelten Tiere wurden dazu regelmäßig auf äußere Anzeichen und durch das Anfertigen eines wöchentlichen differenziellen Blutbildes auf eine maligne Erkrankung untersucht.

#### **4.2.2.1 Bildungsrate solider Tumoren nach MNU-Exposition**

Die Tiere wurden insgesamt über einen Versuchszeitraum von 200 Tagen unter Standardbedingungen gehalten und der Gesundheitszustand anhand verschiedener Kriterien (Sozialverhalten, Gewicht, Fellbeschaffenheit, Mobilität, Atmung) sowie des wöchentlich angefertigten Differentialblutbildes überprüft. Außerdem wurden bei jeder Blutentnahme Zellausstriche angefertigt, um mögliche Anzeichen einer malignen Veränderung anhand von lymphoblastoiden Zellen im peripheren Blut frühzeitig zu detektieren. Tiere mit Krankheitszeichen wurden euthanasiert, sezient und inspiziert. Veränderte (vergrößerte) und gegebenenfalls tumoröse Gewebe

## Ergebnisse

wurden für die Anfertigung von Paraffin-Gewebeschnitten im Institut für Pathologie (UK Essen) fixiert und gesammelt.

Eine gute Aussage über den Gesundheitszustand konnte anhand der Differentialblutbilder gemacht werden, da größere Abweichungen der Leukozyten- und Erythrozytenzahlen vom Normalwert frühzeitig eine Erkrankung anzeigten (Abb. 38 A+B).

### A) Differentialblutbild einer gesunden Maus

PLT Alarme: PEC MIC							
WBC :	14.6	$10^3/\text{mm}^3$	< 3.0 - 15.0 >	MCV :	51	$\mu\text{m}^3$	< 44 - 69 >
RBC :	12.30	H $10^6/\text{mm}^3$	< 5.00 - 12.00 >	MCH :	14.9	pg	< 12.0 - 24.5 >
HGB :	18.3	H g/dl	< 11.1 - 18.0 >	MCHC:	29.3	g/dl	< 21.6 - 42.0 >
HCT :	62.5	H %	< 36.0 - 52.0 >	RDW :	12.8	N %	< 21.0 - 25.0 >
PLT :	944	H $10^3/\text{mm}^3$	< 140 - 600 >	MPV :	5.1	$\mu\text{m}^3$	< 4.6 - 7.3 >
DIFF :							
%LYM:	85.6	%	< 0.0 - 99.0 >	#LYM:	12.4	H $10^3/\text{mm}^3$	< 1.2 - 3.2 >
%MO :	2.5	%	< 0.0 - 99.0 >	#MO :	0.3	$10^3/\text{mm}^3$	< 0.3 - 0.8 >
%GRA:	11.9	%	< 0.0 - 99.0 >	#GRA:	1.9	$10^3/\text{mm}^3$	< 1.2 - 6.8 >

### B) Differentialblutbild einer schwer erkrankten Maus

PLT Alarme: SCH MIC							
WBC :	47.1	H $10^3/\text{mm}^3$	< 3.0 - 15.0 >	MCV :	86	H $\mu\text{m}^3$	< 44 - 69 >
RBC :	2.39	N $10^6/\text{mm}^3$	< 5.00 - 12.00 >	MCH :	28.5	H pg	< 12.0 - 24.5 >
HGB :	6.8	N g/dl	< 11.1 - 18.0 >	MCHC:	33.2	g/dl	< 21.6 - 42.0 >
HCT :	20.6	N %	< 36.0 - 52.0 >	RDW :	17.3	N %	< 21.0 - 25.0 >
PLT :	877	H $10^3/\text{mm}^3$	< 140 - 600 >	MPV :	6.1	$\mu\text{m}^3$	< 4.6 - 7.3 >
WBC Alarme: EOS(8.9)							
DIFF :							
%LYM:	58.0	%	< 0.0 - 99.0 >	#LYM:	27.3	H $10^3/\text{mm}^3$	< 1.2 - 3.2 >
%MO :	2.8	%	< 0.0 - 99.0 >	#MO :	1.3	H $10^3/\text{mm}^3$	< 0.3 - 0.8 >
%GRA:	39.2	%	< 0.0 - 99.0 >	#GRA:	18.5	H $10^3/\text{mm}^3$	< 1.2 - 6.8 >

**Abb. 38: Differentialblutbild der Maus:** A) Differentialblutbild einer gesunden C57BL/6J Wildtypmaus, 13 Wochen nach MNU-Behandlung (ohne Befund, 200 Tage überlebt); B) Differentialblutbild einer schwer erkrankten FancD2<sup>(-/-)</sup>-Maus, 13 Wochen nach MNU-Behandlung (Thymom, Tag 90 euthanasiert).

In Abbildung 38 A ist eine natürliche Blutzellverteilung aus dem peripheren Blut dargestellt. Die Zahl der Leukozyten („**White Blood Cells**“) schwankt in gesunden Tieren zwischen 10 und 14 x  $10^3$  Zellen /  $\text{mm}^3$  und die der Erythrozyten zwischen 9 und 12 x  $10^6$  Zellen /  $\text{mm}^3$ . Die prozentuale Verteilung innerhalb der Leukozytenfraktion liegt bei 85 - 87 % Lymphozyten (LYM), 2 - 3 % Monozyten (MO) und 10 - 13 % Granulozyten (GRA). Signifikante Änderungen in diesen

## Ergebnisse

Zellparametern deuten auf eine bösartige Erkrankung im hämatopoetischen System hin (Abb. 38 B).

Weitere Krankheitssymptome (Gewicht, Sozialverhalten, Atmung, etc.) traten in den meisten Fällen erst im Endstadium, also bei schon weit fortgeschrittener Erkrankung auf. Insgesamt wurden acht Mäuse mit einem Thymom (nur  $\text{NER}^{(-)}$ -Tiere) beobachtet, ein Tier mit einer nachgewiesenen Leukämie ( $\text{XPC}^{(-)}$ ), sieben Tiere mit ausgeprägter Splenomegalie (möglicherweise myeloproliferatives Syndrom) (ein Wildtypier, sechs  $\text{NER}^{(-)}$ -Tiere) sowie eine Maus mit einem Milztumor ( $\text{XPC}^{(-)}$ ) (Tab. 10).

**Tab. 10: Übersicht der Befunde karzinogener Veränderungen in den MNU ± O<sup>6</sup>-BG-behandelten Mauslinien:**

MNU	MNU + O <sup>6</sup> -BG	Ohne Befund (gesund)	Tumor (allgemein)	Splenomegalie	Todesursache unklar
<b>Wildtyp (C57BL/6J)</b>		5/5*	0/5	1/5	0/5
	<b>Wildtyp (C57BL/6J)</b>	3/5	1/5	0/5	1/5
<b>FancD2</b>		1/4	2/4	1/4	0/4
	<b>FancD2</b>	2/5	2/5	0/5	1/5
<b>XPC</b>		1/5	1/5	3/5	0/5
	<b>XPC</b>	1/4	2/4	1/4	0/4
<b>XPA</b>		4/4	0/4	0/4	0/4
	<b>XPA</b>	1/4	3/4	1/4	0/4

\* vergrößerte Milz nach 200 Tagen, äußerlich gesund

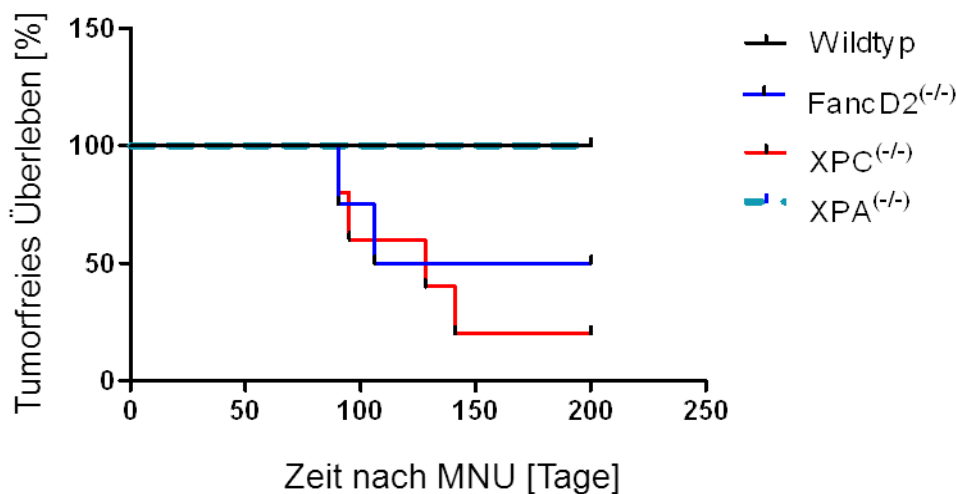
Anhand der dokumentierten Daten (Häufigkeit und Latenzzeit) wurde eine Kaplan-Meier-Kurve zum tumorfreien Überleben [%] über die Zeit [Wochen] nach Behandlung mit MNU bzw. MNU + O<sup>6</sup>-BG berechnet (Abb. 39 und 40). In der Gruppe der MNU-behandelten Tiere zeigten die Wildtyp- sowie die  $\text{XPA}^{(-)}$ -Tiere über die gesamte Versuchsdauer keine krankheitsauffälligen Merkmale. Lediglich bei einem Wildtypier wurde bei der Sektion am Ende der Beobachtungszeit eine leicht vergrößerte Milz festgestellt.



## Ergebnisse

Demgegenüber führte ein XPC- oder FancD2-Knockout zu einer verkürzten tumorfreien Überlebensdauer. Lediglich 50 % (2/4) der FancD2<sup>(-/-)</sup>-Mäuse erreichten 200 Tage ohne krankhafte Symptome, von denen ein Tier nach Sektion einen Tumor (Thymom) zeigte. Die zwei zuvor erkrankten Tiere dieses Genotyps entwickelten eine Splenomegalie nach 90 bzw. 106 Tagen.

Bei den XPC<sup>(-/-)</sup>-Mäusen lag das tumorfreie Überleben bei 20 % (1/5). Dabei wurde bei einem Tier nach 95 Tagen eine Leukämie diagnostiziert und bei den drei weiteren Tieren eine Splenomegalie (90, 128 und 141 Tage nach MNU).



**Abb. 39: Überlebenszeitanalyse von verschiedenen Reparatur-profizienten und -defizienten Mäusen nach MNU-Behandlung:** Es wurden Wildtyp- (n=5), XPC<sup>(-/-)</sup>- (n=5), XPA<sup>(-/-)</sup>- (n=4) und FancD2<sup>(-/-)</sup>-Mäuse (n=5) am Tag 0 mit einer einmaligen Dosis MNU [50 mg/kg] behandelt und 200 Tage beobachtet. Das tumorfreie Überleben der behandelten Mäuse wurde in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt.

Eine zusätzliche pharmakologische Inhibierung der MGMT durch Vorinkubation mit O<sup>6</sup>-BG führte bei allen untersuchten Mauslinien zu einem deutlich stärkeren karzinogenen Effekt als durch MNU alleine. Bei den Wildtyptieren lebten 80 % (4/5) der Tiere bis zum Ende der Versuchszeit ohne einen von außen erkennbaren Tumor, wobei nach 200 Tagen drei der vier überlebenden Tiere nach Sektion einen vergrößerten Thymus aufwiesen. Eine Wildtypmaus starb 135 Tage nach der MNU-Behandlung ohne ersichtlichen Grund.

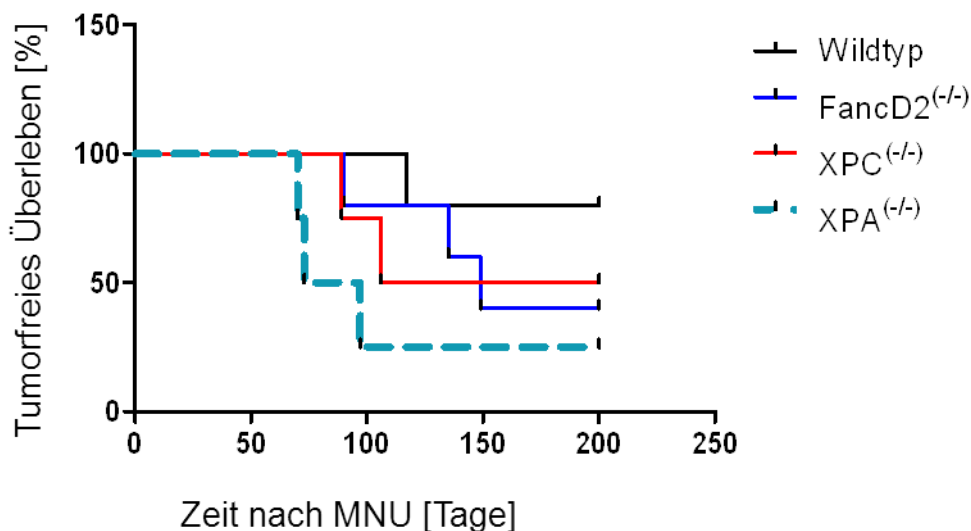
Die Depletion der MGMT führte bei den XPC<sup>(-/-)</sup>-Tieren nicht zu einer vermehrten Tumorinduktion im Vergleich zu der nur MNU-behandelten Gruppe. Ein Tier dieser Gruppe (1/4) war über 200 Tage symptomfrei. Die erkrankten Tiere zeigten entweder

## Ergebnisse

vergrößerte Milzgewebe (Tag 89 bzw. Tag 200) oder entwickelten einen soliden Tumor des Thymus (Tag 106).

In der Gruppe mit FancD2-Verlust überlebten 40 % (2/5) der Tiere 200 Tage ohne Befunde. Ein Tier starb am 135. Behandlungstag ohne ersichtlichen Grund. Bei einem weiteren Tier wurde nach 200 Tagen ein kleiner Tumor (Thymom) während der Sektion entdeckt. Die verstorbenen Tiere an Tag 90 bzw. 149 wiesen jeweils einen soliden Tumor (Thymom) auf. Somit war nur ein Tier dieser Gruppe nach 200 Tagen ohne Befund.

Den stärksten karzinogenen Effekt zeigte die Behandlung der XPA<sup>(-/-)</sup>-Tiere. 75 % (3/4) der Tiere entwickelten einen soliden Tumor zwischen Tag 70 und 97 (70, 73, 97 Tage nach MNU Behandlung). Das einzige Tier dieser Gruppe, das 200 Tage symptomfrei lebte, zeigte nach der Sektion eine vergrößerte Milz (Splenomegalie) (Abb. 40).



**Abb. 40: Eine Depletion der MGMT-Aktivität reduziert die tumorfrees Überlebenszeit von XPA-defizienten Mäusen dramatisch:** Wildtyp- (n=5), XPC<sup>(-/-)</sup>- (n=5), XPA<sup>(-/-)</sup>- (n=4) und FancD2<sup>(-/-)</sup>- Mäuse (n=5) wurden am Tag 0 mit MNU [50 mg/kg] und O<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg] behandelt und über eine Dauer von 200 Tage beobachtet. Die Überlebensrate ohne Anzeichen einer Tumorerkrankung wurde in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt.

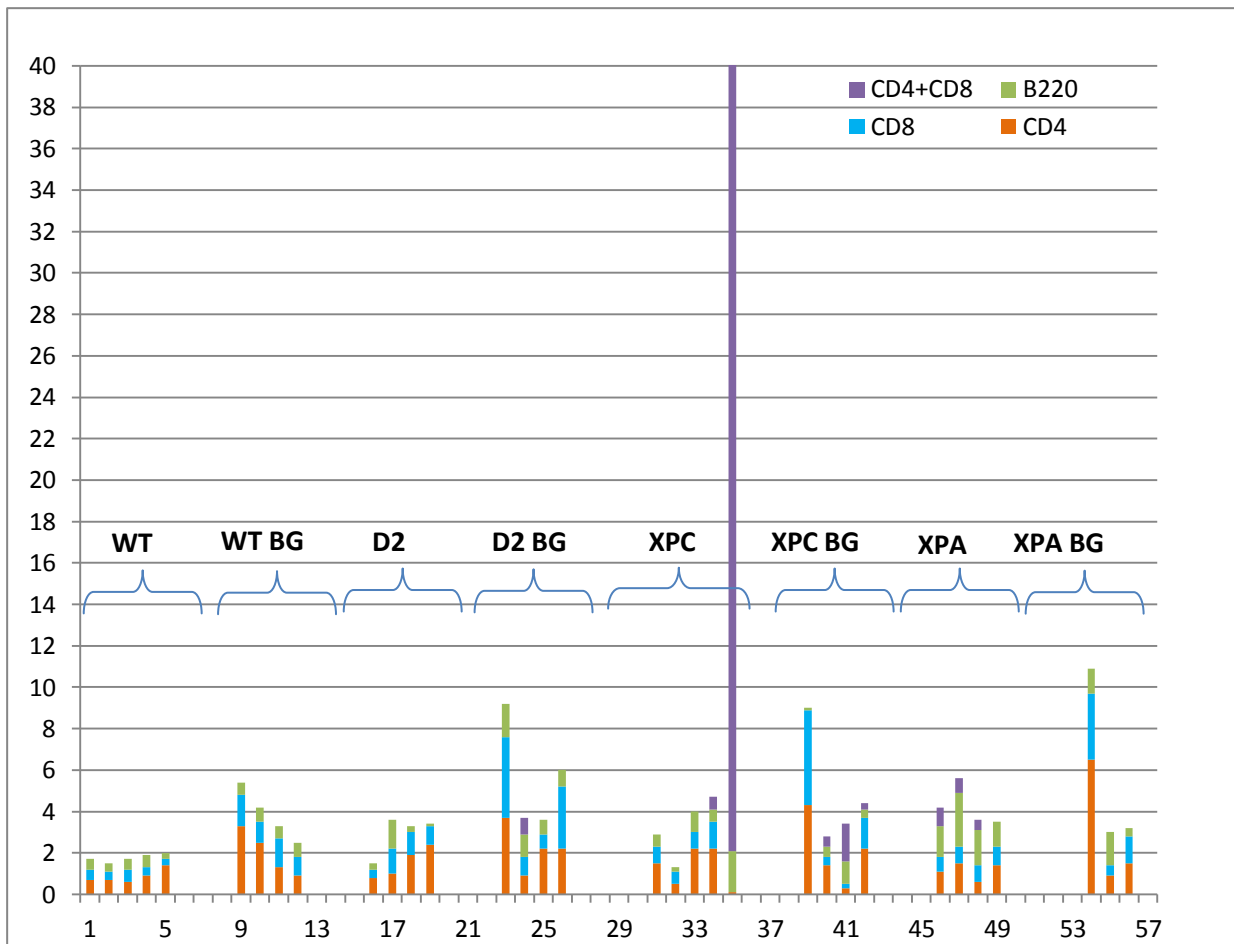
Der früheste Zeitpunkt einer Erkrankung lag bei der MNU-behandelten Gruppe im Durchschnitt bei Tag 90, die letzten Erkrankungen wurden am 149. Behandlungstag detektiert (Abb. 39). Demgegenüber führte ein Verlust der MGMT-Aktivität zu einer verkürzten Latenzzeit (70 Tage nach Behandlung), wobei auch in dieser Gruppe die letzte Erkrankung am Tag 149 ermittelt wurde (Abb. 40).

### 4.2.2.2 T-Zell Lymphome als dominanter Tumortyp bei der MNU-induzierten Karzinogenese

Lymphome sind bei Mäusen die bei weitem häufigste Form von neoplastischen Erkrankungen nach Exposition mit DNA-alkylierenden Verbindungen wie MNU (Dumenco 1993). Seltener werden auch andere Tumoren der Milz oder Leber beschrieben. Um dies für die vorliegende Untersuchung zu bestätigen und zu ermitteln, ob sich gegebenenfalls Unterschiede zwischen den verschiedenen Reparatur-profizienten und -defizienten Mausstämmen ergeben, wurden die Tumoren nach Resektion näher charakterisiert. Dazu wurden HE (Hämalaun-Eosin) - gefärbte Paraffin-Dünnschnitte aus Milz, Leber und Thymus, sowie Blutausstriche und Zellen aus Knochenmark und Milz analysiert. Die Zellen aus Knochenmark und Milz wurden nach Entnahme und Aufreinigung (Kap. 3.2.9) für reife T-Zell- (CD4, CD8a) bzw. B-Zell- (B220) Oberflächenmarker mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch (FACS) gemessen. Die prozentuale Verteilung der T- bzw. B-Zellen pro Tier in dem untersuchten Gewebe wurde grafisch dargestellt (Abb. 41 und 42).

Der Anteil reifer T- bzw. B-Zellen im Knochenmark liegt für gesunde Mäuse bei ca. 1%. Höhere Werte deuten in der Regel auf eine maligne Erkrankung im hämatopoetischen System hin. Bei der Auswertung der T-Zellmarker CD4 und CD8 aus dem Knochenmark fanden sich bei den Wildtyptieren nach MNU-Behandlung Werte zwischen 0,8 % und 1,2 %. Nach zusätzlicher Depletion der MGMT-Aktivität schwankten die Werte zwischen 2 - 5 %. Bei Verlust des FancD2-Proteins variierte der Anteil an T-Zellen nach MNU zwischen 1,5 und 3 %, bei zusätzlicher Blockierung der MGMT zwischen 4 und 8 %. Bei den XPC<sup>(-/-)</sup>-Mäusen wurden Werte zwischen 1,5 und 4 % gemessen, wobei auffiel, dass bei einem Tier dieser Gruppe ein extrem hoher Anteil (50 %) ausschließlich CD4/CD8 doppelt-positive T-Zellen auftrat. Eine zusätzliche Blockierung der endogenen MGMT durch O<sup>6</sup>-BG führte zu 2,5 bis 8,5 % reifen T-Zellen. Im Knochenmark von XPA<sup>(-/-)</sup>-Tieren wurden 4 - 6 % reife T-Zellen gemessen und nach vorheriger Depletion der MGMT 2 - 10 %. Für den B-Zellmarker B220 wiesen alle Tiere Werte von < 1 % auf (Abb. 41).

## Ergebnisse

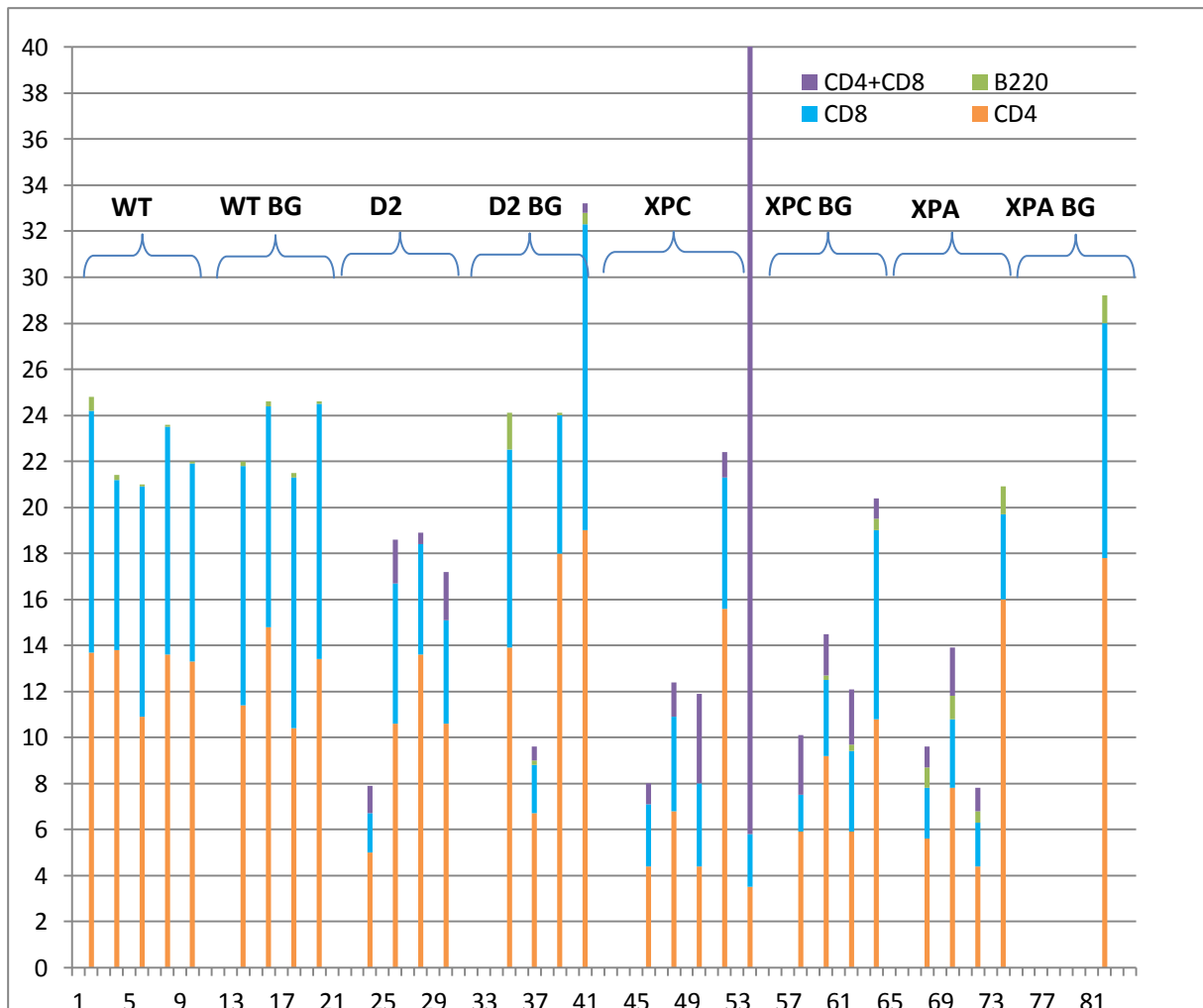


**Abb. 41: Durchflusszytometrische Bestimmung des T- und B-Zellanteils im Knochenmark von Mäusen nach MNU ± O<sup>6</sup>-BG-Behandlung:** Wildtyp (WT)-, XPA<sup>(-/-)</sup>, XPC<sup>(-/-)</sup>, und FancD2<sup>(-/-)</sup> (D2)-Mäuse wurden mit MNU [50 mg/kg] ± O<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg] *i.p.* behandelt. Bei Erkrankungssymptomen oder nach 200 Tagen wurden die Zellen des Knochenmarks entnommen, für T-Zell (CD4, CD8)- und B-Zell-Oberflächenmarker (B220) gefärbt und die Verteilung durchflusszytometrisch bestimmt.

Entsprechende FACS-Messungen wurden auch für die Lymphozytenfraktion der Milz durchgeführt (Abb. 42). Der Anteil reifer T- und B-Zellen im Milzgewebe gesunder Mäuse beträgt durchschnittlich 10 - 30 %.

Bei Anwesenheit aller untersuchten Reparaturproteine wurden bei den Wildtyptieren nach MNU-Behandlung zwischen 20 % und 25 % reife T-Zellen detektiert, die auch bei vorheriger MGMT-Inaktivierung auf demselben Niveau verblieben. In den FancD2<sup>(-/-)</sup>-Tieren wurden 8 - 18 % reife T-Zellen gemessen, die bei gleichzeitiger Behandlung mit O<sup>6</sup>-BG zwischen 10 % und 30 % schwankten. In der Milz der XPC<sup>(-/-)</sup>-Tiere wurden, unabhängig von aktiver MGMT, zwischen 10 % und 20% ausgereifter T-Zellen gemessen, wobei auch hier ein Tier, wie schon bei den Messungen in den Knochenmarkszellen gesehen, mit einem hohen Gehalt CD4/CD8-doppelt-positiver T-Zellen (52 %) auffiel.

## Ergebnisse



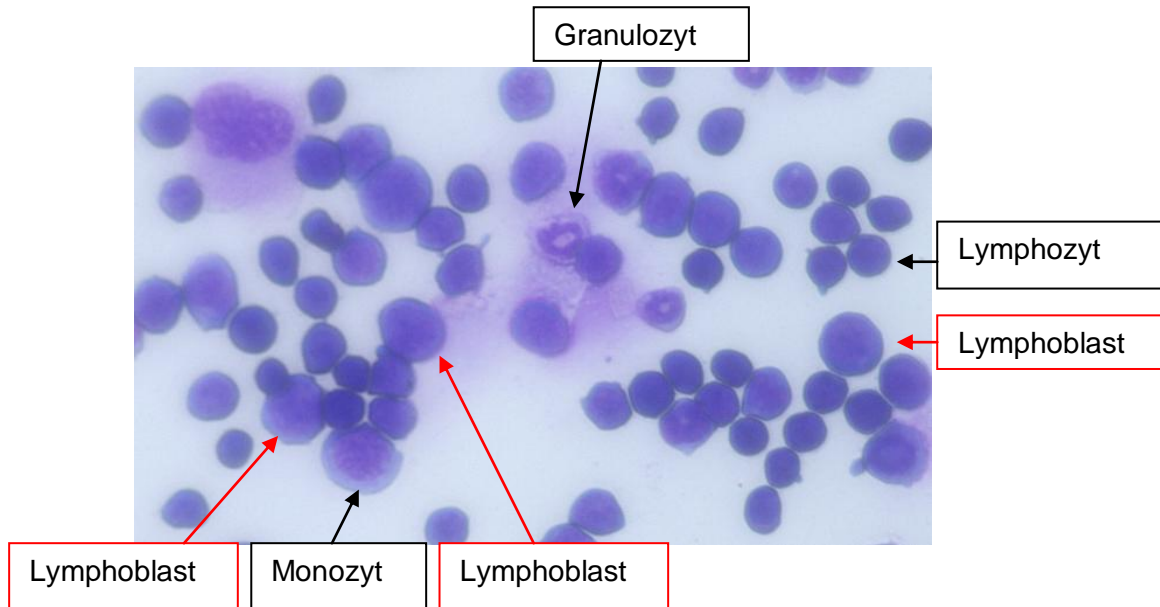
**Abb. 42: Durchflusszytometrische Analyse des T- und B-Zellanteils bei Milzlymphozyten von verschiedenen Reparatur-profizienten und -defizienten Mausstämmen nach MNU-Behandlung:** Wildtyp (WT)-, XPA<sup>(-/-)</sup>-, XPC<sup>(+/-)</sup>- und FancD2<sup>(+/-)</sup> (D2)- Mäuse wurden mit MNU [50 mg/kg] ± O<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg] behandelt. Bei Erkrankung oder nach 200 Tagen wurden Lymphozyten aus der Milz isoliert und für T-Zell (CD4, CD8) und B-Zell-Oberflächenmarker (B220) gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen.

Der Anteil von reifen T-Zellen bei den XPA<sup>(-/-)</sup>-Tieren lag zwischen 10 % und 20 %, erreichte allerdings bei gleichzeitiger MGMT-Inhibition bis zu 30 %. Wie bei den Zellen des Knochenmarks zeigten auch hier alle Tiere für den Oberflächenmarker B220 < 1 % positive B-Zellen.

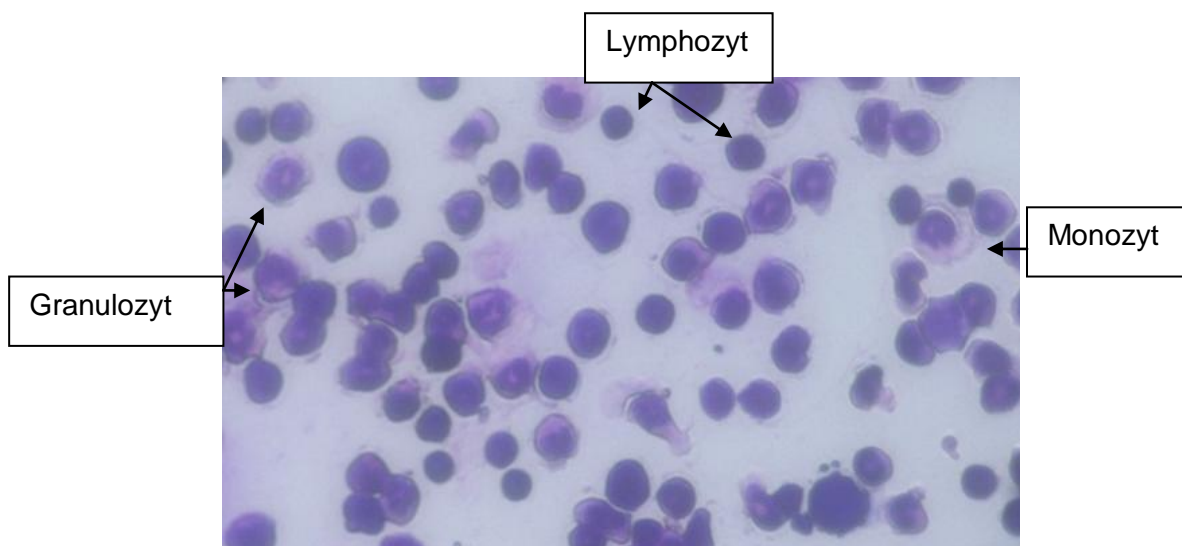
Eindeutig identifiziert wurde mit der durchflusszytometrischen Analyse eine Leukämie in einem XPC<sup>(-/-)</sup>-Tier (MNU-behandelt), die durch extrem hohe Konzentrationen (über 50 %) an CD4/CD8 doppelt-positiven T-Zellen sowohl im Knochenmark als auch in Milzlymphozyten erkennbar wurde. Zusätzlich belegt wurde dieses Ergebnis durch die im Versuch angefertigten Blutausrichungen. Diese wurden direkt im Anschluss an die Blutentnahmen durchgeführt und mit einer Häma-Schnellfärbung für die

## Ergebnisse

unterschiedlichen Blutzelltypen angefärbt, um mögliche Veränderung im Blut durch Anwesenheit maligner Zellen (Lymphoblasten) frühzeitig zu erkennen. Bei der leukämischen  $XPC^{(-/-)}$ -Maus konnten im Blutausstrich maligne Lymphoblasten nachgewiesen werden (Abb. 43), die bei unbehandelten Kontrolltieren nicht auftraten (Abb. 44).



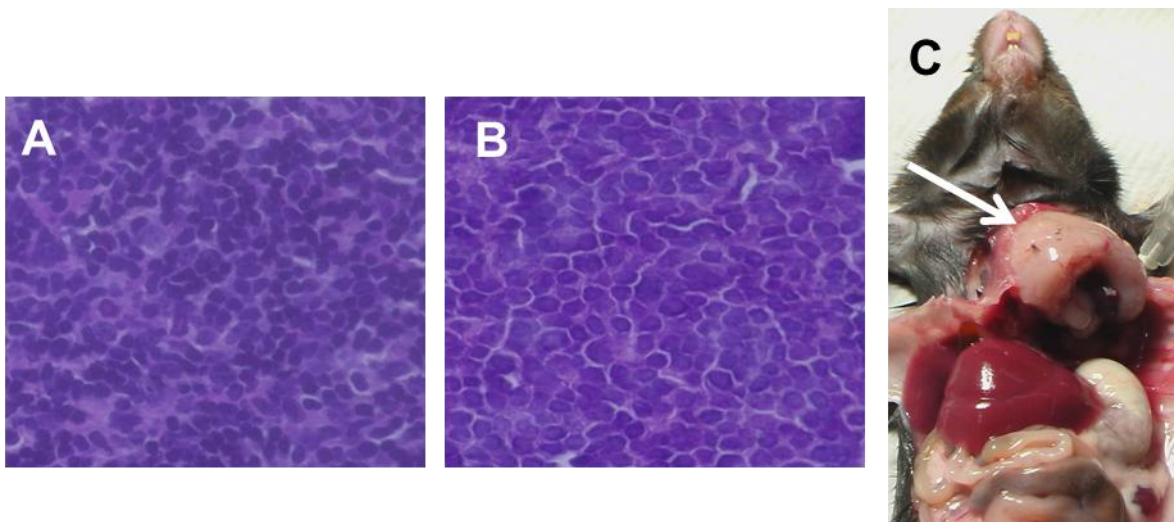
**Abb. 43: Beispiel einer Leukämie bei einer MNU-behandelten Maus:** Dargestellt sind Zellen des Knochenmarks einer  $XPC^{(-/-)}$ -Maus nach MNU-Exposition. Die nach Wright-Giemsa angefärbten Zellen zeigen beispielhaft die Entwicklung einer MNU-induzierten Leukämie (Objektiv 20-fach).



**Abb. 44: Zellen aus dem Knochenmark einer gesunden Maus (Wright-Giemsa):** Einer unbehandelten Maus wurden Knochenmarkszellen entnommen, über einen Cytospin auf Objektträger gebracht und anschließend nach Wright-Giemsa gefärbt. Mikroskopische Darstellung der verschiedenen Zelltypen des Knochenmarks (Objektiv 20-fach).

## Ergebnisse

Abschließend wurden die gesammelten Gewebe (Milz, Thymus) der behandelten Mäuse mit fachlicher Unterstützung eines Hämatologen auf tumoröse Merkmale untersucht. Bei den entnommenen Thymusgeweben wurden anhand der angefertigten Dünnschnitte zweifelfrei die markanten Merkmale maligner Zellen detektiert, die deutliche Unterschiede zu gesunden Thymozyten (T-Lymphozyten) aufwiesen. Die Zellkerne gesunder Zellen waren im Gewebeverband eher klein und locker angesiedelt, während die Zellkerne bei einem Thymom stark vergrößert und dicht gepackt waren. Dadurch wurden homogene tumoröse Areale sichtbar oder das Gewebe zeigte insgesamt eine homogen-dichte Zellstruktur (Abb. 45 A-C).



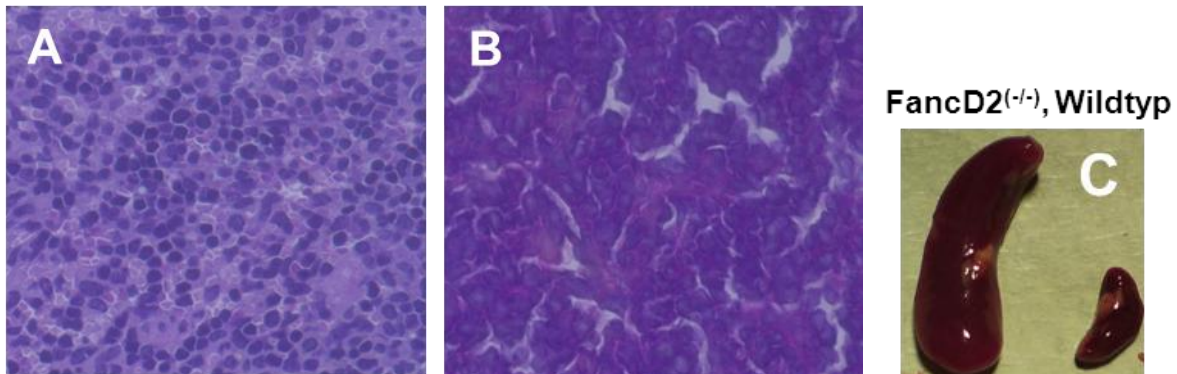
**Abb. 45: Paraffin-Gewebeschnitt des Thymus der Maus (HE-Färbung):** Beispielhafte Darstellung eines gesunden Thymus (A) im Vergleich zu einer tumorösen Veränderung (Thymom) (B) nach MNU-Exposition bei gleichzeitigem Verlust der DNA Reparatur ( $XPC^{(-/-)}$ ) Objektiv 40-fach; C) Foto eines Thymoms in der Maus nach Euthanasie

Bei den Gewebeschnitten der Milz konnte bei einer Maus, die nach Sektion eine vergrößerte Milz aufwies, eindeutig ein Milztumor nachgewiesen werden (Abb. 46 A). Auch hierbei besaßen die Tumorzellen einen deutlich größeren Zellkern als bei gesundem Gewebe (Abb. 46 B). Das tumoröse Gewebe wirkte sehr homogen und dicht vernetzt, während im gesunden Milzgewebe deutlich unterschiedlich strukturierte Areale zu finden waren.

Bei den anderen sechs Tieren, die eine Splenomegalie entwickelten, fanden sich keine Anzeichen eines Milztumors. Bei diesen Tieren war die Vergrößerung des Organs vermutlich bedingt durch eine vermehrte Zellproliferation verschiedener histologisch normaler Zelltypen. Solch eine Überproduktion in der Milz ist oft ein

## Ergebnisse

Zeichen für einen Mangel an hämatopoetischen Zellen im Knochenmark nach massivem Zellverlust oder durch maligne Zellveränderungen. Dies konnte partiell in den Blutausstrichen durch detektierbare Mengen an Lymphblasten-Zellen sowie erhöhte T-Zell-Werte bei der Durchflusszytometrie bestätigt werden.



**Abb. 46: Paraffin-Gewebeschnitt der Milz bei der Maus (HE-Färbung):** Darstellung einer unauffälligen Milz einer Kontrollmaus (A) im Vergleich zu einer tumorösen Splenomegalie (Milztumor) (B) bei einer MNU-behandelten Maus mit Verlust der DNA-Reparatur (XPC<sup>-/-</sup>); Objektiv 40-fach; (C) Unterschiede der Organgröße der Milz bei einer gesunden Kontrollmaus (rechts) zu einer erkrankten FancD2<sup>-/-</sup>-Maus (links) nach MNU-Behandlung.

### 4.2.3 Bestimmung der Mutationsrate anhand des *lacZ*-transgenen Mausmodells (“*small blue mouse*“ model)

Neben dem Zelltod und maligner Transformation sollte als dritter biologischer Aspekt die Entstehung von MNU-induzierten Mutationen in Abhängigkeit der DNA-Reparaturleistung untersucht werden. Anders als in Zellkulturexperimenten, bei denen auf einen mutierten Phänotyp hin selektiert werden kann, sind solche Analysen im Gewebe von Mäusen aufgrund der geringen Mutationsfrequenz viel schwieriger. Daher wurden in den letzten Jahren spezielle Mausstämme mit transgenen „Indikatorsequenzen“ entwickelt, nach deren Isolierung der notwendige Selektionsschritt in einem anderen, meist prokaryotischen Zellsystem, stattfindet.

Das transgene *lacZ*-Mausmodell ist eins der ersten etablierten *in vivo*-Modelle, dass unter anderem auf die Bestimmung von Mutationsraten in hämatopoetischen Zellen hin optimiert wurde. Das Genom dieser Mäuse enthält eine in der Keimbahn integrierte Sequenz, die 20 als „*tandem repeat*“ angeordnete Sequenzen des bakteriellen *lacZ*-Gens umfasst. Dieses Indikator-Gen wird in der Maus nicht



exprimiert und unterliegt somit dem Zugriff der globalen genomischen Reparatur (GG-NER), nicht aber dem transkriptions-gekoppelten Mechanismus (TC-NER) der NER. Um die mutagene Wirkung von MNU auf dem Hintergrund der oben beschriebenen Reparatur-profizienten und -defizienten Stämme mit diesem Mausmodell zu bestimmen, wurden zunächst transgene Mäuse ( $LacZ^{+}/C57BL/6J$ ) sowohl mit  $XPC^{(-/-)}$ - (GG-NER inaktiv) als auch mit  $XPA^{(-/-)}$ -Tieren (GG-NER und TC-NER inaktiv) verpaart. Aus den daraus entstandenen  $LacZ^{+}/Wildtyp$ - sowie  $LacZ^{+}/XPC^{(-/-)}$ - und  $LacZ^{+}/XPA^{(-/-)}$ -Mäusen sollte dann die Frequenz von MNU-induzierten Punktmutationen bei An- und Abwesenheit von aktivem MGMT-Protein ermittelt werden.

### **4.2.3.1 Bestimmung der basalen Mutationsrate aus Zellen des Knochenmarks von Reparatur-profizienten und -defizienten Tieren**

Zur Bestimmung der basalen Mutationsrate wurde dieser Versuch zunächst mit den unterschiedlichen Mauslinien ohne MNU-Exposition durchgeführt. Nach Euthanasie wurde die DNA aus Knochenmarkzellen von Femur und Tibia isoliert. Die in der genomischen DNA enthaltenen *lacZ*-Sequenzen wurden enzymatisch herausgeschnitten und über Magnetbead-gekoppelte Antikörper isoliert (siehe Material und Experimenteller Teil). Die vereinzelt *lacZ*-Sequenzen wurden dann in einen pUR288-Expressionsvektor inkloniert und in elektrokompente *E. coli* ( $\Delta lacZ/galE^{-}$ ) transfiziert. Anhand von Selektionsplatten (P-Gal) wurden Funktionsdefiziente *lacZ*-Mutanten von Bakterien mit intaktem LacZ-Protein unterschieden und daraus die vorläufige Mutationsrate berechnet. Da nach MNU-induzierten Basen-Methylierungen in der DNA überwiegend Punktmutationen entstehen sollten, wurde die Häufigkeit in der aus den *E. coli*-Mutanten isolierten DNA dieses Mutationstyps nach Gelelektrophorese anhand eines spezifischen Bandenmusters (*lacZ*-unverdaut sowie nach Aval und HindIII-Restriktionsverdau) ermittelt.

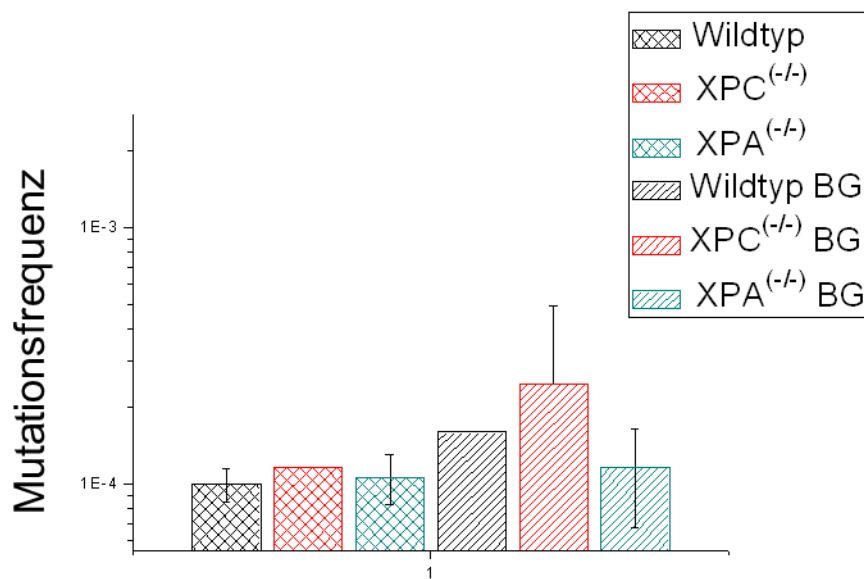
Die basale Mutationsrate in den Knochenmarkzellen der unterschiedlichen Mauslinien ergab sich als Mittelwert von zwei Tieren aus der Häufigkeit von Punktmutationen pro Gewebe (Mutationsfrequenz).

Diese Frequenz betrug bei unbehandelten Wildtyp-Tieren  $1 \times 10^{-4}$ , bei  $XPC^{(-/-)}$ -Tieren  $1,16 \times 10^{-4}$  und bei  $XPA^{(-/-)}$ -Tieren  $1,1 \times 10^{-4}$ . Da signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und NER-defizienten Tieren nicht gemessen wurden, führt das Fehlen einer

## Ergebnisse

Reparaturrelevanten Komponente, wie XPC oder XPA, in diesem Testsystem nicht zu einer detektierbaren Erhöhung der spontanen Mutationsrate in Knochenmarkszellen dieser Mäuse.

Durch einmalige Blockierung der MGMT mit O<sup>6</sup>-BG erhöhte sich die Mutationsrate bei Wildtyp-Tieren von  $1,0 \times 10^{-4}$  auf  $1,5 \times 10^{-4}$ , bei XPC<sup>(-/-)</sup>-Tieren von  $1,16 \times 10^{-4}$  auf  $2,40 \times 10^{-4}$ , und bei XPA<sup>(-/-)</sup>-Tieren von  $1,1 \times 10^{-4}$  auf  $1,15 \times 10^{-4}$ . Demnach führte in Abwesenheit von XPC die Depletion der MGMT-Aktivität zu einer Verdopplung der basalen Mutationsrate in den Knochenmarkszellen, während sie bei Wildtyp- und XPA<sup>(-/-)</sup>-Tieren vergleichsweise konstant blieb (Abb. 47). Aufgrund der hohen Standardabweichungen bei den XPC<sup>(-/-)</sup>- und XPA<sup>(-/-)</sup>-Tieren konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zu den unbehandelten Tieren beschrieben werden.



**Abb. 47: Bestimmung der basalen Mutationsrate in den hämatopoetischen Zellen von Wildtyp- und von NER-defizienten Mäusen (*lacZ*-transgenes Mausmodell):** LacZ<sup>(+)</sup>/Wildtyp-, LacZ<sup>(+)</sup>/XPC<sup>(-/-)</sup> und LacZ<sup>(+)</sup>/XPA<sup>(-/-)</sup>-Tiere wurden entweder mit O<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg] behandelt oder als unbehandelte Kontrolle mitgeführt. Nach 10 Tagen wurden aus den Zellen des Knochenmarks die *lacZ*-Sequenzen isoliert und in elektrokompetente *E. coli* Bakterien ( $\Delta lacZ/galE$ ) transfiziert. Aus der Anzahl der auf LacZ-Funktionsverlust selektierten Bakterienkolonien wurde dann die spontane Mutationsrate ermittelt. Der Versuch wurde mit je 2 Tieren/Mauslinie in unabhängigen Analysen durchgeführt. BG = mit O<sup>6</sup>-BG *i.p.* vorinkubiert.

### 4.2.3.2 Ermittlung der MNU-induzierten Mutationsrate in Reparatur-profizienten und -defizienten Mäusen

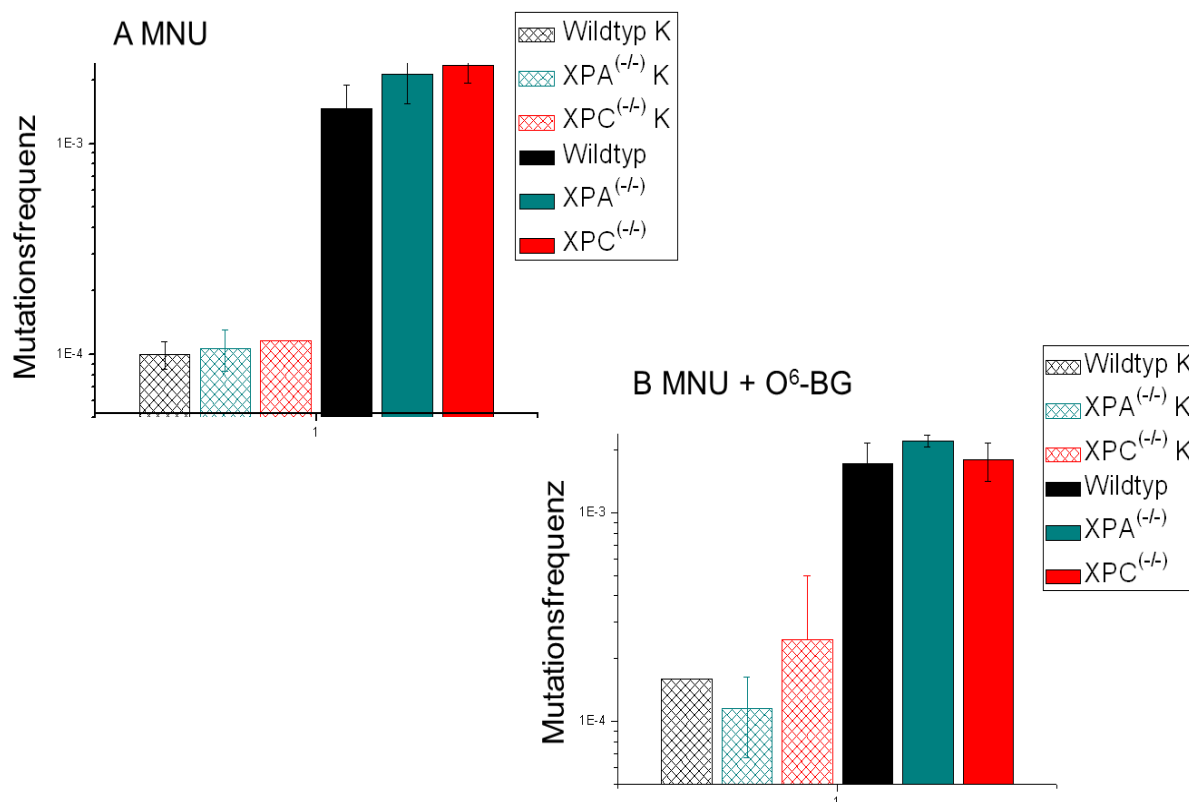
Aufgrund ähnlicher basaler Mutationsraten in den untersuchten Mauslinien wurden im nächsten Schritt die MNU-induzierten Mutationsraten im Knochenmark der *lacZ*-transgenen Mäuse bestimmt. Dazu wurden *LacZ*<sup>(+)</sup>/Wildtyp-, *LacZ*<sup>(+)</sup>/*XPC*<sup>(-/-)</sup>- und *LacZ*<sup>(+)</sup>/*XPA*<sup>(-/-)</sup>-Tieren einmalig MNU [50 mg/kg] alleine oder nach Vorbehandlung mit *O*<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg] *i.p.* injiziert und unter Standardbedingungen gehalten. Nach der Inkubationszeit von 10 Tagen wurden die Mäuse euthanasiert, die Zellen des Knochenmarks entnommen und die MNU-induzierte Punktmutationsrate im *lacZ*-Indikatororgan, wie oben beschrieben, bestimmt (Abb. 48).

Die Behandlung mit MNU verursachte sowohl bei Wildtyp- ( $1,47 \times 10^{-3}$ ), als auch *XPC*<sup>(-/-)</sup>- ( $2,35 \times 10^{-3}$ ) und *XPA*<sup>(-/-)</sup>- ( $2,14 \times 10^{-3}$ ) Tieren eine etwa 10-fache Erhöhung der Mutationsrate im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen. Zudem wurde bei den NER-defizienten *XPC*<sup>(-/-)</sup>- und *XPA*<sup>(-/-)</sup>-Mäusen eine etwa 2-fach höhere Mutationsfrequenz detektiert als bei den Wildtyptieren (Abb. 48 A).

Eine zusätzliche Blockierung der MGMT durch *O*<sup>6</sup>-BG führte nicht zu einer weiteren Erhöhung der Mutationsrate. Die Frequenzen lagen hier bei  $1,71 \times 10^{-3}$  (Wildtyp),  $1,79 \times 10^{-3}$  (*XPC*<sup>(-/-)</sup>) und  $2,21 \times 10^{-3}$  (*XPA*<sup>(-/-)</sup>). Signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und NER-defizienten Tieren wurden jedoch nicht beobachtet (Abb. 48 B).

Da von den MNU-induzierten DNA-Methylierungen dem *O*<sup>6</sup>-meG-Addukt das stärkste mutagene Potential zugeschrieben wird, sollte im Folgenden der den detektierten *lacZ*-Mutationen zugrunde liegende Basenaustausch bzw. -verlust bestimmt werden. Dazu wurden von den selektierten Bakterienklonen mit Punktmutation im *lacZ*-Gen pro Genotyp und Tier je 5 Klone stichprobenartig ausgewählt und für eine DNA-Sequenzierung in Glycerin eingefroren. Anhand der Sequenzierung sollte anschließend untersucht werden, ob als Ursprung der entstandenen Punktmutationen eine nicht-reparierte *O*<sup>6</sup>-meG-Base in Frage kam.

## Ergebnisse



**Abb. 48: MNU-induzierte Mutationsraten in den hämatopoetischen Zellen von Reparatur-profizienten und -defizienten Mäusen:** *LacZ*<sup>(+)</sup>/Wildtyp-, *LacZ*<sup>(+)</sup>/XPC<sup>(-/-)</sup>- und *LacZ*<sup>(+)</sup>/XPA<sup>(-/-)</sup>-Mäuse wurden mit einer einmaligen Dosis von MNU [50 mg/kg] (A) oder zusätzlich mit O<sup>6</sup>-BG [25 mg/kg] (B) *i.p.* behandelt. Die Mutationsfrequenz im *lacZ*-Gen wurde, wie in Abbildung 47 beschrieben, bestimmt. Das Experiment wurde mit je vier Tieren/Mauslinie in unabhängigen Analysen durchgeführt. schraffierte Balken = unbehandelte Kontrollen; farbige Balken = MNU-exponierte Mausstämmen; K = Kontrolle.

### 4.2.3.3 Sequenzanalyse von MNU-induzierten Punktmutationen im *lacZ*-Gen

Die DNA-Sequenzierung ermöglicht es, Abweichungen in der Nukleotidsequenz eines Gens zu identifizieren und daraus mögliche Rückschlüsse auf den verursachenden DNA-Schaden zu ziehen. Dadurch können spezifische Sequenzveränderungen wie G:C → A:T Basenpaarmutationen, die möglicherweise auf persistierende O<sup>6</sup>-Methylguanin-Schäden zurückzuführen sind, erkannt werden.

Hierzu wurden aus den selektierten Bakterienklonen des Mutations-Assays, die pUR 288-Plasmide mit der *lacZ*-DNA isoliert, amplifiziert und für die Sequenzierung vorbereitet. Es standen sechs Sequenzierungsprimer zur Verfügung, die in Kombination das gesamte *lacZ*-Plasmid (4200 Bp.) abdecken konnten. Aufgrund der großen Probenzahl wurden zunächst nur die ersten zwei Primer genutzt, die eine Sequenzierung des Gens ab Position 366 ermöglichten (siehe Abb. 49). Insgesamt standen 99 Bakterienklone aus den drei verschiedenen Genotypen (Wildtyp, XPA<sup>(-/-)</sup>,

## Ergebnisse

---

XPC<sup>(-/-)</sup> nach MNU- bzw. MNU + O<sup>6</sup>-BG-Behandlung zur Verfügung, von denen 54 Proben sequenziert wurden. Bei 40 der 54 Proben konnte eine erfolgreiche Sequenzierung durchgeführt werden und mit den eingesetzten Primern wurden dabei 13 Punktmutationen im Vergleich zur Referenzsequenz (Wildtypkontrolle) detektiert. Die meisten Mutationen befanden sich am N-Terminus der *lacZ*-Sequenz, die vom ersten Primer abdeckt wurden (Abb. 49).

Im *lacZ*-Gen fanden sich bei MNU-behandelten Wildtypmäusen von sieben erfolgreichen Sequenzierungsanalysen zwei Mutationen an der Position 419 (A→G) und 827 (G→A) (Tab. 11). Bei den XPC-defizienten Tieren wurden aus sechs erfolgreich analysierten Proben zwei Mutationen entdeckt (G→C an Position 428; A→G an Position 430). Bei XPA-Defizienz wurde aus sieben erfolgreich sequenzierten Proben eine Mutation von C→T an Position 489 gemessen.

In der Gruppe der MNU + O<sup>6</sup>-BG-behandelten Tieren wurden beim Wildtyp drei Mutationen detektiert (A→C an Position 413; G→A an Position 819; G→A an Position 1001), in XPC<sup>(-/-)</sup>-Tieren ebenfalls drei Mutationen (A→G an Position 430; T→G an Position 1229; G→A an Position 1230) und bei XPA<sup>(-/-)</sup>-Tieren zwei Mutationen an gleichen Position (G→A an Position 488).

Die Anzahl an MNU-induzierten Punktmutationen wurde durch die Blockierung der MGMT nicht erhöht, in beiden Gruppen wurden ähnliche viele Mutationen detektiert. Insgesamt wurden sechs verschiedene Mutationstypen in diesen Proben gefunden.

Die Folgen der unterschiedlichen Punktmutationen auf die Aminosäuresequenz wurden anhand der Basenaustausche gegenüber einer Referenzsequenz ermittelt. In der Wildtypsituation verursachte die Mutation an Position 419 (Basenaustausch von A→G) keine veränderte Aminosäure-Sequenz im Protein. Die Mutation an Position 827 von G→A führte zum Austausch von Tryptophan gegen Cystein. Unter Blockierung der MGMT fanden sich bei den Wildtyptieren erneut Mutationen mit einem Basenaustausch ohne Folgen (Position 413: Alanin→Alanin) und zwei Mutationen mit einem Aminosäureaustausch (Position 819: Asparaginsäure→Asparagin; Position 1001: Tryptophan→Cystein). Bei den XPC<sup>(-/-)</sup>-Tieren veränderte die G→C Mutation (Position 428) die Aminosäuresequenz nicht und an Position 430 entstand durch die Mutation eine Veränderung von Glutaminsäure nach Glycin.



## Ergebnisse

**Tab. 11: Übersicht der MNU-induzierten Punktmutationen im *lacZ*-Gen**

	Wildtyp	XPC <sup>(-/-)</sup>	XPA <sup>(-/-)</sup>	Wildtyp (O <sup>6</sup> -BG)	XPC <sup>(-/-)</sup> (O <sup>6</sup> -BG)	XPA <sup>(-/-)</sup> (O <sup>6</sup> -BG)
<b>Verfügbare Klone</b>	19	15	19	11	15	20
<b>Sequenzierte Präparate</b>	12	8	8	10	7	9
<b>Erfolgreiche Sequenzierung</b>	7	7	6	7	6	7
<b>Gefundene Mutationen</b>	2 (A→G Pos.419), (G→A Pos.827)	2 (G→C Pos.428), (A→G Pos.430)	1 (C→T Pos.489)	3 (G→A Pos. 1001), (A→C Pos.413), (G→A Pos.819)	3 (A→G Pos.430), (T→G Pos.1229) G→A Pos.1230)	2 (G→A Pos.488)

Die drei Mutationen der XPC- und MGMT-depletieren Tiere zeigten jeweils eine Sequenz-Veränderung von Glutaminsäure zu Glycin (A→G an Position 430), von Isoleucin nach Serin (Position 1229 T→G) und von Glutaminsäure nach Lysin (Position 1230).

Die einzige in XPA<sup>(-/-)</sup>-Tieren gefundene Mutation verursachte ein Stoppcodon durch den Basenaustausch von C→T an Position 489. Die zusätzliche Blockierung der MGMT-Aktivität brachte zweimal die Mutation an Position 488 hervor, die zu einem Aminosäureaustausch von Tryptophan nach Cystein führte (Tab. 12).

**Tab. 12: Veränderungen in der angenommenen Aminosäuresequenz durch MNU-induzierte Punktmutationen im *lacZ*-Gen**

Genotyp	Position	Mutation
Wildtyp	419	A→G
Wildtyp	827	G→A
Wildtyp-O <sup>6</sup> -BG	413	A→C
Wildtyp-O <sup>6</sup> -BG	819	G→A
Wildtyp-O <sup>6</sup> -BG	1001	G→A
XPC	428	G→C
XPC	430	A→G
XPC-O <sup>6</sup> -BG	430	A→G
XPC-O <sup>6</sup> -BG	1229	T→G
XPC-O <sup>6</sup> -BG	1230	G→A
XPA	489	C→T
XPA-O <sup>6</sup> -BG	488	G→A
XPA-O <sup>6</sup> -BG	488	G→A

\* Genetischer Code: Alanin (A), Arginin (R), Asparagin (N), Asparaginsäure (D), Cystein (C), Glutamin (Q), Glutaminsäure (E), Glycin (G), Histidin (H), Isoleucin (I), Leucin (L), Lysin (K), Methionin (M), Phenylalanin (F), Prolin (P), Serin (S), Threonin (T), Tyrosin (Y), Tryptophan (W), Valin (V)

## Ergebnisse

Allgemein führten die hier detektierten MNU-induzierten Mutationen demnach zu ganz unterschiedlichen Veränderungen der Aminosäuresequenz. Ob diese allerdings zu dem Funktionsverlust des LacZ-Proteins geführt haben, konnte vorerst nicht nachgewiesen werden. Die „stillen“ Mutationen an Position 413 und 419 waren jedenfalls sicher nicht die Ursache für den LacZ-Ausfall. Insgesamt entstanden 10 Transitionen (Austausch zweier Purin- bzw. Pyrimidinbasen) und drei Transversionen (Austausch zwischen Purin und Pyrimidinbase). Zu einem eindeutigen Funktionsverlust führte sicher die Mutation an Position 489, die durch eine C→T Transition einen Transkriptionsabbruch (Stoppcodon TAG) induzierte.

Um schließlich das Verhältnis von O<sup>6</sup>-meG-induzierten Punktmutationen zu anderen Schadentypen zu analysieren, wurden alle Mutationen, die durch eine Fehlpaarung von O<sup>6</sup>-meG in der Replikation entstehen können (G→A, C→T), den anderen Mutationstypen gegenübergestellt und prozentual berechnet (Tab. 13).

**Tab. 13: Anteil O<sup>6</sup>-meG-induzierter Punktmutationen im *lacZ*-Gen**

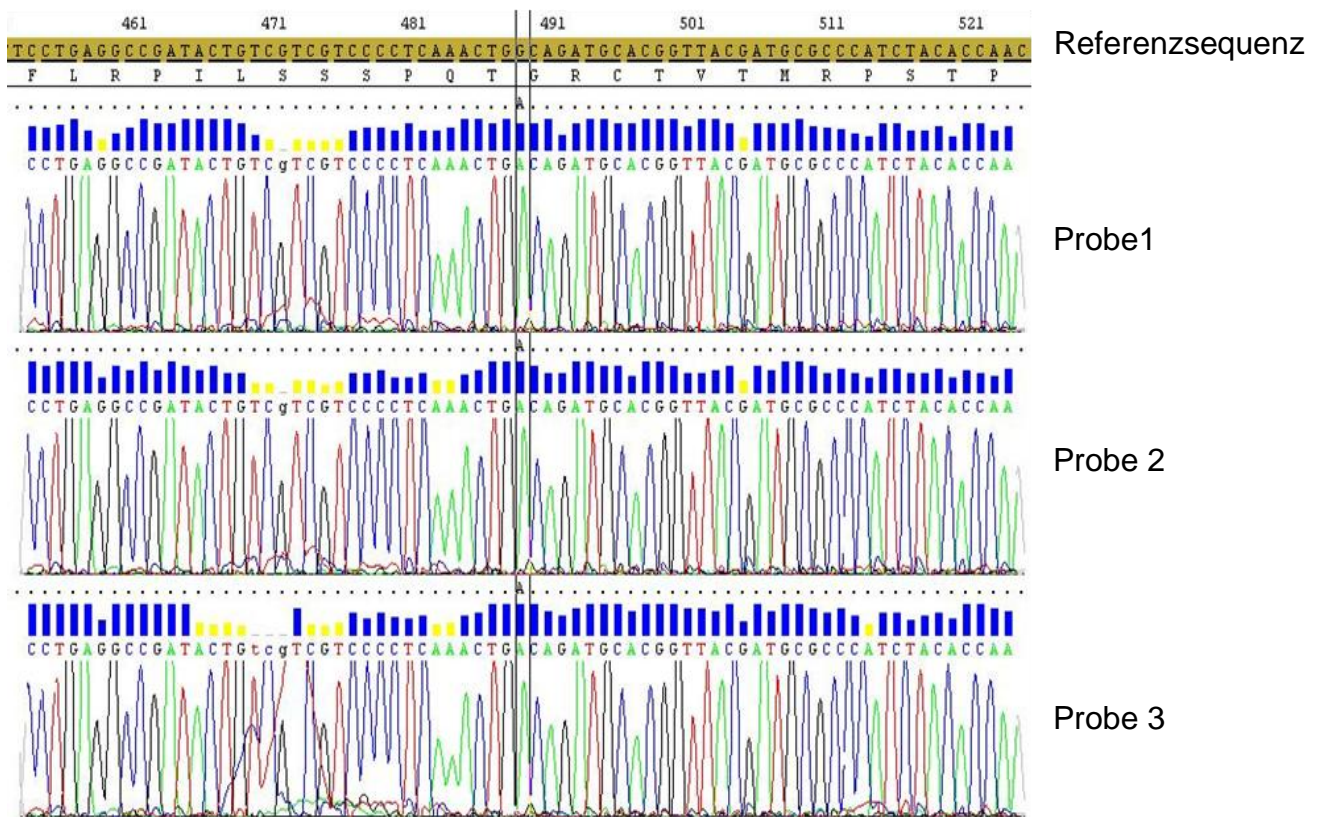
<b>Mäuse</b>	<b>Anzahl aller Mutationstypen</b>	<b>O<sup>6</sup>-meG-vermittelte Mutationen</b>
<b>Total</b>	<b>13 (100 %)</b>	<b>6 (G-&gt;A) 1 (C-&gt;T) = 7 (54 %)</b>
<b>MGMT<sup>(+)</sup></b>	<b>5 (38 %)</b>	<b>2 (15 %)</b>
<b>MGMT<sup>(-)</sup></b>	<b>8 (62 %)</b>	<b>5 (39 %)</b>
<b>WT</b>	<b>5 (38 %)</b>	<b>3 (23 %)</b>
<b>NER<sup>(-/-)</sup></b>	<b>8 (62 %)</b>	<b>4 (31 %)</b>

Von den insgesamt 13 (= 100 %) ermittelten Punktmutationen konnten sieben (54 %) auf mögliche nicht-reparierte O<sup>6</sup>-meG-Schäden zurückgeführt werden. Davon traten zwei (15 %) in MNU-behandelten Mäusen auf und fünf (39 %) in MGMT-depletierten Tieren. Demgegenüber führte ein Verlust der Exzisions-Reparatur nicht zu einer signifikanten Erhöhung von O<sup>6</sup>-meG-spezifischen Punktmutationen (Abb. 50). Von sieben möglichen Mutationen wurden drei (23 %) bei Wildtyptieren und vier (31 %) bei NER-defizienten Tieren gefunden. Ein Ausfall der NER-Aktivität zeigte demnach



## Ergebnisse

zumindest für diese Probenzahl keine signifikante Erhöhung von O<sup>6</sup>-meG-abstammenden Punktmutationen vergleichsweise zu NER-profizienten Tieren.



**Abb. 50: Typische O<sup>6</sup>-meG-vermittelte Punktmutation (G:C->A:T) nach MNU-Behandlung:** Dargestellt ist eine Punktmutation von G->A, die typischerweise durch nicht-reparierte O<sup>6</sup>-meG-Läsionen während der Replikation entstehen. Die Sequenzanalyse zeigte in diesem Genabschnitt bei drei Proben von NER-defizienten Mäusen eindeutig ein Adenin anstelle eines Guanins in der Wildtypsequenz (Wildtypsequenz lacZ; ocker, A; Adenin (grün); C Cytosin (blau); T Thymin (rot); G Guanin (schwarz)).

### 5 Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation sollte, basierend auf biochemischen und zellbiologischen Daten von Nickel (2010), geprüft werden, ob der dort entdeckte alternative Reparaturweg für O<sup>6</sup>-meG auch in den Zellen verschiedener Gewebetypen der Maus aktiv ist und welche biologische Rolle ihm gegebenenfalls für das Zellüberleben nach DNA-Alkylierung sowie bei der Mutations- und Tumorentstehung zukommt.

#### 5.1 Der Einfluss des MGMT-Proteins auf die Reparatur von O<sup>6</sup>-meG

Die DNA-Methyltransferase MGMT ist ein intensiv untersuchtes Reparaturprotein für die Entfernung von O-Alkylierungsschäden im Basenpaarungsbereich des DNA-Doppelstranges. Die MGMT besitzt eine hohe Spezifität für O<sup>6</sup>-meG-Läsionen sowie eine geringere Präferenz auch für O<sup>4</sup>-meT (Graves 1989, Encell 1999). Das Protein wurde in vielen pro- und eukaryotischen Organismen nachgewiesen und besitzt im aktiven Zentrum beidseitig des Methylgruppen-Akzeptors eine evolutionär hochkonservierte Aminosäuresequenz. Mit Hilfe der Antikörper-basierten ICA-Technik wurde in dieser Arbeit die Effizienz der O<sup>6</sup>-meG-Reparatur in verschiedenen Zelltypen von MNU-exponierten C57BL/6J-Wildtypmäusen gezeigt. Nach der Schadensinduktion erfolgte sowohl in Milzlymphozyten als auch in Zellen von Niere und Leber eine rasche Entfernung der Läsionen aus der Kern-DNA (Abb. 21 und 22 A). Die Beteiligung des MGMT-Proteins an diesem Prozess konnte indirekt anhand der verlangsamten Reparaturkinetik unter Einwirkung des MGMT-Inhibitors O<sup>6</sup>-BG belegt werden. Eine Blockierung des MGMT-Proteins durch O<sup>6</sup>-BG führte in MNU-behandelten Wildtypmäusen zunächst zu deutlich höheren Addukt Mengen als bei Tieren mit aktiver MGMT sowie zu einer gewebespezifisch unterschiedlich stark eingeschränkten Reparaturleistung (Abb. 21 und 22). Der effizienteste Reparaturprozess wurde in den Hepatozyten der Leber (Abb. 22 B) sowie in den Cortex-Zellen der Niere dokumentiert (Abb. 22 A). Eine vergleichsweise langsame O<sup>6</sup>-meG-Reparatur wurde in Milzlymphozyten gemessen (Abb. 21). Ähnliche Ergebnisse werden auch schon in der Arbeit von Nickel (2010) berichtet, wobei MGMT-depletierte humane Lymphozyten eine ebenfalls nur partielle Reparatur von MNU-induzierten O<sup>6</sup>-meG-Schäden über die Zeit aufweisen. Die Unterschiede im

Reparaturverhalten der untersuchten Zelltypen beruhen auf den gewebespezifischen Unterschieden in der MGMT-Expression und –Aktivität, wie sie bei Nagern (Maus, Ratte) und beim Menschen gefunden werden (Gerson 1986). Die Leber verfügt dabei über den höchsten Anteil endogener MGMT, gefolgt von Niere und Lunge, während hämatopoetische Zellen vergleichsweise wenig MGMT-Protein aufweisen (Pegg 1978, Gerson 1985/1986). Die Tatsache, dass trotz Blockierung der MGMT-Aktivität weiterhin eine Reparatur von O<sup>6</sup>-meG in allen untersuchten Gewebetypen gemessen wurde, zeigt, dass es in diesen Zellen mindestens einen weiteren Reparaturmechanismus für diesen Alkylierungsschaden geben muss.

Die ersten Hinweise zu einem alternativen Reparaturweg für O<sup>6</sup>-meG lieferten Experimente an verschiedenen *E. coli* Stämmen (Samson 1988). Dabei sind Bakterien mit aktiver MGMT (*ada*<sup>+</sup>) in der Lage, MNU-induzierte O<sup>6</sup>-meG-Läsionen effektiv und schnell zu entfernen und auch ein genetischer Verlust der MGMT-Aktivität (*ada*<sup>-</sup>) schränkt ihre Reparaturfähigkeit nur partiell ein. Haben die *E. coli*-Zellen hingegen zusätzlich eine Funktionsmutation in der bakteriellen Nukleotid-Exzisionsreparatur Uvr (*ada*<sup>(-/-)</sup>/*UvrB*<sup>(-/-)</sup>), führt dies nach einer MNU-Behandlung zu persistierenden O<sup>6</sup>-meG-Schäden in der DNA. Vergleichbare Ergebnisse werden auch in anderen Studien gezeigt (Rossi 1991). In der Arbeit von Nickel (2010) ist dann erstmals ein alternativer Exzisions-Mechanismus für die Entfernung von O<sup>6</sup>-meG-Läsionen aus der DNA von Säugerzellen beschrieben worden, der Komponenten des NER-Systems sowie des FA-Signalweges benützt und parallel zur MGMT-gekoppelten Reparatur abläuft.

### **5.2 O<sup>6</sup>-meG wird in primären Mauszellen über einen MGMT-unabhängigen Reparaturweg entfernt, der Komponenten der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) sowie des Fanconi/BRCA-Signalweges (FA) benötigt**

Als essentielle Faktoren des alternativen Reparaturweges sind aus Untersuchungen an humanen Zelllinien sowie an Primärzellen das XPC-Protein aus dem NER-Weg sowie das FancD2-Protein aus dem FA-Signalweg bestimmt worden (Nickel 2010). In dieser Arbeit wurde nun belegt, dass diese Faktoren auch für die Exzisionsreparatur von O<sup>6</sup>-meG-Läsionen *in vivo* absolut notwendig sind. Zusätzlich wurden weitere NER- und FA-Proteine in die Versuchsansätze aufgenommen, um

den molekularen Mechanismus des alternativen Reparaturmechanismus näher zu charakterisieren. Auch sollte die Frage geklärt, ob der alternative Exzisions-Mechanismus speziell auf O<sup>6</sup>-Alkylierungen zugreift oder ein breiteres Substratspektrum für weitere DNA-Schadenstypen aufweist.

### 5.2.1 Einfluss der NER-Faktoren auf die O<sup>6</sup>-meG-Reparatur in verschiedenen Zell-/Gewebetypen der Maus

Der NER-Weg, als komplexer Reparaturmechanismus, kann durch sein großes Substratspektrum eine Vielzahl unterschiedlicher Schadenstypen erkennen und reparieren. UV-induzierte Cyclobutan-Pyrimidin-Dimere (CPD) und Pyrimidin (6-4) Pyrimidone Addukte (6-4PP) gehören dabei zu den klassischen NER-Substraten. Aber auch Strukturen wie Cisplatin-induzierte 1,2 Pt-[GpG] Intrastrang Verknüpfungen oder sogenannte „*bulky adducts*“, die durch mutagene oder genotoxische Substanzen entstehen, werden von der NER erkannt und entfernt (Hoeijmakers 2001, Gillet und Schärer 2006).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass O<sup>6</sup>-meG-Läsionen über einen NER-ähnlichen Exzisions-Mechanismus *in vivo* entfernt werden können (Kap. 4.1.2). Dabei hatten die beiden untersuchten NER-Faktoren XPC und XPA allerdings eine unterschiedliche funktionelle Bedeutung für die O<sup>6</sup>-meG-Reparatur. Trotz des Verlustes der XPA-Funktion, aber bei aktiver MGMT-Aktivität, lief sowohl in Milzlymphozyten als auch in Nierencortex-Zellen die Reparatur der Addukte vergleichbar effizient ab wie bei NER-profizienten Tieren (Abb. 26 A und 27 A). Auch die zusätzliche Blockierung des MGMT-Proteins führte in XPA<sup>(-/-)</sup>-Zellen lediglich zu einer verlangsamten Schadensreparatur (Abb. 26 B und 27 B).

Somit konnte dem XPA-Protein für die Entfernung von O<sup>6</sup>-meG-Läsionen *in vivo* nur eine eher untergeordnete Rolle zugesprochen werden. Unterstützt werden die Ergebnisse durch die Daten von Nickel (2010), die zeigen, dass ein Verlust des XPA-Proteins in MGMT-blockierten primären Mauslymphozyten die Reparatur von O<sup>6</sup>-meG ebenfalls nur partiell einschränken. Obwohl ein funktionelles XPA-Protein für die Entfernung von kritischen O<sup>6</sup>-G-Methylierungen aus dem Gesamtgenom nicht unbedingt notwendig ist, waren XPA<sup>(-/-)</sup>-Zellen jedoch deutlich empfindlicher gegenüber den zytotoxischen Auswirkungen einer MNU-Behandlung als die

entsprechenden Wildtypzellen (Abb. 34 A). Ähnliche Ergebnisse für ethylierende Agenzien zeigen die Untersuchungen von Bronstein *et al.* (1991). Dabei reagieren humane lymphoblastoide Zellen mit einer XPA-Defizienz deutlich sensitiver gegenüber den biologischen Auswirkungen von Ethylnitroseharnstoff (ENU) als XPA-profiziente Zellen. Gleichzeitig führte in dieser Untersuchung der XPA-Verlust zu einem Ausfall der Reparatur von O<sup>6</sup>-Ethylguanin (Bronstein 1992). Diese Ergebnisse stehen allerdings im Widerspruch zu Daten einer anderen Studie (Maher 1990). Koloniebildungsversuche an humanen NER-profizienten und XPA-defizienten Fibroblasten zeigen in Anwesenheit funktioneller MGMT-Aktivität ein ähnlich gutes Überleben nach Behandlung mit methylierenden oder mit ethylierenden Agenzien. Erst eine reduzierte MGMT-Aktivität verstärkt die Sensitivität gegenüber methylierenden und ethylierenden Agenzien jedoch ohne signifikante Unterschiede zwischen XPA-profizienten und -defizienten Zellen. Diese Ergebnisse wiederum stimmen mit den in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten an hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen überein. Eine Blockierung des MGMT-Proteins verstärkte die Sensitivität gegenüber steigenden MNU-Dosen erheblich (Abb. 34 B). Möglicherweise haben die in Maher (1990) untersuchten MGMT-profizienten Zelllinien, die aus XPA<sup>(-/-)</sup>-Patienten etabliert worden sind, weitere spezielle Eigenschaften, wie beispielsweise einen MMR-Funktionsverlust, durch den ein ähnlich gutes Überleben nach ethylierenden und methylierenden Agenzien erreicht wird.

Da in der Literatur postuliert wird, dass das „klassische“ NER-System auch an der Reparatur von Cisplatin-induzierten Pt-[GpG] Intrastrang Addukten beteiligt ist, wurde die funktionelle Rolle des XPA-Proteins auch in diesem Zusammenhang untersucht (Abb. 33). Dabei zeigten Nierencortex-Zellen bei Wildtypmäusen nach Cisplatin-Exposition zunächst einen Anstieg der Pt-[GpG]-Schäden mit anschließender Reduktion durch den eingeleiteten Reparaturprozess. Ein XPA-Verlust führte auch bei diesem Schadenstyp lediglich zu einer gegenüber den Wildtyptieren verlangsamten Reparaturkinetik (Abb. 33). Dies zeigte, dass ähnlich wie bei den O<sup>6</sup>-meG-Addukten, aber anders als bei UV-Schäden in der DNA (Rademakers 2003), das XPA-Protein auch bei der Reparatur von Platin-Intrastrang-Addukten offenbar nur eine untergeordnete Rolle spielt. Andererseits beschreiben Enoiu *et al.* (2012), dass die Anwesenheit des XPA-Proteins entscheidend für die Entfernung von zytotoxischen Interstrang-„cross-links“ (ICL) ist. Bei der Messung verschiedener

Reparatur-defizienter humaner Fibroblastenlinien zeigt sich ein Ausbleiben der Reparatur von toxischen ICL vor allem bei einem Funktionsverlust von XPA.

Aus der vorhergehenden Arbeit von Nickel (2010) geht hervor, dass das XPC-Protein *in vitro* an DNA-Doppelstrangmoleküle binden kann, die O<sup>6</sup>-meG:C oder O<sup>6</sup>-etG:C-Basenpaare enthalten und an der Exzisionsreparatur dieser Alkylierungsschäden beteiligt ist. Weiter führt nach Nickel (2010) ein Fehlen des XPC-Proteins in humanen Fibroblasten-Zelllinien dazu, dass MNU-induzierte O<sup>6</sup>-meG-Läsionen nicht mehr aus der DNA entfernt werden können.

Das wurde in dieser Arbeit nun auch für primäre Mauszellen *in vivo* bestätigt. Ein XPC-Funktionsverlust bewirkte in Milzlymphozyten sowie in Nierencortex-Zellen einen Ausfall der Exzisionsreparatur von MNU-induzierten O<sup>6</sup>-meG-Schäden und hinterließ einen dauerhaft hohen Adduktspiegel in der DNA, wenn zugleich die endogene MGMT inhibiert wurde (Abb. 23 B und 24 B). Zunächst überraschend zeigten Leberzellen unter diesen Bedingungen jedoch weiterhin eine gewisse Reparaturaktivität für O<sup>6</sup>-meG (Abb. 25 B). Diese Diskrepanz beruht wahrscheinlich auf der außerordentlich hohen MGMT-Expression in Maushepatozyten (Pegg 1978) und der deshalb unvollständigen Inaktivierung des MGMT-Proteins durch den Inhibitor O<sup>6</sup>-BG. Basierend auf den hier erhobenen Daten konnte eindeutig belegt werden, dass XPC auch in primären Mauszellen unter *in vivo*-Bedingungen eine unabdingbare Komponente der Exzisionsreparatur von O<sup>6</sup>-meG ist.

Weiterhin sollte geprüft werden, ob der XPC-abhängige alternative Reparaturweg exklusiv auf methylierte Guanin-Basen zugreift oder möglicherweise auch auf weitere DNA-Schadenstypen. Dazu wurde die Reparatur von Cisplatin-induzierten Pt-[GpG]-Addukten untersucht. Ein XPC-Verlust führte zu einem vollständigen Ausfall der Exzisionsaktivität und einer langanhaltenden Persistenz dieser Schäden (Abb. 33). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Befunden in Tubulusepithelzellen der Niere (Liedert 2006) und in peripheren Nervenzellen (Dzagnidze 2007) von Cisplatin-behandelten Mäusen. An der Reparatur von ICL's ist XPC nach Messungen von Enoiu *et al.* (2012) allerdings nicht beteiligt.

Daneben werden dem XPC-Protein auch die Beteiligung an weiteren Reparaturprozessen zugeschrieben, die möglicherweise unabhängig von der Nukleotidexzision sind (Melis 2011, Cramers 2012). So entwickeln XPC<sup>(-/-)</sup>-Mäuse nach oxidativem Stress häufiger Tumoren als XPA<sup>(-/-)</sup>- oder Wildtypiere. Dies kann eventuell auf einen Verlust der Reparaturkompetenz für ROS-induzierte („reactive

*oxygen species*“) DNA-Schäden wie 8-hydroxguanin zurückzuführen sein (Melis 2011). Des Weiteren reagieren humane XPC<sup>(-/-)</sup>-Fibroblasten im Vergleich zu Wildtypzellen extrem sensitiv auf DNA-oxidierende Agenzien (D’Errico 2006). Das könnte für eine Rolle von XPC auch bei der Basen-Exzisions-Reparatur sprechen, da 8-oxo-Guanin-Schäden in diesen Zellen deutlich schlechter repariert werden (D’Errico 2006).

### **5.2.2 Zur Rolle von Komponenten des Fanconi Anämie/BRCA-Signalweges (FA) bei der Exzisionsreparatur von O<sup>6</sup>-meG**

Beim FA-Signalweg handelt es sich um einen sehr komplexen Mechanismus, der als Zellantwort auf verschiedene Typen von DNA-Schädigungen induziert wird. Belegt ist dies für Strahlen-induzierte Doppelstrangbrüche sowie für Chemikalien-induzierte DNA-Strangverknüpfungen (ICL), die jeweils einen Replikationsstopp hervorrufen. Eine Mutation in einem der bisher 15 bekannten FA-Proteine führt bei primären Zellen von Patienten mit Fanconi Anämie zu einer hohen Empfindlichkeit gegen ICL-induzierende Agenzien wie Mitomycin C, Diepoxybutan oder Cisplatin (Grompe und D’Andrea 2001, Taniguchi 2002/2003, De Winter und Joenje 2009, Ziehe 2012). Eine direkte Beteiligung des Gesamtkomplexes oder einzelner Komponenten an der Entfernung der oben genannten Schäden aus der DNA ist bislang nicht eindeutig belegt (Shen 2009). Gut untersucht ist hingegen die präferentielle Bindung des aktivierten FA-Komplexes an blockierten Replikationsgabeln sowie seine Rolle bei der Stabilisierung der Reparaturmaschinerie am geschädigten Chromatin (Ciccia 2007, Gari 2008, Kim 2008).

Erste Zusammenhänge zwischen der Funktion des FA-Signalweges und der Resistenz gegenüber Alkylanzien stammen aus Daten von Chen *et. al* (2007). Dabei zeigen humane Glioblastomzellen nach reduzierter Expression des FancD2-Proteins eine zweifach höhere zelluläre Sensitivität gegenüber Temozolomid oder BCNU (*bis-chloroethylnitrosourea*). In einem weiteren Versuch führt eine zusätzliche Inhibition der endogenen MGMT bei diesen Zellen sogar zu einer Verstärkung der zytotoxischen Effekte von Temozolomid und BCNU. Eine ähnliche Wirkung konnte zum Teil auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Milzlymphozyten aus FancD2<sup>(-/-)</sup>-Tieren wiesen nach *ex vivo*-Behandlung mit MNU ein deutlich reduziertes Zellüberleben gegenüber entsprechenden Wildtypzellen auf (Abb. 34 A). Eine

vorherige Depletion der endogenen MGMT-Aktivität verstärkte hier zwar den zytotoxischen Effekt von MNU, allerdings bei Wildtyp- und FancD2<sup>(-/-)</sup>-Zellen gleichermaßen stark (Abb. 34 B). Zudem konnte gezeigt werden, dass die hier gesteigerte zelluläre Sensitivität der FancD2-defizienten Zellen mit einer reduzierten bzw. fehlenden Reparaturfähigkeit von O<sup>6</sup>-meG-Schäden einherging (Abb. 29 und 30). In der DNA von Milzlymphozyten und Nieren-Zellen aus MNU-exponierten FancD2<sup>(-/-)</sup>-Tieren fanden sich, im Vergleich zum Wildtyp, bis zu zweifach höhere O<sup>6</sup>-meG-Schadensmengen (Abb. 29 A und 30 A), die bei zusätzlichem Verlust der MGMT-Aktivität dauerhaft in der DNA zurückblieben (Abb. 29 B und 30 B). Weiterhin unterstützt wird dieser Zusammenhang durch Untersuchungen von Kondo *et al.* (2011), die zeigen, dass Mausfibroblasten durch Verlust des FancD2-Proteins extrem gegenüber methylierenden Agenzien sensitiviert werden. Die Reparaturbefunde in dieser Arbeit legen nahe, dass die zuvor gemessene zelluläre Alkylanzien-Sensitivität von FancD2<sup>(-/-)</sup>-Zellen auch auf persistierende O<sup>6</sup>-meG-Addukte zurückzuführen ist.

Ob diese Funktion ausschließlich für das FancD2-Protein zutrifft oder noch andere FA-Proteine von ähnlicher funktioneller Bedeutung für diesen Schadenstyp waren, wurde das FancD2-Homolog Fancl in die Untersuchung einbezogen. Fancl bildet mit FancD2 den ID-Komplex und wird gemeinsam mit FancD2 nach der Aktivierung des FA-Signalweges monoubiquitiniert. Zuvor werden Fancl und FancD2 allerdings unabhängig vom FA-Signalweg von ATR/ATM phosphoryliert, was die Dissoziation vom Fancl- und FancD2-Protein nach der Monoubiquitinierung begünstigt (Taniguchi 2002, Sareen 2012).

In der Literatur wird das Fancl-Protein bislang nicht mit Reparaturprozessen von DNA-Alkylschäden in Verbindung gebracht. In dieser Arbeit wurden humane Fancl<sup>(-/-)</sup>-Fibroblasten sowie deren rekonstituierte Wildtypform auf die Reparaturfähigkeit von O<sup>6</sup>-meG-Läsionen geprüft. Dabei waren Fancl<sup>(-/-)</sup>-Fibroblasten in der Lage, in An- und Abwesenheit von der MGMT, O<sup>6</sup>-meG effizient aus der DNA zu entfernen vergleichsweise zu den rekonstituierten Wildtypzellen (Abb. 32). Dieses Ergebnis legte dar, dass Fancl nicht an der Reparatur von O<sup>6</sup>-meG-Schäden beteiligt ist und somit keine Rolle im alternativen Reparaturweg für O<sup>6</sup>-meG spielt. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass Fancl und FancD2 zwar strukturell sehr ähnlich sind, trotzdem entscheidende Unterschiede in ihrer Funktion aufweisen. So verfügt FancD2 über eine Nukleosom-Bindungsstelle, die wichtig für die Anhaftung an



Chromatin- und Histonstrukturen (H3/H4) ist und eine entscheidende Rolle in der Interstrang-„cross-link“ Reparatur spielt, da Mutationen in dieser Sequenz zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Cisplatin führen (Sato 2012). FancI weist keine solche Sequenz auf, stimuliert aber stattdessen die Monoubiquitinierung von FancD2 und dessen Histon-Bindungsaffinität (Sato 2012a). Möglicherweise ist diese Bindungsstelle notwendig für die Reparatur von O<sup>6</sup>-meG-Schäden.

Neben dem FancI wurden auch andere FA-Proteine auf deren Einfluss an der O<sup>6</sup>-meG-Reparatur untersucht (Nickel 2010). Lymphoblastoide FancA<sup>(-/-)</sup>, FancC<sup>(-/-)</sup> und FancG<sup>(-/-)</sup>-Zellen verfügen nach MNU-Induktion über vergleichbare Reparatoreigenschaften wie die FA-Wildtypzellen, auch wenn die endogene MGMT blockiert ist. Unterstützt werden diese Daten auch von Kondo *et al.* (2011), wonach ein Verlust der FancA- oder FancC-Funktion in murinen Fibroblasten keine signifikanten Unterschiede im Zellüberleben nach Alkylanzien-Gabe zeigt vergleichsweise zu Wildtypzellen. Dies kann auf eine ähnliche Reparaturfähigkeit in diesen Zellen zurückgeführt werden. Aus den hier erhobenen Daten sowie den Erkenntnissen aus der Literatur lässt sich die besondere Stellung von FancD2 für die Reparatur von methylierenden DNA-Schädigungen erkennen, besonders für die Reparatur von kritischen O<sup>6</sup>-meG-Läsionen, in die andere FA-Proteine bislang nicht involviert sind. In welcher Art FancD2 an dem Reparaturprozess von O<sup>6</sup>-meG Läsionen beteiligt ist, konnte nicht geklärt werden.

Es steht jedoch fest, dass von allen bisher untersuchten FA-Proteinen ausschließlich FancD2 für die O<sup>6</sup>-meG-Läsionen aus der DNA unterschiedlicher Zelltypen absolut essentiell ist. Um die funktionelle Bedeutung von FancD2 auch für andere Schadenstypen festzustellen wurde in FancD2-profizienten und -defizienten Zellen die Reparaturfähigkeit von Cisplatin-induzierten Pt-[GpG] Intrastrang-Verknüpfungen bestimmt. Ein FancD2-Knockout zeigte, wie auch schon bei O<sup>6</sup>-meG gesehen, nach Exposition mit dem Zytostatikum Cisplatin zunächst einen schadensinduzierten Anstieg der Pt-[GpG]-Addukte, die allerdings nicht wieder repariert wurden und dauerhaft in der DNA zurückblieben (Abb. 33). Dies zeigte, dass das FancD2-Protein nicht nur für die Reparatur von O<sup>6</sup>-meG-Läsionen, sondern auch an der Entfernung von Pt-[GpG]-Schäden maßgeblich beteiligt ist. Parallel zum XPC-Protein stellt daher auch das FancD2-Protein eine weitere Komponente des alternativen Reparaturweges *in vivo* dar und zeigt eine Verbindung zwischen der NER und dem FA-Signalweg auf.

### **5.3 MNU-induzierte DNA-Schäden haben gravierende Effekte auf hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen *in vivo***

Es ist lange bekannt, dass sich die zytotoxischen Effekte einer Exposition mit methylierenden Agenzien bei Maus und Mensch besonders stark in Zellen des hämatopoetischen Systems ausprägen (Allay 1995, Sakumi 1997, Reese 2001). Zurückgeführt wird dies auf den niedrigen MGMT-Gehalt dieser Zellen und die dadurch bedingte ungenügende Reparatur von kritischen O<sup>6</sup>-meG-Schäden (Gerson 1985/1986, Glassner 1999, Reese 2001, Milsom 2008). Die persistierenden DNA-Schäden in proliferations-aktiven hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen stellen nach dem derzeit akzeptierten Modell in Kombination mit der post-replikativen Aktivität der *Mismatch-Reparatur* auch die Hauptursache für die schwerwiegende Myelosuppression nach Behandlung mit monofunktionellen Alkylanzien dar (Moritz 1995, Karran 2001, Quiros 2010). Sichtbar wird dieser Effekt im peripheren Blut durch eine starke Abnahme der Leukozyten- und Thrombozytenzahl (Davis 2000, Jansen 2002, Sorg 2007).

Auch bei den *in vivo*-Experimenten in dieser Arbeit zeigte sich die myelosuppressive Wirkung bereits eine Woche nach MNU-Behandlung besonders bei Reparaturdefizienten Mäusen anhand einer deutlichen Reduktion der peripheren Leukozyten, wohingegen andere Zelltypen, wie Erythrozyten und Thrombozyten, nicht betroffen waren (Abb. 37). Diese Beobachtungen legen nahe, dass durch MNU vorrangig die Lymphopoese dieser Tiere geschädigt wird und zu einem Verlust lymphatischer Vorläuferzellen führt. Ob und wie schnell der gemessene periphere Zellverlust wieder ausgeglichen werden kann, hängt, wie hier gezeigt, sowohl von der induzierten Schadensmenge als auch von der Reparaturkapazität der hämatopoetischen Zellen ab (Abb. 35).

Eine MNU-Dosis von 15 mg/kg erzeugte in keinem der untersuchten Mausstämme messbare Effekte im peripheren Blut (Abb. 35 A), während eine Dosis von 30 mg/kg bereits bei der Mehrzahl der adulten Mäuse eine myelosuppressive Wirkung induzierte (Abb. 35 B). Aus der Literatur ist bislang nur der Einfluss der MGMT-Aktivität auf die Myelotoxizität durch Alkylanzien bekannt. Die Untersuchungen von Tsuzuki *et al.* (1996) zeigen, dass durch einen homozygoten MGMT-Verlust C57BL/6J-Wildtypmäuse gegenüber MNU stark sensitiviert werden und ihre Überlebenszeit im Vergleich zu MGMT-profizienten Wildtyptieren deutlich verkürzt ist.

Die hämatopoetischen Zellen dieser Tiere sind nicht mehr in der Lage, die MNU-induzierten Schäden hinreichend zu beheben, um eine Erholung der peripheren Leukozyten zu ermöglichen. Diese Befunde bestärken die Annahme, dass die Myelotoxizität im Wesentlichen durch persistierende O<sup>6</sup>-meG-Schäden hervorgerufen wird. In die gleiche Richtung weisen auch die Untersuchungen von Jansen *et al.* (2002) und Sorg *et al.* (2007), bei denen wiederholte Behandlungszyklen mit dem methylierenden Zytostatikum Temozolomid bei C57BL/6J-Mäusen nur dann eine Myelosuppression hervorrufen, wenn gleichzeitig die endogene MGMT durch O<sup>6</sup>-BG inaktiviert ist. Erst durch transgene Expression eines O<sup>6</sup>-BG-resistenten MGMT-Proteins in die Knochenmarkszellen und anschließender Transplantation in letal bestrahlte Rezipienten-Mäuse sind diese vor der myelotoxischen Wirkung von Temozolomid weitgehend geschützt. Diese Ergebnisse unterstreichen eindrücklich die ursächliche Wirkung der O<sup>6</sup>-meG-Addukte und die protektive Rolle der MGMT.

Ausgehend von der Annahme, dass eine durch DNA-Methylierung hervorgerufene Myelotoxizität auch auf nicht-reparierte O<sup>6</sup>-meG-Schäden zurückzuführen ist, wurde in dieser Arbeit erstmals die Rolle einzelner Komponenten des alternativen Reparaturweges unter diesem Aspekt untersucht. Dass diese Faktoren für die Reparatur von O<sup>6</sup>-meG *in vivo* von zentraler Bedeutung sind, wurde schon anhand der durchgeführten Reparaturkinetiken in verschiedenen Zelltypen belegt (Abb. 23/24 B und 29/30 B). Bei funktioneller Anwesenheit beider Reparatursysteme und effizienter Entfernung der O<sup>6</sup>-meG-Schäden zeigten MNU-exponierte Wildtypiere keine myeloablativen Auswirkungen im peripheren Blut (Abb. 37 A). Erst ein Verlust der MGMT-Aktivität sensitivierte diese Mäuse gegenüber den zytotoxischen Effekten von MNU und führte zu einer leichten Myelosuppression (Abb. 37 B).

Auf dem Hintergrund einer XPC- oder FancD2-Defizienz verursachte die MNU-Behandlung eine deutliche Toxizität im hämatopoetischen System, die zu einer starken Reduktion der peripheren Leukozyten führte (Abb. 37 A). Interessanterweise verstärkte eine zusätzliche Depletion der MGMT diesen Effekt nicht (Abb. 37 B). Die größten zellulären Auswirkungen fanden jedoch bei den MNU-exponierten XPA<sup>(-/-)</sup>-Tieren statt. In Anwesenheit von MGMT hatte der Verlust der XPA-Funktion zunächst nur leichte myeloablativ Effekte von MNU zur Folge, die sich aber bei Inhibition der endogenen MGMT-Aktivität drastisch verstärkten und zu einem lang anhaltenden Mangel an peripheren Leukozyten führte. Demgegenüber normalisierte sich dieser

Parameter bei XPC<sup>(-/-)</sup>- und FancD2<sup>(-/-)</sup>-Tieren selbst bei MGMT-Inhibition vergleichsweise schnell (Abb. 37).

Basierend auf den hier erhobenen Daten konnte erstmals gezeigt werden, dass parallel zur MGMT auch die Funktionalität des Exzisions-Reparaturweges *in vivo* zum effizienten Schutz vor den zytotoxischen Wirkungen einer DNA-Methylierung beiträgt. Dies geht über die in der Literatur beschriebenen Erkenntnisse hinaus, die bislang lediglich der MGMT eine chemoprotektive Rolle bei Methylierungsschäden zusprechen (Dumenco 1993, Shiraishi 2000). Einen besonderen Stellenwert in dieser Untersuchung besaß das XPA-Protein. Obgleich ein Ausfall des XPA-Proteins die Exzisions-Reparatur von O<sup>6</sup>-meG-Schäden im Gesamtgenom nur mäßig verlangsamte, hatte ein kombinierter Verlust des XPA- und MGMT-Proteins eine extreme Zunahme der MNU-induzierten Hämatotoxizität zur Folge. Dies war wegen der ohnehin geringen MGMT-Aktivität von Stamm- und Vorläuferzellen besonders bemerkenswert.

Eine mögliche Erklärung für die Sonderrolle des XPA-Proteins in diesem Zusammenhang könnte seine duale Funktion sowohl in der Gesamt-genomischen wie in der Transkriptions-gekoppelten Reparatur (TC-NER) liefern (siehe Einleitung). Das Funktionsmodell des hocheffizienten TC-NER-Weges ist zwar ursprünglich für UV-induzierte DNA-Schäden etabliert, aus Reparaturmessungen an ENU-exponierten Ratten ergeben sich jedoch klare Hinweise auf eine solche präferentielle Schadensentfernung aus aktiven Genen auch für O<sup>6</sup>-Ethylguanin (Engelbergs 1998). Werden diese geschädigten Genabschnitte dann transkribiert, fügt die RNA-Polymerase II durch zusätzlichen Ausfall der Transkriptions-gekoppelten Reparatur (XPA<sup>(-/-)</sup>) während des Transkriptionsprozesses ein Uridin gegenüber eines nicht-reparierten O<sup>6</sup>-meG-Schadens ein. Dieser falsche Einbau im mRNA Transkript erzeugt eine Veränderung der Aminosäureabfolge und somit der Protein-Funktion. Diese können dann mitunter auch zytotoxisch für die Zelle werden (Burns 2010).

Eine weitere Möglichkeit für die zytotoxischen Ereignisse besteht in dem post-replikativen Einsatz der *Mismatch-Reparatur* bei bestehenden O<sup>6</sup>-meG-Schäden in der DNA. Dabei sitzt der *Mismatch*-Komplex an der Stelle einer O<sup>6</sup>-meG:T Basenfehlpaarung und kann durch *futile repair cycles* Lücken bzw. Strangbrüche in der DNA hinterlassen, die nach einer weiteren Replikation toxische Doppelstrangbrüche zur Folge haben (Duckett 1996, Roos 2004). Außerdem kann durch den wiederholten Reparaturprozess der Zugang für die RNA Polymerase II zur

DNA verhindert werden, wodurch die Transkription blockiert oder gar gehemmt wird. Für die Tumorthherapie könnten diese Ergebnisse einen zusätzlichen interessanten Ansatzpunkt bieten, da das hämatopoetische System immer noch als Dosis-limitierender Faktor während der Alkylanzien-Therapie gilt (Moritz 1995). In zahlreichen Studien wird über retroviralen Gentransfer (Überexpression des MGMT-Proteins) bzw. O<sup>6</sup>-BG-resistente Zellen versucht körpereigene Knochenmarkzellen für die Tumorthherapie mit Alkylanzien zu stärken, um einem besseren Angriffspunkt bei der Bekämpfung von Tumorzellen durch höhere Behandlungsdosen zu erzielen (Milsom 2008, Adair 2012). Im Bezug auf die neu gewonnenen Ergebnisse in dieser Arbeit könnte aber auch der Status des XPC-, FancD2- oder XPA-Proteins in Tumorzellen Aufschluss über deren Reparatureigenschaften geben und Möglichkeiten für neue Therapieansätze schaffen.

### **5.4 Eine reduzierte Reparaturkapazität für O<sup>6</sup>-meG erhöht die Tumorzinzidenz im hämatopoetischen System MNU-behandelter Mäuse**

Das Auftreten von Tumoren ist eng mit einer hohen Proliferationsrate in bestimmten Gewebetypen verknüpft, da proliferierende Zellen besonders anfällig für die Entstehung von Mutationen sind (Cohen und Ellwein 1990). Die Ursache hierfür liegt einerseits in der „spontanen“ Fehlerrate der DNA-Polymerase während der Replikation, andererseits in der vergleichsweise kurzen Zeitspanne, die für eine rechtzeitige Reparatur von induzierten DNA-Modifikationen zur Verfügung steht. In beiden Fällen nehmen mutagene Ereignisse stark zu, die unter anderem zur malignen Transformation einzelner Zellen führen können. Methylierende Agenzien wie MNU verstärken diesen Effekt erheblich, da insbesondere den O<sup>6</sup>-meG-Läsionen aufgrund ihrer Fehlpaarungseigenschaft ein hohes mutagenes und karzinogenes Potential zugesprochen wird (Margison 2002, Kaina 2007). Werden diese Addukte nicht rechtzeitig aus der DNA entfernt, können resultierende G:C->A:T Mutationen zum Beispiel in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen zu einem erhöhten Tumorrisiko beitragen (Dumenco 1993).

Einen ersten direkten Zusammenhang zwischen der Exposition mit methylierenden Agenzien und der Entstehung von Tumoren zeigt die Arbeit von Fong *et al.* (1990). In dieser Studie entwickeln Ratten nach Behandlung mit dem methylierenden Krebsmedikament Procarbazin vermehrt Mammakarzinome, die auch auf nicht-

reparierte O<sup>6</sup>-meG-Läsionen zurückzuführen sind. Auch andere Untersuchungen bringen die Entstehung von Tumoren in Zusammenhang mit persistierenden O<sup>6</sup>-meG-Läsionen (Iwakuma 1997, Sakumi 1997). Die meisten Versuche basieren dabei auf dem Vergleich von MGMT-profizienten und -defizienten Mäusen, da dieses Protein präferenziell Alkylierungen an der O<sup>6</sup>-Position des Guanins entfernt. Tatsächlich steigt nach einer Behandlung mit alkylierenden Substanzen die Tumorzinzidenz nur bei den MGMT-defizienten Tieren stark an, während bei funktioneller MGMT Tumoren verhindert werden. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden welche Rolle neben der MGMT auch die Komponenten des alternativen Reparaturweges bei der MNU-induzierten Karzinogenese spielen. Es konnte hier gezeigt werden, dass Wildtypmäuse mit funktioneller Reparaturfähigkeit bei der eingesetzten MNU-Dosis innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 200 Tagen keine Tumoren aufwiesen und dass nach pharmakologischer Inhibierung des MGMT-Proteins während der Behandlung lediglich ein Tier erkrankte (Abb. 39 und 40). Dieses Ergebnis bestätigt Befunde von Dumenco *et al.* (1993), die der MGMT eine Schutzfunktion bei der MNU-induzierten Tumorgenese zuschreiben.

Demgegenüber führte ein Ausfall der XPC- oder FancD2-Funktion zu einer deutlich erhöhten Rate von Lymphomen nach MNU-Exposition, unabhängig vom jeweiligen MGMT-Status. Dies unterstreicht die wichtige Rolle der Exzisionsreparatur für eine karzinogene Wirkung von MNU bei diesen Tieren. Zudem verkürzte der Verlust des XPC- oder FancD2-Proteins die Latenzzeit für das Auftreten der ersten Tumore auf 90 Tage. Trotz des partiellen Ausfalls der O<sup>6</sup>-meG-Exzision aus der genomischen DNA fand sich der stärkste karzinogene Effekt einer MNU-Exposition in der Gruppe der XPA<sup>(-/-)</sup>-Tiere. Ähnlich wie bei der Myelotoxizität hatte ein Verlust der XPA-Funktion bei aktiver MGMT zunächst keinen signifikanten Effekt auf die Karzinogenese, da alle behandelten Tiere die Beobachtungszeit tumorfrei überlebten (Abb. 39). Bei zusätzlicher Blockierung der MGMT-Funktion fanden sich jedoch bei allen MNU-exponierten XPA<sup>(-/-)</sup>-Tieren T-Zell Lymphome und die Latenzzeit bis zum ersten Auftreten eines Tumors war mit 70 Tagen im Vergleich zu XPC<sup>(-/-)</sup>- und FancD2<sup>(-/-)</sup>-Tieren weiter verkürzt. Dieser Befund war zunächst überraschend angesichts der deutlich schwächeren Auswirkung einer XPA-Defizienz auf die Exzisionsreparatur von O<sup>6</sup>-meG in hämatopoetischen Zellen (Abb. 26).

Eine mögliche Erklärung ergibt sich aus der Analogie zur NER-vermittelten Reparatur von UV-Schäden. Hier führt ein Funktionsverlust von XPA, im Gegensatz zu XPC,

zum Ausfall nicht nur der globalen genomischen Reparatur (GG-NER) sondern auch der sehr effizienten Reparatur transkribierter Gensequenzen (TC-NER). Möglicherweise gilt ähnliches auch für die Exzisionsreparatur von O<sup>6</sup>-Alkylresten am Guanin, wie Untersuchungen von Engelbergs *et al.* (1998) am Brustdrüsenepithel der Ratte nahelegen. Demnach werden nach kombiniertem Ausfall von TC-NER und MGMT-Aktivität O<sup>6</sup>-Methylierungen nicht mehr hinreichend schnell aus den kodierenden Sequenzen aktiver Gene entfernt und führen dann im nächsten Replikationsschritt zu fixierten Mutationen, die ein weitaus größeres Risikopotential für die Tumorentstehung darstellen, als Sequenzveränderungen in „stillen“ Genen oder nicht-kodierenden Bereichen der DNA. Offenbar reicht aber die Funktionalität eines der beiden Reparatursysteme, TC-NER oder MGMT, aus, um diese kritischen DNA-Abschnitte hinreichend zu schützen und eine maligne Transformation einzelner hämatopoetischer Zellen weitgehend zu verhindern.

In diesem Zusammenhang wird über sogenannte „Hotspots“ in der DNA diskutiert, in denen vorwiegend O<sup>6</sup>-meG- bzw. O<sup>6</sup>-etG-Läsionen nach MNU- oder ENU-Exposition spezielle Mutationstypen herbeiführen (Engelbergs 2000). Ein bekanntes Beispiel ist die Punktmutation in den Proto-Onkogenen Ha-ras bzw. K-ras (Codon 12: GGA→GAA) (Esteller 2000, Rajewsky 2000), durch die das Signalprotein RAS dauerhaft aktiviert bleibt und Zellzyklus-stimulierende Transkriptionsprozesse induziert. Aber auch der Status der MMR-Proteine könnte einen Einfluss auf die Karzinogenese haben (Kawate 1998, Qin 1999). Da das Eingreifen der MMR auf die post-replikative O<sup>6</sup>-meG:T Situation zugreift und für die zytotoxischen Eigenschaften von O<sup>6</sup>-meG-Läsionen verantwortlich gemacht wird, führt ein Verlust dieses Reparaturmechanismus zu einer zellulären Toleranz gegenüber nicht-reparierten O<sup>6</sup>-meG-Schäden. Diese können im Zusammenhang mit einer zusätzlichen Blockierung des Reparaturproteins MGMT in MNU-exponierten Mäusen vermehrt persistierende O<sup>6</sup>-meG-Läsionen in der DNA zurücklassen und durch sekundäre Mutationen die Tumorzinzidenz steigern (Kawate 1998).

Ein weiterer wichtiger Aspekt der vorliegenden Untersuchung war die Beobachtung, dass durch die MNU-Behandlung bei den Mäusen vorwiegend Thymome (Abb. 45), aber auch ein Milztumor (Abb. 46) sowie eine Leukämie (Abb. 43) induziert wurden. Ähnliches findet sich auch bei Dumenco *et al.* (1993), die bei Mäusen nach MNU ebenfalls in der Hauptursache Thymome diagnostizierten. Dabei

führt eine Überexpression von transgener humaner MGMT in Thymuszellen jedoch zu einem effektiven Schutz vor der Karzinogenese in diesem Gewebe.

Anhand der in dieser Arbeit histologisch bestimmten Tumortypen sowie den durchflußzytometrischen Analysen (FACS) von Knochenmark- und Milzzellen der MNU-behandelten Mäuse konnten weiterführend Rückschlüsse auf die betroffene Zell-Lineage gezogen werden. Die FACS-Daten der untersuchten Knochenmarkzellen zeigten bei krankheitsbedingten Auffälligkeiten der Mäuse den pathologischen Befund reifer, CD4- oder CD8-positiver T-Zellen an. Im Fall der leukämischen Maus wurden allerdings ausschließlich CD4/CD8 doppelt positive T-Zellen nachgewiesen. Für den B-Zellmarker B220 waren alle untersuchten Zellproben negativ (Abb. 41). Dies deutet darauf hin, dass, ähnlich wie bei der Myelotoxizität, bei Abwesenheit essentieller Reparaturkomponenten die lymphatischen Vorläuferzellen hochempfindlich für die MNU-induzierte Karzinogenese sind.

### **5.5 MNU-behandelte Mäuse weisen eine stark erhöhte Mutationsrate in ihren hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen auf**

Ein geeignetes Modell zur Bestimmung von Mutationsraten im lebenden Organismus stellt das *lacZ*-transgene Mausmodell dar (Boerrigter 1995). Optimiert wurde das Verfahren inzwischen für die Analyse der Mutationsfrequenz in primären hämatopoetischen Zellen aus dem Knochenmark (Geiger 2009). Da das bakterielle *lacZ*-Gen als nicht-transkribierte Sequenz im Mausgenom integriert vorliegt, spiegelt es als Indikatorgen vorrangig die Aktivität der Gesamt-genomischen Reparatur (GG-NER) wider. Da besonders das hämatopoetische System sehr empfindlich auf methylierende Agenzien reagiert (Kap. 5.3), wurde das *lacZ*-Mausmodell in dieser Arbeit für die Ermittlung von MNU-induzierten Mutationsraten in der Maus unter Beachtung der speziellen Reparaturkomponenten genutzt. Ausgehend von den Ergebnissen zur Tumorbildung (Kap 5.4) ist zu vermuten, dass durch den Ausfall einzelner Reparaturkomponenten, die für die Entfernung von O<sup>6</sup>-meG-Läsionen wichtig sind, auch erhöhte Mutationsraten nach MNU-Exposition gemessen werden. Die Bestimmung der basalen Mutationsfrequenz im *lacZ*-Gen aus Knochenmarkzellen zeigte zunächst keinen Unterschied zwischen den drei



untersuchten Mauslinien. Sowohl bei LacZ<sup>(+)</sup>/Wildtyp- als auch LacZ<sup>(+)</sup>/XPC<sup>(-/-)</sup>- und LacZ<sup>(+)</sup>/XPA<sup>(-/-)</sup>-Tieren wurde im Indikatorgen eine basale Mutationsfrequenz von  $1 \times 10^{-4}$  gemessen (Abb. 47). Das entspricht einer Häufigkeit von einer Funktionsverlust-Mutation in „single copy“-Genen pro  $10^5$  diploiden Zellen. Vergleichbare Werte werden auch in Untersuchungen von Geiger *et al.* (2006) in Knochenmarkzellen von LacZ<sup>(+)</sup>/C57BL/6J-Mäusen ermittelt. Zusätzlich zeigen Daten von Boerrigter *et al.* (1995) und Vijg *et al.* (1997), dass spontan entstehende Mutationen in allen Zell- und Gewebetypen von Mäusen gleichhäufig auftreten. Die dort in Milzzellen von LacZ<sup>(+)</sup>/C57BL/6J oder LacZ<sup>(+)</sup>/BALB/C-Mäusen gemessene Frequenz von 0,8 bzw.  $0,5 \times 10^{-4}$  ist sehr ähnlich zu den Werten in den hier untersuchten Knochenmarkzellen.

Die basale Mutationsrate in somatischen Zellen beruht vermutlich vorwiegend auf Replikationsfehlern der DNA-Polymerase I, die der *Mismatch-Reparatur* entgehen sowie auf endogen induzierten DNA-Schäden, die nicht rechtzeitig vor der Replikation beseitigt werden können. Unerwartet in dieser Arbeit war, dass ein Verlust der XPC-Funktion keine Erhöhung der basalen Mutationsrate bewirkte, obwohl das *lacZ*-Gen eine Zielsequenz der GG-NER darstellt. Hingegen ist plausibel, dass ein Ausfall des XPA-Proteins keine erhöhte Mutationsrate im Vergleich zu Wildtypzellen induzierte, da auch ohne funktionelles XPA eine nennenswerte Restaktivität an O<sup>6</sup>-meG-Exzisionsreparatur im Gesamtgenom verbleibt (Abb. 26 und 27) und die Transkriptions-gekoppelte Reparatur für das *lacZ*-Gen keine Rolle spielt. Die Ähnlichkeit der Spontanmutationsraten in den drei Mausstämmen könnte mit der Reparaturfunktion des MGMT-Proteins in den Knochenmarkzellen dieser Tieren zusammenhängen, die den Verlust des XPC- und XPA-Proteins eventuell ausgleichen kann. Partiiell bestätigt wurde diese Vermutung durch die Messung bei den Mäusen mit kurzzeitiger MGMT-Inhibition, die einen leichten, allerdings nicht signifikanten Anstieg der basalen Mutationsrate in Wildtyp- und NER<sup>(-/-)</sup>-Tieren zeigte (Abb. 47). Dieses Ergebnis war plausibel, da die DNA für die Mutationsanalyse aus allen Zellen des Knochenmarks isoliert wurde, zum MGMT-abhängigen Teil aber nur die relative Zellfraktion beitragen kann, die während der vergleichsweise kurzen Inhibitionsphase von maximal 24 Stunden durch die Replikation gegangen war und danach nicht der Apoptose unterlag.

Im Gegensatz zu den Spontanraten induzierte die Behandlung mit MNU eine 10-fach höhere Mutationsfrequenz bei LacZ<sup>(+)</sup>/Wildtyp- und LacZ<sup>(+)</sup>/NER<sup>(-/-)</sup>-Tieren (Abb. 48).

Dies zeigte die starke mutagene Wirkung von MNU, die auch in anderen Untersuchungen bestätigt wurde (Boerrigter 1995, Vijg 1997, Geiger 2006). Mit Hilfe von Sequenzanalysen konnten zudem die Mutationstypen bestimmt werden, die durch die einmalige MNU-Behandlung induziert wurden (Tab. 11). Über 90 % der ermittelten Mutationen stellten dabei Punktmutationen dar, von denen etwa die Hälfte aus O<sup>6</sup>-meG:C→A:T Transitionen entstanden (Tab. 12 und Tab. 13).

Übereinstimmende Ergebnisse belegen auch die Untersuchungen von Gossen *et al.* (1989) nach Behandlung mit ethylierenden Agenzien. Es gab in den hier erhobenen Daten jedoch keine signifikanten Unterschiede, sowohl in der MNU-induzierten Gesamtmutationsfrequenz als auch in den speziell von O<sup>6</sup>-meG abstammenden G:C→A:T Mutationen zwischen Reparatur-profizienten und NER<sup>(-/-)</sup>-Tieren. Daher konnte eine konkrete Aussage über die Exzisionsreparatur als spezifischer Schutzmechanismus vor mutagenen O<sup>6</sup>-meG-Läsionen in diesem Versuch nicht eindeutig getroffen werden. Generell stammten von allen gemessenen Mutationstypen in den Knochenmarkzellen der untersuchten Mauslinien ca. 50 % von O<sup>6</sup>-meG ab, wobei tendenziell mehr O<sup>6</sup>-meG-vermittelte Punktmutationen nach Verlust der MGMT-Aktivität (39 %) oder den Ausfall der NER-Funktion auftraten (31 %), als in Anwesenheit aktiver DNA-Reparaturfähigkeit (15 bzw. 23 %) (Tab. 13).

Eine mögliche Erklärung für die geringen Frequenzunterschiede könnte die limitierte Probenzahl sein, da im Rahmen dieser Arbeit pro Mausstamm nur wenige LacZ-Funktionsmutanten erfolgreich sequenziert werden konnten. Außerdem könnte eine vollständige Sequenzierung des Indikatorgens weitere Loci mit potentiell durch O<sup>6</sup>-meG-induzierten Mutationen aufzeigen. Da dies jedoch aufgrund der geringen Probenausbeute sowie des limitierten Sequenziererfolges nur begrenzt möglich war, wurden zunächst lediglich die ersten 1200 Basenpaare des *lacZ*-Gens (Gesamtgröße: 4200 Basenpaare) überprüft. Dabei fand sich die Mehrzahl (acht von 13) der Punktmutationen am Sequenzanfang des Indikatorgens. Darunter waren jedoch drei Aminosäuresequenz-neutrale („stille“) Mutationen (Tab. 12). Deshalb bleibt unklar, ob die gefundenen Sequenzänderungen einen repräsentativen Überblick über das induzierte Mutationsspektrum darstellten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Exposition mit MNU die Mutationsrate in Wildtyp- sowie NER<sup>(-/-)</sup>-Mäusen stark erhöht und tendenziell mehr G:C→A:T Mutationen induziert. Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass persistierende O<sup>6</sup>-meG-Läsionen hauptsächlich für die mutagene und karzinogene Wirkung von

methylierenden Agenzien wie MNU verantwortlich sind. Ein harter kausaler Nachweis für den direkten Zusammenhang zwischen Mutationsinduktion durch O<sup>6</sup>-meG und der malignen Transformation von Stamm- und Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems steht jedoch noch aus. Die Analyse von einschlägig mutierten Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen in den induzierten Lymphomen könnte diese Kausalkette weiter verstärken.

### **5.6 Andere Proteinkomponenten, die an der Prozessierung von O<sup>6</sup>-meG-Addukten beteiligt sind**

Welch hohen Stellenwert die Reparatur von O<sup>6</sup>-meG-Schäden auf das Zellüberleben und die Genomstabilität hat, zeigt die umfangreiche Beteiligung unterschiedlicher Reparatursysteme. Dabei schützt neben der MGMT auch der Exzisions-Reparaturweg vor den zytotoxischen (Kap. 5.4) und karzinogenen Auswirkungen (Kap. 5.5) von Guanin-O<sup>6</sup>-Alkylierungen. Demgegenüber steht die Beteiligung der MMR, die zusammen mit der homologen Rekombination Reparatur ebenfalls an der Prozessierung dieses Schadenstyps mitwirkt. Neben den hier beschriebenen Reparaturfaktoren kommen aber noch weitere Proteine in Betracht, die direkt oder indirekt an der O<sup>6</sup>-meG-Reparatur beteiligt sein können.

Ein erster interessanter Faktor wurde im prokaryotischen System entdeckt. Dort gibt es neben der bakteriellen Methyltransferase (AGT) sogenannte *Alkyltransferase like proteins* (ATLs). Diese sind in der Lage an O<sup>6</sup>-meG-haltige Sequenzen in der DNA-Struktur zu binden (Pegg 2011). Anders als die bakterielle AGT können die Schäden jedoch nicht repariert werden, da im aktiven Zentrum der ATLs ein Tryptophan anstelle eines Cystein-Akzeptormoleküls vorkommt. Durch die stabile Bindung des ATL-Komplexes an der Schadensstelle wird die DNA-Helix strukturell so verändert, dass ein Zugang für NER-Komponenten zur Schadensstelle gewährleistet wird (Pearson 2006, Tubbs 2009). Tatsächlich ist durch Protein-Protein Bindungsanalysen eine Interaktion der bakteriellen Uvr-Faktoren (NER-System) und ATL festgestellt worden (Tubbs 2009, Mazon 2009). Für die Reparatur von O<sup>6</sup>-Methyladdukten in Säugerzellen spielen die ATLs vermutlich keine Rolle, da sie bislang nur in Prokaryoten und Hefen nachgewiesen worden sind (Mazon 2009, Onodera 2011).

Komplementär zu den ATLS in Prokaryoten können die *DNA damage binding proteins* (DDB) in Säugerzellen für die initialen Reparaturschritte der NER sorgen. Sie besitzen eine hohe Affinität für UV-induzierte DNA-Schäden und stellen damit die ersten Komponenten des GG-NER-Weges dar. Durch Ubiquitinierung des XPC-Proteins durch DDB wird dessen DNA-Bindungsaktivität verstärkt und der NER-Komplex zur Schadensstelle rekrutiert (Sugasawa 2005, Takedachi 2010). Ein Verlust der DDB-Proteine führt zu einer verringerten Rekrutierung des XPC-Proteins zur geschädigten DNA-Stelle (Wang 2004, Alekseev 2008). Das XPC-Protein kann jedoch auch unabhängig von DDB geschädigte DNA-Strukturen binden und die GG-NER einleiten (Hoogstraaten 2008). Daher sind die DDB-Proteine wahrscheinlich nur indirekt an der Reparatur von O<sup>6</sup>-meG-Addukten beteiligt.

In eine andere Richtung geht die Studie von Komori *et al.* (2009). Nach heutigem Wissenstand beruht das zytotoxische Potential von O<sup>6</sup>-meG-Läsionen vorwiegend auf den post-replikativen Reparaturversuchen durch die *Mismatch-Reparatur* (*futile repair cycles*). Dieses Modell schlägt vor, dass entweder die Bindung des MMR-Komplexes an O<sup>6</sup>-meG:T Basenfehlpaare ein Signal für die Apoptose darstellt oder dass die wiederholte Generierung von Einzelstrangbrüchen beim Reparaturversuch zum Tod der Zelle führt (Fishel 1998, Karran 2001). Bislang ist jedoch kein direkter Nachweis einer Apoptoseinduktion durch die MMR-Aktivität erbracht worden (Meikrantz 1998). In der Arbeit von Komori *et al.* (2009) wird erstmals eine Funktionsmutation in dem bis dahin unbekanntem Protein MAPO1 (*O<sup>6</sup>-methylguanine-induced apoptosis 1*) identifiziert, das Säugerzellen trotz MGMT-Defizienz und funktioneller *Mismatch-Reparatur* resistent gegenüber der zytotoxischen Wirkung von MNU macht. Weiterhin führte eine MAPO1-Defizienz bei MNU-exponierten Fibroblasten zu einer deutlich abgeschwächten Caspase 3-Aktivität und einer verringerten Depolarisation der mitochondrialen Membran. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass MAPO1 in wichtigen Schritten der Signaltransduktion des Apoptoseweges involviert ist, die durch persistierende O<sup>6</sup>-meG-Addukte induziert wird. Ob MAPO1 durch die MMR-Proteine aktiviert oder reguliert wird, konnte in der Arbeit nicht eindeutig festgestellt werden (Komori 2009).

Neben den hier untersuchten und diskutierten Faktoren haben möglicherweise noch weitere Proteine einen direkten oder indirekten Einfluss auf die Reparatur von O<sup>6</sup>-meG. Aufgrund der Komplexität der verschiedenen Reparatursysteme und ihrer molekularen Interaktion innerhalb des zellulären „*DNA damage response*“-Netzwerks

ist es jedoch experimentell sehr aufwendig einzelne Komponenten sicher zu identifizieren.

### 5.7 NER und Chromatin-modulierende Faktoren

Die Effektivität zur Entfernung von DNA-Alkylierungsschäden wird in den meisten Studien der Aktivität bestimmter Reparatursysteme zugeschrieben. Dabei wurde lange nicht in Betracht gezogen, dass schon auf Chromatin-Ebene bestimmte regulatorische Prozesse erst die Möglichkeit schaffen, eine effiziente Reparatur solcher Schäden zu ermöglichen. Vermutlich kommt es nach einer Schadensinduktion im kondensierten Chromatin zu einer Interaktion vieler Effektorproteine, die durch post-translationale Modifikationen und andere Regulationsprozesse die Chromatinstruktur auflockern.

Die Dekondensierung im Bereich des DNA-Schadens ist wahrscheinlich die Voraussetzung für eine bessere Zugänglichkeit bestimmter Reparaturproteine, zum Beispiel für das NER-System (Solimando 2008). Diese Untersuchungen ergeben, dass das XPC-Protein zwar in der Lage ist, spezifisch DNA-Schäden in kompakten Chromatinstrukturen zu erkennen und zu binden, andere NER-Komponenten wie das XPA-Protein hingegen nicht. Eine Rekrutierung des Prä-Inzisionskomplexes der NER findet nur im dekondensierteren Perichromatin (Interphasechromatin) statt (Solimando 2008). Offensichtlich wird nach der Schadendetektion durch das XPC-Protein die Chromatinstruktur so verändert, dass der relativ große NER-Komplex im Perichromatin an der Schadensstelle gebunden werden kann. An diesem Prozess sind sogenannte „*chromatin remodeling proteins*“ maßgeblich beteiligt. Ein wichtiges Bindeglied zwischen Chromatinfaktoren und effizienter DNA-Reparatur stellt die Chromatin-assoziierte Poly-(ADP-ribose) Polymerase 1 (PARP1) dar. PARP1 verfügt über eine Bindungsdomäne mit Präferenz für Einzelstrangbrüche in der DNA. Durch Poly-(ADP-ribosy-)lierung werden dann verschiedene Akzeptorproteine katalysiert, die in der Chromatinarchitektur (Histone, *High mobility group proteins*), Replikationsprozessen oder der DNA-Reparatur (XRCC1) involviert sind (Caldecott 1996, D'Amours 1999, Bouchard 2003, Heale 2006).

Ob dieser Prozess auch durch O<sup>6</sup>-meG-Läsionen aktiviert wird, ist bisher unklar. Erste Hinweise dafür gehen aus der Arbeit von Menissier de Murcia *et al.* (1997) hervor. Diese Studie zeigt, dass PARP1<sup>(-/-)</sup>-Mäuse und PARP-1-defiziente MEF's im

Gegensatz zum Wildtyp extrem sensitiv auf methylierende Agenzien wie MNU reagieren (Menissier de Murcia 1997, Trucco 1998). Neue Studien deuten zudem an, dass PARP1 mit dem XPC-Protein kooperiert (Pines 2012). XPC besitzt eine potentielle PAR-Bindungsstelle (Gagne 2008) und wird nach UV-Schadensinduktion von PARP1 modifiziert. PARP1 aktiviert zudem weitere „*chromatin remodeling proteins*“ wie ALC1 (*Amplified in Liver Cancer 1*) oder auch das DDB2-Protein, die das Aktivierungspotential der NER-Komponenten fördern. Auch kann PARP1 direkt das XPC-Protein (post-translational) modifizieren und dadurch dessen Reparaturkapazität optimieren (Pines 2012).

Diese Ergebnisse können einen wichtigen Ansatzpunkt für die Tumorthherapie von alkylierenden Chemotherapeutika geben. Neu entwickelte PARP-Inhibitoren zeigen in humanen Fibroblasten nach UV-Bestrahlung eine verminderte Rekrutierung von XPC zur Schadensstelle (Luijsterburg 2012). Auch nach einer Behandlung mit dem methylierenden Zytostatikum Temzolomid (TMZ) werden Glioblastomzellen durch eine zusätzliche PARP-Inhibition deutlich sensitiviert (Sarkaria 2008). Trotz dieses Erfolges bei verschiedenen Zelllinien zeigt sich aber, dass PARP-Inhibitoren in Kombination mit einer TMZ-basierten Therapie bei Melanom-Patienten die toxischen Nebenwirkungen im Knochenmark (Myelosuppression) deutlich verstärken (Plummer 2005). Wie in Kap. 5.4 beschrieben verfügen Stamm- und Vorläuferzellen des hämatopoetischen Systems nur über eine geringe MGMT-Aktivität und demnach nur über eine limitierte Kapazität zur Reparatur TMZ-induzierter O<sup>6</sup>-meG-Läsionen. Ausgehend von den aktuellen Daten über die Interaktion von PARP und XPC kann nun geschlossen werden, dass die verstärkte Myelosuppression bei den Patienten auf einer zusätzlich reduzierten Exzisionsreparatur der O<sup>6</sup>-meG-Läsionen beruht.

Eine attraktive Strategie, die Myelosuppression bei TMZ-behandelten Patienten zu verringern und gleichzeitig die Antitumorwirkung des Zytostatikums zu erhöhen, stellt ein retroviraler Gentransfer einer O<sup>6</sup>-BG-resistenten MGMT-Mutante in die hämatopoetischen Stammzellen dieser Patienten dar. Bei einer Kombinationstherapie mit TMZ plus O<sup>6</sup>-BG sollte dann das blutbildende System durch die transgene MGMT effizient geschützt sein, während die Tumorzellen durch die Inaktivierung der endogenen MGMT stark sensitiviert werden. Dieses Konzept wurde, nach intensiven Vorstudien im Maussystem, erstmals erfolgreich in der Klinik durchgeführt (Milsom 2008, Adair 2012). Zusätzlich kann gezeigt werden, dass humane Kolon-Adenokarzinomzellen, die einen Defekt in der *Mismatch-Reparatur*

vorweisen, durch die Behandlung mit einem PARP-Inhibitor gegenüber TMZ stärker sensitiviert werden als vergleichbare MMR-profiziente Zellen (Curtin 2004).

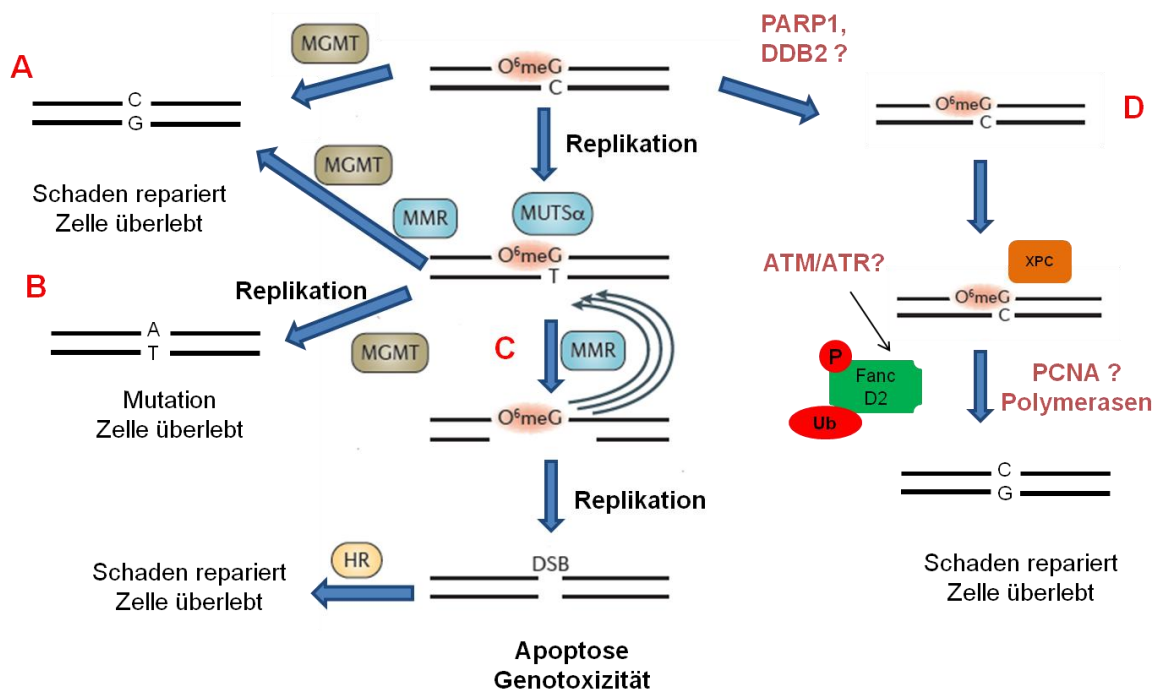
Dies könnte ein interessanter therapeutischer Ansatz bei MMR-defizienten Tumoren wie Kolonkarzinom oder Glioblastom sein, da die hämatopoetischen Zellen dieser Patienten mit funktionsfähiger *Mismatch-Reparatur* besser geschützt sind (Curtin 2004, Sarkaria 2008).

### 5.8 Fazit und Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass O<sup>6</sup>-meG-Addukte neben der direkten Demethylierung durch das MGMT-Reparaturprotein alternativ auch über einen Nukleotid-Exzisionsreparaturweg aus der genomischen DNA von primären Mauszellen entfernt werden können. Dabei erkennt das XPC-Protein den Schaden und rekrutiert vermutlich weitere Komponenten des NER-Komplexes zur Schadensstelle, um die Reparatur einzuleiten. Das XPA-Protein scheint für die O<sup>6</sup>-meG-Reparatur, zumindest auf Gesamt-genomischer Ebene, nur bedingt notwendig zu sein. Offensichtlich sind aber noch weitere Faktoren an dieser Exzisionsreparatur beteiligt, wie die essentielle Rolle von FancD2 zeigt. Zum derzeitigen Wissensstand ist das FancD2-Protein als einzige Komponente des FA-Signalweges direkt an dem Reparaturprozess beteiligt. Möglicherweise interagiert FancD2 über PCNA und die NER-Endonukleasen XPF-ERCC1 und XPG, die nach Heranführen an die Schadensstelle die Exzision der O<sup>6</sup>-meG-haltigen Nukleotidsequenz vornehmen. Die Wiederauffüllungs- und Ligationsschritte könnten dann ebenfalls über den NER-Mechanismus ablaufen. Zusätzlich kann PARP1 oder das DDB2-Protein die Zugänglichkeit für XPC optimieren und die Reparatur der O<sup>6</sup>-meG-Läsionen unterstützen. Die möglichen Interaktionspartner, die direkt oder indirekt an der O<sup>6</sup>-meG-Reparatur mitwirken, sind in folgendem Modell dargestellt (Abb. 51).

Weiterhin wurde in dieser Arbeit der relative Beitrag des alternativen Reparaturweges für den Schutz vor den biologischen Auswirkungen einer Alkylanzien-Exposition *in vivo* herausgearbeitet. Die Komponenten XPC und FancD2 schützen hämatopoetische Stamm- und Vorläuferzellen vor den zytotoxischen Eigenschaften von MNU und sichern damit das Zellüberleben, auch wenn die endogene MGMT-Aktivität blockiert ist. Eine ähnliche Schutzfunktion weisen die beiden Proteinkomponenten auch für die Tumorbildung im hämatopoetischen

System der Maus auf. Das XPA-Protein scheint in diesem Zusammenhang eine besondere Funktion zu besitzen. In Anwesenheit aktiver MGMT hat ein Funktionsverlust von XPA keine nennenswerte Auswirkung auf den hämatotoxischen und karzinogenen Effekt von MNU. Eine gleichzeitige Depletion der MGMT-Aktivität führt demgegenüber bei diesen Tieren zu einem dramatischen Anstieg sowohl der Myelosuppression als auch der Lymphominzidenz nach MNU. Dieser Befund war insofern überraschend, als nach einem vereinfachten Modell das Absterben kritisch getroffener Zellen das Risiko einer malignen Entartung im blutbildenden System eher reduzieren sollte.



**Abb. 51: Modell der möglichen Interaktionspartner in der O<sup>6</sup>-meG-Reparatur:** O<sup>6</sup>-meG-Läsionen in der DNA können auf unterschiedliche Weise repariert werden. Eine effiziente Korrektur erfolgt über die MGMT, die die Methylgruppe vom Guanin auf ein internes Cystein überträgt und dadurch den Schaden repariert (A). Passiert das O<sup>6</sup>-Methyladdukt die Replikation, entsteht ein O<sup>6</sup>-meG:T Basenfehlpaar. Dieses kann weiterhin von der MGMT demethyliert werden mit nachfolgender Reparatur der dann vorliegenden G:T-Fehlpaarung durch die MMR zur ursprünglichen G:C-Situation (A) oder nach einer weiteren Replikation zu einer fixierten G:C->A:T Mutation werden (B). Erkennt die MMR den persistierenden Methylierungsschaden, versucht sie durch *futile repair cycles* diesen zu beheben, indem wiederholt ein Thymin gegenüber dem O<sup>6</sup>-meG eingebaut wird. Dies führt zu wiederkehrenden Einzelstrangbrüchen, die während einer erneuten Replikation zu letalen Doppelstrangbrüchen führen können (C). Zusätzlich kann ein O<sup>6</sup>-meG-Schaden auch von den Komponenten des alternativen Exzisionsreparaturweges erkannt und repariert werden (D). Dabei unterstützt wahrscheinlich der Chromatinfaktor PARP1 sowie das DDB2-Protein die Zugänglichkeit von XPC zur Schadensstelle. XPC kann daraufhin im direkten oder indirekten Zusammenspiel mit dem FancD2-Protein den Reparaturprozess durchführen. Dieser Mechanismus greift aber sinnvollerweise nur vor der ersten Replikation, solange im Gegenstrang noch das korrekte Cytosin als Kopiervorlage vorhanden ist. Vermutlich sind auch die Endonukleasen XRCC1-XPF und XPF sowie der PCNA-Komplex in dem Reparaturschritt involviert (modifiziert nach Fu 2012).



Aufgelöst werden könnte dieser Widerspruch dadurch, dass die beobachtete Myelosuppression und die Tumorbildung von verschiedenen Zellkompartimenten der Hämatopoese mit unterschiedlichem Sensitivitätsprofil ausgehen.

Bei der Messung der MNU-induzierten Mutationsrate ließ sich ein solch klarer Unterschied zwischen den Mäusen mit unterschiedlicher Reparaturkompetenz für O<sup>6</sup>-meG nicht nachweisen. Dies könnte auf der Tatsache beruhen, dass das Indikatorgen *lacZ* in den Mauszellen nicht exprimiert wird und deshalb anderen Reparatureffekten unterliegt wie beispielsweise den aktiven Transformationsrelevanten Tumorsuppressor- und Onkogenen.

Die Fragen zum genauen molekularen Mechanismus des alternativen Reparaturweges konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Es bleibt offen, ob XPC und FancD2 möglicherweise kooperativ an der Entfernung der O<sup>6</sup>-meG-Läsionen über einen gemeinsamen Reparaturweg beteiligt sind. Vorversuche, eine XPC<sup>(-/-)</sup>/FancD2<sup>(-/-)</sup>-Doppel-*knockout*-Mauslinie zu generieren schlugen fehl. Vermutlich sind solche Tiere wegen der Bedeutung des FancD2-Proteins für die Funktionalität des FA-Komplexes und der bei seinem Ausfall beobachteten Letalität auf dem Hintergrund einer zusätzlichen NER-Defizienz nicht lebensfähig. Um die funktionelle Bedeutung von XPC und FancD2 für die Reparatur von O<sup>6</sup>-Methylguaninschäden noch besser herauszustellen, könnten Reparaturkinetiken an Mäusen mit einem MGMT<sup>(-/-)</sup>-Hintergrund durchgeführt werden. Alle bisherigen Daten wurden lediglich unter temporärer pharmakologischer Blockierung der MGMT-Aktivität erhoben.

Zudem konnte festgestellt werden, dass der alternative Reparaturweg nicht nur auf O<sup>6</sup>-Methylierungsschäden zugreift, sondern zum Beispiel auch die durch Cisplatin hervorgerufenen Intrastrang-Verknüpfungen (Pt-[GpG]-Addukte) aus der DNA entfernen kann. Wie umfangreich das Substratspektrum dieses Mechanismus ist, könnte durch die Analyse weiterer DNA-Schadenstypen untersucht werden.

Schließlich sollte zukünftig auch ein Augenmerk auf bestimmte Chromatinmodulierende Faktoren gerichtet werden, da erste Studien andeuten, dass z.B. PARP1 eine wichtige Rolle für die Zugänglichkeit des XPC-Proteins zur Schadensstelle ausübt. Unter diesem Aspekt könnten auch Proteine wie ALC1 oder DDB2 in solche Untersuchungen aufgenommen werden.

## 6 Zusammenfassung

Aufgrund ihres hohen zytotoxischen, mutagenen und karzinogenen Potentials sind DNA-Alkylierungen an der O<sup>6</sup>-Position des Guanins äußerst riskant sowohl für Zellen als auch für Organismen. Deshalb verfügen Säugerzellen über effiziente Reparaturmechanismen, über die diese kritischen Läsionen aus dem Genom entfernt werden können. Neben der gut untersuchten direkten De-Methylierung durch das MGMT-Protein ist kürzlich ein alternativer Exzisions-Reparaturweg für O<sup>6</sup>-meG in humanen Zellen entdeckt worden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde nun geklärt, dass dieser Reparaturmechanismus auch in allen daraufhin untersuchten Primärzellen der Maus nachweisbar war und dass die Proteine XPC und FancD2 dabei eine essenzielle Funktion hatten, während ein Verlust von XPA nur zu einer verlangsamten Exzisionsreparatur von O<sup>6</sup>-meG führte. Im Weiteren wurde analysiert, welche relative Schutzwirkung die beiden konkurrierenden Reparaturmechanismen unter *in vivo*-Bedingungen für das Risiko von biologischen Endpunkten wie Zelluntergang oder Tumorentstehung, haben. Dazu wurden Reparatur-profiziente und -defiziente Mäuse mit dem Alkylanz N-Methyl-N-Nitroseharnstoff (MNU) behandelt und die zytotoxische Auswirkung auf die Hämatopoese, dem Alkylierungs-sensibelsten Zellsystem der Maus, anhand der Myelosuppression im peripheren Blut registriert. Ferner wurde in Langzeituntersuchungen das Auftreten von malignen Veränderungen (Lymphomen) bei den MNU-exponierten Tieren analysiert.

Der funktionelle Ausfall von XPC oder FancD2 führte, überraschenderweise unabhängig von der MGMT-Aktivität, zu einer signifikanten Verstärkung sowohl der Zytotoxizität bei hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen (Myelosuppression) als auch der Karzinogenese (T-Zell-Lymphome). Demgegenüber zeigte ein Funktionsverlust der MGMT-vermittelten Reparatur oder des XPA-Proteins deutlich geringe Auswirkungen auf Ausmaß beziehungsweise Häufigkeit der beiden Endpunkte. Waren die Mäuse hingegen sowohl für MGMT als auch für XPA defizient, zeigten sie die mit Abstand höchste Suszeptivität für Zelluntergang und maligne Transformation nach MNU-Exposition.

Bei der Bestimmung der Mutationsrate in Knochenmarkszellen der verschiedenen Mauslinien anhand einer transgenen *lacZ*-Sequenz fand sich eine etwa zehnfache Erhöhung dieser Werte nach MNU-Behandlung, aber kein signifikanter Unterschied bei An- oder Abwesenheit der beiden Reparaturfunktionen. Nach Sequenzanalyse

## Zusammenfassung

---

des Indikators zeigten sich jedoch bei den Reparatur-defizienten Mäusen Hinweise auf das vermehrte Auftreten von Punktmutationen, die von persistierenden O<sup>6</sup>-meG-Addukten herleitbar waren.

Der hier in seiner biologischen Funktion erstmals näher charakterisierte alternative Exzisions-Reparaturweg ist offenbar nicht nur auf die Entfernung von Guanin-O<sup>6</sup>-Alkylierungen aus der DNA beschränkt, sondern greift beispielweise auch auf Cisplatin-induzierte Läsionen zu und hat höchstwahrscheinlich einen großen Einfluss auf die therapeutische Wirksamkeit sowie auf das Nebenwirkungsspektrum von methylierenden Medikamenten in der Onkologie.

## 7 Literaturverzeichnis

- Adair J.E., Beard B.C., Trobridge G.D., Neff T., Rockhill J.K., Silbergeld D.L., Mrugala M.M., Kiem H-P.: Extended Survival of Glioblastoma Patients After Chemoprotective HSC Gene Therapy. *Science Translational Medicine* 4 (133), (2012)
- Alekseev S., Luijsterburg M.S., Pines A., Geverts B., Mari P-O., Giglia-Mari G., Lans H., Houtsmuller A.B., Mullenders L.H.F., Hoeijmakers J.H.J., Vermeulen W.: Cellular Concentrations of DDB2 Regulate Dynamic Binding of DDB1 at UV-Induced DNA Damage. *Molecular and Cellular Biology* 28 (24): 7402–7413, (2008)
- Allan J.M., Travis L.B.: Mechanisms of therapy related carcinogenesis. *Nature reviews* 5: 943-955, (2005)
- Allay J.A., Durnenco L.L., Koc O.N., Liu L., Gerson S.L.: Retroviral Transduction and Expression of the Human Alkyltransferase cDNA provides nitrosourea resistance to hematopoietic cells. *Blood* 85 (11): 3342-3351, (1995)
- Barnes D.E., Lindahl T.: Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damages in mammalian cells. *Annual Review of Genetics* 38: 445-476, (2004)
- Bartsch H., Spiegelhalter B.: Environmental exposure to N-nitroso compounds (NNOC) and precursors: an overview. *European Journal of cancer prevention* 1: 11—17, (1996)
- Beranek D.T.: Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutation Research* 231: 11-30, (1990)
- Boerrigter M.E.T.I., Dolle M.E.T., Martus H-J., Gossen J.A. Vijn J.: Plasmid-based transgenic mouse model for studying *in vivo* mutations. *Nature* 377: 657-659, (1995)
- Bouchard V.J., Rouleau M., Poirier G.G.: PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage. *Experimental Hematology* 31: 446–454, (2003)
- Boyce R.P. and Flanders P.H.: Release of Ultraviolet light-induced thymine dimers from DNA in *E. coli* K-12. *PNAS* 51 (2): 293-300, (1964)
- Bronstein S.M., Cochrane J.E., Craft T.R., Swenberg J.A., Skopek T.R.: Toxicity, Mutagenicity, and mutational Spectra of *N*-Ethyl-*N*-nitrosourea in human cell lines with different DNA Repair phenotypes. *Cancer Research* 51: 5188-5197, (1991)
- Bronstein S.M., Skopek T.R., Swenberg J.A.: Efficient Repair of O<sup>6</sup>-Ethylguanine, but not O<sup>4</sup>-Ethylthymine or O<sup>2</sup>-Ethylthymine, is dependent upon O<sup>6</sup>-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase and Nucleotide Excision repair activities in human cells. *Cancer Research* 52: 2008-2011, (1992)
- Burns J.A., Dreij K., Cartularo L., Scicchitano D.A.: O<sup>6</sup>-Methylguanine induces altered proteins at the level of transcription in human cells. *Nucleic Acids Research* 38 (22): 8178–8187, (2010)
- Caldecott K.W., Aoufouchi S., Johnson P., Shall S.: XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase  $\beta$  and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' *in vitro*. *Nucleic Acids Research* 24 (22): 4387–4394, (1996)
- Chen Z., Yang J., Wang G. Song B., Li J., Xu Z.: Attenuated expression of xeroderma pigmentosum group c is associated with critical events in human bladder cancer carcinogenesis and progression. *Cancer Research* 67: 4578-4585, (2007)

- Christmann M., Tomicic M.T., Roos W.P., Kaina B.: Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193: 3–34, (2003)
- Ciccia A., Ling C., Coulthard R., Yan Z., Xue Y., Meetei A.R., Laghmani E.H., Joenje H., McDonald N., de Winter J.P., Wang W., West S.C.: Identification of FAAP24, a Fanconi Anemia Core Complex Protein that Interacts with FANCM. *Molecular Cell* 25: 331–343, (2007)
- Cohen S.M., Ellwein L.B.: Cell Proliferation in Carcinogenesis. *Science* 249: 1007–1011, (1990)
- Colussi C., Parlanti E., Degan P., Aquilina G., Barnes D., Macpherson P., Karran P., Crescenzi M., Dogliotti E., Bignami M.: The Mammalian Mismatch Repair Pathway Removes DNA 8-oxodGMP Incorporated from the Oxidized dNTP Pool. *Current Biology* 12: 912–918, (2002)
- Cortez D., Guntuku S., Qin J., Elledge S.J.: ATR and ATRIP: Partners in Checkpoint Signaling. *Science*, (2001)
- Cramers P., Filon A.R., Pines A., Kleinjans J.C., Mullenders L.H.F., van Zeeland A.A.: Enhanced Nucleotide Excision Repair in Human Fibroblasts Pre-exposed to Ionizing Radiation. *Photochemistry and Photobiology* 88: 147–153, (2012)
- Curtin N.J., Wang L-Z., Yiakouvaki A., Kyle S., Arris C.A., Canan-Koch S., Webber S.E., Durkacz B.W., Calvert H.A., Hostomsky Z., Newell D.R.: Repair-Deficient Cells Restores Sensitivity to Temozolomide in Mismatch Novel Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 Inhibitor, AG14361. *Clinical Cancer Research* 10: 881-889, (2004)
- D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G.G.: Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Journal of Biochemistry* 342: 249 – 268, (1999)
- D'Andrea A.D. and Grompe M.: The Fanconi anemia/BRCA pathway. *Nature reviews* 3: 23-34, (2003)
- D'Errico M., Parlanti E., Teson M., Bernardes de Jesus B.M., Degan P., Calcagnile A., Jaruga P., Bjørn M., Crescenzi M., Pedrini A.M., Egly J-M., Zambruno G., Stefanini M., Dizdaroglu M., Dogliotti E.: New functions of XPC in the protection of human skin cells from oxidative damage. *EMBO* 25: 4305–4315, (2006)
- Davis B.M., Koc O.N., Gerson S.L.: Limiting numbers of G156A O<sup>6</sup>-methylguanine –DNA methyltransferase-transduced marrow progenitors repopulate nonmyeloablated mice after drug selection. *Blood* 95 (10): 3078-3084, (2000)
- De Boer J. and Hoeijmakers J.H.J.: Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21 (3): 453-460, (2000)
- De Boer J., Hoeijmakers J.H.: Cancer from the outside, aging from the inside: mouse models to study the consequences of defective nucleotide excision repair. *Biochimie* 81: 127–137, (1999)
- De Vries A., van Oostrom C.T.M., Hofhuis F.M.A., Dortant P.M., Berg R.J.W., de Gruijl F.R., Wester P.W., van Kreijl C.F., Capel P.J.A., van Steeg H., Verbeek S.J.: Increased susceptibility to ultraviolet-B and carcinogens of mice lacking the DNA excision repair gene XPA. *Nature* 377 (6545): 169-173, (1995)
- De Winter J.P., Joenje H.: The genetic and molecular basis of Fanconi anemia, *Mutation Research* 688 (1-2): 11-19, (2009)
- Dipple A.: DNA adducts of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 16 (3): 437-441, (1995)

- Dolan M.E., Moschel R.C., Pegg A.E.: Depletion of mammalian O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity by O<sup>6</sup>-benzylguanine provides a means to evaluate the role of this protein in protection against carcinogenic and therapeutic alkylating agents. *PNAS* 87: 5368-5372, (1990)
- Drabløs F., Feyzi E., Aas P.A., Vaagbø C.B., Kavli B., Bratlie M.S., Peña-Díaz J., Otterlei M., Slupphaug G., Krokan H.E.: Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair* 3 (11): 1389-1407, (2004)
- Duckett D.R., Drummond J.T., Murchie A.I.H., Reardon J.T., Sancar A., Lilley D.M.J., Modrich P.: Human MutS $\alpha$  recognizes damaged DNA base pairs containing O<sup>6</sup>-methylguanine, O<sup>4</sup>-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *PNAS* 93: 6443-6447, (1996)
- Dumenco L.L., Allay E., Norton K., Gerson S.L.: The Prevention of Thymic Lymphomas in Transgenic Mice by Human O<sup>6</sup>-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase. *Science* 259, (1993)
- Dzagnidze A., Katsarava Z., Makhalova J., Liedert B., Yoon M-S., Kaube H., Limmrith V., Thomale J.: Repair capacity for platinum-DNA adducts determines the severity of cisplatin-induced peripheral neuropathy. *The Journal of Neuroscience* 27 (35): 9451-9457, (2007)
- Ekanayake K.S., Lebreton P.R.: Activation Barriers for DNA Alkylation by Carcinogenic Methane Diazonium Ions. *Journal of Computational Chemistry* 27 (3), (2005)
- Elder R.H., Jansen J.G., Weeks R.J., Willington M.A., Deans B., Watson A.J., Mynett K.J., Bailey J.A., Cooper D.P., Rafferty J.A., Heeran M.C., Wijnhoven S.W.P., Van Zeeland A.A., Margison G.P.: Alkylpurine–DNA–N-Glycosylase Knockout Mice Show Increased Susceptibility to Induction of Mutations by Methyl-Methanesulfonate. *Molecular and Cellular Biology* 18 (10): 5828-5837, (1998)
- Encell L.P., Loeb L.A.: Redesigning the substrate specificity of human O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase. Mutants with enhanced repair of O<sup>4</sup>-methylthymine. *Biochemistry* 38: 12097-12103, (1999)
- Engelbergs J., Thomale J., Galhoff A., Rajewsky M.F.: Fast repair of O<sup>6</sup>-ethylguanine, but not O<sup>6</sup>-methylguanine, in transcribed genes prevents mutation of H-ras in rat mammary tumorigenesis induced by ethylnitrosourea in place of methylnitrosourea. *PNAS* 95: 1635-1640, (1998)
- Engelbergs J., Thomale J., Rajewsky M.F.: Role of DNA repair in carcinogen-induced ras mutation. *Mutation Research* 450: 139–153, (2000)
- Engelward B.P., Weeda G., Wyatt M.D., Broekhof J.L.M., De Wit J., Donker I., Allan J.M., Gold B., Hoeijmakers J.H.J., Samson L.D.: Base excision repair deficient mice lacking the Aag alkyladenine DNA glycosylase. *PNAS* 94: 13087–13092, (1997)
- Enoiu M., Jiricny J., Schärer O.D.: Repair of cisplatin-induced DNA interstrand crosslinks by a replication-independent pathway involving transcription-coupled repair and translesion synthesis. *Nucleic Acids Research* 40 (18): 8953–8964, (2012)
- Esteller M., Toyota M., Sanchez-Cespedes M., Capella G., Peinado M.A., Watkins D.N., Issa J.-P.J., Sidransky D., Baylin S.B., Herman J.G.: Inactivation of the DNA Repair Gene O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA Methyltransferase by Promoter Hypermethylation Is Associated with G to A Mutations in *K-ras* in Colorectal Tumorigenesis. *Cancer Research* 60: 2368-2371, (2000)

- Evans E., Moggs J.G., Hwang J.R., Egly J-M., Wood R.D.: Mechanism of open complex and dual incision formation by human nucleotide excision repair factors. *EMBO* 16 (21): 6559–6573, (1997)
- Fanconi G. Familiäre infantile perniziösartige Anämie (perniziöses Blutbild und Konstitution). *Jahrbuch für Kinderheilkunde und physische Erziehung* 117: 257–280, (1927)
- Fishel R.: Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction. *Genes and Development* 12: 2096-2101, (1998)
- Fong L.Y.Y., Jensen D.E., Magee P.N.: DNA methyl-adduct dosimetry and O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyl transferase activity determinations in rat mammary carcinogenesis by Procarbazine and N-Methylnitrosourea. *Carcinogenesis* 11 (3): 411-417, (1990)
- Ford G.P., Scribner J.D.: Prediction of nucleoside-carcinogen reactivity. Alkylation of adenine, cytosine, guanine, and thymine and their deoxynucleosides by alkanediazonium ions. *Chemical Research in Toxicology* 3 (3): 219-230, (1990)
- Fousteri M., Mullenders L.H.F.: Transcription-coupled nucleotide excision repair in mammalian cells: molecular mechanisms and biological effects. *Cell Research* 18: 73-84, (2008)
- Friedberg E.C.: How Nucleotide excision repair protects against cancer. *Nature* 1, (2001)
- Friedberg E.C.: Suffering in silence: The tolerance of DNA damage. *Nature reviews* 6: 954-953, (2005)
- Fu D., Calvo J.A., Samson L.D.: Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents, *Nature Reviews Cancer* 12, (2012)
- Gagne J-P., Isabelle M., Lo K.S., Bourassa S., Hendzel M.J., Dawson V.L., Dawson T.M., Poirier G.G.: Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes. *Nucleic Acids Research* 36 (22): 6959–6976, (2008)
- Gari K., De´caillet C., Stasiak A.Z., Stasiak A., Constantinou A.: The Fanconi Anemia Protein FANCM Can Promote Branch Migration of Holliday Junctions and Replication Forks. *Molecular Cell* 29: 141–148, (2008)
- Garner E., Smogorzewska A.: Ubiquitylation and the Fanconi anemia pathway. *Federation of European Biochemical Societies Letters* 585 (18): 2853-2860, (2011)
- Geiger H., David S., Nattamai K.J., Jan V.: Quantification of genomic mutations in murine hematopoietic cells. *Methods in Molecular Biology* 506: 423-436, (2009)
- Geiger H., Schleimer D., Nattamai K.J., Dannenmann S.R., Davies S.M., Weiss B.D.: Mutagenic potential of temozolomide in bone marrow cells *in vivo*. *Blood* 107 (7): 3010-3011, (2006)
- Genschel J., Bazemore L.R., Modrich P.: Human Exonuclease I Is Required for 5' and 3' Mismatch Repair. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (15): 13302–13311, (2002)
- Gerson S.L., Miller K., Berger N.A.: O<sup>6</sup>-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase Activity in Human Myeloid Cells. *Journal of Clinical Investigation* 76(6): 2106–2114, (1985)
- Gerson S.L., Trey J.E., Miller K., Berger N.A.: Comparison of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity based on cellular DNA content in human, rat and mouse tissues. *Carcinogenesis* 7 (5): 745-749, (1986)

- Gerson S.L.: MGMT: Its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nature reviews* 4 (4): 296-307, (2004)
- Gillet L.C.J., Schaerer O.D.: Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair. *Chemical Reviews* 106: 253-276, (2006)
- Glassner B.J., Weeda G., Allan J.M., Broekhof J.L.M., Carls N.H.E., Donker I., Engelward B.P., Hampson R.J., Hersmus R., Hickman M.J., Roth R.B., Warren H.B., Wu M.M., Hoeijmakers J.H.J., Samson L.D.: DNA repair methyltransferase (*Mgmt*) knockout mice are sensitive to the lethal effects of chemotherapeutic alkylating agents. *Mutagenesis* 14 (3): 339–347, (1999)
- Gossen J.A., De Leeuw W.J.F., Tan C.H.T., Zwarthoff E.C., Berends F., Lohman P.H.M., Knook D.L., Vug J.: Efficient rescue of integrated shuttle vectors from transgenic mice: A model for studying mutations in vivo. *PNAS* 86: 7971-7975, (1989)
- Graves R.J., Li B.F.L., Swann P.F.: Repair of O<sup>6</sup>-methylguanine, O<sup>6</sup>-ethylguanine, O<sup>6</sup>-isopropylguanine and O<sup>4</sup>-methylthymine in synthetic oligodeoxynucleotides by *Escherichia coli* *ada* gene O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA-alkyltransferase. *Carcinogenesis* 10 (4): 661-666, (1989)
- Grompe M., D'Andrea A.: Fanconi anemia and DNA repair. *Human Molecular Genetics* 10 (20): 2253-- 2260, (2001)
- Hanawalt P.C.: Controlling the efficiency of excision repair. *Mutation Research* 485: 3-13, (2001)
- Hartlerode A.J., Scully R.: Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells. *Journal of Biochemistry* 423 (2): 157-168, (2009)
- Heale J.T., Ball A.R., Schmiesing J.A., Kim J-S., Kong X., Zhou S., Hudson D.F., Earnshaw W.C., Yokomori K.: Condensin I Interacts with the PARP-1-XRCC1 Complex and Functions in DNA Single-Strand Break Repair. *Molecular Cell* 21: 837–848, (2006)
- Hecht S.: DNA adduct formation from tobacco-specific *N*-nitrosamines. *Mutation Research* 424: 127–142, (1999)
- Hoeijmakers J.H.J.: Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366-374, (2001)
- Hoogstraten D., Bergink S., Verbiest V.H.M., Luijsterburg M.S., Geverts B., Raams A., Dinant C., Hoeijmakers J.H.J., Vermeulen W., Houtsmuller A.B.: Versatile DNA damage detection by the global genome nucleotide excision repair protein XPC. *Journal of Cell Science* 121: 2850-2859, (2008)
- Houghtaling, S. Timmers C., Noll M., Finegold M.J., Jones S.N., Meyn M.S., Grompe M.: Epithelial cancer in Fanconi anemia complementation group D2 (*Fancd2*) knockout mice. *Genes and Development* 17: 2021-2035, (2003)
- Iwakuma T., Sakumi K., Nakatsuru Y., Kawate H., Igarashi H., Shiraishi A., Tsuzuki T., Ishikawa T., Sekiguchi M.: High incidence of nitrosamine-induced tumorigenesis in mice lacking DNA repair methyltransferase. *Carcinogenesis* 18 (8): 1631–1635, (1997)
- Jackson S. Mission Therapeutics: DNA damage & the DNA damage response (DDR). URL: [http://www.missiontherapeutics.com/research\\_and\\_development](http://www.missiontherapeutics.com/research_and_development), Download (2012)
- Jakszyn P., Gonzalez A.: Nitrosamine and related food intake and gastric and oesophageal cancer risk: A systematic review of the epidemiological evidence. *World Journal of Gastroenterology* 12(27): 4296-4303, (2006)



- Jansen M., Sorg U.R., Ragg S., Flashove M., Seeber S., Williams D.A., Moritz T.: Hematoprotection and enrichment of transduced cells in vivo after gene transfer of MGMTP140K into hematopoietic stem cells. *Cancer Gene Therapy* 9: 737 – 746, (2002)
- Jirincy J.: The multifaceted mismatch-repair system. *Molecular cell biology (Nature)* 7, (2006)
- Jones M.J.K., Huang T.T.: The Fanconi anemia pathway in replication stress and DNA crosslink repair. *Cellular and molecular Life Sciences*, (2012)
- Kaina B., Aurich O.: Dependency of the yield of sister-chromatid exchanges induced by alkylating agents on fixation time: Possible involvement of secondary lesions in sister-chromatid exchange induction. *Mutation Research* 149: 451-461, (1985)
- Kaina B., Christmann M., Naumann S., Roos W.P.: MGMT: Key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents, *DNA Repair* 832: 1-21, (2007)
- Karran P., Hampson R.: Genomic instability and tolerance to alkylating agents. *Cancer surveys* 28: 69-85, (1996)
- Karran P.: Mechanisms of tolerance to DNA damaging therapeutic drugs. *Carcinogenesis* 22 (12): 1931—1937, (2001)
- Kawate H., Sakumi K., Tsuzuki T., Nakatsuru Y., Ishikawa T., Takahashi S., Takano H., Noda T., Sekiguchi M.: Separation of killing and tumorigenic effects of an alkylating agent in mice defective in two of the DNA repair genes. *PCNA* 95: 5116–5120, (1998)
- Kennedy R.D., Chen C.C., Stuckert P., Archila E.M., De la Vega M.A., Moreau L.A., Shimamura A., D'Andrea A.D.: Fanconi anemia pathway–deficient tumor cells are hypersensitive to inhibition of ataxia telangiectasia mutated. *Journal of Clinical Investigation* 117 (5): 1440–1449, (2007)
- Kennedy R.D., D'Andrea A.D.: The Fanconi Anemia/BRCA pathway: new faces in the crowd. *Genes and Development* 19: 2925-2940, (2005)
- Kim H., D'Andrea A.D.: Regulation of DNA cross-link repair by the Fanconi anemia/BRCA pathway, *Genes and Development* 26: 1393-1408, (2012)
- Kim J.M., Kee Y., Gurtan A., D'Andrea A.D.: Cell cycle-dependent chromatin loading of the Fanconi anemia core complex by FancM/FAAP24. *Blood* 111 (10): 5215-5222, (2008)
- Kim J-K. and Choi B-S.: The solution structure of DNA duplex-decamer containing the (6-4) photoproduct of thymidyl(3'→5')thymidine by NMR and relaxation matrix refinement. *European Journal of Biochemistry* 228 (3): 849-854, (1995)
- Knippers, R. Molekulare Genetik. *Thieme* 9. Auflage, (2006)
- Knipscheer P., Räschle M., Smogorzewska A., Enoiu M., Ho T.V., Schärer O.D., Elledge S.J., Walter J.C.: Interstrand Cross-Link Repair The Fanconi Anemia Pathway Promotes Replication-Dependent DNA. *Science* 326: 1698-1701, (2009)
- Komori K., Takagi Y., Sanada M., Lim T.-H., Nakatsu Y., Tsuzuki T., Sekiguchi M., Hidaka M.: A novel protein, MAPO1, that functions in apoptosis triggered by O<sup>6</sup>-methylguanine mispair in DNA. *Oncogene* 28: 1142–1150, (2009)
- Kondo N., Takahashi A., Mori E., Noda T., Zdzienicka M.Z., Thompson L.H., Helleday T., Suzuki M, Kinashi Y., Masunaga S., Ono K., Hasegawa M., Ohnishi T.: FANCD1/BRCA2 Plays Predominant Role in the Repair of DNA Damage Induced by ACNU or TMZ. *Plos one* 6 (5), (2011)

- Kondo N., Takahashi A., Ono K., Ohnishi T.: DNA Damage Induced by Alkylating Agents and Repair Pathways. *Journal of Nucleic Acids*, (2010)
- Lambert J.B., Singer T.M., Boucher S.E., Douglas G.R.: Detailed review of transgenic rodent mutation assays. *Mutation Research* 590 (1-3): 1-280, (2005)
- Leung J-W.C., Wang Y., Fong K.W., Huen M.S.Y., Li L., Chen J.: Fanconi anemia (FA) binding protein FAAP20 stabilizes FA complementation group A (FANCA) and participates in interstrand cross-link repair. *PNAS* 109 (12): 4491-4506, (2012)
- Liedert B., Pluim D., Schellens J., Thomale J.: Adduct-specific monoclonal antibodies for the measurement of cisplatin-induced DNA lesions in individual cell nuclei. *Nucleic Acid Research* 34 (6), (2006)
- Lim A., Li B.F.L.: The nuclear targeting and nuclear retention properties of a human DNA repair protein O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase are both required for its nuclear localization: the possible implications. *EMBO* 15 (15): 4050-4060, (1996)
- Liu L., Gerson S.L.: Targeted Modulation of MGMT: Clinical Implications. *Clinical Cancer Research* 12: 328-331, (2006)
- Longley M.J., Pierce A.J., Modrich P.: DNA Polymerase  $\delta$  Is Required for Human Mismatch Repair *in Vitro*. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (16): 10917–10921, (1997)
- Lu X., Heilman J.M., Blans P., Fishbein J.C.: The Structure of DNA Dictates Purine Atom Site Selectivity in Alkylation by Primary Diazonium Ions. *Chemical Research in Toxicology* 18: 1462-1470, (2005)
- Luijsterburg M.S., Lindh M., Acs K., Vrouwe M.G., Pines A., van Attikum H., Mullenders L.H., Dantuma N.P.: DDB2 promotes chromatin decondensation at UV-induced DNA damage. *Journal of Cell Biology* 197 (2), (2012)
- Maher V.M., Domoradzki J., Bhattacharyya N.P., Tsujimura T., Corner R.C., McCormick J.J.: Alkylation damage, DNA repair and mutagenesis in human cells. *Mutation Research* 233: 235-245, (1990)
- Margison G.P., Santibáñez-Korel M.F.: O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA-alkyltransferase: role in carcinogenesis and chemotherapy. *BioEssays* 24: 255—266, (2002)
- Margison G.P., Povey A.C., Kaina B., Koref M.F.S.: Variability and regulation of O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* 24 (4): 625-635, (2003)
- Martin A. und Scharff M.D.: Aid and mismatch repair in antibody diversification. *Nature reviews Immunology* 2: 605—614, (2002)
- Matsumoto Y., Kim K.: Excision of Deoxyribose Phosphate Residues by DNA Polymerase  $\beta$  During DNA Repair. *Science* 269, (1995)
- Matsuoka S., Ballif B.A., Smogortewska A., McDonald E.R., Hurov K.E., Luo K.E., Bakalarski C.E. Zhao Z., Solimini N., Lerenthal Y., Shiloh Y., Gyi S.P. Elledge S.J.: ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science* 316 (5828): 1160-1166, (2007)
- Mazon G., Philippin G., Cadet J., Gasparutto D., Fuchs R.P.: The alkyltransferase-like *ybaZ* gene product enhances nucleotide excision repair of O<sup>6</sup>-alkylguanine adducts in *E. coli*. *DNA Repair* 8: 697–703, (2009)
- Meikrantz W., A.Bergom M.A., Memisoglu A., Samson L.: O<sup>6</sup>-Alkylguanine DNA lesions trigger apoptosis. *Carcinogenesis* 19 (2): 369–372, (1998)
- Melis J.P.M., Luijten M., Mullenders L.H.F., van Steeg H.: The role of XPC: Implications in cancer and oxidative DNA damage. *Mutation Research* 728: 107-117, (2011)

- Ménissier de Murcia J., Niedergang C., Trucco C., Ricoul M., Dutrillaux B., Mark M., Oliver F.J., Masson M., Dierich A.E., Lemeur M., Walztinger C., Chambon C., de Murcia G.: Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells. *PNAS* 94: 7303–7307, (1997)
- Milsom M.D., Jerabek-Willemsen M., Harris C.E., Schambach A., Broun E., Bailey J., Jansen M., Schleimer D., Nattamai K., Wilhelm J., Watson A., Geiger H., Margison G.P., Moritz T., Baum C., Thomale J., Williams D.A.: Reciprocal Relationship between O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA Methyltransferase P140K Expression Level and Chemoprotection of Hematopoietic Stem Cells. *Cancer Research* 68: 6171-6180, (2008)
- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food: Nitrate, Nitrite and N-Nitrosocompounds in Foods. Second Report; *Food surveillance Paper* (HMSO) 23, (1992)
- Missura M., Buterin T., Hindges R., Huebscher U., Kasparkova J., Brabec V., Naegeli H.: Double-check probing of DNA bending and unwinding by XPA±RPA: an architectural function in DNA repair. *EMBO* 20 (13): 3554-3564, (2001)
- Modrich P., Lahue R.: Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annual Review of Biochemistry* 65: 103-1313, (1996)
- Mollwitz B., Brunk E., Schmitt S., Pojer F., Bannwarth M., Schiltz M., Rothlisberger U., Johnsson K.: Directed Evolution of the Suicide Protein O<sup>6</sup>-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase for Increased Reactivity Results in an Alkylated Protein with Exceptional Stability. *Biochemistry* 51: 986–994, (2012)
- Moritz T., Mackay W., Glassner B.J., Williams D.A., Samson L.D.: Retrovirus-mediated Expression of a DNA Repair Protein in Bone Marrow Protects Hematopoietic Cells from Nitrosourea-induced Toxicity *in Vitro* and *in Vivo*. *Cancer Research* 55: 2608-2614, (1995)
- Nickel A.C.: Interaktion verschiedener Reparaturmechanismen für die Behebung von O<sup>6</sup>-Methylguanin-Schäden in der DNA. Dissertation, (2010)
- O'Donnell L., Durocher D.: DNA Repair Has a New FAN1 Club. *Molecular Cell* 39: 167-169, (2010)
- Onodera T., Morino K., Tokishita S-I., Morita R., Masui R., Kuramitsu S., Ohta T.: Role of alkyltransferase-like (ATL) protein in repair of methylated DNA lesions in *Thermus thermophilus*. *Mutagenesis* 26 (2): 303–308, (2011)
- Pearson S.J., Wharton S., Watson A.J., Begum G., Butt A., Glynn N., Williams D.M., Shibata T., Santibáñez-Koref M.F., Margison G.P.: A novel DNA damage recognition protein in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acid Research* 34 (8): 2347-2354, (2006)
- Pegg A.E., Hui G.: Formation and Subsequent Removal of O<sup>6</sup>-Methylguanine from Deoxyribonucleic Acid in Rat Liver and Kidney after Small Doses of Dimethylnitrosamine. *Journal of Biochemistry* 173: 739-748, (1978)
- Pegg A.E. Methylation of the O<sup>6</sup>-position of guanine in DNA is the most likely initiating event in carcinogenesis by methylating agents. *Cancer Investigation* 2: 223-231, (1984)
- Pegg A.E.: Mammalian O<sup>6</sup>-Alkylguanine-DNA Alkyltransferase: Regulation and Importance in Response to Alkylating Carcinogenic and Therapeutic Agents, *Cancer Research* 50: 6119-6129, (1990)
- Pegg A.E.: Multifaceted Roles of Alkyltransferase and Related Proteins in DNA Repair, DNA Damage, Resistance to Chemotherapy, and Research Tools. *Chemical Research in Toxicology* 24: 618–639, (2011)
- Petit C. and Sancar A.: Nucleotide excision repair: from E.coli to man. *Biochimie* 81 (1-2): 15-25, (1999)

- Pichierri P., Rosselli F.: The DNA crosslink-induced S-phase checkpoint depends on ATR–CHK1 and ATR–NBS1–FANCD2 pathways. *EMBO* 23: 1178–1187, (2004)
- Pines A., Vrouwe M.G., Marteiijn J.A., Typas D., Luijsterburg M.S., Cansoy M., Hensbergen P., Deelder A., de Groot A., Matsumoto S., Sugasawa K., Thoma N., Vermeulen W., Vrieling H., Mullenders L.: PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1. *Journal of Cell Biology* 199 (2): 235-249, (2012)
- Plummer E.R., Middleton M.R., Jones C., Olsen A., Hickson I., McHugh P., Margison G.P., McGown G., Thorncroft M., Watson A.J., Boddy A.V., Calvert H., Harris A.L., Newell D.R., Curtin N.J.: Temozolomide Pharmacodynamics in Patients with Metastatic Melanoma: DNA Damage and Activity of Repair Enzymes O<sup>6</sup>-Alkylguanine Alkyltransferase and Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1. *Clinical Cancer Research* 11: 3402-3409, (2005)
- Prasad R., Beard W.A., Batra V.K., Liu Y., Shock D.D., Wilson S.H.: A Review of Recent Experiments on Step-to-Step “Hand-off” of the DNA Intermediates in Mammalian Base Excision Repair Pathways. *Molecular Biology (Mosk)* 45 (4): 586–600, (2011)
- Qin X., Liu L., Gerson S.L.: Mice defective in the DNA mismatch gene PMS2 are hypersensitive to MNU induced thymic lymphoma and are partially protected by transgenic expression of human MGMT. *Oncogene* 18: 4394–4400, (1999)
- Quiros S., Roos W.P., Kaina B.: Processing of O<sup>6</sup>-methylguanine into DNA double-strand breaks requires two rounds of replication whereas apoptosis is also induced in subsequent cell cycles, *Cell Cycle* 9 (1): 168-178; (2010)
- Rademakers S., Volker M., Hoogstraten D., Nigg A.L., Mone M.J., van Zeeland A.A., Hoeijmakers J.H.J., Houtsmuller A.B., Vermeulen W.: Xeroderma Pigmentosum Group A Protein Loads as a Separate Factor onto DNA Lesions. *Molecular and Cellular Biology* 23 (16): 5755–5767, (2003)
- Rajewsky M.F., Engelbergs J., Thomale J., Schweer T.: DNA repair: counteragent in mutagenesis and carcinogenesis — accomplice in cancer therapy resistance. *Mutation Research* 462: 101–105, (2000)
- Reese J.S., Qin X., Ballas C.B., Sekiguchi M., Gerson S.L.: MGMT Expression in Murine Bone Marrow Is a Major Determinant of Animal Survival After Alkylating Agent Exposure. *Journal of Hematotherapy & Stem cell Research* 10: 115–123, (2001)
- Roos W., Baumgartner M., Kaina B.: Apoptosis triggered by DNA damage O<sup>6</sup>-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1. *Oncogene* 23: 359-367, (2004)
- Rossi S.C., Topali M.D.: Mutagenic Frequencies of Site-Specifically Located O<sup>6</sup>-Methylguanine in Wild-Type Escherichia coli and in a Strain Deficient in Ada-Methyltransferase. *Journal of Bacteriology* 173 (3): 1201-1207, (1991)
- Rydberg B., Lindahl T.: Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction. *EMBO* 1 (2): 211-216, (1982)
- Sakumi K., Shiraishi A., Shimizu S., Tsuzuki T., Ishikawa T., Sekiguchi M.: Methylnitrosourea-induced Tumorigenesis in MGMT Gene Knockout Mice. *Cancer Research* 57: 2415-2418, (1997)
- Sale J.E.: Competition, collaboration and coordination—determining how cells bypass DNA damage. *Journal of Cell Science* 125 (7): 1633-1643, (2012)

- Samson L., Thomale J., Rajewsky M.F.: Alternative pathways for the in vivo repair of O<sup>6</sup>-alkylguanine and O<sup>4</sup>-alkylthymine in *Escherichia coli*: the adaptive response and nucleotide excision repair. *EMBO* 7 (7): 2261 -2267, (1988)
- San Filippo J., Sung P., Klein H.: Mechanism of Eukaryotic Homologous Recombination. *Annual Reviews of Biochemistry* 77: 229–257, (2008)
- Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Ünsal-Kaçmaz K., Linn S.: Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annual Review of Biochemistry* 73: 39–85, (2004)
- Sands A.T., Abuin A., Sanchez A., Conti C.J., Bradley A.: High susceptibility to ultraviolet-induced carcinogenesis in mice lacking *XPC*. *Nature* 377, (1995)
- Sareen A., Chaudhury I., Adams N., Sobek A.: Fanconi anemia proteins FANCD2 and FANCI exhibit different DNA damage responses during S-phase. *Nucleic Acids Research* 1-15, (2012)
- Sarkaria J.N., Kitange G.J., James C.D., Plummer R., Calvert H., Weller M., Wick W.: Mechanisms of chemoresistance to alkylating agents in malignant glioma. *Clinical Cancer Research* 14 (10), (2008)
- Sato K., Ishiai M., Toda K., Furukoshi S., Osakabe A., Tachiwana H., Takizawa Y., Kagawa W., Kitao H., Dohmae N., Obuse C., Kimura H., Takata M., Kurumizaka H.: Histone chaperone activity of Fanconi anemia proteins, FANCD2 and FANCI, is required for DNA crosslink repair. *EMBO* 31: 3524–3536, (2012)
- Sato K., Toda K., Ishiai M., Takata M., Kurumizaka H.: DNA robustly stimulates FANCD2 monoubiquitylation in the complex with FANCI. *Nucleic Acids Research* 40 (10): 4553–4561, (2012a)
- Schärer O.D., Jirincy J.: Recent progress in the biology, chemistry and structural biology of DNA glycosylases. *BioEssays* 23 (3): 270-281, (2001)
- Schärer O.D.: DNA interstrand crosslinks: natural and drug-induced DNA adducts that induce unique cellular responses. *Chembiochem* 6(1): 27-32, (2005)
- Seiler, F., Kirstein, U., Eberle, G., Hochleitner, K. & Rajewsky, M.F. Quantification of specific DNA O-alkylation products in individual cells by monoclonal antibodies and digital imaging of intensified nuclear fluorescence. *Carcinogenesis* 14: 1907-1913, (1993).
- Selby C.P. and Sancar A.: Gene- and strand-specific repair in vitro: Partial purification of a transcription-repair coupling factor. *PNAS* 88 (18): 8232-8236, (1991)
- Selby C.P., Sancar A.: Molecular Mechanism of Transcription-Repair Coupling. *Science* 260, (1993)
- Setlow R.B. and Carrier W.L.: The disappearance of thymine dimers from DNA: an error-correcting mechanism. *PNAS* 51 (2) 226-231, (1964)
- Shen X., Do H., Li Y., Chung W-H., Tomasz M., de Winter J.P., Xia B., Elledge S.J., Wang W., Li L.: Recruitment of Fanconi Anemia and Breast Cancer Proteins to DNA Damage Sites Is Differentially Governed by Replication. *Molecular Cell* 35: 716–723, (2009)
- Shimamura A. and Alter B.P.: Pathophysiology and management of inherited marrow failure syndromes. *Blood reviews* 24: 101-122, (2010)
- Shiraishi A., Sakumi K., Sekiguchi M.: Increased susceptibility to chemotherapeutic alkylating agents of mice deficient in DNA repair methyltransferase. *Carcinogenesis* 21 (10): 1879-1883, (2000)
- Silber J.R., Bobola M.S., Blank A., Chamberlain M.C.: O<sup>6</sup>-Methylguanine-DNA methyltransferase in glioma therapy: Promise and problems. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1826 (1): 71-82, (2012)

- Sobol R.W., Horton J.K., Kühn R., Gu H., Singhal R.K., Prasad R., Rajewsky K., Wilson S.H.: Requirement of mammalian DNA polymerase  $\beta$  in base excision repair. *Nature* 379, (1996)
- Solimando L., Luijsterburg M.S., Vecchio L., Vermeulen W., van Driel R., Fakan S.: Spatial organization of nucleotide excision repair proteins after UV-induced DNA damage in the human cell nucleus. *Journal of Cell Science* 122 (1): 83-91, (2008)
- Sorg U.R., Kleff V., Fanaei S., Schumann A., Moellmann M., Opalka B., Thomale J., Moritz T.: O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) gene therapy targeting haematopoietic stem cells: Studies addressing safety issues. *DNA Repair* 6: 1197-1209, (2007)
- Soulier J.: Fanconi Anemia. *Hematology* 1: 492-497, (2011)
- Srivenugopal K.S., Yuan X.H., Friedmann H.S., Ali-Osman F.: Ubiquitination-dependent proteolysis of O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase in human and murine tumor cells following inactivation with O<sup>6</sup>-benzylguanine or 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *Biochemistry* 35 (4): 1328—1334, (1996)
- Sugasawa K., Ng J.M.Y., Masutani C., Iwai S., van der Spek P.J., Eker A.P.M., Hanaoka F., Bootsma D., Hoeijmakers J.H.J.: Xeroderma Pigmentosum Group C Protein Complex Is the Initiator of Global Genome Nucleotide Excision Repair, *Molecular Cell* 2: 223–232, (1998)
- Sugasawa K., Okuda Y., Saijo M., Nishi R., Matsuda N., Chu G., Mori T., Iwai S., Tanaka K., Tanaka K.: UV-Induced Ubiquitylation of XPC Protein Mediated by UV-DB-Ubiquitin Ligase Complex. *Cell* 121: 387–400, (2005)
- Takedachi A., Saijo M., Tanaka K.: DDB2 Complex-Mediated Ubiquitylation around DNA Damage Is Oppositely Regulated by XPC and Ku and Contributes to the Recruitment of XPA. *Molecular and Cellular Biology* 30 (11): 2708–2723, (2010)
- Taniguchi T., Garcia-Higuera I., Xu B., Andreassen P.R., Gregory R.C., Kim S-T., Lane W.S., Kastan M.B., D'Andrea A.D.: Convergence of the Fanconi Anemia and Ataxia Telangiectasia Signaling Pathways. *Cell* 109: 459—472, (2002)
- Taniguchi T., Tischkowitz M., Ameziane N., Hodgson S.V., Mathew C.G., Joenje H., Mock S.C., D'Andrea A.D.: Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nature* 9 (5): 568-- 574, (2003)
- Taverna P., Sedgwick B.: Generation of an Endogenous DNA-Methylating Agent by Nitrosation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 178 (17): 5105–5111, (1996)
- Tricker A.R., Preussmann R.: Carcinogenic N-nitrosamines in the diet: occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential. *Mutation Research* 259 (3-4): 277—289, (1991)
- Trucco C., Oliver F.J., de Murcia G., Ménissier-de Murcia J.: DNA repair defect in poly(ADP-ribose) polymerase-deficient cell lines. *Nucleic Acids Research* 26 (11): 2644–2649, (1998)
- Tsuzuki T., Sakumi K., Shiraishi A., Kawate H., Igarashi H., Iwakuma T., Tominaga Y., Zhang S., Shimizu S., Ishikawa T., Nakamura K., Nakao K., Katsuki M., Sekiguchi M.: Targeted disruption of the DNA repair methyltransferase gene renders mice hypersensitive to alkylating agent. *Carcinogenesis* 17 (6): 1215-1220, (1996)
- Tubbs J.L., Latypov V., Kanugula S., Butt A., Melikishvili M., Kraehenbuehl R., Fleck O., Marriott A., Watson A.J., Verbeek B., McGown G., Thorncroft M., Santibanez-Koref M.F., Millington C., Arvai A.S., Kroeger M.D., Peterson L.A., Williams D.M., Fried M.G., Margison G.P., Pegg A.E., Tainer J.A.: Flipping of alkylated DNA damage

- bridges base and nucleotide excision repair. *Nature* 459, (2009)
- Umar A. und Kunkel T.A.: DNA-replication fidelity, mismatch repair and genome instability in cancer cells. *European Journal of Biochemistry* 238: 297—307, (1996)
- Vijg J., Dolle´ M.E.T., Martus H-J., Boerrigter M.E.T.I.: Erratum to “Transgenic mouse models for studying mutations in vivo: applications in aging research”1. *Mechanisms of Ageing and Development* 99: 257–271, (1997)
- Volker M., Mone´ M.J., Karmakar P., van Hoffen A., Schul W., Vermeulen W., Hoeijmakers J.H.J., van Driel R., van Zeeland A.A., Mullenders L.H.F.: Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors *in vivo*. *Molecular Cell* 8: 312-224, (2001)
- Wakasugi M., Kawashima A., Morioka H., Linn S., Sancar A., Mori T., Nikaido O., Matsunaga T.: DDB Accumulates at DNA Damage Sites Immediately after UV Irradiation and Directly Stimulates Nucleotide Excision Repair. *Journal of Biological Chemistry* 277 (3): 1637-1640, (2002)
- Wang Q-E., Prætorius-Ibba M., Zhu Q., El-Mahdy M.A., Wani G., Zhao Q., Qin S., Patnaik S., Wani A.A.: Ubiquitylation-independent degradation of Xeroderma pigmentosum group C protein is required for efficient nucleotide excision repair. *Nucleic Acids Research* 35 (16): 5338–5350, (2007)
- Wang Q-E., Zhu Q., Wani G., Chen J., Wani A.A.: UV radiation-induced XPC translocation within chromatin is mediated by damaged-DNA binding protein, DDB2. *Carcinogenesis* 25 (6): 1033-1043, (2004)
- Wang W.: A major switch for the Fanconi anemia DNA damage-response pathway. *Nature* 15: 1128-1130, (2008)
- Wang W.: Emergence of a DNA-damgae response network consisting of Fanconi anemia and BRCA proteins. *Nature reviews* 8 (10): 735-748, (2007a)
- Wilson D.M. und Barsky D.: The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutation Research* 485 (4): 283-307, (2001)
- Wogan G.N., Hecht S.S., Felton J.S., Conney A.H., Loeb L.A.: Enviromental and chemical carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology* 14: 473—486, (2004)
- Xu-Welliver M., Pegg A.E.: Degradation of the alkylated form of the DNA repair protein, O<sup>6</sup>-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis* 23 (5): 823—830, (2002)
- Ziehe M.: Untersuchung zur Komplexizität und Dynamik von Cisplatin –DNA -Addukten. Dissertation, (2012)

## Anhang

---

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Aktivität und relative Schutzwirkung zweier konkurrierender DNA-Reparaturwege für O<sup>6</sup>-Methylguanin *in vivo*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Inga Michele befürworte.

Essen, den \_\_\_\_\_

Name des wissenschaftl.	Unterschrift d. wissenschaftl.
Betreuers/Mitglieds der	Betreuers/Mitglieds der
Universität Duisburg-Essen	Universität Duisburg-Essen

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst habe und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift des/r Doktoranden/in

### Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den \_\_\_\_\_

Unterschrift des/r Doktoranden/in



## Lebenslauf

### ■ Persönliche Daten

Name: Inga Michele  
Geburtsdaten: 09.09.1983, in Duisburg  
E-Mail: inga.michele@gmx.de

### ■ Berufserfahrung

12/2009 – 12/2012 Institut für Zellbiologie (Tumorforschung),  
Universitätsklinikum Essen  
**Promotion** Betreuer: PD. Dr. Jürgen Thomale  
**„Aktivität und relative Schutzwirkung zweier konkurrierender DNA-Reparaturwege für O<sup>6</sup>-Methylguanin in vivo“**

**Graduiertenkolleg:** “Transcription, Chromatin Structure and DNA Repair in Development and Differentiation” (GRK 1431),  
Universität Duisburg-Essen

### ■ Studium

09/2008 – 03/2009 Institut für Rechtsmedizin (Altersforschung)  
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf  
**Diplom** Betreuer: Prof. Dr. Stephanie Ritz-Timme,  
Prof. Dr. Christopher Bridges  
**„Intravitale Deiminierung von Arginin-Resten in Histonen humaner Granulozyten“**

10/2003 – 08/2008 Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

### ■ Schule

08/1994 – 06/2003 Gymnasium Otto-Pankok Mülheim/Ruhr  
08/1990 – 07/1994 Grundschule am Lierberg Mülheim/Ruhr

## Anhang

---

### ■ Wissenschaftliches Arbeiten

- 12/2009- Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Institut für Zellbiologie (Tumorforschung),  
12/2012 Universitätsklinikum Essen, Supervisor: PD Dr. J. Thomale  
07/2012 Betreuung Praktikum Medizinische Biologie  
01/2012 Betreuung Praktikum Biologie für Mediziner  
07/2008- 6-wöchiges Forschungspraktikum, Institut für Rechtsmedizin  
08/2008 (Altersforschung), Universitätsklinikum Düsseldorf  
09/2006 2-wöchige Kursteilnahme nach Afrika (Namibia und Südafrika)

### ■ Veröffentlichungen

- 07/2010 Posterpräsentation (Essen, GRK 1431):  
“A novel repair mechanism for O<sup>6</sup>-methylguanine in DNA employs components of the nucleotide excision and the Fanconi anemia pathways” (**Inga D. Michele**, AC. Nickel, P. Andreasen, S. Emmert, S. Navarro, J. Thomale)
- 09/2010 Posterpräsentation (Jena, DGDR): “Fanc-D2-dependent excision repair counteracts the cytotoxic and mutagenic potency of O<sup>6</sup>-methylguanine in mammalian cells” (**Inga D. Michele**, AC. Nickel, P. Andreasen, S. Emmert, S. Navarro, J. Thomale)
- 03/2011 Posterpräsentation (Düsseldorf, AEK): “Molecular und functional characterisation of a novel DNA repair mechanism for O<sup>6</sup>-methylguanine employing components of the nucleotide excision and the Fanconi anemia pathways” (**Inga D. Michele**, AC. Nickel, H. Hanenberg, J. Thomale)
- 09/2012 Posterpräsentation (München, DGDR): “Protective role of different DNA repair pathways for O<sup>6</sup>-methylguanine *in vivo*: relative contribution of MGMT and excision repair” (**Inga D. Michele**, AC. Nickel, B. Ueberle, H. Geiger, J. Thomale)

---

(Inga Michele)